



HAL
open science

Utilisation de la chimie "click" pour visualiser la pénétration de principes actifs dans les protozoaires parasites

Vida Terzic

► To cite this version:

Vida Terzic. Utilisation de la chimie "click" pour visualiser la pénétration de principes actifs dans les protozoaires parasites. Chimie organique. Université Paris-Saclay, 2016. Français. NNT : 2016SACLS190 . tel-02275630v1

HAL Id: tel-02275630

<https://theses.hal.science/tel-02275630v1>

Submitted on 1 Sep 2019 (v1), last revised 7 Oct 2019 (v2)

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.

NNT : 2016SACLS190

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'INSTITUT DE CHIMIE DES SUBSTANCES NATURELLES

ECOLE DOCTORALE N°571

Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et biosystème

Spécialité : Chimie organique

Par

Mlle Vida Terzic

Utilisation de la chimie « click » pour visualiser la pénétration de principes actifs
dans les protozoaires parasites

Thèse présentée à Gif-sur-Yvette, le 31 Août 2016 :

Composition du Jury :

M. Rachid Benhida	Directeur de Recherche, CNRS, Université de Nice	Rapporteur
M. Alain Wagner	Directeur de Recherche, CNRS, Université de Strasbourg	Rapporteur
Mme Florence Mahuteau-Betzer	Chargée de recherche, CNRS, Institut Curie	Examinatrice
Mme Rachel Méallet-Renault	Professeur, Université Paris-Sud 11, ISMO	Présidente
M. Pascal Sonnet	Professeur, CNRS, Université de Picardie	Examineur
Mme Joëlle Dubois	Directrice de Recherche, CNRS, ICSN	Directrice de thèse

Titre : Utilisation de la chimie « click » pour visualiser la pénétration de principes actifs dans des protozoaires parasites

Mots clés : Chimie « click », Dibenzocyclooctynes, Fluorescence, Parasites protozoaires, SPAAC

Résumé : La recherche de nouvelles molécules à activité antiparasitaire pour lutter contre les parasites responsables de maladies telles que le paludisme ou la trypanosomiase humaine africaine est un enjeu primordial car il n'existe pas de vaccin pour ces maladies qui peuvent être mortelles et qui touchent près de 1/6 de la population mondiale. Dans ce contexte, il a été observé au laboratoire que l'amélioration de l'activité des molécules sur une cible isolée ne se retrouvait pas toujours sur les parasites. Une faible entrée de la molécule dans la cellule pourrait être une des causes de ce manque de corrélation, comme cela est souvent le cas dans la recherche de molécules actives.

Pour valider ou non cette cause, ces travaux de thèse ont eu pour but de concevoir, synthétiser et évaluer de nouvelles sondes fluorescentes qui permettraient de visualiser la pénétration de molécules actives dans des cellules, en nous intéressant en particulier aux parasites responsables de la maladie du sommeil et du paludisme.

Notre concept se base sur le principe de la chimie « click », sans catalyseur, impliquant une fonction alcyne et un groupement azoture. Ceci est possible lorsque la fonction

alcyne est insérée dans un cycle tendu comme celui d'un cyclooctyne qui lui confère une plus grande réactivité (Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition).

Nous avons synthétisé des dérivés de la dibenzocyclooctynone, une molécule fluorescente décrite pour réagir sans catalyseur avec des azotures, de manière à obtenir des sondes à détection « on-on' ». Ainsi, sept nouvelles sondes fluorescentes ont été obtenues, dont trois réagissent avec des azotures avec une cinétique adéquate. Les propriétés photophysiques de ces molécules ont été caractérisées et nous avons vérifié qu'elles traversent bien la membrane des protozoaires parasites que nous étudions. La fluorescence n'est observée qu'à l'intérieur du parasite.

La détection d'un azoture *in cellulo* a été vérifiée par HPLC-MS/MS avec une des sondes.

Parmi les sept cyclooctynones obtenues, une sonde forme un adduit triazole fluorescent avec une cinétique acceptable, ce qui constitue le premier exemple de sonde « on-on' » de cette série et une véritable avancée dans la chimie bio-orthogonale.

Title: Utilization of « click » chemistry for the visualization of drug entry into protozoan parasites

Keywords: « Click » chemistry, Dibenzocyclooctynes, Fluorescence, Protozoan parasites, SPAAC

Abstract: The discovery of new molecules with antiparasitic activity is crucial today to fight against infectious diseases such as malaria and HAT since no vaccine is available to cure these diseases. In our search for new antiparasitic compounds, we observed that activity improvement on an isolated target was not seen on parasite. We suspected an ineffective entry of the molecule into the cell to be one of the reasons for these uncorrelated results.

To explore this possibility, this PhD work aimed to design, synthesize and evaluate new fluorescent probes that would allow the visualization of drug entry into parasites responsible for HAT and malaria.

Our concept is based on "click" chemistry that can be achieved without catalyst, between an azide and a strained alkyne like cyclooctyne (Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition).

We synthesized derivatives of dibenzocyclooctynone, a fluorescent molecule described to undergo SPAAC reaction with azides, in order to obtain "on-on'" detection probes. Seven new fluorescent probes were therefore synthesized, among which three of them displayed adequate SPAAC kinetics. Photophysical properties of these molecules were characterized and their penetration into protozoan cells was demonstrated. Fluorescence was only observed in the parasitic cytosol.

In cellulo azide detection was achieved and verified by LC-MS/MS with one of our probes.

One out of the seven probes formed a fluorescent triazole adduct, which constitutes the first example of an « on-on' » probe for this series and a real progress in bioorthogonal chemistry.

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été effectués au sein de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN, Gif-sur-Yvette). Je tiens à remercier les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué au bon déroulement de ce travail de thèse de doctorat.

Je remercie le Pr. Max Malacria, ancien directeur de l'ICSN, et le Dr. Angela Marinetti, directrice de l'ICSN, de m'avoir permis d'effectuer ce travail de thèse de doctorat dans de bonnes conditions.

Je remercie la Fondation pour la Recherche Médicale pour le financement de ces travaux.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma directrice de thèse, le Dr. Joëlle Dubois, Directrice de Recherche à l'ICSN, pour m'avoir accueillie dans son équipe et avoir dirigé directement ces travaux tout au long de ces trois années.

Je remercie sincèrement les membres du jury. Je suis très reconnaissante envers le Dr. Rachid Benhida, Directeur de Recherche à l'ICN (Nice) et le Dr. Alain Wagner, Directeur de Recherche au LFCS (Strasbourg) d'avoir accepté le rôle de rapporteur et d'avoir accordé un temps précieux à ce manuscrit. Ma gratitude s'adresse également au Pr. Pascal Sonnet, Professeur à (Amiens), au Dr. Florence Mahuteau-Betzer, Chargée de Recherche à l'Institut Curie (Orsay) et au Pr. Rachel Méallet-Renault, Professeur à l'ISMO (Orsay) pour l'honneur qu'ils m'ont fait de juger ce travail.

Je souhaite profondément remercier les personnes avec lesquelles j'ai pu collaborer au cours de ces travaux de thèse, qui ont ainsi participé à leur valorisation tout en me permettant d'acquérir de nouvelles connaissances et de vivre une expérience particulièrement enrichissante : le Pr. Philippe Grellier, collaborateur du projet, qui m'a accueillie dans son laboratoire (MNHN, Paris) et m'a permis de m'initier à la parasitologie, ainsi qu'Elisabeth Mouray pour son aide pour les tests de toxicité. Je remercie chaleureusement le Pr. Rachel Méallet-Renault pour m'avoir initiée à la photophysique et pour son aide précieuse lors de ces trois années, ainsi que le Dr. Gilles Clavier (ENS Cachan), que j'ai pu rencontrer par l'intermédiaire de Rachel, pour ses calculs de modélisation qui ont joués un rôle clé dans le dénouement de cette thèse. Merci également à Arnaud Brosseau pour son aide lors des expériences de détermination des durées de vie de fluorescence. Je tiens aussi à remercier Marc Gèze et Cyril Willig (CeMIM, Paris) pour leur accueil et pour m'avoir permis de visualiser ces molécules in cellulo au microscope de fluorescence. Je remercie vivement Nathalie Hue (service HPLC, ICSN) pour son travail conséquent lors des expériences de détection in cellulo. Enfin, je remercie les équipes 45 et 34 pour m'avoir permis d'utiliser leur matériel pour la partie finale de ce projet.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance aux différents services de l'ICSN sans lesquels il n'aurait été possible de mener à bien ces travaux de thèse. Ainsi, je tiens à remercier Jean-François Gallard et Karim Hammad du service RMN, Vincent Guérineau et Nicolas Elie du service de masse, Guillaume Loire et David Lê du service informatique. Je remercie également Odile Thoison et Franck Pélissier du service HPLC, ainsi que Didier Dufossé et José Das-Neves du magasin. Enfin, je remercie les agents d'entretien, Marta Pires et ses collègues, pour leur sympathie et leur joie de vivre.

En intégrant l'équipe 48, j'ai pu rencontrer des personnes que je ne pourrais oublier. En particulier Sylviane Thoret ma formidable collègue et amie. Je remercie aussi Marion Thévenin, ancienne

doctorante de l'équipe que j'ai pu côtoyer en début de thèse. Je remercie les stagiaires, Nathalie Delaperle et Géraldine Chauvel, mais aussi Julie Le Bescont et Mathilde Gréco, que j'ai pu encadrer. Enfin, je remercie Tanja Grayferf, doctorante en co-tutelle.

Je tiens aussi à remercier Fanny Roussi, Vincent Dumontet et Olivier Pamlard, actuels ou ex-compagnons du café matinal quotidien.

Je remercie vivement les personnes extérieures à l'équipe que j'ai pu rencontrer pour leur aide et leur bonne humeur : Benjamin Darses, Romain Rodrigues, Rémy Jouclas, Cécile Mons, Aurélie Baron, Marie-Ange Badet, Philippe Durand, Mathilde Corbin... Je remercie aussi vivement et profondément Laura Fourmois et Audrey Dumoulin. Merci également à toutes les autres personnes que j'ai été amenée à côtoyer durant ces trois années.

Pour finir, je tiens à profondément remercier mon entourage pour leur soutien extraordinaire.

Sommaire

Remerciements	5
Abréviations utilisées	13
Introduction générale.....	19
Partie bibliographique.....	25
Chapitre I : Généralités.....	27
I – <i>Trypanosoma brucei</i>	27
I.1. Le cycle de vie de <i>Trypanosoma brucei</i>	28
I.1.1. Chez l’Homme.....	28
<i>La phase lymphatico-sanguine</i>	28
<i>La phase neurologique</i>	29
I.1.2. Chez la glossine.....	29
I.2. La trypanosomiase humaine africaine	29
II – <i>Plasmodium falciparum</i>	31
II.1. Le cycle de vie de <i>Plasmodium falciparum</i>	32
II.1.1. Chez l’Homme.....	33
<i>La phase hépatique</i>	33
<i>La phase érythrocytaire asexuée</i>	34
<i>La phase érythrocytaire sexuée</i>	35
II.1.2. Chez l’anophèle femelle	35
<i>La phase sexuée</i>	35
<i>La phase asexuée</i>	35
II.2. Le paludisme.....	36
Chapitre II : Réactions bio-orthogonales et chimie « click »	38
I – Introduction au concept.....	38
II - Les réactions polaires.....	39
II.1. Réactions d’addition sur un carbonyle.....	39
II.2. Réaction de Staudinger	42
III - Les réactions de cycloadditions.....	42
III.1. Les cycloadditions de Diels-Alder	43
III.2. Les cycloadditions dipolaires.....	45
III.2.1. Cycloadditions 1,3-dipolaires dont le dipôle est une fonction azoture.....	46
<i>Réaction de Huisgen et Cycloaddition Azoture-Alcyne Catalysée par le Cuivre(I) (CuAAC)</i>	46
<i>Cycloaddition Azoture-Alcyne Promue par Tension de Cycle (SPAAC)</i>	48
<i>Cas particuliers de SPAAC à substrats fluorogéniques</i>	50

<i>Cycloaddition des azotures avec des fonctions alcènes : cas de l'oxanorbornadiène</i>	51
III.2.2. Cycloadditions 1,3-dipolaires alternatives.....	52
<i>Cycloaddition Nitronne-Alcyne Promue par Tension de Cycle (SPANC)</i>	52
<i>Cycloaddition 1,3-dipolaire dont le dipôle est une fonction oxyde de nitrile</i>	53
III.3. Cas particuliers de cycloadditions	54
III.3.1. Cycloaddition Sydnone-Alcyne Promue par Tension de Cycle (SPSAC).....	54
III.3.2. Cycloaddition [2 + 2 + 2] des quadricyclanes.....	54
IV - Versions organométalliques de la bio-orthogonalité	55
IV.1. Réactions de couplage catalysées au palladium	55
IV.1.1. Réaction de Mizoruki-Heck	55
IV.1.2. Couplage de Sonogashira	55
IV.1.3. Couplage de Suzuki-Miyuara	56
IV.2. Métathèse croisée d'oléfines.....	57
V – Réactions « photo-click » : vers une réactivité bio-orthogonale « sur demande »	58
Conclusion	59
Chapitre III : Applications de la chimie bio-orthogonale	62
I – Protéines.....	62
II – Glycanes.....	64
III – Lipides.....	65
IV – Acides nucléiques	66
Conclusion	67
Projet de recherche	69
Approche initiale : Dibenzocyclooctynes fluorescents de 1^{ère} génération	75
Chapitre I : Rappels bibliographiques	77
I – Fluorescence.....	77
I.1. Principe.....	77
I.2. Principales caractéristiques d'un fluorophore	78
I.2.1. Spectres d'absorption et d'émission	78
I.2.2. Déplacement de Stokes	78
I.2.3. Rendement quantique de fluorescence	79
I.2.4. Intensité de fluorescence	79
I.2.5. Durée de vie de fluorescence	80
I.2.6. Constantes de vitesse radiative et non radiative	81
I.3. Facteurs environnementaux influençant la fluorescence	81
I.4. Facteurs moléculaires influençant la fluorescence	83
I.4.1. Extension du système π -conjugué.....	83
I.4.2. Substitution des composés aromatiques	83

I.4.3. Transfert de charge intramoléculaire	86
II – Préparation des carbocyclooctanes et synthèse de cycloalcynes	87
II.1. Préparation des carbocyclooctanes	87
I.1.1. Formation de liaisons C-C intramoléculaires	88
I.1.2. Fragmentation	88
I.1.3. Extension de cycle	89
II.2. Préparation des cycloalcynes	90
II.2.1. Préparation de cyclopropénones	92
II.2.2. Exemple de la méthode E	92
II.3. Exemples de voies de synthèse de cyclooctynes	93
II.3.1. Cyclooctynes simples	93
II.3.2. Dibenzocyclooctynes	95
Chapitre II : Synthèse de dérivés du céto-DIBO « de première génération »	100
I – Formation du phénylacétaldéhyde	101
II – Formation du dibenzocycloocténoïl	103
III – Formation du cycloalcyne	107
IV – Obtention des sondes dibenzocyclooctynones	109
Chapitre III : Evaluation des sondes « de première génération »	112
I – Propriétés photophysiques	112
II – Réactivité vis-à-vis des azotures	116
III – Comportement en milieu biologique	118
III.1. – Imagerie de fluorescence	118
III.1.1. Marquage de <i>Plasmodium falciparum</i>	119
III.1.2. Marquage de <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	120
III.2. – Evaluation de la toxicité	121
III.2.1. Tests d'inhibition de la croissance sur les parasites	121
<i>Résultats sur Trypanosoma brucei</i>	121
<i>Résultats sur Plasmodium falciparum</i>	122
III.2.2. Résultats sur les lignées de cellules de myoblastes de rats L6	122
Chapitre IV : Marquage sur <i>T. brucei</i>	124
I – Méthodes de détection	127
II – Réaction de chimie « click » <i>in cellulo</i>	127
II.1. Incubation initiale de l'azoture	128
II.2. Incubation initiale du cyclooctyne	130
Conclusion	133
Synthèse de dibenzocyclooctynes fluorescents par photochimie : sondes de 2^{ème} génération	135
Chapitre I : Etudes de modélisation	137

I – Etude du céto-DIBO et de ses adduits synthétisés	137
I.1. Résultats pour le céto-DIBO	137
I.2. Cas particulier du DINO	139
II – Calculs de prévision : vers des adduits fluorescents	140
II.1. Influence des substituants sur le triazole	140
II.1.1. Groupements électroattracteurs	140
II.1.2. Groupements électrodonneurs	141
II.2. Résultats sur les dipolarophiles 3,8-disubstitués	143
Chapitre II : Synthèse de dérivés du céto-DIBO « de deuxième génération »	145
I – Stratégie initiale basée sur un intermédiaire d'éther d'énol silylé	146
I.1. Obtention de la benzoïne silylée	146
I.2. Réarrangement de Brook	147
I.3. Essais de double alkylation de Friedel-Crafts	148
II – Stratégie secondaire	149
II.1. Description de la voie de synthèse	149
II.2. Synthèse du céto-3,8-diméthoxydibenzocyclooctyne	150
II.2.1. Obtention du benzylphénylcarbinol	150
<i>Par réaction de Grignard (Voie A)</i>	<i>150</i>
<i>Par réaction de Wittig, suivi d'une hydroboration/oxydation (Voie B)</i>	<i>151</i>
II.2.2. Formation de la cyclopropénone intracyclique	152
II.2.3. Obtention du cycloalcyne par photodécarbonylation	153
II.2.4. Obtention de la dibenzocyclooctynone	154
Chapitre III : Evaluation des sondes « de deuxième génération »	156
I – Propriétés photophysiques	156
II – Réactivité vis-à-vis des azotures	158
II.1. Réaction SPAAC	158
II.2. Etude cinétique	159
II.3. Etudes du 1,4-triazole de benzyle du 3,8-céto-DMDIBO	160
II.3.1. Propriétés photophysiques	160
II.3.2. Etude de modélisation moléculaire	161
III – Comportement en milieu biologique	163
III.1. Imagerie de fluorescence	163
III.1.1. Marquage de <i>P. falciparum</i>	163
III.1.2. Marquage de <i>T. brucei</i>	164
III.2. Evaluation de la toxicité	164
III.2.1. Tests d'inhibition de la croissance sur <i>T. brucei</i>	165
III.2.2. Tests d'inhibition de la croissance sur <i>P. falciparum</i>	165

Conclusion	166
Conclusion générale	167
I – Sondes de première génération	169
II – Sondes de deuxième génération	170
III – Perspectives.....	171
Partie expérimentale	173
Chapitre I : Généralités	175
I – Solvants et réactifs	175
II - Chromatographies sur couche mince, épaisse et flash.....	175
III - Appareils d'analyse	175
III.1. Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	175
III.2. Spectrométrie de masse (SM)	176
III.3. Spectrométrie UV-visible.....	176
III.4. Spectrométrie de fluorescence	176
III.5. Fluorescence résolue en temps par comptage de photons	177
III.6. Rayonet RPR-100.....	178
III.7. Infrarouge (IR)	179
III.8. Point de fusion (Pf).....	179
III.9. Chromatographie liquide à ultra-haute pression (UPLC)	179
IV - Appareil micro-ondes.....	179
V – Microscopie de fluorescence	180
VI – Matériel et tests biologiques.....	180
VI.1. Culture des parasites.....	180
VI.1.1. Culture de <i>P. falciparum</i>	180
VI.1.2. Culture de <i>T. brucei</i>	181
VI.2. Test d'inhibition de la croissance des parasites.....	181
VI.2.1. Evaluation <i>in cellulo</i> de l'activité antipaludique.....	181
VI.2.2. Evaluation <i>in cellulo</i> de l'activité trypanocide.....	182
VII - Modélisation	182
VII.1. Calculateur et logiciels	182
VII.2. Optimisation de géométrie à l'état fondamental	183
VII.3. TD-DFT.....	183
VIII – Visualisation de la chimie « click » par LC-MS/MS.....	183
VIII.1. Préparation des formes sanguines de <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	183
VIII.2. Protocole d'incubation initiale des parasites avec le TAMRA-N ₃	183
VIII.2.1. Marquage par chimie « click » <i>in cellulo</i>	183
VIII.2.2. Témoin TAMRA-N ₃	184

VIII.2.3. Témoin céto-TMDIBO	184
VIII.2.4. Protocoles d'extraction des culots	184
VIII.3. Protocole d'incubation initiale des parasites avec le céto-TMDIBO	184
VIII.3.1. Marquage par chimie « click » <i>in cellulo</i>	184
VIII.3.2. Témoin TAMRA-N ₃	184
VIII.3.3. Témoin céto-TMDIBO	185
VIII.3.4. Protocoles d'extraction des cellules de parasites	185
<i>Extraction des culots</i>	185
<i>Extraction des échantillons de lavage</i>	185
VIII.4. Procédure pour l'analyse des échantillons par LC-MS/MS	185
IX - Protocoles expérimentaux	189
IX.1. Détermination du rendement quantique de fluorescence (Φ_f)	189
IX.2. Détermination de la durée de vie de fluorescence (τ_f)	190
IX.3. Détermination de la constante de vitesse de second ordre (k_2).....	190
Chapitre II : Produits synthétisés	191
Protocoles généraux.....	191
Protocole A : Transformation du dibenzocyclooctène en dibenzocyclooctyne	191
Protocole B : Oxydation du benzocyclooctynol.....	191
Protocole C : Réaction de chimie « click ».....	191
Protocole D : Réaction de dimérisation d'aldéhydes en éther cyclique	192
Protocole E : Réaction d'ouverture de l'éther cyclique.....	192
Protocole F : Protection de la fonction alcool du dibenzocycloocténol.....	192
Protocole G : Déprotection de la fonction alcool du dibenzocyclooctynol.....	192
Protocole H : Réaction de double alkylation de Friedel-Crafts	193
Protocole I : Réaction de photolyse de la cyclopropénone.....	193
Bibliographie	194

Abréviations utilisées

- A** Ac : acétate
ACN : acétonitrile
ADN : acide désoxyribonucléique
AE : acétate d'éthyle
AL : acide de Lewis
APPI : photo-ionisation à pression atmosphérique
Ar : aryle
- B** Bn : benzyle
BSA : albumine de sérum bovin
Bu : butyle
BV : orbitale la plus basse vacante
- C** Cat : catalyseur
CCM : chromatographie sur couche mince
Cl₅₀ : concentration de produit inhibant 50% de l'activité de l'enzyme considérée
COSY : Correlation Spectroscopy
- D** d : doublet
Da : dalton
DCE : dichloroéthane
DCM : dichlorométhane
DEPT : Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO : diméthylsulfoxyde
- E** ém : émission
éq. : équivalent
ERO : espèces réactives de l'oxygène
ESI : ionisation par electrospray
Et : éthyle
ex : excitation
- F** FPP : pyrophosphate de farnésyle
FTase : protéine farnésyltransférase
- H** hFTase : protéine farnésyltransferase humaine
HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Cohorence
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence
HOMO : orbitale moléculaire la plus haute occupée
Hz : Hertz

I ICSN : Institut de Chimie des Substances Naturelles
Im : imidazole
IR : infrarouge

L LDA : diisopropylamide de lithium
LUMO : orbitale moléculaire la plus basse inoccupée

M m : multiplet
m : *mé*ta
MALDI : matrix-assisted laser desorption/ionisation
*m*CPBA : acide *m*-chloroperbenzoïque
Me : méthyle
MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle
MO : micro-ondes

N NBS : N-bromosuccinimide
n.d. : non déterminé

O *o* : *ortho*
OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P *p* : *para*
P. : *Plasmodium*
PBS : tampon phosphate salin
P.f. : *Plasmodium falciparum*
Ph : phényle
ppm : partie par million

Q quant. : quantitatif

R Rdt : rendement
RMN : résonance magnétique nucléaire

S s : singulet
SM : spectrométrie de masse
S_N2 : substitution nucléophile de type 2
S_NAr : substitution nucléophile aromatique

T t : temps
t : triplet
t : *tert*

T. : *Trypanosoma*

T° : température

TA : température ambiante

T.b. : *Trypanosoma brucei*

TbFTase : protéine farnésyltransférase de *Trypanosoma brucei*

Tf : triflate

THF : tétrahydrofurane

TMS : triméthylsilyle

U UV : ultraviolet

Introduction générale

La principale thématique du laboratoire consiste en la recherche de nouvelles molécules à activité antiparasitaire pour lutter contre les agents infectieux responsables de maladies telles que le paludisme ou la trypanosomiase humaine africaine. Ces maladies tropicales dues à des protozoaires parasites affectent plus de 1/6 de la population mondiale et représentent actuellement des problèmes majeurs de santé reconnus par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Cependant, les médicaments pour soigner ces maladies parasitaires sont en général très toxiques et souvent inefficaces à cause du développement de résistances. De ce fait, la découverte et la mise en place de nouveaux traitements est primordiale pour lutter contre ces maladies pouvant être mortelles sans soin.

Les molécules synthétisées au laboratoire ont pour but de cibler la voie de prénylation des protéines intervenant dans la croissance du parasite. La cible principale est la protéine farnésyltransférase (FTase), une enzyme cytosolique qui catalyse une réaction de transfert d'un groupement farnésyle sur la cystéine C-terminale d'une protéine, permettant ainsi son bon adressage à la membrane (plasmique ou non). La FTase a été initialement validée en tant que cible anticancéreuse¹ en 1999 et a été l'objet de nombreuses synthèses d'inhibiteurs (les FTIs), dont certains sont allés jusqu'en phase II d'essais cliniques.² Toutefois, dès 1998, des études ont montré son rôle indispensable à la survie de *Trypanosoma brucei* (parasite responsable de la trypanosomiase humaine africaine), ainsi qu'à celle de *Plasmodium falciparum* (parasite responsable des cas les plus fréquents de paludisme et les plus mortels).³ Mais ce n'est qu'en 2005 qu'elle a été validée comme nouvelle cible antiparasitaire.⁴

Dans ce contexte de recherche de nouveaux agents antiparasitaires dans le domaine des inhibiteurs de la prénylation de protéines, un criblage de composés présents dans la chimiothèque de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) a été réalisé en 2006 sur la FTase. Il a permis de faire apparaître une nouvelle famille d'inhibiteurs comportant une structure originale : un arylthiophène tétrasubstitué (Figure 1).

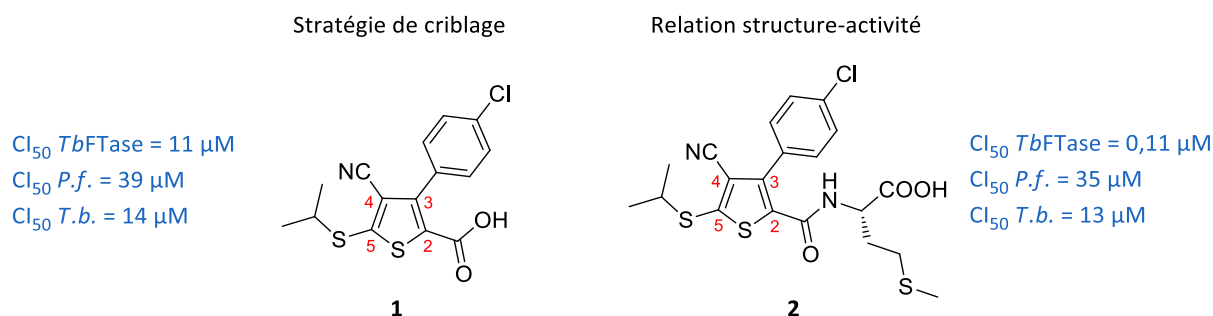


Figure 1 : Structure et évaluation biologique de composés arylthiophènes tétrasubstitués

¹ Oliff, A. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Rev. Cancer* **1999**, *1423*, C19–C30.

² Cestac, P.; Doisneau-Sixou, S.; Favre, G. *Ann. Pharm. Fr.* **2005**, *63*, 76–84.

³ Yokoyama, K.; Trobridge, P.; Buckner, F. S.; Scholten, J.; Stuart, K. D.; Van Voorhis, W. C.; Gelb, M. H. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1998**, *94*, 87–97.

⁴ Eastman, R. T. J. *Lipid Res.* **2005**, *47*, 233–240.

Des études de relation structure-activité avec la synthèse de plus d'une centaine d'analogues, réalisées au cours des travaux de thèse des Dr. S. Lethu⁵ et D. Bosc,⁶ ont permis de gagner en activité sur l'enzyme isolée d'un facteur 100 lorsque l'on remplace l'acide carboxylique en position 2 par une méthionine (**2**, Figure 1). Toutefois, les tests sur parasites ont abouti à des valeurs identiques à celles obtenues en absence de méthionine (**1**, Figure 1), ce qui a soulevé deux problématiques majeures : la FTase est-elle la vraie cible de ces composés ? Sont-ils capables de traverser la membrane de la cellule pour l'atteindre ?

Pour répondre à la première, il faudrait vérifier si ces composés bloquent la farnésylation de protéines. Pour cela, les cellules pourraient être incubées avec un farnésyle modifié, greffé par exemple d'une fonction azoture. Après son incorporation métabolique, les protéines modifiées seraient détectées avec un groupement triarylphosphine biotinylé, *via* une version « click » de la réaction de Staudinger. Ce test a été décrit sur des cellules de mammifères⁷ et son développement sur parasites est en cours mais ne sera pas traité ici.

Les travaux de cette thèse porteront sur la réponse à la deuxième problématique : est-il possible que la faible activité antiparasitaire observée *in cellulo* soit due à une pénétration insuffisante de ces composés ? Ceci pourrait répondre à un problème récurrent dans le processus de recherche de nouvelles molécules médicaments, bien en amont de la transition aux essais cliniques : beaucoup d'exemples de composés sont en effet décrits comme ayant une forte affinité avec leur cible *in vitro* mais deviennent inutiles au sens clinique en échouant à atteindre leur cible *in vivo*. La pharmacocinétique explique souvent les raisons de cet échec : cela dépend de l'efficacité avec laquelle la molécule est absorbée par l'organisme, la zone dans laquelle elle est distribuée et la vitesse avec laquelle elle est métabolisée et excrétée. L'optimisation de ces propriétés ADME (Absorption, Distribution, Métabolisation, Excrétion) est couramment réalisée pour les composés hit, grâce à de nombreuses méthodes disponibles. Néanmoins, une autre explication à cet échec pourrait être sa difficulté à entrer dans la cellule.

Il n'existe aujourd'hui aucune façon simple de répondre à cette question. Une solution de facilité serait d'utiliser la radioactivité en synthétisant les dérivés radioactifs de ces composés et de visualiser ensuite leur localisation. Mais cette technique n'est pas sans risques et présente diverses contraintes : la radiosynthèse peut se révéler fastidieuse et nécessite des locaux et une formation adaptés. D'autant plus que la gestion et le stockage des déchets radioactifs sont onéreux et soumis à des normes strictes.

Une alternative plus favorable mais plus complexe serait une détection par fluorescence. En effet, un simple greffage d'un fluorophore commercial au composé étudié risque de fausser les résultats en modifiant par exemple ses propriétés physico-chimiques : la molécule d'intérêt est-elle entrée dans la cellule grâce aux propriétés du fluorophore ? Ou est-elle restée à l'extérieur car ce dernier est trop polaire ou possède un poids moléculaire élevé ? De plus, l'utilisation de fluorophores commerciaux est impliquée en général dans la détection de biomolécules de poids moléculaire élevé, contrairement à notre cas.

⁵ Lethu, S. « Etudes des relations structure-activité des 3-arylthiophènes : une nouvelle classe d'inhibiteurs de la protéine farnésyltransférase ». *Université Paris-Sud XI*, **2009**, Gif-sur-Yvette.

⁶ Bosc, D. « Synthèse et évaluation biologique d'hétérocycles à cinq chaînons, inhibiteurs de la protéine farnésyltransférase ». *Université Paris-Sud XI*, **2011**, Gif-sur-Yvette.

⁷ Kho, Y.; Kim, S. C.; Jiang, C.; Barma, D.; Kwon, S. W.; Cheng, J.; Jaunbergs, J.; Weinbaum, C.; Tamanoi, F.; Falck, J.; Zhao, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 12479-12484.

Le but de cette thèse est de développer comme outil fluorescent des molécules qui jouent le rôle de sondes capables de détecter de petites molécules intracellulaires en se liant covalamment à elles. Elles doivent être capables de traverser les membranes et de ne s'accumuler que dans le cytosol des parasites que nous étudions sans perturber leur métabolisme. Ceci tout en offrant une émission de fluorescence différente une fois liée au composé d'intérêt pour permettre de différencier les signaux de la sonde libre et de la sonde couplée.

La première partie de ce manuscrit résumera les données bibliographiques concernant les parasites étudiés (*T. brucei* et *P. falciparum*), ainsi que les différentes réactions bio-orthogonales décrites, suivies de leurs applications.

Le reste du manuscrit traitera des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse. Il exposera la synthèse des diverses sondes obtenues et leur réactivité vis-à-vis de la réaction « click », leurs propriétés de fluorescence et leur évaluation biologique. Cette partie sera divisée en deux sections correspondant aux deux démarches engagées pour l'élaboration de ces sondes.



Partie
bibliographique

Chapitre I : Généralités

I – *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei est une espèce de parasite protozoaire faisant partie du genre *Trypanosoma* responsable de la trypanosomiase africaine, appelée aussi maladie du sommeil. Il s'agit d'un organisme unicellulaire eucaryote qui change plusieurs fois de morphologie au cours de son cycle de vie mais qui conserve les caractéristiques principales d'une cellule eucaryote (Figure 2) : un noyau contenant son information génétique, des organites comme l'appareil de Golgi ou le réticulum endoplasmique ainsi qu'une mitochondrie particulière. En effet, cette dernière est unique, s'étend tout le long du parasite et son ADN mitochondrial est arrangé en un réseau très serré appelé kinétoplaste. Pour cette raison, de tels parasites peuvent également être appelés kinétoplastides.

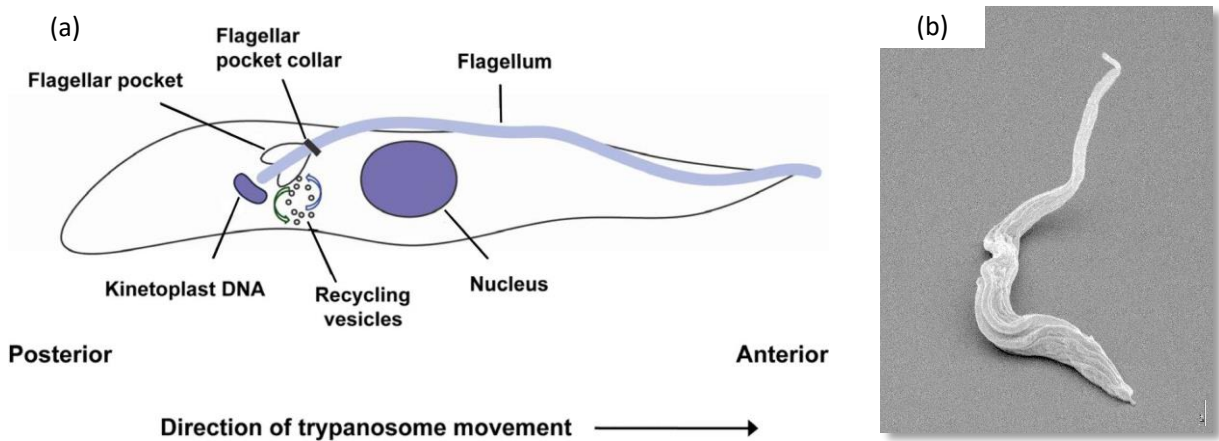


Figure 2 : (a) Schéma général⁸ et (b) vue aux rayons X⁹ de *Trypanosoma brucei*

Une autre particularité, plus visuelle, est la présence d'un flagelle, unique, présent à chaque stade du développement du parasite, et qui résulte de l'invagination de la membrane plasmique à l'extrémité postérieure. C'est un organe essentiel à la survie du parasite et qui est multifonctionnel : il a tout d'abord un rôle principal dans la motilité du parasite, particulièrement énergique, permettant la propulsion cellulaire mais aussi l'invasion des tissus notamment grâce à sa manière de se mouvoir.

Il intervient dans la morphogénèse et la division cellulaire en définissant et en orientant l'axe de division, et il est également impliqué dans la signalisation cellulaire et la transduction du signal. En effet, la membrane flagellaire interagit avec l'environnement extérieur et exhibe une composition distincte en lipides et protéines du reste de la surface de la cellule, qui lui permet de s'attacher aux tissus de l'hôte. Enfin, cette membrane abrite un grand nombre de facteurs de virulence et permet aussi au parasite d'échapper efficacement au système immunitaire en modifiant rapidement la nature des antigènes et glycoprotéines exprimés à la surface membranaire.

⁸ Rudenko, G. *Essays Biochem.* **2011**, 51, 47–62.

⁹ Redecke, L.; Nass, K.; DePonte, D. P.; White, T. A.; Rehders, D.; Barty, A.; Stellato, F.; Liang, M.; Barends, T. R. M.; Boutet, S.; Williams, G. J.; Messerschmidt, M.; Seibert, M. M.; Aquila, A.; Arnlund, D.; Bajt, S.; Barth, T.; Bogan, M. J.; Caleman, C.; Chao, T.-C.; Doak, R. B.; Fleckenstein, H.; Frank, M.; Fromme, R.; Galli, L.; Grotjohann, I.; Hunter, M. S.; Johansson, L. C.; Kassemeyer, S.; Katona, G.; Kirian, R. A.; Koopmann, R.; Kupitz, C.; Lomb, L.; Martin, A. V.; Mogk, S.; Neutze, R.; Shoeman, R. L.; Steinbrener, J.; Timneanu, N.; Wang, D.; Weierstall, U.; Zatsepin, N. A.; Spence, J. C. H.; Fromme, P.; Schlichting, I.; Duszynski, M.; Betzel, C.; Chapman, H. N. *Science* **2013**, 339, 227–230.

Ce parasite se reproduit et se multiplie par scissiparité ou division binaire, un mode de développement asexué conduisant à la séparation d'un individu pour donner deux clones.

I.1. Le cycle de vie de *Trypanosoma brucei*

La survie de *Trypanosoma brucei* dépend de deux hôtes, un hôte intermédiaire et vecteur, représenté par la mouche tsé-tsé ou glossine, et un hôte définitif, le mammifère. Le cycle de vie d'un tel parasite comporte deux cycles (Figure 3) où chaque stade est gouverné par un programme d'expression de gènes spécifiques et marqué par des différenciations cellulaires et métaboliques.

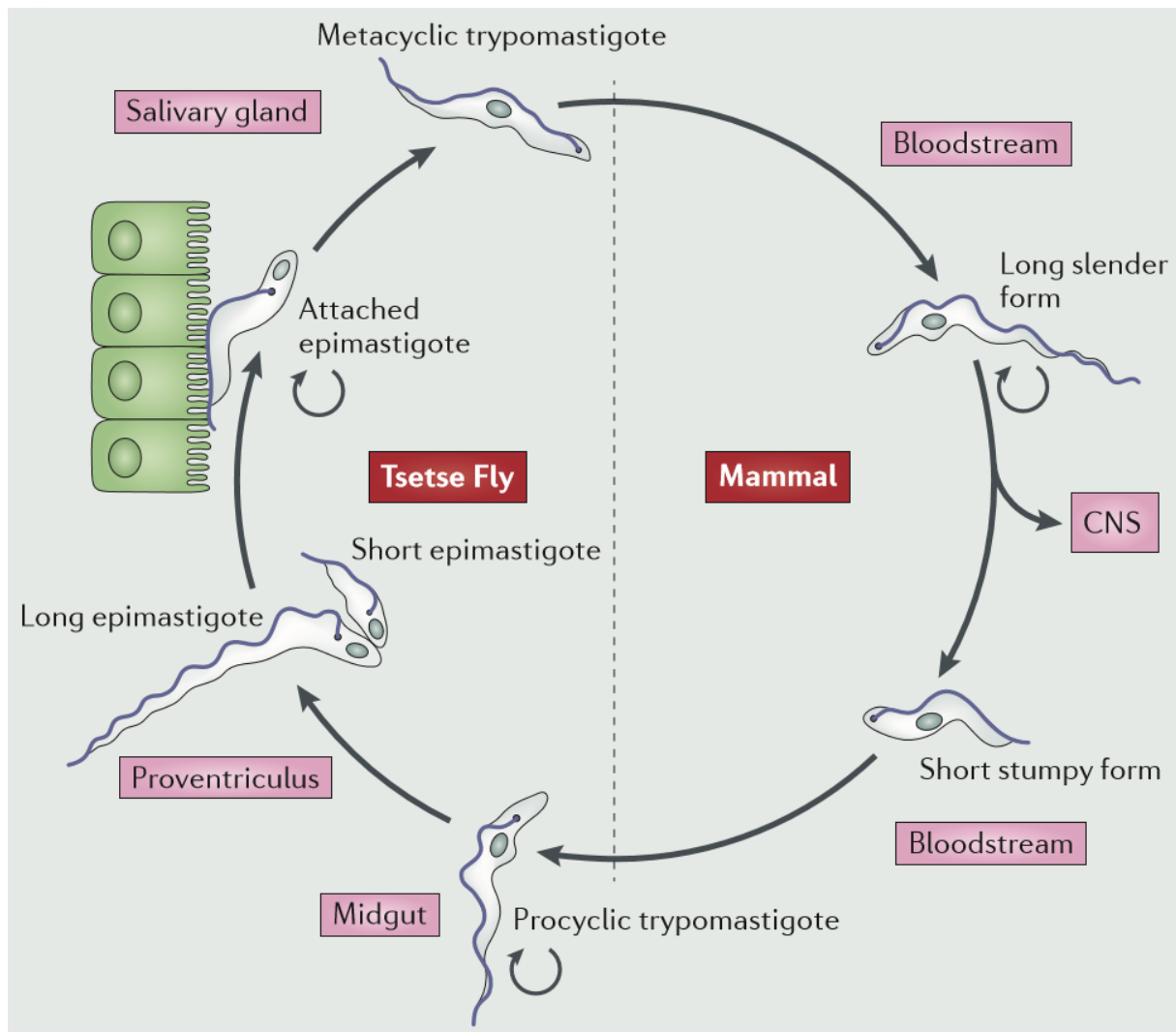


Figure 3 : Cycle de vie de *Trypanosoma brucei*¹⁰

I.1.1. Chez l'Homme

La phase lymphatico-sanguine

Le premier cycle débute chez l'Homme lorsqu'une glossine porteuse du parasite va le piquer en prenant son repas sanguin, et transmettre par sa salive des trypomastigotes métacycliques, forme infectieuse du parasite chez l'être humain caractérisée par la position post-nucléaire du kinétoplaste.

¹⁰ Langousis, G.; Hill, K. L. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 505–518.

Dans un premier temps, ils se retrouvent dans les tissus sous-cutanés et dans les systèmes sanguin et lymphatique où ils se différencient et se multiplient quasi-spontanément par scissiparité en trypomastigotes sanguins à forme allongée. Cette étape du développement est appelée phase lymphatico-sanguine et est caractérisée par des poussées de fièvre, des céphalées, des douleurs articulaires ou encore des démangeaisons. En effet, les formes sanguines de trypanosomes allongés envahissent l'organisme entier en étant transportés à différents sites par la circulation sanguine. Ils sont capables de traverser différentes membranes et d'envahir différents types de tissus, comme le tissu conjonctif. Ils échappent très efficacement au système immunitaire, qui ne s'adapte pas assez vite dans sa fabrication de nouveaux anticorps. Sa concentration dans le sang est donc cyclique ce qui influence les symptômes. D'autre part, étant dans le sang, ils peuvent également traverser la membrane du placenta et infecter le fœtus.

La phase neurologique

A un stade avancé, les trypomastigotes de forme allongée peuvent franchir la barrière hémato-encéphalique, ce qui constitue la deuxième phase d'invasion du parasite qui est mortelle sans traitement. Lorsqu'il envahit le système nerveux central, différents symptômes caractéristiques se manifestent comme des troubles sensoriels et de coordination, un état confusionnel mais aussi des troubles du sommeil, origine du nom de la maladie.

I.1.2. Chez la glossine



Figure 4 : Mouche tsé-tsé¹¹

Les trypanosomes à forme allongée se différencient chez l'Homme en une forme trapue et plus courte, qui ne se divise pas. Ainsi libres dans le sang, ces formes peuvent être prélevées à nouveau par la glossine (Figure 4), ce qui constitue son deuxième cycle de vie. Les parasites de forme trapue se transforment en trypomastigotes procycliques dans son intestin où ils s'y divisent toujours par scissiparité. Ils quittent ensuite les intestins de l'insecte et se transforment en épimastigotes (forme caractérisée par la position pré-nucléaire du kinétoplaste), qui migrent aux glandes salivaires où ils s'attachent à la membrane des cellules épithéliales des glandes par le flagelle (Figure 3). Les épimastigotes se multiplient et se différencient en trypomastigotes métacycliques, capables de se détacher de l'épithélium des glandes salivaires et de se concentrer dans la salive de l'insecte, en attendant d'être transmis à un autre mammifère.

I.2. La trypanosomiase humaine africaine

La trypanosomiase humaine africaine, également connue sous le nom de maladie du sommeil, fait partie des maladies tropicales négligées, comme la leishmaniose ou la maladie de Chagas. C'est une infection parasitaire endémique localisée en Afrique intertropicale, causée par un parasite protozoaire flagellé, *Trypanosoma brucei*, dont il existe deux sous-espèces transmissibles à l'Homme :

¹¹ <http://www.warrenphotographic.co.uk/>.

- *Trypanosoma brucei gambiense* : trouvé en Afrique centrale et occidentale, il provoque une atteinte chronique qui peut rester à l'état passif pendant des mois voire des années, et est responsable de plus de 90% des cas ;
- *Trypanosoma brucei rhodesiense* : rencontré en Afrique orientale et méridionale, il est à l'origine d'infections zoonotiques et aiguës et représente moins de 10% des cas signalés.

Cette maladie conduit à la mort en absence de traitement. Selon l'OMS, 3796 personnes ont été infectées en 2014, mais entre 1999 et 2014 le nombre de cas détectés dus à la forme chronique (*T.b. gambiense*) a chuté de 77% et le nombre de nouveaux cas dus à la forme aiguë (*T.b. rhodesiense*) a diminué de 71%, grâce aux campagnes de prévention massives réalisées dans les 37 pays concernés.¹²

La transmission de *T. brucei* se fait par piqûre d'une glossine, appelée plus communément mouche tsé-tsé. Dans certaines situations, la contamination peut être due à une seringue souillée ou être transmise au fœtus lors de la grossesse par passage de la barrière placentaire.

Les traitements actuels pour lutter contre la maladie du sommeil font face depuis plusieurs années à un développement de résistances. Le choix du traitement dépend du stade de la maladie : phase lymphatico-sanguine (stade 1) ou neurologique (stade 2), toutefois il n'existe à ce jour que cinq molécules sur le marché (Tableaux 1 et 2).

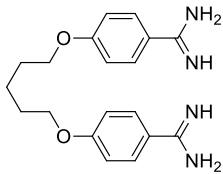
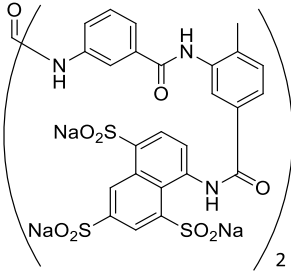
Médicament	Pentamidine	Suramine sodique
		
	3	4
Trypanosome	<i>T. b. gambiense</i>	<i>T. b. rhodesiense</i>
CI_{50} (μM)	0,011	0,046
Utilisé depuis	1937	1922
Résistances	années 2000	années 1990

Tableau 1 : Traitements disponibles pour le stade 1 de la maladie du sommeil

La pentamidine **3** agit par exemple en tant qu'intercalant de l'ADN et est donc capable d'entrer dans le noyau. Les molécules de traitements du second stade interviennent au niveau du stress oxydant (le composé **6** favorise la production d'ERO et le composé **7** inhibe la trypanothione) ou de la biosynthèse des polyamines (le composé **5** inhibe l'ornithine décarboxylase). Cependant, les cibles de ces molécules n'ont pas toutes été déterminées, comme le cas du composé **4** qui inhiberait des enzymes variées.

¹² <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>.

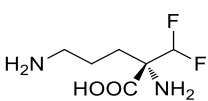
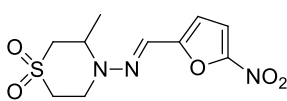
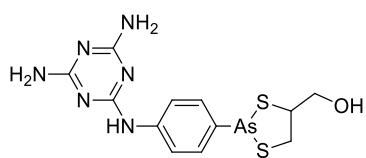
	Eflornithine	Nifurtinox	Mélarsozol
Médicament			
	5	6	7
<i>Trypanosome</i>	<i>T. b. gambiense</i>	<i>T. b. gambiense</i>	<i>T. b. gambiense et rhodesiense</i>
<i>Cl₅₀ (μM)</i>	1,67	1,08	0,004-0,009
<i>Utilisé depuis</i>	1982	années 1960	1949
<i>Résistances</i>	-	-	années 1990

Tableau 2 : Traitements disponibles pour le stade 2 de la maladie du sommeil

Bien que combattre les phénomènes de résistance constitue aujourd'hui une priorité, il est également nécessaire d'obtenir des traitements administrables plus facilement, moins coûteux et entraînant moins d'effets secondaires graves et de complications sévères. Le mélarsozol **7** illustre bien cette toxicité : c'est un dérivé à base d'arsenic peu toléré par l'organisme qui peut induire des encéphalopathies conduisant pour la moitié des individus atteints à la mort. Ces molécules sont également toxiques pour certains organes, comme le pancréas, le foie ou la moelle osseuse et peuvent entraîner des phlébites aiguës. Leur administration est ainsi délicate pour les patients atteints du sida, dont le système immunitaire est affaibli. De plus, certaines de ces molécules ont un effet tératogène ou embryocide et ne sont donc pas compatibles avec une grossesse.

II – *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum est une espèce de protozoaire parasite, de l'embranchement des apicomplexes ou sporozoaires et du genre *Plasmodium*, responsable des cas les plus fréquents et les plus mortels de paludisme. Comme pour *Trypanosoma brucei*, il s'agit d'un organisme eucaryote unicellulaire et polymorphe. Toutefois, à l'exception des gamètes mâles, il ne présente pas de flagelle ce qui n'empêche pas ses formes invasives d'être motiles. Son polymorphisme est plus subtil : sa morphologie et ses constituants intracellulaires déterminent en effet si le parasite jouera un rôle invasif ou non (parasite extra- ou intracellulaire), quel type cellulaire il sera susceptible d'envahir puis de quitter (hépatocytes ou érythrocytes de mammifères, cellules de l'épithélium intestinal de l'insecte) et comment il se reproduira (par division mitotique ou par fécondation).

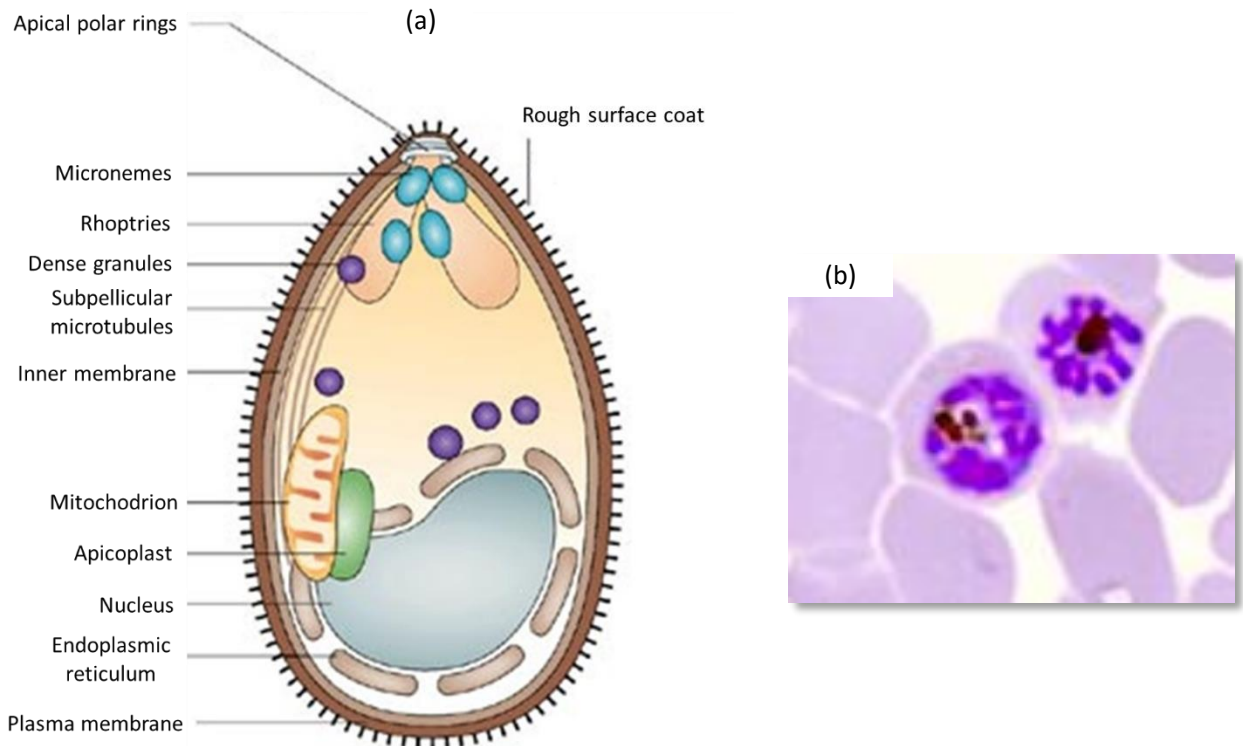


Figure 5 : (a) Schéma général de *Plasmodium falciparum* au stade mérozoïtes¹³ et (b) vue au microscope d'érythrocytes infectés¹⁴

Comme toute cellule eucaryote, *Plasmodium falciparum* possède un noyau contenant la majorité de son ADN, une ou plusieurs mitochondries, des ribosomes et autres organites caractéristiques (Figure 5). Une première particularité est la présence d'un apicoplaste toujours à proximité du noyau, contenant l'ADN circulaire du parasite et dont le rôle exact n'est pas connu. On sait toutefois qu'il s'agit d'un genre de plaste, qui ne possède pas d'activité photosynthétique mais qui est le siège de la synthèse des acides gras et des isoprénoïdes. Le fait que son métabolisme soit procaryotique constitue un avantage thérapeutique.

Les parasites apicomplexes sont également caractérisés par la présence d'un complexe apical réunissant les organites responsables du caractère invasif : les rhoptries, les micronèmes et les granules denses. Leurs propriétés sécrétrices particulières leur permettent d'envahir des cellules et des tissus spécifiques, sans lyser leurs hôtes.

II.1. Le cycle de vie de *Plasmodium falciparum*

Le cycle de vie de *Plasmodium falciparum* est assez complexe et se divise en deux cycles principaux nécessitant chacun un hôte spécifique : l'Homme et l'anophèle femelle (Figure 6).

¹³ Baum, J.; Papenfuss, A. T.; Baum, B.; Speed, T. P.; Cowman, A. F. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 621-628.

¹⁴ ©LCC : Laboratoire de Chimie de Coordination, UPR 8241, CNRS.

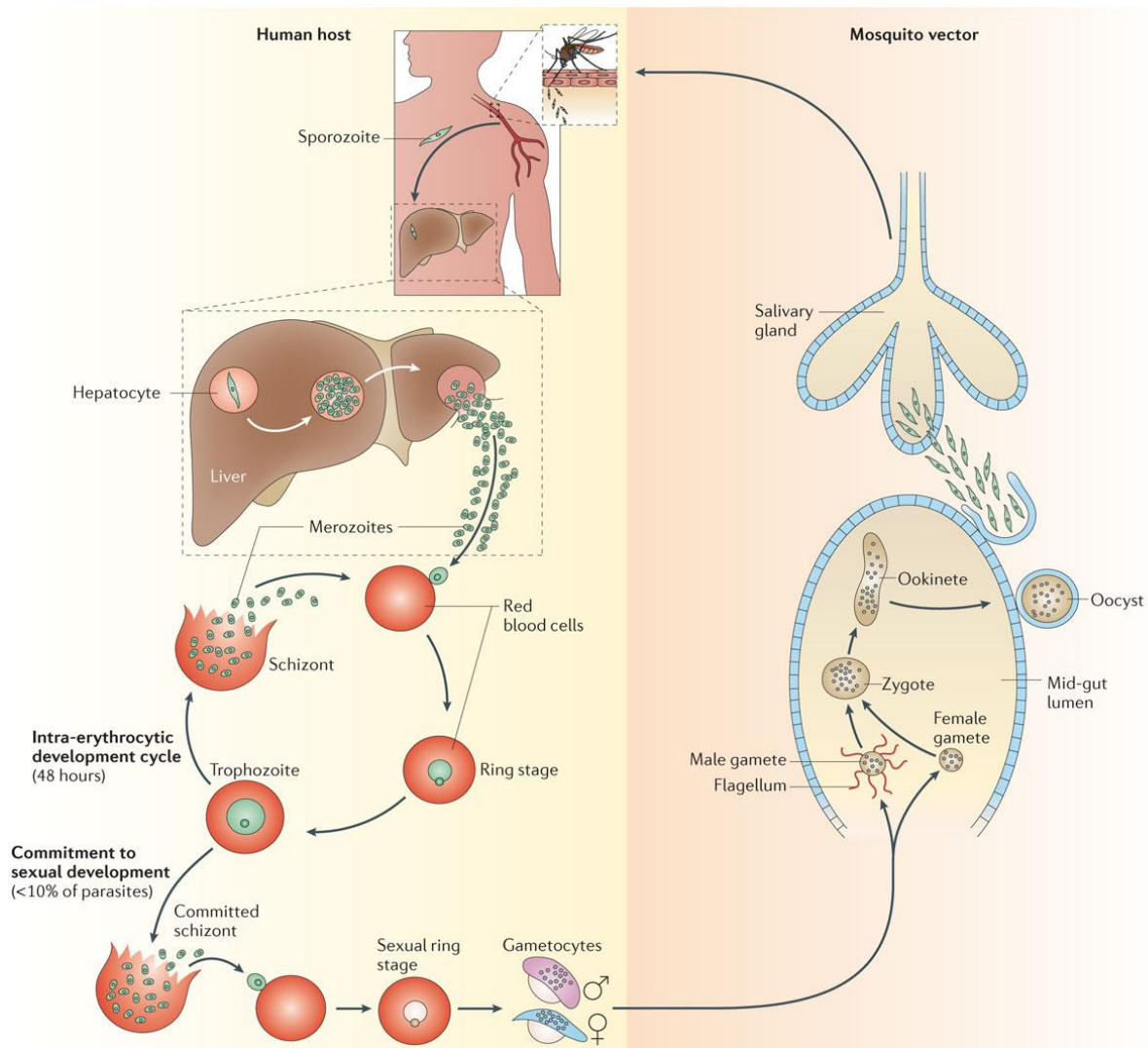


Figure 6 : Cycle de vie de *Plasmodium falciparum*¹⁵

II.1.1. Chez l'Homme

Le premier cycle se déroule chez l'Homme, après piqûre par le moustique infecté. On distingue trois étapes selon la localisation du parasite et selon le type de développement, asexué ou sexué.

La phase hépatique

La première étape constitue le stade hépatique et est asymptomatique. Pendant un repas sanguin, le moustique libère par sa salive des sporozoïtes dans les tissus sous-cutanés de l'Homme, qui rejoignent la circulation sanguine par les capillaires. Une importante partie d'entre eux est dégradée par les macrophages et dans le système lymphatique. La majorité des sporozoïtes restant migrent vers le foie et envahissent les cellules hépatiques grâce à des récepteurs spécifiques. Une fois dans le cytoplasme, ils s'arrondissent et évoluent en élément uninucléé, qui se développe en trophozoïte. Celui-ci évolue pendant une à trois semaines en schizonte mature, cellule volumineuse (40 à 100 µm) contenant jusqu'à 20 000 mérozoïtes, après une série de division mitotique intra-hépatocytaire. A un stade mature, ils quittent l'hépatocyte sous forme de mérosome (vésicule contenant les mérozoïtes) et

¹⁵ Josling, G. A.; Llinás, M. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 573-587.

vont se loger dans les capillaires pulmonaires où ils vont se désintégrer lentement (en 2-3 jours) et rejoindre la circulation générale.

La phase érythrocytaire asexuée

La deuxième étape est le stade érythrocytaire asexué : les mérozoïtes libérés dans les capillaires se retrouvent dans la circulation sanguine où ils vont envahir les globules rouges, notamment lorsque le débit sanguin est lent et propice à la promiscuité des cellules. En effet, l'entrée dans le globule rouge est un processus relativement long, que l'on peut diviser en quatre étapes. Cela débute par une adhésion sélective du mérozoïte à la surface de l'érythrocyte, suivi d'une réorientation du parasite de manière à ce que le complexe apical entre en contact avec la membrane de l'hôte. Une jonction irréversible se forme ensuite grâce à la sécrétion de protéines d'adhésion par le parasite, qui s'enveloppe d'une membrane en déformant le globule rouge grâce aux sécrétions des rhoptries, pendant sa progression. Une fois entièrement enveloppé, la membrane de l'hôte se referme, conduisant à la formation d'une vacuole parasitophore dans laquelle se retrouve le mérozoïte, contrairement aux sporozoïtes qui sont libres dans le cytosol des hépatocytes. Cette première phase d'invasion est aussi appelée stade anneau (Figure 7a).

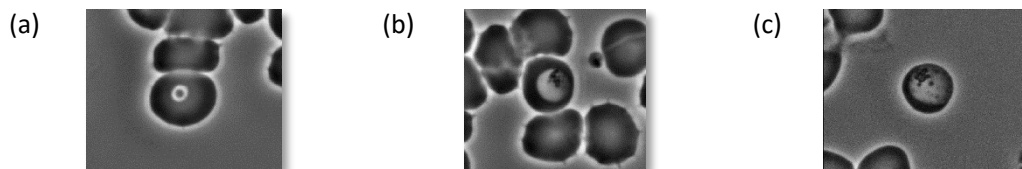


Figure 7 : *P. falciparum* (a) Stade anneau, (b) Stade mérozoïte et (c) Stade schizonte¹⁶

Le jeune mérozoïte (Figure 7b), après avoir perdu son arsenal d'organites d'invasion, commence à ingérer le cytoplasme du globule rouge et convertit notamment l'hème de l'hémoglobine en un pigment cristallin insoluble, l'hémozoïne, qu'il stocke dans sa vacuole digestive en raison de sa toxicité. La globine est quant à elle catabolisée en acides aminés. Dans un même temps, la membrane de l'hôte se déforme et sa surface change, empêchant ainsi l'invasion par un autre mérozoïte.

Le mérozoïte continue sa croissance (stade trophozoïte) en vidant le globule rouge de ses composants. A un stade critique, il rend la membrane de l'hôte plus perméable aux nutriments du plasma sanguin. Après avoir atteint une taille maximale (stade schizonte, Figure 7c), le noyau du parasite se divise plusieurs fois (jusqu'à 16 fois pour *P. falciparum*) en formant des bourgeons.

De nouveaux mérozoïtes se forment (stade rosette, Figure 8a) puis finissent par sortir de la cellule hôte par hémolyse (éclatement des hématies, Figure 8b), en laissant derrière eux l'hémozoïne. Cette étape dure environ 48 h pour *P. falciparum* et se répète, augmentant ainsi drastiquement la densité de parasites dans le sang, ce qui influence le pronostic et la sévérité de la maladie.



Figure 8 : *P. falciparum* (a) Stade rosette et (b) Hémolyse¹⁶

¹⁶ Clichés de microscopie confocale, CeMIM, MNHN.

Des premiers symptômes apparaissent pouvant être confondus avec un état grippal : fièvre, frissons, douleurs musculaires ou encore troubles digestifs. En l'absence de traitement, une forte anémie peut survenir, compliquant par exemple une grossesse éventuelle. Des atteintes plus graves conduisant à la mort sont causées par la capacité du parasite intra-érythrocytaire à s'agglutiner le long des parois des vaisseaux sanguins irriguant le cerveau, les viscères ou le placenta grâce à la sécrétion de protéines d'adhésion. Ceci lui permet de ne pas être dirigé à la rate, cimetière des globules, et de poursuivre sa croissance. Néanmoins, cela provoque chez le patient une obstruction des vaisseaux irriguant des organes vitaux.

La phase érythrocytaire sexuée

Une partie des mérozoïtes ayant envahi le globule rouge se différencie en cellules sexuelles. Cette dernière étape constitue la phase sexuée ou « gamogonique », comportant cinq stades de maturation où les mérozoïtes vont évoluer à terme en gamétocytes mâles et femelles matures. Seuls ces derniers sont visibles dans le sang périphérique et y persistent pendant un temps limité, avant d'être détruits par l'organisme. C'est pendant cette période qu'ils peuvent être prélevés par le moustique, au cours d'un repas sanguin. Ainsi, la transmission, et donc la propagation de l'infection d'un hôte à l'autre requiert la présence de ces gamétocytes matures dans la circulation sanguine périphérique.

II.1.2. Chez l'anophèle femelle

La phase sexuée



Figure 9 : Anophèle femelle¹⁷

Le deuxième cycle de *P. falciparum* se déroule ainsi dans l'anophèle femelle (Figure 9) lorsqu'elle ingère les gamétocytes mâles et femelles matures. Ce cycle représente un stade sexué du parasite, uniquement observable chez l'insecte. Les gamétocytes se développent dans l'appareil digestif du moustique et se différencient en gamètes, qui, après fécondation, entraîne la formation de l'ookinète, zygote mobile capable de traverser la paroi stomacale. Cette fécondation est rendue possible grâce aux conditions favorables présentes chez l'insecte (température et environnement chimique), mais aussi à la reconnaissance des gamètes femelles par les flagelles des gamètes mâles.

La phase asexuée

En traversant l'épithélium, l'ookinète forme un oocyte dans lequel vont se développer les sporozoïtes par division mitotiques internes avant d'être libérés suite à l'éclatement de l'oocyte. Ils migrent ensuite aux glandes salivaires de l'anophèle, dirigés par leur complexe apical spécifique, où ils sont stockés jusqu'au prochain repas sanguin du moustique.

¹⁷ <http://jibbio.wordpress.com/>.

II.2. Le paludisme

Le paludisme est une maladie infectieuse parasitaire répandue en Afrique, en Asie et en Amérique du Sud, et plus particulièrement dans les régions intertropicales. Selon l'OMS, il y a eu près de 214 millions de nouveaux cas dans le monde en 2015 (dont 88% en Afrique) et 438 000 décès ont été déplorés cette même année (dont 90% dans les pays africains et dont 70% d'enfants de moins de cinq ans).¹⁸

En 15 ans, grâce à des campagnes de prévention massives, le nombre de nouveaux cas a globalement diminué de 37% et le nombre de morts de 60%. Le nombre de cas mortels chez les enfants de moins de cinq ans a également été réduit de 65%. Malgré ces signes encourageants, le paludisme constitue un véritable fléau touchant 80% des populations africaines. De plus, l'OMS considère que 3,2 milliards de personnes sont à risque.

L'agent infectieux responsable de cette maladie est un parasite du genre *Plasmodium*. Il est transmis à l'hôte par la piqûre d'un moustique, l'anophèle femelle. Cinq espèces *Plasmodium* peuvent infecter l'Homme :

- *Plasmodium falciparum* : essentiellement présent en Afrique subdésertique, il s'agit du plus dangereux de son espèce puisqu'il cause 80% des infections paludiques et 90% des décès ;
- *Plasmodium vivax* : rarement mortel, il est très largement répandu en Amérique du Sud et en Asie et constitue l'origine la plus fréquente de fièvres tierces bénignes (accès de fièvre tous les trois jours) dont les crises sont récurrentes ;
- *Plasmodium ovale* : provoque également le paludisme tierce, il est endémique des régions de l'Afrique de l'Ouest, des Philippines, de l'Indonésie orientale et de la Papouasie-Nouvelle-Guinée ;
- *Plasmodium malariae* : rencontré sur toute la planète, il est le seul responsable des fièvres quaterne (tous les quatre jours). Les infections sont bénignes mais peuvent durer parfois toute une vie ;
- *Plasmodium knowlesi* : connu chez le singe, il a récemment été découvert chez l'Homme en Malaisie. Mal diagnostiqué, il était confondu avec *P. malariae*.

La meilleure façon de lutter contre cette maladie infectieuse est d'éviter la piqûre d'anophèle au moyen par exemple de répulsifs. Mais il existe également des traitements préventifs comme la méfloquine **8** ou la malarone **9** (Tableau 3), qui peuvent entraîner néanmoins des effets secondaires indésirables et qui sont coûteux. Le premier agit en inhibant la polymérisation de l'hème, tandis que le second implique la synergie d'action de la proguanil, qui bloque le métabolisme des folates (essentiel à production de l'ADN chez le *Plasmodium*), et de l'atovaquone, qui inhibe le cytochrome b mitochondrial du parasite.

¹⁸ <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>.

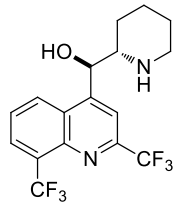
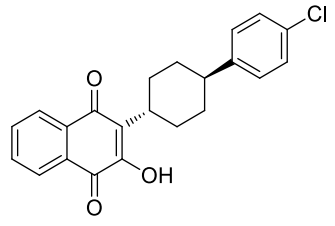
Médicament	Méfloquine	Malarone
		
<i>Cl₅₀ (μM)</i>	-	-
<i>Utilisé depuis</i>	années 1970	1999
<i>Résistances</i>	années 1980	années 2000

Tableau 3 : Traitements préventifs pour le paludisme

Pour les patients infectés, des traitements plus ou moins historiques existent, comme la quinine **10** ou l'artémisinine **12** (Tableau 4), mais aussi des molécules inspirées de produits naturels comme la chloroquine **11**, mais qui rencontrent depuis plusieurs années un phénomène de résistance, dû à l'adaptation rapide du parasite. La quinine et ses dérivés induisent la mort du parasite en inhibant la métabolisation de l'hémoglobine en hémozoïne, tandis que le mécanisme d'action du composé **12** reste toujours controversé. Néanmoins, il semblerait que le clivage du motif endopéroxyde, indispensable à l'activité antimalariale, induise la formation de ROS. Le composé **12** serait également capable d'alkyler l'hème.

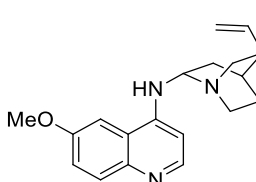
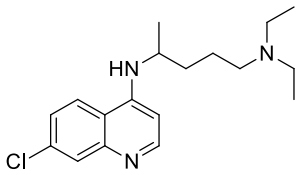
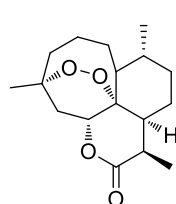
Médicament	Quinine	Chloroquine	Artémisinine
			
<i>Cl₅₀ (μM)</i>	0,315	0,072	0,008
<i>Utilisé depuis</i>	17 ^{ème} siècle	1934	1972
<i>Résistances</i>	-	années 1960	années 2000

Tableau 4 : Exemples d'antipaludéens

Le développement de résistances aux traitements actuels pour lutter contre les maladies parasitaires tropicales justifie la recherche de nouvelles molécules à activité antiparasitaire, objectif principal du laboratoire. Dans ce contexte, nous avons choisi de développer des sondes fluorescentes pour pouvoir vérifier la pénétration de molécules actives dans les cellules de parasites que nous étudions. La détection de ces molécules se base sur un domaine récent de la chimie biologique : la chimie bio-orthogonale.

Chapitre II : Réactions bio-orthogonales et chimie « click »

I – Introduction au concept

La chimie dite bio-orthogonale, c'est-à-dire la capacité à former des liaisons covalentes biocompatibles et hautement sélectives, est en plein essor depuis le début du siècle car elle est la source d'outils chimiques innovant permettant de modifier avec des performances inégalées du matériel biologique. Le but principal de telles réactions est de traquer des biomolécules dans leur environnement natif, qu'il soit cellulaire, tissulaire ou même dans un organisme entier. Ceci représente un intérêt considérable pouvant permettre une meilleure compréhension de processus biologiques (*i.e.* la lipidation des protéines, notamment dans le cerveau où certaines sont liées au développement de la maladie d'Alzheimer, ou le suivi de voies métaboliques dans certains types de cancers). Mais il s'agit d'un véritable défi chimique, dû à la présence d'une large gamme de molécules comme des biopolymères (protéines, ADN, ARN, etc.), des ions et des métabolites, réactifs potentiellement susceptibles d'interagir dans cette réaction.

La découverte de protéines fluorescentes pouvant être utilisées comme gène rapporteur (ex : la protéine fluorescente verte ou GFP¹⁹) a permis de traquer efficacement dans des systèmes cellulaires des protéines en fusionnant le gène rapporteur au gène d'intérêt. Mais très vite, les limites de cette méthode recombinante ont porté l'attention sur les autres classes de biomolécules comme les glycanes, les lipides et les acides nucléiques, pour lesquelles un marquage génétique n'est pas le choix adapté.

En 2001, Sharpless et coll.²⁰ introduisirent le concept de chimie « click » définissant la réaction « parfaite » réalisable dans des conditions simples (idéalement dans l'eau et à l'air ambiant), de cinétique rapide, chimiosélective, conduisant à un grand rendement et à peu, ou pas, de sous-produits inoffensifs, avec une purification simple. Peu de réactions répondent à ces critères et parmi elles, peu sont compatibles avec une application biologique.

C'est ainsi que le développement de nouvelles réactions de chimie « click » bio-orthogonales (Figure 10), initié par Bertozzi²¹ et basé sur l'optimisation de quelques réactions hautement spécifiques préexistantes, a permis aujourd'hui d'étudier les fonctions et la localisation de biomolécules, au sein de systèmes vivants variés. De telles réactions chimiques diffèrent des réactions « click » classiques par différents paramètres délimitant leur application dans un contexte biologique :

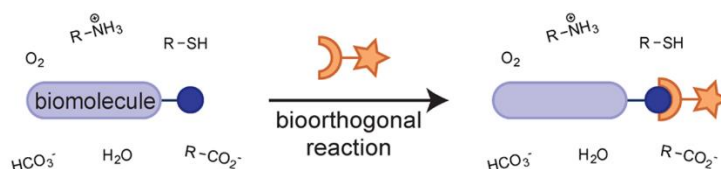
- Biocompatibilité : définit une réaction réalisable en conditions physiologiques (température ambiante, pression atmosphérique, pH principalement compris entre 6 et 8, milieu aqueux et présence d'oxygène) et compatible avec un système vivant (non toxique et ne perturbant pas son métabolisme) ;

¹⁹ Prasher, D. C.; Eckenrode, V. K.; Ward, W. W.; Prendergast, F. G.; Cormier, M. J. *Gene*, **1992**, *111*, 229-233.

²⁰ Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.

²¹ Hang, H. C.; Yu, C.; Kato, D. L.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 14846-14851.

- Sélectivité : réaction dont les réactifs réagissent spécifiquement entre eux et de manière irréversible, sans interagir avec les fonctions des biomolécules présentes dans le milieu (nucléophiles biologiques comme les fonctions thiols et amines, enzymes...);
- Cinétique : la vitesse de telles réactions doit être rapide de manière à offrir un outil efficace et minimiser les possibles perturbations ou la toxicité dans le milieu biologique ;
- Stabilité en milieu aqueux : les réactifs impliqués doivent être stables en milieu biologique (face à l'hydrolyse et à l'oxydation), de même pour les produits issus de leur réaction (la liaison formée doit être covalente et stable).

Figure 10 : Réaction chimique bio-orthogonale²²

Les réactions chimiques bio-orthogonales, qui représentent un sous-ensemble de la chimie « click », peuvent être divisées en quatre types principaux : les réactions polaires, les réactions de cycloaddition de type Diels-Alder et de type dipolaires, et les réactions organométalliques. Mais ils existent aussi des réactions particulières, qui seront également décrites brièvement.

II - Les réactions polaires

Les réactions polaires concernent les réactions entre un site riche (nucléophile) et un site pauvre (électrophile) en électron (Figure 11). Elles impliquent des liaisons covalentes et polaires, voire des espèces chargées, ainsi que des liaisons polarisables. L'exemple le plus courant des réactions polaires est l'addition nucléophile. Ces réactions sont omniprésentes en synthèse organique mais un très faible nombre d'entre elles est applicable en conditions biologiques.

Figure 11 : Réaction polaire²²

II.1. Réactions d'addition sur un carbonyle

La condensation d'un nucléophile sur un carbonyle de type aldéhyde ou cétone fait partie des moyens les plus couramment utilisés pour le marquage de biomolécules. Toutefois, les aldéhydes et les cétones sont des électrophiles susceptibles d'être attaqués par des nucléophiles biologiques. Pour favoriser la réaction bio-orthogonale, le partenaire nucléophile utilisé doit avoir un caractère nucléophile plus fort, comme le cas des nucléophiles à effet alpha (hydrazide, aminoxy) où la présence d'un atome adjacent (*i.e.* en position alpha) possédant un doublet non liant augmente sa nucléophilie et diminue son caractère basique.

²² Patterson, D. M.; Nazarova, L. A.; Prescher, J. A. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 592-605.

Ceci peut être expliqué par un diagramme d'orbitales moléculaires (Figure 12) proposé par Hoz²³ où les α -nucléophiles peuvent être considérés sous leur forme radicalaire à l'état de transition. De tels systèmes à trois électrons (comme le radical hydroperoxyde $\text{HOO}\cdot$) voient leur état de transition stabilisé par l'appariement de deux électrons à un niveau d'énergie plus bas et dans une orbitale liante. Le dernier électron se retrouve à un niveau d'énergie plus haut et dans une orbitale non-liante (HOMO pour orbitale moléculaire la plus haute occupée), favorisant ainsi un transfert monoélectronique vers la LUMO (pour orbitale moléculaire la plus basse vacante) d'un électrophile, ce qui stabilise également l'état de transition. Ce profil ne se retrouve pas pour un nucléophile normal (comme l'ion hydroxyde HO^-) où le caractère non radicalaire confère par ailleurs un caractère basique plus important.

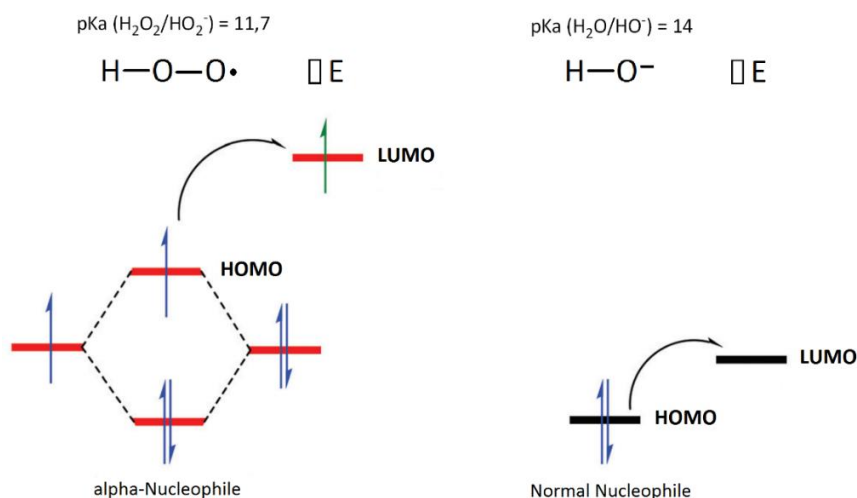


Figure 12 : Représentation schématique de l'éclatement des orbitales moléculaires pour un α -nucléophile et un nucléophile normal dans leur état de transition²⁴

Les condensations d' α nucléophiles sur les carbonyles (Figure 13) ont été appliquées à une variété de biomolécules (comme les protéines et les glycanes), mais en général le produit formé (hydrazone, oxime) est peu stable et peut notamment être soumis à une hydrolyse dans un contexte cellulaire, ce qui peut limiter son utilisation.²⁵

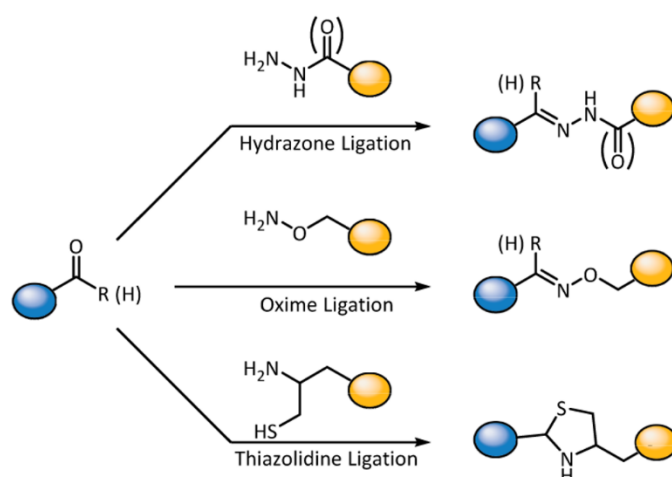


Figure 13 : Ligations bio-orthogonales sur une fonction carbonyle²⁶

²³ Hoz, S. J. *Org. Chem.* **1982**, *47*, 3545-3547.

²⁴ Singh, N.; Karpichev, Y.; Sharma, R.; Gupta, B.; Sahu, A. K.; Satnami, M. L.; Ghosh, K. K. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 2827-2848.

²⁵ Dirksen, A.; Dawson, P. E. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *12*, 2543-2548.

²⁶ King, M.; Wagner, A. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 825-839.

Pour favoriser la formation d'un produit plus stable, Bertozzi et coll.²⁷ et Rabuka et coll.²⁸ se sont basés sur la réaction de Pictet-Spengler et ont développé des versions alkylées de nucléophile hydrazine **15** et aminoxy **16** portées par une tryptamine (Figure 14).

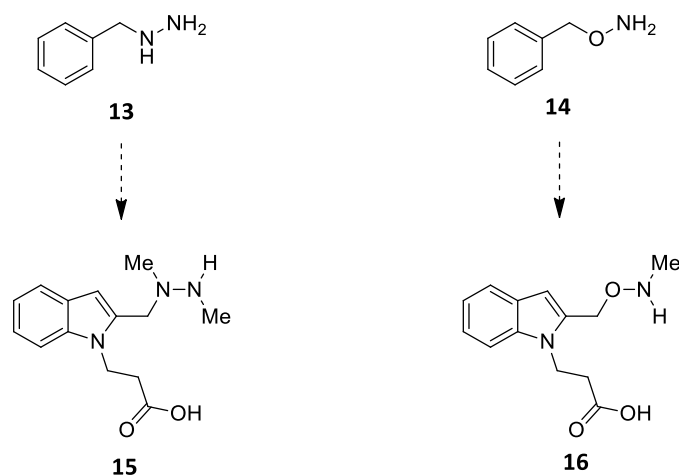


Figure 14 : Versions alkylées d' α -nucléophiles portés par une tryptamine

Après la réaction polaire initiale avec l'aldéhyde, un ion intermédiaire hydrazone ou oxyminium est formé, qui subit ensuite une réaction de cyclisation intramoléculaire par l'indole. La fonction formée est stable vis-à-vis de l'hydrolyse (Figure 15).

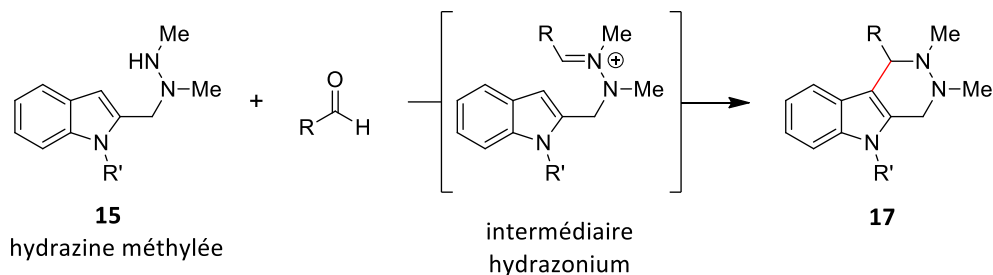


Figure 15 : Ligation sur un aldéhyde avec la réaction de Pictet-Spengler

Un autre exemple proposé par Nice et coll.²⁹ est la réaction spécifique des 1,2-aminothiol d'une cystéine sur un aldéhyde : en condition acide, la condensation conduit à la formation d'un produit stable, la thiazolidine (Figure 13).

Malgré des améliorations en termes de stabilité, la présence de molécules endogènes possédant des fonctions aldéhydes (comme dans les glucides et leurs métabolites) et des fonctions cétones (dans certaines hormones de mammifères comme la cortisone) susceptibles de réagir avec le partenaire nucléophile et donc d'être marquées, rend cette méthode limitante lors d'une utilisation sur des cellules car elle conduit à des marquages non sélectifs.

²⁷ Agarwal, P.; van der Weijden, J.; Sletten, E. M.; Rabuka, D., Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 46-51.

²⁸ Agarwal, P.; Kudirka, R.; Albers, A. E.; Barfield, R. M.; de Hart, G. W.; Drake, P. M.; Jones, L. C.; Rabuka, D. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 846-851.

²⁹ Wade, J. D.; Domagala, T.; Rothacker, J.; Catimel, B.; Nice, E. *Lett. Pept. Sci.* **2002**, *8*, 211-220.

II.2. Réaction de Staudinger

Pour éviter des marquages croisés avec des fonctions endogènes, l'utilisation de fonctions chimiques dites non naturelles est devenue une situation idéale. Un exemple marquant est celui de la réaction de Staudinger où l'électrophile est un groupement azoture et le nucléophile une triarylphosphine.

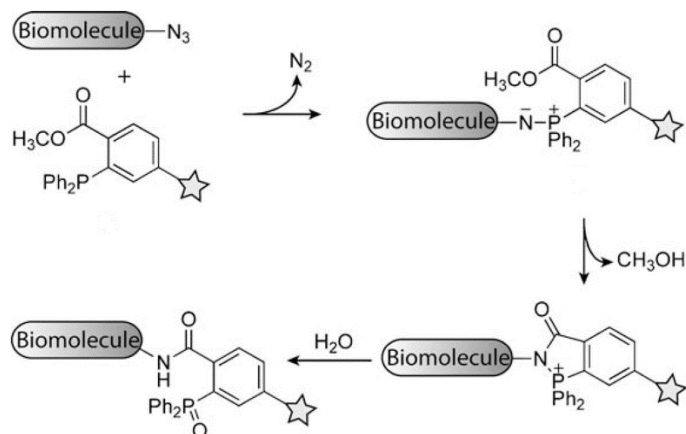


Figure 16 : Ligation de Staudinger entre les azotures et les triarylphosphines³⁰

Ces deux fonctions n'existent pas dans les organismes vivants et ne présentent aucune réactivité vis-à-vis des fonctions biologiques. Elles réagissent spécifiquement entre elles pour former à terme une liaison amide stable rendue possible par la présence d'un ester sur l'un des phényles de la phosphine, qui détourne le mécanisme classique conduisant à la réduction de la fonction azoture en amine primaire (Figure 16). Les limites de cette méthode sont principalement cinétiques, ainsi que le caractère sensible à l'oxydation des phosphines.

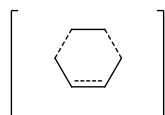
III - Les réactions de cycloadditions

Aujourd'hui, la grande majorité des réactions bio-orthogonales décrites font partie de la famille des cycloadditions. Il s'agit de réactions péricycliques où l'état de transition est typiquement cyclique, et qui se caractérisent par un mécanisme concerté où il y a simultanément rupture et formation de liaisons σ et π (Figure 17). Les réactions de cycloaddition sont contrôlées par les symétries de phase de l'orbitale HOMO du premier réactif et celle de la LUMO du second (Figure 18).

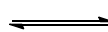
système à 2 électrons π



système à 4 électrons π



état de transition
péricyclique



adduit de cycloaddition
(2 nouvelles liaisons σ ,
1 nouvelle liaison π)

Figure 17 : Réaction de cycloaddition

³⁰ Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974-6998.

Elles nécessitent en général une aide thermique et l'adduit formé est en équilibre avec le processus inverse appelé rétrocycloaddition. Ces réactions ont fait l'objet d'un grand intérêt dans le contexte de la chimie bio-orthogonale car il s'agit de transformations relativement propres et réalisables en conditions douces. En modulant les réactifs au niveau des énergies d'activation, il est possible de s'affranchir du paramètre thermique, ce qui peut rendre possible la transformation à température ambiante, voire accélérer la vitesse de réaction. En modulant la nature des réactifs, cette réaction peut devenir possible milieu aqueux.

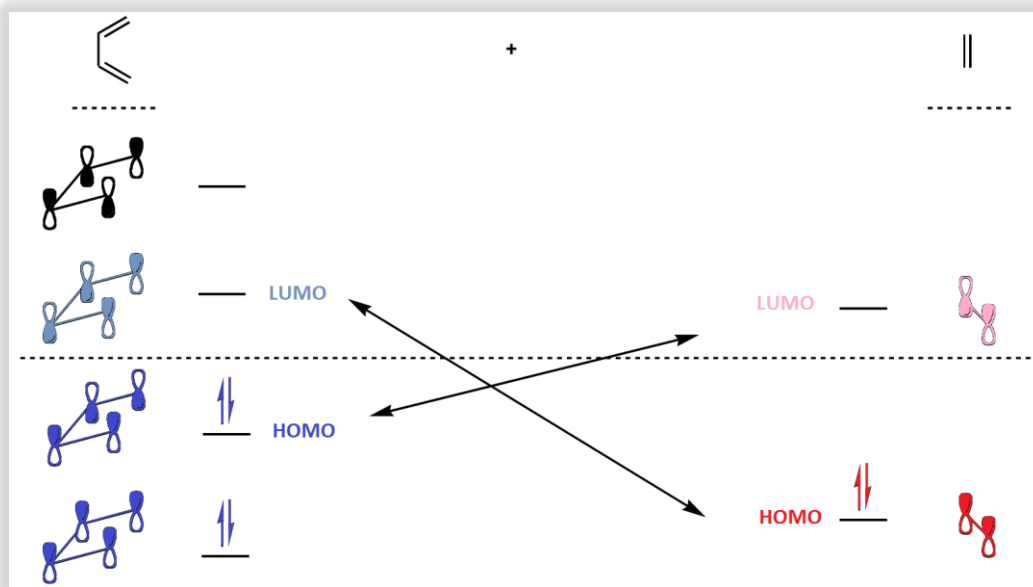


Figure 18 : Exemple de réaction péri-cyclique : cycloaddition $[4 + 2]$ ³¹

Parmi les réactions de cycloadditions décrites dans la chimie bio-orthogonale, deux catégories principales émergent : les cycloadditions de type Diels-Alder et les cycloadditions dipolaires.

III.1. Les cycloadditions de Diels-Alder

Les cycloadditions de Diels-Alder classiques sont décrites comme la réaction entre un diène conjugué (système à 4 électrons π délocalisés sur quatre atomes) et un dienophile (système à 2 électrons π) conduisant à la formation de cycles à six chaînons *via* une cycloaddition $[4 + 2]$ (Figure 19).

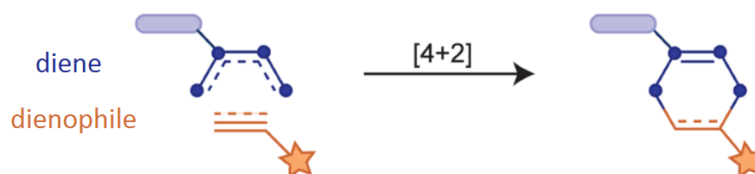


Figure 19 : Cycloaddition de Diels-Alder $[4 + 2]$ ²²

Cette réaction fonctionne d'autant mieux que le diène est riche en électrons et le dienophile appauvri en électrons. La grande majorité des réactions de Diels-Alder nécessitent un chauffage, même modéré, et ne sont donc pas compatibles avec des conditions biologiques où la température n'excède généralement pas 37°C. Toutefois, il a été démontré qu'en jouant sur la nature électronique des

³¹ <http://www.isites.harvard.edu>.

réactifs, cette réaction pouvait être utilisée à des fins bio-orthogonales mais de manière limitée en milieu biologique en raison de sa cinétique lente.³²

En 2008, Fox et coll.³³ ont démontré que le *trans*-cyclooctène (TCO, **18**) réagissait très efficacement avec les tétrazines (**19**) en solution aqueuse lors d'une cycloaddition [4 + 2] avec une constante de vitesse de l'ordre de $10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure 20). A ce jour, cette réaction représente la plus rapide des transformations bio-orthogonales décrites (10^3 à $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ selon les dérivés).³⁴

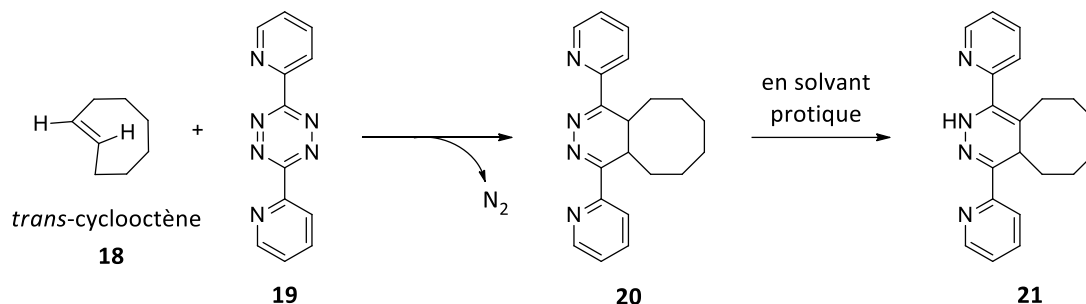


Figure 20 : Réaction de Diels-Alder inverse entre le *trans*-cyclooctène et une tétrazine

La particularité de cette réaction de Diels-Alder est que le diénoophile, **18**, est un alcène contraint et que le diène, **19**, est pauvre en électron d'où le terme de réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse. La tension exercée sur le diénoophile a pour conséquence la déstabilisation et donc l'augmentation des niveaux d'énergie de ses orbitales HOMO et LUMO tandis que la présence d'hétéroatomes et de groupements électroattracteurs sur le diène abaisse ces niveaux d'énergie. Il s'ensuit une accélération de la cycloaddition favorisée par la proximité de la HOMO du premier et de la LUMO du second (Figure 21).

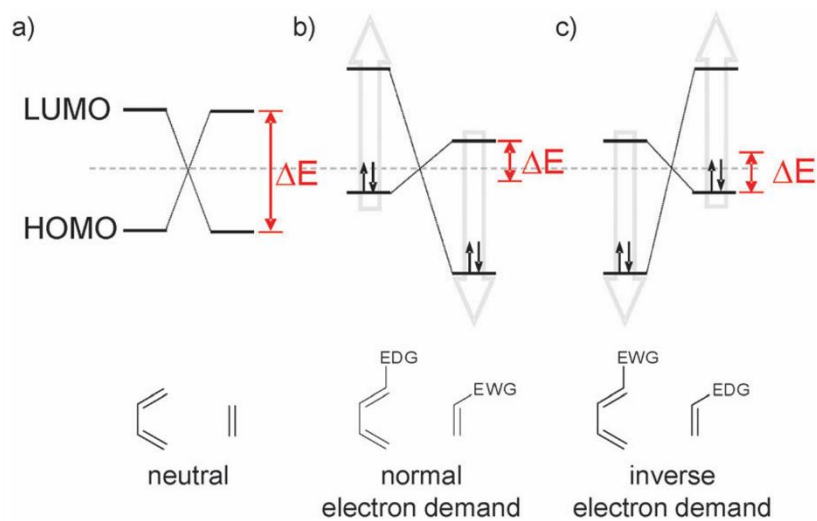


Figure 21 : Orbitales frontières des cycloadditions de Diels-Alder (a) neutre et à demande électronique (b) normale et (c) inverse³⁵

³² Seelig, B.; Jäschke, A. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7729-7732.

³³ Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518-13519.

³⁴ Selvaraj, R.; Fox, J. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 753-760.

³⁵ Knall, A. C.; Slugovc, C. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5131-5142.

La réactivité des tétrazines vis-à-vis d'autres alcènes contraints a été testée, comme le norbornène **22**,³⁶ le cyclobutène **23** et récemment le méthylcyclopropène **25**,³⁷ mais aussi vis-à-vis de cyclooctynes comme le bicyclo[6.1.0]nonyne **24** ou BCN³⁸ (Figure 22). Il faut noter que le norbornène **22** réagit plus difficilement que le TCO **18**, mais ce dernier peut s'isomériser en *cis*-cyclooctène avec le temps, isomère non réactif.

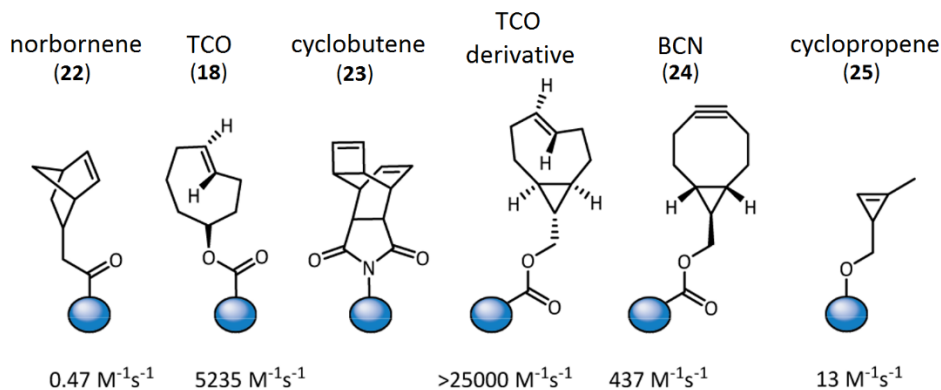


Figure 22 : Diénophiles décrits pour leur réactivité avec les tétrazines²⁶

III.2. Les cycloadditions dipolaires

Les réactions dipolaires impliquent une réaction entre un dipôle 1,3 et un dipolarophile conduisant à la formation de cycles à cinq chaînons au cours d'une cycloaddition [3 + 2] d'un point de vue atomique ou [4 + 2] d'un point de vue électronique (Figure 23). Un dipôle 1,3 est un système de 4 électrons π délocalisés sur trois atomes, dont les structures de résonance font apparaître des charges positive et négative à chaque extrémité. Ainsi, les atomes en position distale peuvent être considérés à la fois comme des sites nucléophiles et électrophiles. En général, l'atome le plus électronégatif et/ou possédant le coefficient orbitalaire le plus grand pour la HOMO joue le rôle du nucléophile. Le partenaire dipolarophile le plus souvent rencontré est une fonction alcène ou alcyne, mais des dipolarophiles contenant des hétéroatomes, comme les carbonyles et les imines, peuvent aussi réagir.

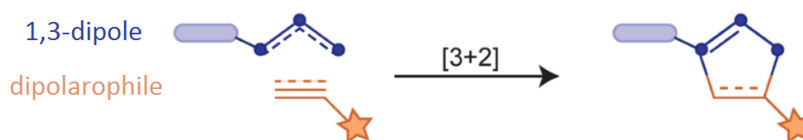


Figure 23 : Cycloaddition dipolaire [3 + 2]²²

Dans le cas des cycloadditions dipolaires rencontrées dans le contexte bio-orthogonal, les dipôles et dipolarophiles utilisés ont des énergies d'activation proches : la HOMO de l'un peut recouvrir la LUMO de l'autre et vice-versa. Ceci rend les optimisations plus variées : en greffant un substituant électroattracteur sur le dipolarophile, l'énergie d'activation de sa LUMO va diminuer en augmentant ainsi sa réactivité ; de la même manière, un groupement électrodonneur va augmenter l'énergie d'activation de son HOMO, accélérant également sa vitesse de réaction. C'est ainsi que les azotures

³⁶ Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 2297-2299.

³⁷ Yang, J.; Šečkutė, J.; Cole, C. M.; Devaraj, N. K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 7476-7479.

³⁸ Chen, W.; Wang, D.; Dai, C.; Hamelberg, D.; Wang, B. *Chem. Comm.* **2012**, *48*, 1736-1738.

sont capables de réagir avec des dipolarophiles à la fois pauvres (ex : fumarate de diéthyle) et riches (ex : 1-pyrrolidino-1-cyclopentène) en électrons (Figure 24).³⁹

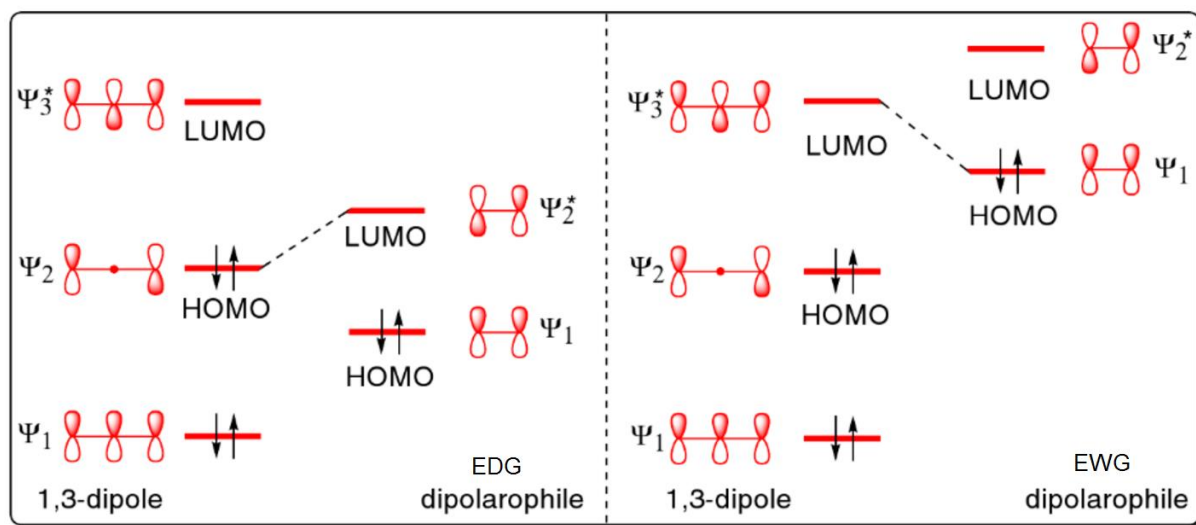


Figure 24 : Orbitales frontières des cycloadditions 1,3-dipolaires avec un dipolarophile riche ou pauvre en électrons³⁸

III.2.1. Cycloadditions 1,3-dipolaires dont le dipôle est une fonction azoture

Réaction de Huisgen et Cycloaddition Azoture-Alcyne Catalysée par le Cuivre(I) (CuAAC)

La réactivité des azotures vis-à-vis des fonctions alcynes est connue depuis la fin du 19^{ème} siècle,⁴⁰ mais son mécanisme de cycloaddition concerté n'a été proposé qu'en 1963 par Huisgen,⁴¹ qui fut à l'origine du concept de cycloaddition 1,3-dipolaire. Bien que cette réaction soit couramment utilisée en synthèse organique, la pression et les températures élevées nécessaires à sa réalisation ne sont pas compatibles avec les systèmes vivants.

Néanmoins, le potentiel de cette transformation ainsi que la formation favorable de produits triazoles aromatiques ont permis aux équipes de Sharpless⁴² et Meldal⁴³ de découvrir la même année la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre les azotures et les alcynes terminaux conduisant à la formation d'un seul isomère triazole grâce à une catalyse au cuivre I et réalisable à température ambiante (réaction aujourd'hui communément connue sous le terme CuAAC) (Figure 25).

³⁹ Kumar, S.; Kumar, V.; Singh, S. P. *Pericyclic Reactions: A Mechanistic and Problem-Solving Approach*; Academic Press, **2015**, p.247.

⁴⁰ Michael, A. J. *Prakt. Chem.* **1893**, *48*, 94-95.

⁴¹ Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565-598.

⁴² Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.

⁴³ Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.

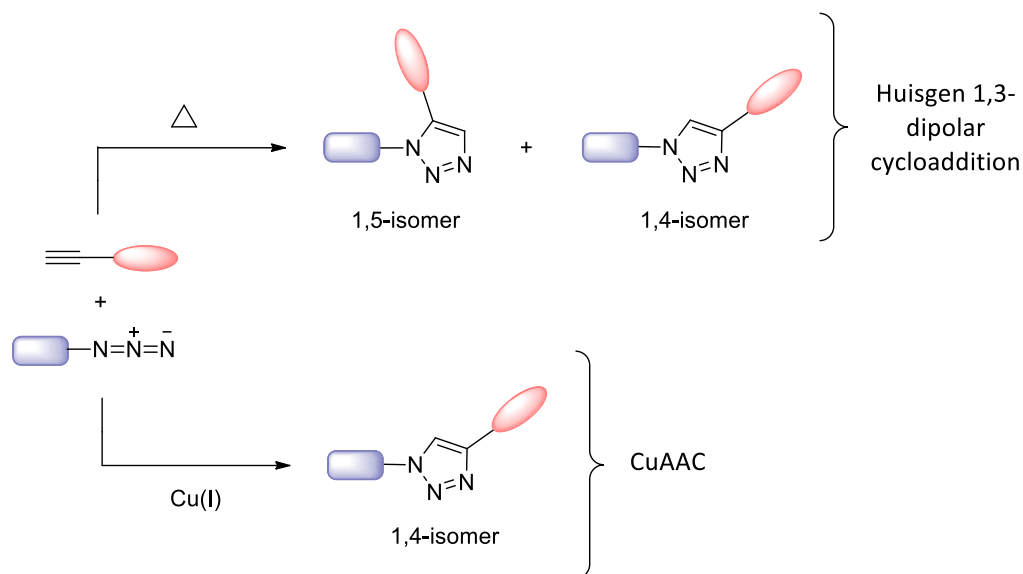


Figure 25 : Cycloadditions 1,3-dipolaires entre les azotures et les alcynes terminaux

Récemment, Fokin et coll.⁴⁴ ont mis à jour le mécanisme de cette réaction en mettant en évidence l'intervention d'un intermédiaire de cuivre bi-nucléaire (Figure 26). Ceci explique la stéréochimie et l'amélioration de la cinétique mais prouve également l'incompatibilité des alcynes disubstitués à participer à la CuAAC.

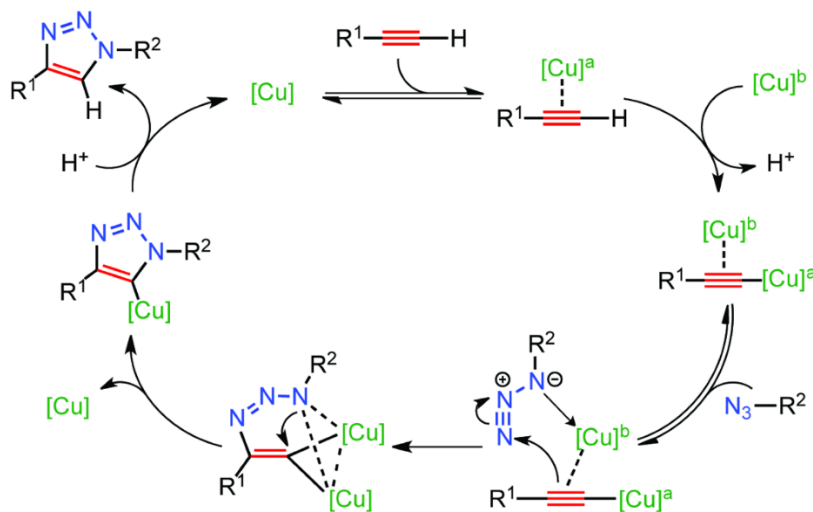


Figure 26 : Cycle catalytique pour la CuAAC avec deux atomes de cuivre proposé par Fokin et coll.⁴⁴

En effet, le cycle catalytique débute de la même manière que celui précédemment décrit par Sharpless avec la complexation de l'alkyne avec un premier atome de cuivre. La formation *in situ* du complexe d'acétylure de cuivre, dont le cuivre coordine une liaison σ , est suivie du recrutement d'un second atome de cuivre qui coordine une liaison π de l'alkyne, formant ainsi le complexe catalytiquement actif. Le cycle se poursuit par la coordination réversible d'un azoture organique sur le deuxième cuivre *via* son azote le plus nucléophile. Le carbone β de l'acétylure de cuivre attaque l'azoture au niveau de son azote le plus électrophile pour former la première liaison covalente C-N. La deuxième liaison covalente N-C se forme par l'attaque nucléophile de l'azote coordonné avec départ

⁴⁴ Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. *Science*, **2013**, *340*, 457-460.

d'un atome de cuivre. Enfin, une fois le triazole formé, il y a régénération du catalyseur par scission de la liaison Cu-C. Selon les travaux de Fokin et coll., c'est bien la présence des atomes de cuivre qui participe à la stéréochimie de la réaction mais également à sa vitesse de réaction.

Bien que cette réaction ait été une révolution en termes de cinétique, de rendement et de stéréochimie, la CuAAC présente un inconvénient majeur pour son application bio-orthogonale sur des organismes vivants en raison de la cytotoxicité de son catalyseur au cuivre.

Cycloaddition Azoture-Alcyne Promue par Tension de Cycle (SPAAC)

Pour pallier cette difficulté et pour exploiter le potentiel bio-orthogonal de cette réaction (les fonctions azoture et alcyne ne sont naturellement pas présentes en milieu biologique), Bertozzi et coll.⁴⁵ ont développé deux ans plus tard une cycloaddition biocompatible en cherchant à activer les alcynes autrement que par une catalyse métallique : *via* une tension de cycle.

La réactivité des azotures vis-à-vis de cycles tendus comme le dicyclopentadiène est connue depuis les années 1930,⁴⁶ mais c'est en 1961 que Wittig et Krebs⁴⁷ ont décrit pour la première fois la réaction singulière entre l'azoture de phényle et le cyclooctyne, le plus petit des cycloalcynes carbonés stables.

Basée sur ces résultats, l'équipe de Bertozzi a développé une série de cyclooctynes (Figure 27) et a vérifié leur bio-orthogonalité sur des systèmes vivants avec des azotures en ne constatant aucune cytotoxicité. Cette cycloaddition promue par tension de cycle ou SPAAC est réalisable également à température ambiante et dans des solvants aqueux mais n'est pas régiosélective. De plus, l'absence de cuivre catalyseur a un impact sur la vitesse de réaction, qui constitue aujourd'hui le principal paramètre que l'on cherche à améliorer.

Une première optimisation fut l'introduction en position propargylique d'atomes de fluor, dont l'effet électroattracteur a permis d'obtenir une constante de vitesse 60 fois supérieure pour les dérivés cyclooctynes difluorés (DIFO, **27**) par rapport au cyclooctyne OCT **26** initial.⁴⁸ En effet, la polarisation de l'alcyne ainsi induite a eu pour conséquence de diminuer le niveau d'énergie de sa LUMO et donc d'abaisser son énergie d'activation pour la SPAAC.

Des études de modélisation ont prédit par la suite que l'effet des fluors couplé à une augmentation de la tension de cycle par la fusion d'un noyau benzyle sur le motif cyclooctyne augmenteraient la vitesse de réaction. En effet, l'angle de la triple liaison intracyclique C-C-C est d'environ 155° (contre 180° pour un alcyne linéaire). L'introduction de tension supplémentaire diminue d'autant plus cet angle, rendant l'état fondamental géométriquement plus proche de l'état de transition, augmentant ainsi la réactivité du cyclooctyne.

La synthèse d'un tel composé monobenzocyclooctyne difluoré (DIFBO, **28**)⁴⁹ fut achevée en 2010 mais la réactivité de la triple liaison devint tellement importante que le composé s'est révélé être instable. Ce problème a été résolu en utilisant un complexe de cyclodextrine, qui a permis de calculer la vitesse de réaction : pratiquement 100 fois plus rapide que pour le composé **26**.

⁴⁵ Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.

⁴⁶ Alder, K.; Stein, G. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1931**, *485*, 211-222.

⁴⁷ Wittig, G.; Krebs, A. *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260-3275.

⁴⁸ Codelli, J. A.; Baskin, J. M.; Agard, N. J.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486-11493.

⁴⁹ Sletten, E. M.; Nakamura, H.; Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11799-11805.

Parallèlement à ces travaux, Bertozzi et coll. ont développé un aza-diméthoxycyclooctyne (DIMAC, **29**)⁵⁰ dont la réactivité est similaire à celle du composé **26**, mais qui est nettement plus soluble dans l'eau. En 2010 et 2012, deux nouveaux motifs furent introduits : BCN **24**⁵¹ et COMBO **30**⁵² (pour bicyclo[6.1.0]nonyne et carboxyméthylmonobenzocyclooctyne, respectivement), dont les valeurs k_2 rivalisent avec celle du composé **28**, malgré l'absence de fluors. Là encore, c'est l'ajout de tension de cycle supplémentaire (cyclopropane et phényle, respectivement) qui améliore la réactivité par rapport au cyclooctyne OCT **26** initial.

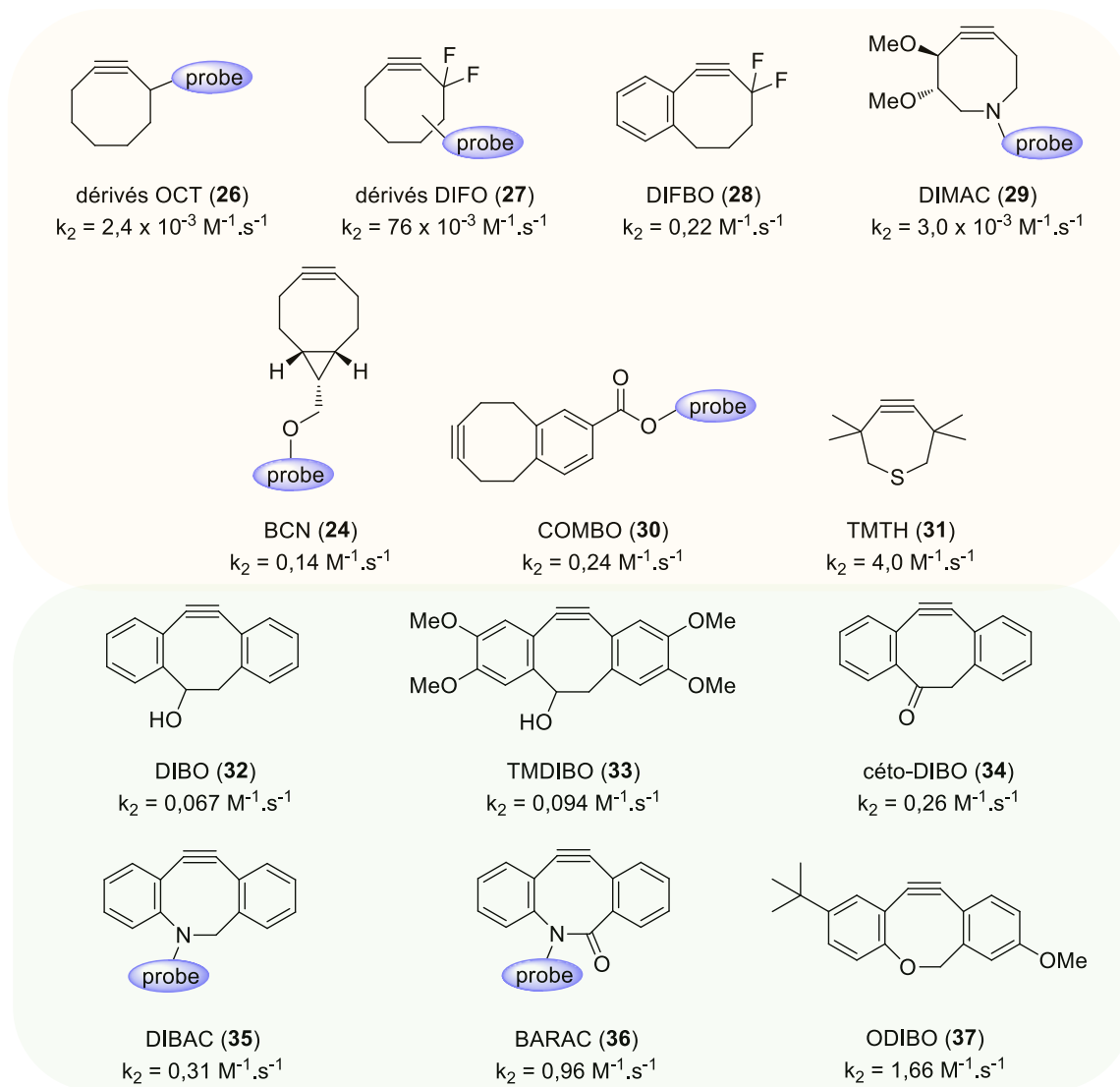


Figure 27 : Cyclooctynes et dibenzocyclooctynes développées pour les SPAAC avec les azotures et leur constante de vitesse de second ordre respective dans ACN ou MeOH

En 2008, Boons et coll.⁵³ ont introduit une nouvelle méthode d'activation favorisant la SPAAC en fusionnant au cyclooctyne deux noyaux phényles, qui contribuent d'autant plus à l'augmentation de l'énergie de tension. Le premier dérivé décrit, le 4-dibenzocyclooctynol **32** ou DIBO, présente une cinétique proche de celle du DIFO **27** mais est peu hydrophile. Toutefois, ce nouveau motif est

⁵⁰ Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3097-3099.

⁵¹ Dommerholt, J.; Schmidt, S.; Temming, R.; Hendriks, L. J.; Rutjes, F. P.; van Hest, J. C.; Lefeber, D. J.; Friedl, P.; van Delft, F. L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 9422-9425.

⁵² Varga, B. R.; Kállay, M.; Hegyi, K.; Béni, S.; Kele, P. *Chemistry*, **2012**, *18*, 822-828.

⁵³ Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 2253-2255.

intéressant d'un point de vue synthétique et d'autres dérivés ont suivi : le TMDIBO (**33**)⁵⁴ (ou tétraméthoxydibenzocyclooctynol) et le céto-DIBO **34**,⁵⁵ version oxydée de **32**. Il fut alors évident que le nombre d'atomes hybridés sp² corrélait avec la vitesse de réaction. Avec une fonction alcool libre fonctionnalisable, le TMDIBO **33** fait partie aujourd'hui des cyclooctynes les plus utilisés pour les réactions de chimie « click » avec des azotures, notamment pour le marquage extracellulaire des glycanes, où il peut être fonctionnalisé avec un fluorophore commercial⁵³ (AlexaFluor-647), un groupement TCO qui réagit ensuite avec une tétrazine liée à un fluorophore (Tz-DyLight)⁵⁶ ou un complexe de gadolinium.⁵⁷

Des composés dibenzocyclooctynes comportant une fonction amine ou amide endocyclique ont été développés la même année. DIBAC **35**^{58,59} (ou aza-dibenzocyclooctyne) correspond à une structure hybride du DIBO **32** et du DIMAC **29** : en combinant la cinétique favorable du premier et l'hydrophilie du second, ce dérivé a montré une vitesse de réaction similaire à celle du céto-DIBO **34**. BARAC **36**⁶⁰ (ou biaryl-aza-cyclooctyne), version amide du DIBAC **35**, possède un carbone sp² supplémentaire qui lui a permis d'atteindre une constante de vitesse de presque 1 M⁻¹.s⁻¹.

En 2012, deux derniers cycloalcyne ont été étudiés : ODIBO **37**⁶¹ (ou oxa-dibenzocyclooctyne) et TMTM **31**⁶² (ou thiacycloheptyne). Ce dernier possède à ce jour la plus rapide des cinétiques pour la SPAAC (Figure 27). Néanmoins, toute tentative de fonctionnalisation ou d'optimisation a résulté en l'instabilité ou la perte de réactivité du dérivé. Le composé **37** réagit avec les azotures avec une vitesse similaire à celle du composé **36** dans le méthanol, mais il a été décrit que dans un mélange eau-méthanol-tétrahydrofurane, cette vitesse pouvait atteindre 45 M⁻¹.s⁻¹.

Cas particuliers de SPAAC à substrats fluorogéniques

L'optimisation des partenaires alcyne dans les réactions SPAAC n'a pas pour but unique l'amélioration de la cinétique de couplage. Des équipes se sont également intéressées au développement de cyclooctynes fluorogéniques, c'est-à-dire capables de produire des adduits fluorescents. Idéalement, il peut s'agir de systèmes dits « off-on », qui offrent plusieurs avantages : pas de lavages nécessaires pour enlever l'excédent de la sonde utilisée (fluorophore commercial ou anticorps), diminution du rapport signal sur bruit et possibilité de suivre des processus biologiques en temps réel, ce dernier étant le plus attrayant.

En 2011, Jewett et Bertozzi⁶³ introduisent un dérivé du composé **36** couplé à une coumarine (coumBARAC, **38**). Ce composé est faiblement fluorescent mais conduit à un adduit triazole **39** ayant un rendement quantique de fluorescence Φ_f dix fois plus important (rendement traduisant l'efficacité de la molécule fluorescente, correspondant au rapport du nombre de photons émis sur ceux absorbés) lorsqu'il réagit avec un azoture (Figure 28). La vitesse de cette réaction est comparable à celle du

⁵⁴ Stöckmann, H.; Neves, A. A.; Stairs, S.; Ireland-Zecchini, H.; Brindle, K. M.; Leeper, F. J. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 932-936.

⁵⁵ Mbua, N. E.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Steet, R.; Boons, G.-J. *ChemBioChem.* **2011**, *12*, 1912-1921.

⁵⁶ Neves, A. A.; Stöckmann, H.; Wainman, Y. A.; Kuo, J. C.-H.; Fawcett, S.; Leeper, F. J.; Brindle, K. M. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 934-941.

⁵⁷ Neves, A. A.; Wainman, Y. A.; Wright, A.; Kettunen, M. I.; Rodrigues, T. B.; McGuire, S.; Hu, D.-E.; Bulat, F.; Crich, S. G.; Stöckmann, H.; Leeper, F. J.; Brindle, K. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1286-1290.

⁵⁸ Kuzmin, A.; Poloukhine, A.; Wolfert, M. A.; Popik, V. V. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 2076-2085.

⁵⁹ Debets, M. F.; van Delft, F. L. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 97-99.

⁶⁰ Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688-3690.

⁶¹ McNitt, C. D.; Popik, V. V. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 8200-8202.

⁶² de Almeida, G.; Sletten, E. M.; Nakamura, H.; Palaniappan, K. K.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 2443-2447.

⁶³ Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5937-5939.

composé **36**, mais les propriétés de fluorescence ne sont pas compatibles avec une utilisation en milieu biologique en raison des longueurs d'ondes d'excitation trop proches de l'UV.

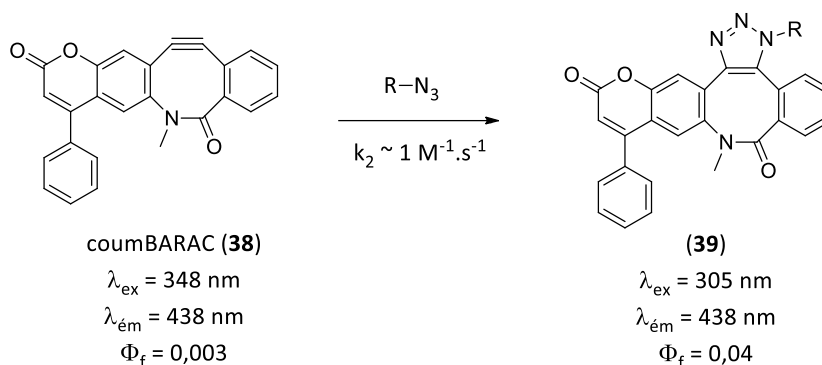


Figure 28 : Version fluorogénique de la SPAAC avec le coumBARAC

Un autre exemple fut décrit par Boons et coll.⁶⁴ correspondant à une version fluorogénique du DIBO (FI-DIBO, **40**). Ce composé, faiblement fluorescent, possède une fonction alcyne réactive et une seconde masquée sous la forme de cyclopropénone pouvant rendre ce réactif potentiellement bifonctionnel. Il réagit efficacement avec les azotures pour conduire à un adduit **41** dont le rendement quantique de fluorescence est 60 fois plus important (Figure 29). Contrairement au coumBARAC **38**, ces composés possèdent des longueurs d'ondes d'excitation supérieures à 350 nm, ce qui les rend plus exploitables dans un contexte biologique. De plus, leur grand déplacement de Stokes $\Delta\nu$ (7180 cm^{-1} pour les triazoles **41**) ne favorise pas la réabsorption de photons émis, ce qui permet une lecture plus exacte du signal de fluorescence.

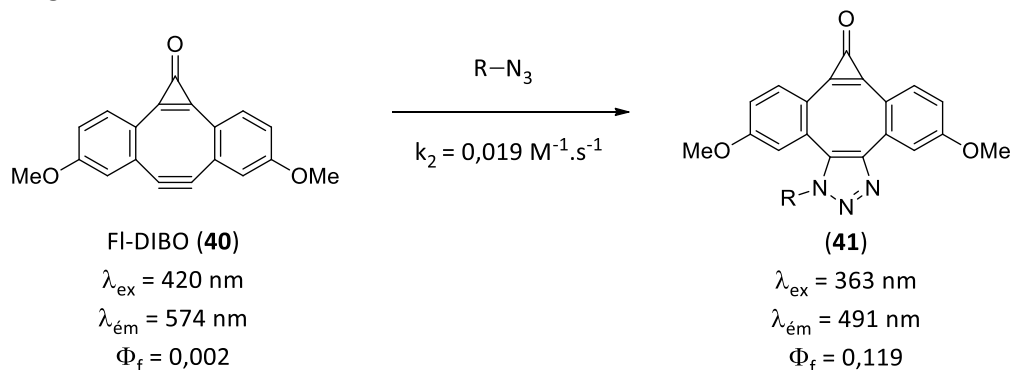


Figure 29 : Version fluorogénique de la SPAAC avec le FI-DIBO

Cette réaction a permis le marquage de protéines BSA en solution dans un tampon, modifiées par un groupement azoture, dans des conditions biologiques et par visualisation de la fluorescence.

Cycloaddition des azotures avec des fonctions alcènes : cas de l'oxanorbornadiène

Les azotures peuvent également réagir avec des alcènes contraints, comme l'oxanorbornadiène, *via* une cycloaddition [3 + 2] pour aboutir à des régioisomères triazoles (Figure 30). La réaction passe par un intermédiaire triazolone qui subit spontanément une réaction de rétro-Diels-Alder. Cette

⁶⁴ Friscourt, F.; Fahrni, C. J.; Boons, G.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18809-18815.

réaction a été appliquée à quelques expériences^{65,66} principalement *in vitro*, mais reste limitée en raison de sa faible cinétique (de l'ordre de $10^{-4} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), probablement car il s'agit d'une réaction multi-étapes.

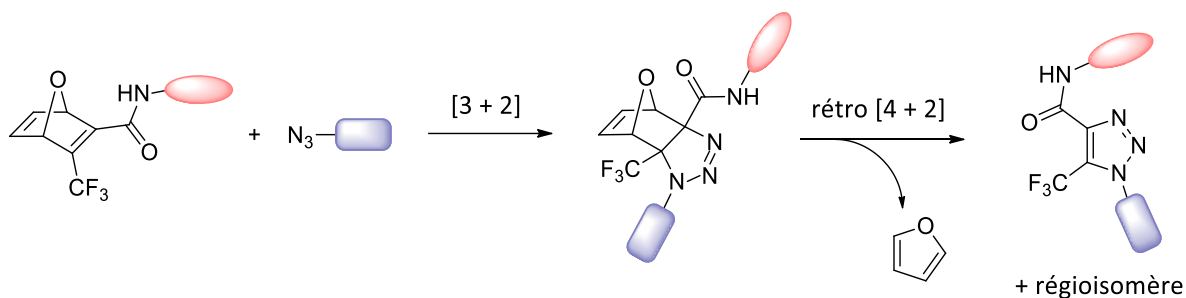


Figure 30 : Cycloaddition entre les azotures et les oxanorbornadiènes

III.2.2. Cycloadditions 1,3-dipolaires alternatives

Cycloaddition Nitronne-Alcyne Promue par Tension de Cycle (SPANC)

Après de nombreuses optimisations de cyclooctynes pour une réaction vis-à-vis du dipôle mou N₃ dans les SPAAC, la réactivité du dipolarophile a été testée avec d'autres dipôles 1,3 durs comme les nitrones. Ning *et al.*⁶⁷ ont décrit en 2010 la première cycloaddition entre un tel dipôle et le composé **32**, conduisant à la formation d'isoxazoline *N*-alkylée, adduit formé 32 fois plus vite que la SPAAC correspondante (Figure 31). Les nitrones ne sont pas des fonctions naturelles et présentent une bonne biocompatibilité. En revanche, il a été décrit que les formes acycliques sont sujettes à l'hydrolyse,⁶⁸ notamment lorsque le pH est basique ou acide, et que l'adduit formé est susceptible d'être réarrangé⁶⁹ en acylaziridine, puis en ylure, qui s'hydrolyse.

Une version cyclique du dipôle a été décrite l'année suivante dont la vitesse a doublé.⁷⁰ La même équipe a alors testé la réactivité des nitrones cycliques sur BARAC **36**⁷¹ et a réussi à atteindre une constante de vitesse de pratiquement $50 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 47 fois plus rapide que la SPAAC correspondante et 14 fois plus rapide que la SPANC avec le composé **32**. Ceci s'explique par la tension de cycle appliquée cette fois-ci sur le dipôle, rendant le système doublement tendu.

⁶⁵ Laverman, P.; Meeuwissen, S. A.; van Berkel, S. S.; Oyen, W. J.; van Delft, F. L.; Rutjes, F. P.; Boerman, O. C. *Nucl. Med. Biol.* **2009**, *36*, 749-757.

⁶⁶ van Dongen, S. F.; Verdurmen, W. P.; Peters, R. J.; Nolte, R. J.; Brock, R.; van Hest, J. C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 7213-7216.

⁶⁷ Ning, X.; Temming, R. P.; Dommerholt, J.; Guo, J.; Ania, D. B.; Debets, M. F.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J.; van Delft, F. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3065-3068.

⁶⁸ MacKenzie, D. A.; Sherratt, A. R.; Chigrinova, M.; Cheung, L. L.; Pezacki, J. P. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 81-88.

⁶⁹ McKay, C. « Alkyne-nitrone cycloadditions for functionalizing cell surface proteins ». *University of Ottawa*, **2012**, Canada.

⁷⁰ McKay, C. S.; Blake, J. A.; Cheng, J.; Danielson, D. C.; Pezacki, J. P. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10040-10042.

⁷¹ McKay, C. S.; Chigrinova, M.; Blake, J. A.; Pezacki, J. P. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 3066-3070.

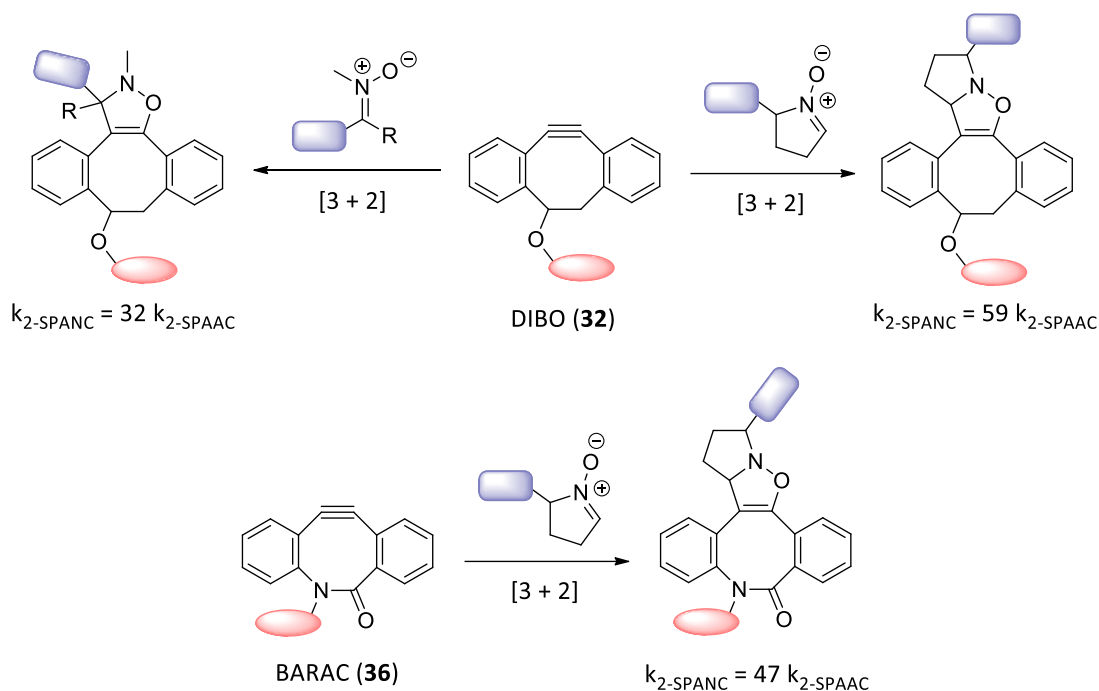


Figure 31 : Cycloadditions 1,3-dipolaires des nitrones avec les cyclooctynes (SPANC)

Cycloaddition 1,3-dipolaire dont le dipôle est une fonction oxyde de nitrile

Tout comme l'azoture, l'oxyde de nitrile est capable de réagir sans catalyseur avec des dipolarophiles de type cyclooctynes (26) ou alcènes contraints⁷² (22) (Figure 32).

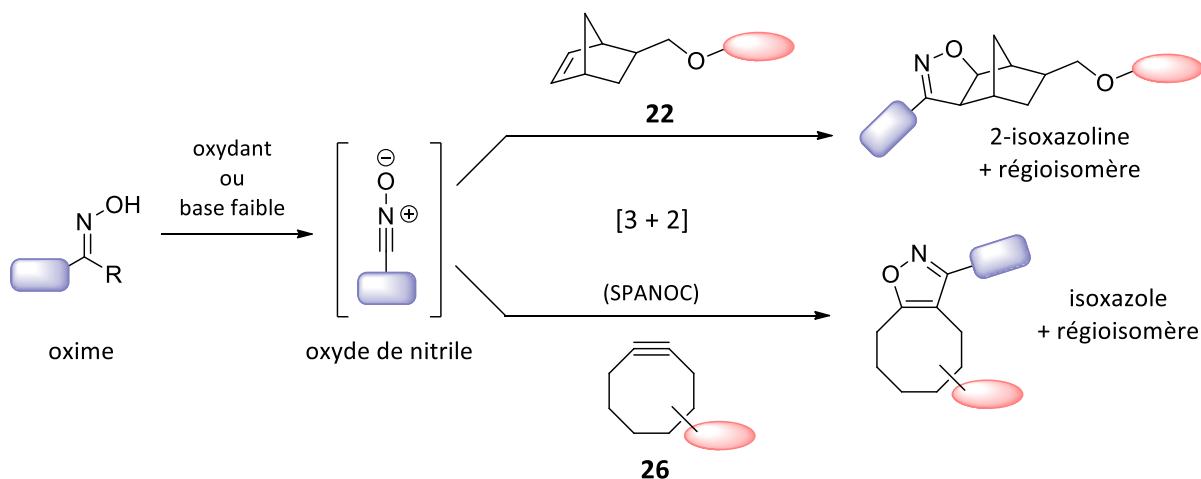


Figure 32 : Cycloadditions 1,3-dipolaires des oxydes de nitrile, générés *in situ*

Les oxydes de nitrile ne sont pas présents en milieu biologique mais leur génération est induite *in situ* à partir d'oximes, par oxydation ou par déprotonation *via* une base faible, ce qui peut être limitant. Dans le cas des cyclooctynes, la cycloaddition oxyde de nitrile-alcyne promue par tension de cycle (ou SPANOC) s'est révélée être 10 fois plus rapide que la SPAAC.^{73,74,75} Malgré la génération *in situ* requise

⁷² Gutsmedl, K.; Wirges, C. T.; Ehmke, V.; Carell, T. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2405-2408.

⁷³ Jawalekar, A. M.; Reubsaet, E.; Rutjes, F. P.; van Delft, F. L. *Chem. Comm.* **2011**, *47*, 3198-3200.

⁷⁴ Singh, I.; Heaney, F. *Chem. Comm.* **2011**, *47*, 2706-2708.

⁷⁵ Heaney, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 3043-3058.

qui pourrait être la source de réactivité croisée, les oxydes de nitrile représentent plusieurs avantages non négligeables (formation facile, cinétique intéressante et adduits formés stables).

III.3. Cas particuliers de cycloadditions

III.3.1. Cycloaddition Sydnone-Alcyne Promue par Tension de Cycle (SPSAC)

Une très récente nouvelle réaction bio-orthogonale concerne la cycloaddition [3 + 2] entre les sydnones (**42**), hétérocycles mésoioniques pouvant être considérés comme des dipôles 1,5, et les cyclooctynes (**24**), avec dégagement de CO₂. Un premier exemple a été décrit par Chin et Wallace⁷⁶ (Figure 33) mais leur réactivité vis-à-vis d'alcynes vrais était déjà connue depuis Huisgen.⁷⁷ L'utilisation de cyclooctynes permet toutefois de s'affranchir du catalyseur au cuivre et rend cette réaction réalisable à température ambiante. De récents travaux⁷⁸ ont montré que la vitesse est 27 fois plus rapide avec BARAC **36** (1,46 M⁻¹.s⁻¹).

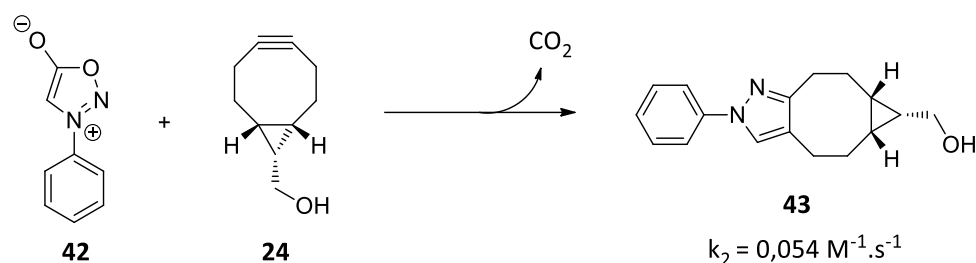


Figure 33 : Cycloaddition des sydnones avec les cyclooctynes

III.3.2. Cycloaddition [2 + 2 + 2] des quadricyclanes

Dans la course à la découverte de nouvelles réactions chimiques compatibles avec le milieu biologique, Sletten et Bertozzi⁷⁹ ont décrit une réaction inhabituelle rendue possible entre autre grâce à la présence d'un complexe métallique à base de nickel (Figure 34). Une réaction de cycloaddition de type [2 + 2 + 2] a lieu entre un tétracycle contraint, le quadricyclane, et le système π du nickel bis(dithiolène).

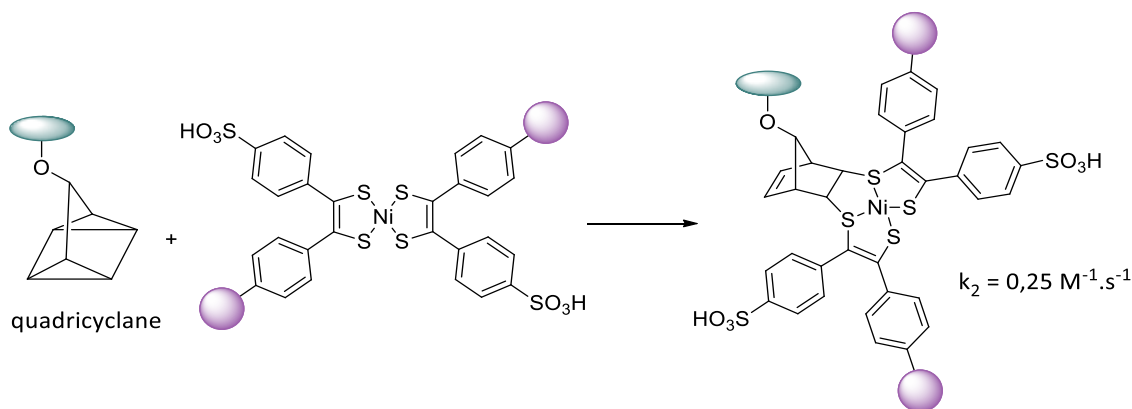


Figure 34 : Cycloaddition [2 + 2 + 2] des quadricyclanes

⁷⁶ Wallace, S.; Chin, J. W. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1742-1744.

⁷⁷ Huisgen, R.; Grashy, R.; Gotthardt, H.; Schmidt, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1962**, *1*, 48-49.

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

⁷⁹ Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17570-17573.

Ce type de réaction est généralement catalysé par un métal, mais ici la tension de cycle du quadricyclane est telle qu'elle permet de surmonter l'énergie d'activation pour aboutir à un produit avec un système π spécifique. En effet, ce dernier rend l'adduit formé photo-réactif : sous irradiation, il est dégradé en dérivé norbornadiène et le complexe au nickel est régénéré.

Cette réaction n'a pour l'heure été testée que sur des protéines (l'albumine de sérum bovin ou BSA) modifiées avec un quadricyclane, mais son orthogonalité avec des marquages de type SPAAC et condensation d'aldéhyde/aminooxy a été démontrée. Son utilisation est possible pour des études de marquages de protéines *in vitro*, mais son application sur des systèmes vivants nécessite des études sur la réactivité et la stabilité rédox du Ni-bis(dithiolène), ainsi que l'étude sur la photochimie de l'adduit correspondant.

IV - Versions organométalliques de la bio-orthogonalité

IV.1. Réactions de couplage catalysées au palladium

Depuis l'introduction de catalyseur au palladium soluble dans l'eau en 2006,⁸⁰ les réactions de couplages catalysées par ce métal sont devenues une nouvelle source d'intérêt en chimie biologique.

IV.1.1. Réaction de Mizoruki-Heck

Les premiers couplages catalysés au palladium sur des biomolécules ont été décrits la même année par Yokoyama et coll.⁸¹ qui ont réussi à marquer une protéine modifiée par un groupement *p*-iodophénylalanine avec un catalyseur au palladium soluble dans l'eau, notamment grâce à la nature de son ligand : la triphénylphosphine-3,3',3''-trisulfonate, ou TPPTS (Figure 35). Ce premier essai a néanmoins mené à un rendement très faible, au bout d'un temps de réaction long, avec une forte concentration de DMSO et sous atmosphère d'argon.

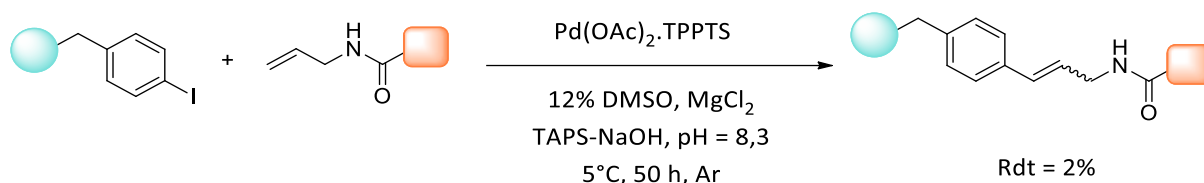


Figure 35 : Fonctionnalisation de protéines par la réaction de Mizoruki-Heck

L'application de cette réaction en milieu biologique reste limitée, mais ces travaux ont marqué un nouveau champ d'approches en orientant les recherches vers d'autres réactions palladocatalysées.

IV.1.2. Couplage de Sonogashira

Même si les premières applications de la réaction de Sonogashira sur la modification de peptides ont été décrites une dizaine d'années plus tôt, ce n'est qu'en 2007 que ce type de réaction a été plus

⁸⁰ Shaughnessy, K. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2006, 1827-1835.

⁸¹ Kodama, K.; Fukuzawa, S.; Nakayama, H.; Kigawa, T.; Sakamoto, K.; Yabuki, T.; Matsuda, N.; Shirouzu, M.; Takio, K.; Tachibana, K.; Yokoyama, S. *ChemBioChem.* **2006**, 7, 134-139.

largement connu.⁸² En se basant sur leurs précédents travaux sur la réaction de Heck, Kodama *et al.* ont réutilisé leur substrat protéique modifié par une *p*-iodophénylalanine pour tester cette nouvelle réaction. Après optimisation, ils obtinrent 25% de conversion en un temps significativement plus court que pour le couplage de Heck (Figure 36).

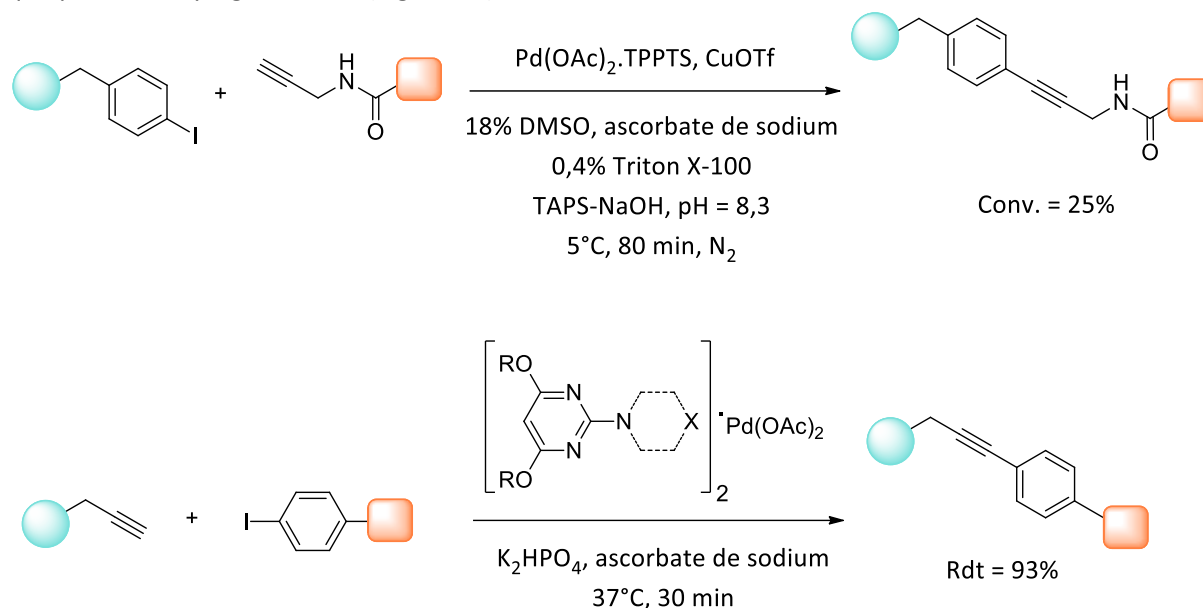


Figure 36 : Couplages de Sonogashira appliqués à la chimie bio-orthogonale

Toutefois, cet exemple nécessite une mixture complexe de réactifs, ainsi qu'une atmosphère d'azote. En 2011, Lin et coll.⁸³ ont décrit un couplage de Sonogashira sans cuivre sans précédent : le ligand aminopyrimidine permettant de solubiliser dans l'eau le complexe de palladium a permis de réaliser ce couplage dans des conditions bio-orthogonales en obtenant un rendement de 93%. L'application de ce couplage *in vivo* a été réalisée par Chen et coll.⁸⁴ en 2013 sur *E. coli* en utilisant $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ comme source alternative de palladium.

IV.1.3. Couplage de Suzuki-Miyaura

Le premier essai a été décrit en 2005 pour le marquage de protéines modifiées *in vitro*,⁸⁵ mais il faut attendre 2011 pour avoir une adaptation bio-orthogonale du couplage de Suzuki, grâce à un palladocatalyseur soluble dans l'eau contenant le sel 2-amino-4,6-dihydroxypyrimidine de sodium (Figure 37).⁸⁶

⁸² Kodama, K.; Fukuzawa, S.; Nakayama, H.; Sakamoto, K.; Kigawa, T.; Yabuki, T.; Matsuda, N.; Shirouzu, M.; Takio, K.; Yokoyama, S.; Tachibana, K. *ChemBioChem*. **2007**, *8*, 232-238.

⁸³ Li, N.; Lim, R. K.; Edwardraja, S.; Lin, Q. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15316-15319.

⁸⁴ Li, J.; Lin, S.; Wang, J.; Jia, S.; Yang, M.; Hao, Z.; Zhang, X.; Chen, P. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7330-7338.

⁸⁵ Ojida, A.; Tsutsumi, H.; Kasagi, N.; Hamachi, I. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3301-3305.

⁸⁶ Spicer, C. D.; Davis, B. G. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1698-1700.

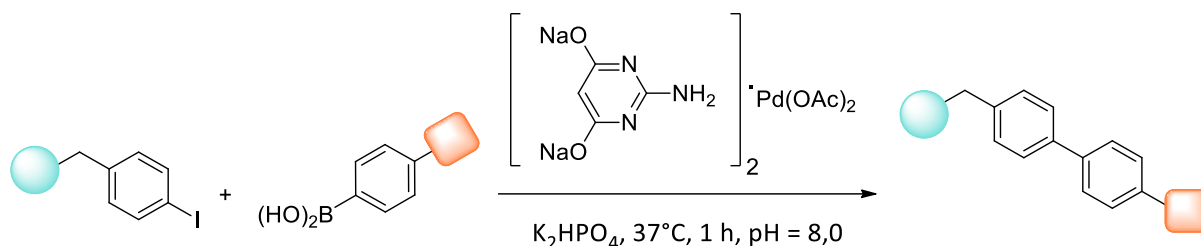


Figure 37 : Couplage de Suzuki en milieu aqueux

Parmi les réactions palladocatalysées, le couplage de Suzuki est celui qui a offert le plus d'applications pour le marquage de protéines *via* des gènes recombinants exprimant la *p*-iodophénylalanine modifiée à la surface des cellules d'*E. coli*.⁸⁷ L'équipe de Bradley⁸⁸ a par ailleurs développé des microsphères permettant une meilleure entrée du complexe de palladium dans les cellules dans le but de faire des couplages intracellulaires, mais des travaux ont mentionné une certaine cytotoxicité des acides boroniques au-delà de 1 mM⁵⁸ qu'il faut étudier.

De manière générale, l'ajout du palladium dans les cellules et de son ligand de façon séparée conduit à une forte toxicité. C'est pourquoi il est préférable de former le complexe au préalable. Les applications *in vivo* restent peu nombreuses et ne sont décrites que sur des cellules de bactéries. Sur des cellules de mammifères, et plus largement sur les eucaryotes, il est nécessaire de s'assurer que la complexation du palladium soit totale car ce métal est thiophile et pourrait réagir avec des molécules possédant des groupements thiols.

IV.2. Métathèse croisée d'oléfines

Une autre transformation basée sur la réactivité bio-orthogonale des alcènes est la métathèse croisée d'oléfines, dont la liaison covalente formée sélectivement grâce au catalyseur de ruthénium d'Hoveyda-Grubbs a permis de marquer des peptides par glycosylation et PEGylation (Figure 38).⁸⁹ Les cystéines *S*-allylées sont des substrats très intéressants pour ce type de catalyse et leur introduction sur des protéines peut se faire par simple addition conjuguée de thiolallyle sur des déshydroalanines, par allylation directe des cystéines ou par désulfuration de disulfide allylé. L'utilisation de *tert*-butanol restreint néanmoins son application dans le contexte bio-orthogonal.

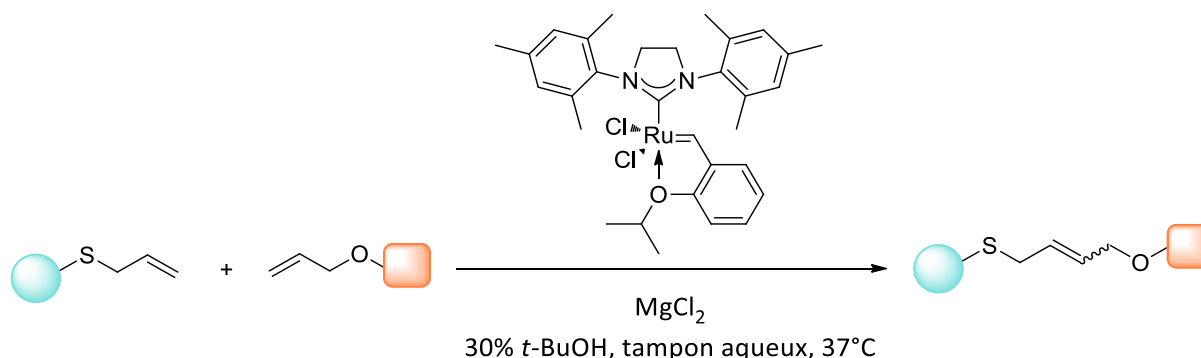


Figure 38 : Fonctionnalisation de protéines par métathèse croisée

⁸⁷ Spicer, C. D.; Triemer, T.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 800-803.

⁸⁸ Yusop, R. M.; Unciti-Broceta, A.; Johansson, E. M.; Sánchez-Martin, R. M.; Bradley, M. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 239-243.

⁸⁹ Lin, Y. A.; Chalker, J. M.; Floyd, N.; Bernardes, G. J.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9642-9643.

V – Réactions « photo-click » : vers une réactivité bio-orthogonale « sur demande »

Le défi corollaire à l'identification de nouvelles transformations bio-orthogonales est l'élucidation de méthodes permettant de *contrôler* cette réactivité. Pouvoir actionner ou désactiver des groupements fonctionnels nous amènerait à une réactivité dite « sur demande », ce qui pourrait être utile pour des fonctions relativement instables en milieu biologique sous leur forme réactive. L'activation photochimique est particulièrement intéressante car l'utilisation de lumière pulsée peut entraîner un contrôle à la fois spatial et temporel des réactifs en jeu (Figure 39).

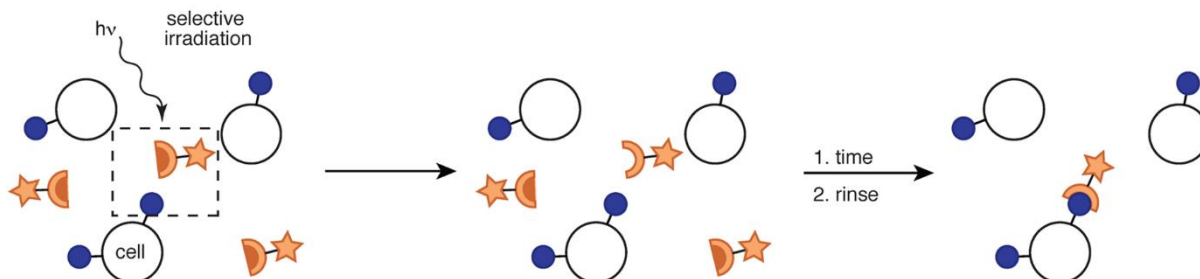


Figure 39 : Principe de la "photo-click" bio-orthogonale²²

C'est ainsi que Poloukhine *et al.*⁹⁰ ont exploité la formation de fonction alcyne par photochimie à partir de la cyclopropénone correspondante pour contrôler leur réactivité vis-à-vis des azotures (Figure 40). Des cellules de mammifères vivantes ont été incubées avec un sucre modifié ayant une fonction azoture et, après métabolisation, se sont retrouvés à la surface membranaire. La cyclopropénone, greffée par une biotine, a été ajoutée et les cellules ont été irradiées à 350 nm pendant une minute, ce qui a abouti à la formation *in situ* du cyclooctyne, permettant la réaction SPAAC *in vitro* contrôlée dans le temps et l'espace. Les adduits sont alors détectés en ajoutant un anticorps dirigé contre la biotine.

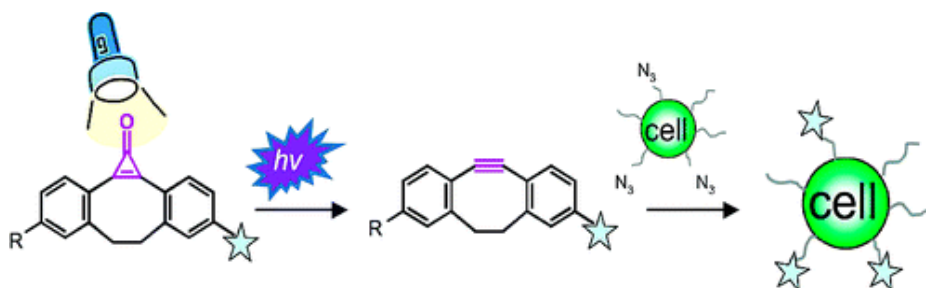


Figure 40 : Exemple de "photo-click" bio-orthogonale pour le marquage de glucides à la surface membranaire⁹⁰

À la même époque, Lin et coll.⁹¹ ont utilisé cette chimie « photo-click » pour le marquage *in vitro* de protéines recombinantes et endogènes (Figure 41). Comme précédemment, des cellules de mammifères vivantes ont été incubées avec un acide aminé modifié (homoallylglycine ou HAG) qui a été incorporé lors de modifications post-traductionnelles sur des protéines intracellulaires. Des sondes tétrazoles ont été ajoutées et, après irradiation UV, ont donné *in situ* des nitrilimines par photolyse,

⁹⁰ Poloukhine, A. A.; Mbua, N. E.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J.; Popik, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15769-15776.

⁹¹ Song, W.; Wang, Y.; Yu, Z.; Vera, C. I.; Qu, J.; Lin, Q. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 875-885.

capables de se lier à des alcènes terminaux par cycloaddition 1,3-dipolaire. La détection est dans ce cas visualisée directement car l'adduit formé est fluorescent.

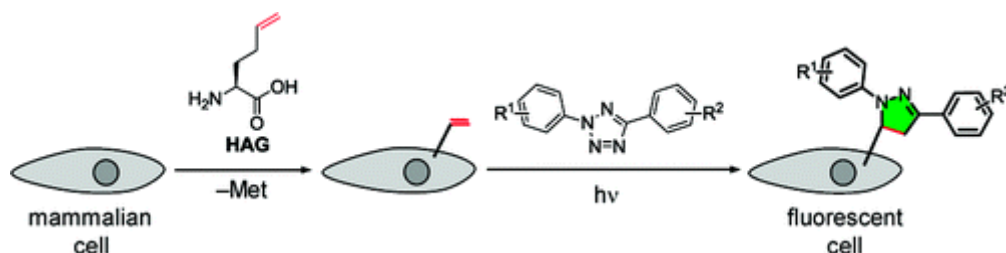


Figure 41 : Exemples de réactions "photo-click" bio-orthogonale pour le marquage de protéines⁹¹

La résolution spatiale de telles réactions dépend néanmoins de la durée de vie du réactif libéré « photoactivable ». Par exemple, elle est courte pour les nitrilimines, qui sont sujets à une hydrolyse rapide. La poursuite dans ce domaine de la bio-orthogonalité demeure un défi qu'il faut relever, en développant notamment des méthodes basées sur l'absorption à deux photons, moins invasives pour les tissus vivants.

Conclusion

En une quinzaine d'années, une grande variété de réactions chimiques bio-orthogonales a été développée dans le but de détecter des biomolécules dans leur environnement natif. Le choix des partenaires doit être adapté au contexte de l'étude en fonction des modifications possibles sur la biomolécule, de la nécessité de la survie des cellules après la réaction, ou encore en fonction de la cinétique souhaitée.

Comme présenté dans la revue de Prescher,²² les réactions bio-orthogonales sont résumées dans les tableaux ci-dessous (Tableaux 5, 6 et 7) et triées selon le type de réactions chimiques.

Type de réaction polaire	Partenaire 1	Partenaire 2	Produit	Commentaires	Réf.
Condensation aldéhyde/cétone	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{H}(\text{CH}_3)$	$\text{H}_2\text{N}-\text{N}(\text{H})-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}$	$\text{R}-\overset{(\text{CH}_3)}{\text{C}}=\text{N}-\text{N}(\text{H})-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}$	adduits enclins à être hydrolysés	25
		$\text{H}_2\text{N}-\text{O}-\text{R}$	$\text{R}-\overset{(\text{CH}_3)}{\text{C}}=\text{N}-\text{O}-\text{R}$		
		$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{R}$ $\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{R}$	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{H})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{R}$	29	
				marquages non sélectifs à cause du partenaire 1	28
Ligation de Staudinger	$\text{R}-\text{N}_3$			phosphines sensibles à l'oxydation	30

Tableau 5 : Récapitulatif des principaux types de réactions polaires en chimie bio-orthogonale

Type de cycloaddition	Partenaire 1	Partenaire 2	Produit	Commentaires	Réf.
<i>Diels-Alder à demande électronique inverse</i>				TCO s'isomérise avec le temps	33
				partenaire 2 stables au stockage	36
					37
<i>CuAAC</i>		$\equiv\text{C}-\text{R}, \text{Cu(I)}$		cytotoxicité du cuivre	42, 43
<i>SPAAC</i>	$\text{R}-\text{N}_3$			pas de catalyse nécessaire	45, 48, 51
					53, 58, 59, 60, 63, 64
				oxanorbornadiène susceptible de réagir avec des acides aminés basiques	65, 66
<i>Cycloadditions 1,3-dipolaires alternatives</i>				nitrone parfois sujettes à l'hydrolyse	67, 70, 71
	$\left[\text{R}-\text{C}\equiv\text{N}-\text{O}^{\ominus} \right]^{\oplus}$			oxydes de nitrile générés <i>in situ</i> par photolyse	73, 74, 75
			72		
<i>Cycloaddition 1,5-dipolaire</i>				produit secondaire : CO ₂	76
<i>Cycloaddition [2 + 2 + 2]</i>				stabilisation des électrons π du Ni requise	79

Tableau 6 : Récapitulatif des principaux types de cycloadditions en chimie bio-orthogonales

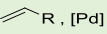

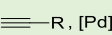
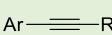


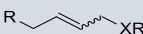
Type de réaction organométallique	Partenaire 1	Partenaire 2	Produit	Commentaires	Réf.
Mizoruki-Heck	Ar-X	 R, [Pd]		applications <i>in vivo</i> limitées	81
Sonogashira		 R, [Pd]	Ar- 	catalyseur au Pd requis	82, 83, 84
Suzuki		R-B(OH) ₂ , [Pd]	Ar-R	acides boroniques modérément cytotoxiques	85, 86, 87, 88
Métathèse croisée		 XR, [Ru]		catalyseur au Ru requis	89

Tableau 7 : Récapitulatif des principaux types de réactions organométalliques en chimie bio-orthogonale

Chapitre III : Applications de la chimie bio-orthogonale

La stratégie basée sur des rapporteurs chimiques bio-orthogonaux requiert l'incorporation d'un des partenaires de la réaction au sein de la biomolécule ciblée, dans la cellule ou dans l'organisme vivant étudiés (Figure 42).

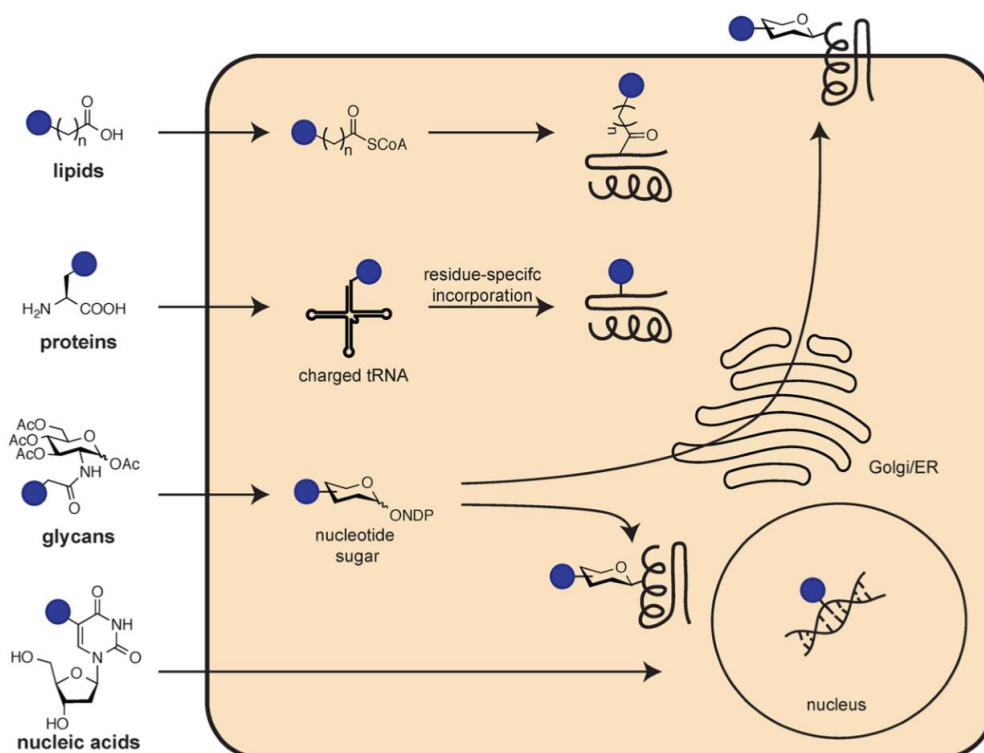


Figure 42 : Incorporation d'unités bio-orthogonales dans les différentes classes de biomolécules²²

Grâce aux rapides avancées dans la chimie bio-orthogonale de ces dernières années, un nombre conséquent d'applications a été décrit pour chacune des classes de biomolécules : protéines, glycanes, lipides et acides nucléiques.

I – Protéines

Les protéines représentent les biomolécules les plus abondantes dans les systèmes vivants et participent pratiquement à tous les processus biologiques. A ce jour, l'introduction de rapporteurs bio-orthogonaux dans les protéines constitue l'outil le plus performant pour étudier leur expression, leur localisation et leur fonction dans leur environnement natif. Plusieurs stratégies ont été développées dont les plus marquantes utilisent la machinerie traductionnelle de la cellule : (a) l'incorporation spécifique de résidus greffés d'une fonction bio-orthogonale et (b) l'incorporation spécifique sur un site particulier de la protéine avec l'addition d'ARNt artificiel d'une part, et en introduisant le gène d'intérêt muté par un codon stop « amber » d'autre part, permettant l'ajout du résidu modifié porté par l'ARNt artificiel (Figure 43).

Ces stratégies doivent utiliser des acides aminés non naturels tolérés par la machinerie traductionnelle et notamment par les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRSs) pour augmenter les chances d'incorporation. En utilisant ces méthodes, une variété de fonctions bio-orthogonales a pu être incorporée dans les protéines, à la fois dans des cellules bactériennes comme *E. coli* et celles de mammifères, permettant une détection par CuAAC,⁹² SPAAC⁹³ et par des ligations de Staudinger⁹⁴ ou de tétrazines.^{95,96}

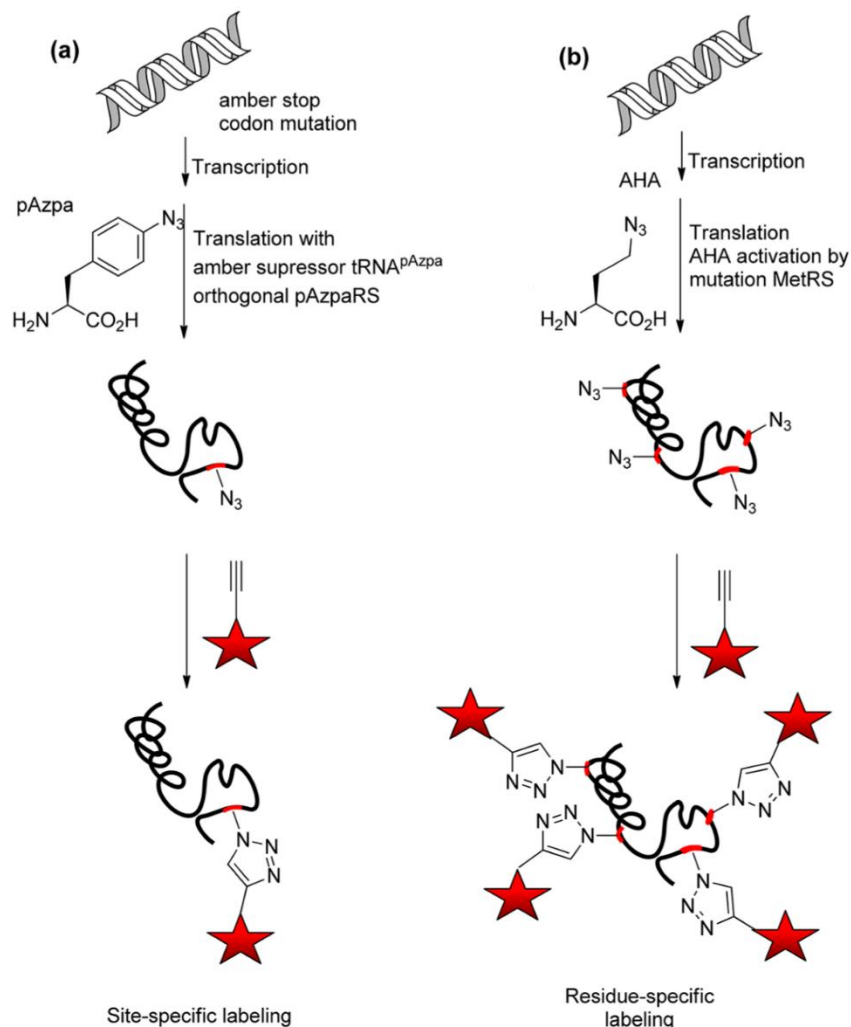


Figure 43 : Stratégies de marquage de protéines par chimie bio-orthogonale⁹⁷

Un exemple intéressant de marquage spécifique sur un site particulier de la protéine a été décrit *in vivo* par Mehl et coll.⁹⁵ sur des cellules d'*E. coli*. L'équipe a développé un acide aminé comportant une fonction tétrazine, capable d'être incorporé à une position donnée sur une protéine (ici la GFP) grâce à l'introduction d'un plasmide comportant le gène muté de la GFP par un codon stop « amber ». En effet, la présence de ce dernier permet le recrutement par la cellule de l'acide aminé non naturel à la position où ce codon a été placé, au sein de la GFP lors de la traduction. La protéine modifiée sur un

⁹² Link, A. J.; Tirrell, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164-11165.

⁹³ Link, A. J.; Vink, M. K.; Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R.; Tirrell, D. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 10180-10185.

⁹⁴ Kiick, K. L.; Saxon, E.; Tirrell, D. A.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 19-24.

⁹⁵ Seitchik, J. L.; Peeler, J. C.; Taylor, M. T.; Blackman, M. L.; Rhoads, T. W.; Cooley, R. B.; Refakis, C.; Fox, J. M.; Mehl, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2898-2901.

⁹⁶ Li, Z.; Wang, D.; Li, L.; Pan, S.; Na, Z.; Tan, C. Y.; Yao, S. Q. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 9990-9998.

⁹⁷ Thirumurugan, P.; Matosiuk, D.; Jozwiak, K. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4905-4979.

site spécifique peut alors être détectée par fluorescence en ajoutant un dérivé du TCO **18** grâce à une réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse. En effet, le système π conjugué de la tétrazine entraîne une extinction de la fluorescence de la GFP, qui est retrouvée après cyclisation avec l'alcène contraint. Cette application est possible à la fois *in vitro* et *in vivo* et la réaction « click » a l'avantage d'être rapide (5 min *in vitro* avec 3 μM de GFP-tétrazine et 39 μM de TCO ; 45 min *in vivo* avec 125 μM de TCO) mais aussi quantifiable avec une concentration de l'ordre du μM pour le TCO. Néanmoins, elle nécessite une manipulation génétique préalable relativement longue (incorporation de l'acide aminé au bout de 40 h) pour aboutir à la protéine modifiée, ce qui peut être un désavantage pour une application sur des cellules de mammifères.

II – Glycanes

Les glycanes constituent une autre classe de biomolécules particulièrement intéressante pour la bio-imagerie, car ils jouent un rôle clé dans de nombreux processus biologiques. Les glycanes contenant de l'acide sialique par exemple sont liés aux infections bactériennes et aux invasions de virus. Une glycosylation anormale est également impliquée dans la progression de certaines maladies, comme le cancer. L'étude de la dynamique des glycanes est ainsi cruciale en glycobiologie, pouvant permettre d'améliorer le diagnostic de maladies ainsi que leurs thérapies.

Contrairement aux protéines, les glycanes ne peuvent être modifiés par des méthodes génétiques car leur source est d'origine externe et métabolique, et non génétique. La principale méthode de marquage des glycanes repose sur l'utilisation de monosaccharides fonctionnalisés par des rapporteurs bio-orthogonaux. Ces monosaccharides sont des précurseurs de la biosynthèse des glycanes qui sont incorporés *via* la machinerie métabolique de la cellule dans la structure des glycanes cibles en fonction de leur nature. Les fonctions bio-orthogonales se retrouvent à la surface de la membrane cellulaire (Figure 44) et peuvent ensuite réagir *via* diverses réactions bio-orthogonales : le premier exemple fut décrit en 2000 par Saxon et Bertozzi⁹⁸ *via* une ligation de Staudinger, suivi par des détections utilisant les réactions CuAAC⁹⁹ et SPAAC.¹⁰⁰

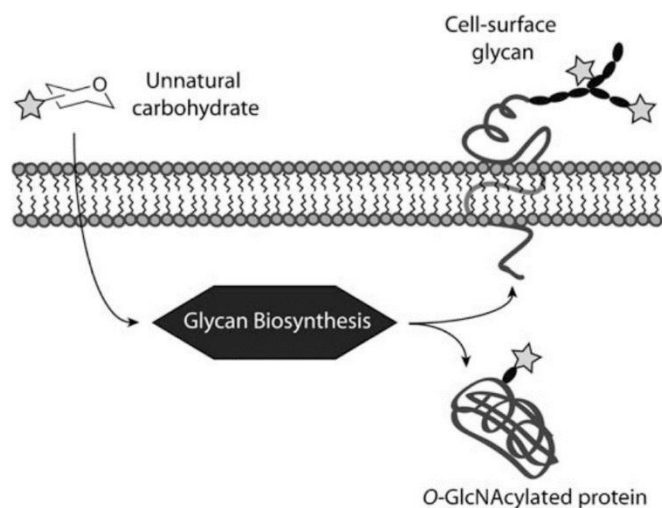


Figure 44 : Stratégie de marquage de glycanes par chimie bio-orthogonale²⁹

⁹⁸ Saxon, E.; Bertozzi, C. R. *Science*, **2000**, *287*, 2007-2010.

⁹⁹ Laughlin, S. T.; Baskin, J. M.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R. *Science*, **2008**, *320*, 664-667.

¹⁰⁰ Chang, P. V.; Dube, D. H.; Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9516-9518.

Même si cette méthode a abouti à de nombreuses applications, ses conditions de réalisation ne sont pas toujours optimales et requièrent souvent la fixation des cellules pour procéder à la réaction bio-orthogonale.

Un exemple parlant de la CuAAC est celui décrit par Vauzeilles et coll.¹⁰¹ pour la détection de *Legionella pneumophila*, bactéries responsables de la légionellose. Ils s'appuient sur l'incorporation spécifique d'un monosaccharide portant une fonction azoture dans la paroi extracellulaire, particulièrement riche en sucres. Cette étape de métabolisation varie d'un organisme à l'autre (ici environ 12 h) mais témoigne de l'activité et donc de la vie de la cellule. Les fonctions azotures se retrouvent à la surface de la cellule et une solution contenant le catalyseur cuivré, son ligand et son oxydant, ainsi que l'alcyne couplé à une biotine est ajoutée. La réaction « click » s'opère entre 30 min et 3 h et la détection des cellules se fait par microscopie de fluorescence à 488 nm en ajoutant un anticorps dirigé contre la biotine (AlexaFluor 488-IgG), marqué par un fluorophore. Cette application constitue une nette amélioration par rapport aux détections classiques de *Legionella pneumophila*, qui se basent sur la culture cellulaire d'un échantillon (environ trois jours) puis par réplication de l'ADN par PCR. En termes de bio-orthogonalité néanmoins, cette méthode n'est pas optimale puisque les concentrations utilisées sont de l'ordre du mM (dont 2 mM pour le cuivre) et conduisent à une toxicité non négligeable, d'autant plus que le temps total de l'expérience est long.

III – Lipides

Les lipides jouent un rôle biologique important dans la régulation de voies biologiques et dans certains événements physiopathologiques. On les retrouve en abondance dans les membranes où ils jouent des rôles clé en tant que ligands et substrats. Comme les glycanes, les lipides ne peuvent pas être étudiés directement par des méthodes génétiques. Pour les étudier, leur marquage se fait essentiellement par l'incorporation de précurseurs modifiés dans leur biosynthèse (Figure 45).

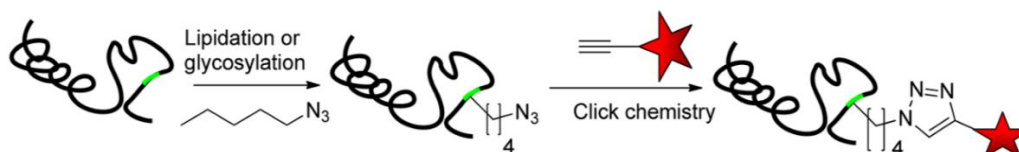


Figure 45 : Stratégie de marquage des lipides par la chimie bio-orthogonale⁹²

La difficulté dans le marquage des lipides repose sur leur comportement dynamique important : lorsqu'ils sont des intermédiaires métaboliques, ils sont fréquemment convertis en d'autres espèces de lipides ou acides gras. De même, lorsqu'ils font partie des constituants de la membrane, ils diffusent rapidement d'un compartiment membranaire à un autre, rendant le suivi de leur localisation et de leur évolution ardu.

Des cholines greffées d'une fonction alcyne ont par exemple été incorporées métaboliquement sur des phospholipides, ce qui a permis de suivre leur synthèse dans la cellule et leur localisation par un marquage sélectif *via* une réaction CuAAC.¹⁰² D'autres exemples de marquage de phospholipides ont

¹⁰¹ Mas Pons, J.; Dumont, A.; Sautejeau, G.; Fugier, E.; Baron, A.; Dukan, S.; Vauzeilles, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1275-1278.

¹⁰² Jao, C. Y.; Roth, M.; Welte, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 15332-15337.

été décrits *via* les SPAAC.¹⁰³ Martin *et al.*¹⁰⁴ ont utilisé la ligation de Staudinger pour étudier le rôle de la myristoylation dans l'apoptose, en utilisant des acides gras greffés par des fonctions azotures.

En 2009, Neef et Schultz décrivent pour la première fois le marquage de lipides par CuAAC et SPAAC, sur des cellules de mammifères à la fois fixées et vivantes.¹⁰³ Leurs travaux se basent sur un modèle de lipide, l'acide phosphatidique (ayant des rôles importants comme dans la prolifération cellulaire ou l'exocytose), dont ils ont reproduit la synthèse en greffant en bout de chaîne une fonction alcyne (terminale ou cyclooctyne). Des cellules de macrophages ont été incubées avec ces dérivés (10 μ M) pendant une heure avant d'être révélées par fluorescence grâce à une réaction SPAAC avec l'ajout d'un dérivé coumarine portant une fonction azoture (50 μ M), au bout de 3 h. Aucune toxicité n'a été observée sur les cellules vivantes, même après plusieurs heures, ce qui n'a pas été le cas pour la version CuAAC où 1 mM de cuivre sont nécessaires pour faire réagir la même concentration d'acide phosphatidique modifié que la SPAAC. Dans ce dernier cas, la fixation des cellules a été inévitable. Cette méthode de marquage de lipides requiert la synthèse ou la disponibilité commerciale des lipides étudiés, et la vitesse de réaction *in vivo* ne permet pas une observation en temps réel ou à l'échelle de la minute du dynamisme des lipides. Elle reste néanmoins sélective et, dans le cas de la SPAAC, non toxique.

IV – Acides nucléiques

Les acides nucléiques incluant l'ADN et l'ARN sont des unités essentielles pour les processus cellulaires biologiques. L'étude de tels polymères dans leur environnement natif est critique pour la compréhension de certaines maladies mais aussi pour un domaine émergent, l'épigénétique. Le marquage direct de nucléotides constitue aujourd'hui la méthode la plus couramment utilisée pour détecter les acides nucléiques. Traditionnellement, la thymidine tritiée peut être utilisée mais cette technique est basée sur la radioactivité et requiert souvent la dénaturation de l'ADN.

L'équipe de Salic^{105,106} a développé en 2008 une autre méthode, basée sur l'incorporation d'un autre nucléotide modifié (la 5-éthynyl-2-désoxyuridine ou EdU) dans l'ADN de cellules en cours de réplication (Figure 46). La détection est rendue possible par chimie « click » *via* une réaction CuAAC.

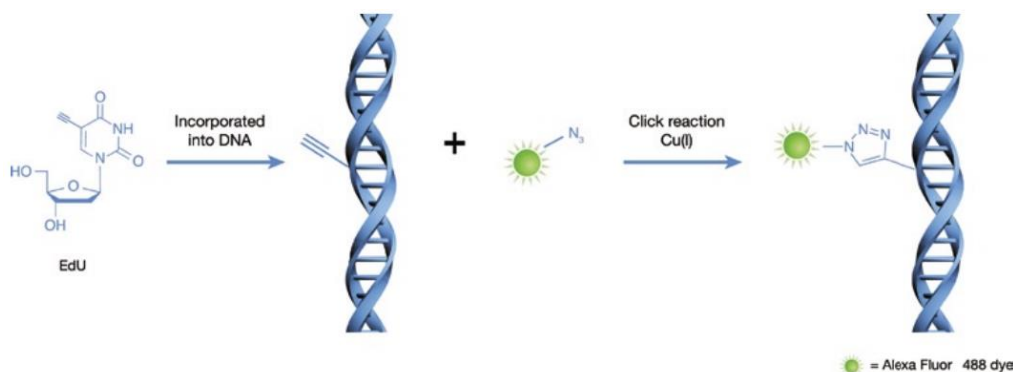


Figure 46 : Stratégie de marquages des acides nucléiques par chimie bio-orthogonale¹⁰⁶

¹⁰³ Neef, A. B.; Schultz, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1498-1500.

¹⁰⁴ Martin, D. O.; Vilas, G. L.; Prescher, J. A.; Rajaiah, G.; Falck, J. R.; Bertozzi, C. R.; Berthiaume, L. G. *FASEB J.* **2008**, *22*, 797-806.

¹⁰⁵ Salic, A.; Mitchison, T. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2415-2420.

¹⁰⁶ Buck, S. B.; Bradford, J.; Gee, K. R.; Agnew, B. J.; Clarke, S. T.; Salic, A. *Biotechniques* **2008**, *44*, 927-929.

EdU s'est révélé être toxique (par déstabilisation de l'ADN et arrêt du cycle cellulaire) ce qui a limité son application *in vivo*. Des analogues moins toxiques ont été décrits par Neef et Luedtke¹⁰⁷ en utilisant une ligation par des tétrazines qui ne nécessite pas une catalyse métallique, notamment le VdU (pour 5-vinyl-2-désoxyuridine) dont la fonction vinyle aromatique est capable de réagir *via* une réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse. Ce composé a été incorporé dans plusieurs lignées de cellules humaines et seul l'ADN nucléaire a été marqué, témoignant de sa sélectivité vis-à-vis de l'ARN d'une part, et de l'ADN mitochondrial d'autre part. De plus, il cause nettement moins de toxicité et représente le premier exemple de marquage intranucléaire par le biais de ce type de réaction. Comme pour le marquage des glucides, l'incorporation du nucléoside dans l'ADN n'est pas immédiate et nécessite sa métabolisation (16 h). Toutefois, comme pour tous les exemples décrits à ce jour, la réaction bio-orthogonale a lieu après fixation des cellules et dénaturation de l'ADN, ce qui limite son utilisation *in vivo*. La tétrazine utilisée est liée à un fluorophore (TAMRA ou tétraméthylrhodamine, 5 μM pour 30 μM de diènoophile) qui permet la détection par fluorescence au bout de 4 h.

Conclusion

Les exemples ci-dessus témoignent du pouvoir de la chimie bio-orthogonale, un domaine de recherche émergeant depuis seulement une quinzaine d'années poussé par la découverte de nouvelles réactions chimiques. Dans un contexte pluridisciplinaire allant de l'étude des mécanismes fondamentaux de réactions organiques aux applications en biologie sur des organismes vivants, la chimie bio-orthogonale offre de nombreux défis et des innovations prometteuses.

Toutefois, les applications décrites visent essentiellement le marquage et donc l'étude de biomolécules dans les systèmes biologiques. Bien que les informations obtenues participent à une meilleure compréhension des métabolismes et des très nombreuses pathologies dans lesquels ces biomolécules sont impliquées, l'étude *via* la chimie bio-orthogonale de molécules xénobiotiques, c'est-à-dire étrangères au système vivant étudié, est moins fréquente.^{108,109} Des exemples classiques de xénobiotiques sont les médicaments ou les pesticides, des molécules de petite taille comparées aux biomolécules ciblées. Contrairement aux dérivés ou analogues de précurseurs de biomolécules utilisés ci-dessus, les xénobiotiques ne sont ni produits par l'organisme lui-même, ni utilisés dans ses voies de biosynthèse. Ils ne peuvent donc pas être utilisés comme leurres dans la machinerie cellulaire.

¹⁰⁷ Neef, A. B.; Luedtke, N. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 20404-20409.

¹⁰⁸ Penarete-Vargas, D. M.; Boisson, A.; Urbach, S.; Chantelauze, H.; Peyrottes, S.; Fraisse, L.; Vial, H. J. *PLoS One* **2014**, *9*, doi: 10.1371/journal.pone.0113918.

¹⁰⁹ Ismail, H. M.; Barton, V.; Phanchana, M.; Charoensutthivarakul, S.; Wong, M. H.; Hemingway, J.; Biagini, G. A.; O'Neill, P. M.; Ward, S. A. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2016**, *113*, 2080-2085.

Projet de recherche

Afin de comprendre le manque de corrélation entre les activités enzymatique et cellulaire pour certaines molécules, ces travaux de thèse ont été menés de manière à tenter de répondre à une question essentielle : les molécules synthétisées au laboratoire sont-elles capables d'entrer dans le parasite ?

Pour y répondre, notre objectif est de développer un outil de fluorescence innovant, basé sur le principe de la chimie bio-orthogonale et capable de détecter la présence de petites molécules à l'intérieur d'une cellule, essentiellement dans les protozoaires parasites responsables du paludisme et de la maladie du sommeil (*P. falciparum* et *T. brucei*, respectivement).

Néanmoins, l'utilisation des méthodes appliquées à la détection de biomolécules n'est pas appropriée. En effet, la visualisation de la réaction bio-orthogonale dans ces exemples se fait principalement par une détection de la fluorescence : l'un des partenaires au moins porte un fluorophore, généralement commercial, en plus de la fonction impliquée dans le couplage. Sa taille et ses propriétés physico-chimiques ne constituent pas une gêne une fois le précurseur incorporé dans la biomolécule. Mais il n'en est pas de même pour les petites molécules, dont le comportement en milieu biologique pourrait être influencé. De plus, les méthodes décrites pour la détection de biomolécules ne permettent pas toujours de faire la différence entre le signal du précurseur libre et celui du précurseur incorporé et nécessite des marquages complémentaires.

Ainsi, ces travaux de thèse consistent en la conception d'un outil fluorescent basé sur un système de détection « on-on' ». En effet, les systèmes « off-on » ne nous permettraient pas de vérifier que nos sondes sont elles-mêmes capables de traverser les membranes et les systèmes « on-off » ne nous permettraient pas de visualiser la localisation (intra- ou extracellulaire) des adduits formés. Notre but est donc de créer une sonde fluorescente capable de détecter de façon bio-orthogonale une molécule d'intérêt au sein d'une cellule, dont l'adduit formé serait également fluorescent mais à une autre longueur d'onde d'émission. Ceci permettrait de visualiser et différencier le signal de la sonde libre et de la sonde couplée, mais aussi de quantifier le signal intracellulaire et donc la pénétration de la molécule d'intérêt.

De telles sondes doivent toutefois remplir de nombreux critères, résumés en un cahier des charges (Tableau 8) à l'interface de trois disciplines.

D'un point de vue chimique, les sondes doivent posséder les mêmes caractéristiques que les réactifs des transformations bio-orthogonales : réaction spécifique et rapide avec la molécule d'intérêt, réalisable en conditions physiologiques et menant à une liaison covalente stable. Leur emploi en milieu biologique, et notamment sur des cellules vivantes, impose leur inactivité vis-à-vis des fonctions biologiques présentes.

De plus, les molécules que nous cherchons à détecter ayant une cible potentiellement cytosolique, ces sondes doivent être capables de traverser les membranes et de ne s'accumuler que dans le cytosol du parasite.

Enfin, les propriétés de fluorescence de ces sondes doivent être compatibles avec le vivant avec une longueur d'onde d'excitation éloignée de l'UV pour éviter, par exemple, des signaux parasites de molécules endogènes autofluorescentes (ex : tryptophane, NADH...). Ses propriétés doivent également être suffisamment stables pour permettre une étude adéquate : ces sondes doivent présenter un bon rendement quantique de fluorescence Φ_f qui traduit leur efficacité à émettre de la fluorescence, ainsi

qu'un faible photo-blanchiment qui correspond à la dégradation chimique irréversible de l'espèce à l'état excité et donc à une disparition plus ou moins rapide de la fluorescence. Un grand déplacement de Stokes $\Delta\nu$ est également nécessaire pour éviter des phénomènes de réabsorption de photons conduisant à une mesure faussée du signal d'émission. Enfin, la réaction de ces sondes avec la molécule d'intérêt doit conduire à une modification de la fluorescence de manière à rendre possible une visualisation et une quantification.

Chimie	Biologie	Photophysique
Reconnaissance spécifique de la molécule d'intérêt	Non réactifs vis-à-vis des fonctions biologiques	$\lambda_{\text{ex}} > 340 \text{ nm}$
Lien covalent à la molécule d'intérêt	Traverser les membranes et sans contraintes	Grand déplacement de Stokes $\Delta\nu$
Réaction rapide et stœchiométrique	Accumulation dans le cytosol	Modification de la fluorescence
Réalisation en conditions physiologiques	Quantification sonde libre VS sonde couplée	Faible photo-blanchiment
		Grand rendement quantique de fluorescence Φ_f

Tableau 8 : Cahier des charges de la sonde fluorescente

Dans la littérature, une seule famille de composés répond à la majorité de ces critères : celles des dibenzocyclooctynones, dont le membre le plus simple est le céto-DIBO **34**⁵⁴ (Figure 47). En effet, celui-ci fluoresce et possède un bon rendement quantique de fluorescence, un grand déplacement de Stokes, ainsi qu'une durée de vie de fluorescence τ_f correcte. Il est également capable de réagir avec une fonction azoture *via* une réaction SPAAC. Toutefois, il possède une longueur d'onde d'excitation proche de l'UV, ce qui pourrait limiter son utilisation *in cellulo*, et l'adduit triazole **44** est décrit comme non fluorescent.

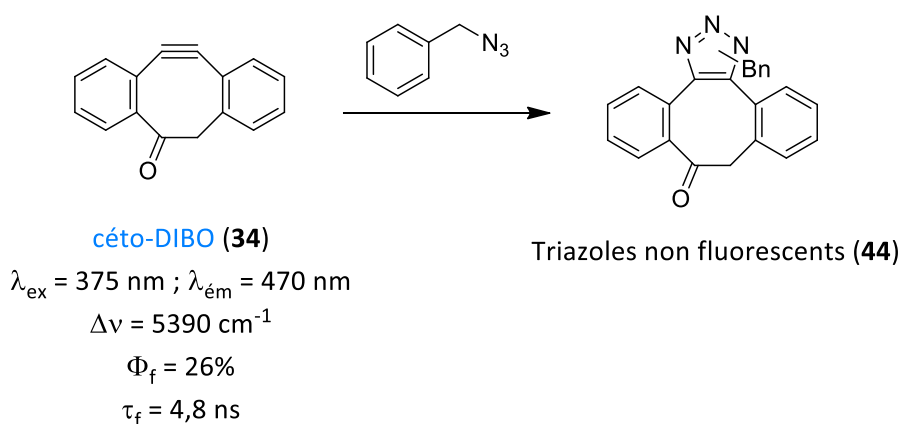


Figure 47 : Réactivité du céto-DIBO

Nous nous proposons ainsi de concevoir et synthétiser des dérivés du céto-DIBO **34** répondant au cahier des charges, de manière à déplacer la longueur d'onde d'excitation vers le proche infrarouge et

obtenir des triazoles fluorescents possédant, de plus, une émission différente de la sonde initiale (Figure 48).

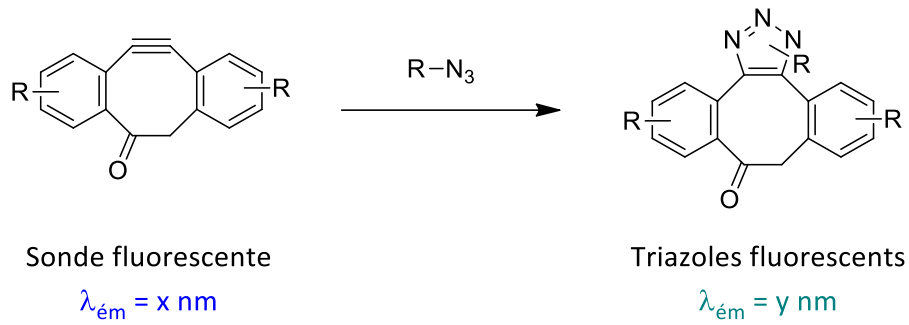


Figure 48 : Conception et synthèse de dérivés du céto-DIBO pour obtenir des triazoles fluorescents

Les dibenzocyclooctynones obtenues seront caractérisées en photophysique et leur réactivité vis-à-vis de la réaction de chimie « click » avec un modèle d'azoture sera vérifiée. Enfin, leur comportement propre en milieu biologique sera étudié chez *P. falciparum* et *T. brucei*, avant de vérifier la faisabilité de la détection *in cellulo* chez le parasite.

Approche initiale :
Dibenzocyclooctynes
fluorescents de 1^{ère}
génération

génération

Chapitre I : Rappels bibliographiques

Outre ses propriétés bio-orthogonales, le céto-DIBO **34** nous intéresse en raison de ses propriétés de fluorescence, non observées pour les autres dibenzyclooctynes. Dans le but de développer de nouveaux dérivés fluorescents de ce composé, nous nous sommes au préalable intéressés à la préparation des cyclooctynes qui repose sur deux étapes clés : la formation de cyclooctanes et l'obtention de fonctions alcynes intracycliques. Les propriétés de fluorescence intrinsèques de ces dérivés pouvant jouer un rôle important dans l'analyse et la détection de molécules en milieu biologique, nous nous sommes également intéressés à cette technique de marquage.

I – Fluorescence

I.1. Principe

La fluorescence est un cas particulier de luminescence,¹¹⁰ qui correspond à une émission de lumière (dans l'ultraviolet, le visible ou l'infrarouge) par désexcitation radiative d'une espèce à un état électroniquement excité. Ce phénomène, qui s'accompagne de l'émission d'un photon, peut être illustré par un diagramme de Perrin-Jablonski (Figure 49) où sont représentés les différents niveaux et états électroniques d'une molécule : l'état fondamental singulet S_0 et les états excités S_1 et S_2 , chacun d'entre eux étant subdivisé en plusieurs niveaux d'énergie vibrationnelle.

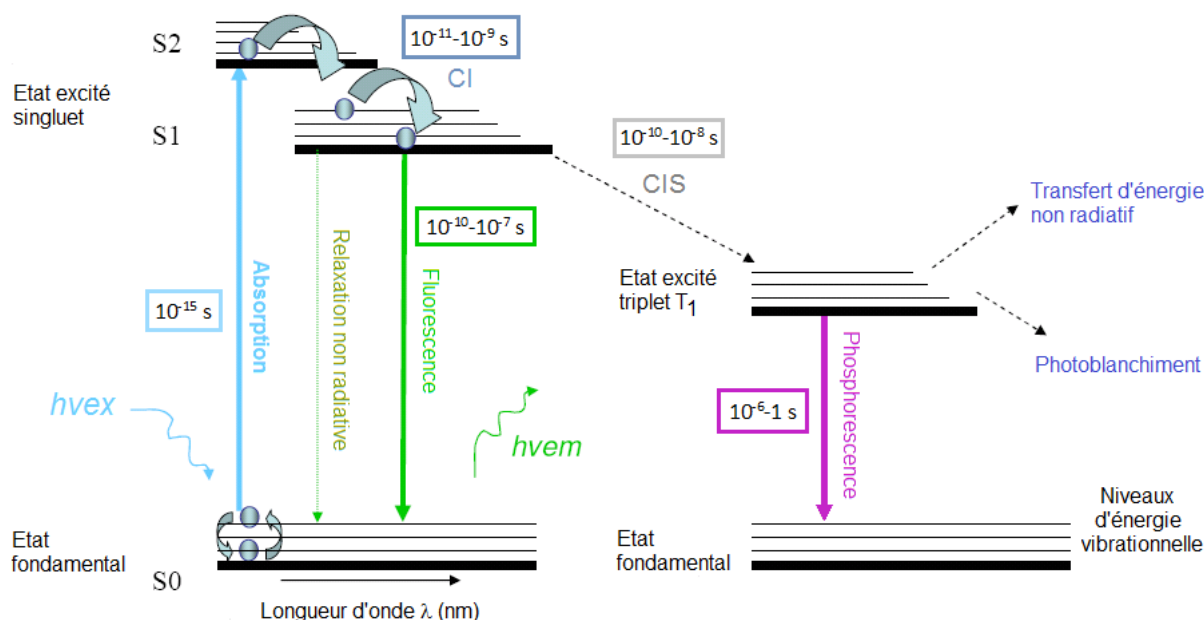
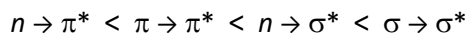


Figure 49 : Diagramme de Perrin-Jablonski

Tout débute par une radiation lumineuse, ou excitation, qui résulte en l'absorption rapide d'un photon $h\nu_{ex}$ à une longueur d'onde $\lambda = 1/h\nu_{ex}$ (où h représente la constante de Planck et ν la fréquence de la radiation) par la molécule la faisant passer de l'état fondamental à un état électronique excité de plus haute énergie et instable. Ceci correspond à la promotion d'un électron dans une orbitale

¹¹⁰ *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Bernard Valeur, 2001, Wiley-VCH Verlag GmbH.

inoccupée d'énergie plus élevée, l'ordre d'énergie des transitions électroniques étant en général le suivant :



La molécule à l'état excité revient toujours à son état fondamental mais suivant différents processus de désexcitation. Dans le cas de la fluorescence, une première relaxation, non radiative, fait passer le fluorophore de l'état S_2 à l'état intermédiaire S_1 (relaxation aussi appelée conversion interne ou CI). La seconde relaxation, cette fois-ci radiative, correspond au retour à l'état fondamental avec l'émission d'un photon $h\nu_{\text{ém}}$ à une longueur d'onde $\lambda' = 1/h\nu_{\text{ém}}$.

Mais toutes les molécules ne sont pas fluorescentes, en général parce qu'elles empruntent une autre voie de désexcitation à partir de l'état S_1 vers un état excité triplet T_1 , qui implique une transition non radiative (appelée conversion inter-système ou CIS). Puisque cette relaxation entraîne une inversion de spin, l'état T_1 correspond à un niveau d'énergie plus bas que l'état S_1 . A partir de l'état T_1 , il existe une compétition entre la désexcitation radiative à l'origine du phénomène de phosphorescence et les désexcitations non radiatives (prédominantes). Ces dernières, qui ne s'accompagnent pas d'émission de photon, utilisent l'énergie absorbée dans des phénomènes irréversibles qui modifient la molécule (réactions chimiques, transfert de proton, changement conformationnel...). En général, une voie de désexcitation est privilégiée par rapport aux autres si sa vitesse est plus rapide que celles des autres relaxations.

1.2. Principales caractéristiques d'un fluorophore

Les fluorophores sont des molécules capables d'émettre un signal fluorescent de longueur d'onde $\lambda_{\text{ém}}$ à la suite de l'absorption d'un photon de longueur d'onde λ_{ex} . Ces espèces sont principalement utilisées en tant que marqueurs en milieu biologique, mais il est intéressant de noter que certains composés fluorescents peuvent présenter, de plus, des propriétés thérapeutiques, comme la quinine. Les fluorophores sont caractérisés par différents paramètres.

1.2.1. Spectres d'absorption et d'émission

Chaque molécule fluorescente est caractérisée par un spectre d'absorption et un spectre d'émission, qui correspondent à la distribution de probabilités des transitions d'énergie. Ainsi, le spectre d'absorption est composé de larges bandes correspondant à de nombreuses bandes d'absorption des différentes transitions vibrationnelles, imputées aux différentes fonctions présentes sur la molécule. Le spectre d'émission est situé à des longueurs d'onde plus grandes que le spectre d'absorption (et donc à des énergies plus basses) en raison de la perte d'énergie due à la relaxation de l'état excité.

1.2.2. Déplacement de Stokes

Le déplacement de Stokes $\Delta\nu$ correspond à la différence d'énergie entre les maxima des spectres d'absorption et d'émission (Figure 50). Il est donc exprimé en unité d'énergie (cm^{-1} , eV, J...) et plus ce déplacement est grand, plus la lecture et la détection d'espèces fluorescentes est facilitée.

$$\Delta\nu = \frac{1}{\lambda_{\text{abs max}}} - \frac{1}{\lambda_{\text{ém max}}}$$

Figure 50 : Calcul du déplacement de Stokes

1.2.3. Rendement quantique de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence Φ_f traduit l'efficacité de fluorescence d'un fluorophore. Il correspond au rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés (Figure 51). Ainsi, plus il est grand, plus l'émission, et donc la fluorescence, est importante.

$$\Phi_f = \frac{N_{\text{photons émis}}}{N_{\text{photons absorbés}}}$$

Figure 51 : Le rendement quantique de fluorescence

En pratique, ce rendement est calculé par rapport à une référence dont le rendement quantique de fluorescence est connu et suivant l'équation suivante (Figure 52) :

$$\Phi_{f(x)} = \Phi_{f(\text{réf})} \times \frac{1-10^{-A_{\text{réf}}}}{1-10^{-A_x}} \times \frac{S_x}{S_{\text{réf}}} \times \left(\frac{n_x}{n_{\text{réf}}}\right)^2$$

Figure 52 : Calcul du rendement quantique de fluorescence

avec x le fluorophore étudié, réf l'étalon choisi, Φ_f le rendement quantique de fluorescence, A l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation étudiée, S l'aire sous la courbe d'émission et n l'indice de réfraction du solvant utilisé.

Par souci de précision, la référence choisie doit avoir une longueur d'onde d'excitation identique à celle du fluorophore étudié et un spectre d'émission couvrant une zone comparable. De plus, les échantillons doivent avoir une absorbance à la longueur d'onde d'excitation étudiée inférieure à 0,1 u.a. afin d'éviter les phénomènes de réabsorption de photons, qui peuvent fausser les mesures de fluorescence. Ceci s'observe notamment lorsque le déplacement de Stokes est faible. Enfin, les échantillons doivent être analysés dans les mêmes conditions pour le fluorophore et la référence (paramètres des spectrofluoromètre et spectrophotomètre) pour minimiser les erreurs de mesures.

1.2.4. Intensité de fluorescence

L'intensité de fluorescence I (ou brillance B) correspond au produit du coefficient d'extinction molaire ε avec le rendement quantique de fluorescence de l'échantillon étudié (Figure 53). ε reflète la probabilité d'absorption à une longueur d'onde donnée, et ainsi associé au rendement quantique, ce paramètre peut constituer un critère de comparaison entre deux fluorophores.

$$I = \varepsilon \times \Phi_f$$

Figure 53 : Calcul de l'intensité de fluorescence

1.2.5. Durée de vie de fluorescence

La durée de vie ou temps de déclin de fluorescence τ_f représente le temps moyen passé par une population de fluorophores à l'état excité S_1 . Ce temps correspond en général à des valeurs de l'ordre de la nanoseconde et peut être exprimé par l'équation ci-dessous (Figure 54) :

$$\tau_f = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

Figure 54 : Expression de la durée de vie de fluorescence

avec k_r la constante de vitesse radiative et k_{nr} la constante de vitesse non radiative.

Ainsi, la durée de vie de fluorescence ne représente pas uniquement les propriétés radiatives d'une molécule excitée mais aussi l'ensemble des processus de désexcitation non radiatifs. Cette équation indique que la durée de vie de fluorescence dépend des caractéristiques du fluorophore mais également de son environnement. Elle apporte ainsi des informations complémentaires, par le calcul des constantes k_r et k_{nr} , en renseignant sur les interactions moléculaires et sur l'environnement physico-chimique des molécules, notamment à l'état excité. La durée de vie de fluorescence est par ailleurs indépendante de la concentration du fluorophore.

Dans les applications en milieu biologique, la durée de vie de fluorescence d'un fluorophore peut constituer un moyen de filtrer le signal des molécules endogènes autofluorescentes (dont la durée de vie de fluorescence est courte) pour s'affranchir du bruit, notamment lorsque la longueur d'onde d'excitation du fluorophore est proche de l'UV. Pour cela, le signal de fluorescence peut être enregistré avec un temps de décalage par rapport à la longueur d'onde d'excitation appliquée, correspondant à la durée de vie des fluorophores endogènes.

La durée de vie de fluorescence, comme le rendement quantique, est une caractéristique déterminée de manière expérimentale. Une méthode conventionnelle pour la mesurer est la technique de comptage de photon unique corrélé dans le temps, qui enregistre les instants d'arrivée de photons uniques dans des canaux temporels suite à l'impulsion excitatrice par une source laser. L'histogramme du nombre de photons comptés par chacun de ces canaux reconstruit le déclin de fluorescence, qui peut être mono- ou multi exponentiel en fonction du nombre d'espèces présentes à l'état excité. Un ajustement de la courbe est ensuite réalisé de manière à obtenir une équation exponentielle de type (Figure 55) :

$$I(t) = Y_0 + Y_1 \exp\left(\frac{-t}{\tau_1}\right) + Y_2 \exp\left(\frac{-t}{\tau_2}\right) + \dots$$

Figure 55 : Ajustement du déclin de fluorescence (multi) exponentiel

avec $I(t)$ l'intensité de fluorescence à l'instant t , Y_0 le bruit, Y_i le coefficient pré-exponentiel de l'espèce i et τ_i la durée de vie de fluorescence de l'espèce i .

La durée de vie de fluorescence est obtenue directement à partir de l'équation et lorsque le déclin est multi exponentiel, il est possible de déterminer la contribution (ou le poids) de chaque espèce i à partir des coefficients pré-exponentiels (Figure 56) :

$$\text{Poids}_i = \frac{Y_i}{\sum Y_i}$$

Figure 56 : Estimation de la contribution au déclin de fluorescence d'une espèce

1.2.6. Constantes de vitesse radiative et non radiative

Une fois le rendement quantique et la durée de vie de fluorescence déterminés, il est alors possible de calculer les constantes de vitesse radiative k_r et non radiative k_{nr} (Figure 57), exprimées en s^{-1} et caractéristiques des états excités d'une molécule.

$$\Phi_f = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad \text{et} \quad \tau_f = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

$$\text{Ainsi, } k_r = \frac{\Phi_f}{\tau_f} \quad \text{et} \quad k_{nr} = \frac{1 - \Phi_f}{\tau_f}$$

Figure 57 : Expressions des constantes de vitesse radiative et non radiative

Celles-ci représentent les vitesses de désexcitation $S_1 \rightarrow S_0$ de la molécule excitée (les constantes de vitesse des désexcitations $T_1 \rightarrow S_0$ ne seront pas traitées) et informent ainsi sur la probabilité de relaxation que le fluorophore empruntera pour revenir à l'état fondamental.

1.3. Facteurs environnementaux influençant la fluorescence

Les propriétés de fluorescence précédemment citées peuvent être influencées, quelques fois fortement, par des facteurs de l'environnement de la molécule.¹¹⁰ Ces facteurs sont variés (Figure 58) et seuls certains seront traités pour illustration.

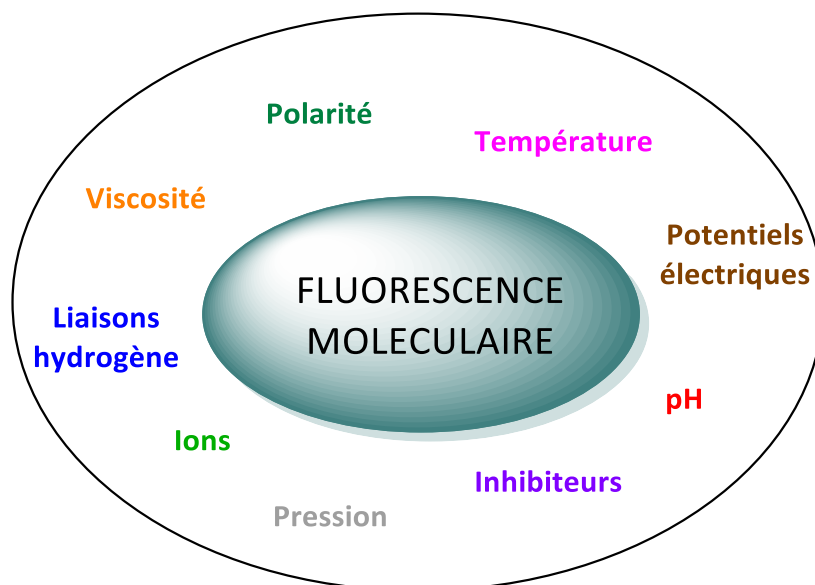


Figure 58 : Facteurs environnementaux ayant un effet sur la fluorescence

La polarité fait partie des paramètres ayant le plus d'influence sur les propriétés de fluorescence. Lorsque les spectres d'absorption et d'émission d'un fluorophore dépendent de la polarité du solvant, ce phénomène est appelé solvatochromisme. Des déplacements des spectres sont alors observés soit vers les courtes longueurs d'onde (effet hypsochrome), soit vers les grandes longueurs d'onde (effet bathochrome). Ceci résulte de l'interaction avec le solvant lorsque la molécule est à l'état excité, qui peut induire des réarrangements en modifiant les moments dipolaires. L'effet de solvant peut donc modifier l'émission, l'intensité de fluorescence et le déplacement de Stokes.

La température influence la viscosité du solvant, ce qui a un effet sur les collisions des molécules avec le solvant, sur les rotations intramoléculaires et sur les vibrations. Le devenir de l'espèce à l'état excité est particulièrement sensible à ces changements, ainsi que le rendement quantique et donc l'intensité de fluorescence.

Il faut également noter que les propriétés acido-basiques d'une molécule ne sont pas les mêmes à l'état fondamental et à l'état excité. En effet, la redistribution de la densité électronique après l'excitation peut par exemple augmenter le caractère acide ou basique et provoquer un transfert de proton à l'état excité qui, à terme, modifie la molécule et donc ses propriétés de fluorescence.

Des paramètres inhibiteurs ou perturbateurs de la fluorescence peuvent également gêner l'utilisation de fluorophores comme le photoblanchiment. Ce dernier correspond à une perte progressive de l'intensité de fluorescence résultant de la dégradation photo-induite du fluorophore. Il s'agit d'un phénomène irréversible où la molécule est modifiée au cours de réactions photochimiques en particulier avec l'oxygène ou des radicaux libres. Le photoblanchiment dépend principalement de la structure du fluorophore mais aussi de son environnement chimique.

Un autre paramètre inhibiteur est le quenching qui, à l'inverse du photoblanchiment, est un phénomène réversible d'extinction de la fluorescence. Il est provoqué par les conditions expérimentales (comme la force ionique, le pH, l'effet des solvants ou la présence d'autres fluorophores qui réduisent l'efficacité d'émission) et par différents procédés. Il peut être observé, par exemple, à la suite d'une collision ou d'un contact à l'état excité entre le fluorophore et une molécule en solution appelée « quencher ». Cette interaction désactive le fluorophore qui retourne à l'état fondamental sans émission de fluorescence et sans être modifié. Des exemples de quenchers sont l'oxygène, les amines, ou les molécules déficientes en électrons. Les quenchers peuvent également former des complexes avec le fluorophore à l'état fondamental et diminuer le rendement quantique, ou être présents sur la molécule, comme dans le cas des atomes lourds (Br, I, Pb) qui induisent un quenching appelé effet des atomes lourds internes, à l'état excité en augmentant la probabilité des CIS.

Un autre procédé pouvant conduire au quenching de la fluorescence est le quenching par transfert d'énergie par résonance de type Förster (ou FRET). Il s'agit également d'un mécanisme de désexcitation non radiative provoqué par un transfert d'énergie entre un composé donneur à l'état excité et un composé accepteur non fluorescent à l'état fondamental. Ce phénomène a lieu (comme pour la technique du FRET fluorescent où l'accepteur est fluorescent) si la distance entre le donneur et l'accepteur est de l'ordre de 10 à 100 Å (< 10 nm), si le spectre d'émission du donneur chevauche le spectre d'excitation de l'accepteur et si l'orientation des dipôles est favorable au transfert d'énergie.

I.4. Facteurs moléculaires influençant la fluorescence

Il est difficile de prédire l'effet d'un atome ou d'un substituant sur les propriétés photophysiques d'un fluorophore. Quelques règles empiriques servent toutefois de repères relatifs.

I.4.1. Extension du système π -conjugué

De manière générale, l'augmentation du motif conjugué conduit à un déplacement des spectres d'absorption et d'émission vers le proche infrarouge et parfois à l'augmentation du rendement quantique de fluorescence (Figure 59).^{110,111,112}

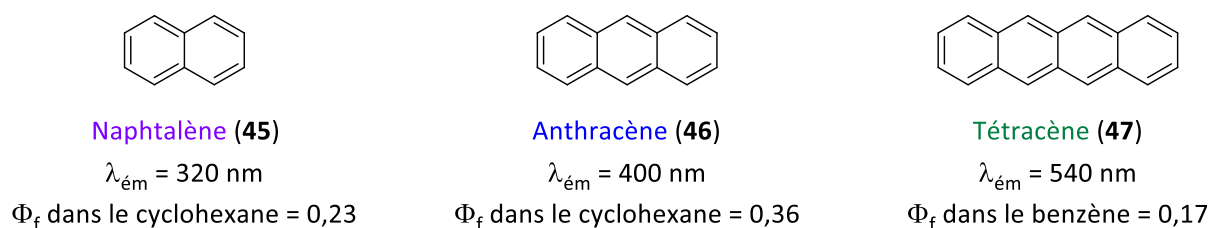


Figure 59 : Extension du système π

En effet, pour ces composés, les transitions les plus basses sont de type $\pi \rightarrow \pi^*$, caractérisées par un coefficient d'extinction molaire et un rendement quantique élevés. Dans le cas du tétracène **47**, sa faible solubilité a un impact sur son efficacité de fluorescence.

Pour les composés ayant un hétéroatome impliqué dans le système π , les transitions les plus basses sont de type $n \rightarrow \pi^*$ et correspondent à des transitions ayant un temps de relaxation radiative élevé. Ainsi, les processus de désexcitation plus rapides seront favorisés, notamment les relaxations non radiatives, ce qui entraîne, en général, des rendements quantiques beaucoup plus faibles (Figure 60).¹¹¹

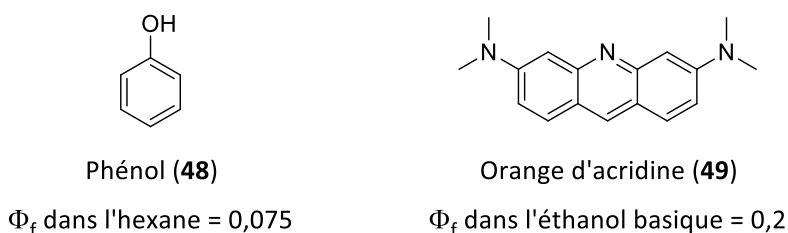


Figure 60 : Exemples de composés hétérocycliques

I.4.2. Substitution des composés aromatiques

Beaucoup de fluorophores sont aromatiques et la nature,¹¹³ la position¹¹⁴ et le nombre¹¹⁵ de substituants peuvent influencer leurs propriétés de fluorescence (Tableaux 9, 10 et 11).

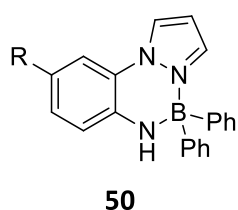
¹¹¹ PhotochemCAD 2.1

¹¹² Müllera, A. M.; Avlasevichb, Y. S.; Müllenb, K.; Bardeen, C. J. *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *421*, 518-522.

¹¹³ Liddle, B. J.; Silva, R. M.; Morin, T. J.; Macedo, F. P.; Shukla, R.; Lindeman, S. V.; Gardinier, J. R. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5637-5646.

¹¹⁴ Anderson, S.; Weaver, M. S.; Hudson, A. J. *Synth. Met.* **2000**, *111-112*, 459-463.

¹¹⁵ Sun, W.-C.; Gee, K. R.; Haugland, R. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3107-3110.

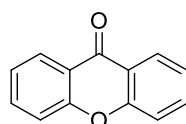


Composé	R	$\lambda_{\text{ém}}$ (nm)	Φ_f
a	H	480	0,69
b	Me	488	0,58
c	OMe	522	0,07
d	Cl	476	0,65
e	CF ₃	468	0,66
f	CO ₂ Et	467	0,70
g	CN	452	0,81

Tableau 9 : Effet de la nature du substituant sur les propriétés photophysiques d'un dérivé du BODIPY¹¹³

L'exemple du dérivé du BODIPY **50** ci-dessus illustre bien l'effet de la nature des substituants sur les propriétés photophysiques de la molécule. Les groupements électrodonneurs (**50b** et **50c**) induisent généralement une augmentation du coefficient d'extinction molaire ainsi qu'un effet bathochrome de l'émission en raison de la participation de leurs doublets non liants à la conjugaison. Toutefois, le gain potentiellement obtenu en absorption et émission ne coïncide pas inéluctablement avec une augmentation du rendement quantique de fluorescence.

L'effet des groupements électroattracteurs (**50d** à **50g**) est plus difficile à prédire. Contrairement aux précédents groupements, les transitions $n \rightarrow \pi^*$, de plus basse énergie, peuvent concurrencer les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ car les doublets non liants ne participent pas au système π -conjugué. Les transitions $n \rightarrow \pi^*$ correspondent de plus à des voies de relaxation longues, favorisant ainsi des processus non radiatifs. En revanche, si ces deux niveaux d'énergie sont proches, le rendement quantique de fluorescence sera fortement influencé par la polarité du solvant. En effet, dans des solvants protiques polaires, le niveau d'énergie des transitions $n \rightarrow \pi^*$ peut augmenter et dépasser celui des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ en raison de l'interaction des doublets non liants avec le solvant *via* des liaisons hydrogènes et conduire à un rendement quantique de fluorescence élevé (Figure 61).¹¹⁶



Xanthone (**51**)

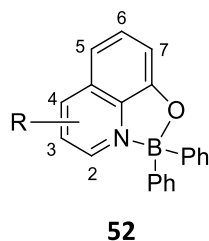
$$\Phi_f \text{ dans EtOH} = 4,9 \times 10^{-4}$$

$$\Phi_f \text{ dans H}_2\text{O} = 4,2 \times 10^{-2}$$

Figure 61 : Effet du solvant sur le rendement quantique de fluorescence de la xanthone

La position des substituants sur un aromatique a également un effet sur les propriétés photophysiques d'un fluorophore. Dans le cas du dérivé du BODIPY **52** ci-dessous,¹¹⁴ la position d'un groupement méthyle peut entraîner un effet bathochrome significatif lorsqu'il est situé en *para* de l'azote (**52d**, $\lambda_{\text{ém}} = 483$ nm) ou de l'oxygène (**52e**, $\lambda_{\text{ém}} = 529$ nm).

¹¹⁶ Heinz, B.; Schmidt, B.; Root, C.; Satzger, H.; Milota, F.; Fierz, B.; Kiefhaber, T.; Zintha, W.; Gilch, P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 3432-3439.

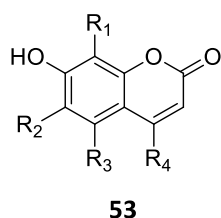


Composé	R	$\lambda_{\text{ém}}$ (nm)
a	H	505
b	2-Me	492
c	3-Me	506
d	4-Me	483
e	5-Me	529
f	6-Me	507
g	7-Me	522

Tableau 10 : Effet de la position d'un groupement méthyle sur la longueur d'onde d'émission d'un dérivé du BODIPY¹¹⁴

Les auteurs ont observé que l'intensité de fluorescence diminuait avec le déplacement de la longueur d'onde d'émission vers le rouge. Des calculs de modélisation ont mis en évidence la localisation de la HOMO principalement au niveau du noyau riche en électrons (le motif phénolate) tandis que la LUMO serait essentiellement au niveau du noyau pauvre en électrons (le motif pyridine). Ainsi, l'apport d'électrons dans la HOMO augmente son niveau d'énergie, conduisant à un effet bathochrome des spectres d'absorption et d'émission (**52e**). A l'inverse, l'augmentation du niveau d'énergie de la LUMO induite par l'apport d'électrons dans cette orbitale entraîne un effet hypsochrome (**52b** et **52d**).

Le cas particulier des aromatiques substitués par des atomes de fluor appuie les effets décrits sur la nature et la position d'un substituant mais également sur leur nombre¹¹⁵ (Tableau 11).



Composé	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	λ_{ex} (nm)	$\lambda_{\text{ém}}$ (nm)	Φ_f	Photo blanchiment
a	H	H	H	Me	360	450	0,63	22%
b	F	H	H	Me	359	465	0,63	17%
c	H	F	H	Me	360	440	0,64	20%
d	H	H	F	Me	354	456	0,78	12%
e	F	F	H	Me	358	455	0,89	5%
f	F	F	F	Me	359	459	0,54	-
g	H	H	H	CF ₃	385	501	0,34	31%
h	H	F	H	CF ₃	385	491	0,44	18%
i	F	F	H	CF ₃	384	504	0,23	7%

Tableau 11 : Effet du fluor sur les propriétés photophysiques d'un dérivé de coumarines¹¹⁵

En effet, la présence d'un seul atome de fluor peut influencer de manière significative le rendement quantique de fluorescence et la photostabilité du fluorophore (**53d**) par rapport au composé parent (**53a**), mais sa position sur la molécule n'est pas négligeable (ces paramètres sont relativement similaires au composé sans fluor pour **53b** et **53c**). Dans une moindre mesure, la longueur d'onde d'émission peut évoluer : effet hypsochrome pour le composé **53c** et effet bathochrome pour les composés **53b** et **53d**.

Lorsque le nombre de fluor augmente, l'effet est plus complexe. Ainsi, la présence simultanée de deux atomes de fluor pour le composé **53e** entraîne une amélioration du rendement quantique de plus de 30% et une diminution du photoblanchiment de 80%, tandis qu'un troisième fluor pour le composé **53f** diminue de 15% le rendement quantique.

Enfin, en greffant un substituant trifluorométhyle (**53g** à **53i**), l'effet sur les propriétés photophysiques est inversé et s'accompagne d'un rendement quantique deux fois plus petit que le composé parent **53a**, ainsi qu'une augmentation du photoblanchiment. Associé à des atomes de fluor en position aromatique (**53h** et **53i**), la photostabilité est améliorée mais l'effet sur le rendement quantique est plus mitigé. Il faut toutefois noter que l'effet bathochrome de la longueur d'onde d'émission est plus marqué.

L'effet de la substitution de fluorophores aromatiques par des fluors reste peut décrit dans la littérature,^{117,118} mais d'un point de vue général, ces atomes augmentent la photostabilité et le rendement quantique de fluorescence par rapport au composé parent.

I.4.3. Transfert de charge intramoléculaire

La présence sur une même molécule d'un groupement électroattracteur conjugué avec un groupement électrodonneur peut induire, à l'état excité, une forme issue d'un transfert de charge intramoléculaire.¹¹⁰ En effet, au cours de l'excitation d'une molécule, un électron est déplacé d'une orbitale vers une autre, ce qui induit une variation du moment dipolaire du fluorophore, qui peut être suffisamment importante pour modifier les propriétés de fluorescence de la molécule à l'état excité. Ceci est dû à la répartition de la densité électronique très différente par rapport à la forme fondamentale, qui peut induire une modification de la géométrie importante.

Ce phénomène peut être illustré par le 4-(*N,N*-diméthylamino)benzonitrile **54** ou DMABN^{119,120} (Figure 62). A l'état fondamental, cette molécule est presque plane de manière à avoir un maximum de conjugaison entre le doublet non liant de l'azote et le phényle. Après l'absorption d'un photon, la molécule se retrouve à un état localement excité (ou LE) plan, qui s'accompagne d'une torsion du groupement électrodonneur. Ce dernier est alors typiquement perpendiculaire au noyau phényle, de manière à récupérer les électrons du doublet non liant. Cette conformation plus stable correspond à une relaxation non radiative depuis l'état LE vers un niveau excité un peu plus bas en énergie (TICT ou Transfert de charge intramoléculaire tordu) où les deux groupements ne sont plus conjugués.

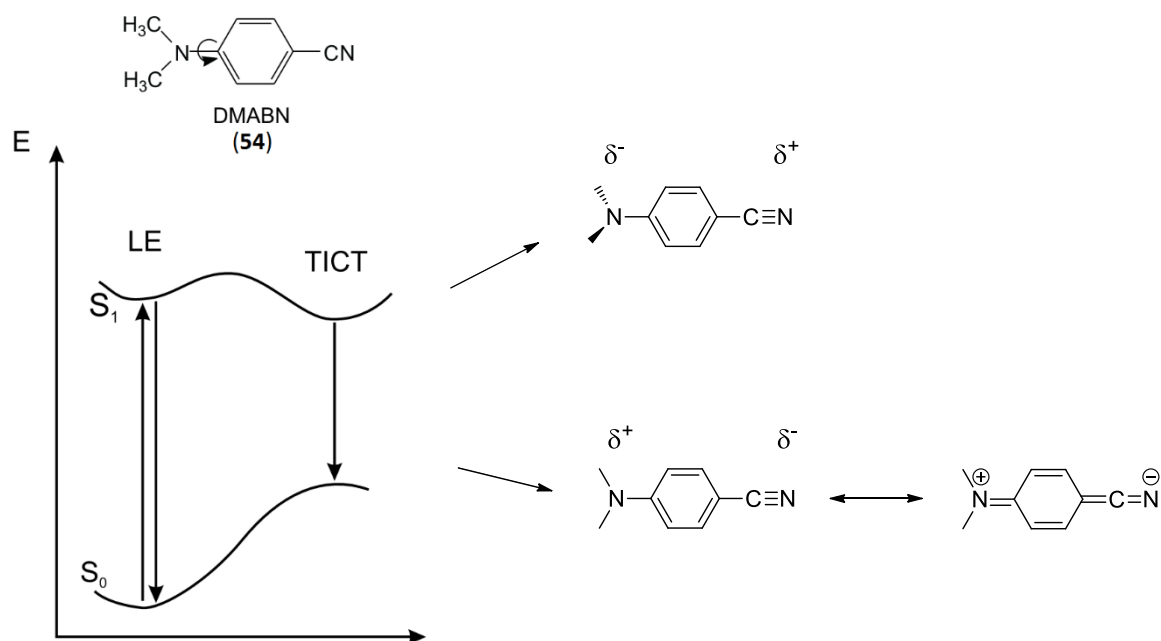
La répartition des charges au niveau intramoléculaire est alors inversée, et les propriétés photophysiques de cette espèce excitée sont fortement influencées par le solvant car cet état est stabilisé par les solvants polaires. Ainsi, dans les cas où un transfert de charge intramoléculaire est possible, la relaxation des espèces à l'état TICT par des processus non radiatifs sera privilégiée dans les solvants polaires.

¹¹⁷ Loper, G. L.; Lee, E. K. C. *Chem. Phys. Lett.* **1972**, *13*, 140-143.

¹¹⁸ Spagnuolo, C. C.; Vermeij, R. J.; Jares-Erijman, E. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12040-12041.

¹¹⁹ Lippert, E.; Lippert, W.; Moll, F.; Nagele, F.; Boos, W.; Prigge, H.; Seibold-Blanckenstein, I. *Angew. Chem.* **1961**, *73*, 695-706.

¹²⁰ Rotkiewicz, R.; Grellmann, K. H.; Grabowski, Z. R. *Chem. Phys. Lett.* **1973**, *19*, 315-318.



Il faut noter que d'autres types particuliers de transfert¹²¹ existent pouvant influencer les propriétés de fluorescence. L'ESIPT (Transfert de Proton Intramoléculaire à l'Etat Excité) est observé dans la famille des phénols et correspond à un transfert de proton intramoléculaire suite à l'absorption d'un photon. L'espèce formée produit un signal de fluorescence lors de la relaxation. Le PET (Transfert d'Electron Photoinduit) est souvent responsable de l'inhibition de la fluorescence car il exalte particulièrement les propriétés oxydo-réductrices des molécules à l'état excité : ceci est toujours observé après l'absorption d'un photon, mais dans le cas du PET un transfert d'électron après l'excitation est observé, qui n'est pas possible à l'état fondamental.

II – Préparation des carbocyclooctanes et synthèse de cycloalcyne

La synthèse de dibenzocyclooctynes constitue deux problématiques clés : la formation du cycle à 8 chaînons (ou cyclooctane) et l'obtention de la fonction alcyne intracyclique (ou cycloalcyne). Dans les stratégies de synthèse développées pour les cyclooctynes précédemment décrits, la synthèse de la triple liaison a essentiellement lieu après la formation du cyclooctane. Des méthodes générales de préparations des carbocyclooctanes et des cycloalcyne seront brièvement présentées et illustrées par les voies de synthèse de quelques cyclooctynes.

II.1. Préparation des carbocyclooctanes

Trois stratégies principales existent pour la préparation de carbocycles à 8 chaînons : *via* la formation de liaisons C-C intramoléculaires de manière à former directement le carbocyclooctane par cyclisation, par fragmentation de systèmes bicycliques et par une extension de cycles de plus petite taille.¹²²

¹²¹ Wu, J.; Liu, W.; Ge, J.; Zhang, H.; Wang, P. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3483-3495.

¹²² Patasis, N. A.; Patane, M. A. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 5757-5821.

I.1.1. Formation de liaisons C-C intramoléculaires

La synthèse de carbocyclooctanes par la formation de liaisons C-C intramoléculaires représente la méthode la plus variée et regroupe des réactions comme les cycloadditions (de type Diels-Alder, catalysées par des métaux de transitions ou par photochimie), les réactions d'aldolisation ou les couplages phénoliques (Figure 63). La formation de la liaison C-C intramoléculaire requiert une entropie et une conformation favorables, expliquant pourquoi les méthodes catalysées par les métaux de transition sont particulièrement nombreuses.¹²³

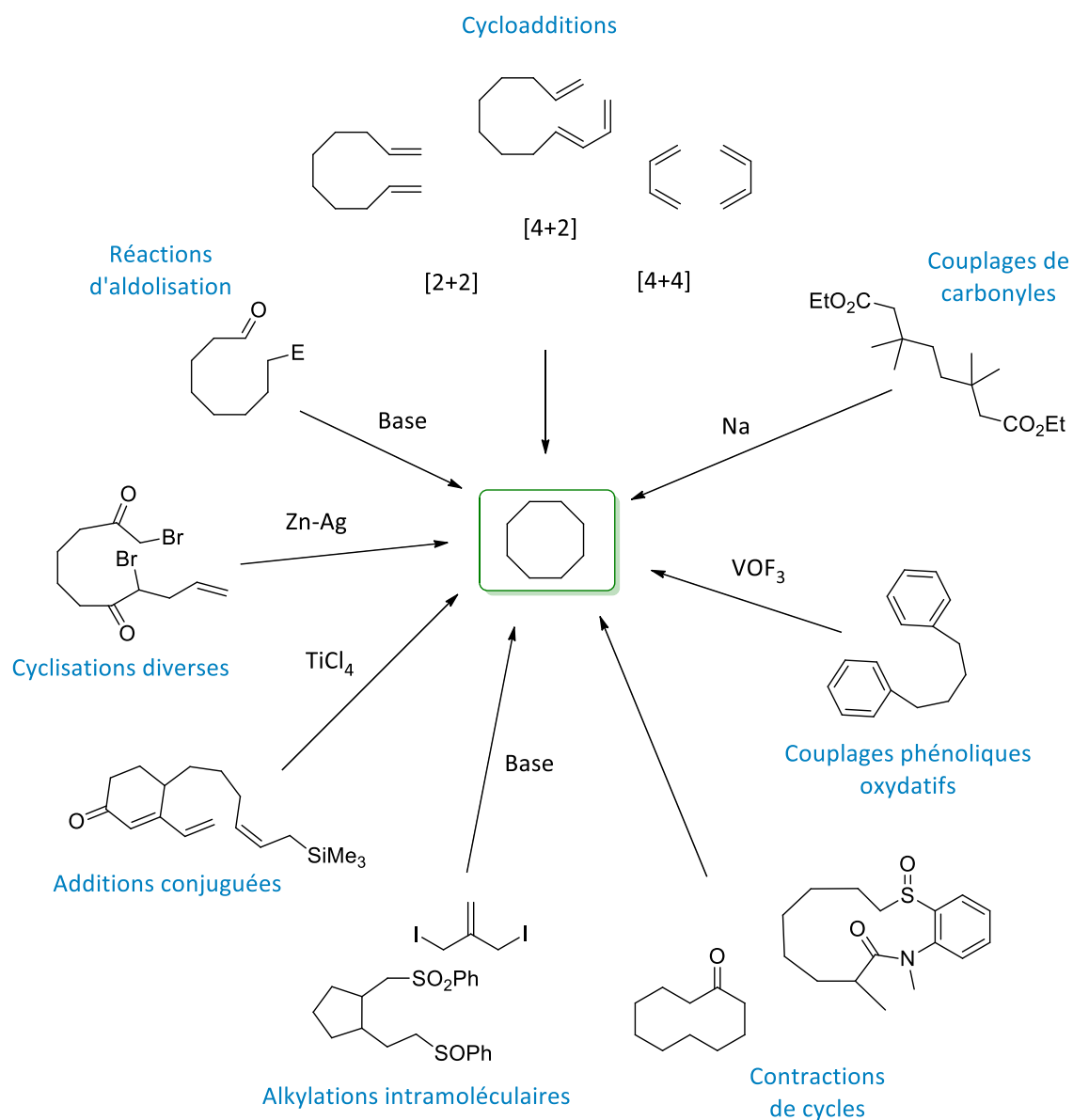


Figure 63 : Préparation de carbocyclooctanes par formation de liaisons C-C intramoléculaires

I.1.2. Fragmentation

La rupture d'une liaison pontant deux atomes dans les systèmes bicycliques à 8 chaînons constitue une méthode efficace dans la synthèse des cyclooctanoïdes. Les principaux modes de fragmentation¹²²

¹²³ Yet, L. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2963-3007.

correspondent à des clivages entre les atomes C₁-C₅, C₁-C₆ et C₁-C₇. Si ces atomes sont liés directement, les précurseurs correspondant font partie de la famille des bicyclooctanes, tandis que la présence d'un atome entre les deux fait intervenir des précurseurs de la famille des bicyclononanes (Figure 64).

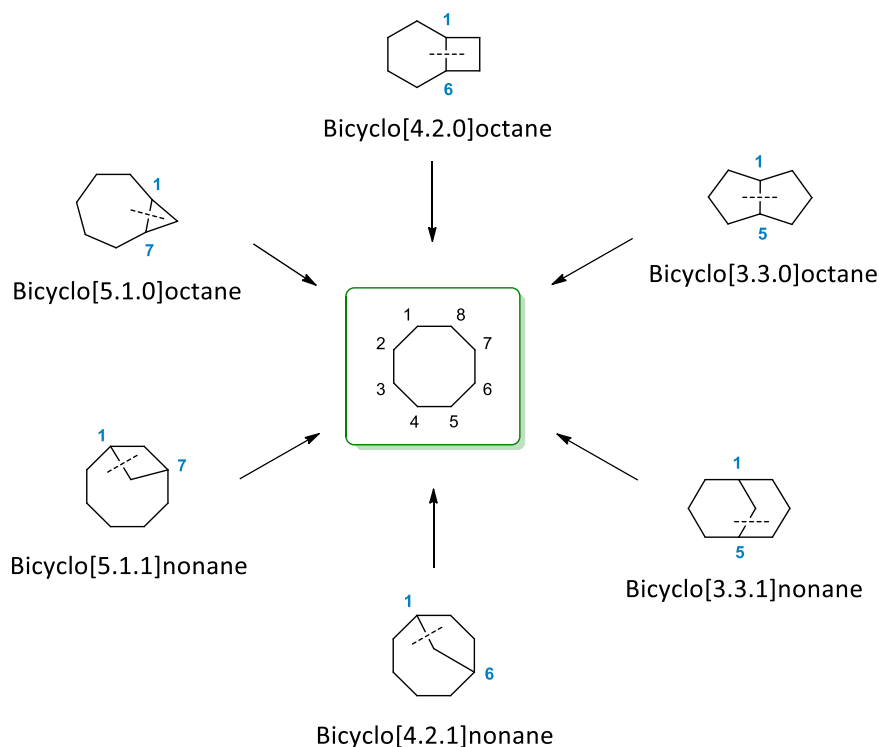


Figure 64 : Préparation de carbocyclooctanes par fragmentation

Les conditions pouvant conduire à des fragmentations sont de nature diverse : rupture oxydante ou réductrice, catalysée par un acide de Lewis ou induite par photochimie.

I.1.3. Extension de cycle

La formation de carbocyclooctanes par extension de cycle peut impliquer une extension allant d'un à quatre atomes, les réarrangements sigmatropiques [3,3] et [1,3] (résultant en une extension de deux ou quatre atomes) étant les stratégies prédominantes (Figure 65).¹²²

Ces réactions ont principalement lieu sous catalyse acide de Lewis ou *via* des processus thermiques.

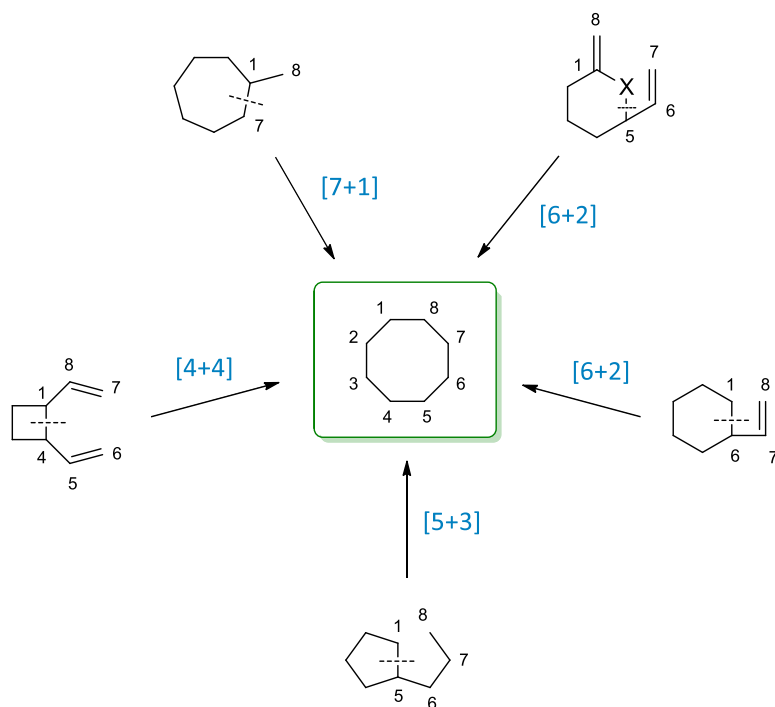


Figure 65 : Préparation de carbocyclooctanes par extension de cycle

II.2. Préparation des cycloalcyne

Les principales méthodes¹²⁴ d'accès aux cycloalcyne sont résumées dans la figure ci-dessous (Figure 66) :

¹²⁴ *Angle Strained Cycloalkynes*, Krebs, A.; Wilke, J. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **1983**; pp.189-233.

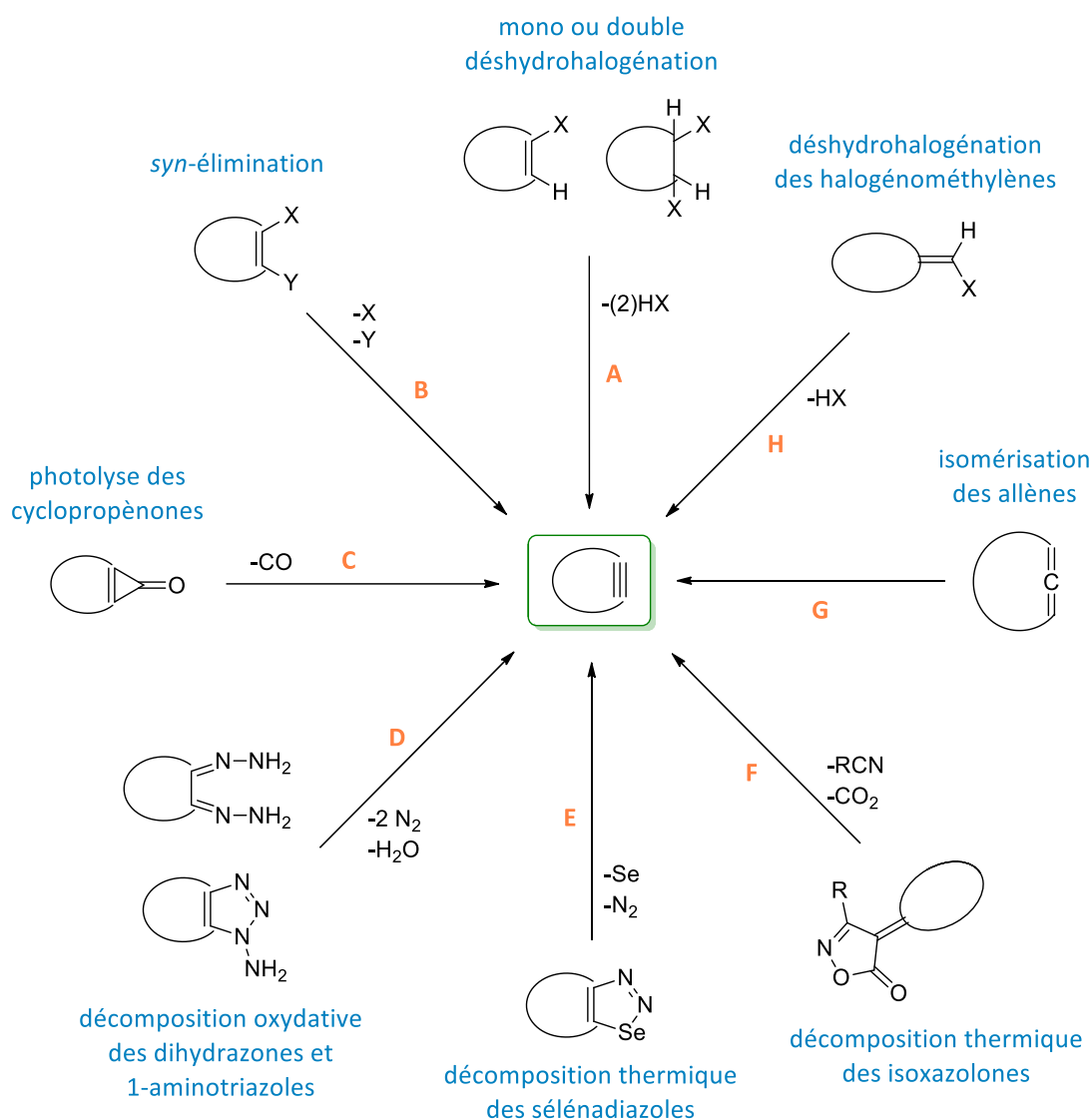


Figure 66 : Méthodes de préparation des cycloalcyne

La formation d'une telle fonction n'est pas aisée, étant donné que le produit formé possèdera des liaisons déformées avec des orbitales sp non linéaires. Ceci est d'autant plus difficile que le cycle est petit.

La méthode A fait partie des voies les plus fréquemment utilisées dans la synthèse des cycloalcyne et correspond à une déshydrohalogénéation promue par une base. Une méthode similaire est la *syn*-élimination de deux groupements partant pouvant être catalysée par un métal de transition (méthode B).

Les méthodes C, D, E et F ont en commun l'élimination irréversible d'une molécule de gaz, force motrice de la réaction, par voie photochimique (méthode C), oxydative (méthode D) ou thermique (méthodes E et F). Parmi elles, la photolyse des cyclopropénones (méthode C) est décrite dans la littérature comme étant rapide et efficace. L'élimination du monoxyde de carbone peut se faire par voie photochimique ou thermique (Figure 67).

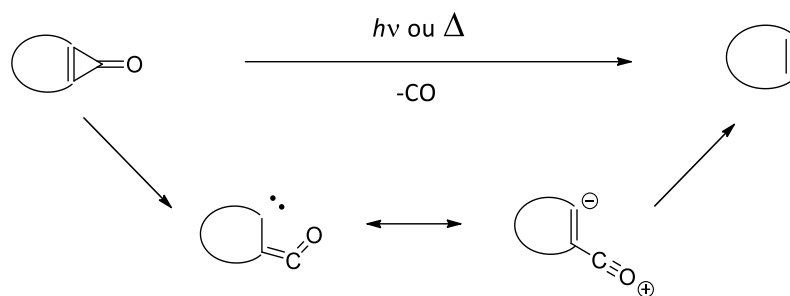


Figure 67 : Décarbonylation des cyclopropénones

II.2.1. Préparation de cyclopropénones

Il existe trois façons principales^{125,126} d'accéder aux cyclopropénones : à partir d'un acétal de cyclopropène, par insertion d'un carbène sur une fonction alcyne ou par une réaction de Friedel-Crafts. Les deux premières n'étant pas utilisées pour la synthèse de cycloalcyne, seule la dernière sera discutée. Celle-ci correspond à l'alkylation de composés aromatiques par l'ion trichlorocyclopropénylium *via* une SEar (Figure 68). Cet électrophile est formé à partir de la réaction du tétrachlorocyclopropène avec l'acide de Lewis AlCl_3 . La substitution électrophile aromatique conduit à un intermédiaire cationique aryldichlorocyclopropénium, dont le devenir dépend des conditions réactionnelles. En présence, par exemple, d'un second équivalent de composé aromatique, cet intermédiaire est capable de réagir *via* une seconde alkylation de Friedel-Crafts, conduisant ainsi à des diarylcyclopropénones symétriques ou asymétriques, après hydrolyse.

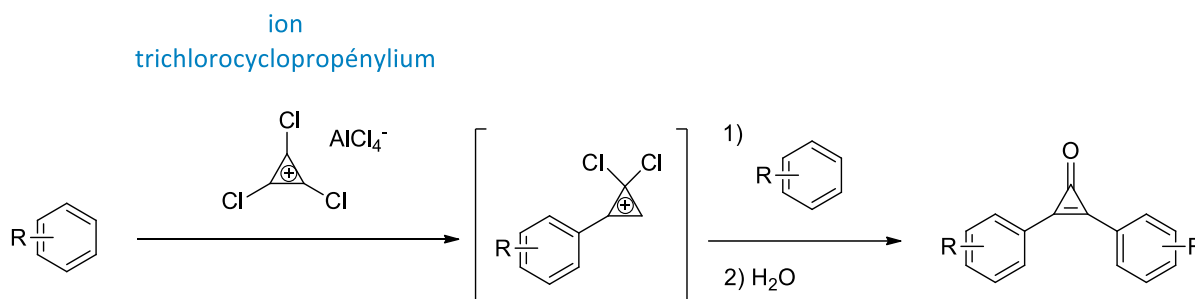


Figure 68 : Voies d'accès aux cyclopropénones

II.2.2. Exemple de la méthode E

La décomposition thermique des sélénadiazoles est une méthode décrite pour la première fois par Meier et Voigt,¹²⁷ permettant d'accéder à l'alcyne cyclique par pyrolyse *via* un mécanisme radicalaire (Figure 69). Sous l'action thermique (100-200°C), le diazote est éliminé pour donner l'intermédiaire diradicalaire de vinyle et de sélényle. Ce dernier conduit à l'alcyne par élimination du sélénium, mais une partie non négligeable se dimérise (majoritairement en 1,4-disélényne), ce qui explique les rendements souvent moyens. De plus, les conditions de pyrolyse ne sont pas toujours compatibles avec les autres fonctions présentes sur la molécule, ce qui limite son utilisation.

¹²⁵ Potts, K. T.; Baum, J. S. *Chem. Rev.* **1974**, *74*, 189-213.

¹²⁶ Poloukhine, A.; Popik, V. V. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7833-7840.

¹²⁷ Meier, H.; Voigt, E. *Tetrahedron*, **1972**, *28*, 187-198.

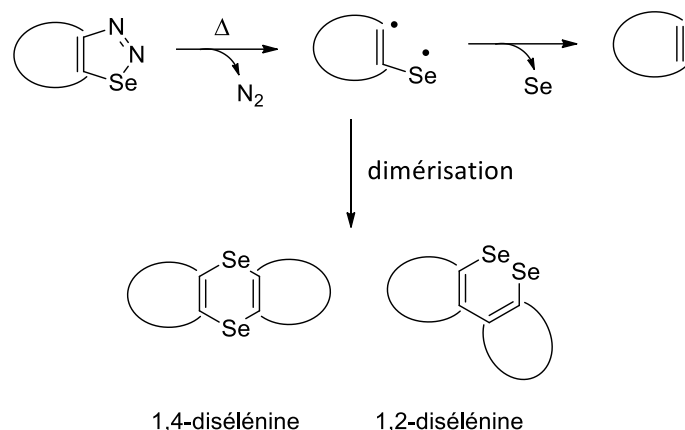


Figure 69 : Mécanisme de la décomposition thermique des sélénadiazoles

Un exemple illustrant cette méthode E est la voie de synthèse du thiacycloalcyne **31** décrit par Bertozzi⁶² (Figure 70). L'insertion de l'atome de soufre se fait dès la première étape à partir de l'acide chloropivaloïque commercial pour former le diester **56** après estérification. Une première étape limitante est la formation du motif à 7 chaînons (**57**) par cyclisation du composé **56**. La dione **58** est obtenue après oxydation et conduit à l'intermédiaire bishydrazone **59**. Ce dernier permet de former la triple liaison intracyclique, seconde étape limitante, *via* une décomposition oxydative avec le tétraacétate de plomb. Au final, cette voie a un rendement global faible de 0,8% sur 6 étapes.

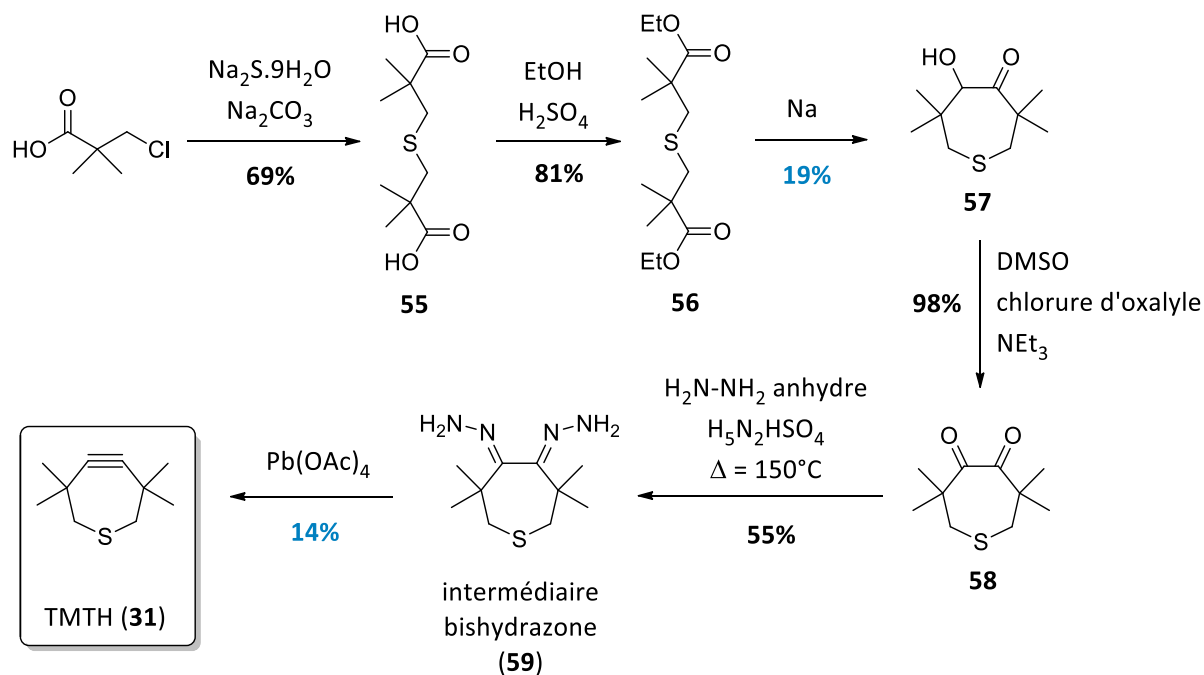


Figure 70 : Synthèse du TMTH

II.3. Exemples de voies de synthèse de cyclooctynes

II.3.1. Cyclooctynes simples

La synthèse de l'aza-cyclooctyne DIMAC **29** (Figure 71) décrite par Bertozzi⁵⁰ débute par l'obtention d'un diène acyclique **60** suite à l'ouverture du méthyl-6-bromoglucopyranoside commercial *via* une

réduction au zinc suivie d'une amination réductrice avec la propènamine. La formation du cycle à 8 chaînons par une métathèse croisée grâce au catalyseur d'Hoveyda-Grubbs de deuxième génération permet d'aboutir à un intermédiaire alcool allylique cyclique **61** avec un bon rendement.

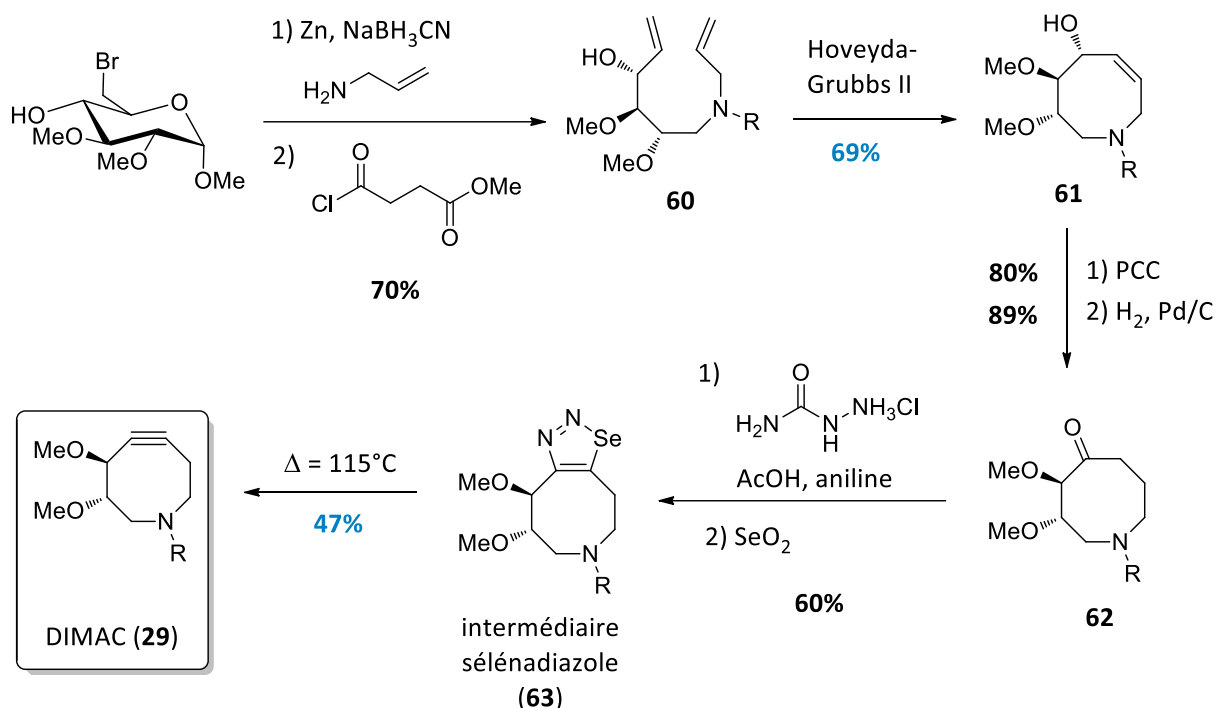


Figure 71 : Synthèse du DIMAC

Cet intermédiaire est transformé en cétone cyclique **62** après hydrogénation de la fonction alcène et oxydation de l'alcool. S'ensuit une réaction avec un semicarbazide et le dioxyde de sélénium pour donner l'intermédiaire sélénadiazole **63** avec un rendement de 60% sur deux étapes. La formation du cycloalcyne **29** est réalisée par la méthode de décomposition thermique de l'intermédiaire sélénadiazole (méthode E de la Figure 66) avec un rendement inférieur à 50%. Au final, le DIMAC **29** est obtenu en 8 étapes avec un rendement global de 9,7%, l'étape limitante étant la formation de la triple liaison intracyclique.

Un autre exemple intéressant est la synthèse du DIFBO **28** décrite par Bertozzi⁴⁹ (Figure 72) où la formation du carbocyclooctane **65** est réalisée, avec un rendement supérieur à 90%, *via* une extension du cycle heptynyle **64** par le triméthylsilyldiazométhane et catalysée par un acide de Lewis particulier. En effet, l'utilisation du triméthylaluminium évite l'élimination du groupement TMS qui permet de former dans un second temps l'intermédiaire triflate d'éther d'énol silylé **66**. Ce dernier possède deux bons groupements partant pouvant être éliminés par une *syn*-élimination en présence de fluorure de césium, qui attaque le silyle, pour conduire à la fonction alcyne intracyclique. Néanmoins, dans ce cas précis, le DIFBO n'a jamais pu être isolé pur car la présence d'atomes de fluor adjacents à l'alcyne a exacerbé sa réactivité et conduit à une homotrimérisation (**67**) quasi-instantanée.

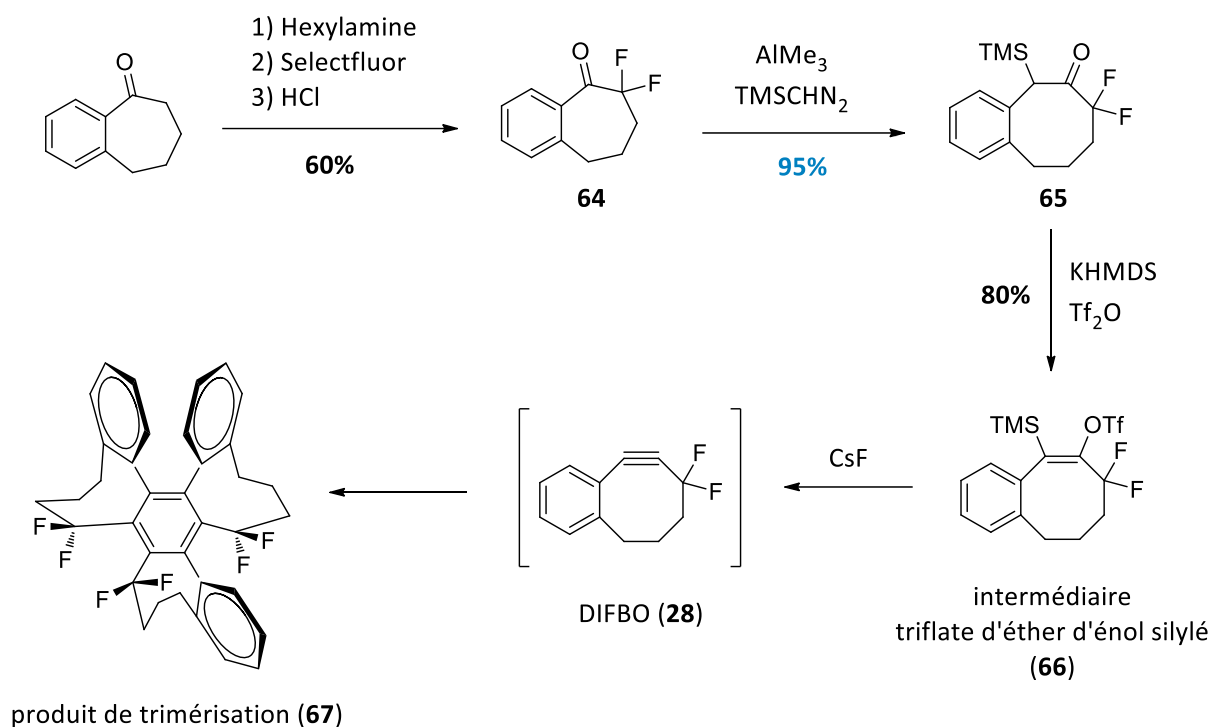


Figure 72 : Synthèse du DIFBO

II.3.2. Dibenzocyclooctynes

La synthèse de l'aza-dibenzocyclooctyne DIBAC **35** a été décrite la même année par les équipes de van Delft⁵⁹ (Figure 73) et de Popik⁵⁸ (Figure 74). Les deux voies de synthèse proposent d'obtenir le cyclooctyne à partir d'un intermédiaire azocine **70** *via* une double étape de dibromation de la fonction alcène intracyclique suivie d'une double déshydrobromation, avec un rendement sur deux étapes de 70%.

Dans la voie de van Delft, l'intermédiaire **70** est obtenu par un couplage initial de Sonogashira, suivi de la formation du cycle à 8 chaînons avec un rendement quantitatif par une amination réductrice intramoléculaire favorisée par la préorganisation d'un intermédiaire alcénique **69** de configuration Z.

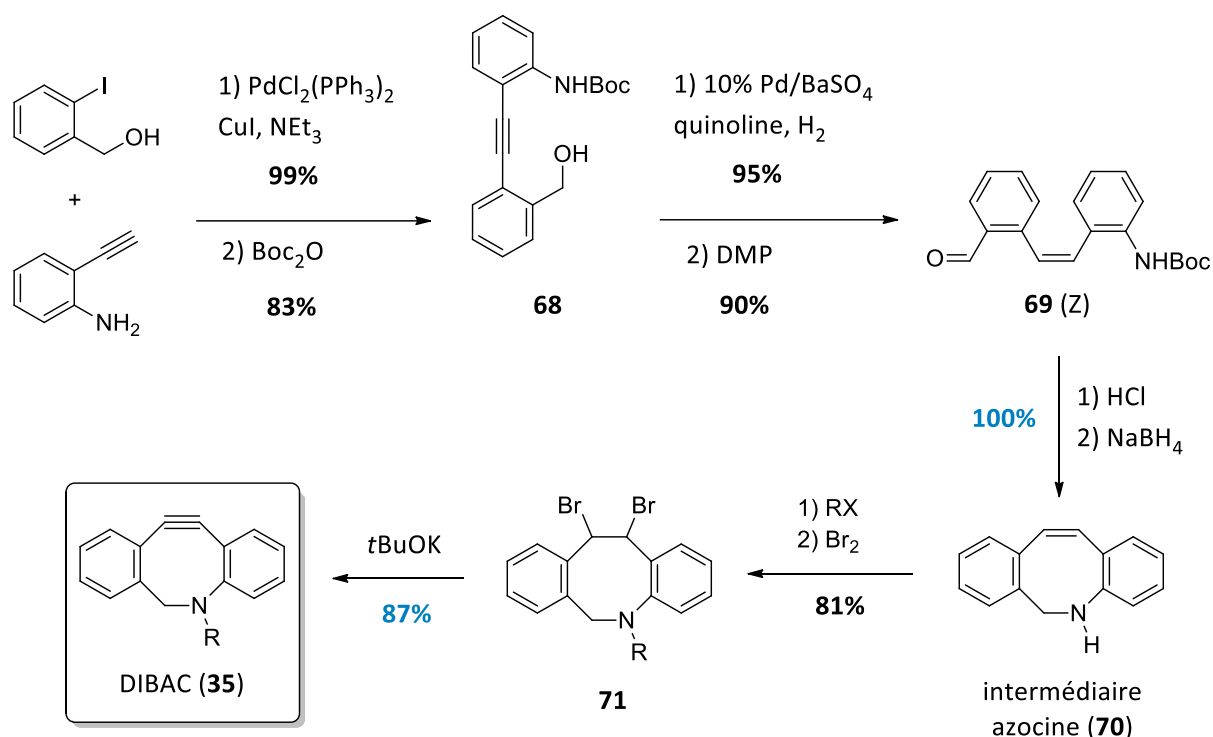


Figure 73 : Synthèse du DIBAC par la voie de van Delft

La voie de Popik débute par l'extension de cycle de la 5-dibenzosuberénone commerciale en lactame **73** après la formation d'un intermédiaire oxime **72**. Cette extension correspond à un réarrangement de Beckmann catalysé par l'acide polyphosphorique. L'intermédiaire azocine **70** est alors obtenu par la réduction du lactame avec un rendement inférieur à 60%.

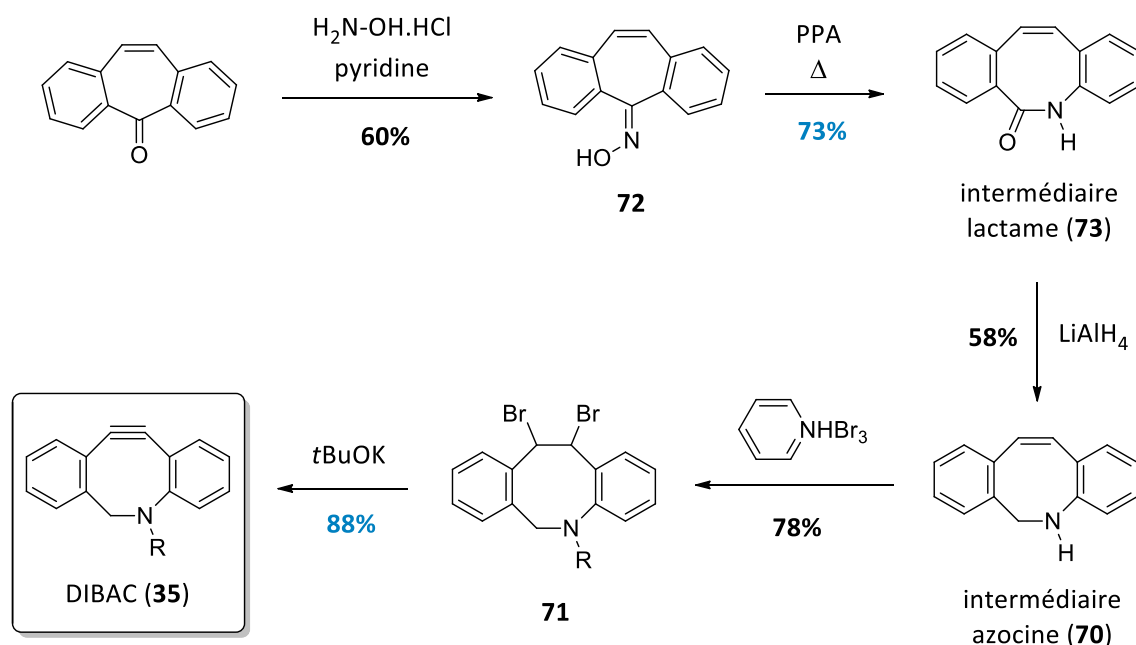


Figure 74 : Synthèse du DIBAC par la voie de Popik

Par comparaison, la méthode de Popik comporte pratiquement deux fois moins d'étapes et la présence préalable dans le précurseur commercial d'un motif dibenzényle cyclique pourrait favoriser

la synthèse. Cependant, cette voie offre un rendement global de 17% sur 5 étapes contre 49% sur 9 étapes pour celle de van Delft.

La voie de synthèse de l'oxa-dibenzocyclooctyne ODIBO **37** développée par Popik⁶¹ (Figure 75) présente la particularité de conduire à des dibenzocyclooctynes substitués. Après la bromation de l'alcool 3-méthoxybenzylique commercial en composé **74** et la substitution de celui-ci par le 4-*tert*-butylphénol, un intermédiaire éther de phényle et de benzyle **75** est formé. La formation du cyclooctane et du cycloalcyne est réalisée successivement *via* la cyclisation de cet éther en cyclopropénone **76**, suivi de la photodécarbonylation du Photo-ODIBO obtenu. Le composé **37** est ainsi formé en seulement 4 étapes avec un rendement global de 8,9 %, l'étape limitante étant la formation de l'alcyne intracyclique.

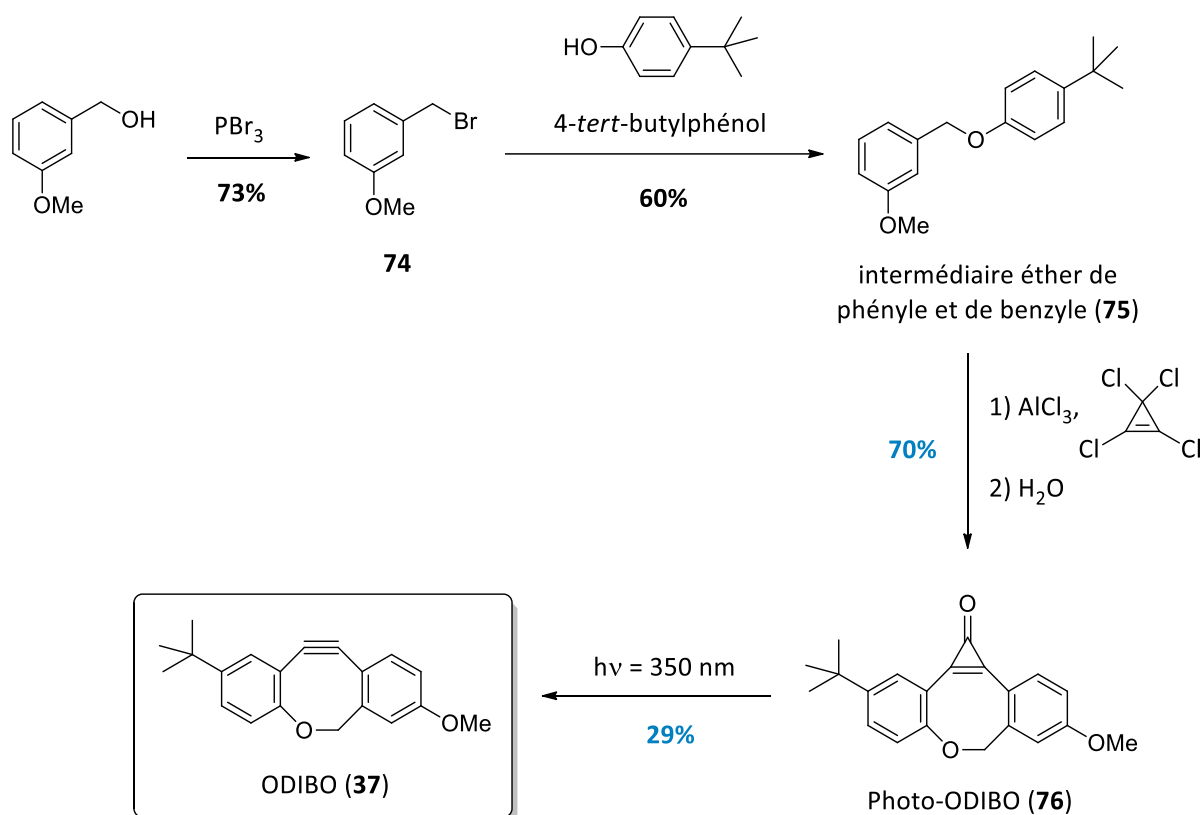


Figure 75 : Synthèse du ODIBO

Le céto-DIBO **34** est le premier céto-carbo-dibenzocyclooctyne décrit et présente la particularité d'être fluorescent. Sa voie de synthèse a été décrite en 2011 par l'équipe de Boons⁵⁴ (Figure 76) et débute par la formation du cycle à 8 chaînons *via* une extension de cycle de la 5-dibenzosuberénone commerciale par le TMSCHN₂ et catalysée par un acide de Lewis, avec un bon rendement. Une étape de réduction de la cétone **77** est nécessaire pour éviter des réactions secondaires lors de la dibromation de l'alcène intracyclique. Il a été constaté que la fonction hydroxyle **78** engendrée n'avait pas besoin de protection dans la suite de la synthèse, qui correspond à la formation du cycloalcyne de manière similaire au DIBAC **35**, mais avec un rendement inférieur à 30%. Une dernière étape d'oxydation conduit au céto-DIBO **34**, qui est obtenu avec un rendement global de 15,7% sur 5 étapes. Il faut noter qu'une nouvelle fois, l'étape limitante de tels composés est la formation de la triple liaison

intracyclique. De plus, cette voie ne permet pas d'obtenir des dérivés du céto-DIBO substitués sur les noyaux phényles car les précurseurs 5-dibenzosuberénones ne sont pas disponibles commercialement.

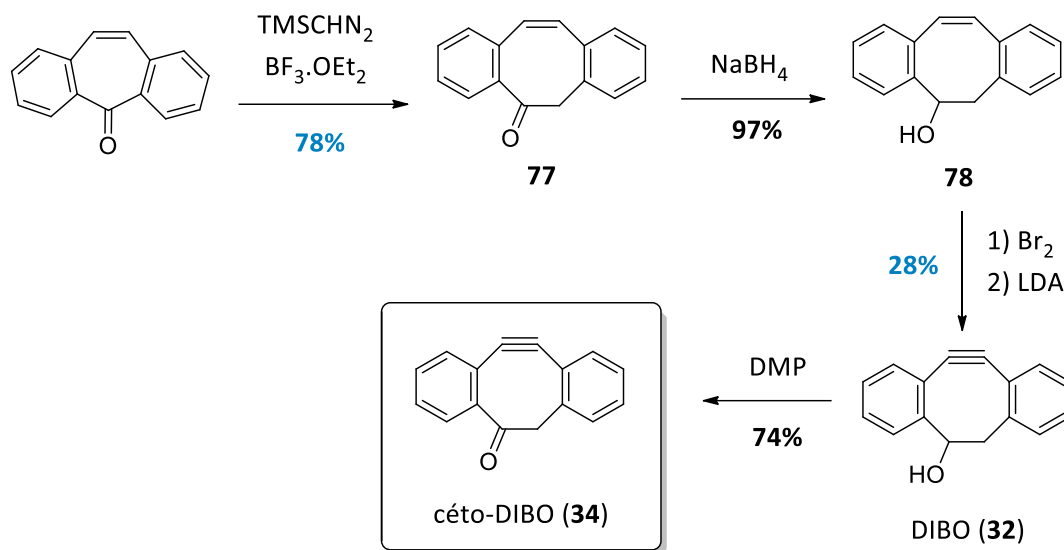


Figure 76 : Synthèse du céto-DIBO

La synthèse du TMDIBO **33**, autre dibenzocyclooctyne substitué, a été décrite la même année par l'équipe de Leeper⁵³ et propose une méthode alternative à la synthèse précédente pour obtenir le dibenzocycloocténol **81**, permettant la diversification des substituants sur les produits finaux (Figure 77).

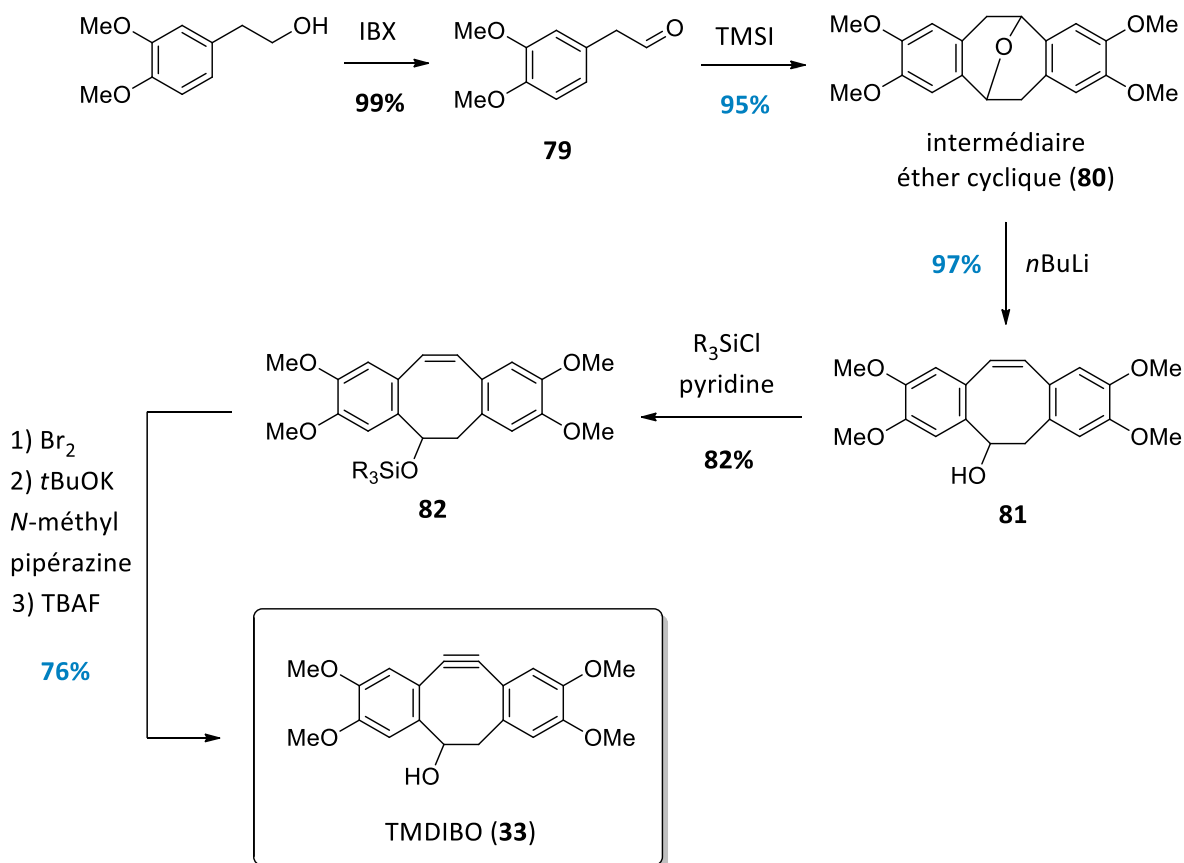


Figure 77 : Synthèse du TMDIBO

Le phénylacétaldéhyde **79**, obtenu après l'oxydation du précurseur alcool commercial, est dimérisé en éther cyclique **80** en présence d'iodure de triméthylsilyle. Cet éther conduit à l'intermédiaire clé **81** de la voie de synthèse du céto-DIBO **34** par ouverture en milieu basique, qui se rapporte à une fragmentation du bicyclic de type C₁-C₅. Ainsi, la formation du cyclooctane se fait avec un très bon rendement. Le reste de la synthèse est similaire, avec une étape supplémentaire de protection/déprotection de la fonction hydroxyle qui fut nécessaire. Au final, le TMDIBO **33** est obtenu en 7 étapes avec un rendement global de 57%.

La synthèse de cyclooctynes fait l'objet de nombreuses publications en raison des propriétés bio-orthogonales de cette famille de molécules. L'obtention de tels composés repose sur deux étapes clés : la formation du cyclooctane et l'obtention de la fonction alcyne intracyclique, dont quelques méthodes ont été détaillées ici. Dans les exemples de voies de synthèse, on constate que la synthèse de la fonction alcyne est toujours réalisée après la formation du cycle à 8 chaînons, ce qui indique que dans l'autre sens cela n'est pas réalisable. Par exemple, dans la voie de synthèse du DIBAC **35** décrite par van Delft, la cyclisation directe du composé **68** par amination réductrice n'a pas été proposée : pour obtenir le cyclooctyne, la triple liaison est d'abord réduite, puis reformée dans un second temps. On constate également qu'il est globalement plus difficile de former la fonction alcyne intracyclique que le cyclooctane.

En plus des propriétés bio-orthogonales de ces molécules, nous nous intéressons au développement de cyclooctynes fluorescents, dérivés du céto-DIBO **34**. Nous avons décidé de nous inspirer de la voie de synthèse alternative décrite par Leeper pour le TMDIBO **33**, qui offre un bon rendement global, car la probabilité de trouver les précurseurs commerciaux est plus grande, ce qui constitue un avantage dans le choix des substituants et donc pour la modulation des propriétés de fluorescence.

Chapitre II : Synthèse de dérivés du céto-DIBO « de première génération »

Pour obtenir de nouveaux dérivés du céto-DIBO **34**, nous nous sommes inspirés d'une voie de synthèse analogue à celle du TMDIBO **33** décrite par Leeper⁵³ (Figure 78) où le cycloalcyne est formé après l'ouverture de l'éther cyclique, lui-même obtenu à partir du phénylacétaldéhyde issu de l'oxydation de l'alcool commercial :

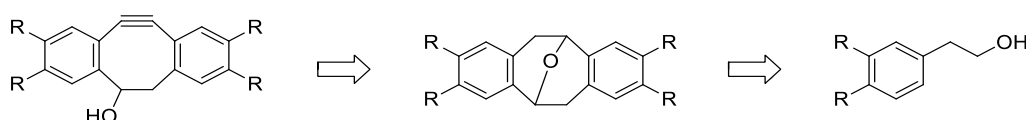


Figure 78 : Rétrosynthèse inspirée de la voie de Leeper pour le TMDIBO

Nous avons ainsi envisagé la synthèse de deux nouvelles sondes : la dinaphtylcyclooctynone **84** (céto-DINO) et la difluorodiméthoxydibenzocyclooctynone **85** (céto-FMDIBO) (Figure 79).

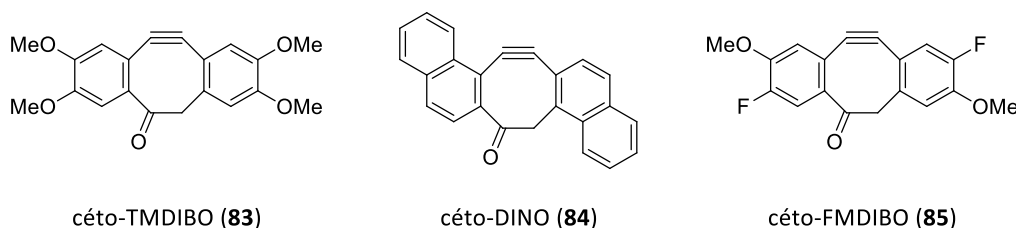


Figure 79 : dibenzocyclooctynones envisagées

Le céto-DINO **84** correspond à une extension du système π -conjugué du céto-DIBO **34**, qui pourrait induire un déplacement de la longueur d'onde d'émission vers le proche infrarouge. Le céto-FMDIBO **85** possède des groupements méthoxy participant à la conjugaison et pouvant entraîner un effet bathochrome de l'émission, ainsi que des atomes de fluor pouvant augmenter la photostabilité du fluorophore et améliorer le rendement quantique de fluorescence.

Lors de travaux préliminaires, le Dr. Guillaume Pousse a reproduit au laboratoire la synthèse du TMDIBO **33** de manière à obtenir une nouvelle sonde : la tétraméthylidibenzocyclooctynone **83** (céto-TMDIBO). En effet, la présence de groupements électrodonneurs participant à la conjugaison pourrait entraîner un déplacement de la longueur d'onde d'émission vers le proche infrarouge. Les étapes de synthèse du céto-TMDIBO **83** seront présentées pour le mettre en comparaison aux deux autres dérivés.

La synthèse du céto-DIBO **34** a également été reproduite et ses résultats seront mis en parallèle des autres dérivés pour les transformations communes.

Pour simplifier la lecture, les intermédiaires communs seront attribués comme **Xa**, **Xb**, **Xc** selon les séries (**a** : TMDIBO, **b** : DINO, **c** : FMDIBO), en utilisant les numérotations des intermédiaires **X** présentés précédemment pour la synthèse du céto-DIBO **34** et du TMDIBO **33** (Figures 75 et 76) et à l'exception des composés dibenzocyclooctynols et dibenzocyclooctynones.

I – Formation du phénylacétaldéhyde

Comme pour le céto-TMDIBO **83**, le phénylacétaldéhyde **79b** de la série dinaphtyle a été obtenu de manière quasi-quantitative, à partir de l'alcool commercial par oxydation par l'acide 2-iodoxybenzoïque **86** (Tableau 12), synthétisé au préalable¹²⁸ à partir de l'acide 2-iodobenzoïque et d'oxone (Figure 80).

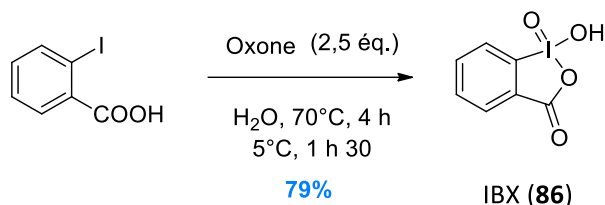
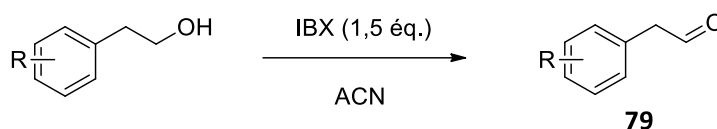


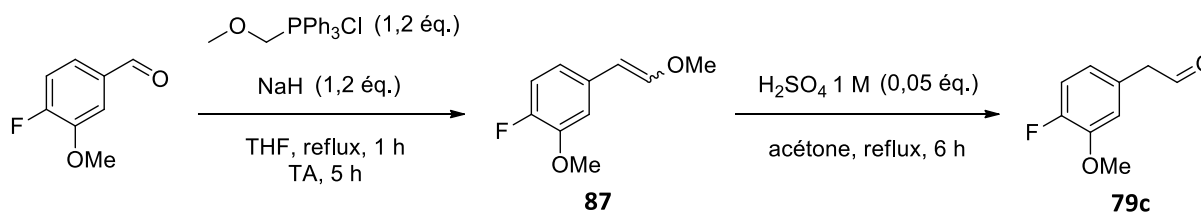
Figure 80 : Préparation de l'IBX



Série	Composé	Conditions	Rendement
TMDIBO	79a	70°C, 2 h, puis 0°C, 1 h	99%
DINO	79b	70°C, 1 h 30, puis 0°C, 1 h	99%

Tableau 12 : Oxydation en phénylacétaldéhyde

En revanche, pour la série FMDIBO, le 2-(4-fluoro-3-méthoxyphényl)éthanol n'est pas disponible commercialement. Pour obtenir le phénylacétaldéhyde **79c**, une réaction d'homologation du 4-fluoro-3-méthoxybenzaldéhyde commercial a été réalisée *via* une réaction de Wittig, suivie d'une hydrolyse acide de l'éther d'énol **87** obtenu sous la forme d'un mélange *E/Z* (41:59) (Tableau 13). Cette transformation est inspirée des travaux d'un brevet¹²⁹ sur l'analogue commercial 5-fluoro-2-méthoxybenzaldéhyde, dont l'homologation a conduit à un rendement de 60% sur deux étapes sans purification intermédiaire.



	Réaction de Wittig	Hydrolyse acide	Rendement sur deux étapes
<i>Avec purification intermédiaire</i>	72%	53%	38%
<i>Sans purification intermédiaire</i>	-	-	37%

Tableau 13 : Réaction d'homologation d'aldéhyde

¹²⁸ Frigerio, M.; Santagostino, M.; Sputore, S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4537-4538.

¹²⁹ *Human Biomolecular Research Institute*, WO2006/25920 A2, **2006**, Pages 43-44.

Malgré plusieurs tentatives, il n'a pas été possible d'améliorer le rendement de cette réaction, la purification intermédiaire du composé **87** a alors été considérée. Il a ainsi été constaté que la réaction de Wittig permet d'obtenir ce composé avec un bon rendement de 72%, mais les premières tentatives d'hydrolyse acide sur cet intermédiaire purifié ont échoué, en conduisant majoritairement au produit de dimérisation **88** de l'éther d'énol. Le mécanisme de la formation de ce produit secondaire est proposé ci-dessous (Figure 81) :

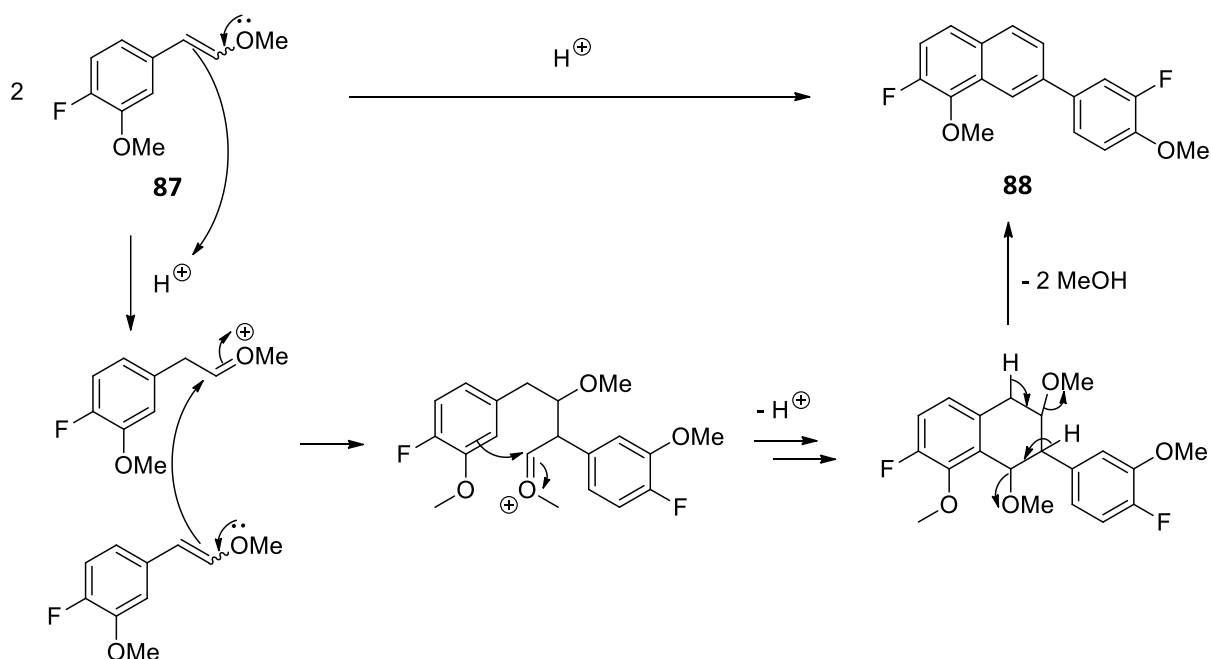


Figure 81 : Formation du produit de dimérisation de l'éther d'énol en milieu acide

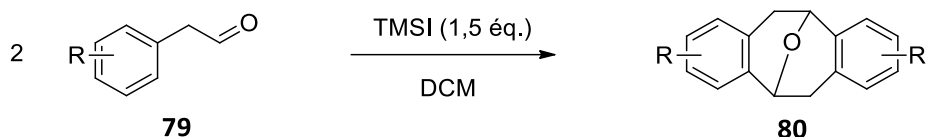
Cette réaction secondaire de condensation d'éther d'énol par catalyse acide serait favorisée en milieu concentré. En effet, la protonation d'un premier équivalent d'éther d'énol conduit à la formation d'une espèce électrophile oxonium qui peut alors réagir avec un nucléophile présent dans le milieu : une molécule d'eau (lors de l'hydrolyse) ou un second équivalent d'éther d'énol (lors de la condensation). Ce dernier étant plus nucléophile que l'eau, son addition nucléophile sur l'oxonium sera d'autant plus favorable que sa concentration est grande. L'intermédiaire ainsi formé possède un site électrophile oxonium qui peut être attaqué par un noyau aromatique de manière intramoléculaire *via* une SEAr. Après réaromatisation et régénération du catalyseur acide, le produit **88** est formé après l'élimination de deux molécules de méthanol, dont la force motrice est l'obtention d'un système conjugué.

Pour empêcher cette réaction secondaire, observée uniquement à partir d'éther d'énol pur, plusieurs essais en conditions diluées ont été réalisés, mais l'aldéhyde homologué a été formé de manière minoritaire. D'autres essais combinant des conditions diluées et un traitement basique en fin de réaction pour neutraliser les traces d'acide ont été effectués, permettant d'obtenir l'aldéhyde homologué de manière reproductible à partir d'éther d'énol pur avec un rendement supérieur à 50%, correspondant au final à un rendement de 38% sur deux étapes.

Les rendements d'homologation avec ou sans purification intermédiaire du composé **87** étant similaires, cette transformation a été par la suite réalisée sans purification pour minimiser les temps de traitement et la quantité de solvant utilisée.

II – Formation du dibenzocycloocténol

Une étape clé de la voie de synthèse de Leeper est la dimérisation des phénylacétaldéhydes en éther cyclique. Cette étape conduit à la formation du cycle à 8 chaînons final et détermine la régiosélectivité du dibenzocyclooctyne final. Elle est réalisée dans les conditions mises au point par Jung *et al.*¹³⁰ en présence d'iodure de triméthylsilyle. Elle nécessite initialement une basse température, mais pour les dérivés dinaphtyle **80b** et difluorodiméthoxydibenzényle **80c**, une période supplémentaire à température ambiante s'est révélée nécessaire pour aboutir à une conversion totale (Tableau 14).



Série	Composé	Conditions	Rendement
TMDIBO	80a	-78°C à -50°C, 3 h	83%
DINO	80b	-78°C, 5 h, puis TA, 3 j	83%
FMDIBO	80c	-78°C, 5 h, puis TA, 20 h	96%

Tableau 14 : Formation de l'éther cyclique avec le TMSI

Ainsi, quel que soit le phénylacétaldéhyde, l'éther cyclique est formé avec un rendement équivalent et supérieur à 80%. Toutefois, pour les séries DINO et FMDIBO, ce rendement n'est obtenu qu'au bout de 3 j et 20 h, respectivement, au lieu de 3 h pour le dérivé **80a**. Ces différences de cinétique peuvent s'expliquer par l'étude du mécanisme de la réaction (Figure 82) :

¹³⁰ Jung, M. E.; Mossman, A. B.; Lyster, M. A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3698-3701.

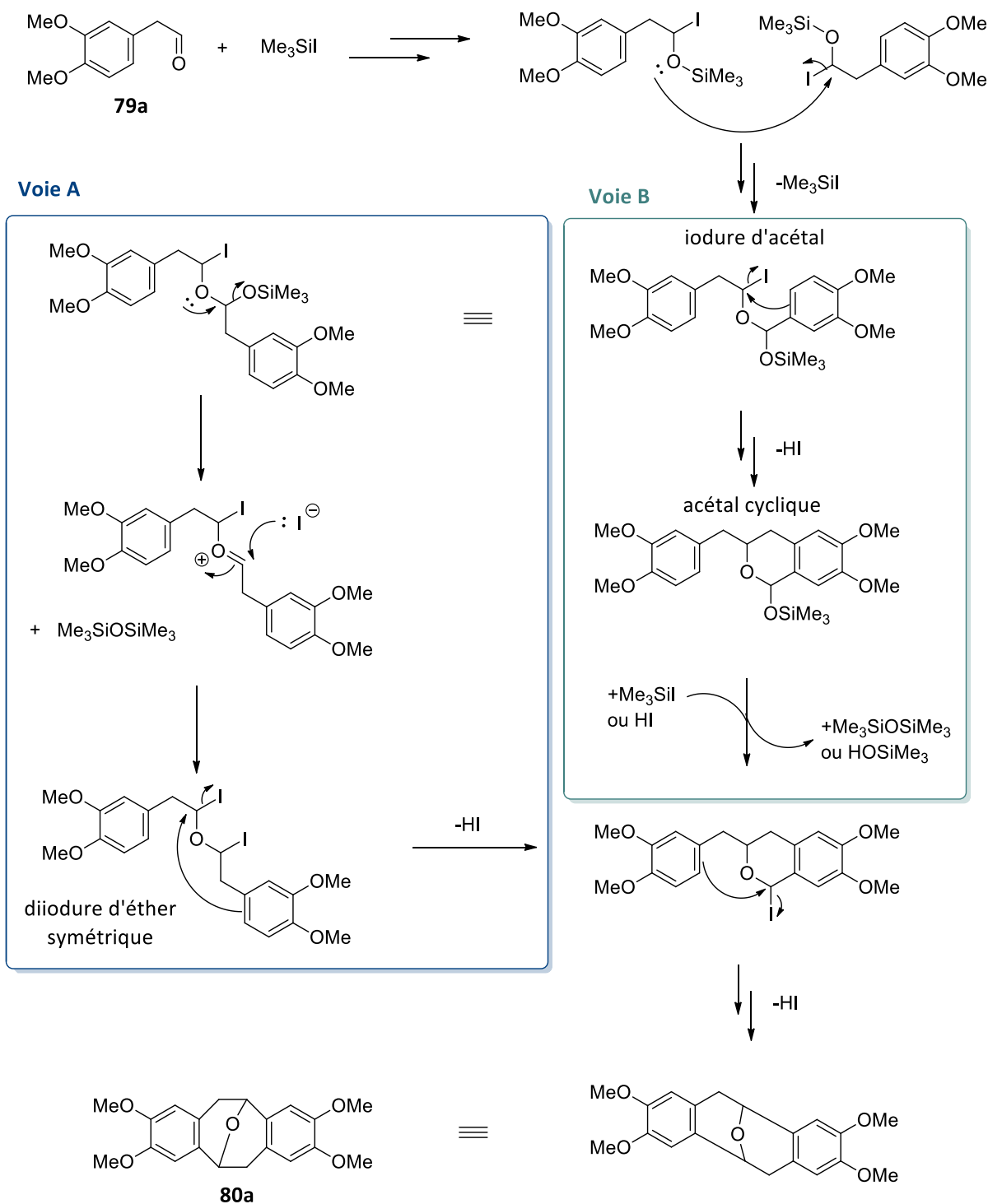


Figure 82 : Mécanisme de la formation de l'éther cyclique

Deux molécules du composé **79a** réagissent avec le TMSI pour former deux intermédiaires silylés qui se dimérisent. L'iodure d'oxonium silylé obtenu donne l'iodure d'acétal avec l'élimination d'une molécule de TMSI. Deux voies sont proposées pour cet intermédiaire. La première (voie A), selon Jung et Miller,¹³¹ conduirait à un intermédiaire diiodure d'éther symétrique après élimination de l'anion triméthylsilyloxy, qui donne l'hexaméthyldisiloxane en réagissant avec la molécule de TMSI

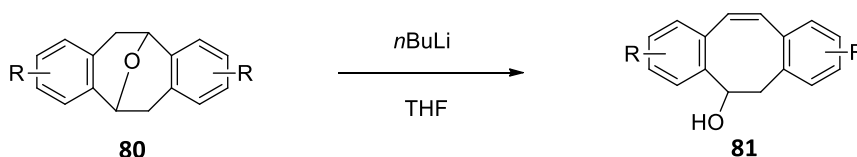
¹³¹ Jung, M. E.; Miller, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1984-1992.

précédemment formée, libérant un ion iodure qui attaque l'oxonium. L'intermédiaire symétrique donne l'éther cyclique final par une double ortho alkylation de Friedel-Crafts.

Une seconde possibilité (voie B), proposée par Larghi et Kaufman,¹³² serait une première cyclisation de l'iodure d'acétal, également considérée comme une cyclisation d'oxa-Pictet-Spengler. L'acétal cyclique obtenu est transformé en iodure d'éther, intermédiaire commun à la voie A, par attaque d'un ion iodure provenant soit d'une molécule de TMSI, soit de HI éliminé après réaromatisation. Une dernière cyclisation intramoléculaire conduit à l'éther cyclique final.

Ainsi, pour le dérivé DINO, l'encombrement stérique imputé aux noyaux naphtyles gênerait particulièrement la deuxième cyclisation intramoléculaire. Pour le dérivé FMDIBO, les atomes de fluor étant à la fois faiblement mésomères donneurs et faiblement inductifs attracteurs, il en résulte que leur effet est faiblement désactivant mais ortho-para orienteur. Ils ne favorisent donc pas l'alkylation des mêmes positions que les groupements méthoxy, ce qui diminue la nucléophilie de l'aromatique.

L'ouverture de l'éther cyclique, également décrite initialement par Jung *et al.*,¹³⁰ conduit au dibenzocycloocténol, intermédiaire clé dans l'obtention des dibenzocyclooctynes et commun à la voie de synthèse du céto-DIBO.⁵⁴ Comme pour le dérivé **81a**, cette étape a conduit à de bons rendements pour la série dinaphtyle, dans des conditions réactionnelles similaires (Tableau 15).



Série	Composé	Conditions (éq. de base)	Rendement
TMDIBO	81a	-78°C à TA, 4 h (2,2 éq.)	98%
DINO	81b	-78°C à TA, 4 h (2,4 éq.)	>76%
FMDIBO	81c	TA, 2 h (1,8 éq.)	47%

Tableau 15 : Ouverture de l'éther cyclique

Par contre, cette réaction a constitué l'étape la plus difficile à optimiser de la voie de synthèse du dérivé FMDIBO, malgré de nombreuses tentatives (Tableau 16). En effet, dans les conditions décrites par Leeper, et de manière générale à basse température, l'ouverture de l'éther cyclique **80c** n'a conduit qu'à d'importantes dégradations avec des rendements en dibenzocycloocténol n'excédant pas 20%. La quantité de *n*-butyllithium influence également le rendement (8 à 36% entre 1,1 et 1,8 équivalent). L'utilisation d'autres bases fortes, comme le *tert*-butyllithium, le diisopropylamide de lithium et une base phosphazène **89** (P(4)-*t*Bu), ont conduit à des rendements inférieurs à 10% ou à une absence de conversion.

¹³² Larghi, E. L.; Kaufman, T. S. *Synthesis*, **2006**, 2, 187-220.

Base	Conditions	Rendement
<i>n</i> BuLi (2,2 éq.)	-78°C à TA, 4 h	0 à 25%
	TA, 4 h	19 à 33%
<i>n</i> BuLi (1,1 éq.)	-78°C à TA, 4 h	8%
<i>n</i> BuLi (1,2 à 1,8 éq.)	TA, 2 à 4 h	16 à 36%
<i>n</i>BuLi (1,8 éq.)	TA, 2 h	47%
<i>t</i> BuLi (2,2 éq.)	-78°C à TA, 4 h	<10%
LDA (2,2 éq.)	-78°C à TA, 4 h	<10%
<i>P</i> (4)- <i>t</i> Bu (2,0 éq.)	-30°C à TA, une nuit	Pas de conversion

P(4)-*t*Bu (**89**)

Tableau 16 : Essais d'ouverture de l'éther cyclique de la série FMDIBO en milieu basique

Ces faibles rendements s'expliquent par un grand nombre de produits secondaires formés. Nous suspectons la présence des atomes de fluor aromatiques de favoriser des substitutions et d'entraîner d'importantes dégradations. Parmi ces produits, un composé présente une chaîne *n*-butyle en position aromatique et un atome de fluor en moins lors de l'analyse en RMN du fluor, ce qui nous laisse envisager la structure suivante (Figure 83) :

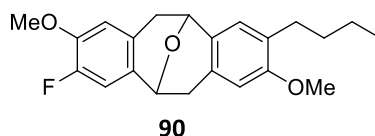
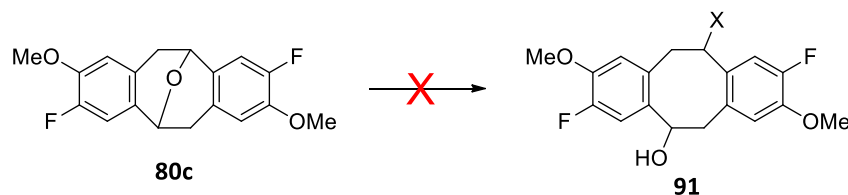


Figure 83 : Exemple de produit secondaire lors de l'ouverture de l'éther de la série FMDIBO

Des essais d'ouverture en milieu acide ont également été réalisés, avec des acides forts de Lewis ou de Brønsted, mais sans observer de conversion (Tableau 17). Ces résultats rejoignent l'hypothèse de Jung : ces éthers dibenzyliques sont remarquablement stables vis-à-vis des acides en partie parce que l'attaque en *anti* de l'oxygène protoné ou activé *via* une S_N2 est fortement gênée par la liaison C-H au pied de la liaison éther. En revanche, les ouvertures en milieu basique sont favorisées par la quasi-coplanarité de la liaison C-O avec une des liaisons C-H benzyliques, rendant possible une ouverture par un mécanisme de type E2. Les meilleures conditions en série FMDIBO, deux heures de réaction à température ambiante et un moindre excès de *n*BuLi, ont conduit à un rendement modeste mais reproductible.



Acide/Nucléophile	pKa	Conditions	X	Composé	Résultats
<i>Al</i> Cl ₃ (5,0 éq.) <i>Na</i> I (5,0 éq.)	AL	ACN, TA, une nuit	I	91a	Absence de conversion
<i>Me</i> ₃ <i>Si</i> Cl (1,2 éq.) <i>Na</i> I (1,2 éq.)	AL	ACN, TA, une nuit	I		
<i>HBF</i> ₄ · <i>OE</i> t ₂ (2,0 éq.)	AL	DCM, TA, 6 h	F	91b	
<i>Me</i> ₃ <i>Si</i> OTf (2,0 éq.)	AL	DCM, 0°C à TA, 4 h, puis 50°C, une nuit	OTf	91c	
<i>Tf</i> OH (2,0 éq.)	-15	DCM, 0°C à TA, une nuit	OTf		

Tableau 17 : Tentatives d'ouverture de l'éther cyclique de la série FMDIBO en milieu acide

L'intermédiaire **78** du céto-DIBO est obtenu en deux étapes à partir de la 5-dibenzosuberénone commerciale (Figure 84).

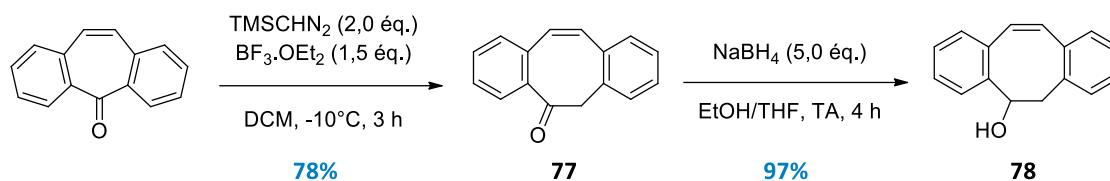


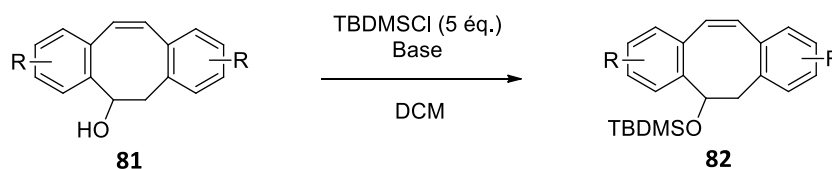
Figure 84 : Obtention de l'intermédiaire dibenzocycloocténol pour la série céto-DIBO

Une extension de cycle initiale grâce au triméthylsilyldiazométhane et catalysée par un acide de Lewis est réalisée à froid en raison de l'instabilité du TMSCHN₂ et conduit au cycle à 8 chaînons **77** avec un bon rendement. La réduction de la cétone est nécessaire pour éviter des réactions secondaires lors de l'étape de dibromation (première étape permettant de passer de l'alcène à l'alcyne intracyclique). Celle-ci a été facilement réalisée avec NaBH₄ dans un mélange éthanol/THF pour conduire au dibenzocycloocténol **78** avec un rendement quasi-quantitatif.

III – Formation du cycloalcyne

La poursuite de la synthèse est semblable à celle décrite par Boons pour le céto-DIBO⁵⁴ et constitue la transformation clé de ces composés : le passage du cyclooctène au cyclooctyne. Contrairement au céto-DIBO, les dérivés auxquels nous nous intéressons ont nécessité la protection de la fonction alcool pour éviter la dégradation du milieu réactionnel. En effet, au cours d'études préliminaires réalisées par le Dr. Guillaume Pousse, il a été constaté la formation majoritaire du produit déshydraté au cours de la dibromation, observé notamment pour le dérivé DINO.

L'étape de protection de l'alcool par un groupement *tert*-butyldiméthylsilyle pour la série DINO a été effectuée dans les conditions de Leeper en conduisant à de bons rendements malgré un temps de réaction long (Tableau 18). Cette réaction a été optimisée sur les composés **81b** et **81c** en remplaçant la pyridine par l'imidazole,¹³³ base azotée plus forte, mais également en plaçant le milieu réactionnel dans un tube hermétiquement fermé. Ces deux paramètres ont conduit à des réactions plus propres et plus rapides, en nécessitant une moindre consommation en base.



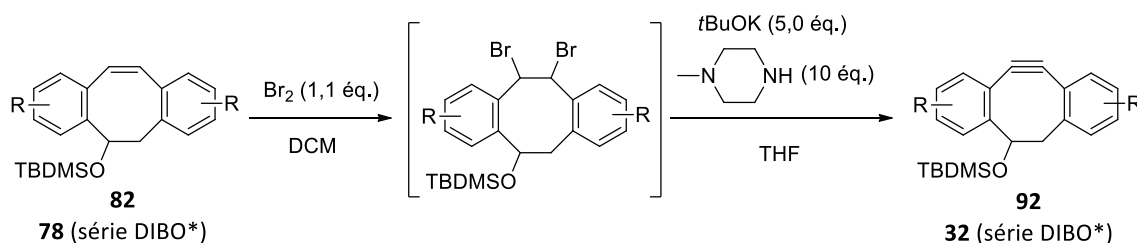
Série	Composé	Conditions	Rendement
TMDIBO	82a	Pyridine (10 éq.), TA, 24 h	69%
DINO	82b	Pyridine (10 éq.), 60°C, 24 h	87%
		Imidazole (3,0 éq.), 60°C, 3 h, tube à vis	93%
FMDIBO	82c	Imidazole (3,0 éq.), TA, 18 h, tube à vis	86%

Tableau 18 : Protection du dibenzocycloocténol

¹³³ Corey, E. J.; Venkateswarlu, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190-6191.

Une fois le dibenzocycloocténoïl **82** protégé, l'obtention du cycloalcyne **92** a été réalisée *via* la dibromation de la fonction alcène cyclique conduisant à un composé dibromé non isolé car peu stable. En effet, la double liaison réagit avec le dibrome pour former un intermédiaire bromonium ponté. L'addition de l'anion Br⁻ se fait ensuite en *anti* du pont afin de former majoritairement les diastéréoisomères *anti*. Après traitement, le brut réactionnel est immédiatement engagé dans l'étape de double déshydrobromation pour former le cyclooctyne. Cette étape nécessite la présence d'une base forte pour déprotomer les carbones benzyliques ainsi que d'une base aminée pour piéger l'acide bromhydrique, sous-produit de la réaction pouvant déprotéger l'alcool ou s'additionner sur des insaturations (la fonction alcène du produit de départ ou la fonction alcyne du produit d'arrivée).

Cette double étape constitue la principale difficulté de cette voie de synthèse, marquée par les différences de résultats selon les dérivés (Tableau 19). Dans le cas de la série DIBO, la deuxième étape est réalisée à froid avec le LDA avec un rendement sur deux étapes de 33%. Ces conditions réactionnelles ont conduit à une absence de conversion pour le composé **82a**. L'équipe de Leeper a également essayé plusieurs bases mais le meilleur rendement est obtenu avec *t*BuOK associé à la N-méthylpipérazine à basse température.



Série	Composé	Conditions de dibromation	Conditions de déshydrobromation	Rendement sur deux étapes
TMDIBO	92a	-78°C, 1 h	TA, 2 h	98%
DINO	92b	-30°C, 3 h	TA, 2 h	16%
FMDIBO	92c	-30°C, 1 h 30	TA, 2 h	39%
DIBO*	32	0°C, 1 h 30	LDA (4,0 éq.), 0°C, 1 h 30	33%

Tableau 19 : Formation du cycloalcyne

*Fonction hydroxyle non protégée

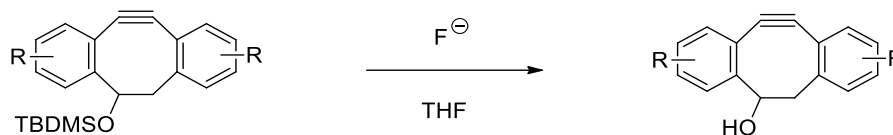
Pour les dérivés **82b** et **82c**, la dibromation de la fonction alcène a été réalisée à -30°C en raison de la cinétique particulièrement lente à de plus basses températures (conversion totale atteinte après 24 h à -78°C) conduisant à la dégradation du milieu réactionnel, en même temps que la déprotection de l'alcool.

La déshydrobromation du dérivé FMDIBO correspond à l'étape limitante et a conduit à un rendement similaire à celui obtenu pour la série DIBO dans les mêmes conditions. En revanche, cette étape représente la majeure difficulté pour l'obtention de dérivés dinaphtylcyclooctynes, notamment au cours de la seconde élimination de l'acide bromhydrique, probablement en raison de la gêne stérique. De plus, le cyclooctyne formé est difficilement séparable du produit issu de la mono-déshydrobromation, ce qui accentue le faible rendement. L'utilisation de LDA sur la série DINO a été réalisée mais a conduit à une importante dégradation.

La méthode de formation de cycloalcyne est celle décrite pour la série TMDIBO, mais elle s'est révélée moins efficace pour les autres composés.

IV – Obtention des sondes dibenzocyclooctynones

La déprotection de l'alcool silylé a été réalisée dans des conditions classiques avec l'utilisation d'ion fluorure issu du TBAF (Tableau 20). Le composé **94** a été obtenu avec un bon rendement, comme pour le dérivé **33**, mais a nécessité une plus basse température de réaction.



Série	Composé	Conditions	Rendement
TMDIBO	33	TBAF (1,5 éq.), 0°C, 1 h	90%
DINO	93	TASF (2,0 éq.), TA, 54 h	71%
		TBAF (2,0 éq.), -20°C, 5 h	53%
FMDIBO	94	TBAF (1,2 éq.), -20°C, 1 h 30	Quantitatif

Tableau 20 : Déprotection du dibenzocyclooctynol

La réalisation de cette réaction dans les conditions de la série TMDIBO a conduit systématiquement à une dégradation du milieu réactionnel pour le dérivé **93**. En diminuant la température, un rendement moyen de 53% a été obtenu après 5 h.

Pour ce composé, une source d'ion fluorure moins réactif a été utilisée, le TASF, dont le fluorure forme un adduit avec un acide de Lewis faible, le fluorure de triméthylsilyle. L'interaction de ce complexe anionique avec le contre-ion sulfonium ne gêne pas la réactivité du fluorure car son électrophilie est diminuée par les effets mésomères donateurs des trois atomes d'azote. Il en résulte que l'ion fluorure est moins réactif car sa basicité est contrôlée par l'acide de Lewis, contrairement au TBAF où le fluorure est libre. Ainsi, le meilleur rendement pour former le composé **93** a été obtenu avec le TASF mais au bout d'un temps de réaction long et sans obtenir une conversion totale, malgré l'ajout de fluorure supplémentaire. Il faut noter qu'avec le TBAF un rendement moyen est atteint au bout d'un temps 10 fois plus court.

Les produits **93** et **94** sont particulièrement peu solubles, ce qui a grandement compliqué leur purification. Des essais de recristallisation ont été réalisés sans succès et la purification sur silice a conduit à d'importantes pertes de matière.

Il faut noter que jusqu'à cette avant-dernière étape de la voie de synthèse, aucun des intermédiaires, toutes séries confondues, n'est fluorescent, excepté le composé **93** ou DINO, dont les propriétés seront décrites dans le chapitre suivant.

L'ultime étape de la voie de synthèse est l'oxydation des cyclooctynols (Tableau 21), réalisée dans les mêmes conditions que pour le composé **34** pour les séries DINO et FMDIBO avec le périodine de Dess-Martin. Les rendements obtenus sont supérieurs à 80% mais, comme pour les précurseurs alcools, les cyclooctynones obtenues sont très peu solubles ce qui a rendu la purification difficile.

L'oxydant utilisé pour le composé **33** est l'oxyde de manganèse en large excès qui a permis d'obtenir le céto-TMDIBO **83** avec un rendement de 50% et au bout d'un temps de réaction long. Des essais avec le DMP et IBX à chaud ont été réalisés mais ont conduit à la dégradation du produit initial.



Série	Composé	Conditions	Rendement
céto-TMDIBO	83	MnO ₂ (25 éq.), TA, 4 j	50%
céto-DINO	84	DMP (1,5 éq.), TA, 1 h 30	87%
céto-FMDIBO	85	DMP (1,5 éq.), TA, 30 min	80%
céto-DIBO	34	DMP (1,5 éq.), TA, 1 h	74%

Tableau 21 : Oxydation finale en dibenzocyclooctynone

Pour conclure, trois nouvelles dibenzocyclooctynones ont été obtenues par la voie de synthèse décrite par Leeper *et al.*⁵³ dont les rendements globaux par série sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 22). La synthèse du céto-DIBO **34** a été reproduite selon la voie décrite par Boons *et al.*⁵⁴ de manière à avoir un composé référent et a conduit à un rendement global de 18% sur 5 étapes.

Sonde			
	céto-TMDIBO (83)	céto-DINO (84)	céto-FMDIBO (85)
Précurseur commercial			
Rendement global	24,5% sur 8 étapes	7,6% sur 8 étapes	4,6% sur 9 étapes

Tableau 22 : Rendements globaux à partir des synthons commerciaux

La synthèse de la série TMDIBO ayant conduit à de bons rendements, nous avons choisi de l'appliquer aux dérivés DINO et FMDIBO. Néanmoins, cette voie a entraîné des différences notoires et non négligeables pour ces derniers, expliquant les faibles rendements globaux par rapport à la série céto-TMDIBO **83**. Cette voie a nécessité de longues optimisations, entraînant ainsi une faible productivité et reproductibilité ainsi qu'une grande variabilité selon les dérivés, comme le montre le schéma ci-dessous (Figure 85). Il est à noter que l'étape particulièrement difficile et qui nécessite d'être améliorée est celle menant à la fonction alcyne intracyclique.

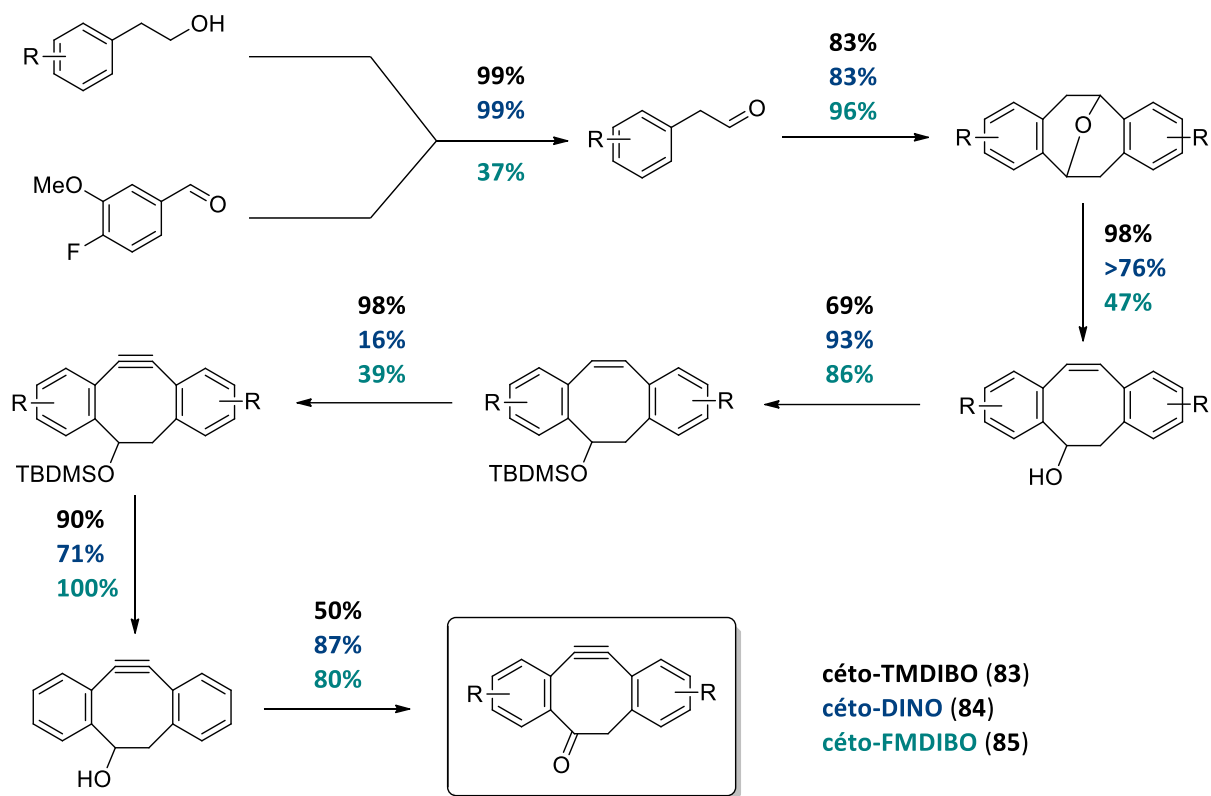


Figure 85 : Schéma récapitulatif des rendements obtenus pour chaque étape selon les séries

Toutefois, les trois composés obtenus sont fluorescents, comme le céto-DIBO **34**. Les propriétés de ces trois composés, ainsi que le DINO **93**, ont été caractérisées et étudiées.

Chapitre III : Evaluation des sondes « de première génération »

I – Propriétés photophysiques

Les propriétés de fluorescence des dibenzocyclooctynes que nous avons synthétisés ont été comparées à celles du céto-DIBO **34**, dont les caractéristiques obtenues sont comparables à celles de la littérature.⁵³ Ces mesures ont été effectuées au laboratoire de photophysique et photochimie supramoléculaires et macromoléculaires (PPSM) de l'ENS Cachan avec l'aide du Pr. Rachel Méallet-Renault et d'Arnaud Brosseau.

Les dibenzocyclooctynes étudiés étant hydrophobes, l'ensemble des spectres d'absorption et d'émission (Figure 86) ont été réalisés en solution dans le méthanol à 25°C, malgré des difficultés de solubilisation. Ce solvant polaire protique, comme l'eau, a été choisi de manière à étudier les propriétés photophysiques des sondes dans un environnement le plus proche possible des conditions aqueuses, tout en permettant une solubilisation suffisante de ces composés.

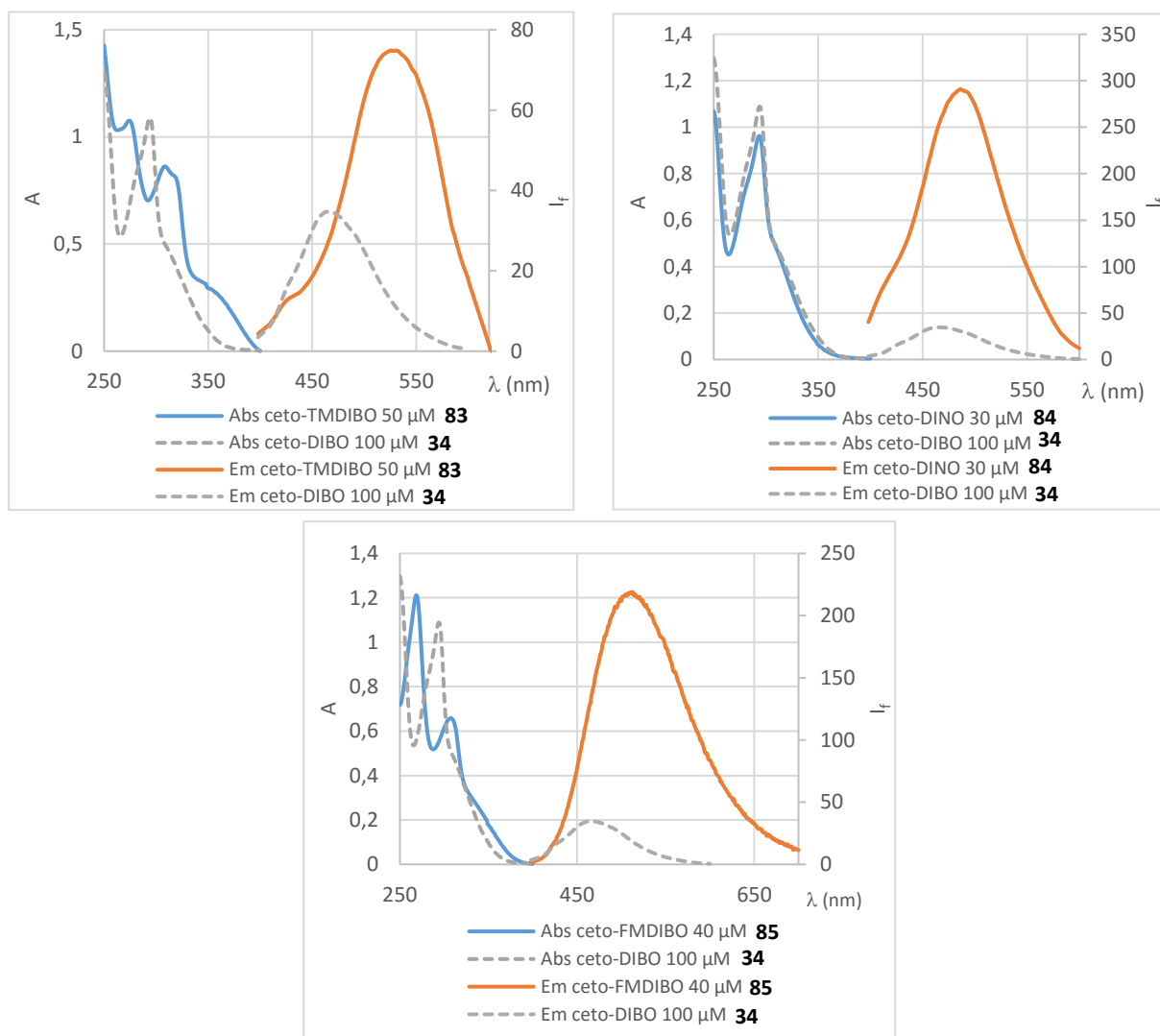


Figure 86 : Courbes d'absorption et d'émission des sondes synthétisées par rapport au céto-DIBO

Les différentes caractéristiques photophysiques obtenues sont résumées dans le tableau ci-dessous (Tableau 23) :

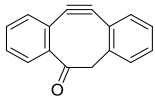
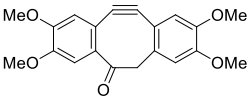
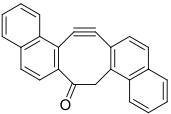
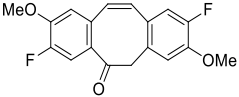
				
	34	83	84	85
λ_{ex} (nm)	375	375	375	375
$\lambda_{ém}$ (nm)	470	528	490	510
$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	5390	7727	6260	7059
Φ_f	26%	3-5%	11%	13%
ϵ_{375} (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	155	3915	300	1000
B	40	157	33	130
τ_f (ns)	4,8	4,6	4,5	5,4
k_r (10 ⁷ s ⁻¹)	5,41	0,87	2,44	2,41
k_{nr} (10 ⁷ s ⁻¹)	15,4	20,9	19,8	16,1

Tableau 23 : Propriétés photophysiques des sondes obtenues par rapport au céto-DIBO
 Déterminées dans le méthanol. Référence : sulfate de quinine, 0,1 M dans H₂SO₄.

Tous les composés étudiés ont une longueur d'onde d'excitation similaire au céto-DIBO **34** et supérieure à 340 nm. Les longueurs d'ondes d'émission sont situées dans la région du bleu-vert (490-528 nm).

La présence des groupements méthoxy, électrodonneurs, a effectivement permis de déplacer de manière significative la longueur d'onde d'émission vers le rouge, de même que l'extension du système π -conjugué dans la série dinaphtyle, mais dans une moindre mesure. Le remplacement de deux groupements méthoxy par des atomes de fluor dans le composé **85** a résulté en un léger effet hypsochrome de l'émission par rapport au composé **83**. Pour ces trois dibenzocyclooctynones, le déplacement de Stokes a ainsi été amélioré, par rapport au composé référent. L'absorption à 375 nm a été considérablement augmentée pour le composé **83** grâce à des transitions $n \rightarrow \pi^*$ imputées aux doublets non liants des groupements méthoxy conjugués au système π ($\epsilon_{375} = 3915 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ au lieu de $155 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ pour le composé **34**), de même pour le composé **85** ($\epsilon_{375} = 1000 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$). Pour le composé **84**, cette augmentation est plus faible ($\epsilon_{375} = 300 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) car les transitions impliquées sont de plus faible énergie ($\pi \rightarrow \pi^*$).

Les rendements quantiques de fluorescence Φ_f ont été calculés par rapport au sulfate de quinine **95** (Figure 86).

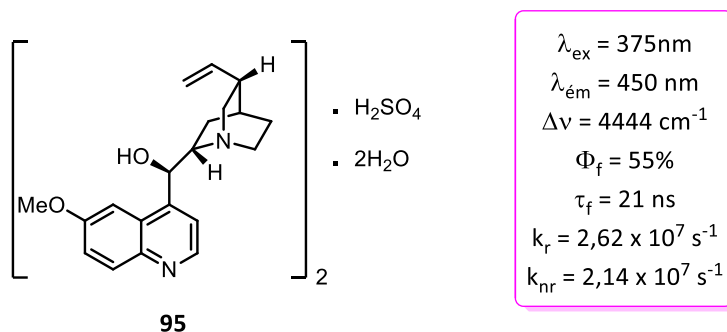


Figure 87 : Propriétés photophysiques du sulfate de quinine dans 0,1 M H₂SO₄

Pour les trois dérivés, les modifications effectuées par rapport au céto-DIBO **34** ont conduit à des moins bons rendements quantiques. Celui-ci a été divisé par 6 lorsque des groupements méthoxy ont été ajoutés (**83**) et par 2 après extension du système π et l'ajout d'atomes de fluor (**84** et **85**). Ceci indique que ces modifications entraînent une moins bonne efficacité de fluorescence des sondes synthétisées, dont le nombre de photons émis par rapport au nombre de photons absorbés est 2 à 6 fois moins important en comparaison au produit **34**. Néanmoins, la comparaison entre le céto-TMDIBO **83** et le céto-FMDIBO **85** montre que le remplacement de groupements méthoxy par des fluors a entraîné une amélioration de ce rendement. Le calcul des brillances B pour ces deux composés montre cependant une amélioration par rapport au céto-DIBO **34**. Ce paramètre est similaire pour la sonde dinaphtyle.

Les temps de vie de fluorescence τ_f sont relativement constants (en moyenne 4,6 ns pour les trois premiers composés), avec une valeur un peu plus grande pour le produit **85**. Ceci indique que les modifications apportées n'ont pas changé le temps moyen passé par les fluorophores à l'état excité. En revanche, le calcul des constantes de vitesse radiative k_r et non radiative k_{nr} montre que globalement les relaxations sans émission de photon sont privilégiées pour ces dérivés (environ 8 fois plus pour les composés **84** et **85** et jusqu'à 24 fois plus pour le composé **83**, contre 3 fois plus pour le composé parent **34**), ce qui explique l'impact sur les rendements quantiques de fluorescence.

Comme cela a été décrit, les transitions les plus basses pour les composés ayant des hétéroatomes impliqués dans le système π sont de type $n \rightarrow \pi^*$ et correspondent à des transitions ayant un temps de relaxation radiative élevé. La vitesse de cette dernière a diminué pour les trois dérivés par rapport au composé référent (deux fois plus lente pour les composés **84** et **85** et six fois plus lente pour le composé **83**). Ainsi, les processus de désexcitation plus rapides seront favorisés, en particulier les relaxations non radiatives, ce qui entraîne des rendements quantiques plus faibles. Pour le céto-DINO **84**, les valeurs obtenues pourraient être liées à sa faible solubilité, comme pour le tétracène.

Le cas particulier du DINO **93** a conduit à des résultats singuliers alors que cette molécule ne diffère du composé **84** que d'un seul degré d'oxydation (Figure 88 et Tableau 24).

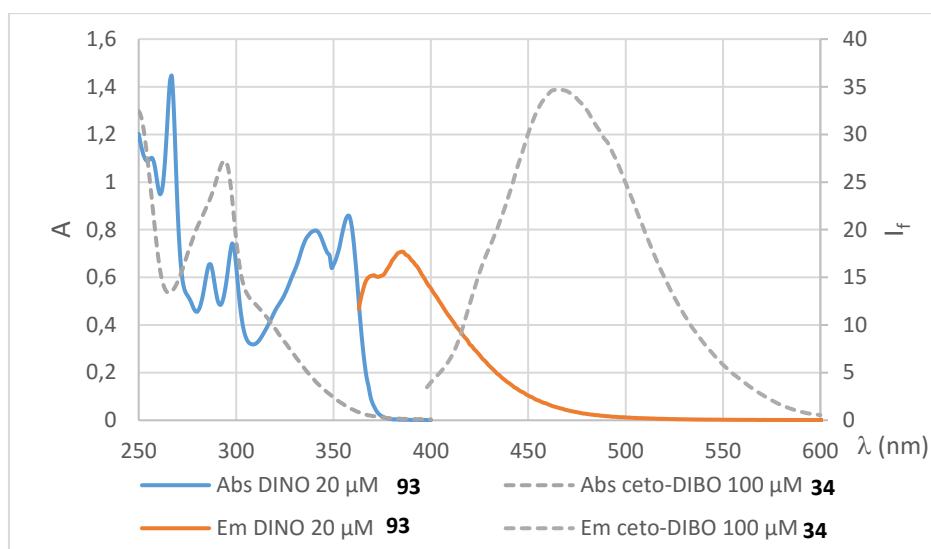
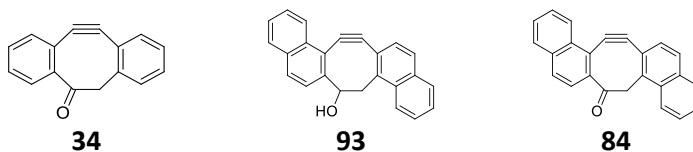


Figure 88 : Courbes d'absorption et d'émission du DINO par rapport au céto-DIBO

Pour ce composé, une excitation à 375 nm n'est plus applicable en raison d'un effet hypsochrome prononcé des spectres d'absorption et d'émission ($\lambda_{ém} = 387$ nm au lieu de 470 nm pour le composé **34** et 490 nm pour le composé **84**), malgré l'extension du système π -conjugué. Il en résulte un déplacement de Stokes plus petit que pour les autres dérivés.



λ_{ex} (nm)	375	340	375
$\lambda_{ém}$ (nm)	470	387	490
$\Delta\nu$ (cm^{-1})	5390	3572	6260
Φ_f	26%	18%	11%
$\epsilon_{\lambda_{ex}}$ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	155	700	300
B	40	126	33
τ_f (ns)	4,8	1,0	4,5
k_r ($10^7 s^{-1}$)	5,41	18,0	2,44
k_{nr} ($10^7 s^{-1}$)	15,4	82,0	19,8

Tableau 24 : Comparaison des propriétés photophysiques du DINO avec le céto-DINO et le céto-DIBO

En revanche, cette molécule présente le rendement quantique de fluorescence le plus élevé de la série, même s'il reste inférieur à celui du composé référent. De plus, la durée de vie de fluorescence est significativement plus courte que pour les autres sondes (1,0 ns au lieu de 4,5 ns pour le céto-DINO **84**). Ainsi, l'amélioration de ces deux paramètres par rapport aux autres dérivés a permis d'obtenir de meilleurs résultats pour la constante de vitesse radiative k_r : $18,0 \times 10^7 s^{-1}$ au lieu de $2,44 \times 10^7 s^{-1}$ pour le céto-DINO **84**. Ceci indique que la vitesse de désexcitation radiative pour le DINO **93** à l'état excité est 7 fois plus rapide que pour sa version oxydée. Le calcul de la brillance B indique par ailleurs que ce paramètre est quatre fois plus important que pour les composés **34** et **84**.

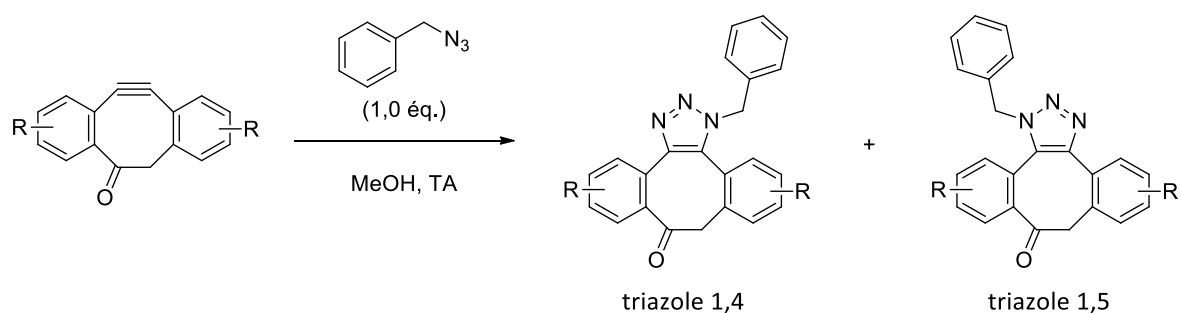
Néanmoins, l'utilisation du DINO **93** en tant que sonde dans le contexte de notre projet est restreinte en raison de sa longueur d'onde d'excitation située dans l'UV et correspondant à la limite fixée par notre cahier des charges. Cette molécule a toutefois la particularité d'avoir une fonction hydroxyle libre et potentiellement fonctionnalisable, pouvant permettre de greffer par exemple un fluorophore adéquat de manière à faire du FRET.

Globalement, les modifications apportées sur les dérivés du céto-DIBO synthétisés ont permis de déplacer la longueur d'onde d'émission vers le rouge en conservant la longueur d'onde d'excitation de 375 nm et en améliorant le déplacement de Stokes. Malgré une durée de vie constante, les rendements quantiques de fluorescence n'ont pas été améliorés. Un intermédiaire réactionnel a présenté des propriétés de fluorescence, le DINO **93**, dont le rendement quantique de fluorescence est supérieur à celui des dérivés dibenzocyclooctynones, mais sa longueur d'onde d'excitation ne convient pas à une utilisation en milieu biologique. Des calculs de modélisation sont en cours pour expliquer ces différences notamment par rapport au céto-DINO **84**.

II – Réactivité vis-à-vis des azotures

Une fois nos sondes caractérisées en photophysique, leur réactivité vis-à-vis des fonctions azotures a été étudiée, d'une part pour vérifier que la SPAAC se réalise bien et avec une cinétique adéquate, d'autre part pour déterminer si les produits triazoles obtenus le cas échéant sont fluorescents.

Dans un premier temps, nous avons reproduit les conditions de la SPAAC décrites pour le céto-DIBO,⁵⁴ dans le méthanol à température ambiante et à l'abri de la lumière, avec un modèle azoture en condition équimolaire, l'azoture de benzyle (Tableau 25).



Sondes	Composé	Temps	Conversion	Rendement	Proportions triazoles 1,4:1,5
<i>céto-DIBO</i>	44	3 h	100%	100%	77:23
<i>céto-TMDIBO</i>	96	2 h 40	100%	55%	91:9
<i>céto-DINO</i>	97	3 j	100%	58%	73:27
<i>céto-FMDIBO</i>	98	2 h 30	100%	65%	83:17
<i>DINO</i>	99	>4 j	80%	41%	100:0

Tableau 25 : Réactivité des sondes synthétisées vis-à-vis de la SPAAC

Dans chaque cas, la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire a eu lieu et a conduit à la formation des deux isomères triazoles sous forme de mélange, à l'exception du composé **99** où seul le 1,4-triazole a

été formé. Ce dernier est formé majoritairement avec les autres dérivés car l'attaque de l'azote distal du dipôle-1,3 est favorisée sur le carbone le plus électrophile, à savoir celui subissant le plus l'effet électroattracteur du carbonyle.

A l'exception de la série dinaphtyle, la conversion totale est atteinte en un temps inférieur à 3 h, ce qui correspond à une cinétique en accord avec les caractéristiques de la chimie « click ». Pour le composé **84**, cette conversion est atteinte après trois jours de réaction et 20% de son précurseur **93** n'étaient toujours pas convertis après plus de quatre jours de réaction. La cinétique particulièrement lente de cette série dinaphtyle vis-à-vis de la SPAAC est probablement due à l'encombrement stérique. Bien que cette réaction ait conduit dans la majorité des cas à une conversion totale, les rendements en produits triazoles isolés traduisent la difficulté de purification en raison de leur faible solubilité.

Toutefois, la réaction SPAAC a conduit pour chaque dérivé à la formation de triazoles non fluorescents, rejoignant les résultats obtenus pour le céto-DIBO.⁵⁴ Cette extinction de la fluorescence, bien qu'en opposition aux réactions fluorogéniques^{90,91} qui génèrent un adduit fluorescent (de type « off-on »), correspond bien à une modulation des propriétés photophysiques des dibenzocyclooctynes (de type « on-off »).

Cette réaction a également été réalisée par le Dr. Guillaume Pousse avec l'ester méthylique de l'arylthiophène **100** et le céto-TMDIBO **83** (Figure 89) en conduisant également aux triazoles **101** correspondants, non fluorescents.

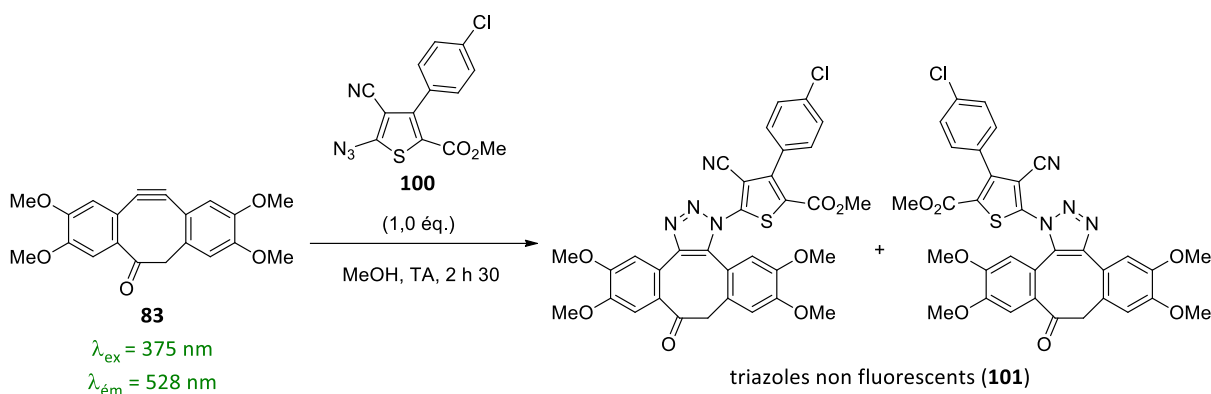


Figure 89 : Réaction SPAAC entre le céto-TMDIBO et l'arylthiophène tétrasubstitué

Afin d'évaluer ces nouveaux dérivés en tant que partenaire de la SPAAC, la détermination des constantes de vitesse est nécessaire. Des études cinétiques ont ainsi été réalisées pour le céto-TMDIBO **83** et le céto-FMDIBO **85**, dérivés les plus performants, par spectrométrie UV. En effet, il est possible de suivre la disparition de la fonction cycloalcyne à une longueur d'onde caractéristique située entre 309 et 320 nm suivant les composés. De telles études, réalisées en conditions de cinétique de pseudo 1^{er}-ordre par rapport au cyclooctyne avec un excès d'azoture de benzyle, ont initialement été effectuées dans le méthanol mais ont conduit à des résultats non reproductibles et non cohérents, en raison de la faible solubilité des sondes dans ce solvant. Des études dans l'acétonitrile ont conduit à des résultats plus homogènes (Tableau 26) :

	céto-DIBO (34) ⁵⁴	céto-TMDIBO (83)	céto-FMDIBO (85)
λ étudiée (nm)	317	320	309
k_2 (M ⁻¹ .s ⁻¹)	0,2590	0,6316	3,495

Tableau 26 : Constantes de vitesse bimoléculaires pour les réactions des dibenzocyclooctynones avec l'azoture de benzyle dans l'acétonitrile à 25°C

Ainsi, l'ajout de groupements méthoxy a permis d'augmenter de plus de deux fois la vitesse de réaction des cyclooctynes vis-à-vis des fonctions azotures par rapport au céto-DIBO, et la présence d'atomes de fluor a multiplié par 13 cette vitesse qui atteint les 3,5 M⁻¹.s⁻¹. Le céto-FMDIBO **85** fait partie des cyclooctynes les plus réactifs décrits dans la littérature, derrière le TMTM **31** ($k_2 = 4,0$ M⁻¹.s⁻¹).

Pour conclure, la réactivité des sondes synthétisées vis-à-vis des fonctions azotures a été vérifiée et a conduit à la formation de triazoles non fluorescents. Cette réactivité a été considérablement améliorée par rapport au composé parent, notamment pour le céto-FMDIBO **85** dont la constante de vitesse de second ordre est supérieure à 3,0 M⁻¹.s⁻¹. La série dinaphtyle fait exception, probablement en raison de l'encombrement stérique qui diminue la cinétique de la SPAAC. Ces résultats nous ont malheureusement conduits à abandonner la possibilité d'utiliser le FRET en fonctionnalisant le DINO **93**.

III – Comportement en milieu biologique

Une étape déterminante dans notre projet est l'étude du comportement propre des sondes synthétisées en milieu biologique, en vérifiant en particulier qu'elles sont capables d'entrer dans les parasites que nous étudions.

Il est également essentiel de vérifier que la fluorescence de ces sondes n'est pas quenchée par le milieu biologique et qu'elles conduisent à un marquage spécifique du cytosol sans marquer d'autres compartiments comme le noyau ou la membrane. Enfin, il est important dans le cadre d'une application sur du matériel biologique vivant de déterminer leur éventuelle toxicité.

Des études préliminaires ont été réalisées dans ce sens en plaçant le céto-TMDIBO **83** avec du glutathion, thionucléophile abondamment présent en milieu biologique, sans qu'aucune réaction ne se produise.

Toutes les expériences ont été effectuées au Muséum National d'Histoire Naturelle dans le laboratoire Molécules de Communication et Adaptation des microorganismes (MCAM) avec le Pr. Philippe Grellier et Elisabeth Mouray. Les analyses d'imagerie ont été faites au Centre de Microscopie Photonique et d'Imagerie (CEMIM) du Muséum sur des cellules vivantes de *Plasmodium falciparum* (agent responsable du paludisme) et sur les formes sanguines de l'espèce *Trypanosoma brucei brucei* (agent responsable de la trypanosomiase africaine chez le bétail).

III.1. – Imagerie de fluorescence

Lors d'études préliminaires, le céto-DIBO **34** a été incubé avec des parasites vivants et il a été constaté qu'il engendrait un marquage des parasites. Chaque composé synthétisé a été incubé avec *P.*

falciparum et *T. b. brucei* vivants et le marquage des cellules a été observé à l'aide d'un microscope confocal de fluorescence. Le signal correspondant à l'autofluorescence des parasites a été soustrait sur les images présentées ci-dessous de manière à ne visualiser que le signal issu des sondes.

III.1.1. Marquage de *Plasmodium falciparum*

Toutes les sondes ont été incubées avec des cellules de *Plasmodium* vivants pendant 30 minutes à l'abri de la lumière à une concentration de 50 μ M. Des premiers clichés de microscopie, sans lavage, ont été pris et sont présentés ci-dessous (Figure 90) :

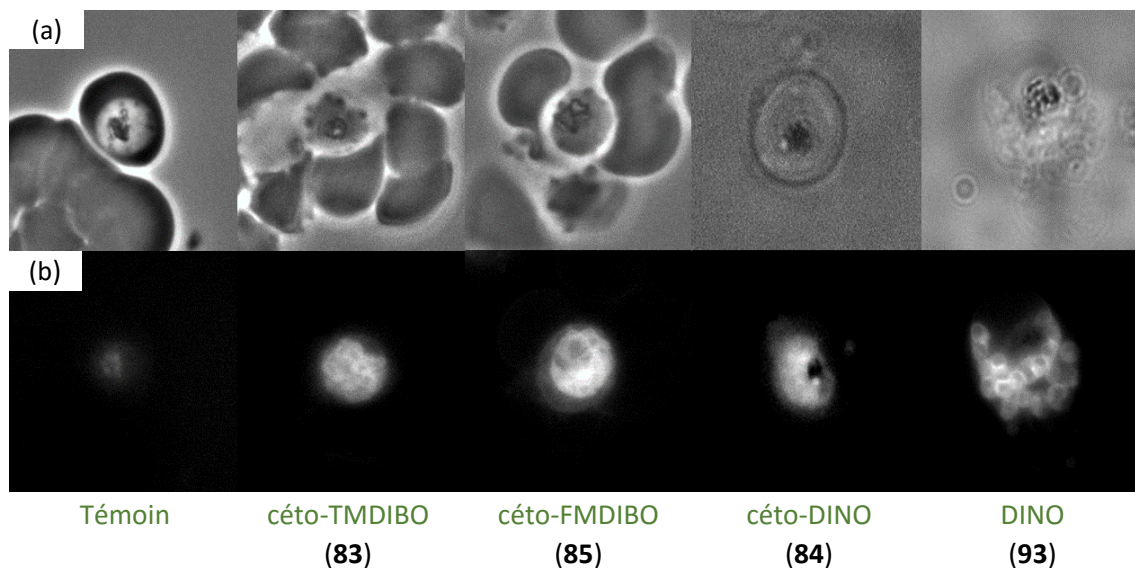


Figure 90 : Clichés de microscopie confocale (a) en contraste de phase et (b) de fluorescence (filtre DAPI, bandes passantes pour l'excitation : 365 ± 20 nm et pour l'émission : passe-haut 400 nm), de *P. falciparum* incubé avec 50 μ M de sondes pendant 30 min et sans lavage

Pour les quatre composés, un marquage fluorescent est observé uniquement dans le parasite. Ces molécules sont donc capables de traverser la membrane de *P. falciparum*, mais également celle du globule rouge qui est la cellule hôte du parasite, et le milieu biologique ne quenche pas leurs propriétés photophysiques. Aucune fluorescence n'est cependant observée ni dans le milieu extracellulaire, si dans l'hématie. Nous ne savons pas si pour cette dernière cela résulte d'une absence d'accumulation des cyclooctynes dans le cytoplasme des globules rouges ou de l'atténuation de leur fluorescence à cause d'une interaction avec le complexe hémique de l'hémoglobine.

A l'intérieur du parasite, une accumulation essentiellement cytosolique des sondes est observée, le noyau et l'hémozoïne n'étant pas marqués. Le produit **83** diffère des autres sondes par une fluorescence assez faible et par un photoblanchiment plus rapide. De plus, il reste le moins accumulé dans les parasites après lavages au milieu de culture. Les composés **84** et **93**, qui ne diffèrent que par l'oxydation d'un seul carbone, ont toutefois des comportements différents : le composé **84** est légèrement moins fluorescent mais reste accumulé dans le parasite après lavage au milieu de culture des hématies infectées, contrairement à son homologue réduit, qui se retrouve en partie expulsé dans le milieu extracellulaire.

Le composé **85** présente également un photoblanchiment rapide et sa fluorescence dans les parasites ne persiste pas beaucoup après lavages. Sa faible solubilité en milieu aqueux, à l'instar des

composés de la série dinaphtyle, a conduit à l'observation d'un grand nombre de cristaux extracellulaires non solubles, et ce, même à 10 μ M (Figure 91). Ceci explique pourquoi l'intensité de fluorescence dans les parasites est faible, voire plus faible que pour le composé **83**, alors que plusieurs paramètres photophysiques ont été améliorés.

De plus, il semblerait que ces sondes soient hémolytiques, ce qui justifie la mise en place de tests de cytotoxicité.

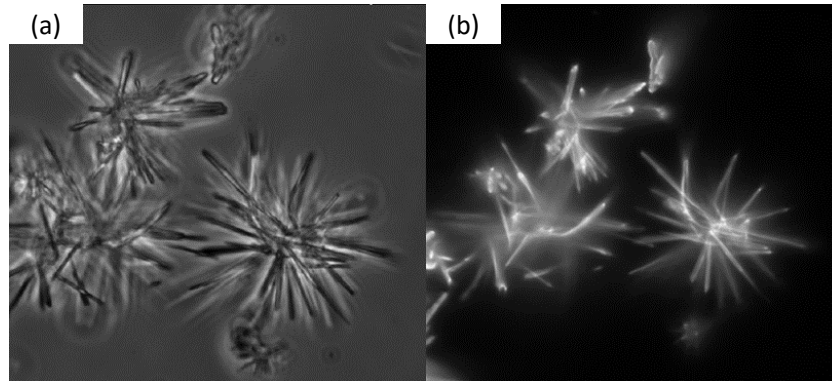


Figure 91 : Cristaux extracellulaires observés dans le milieu de culture en microscopie confocale (a) en contraste de phase et (b) de fluorescence (filtre DAPI, bandes passantes pour l'excitation : 365 ± 20 nm et pour l'émission : passe-haut 400 nm) pour **85** à 10 μ M (observations similaires pour **84** et **93**)

III.1.2. Marquage de *Trypanosoma brucei brucei*

Les sondes ont été incubées avec des trypanosomes vivants pendant 30 minutes à l'abri de la lumière à une concentration de 10 μ M pour minimiser la concentration en cristaux extracellulaires. Des clichés de microscopie, sans lavage, ont été pris et sont présentés ci-dessous (Figure 92) :

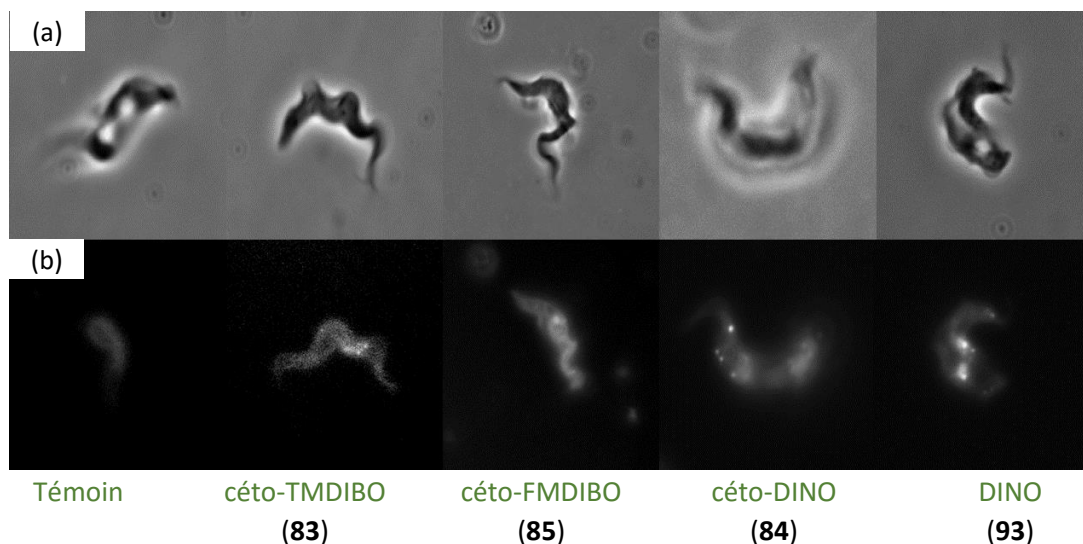


Figure 92 : Clichés de microscopie confocale (a) en contraste de phase et (b) de fluorescence (filtre DAPI, bandes passantes pour l'excitation : 365 ± 20 nm et pour l'émission : passe-haut 400 nm), de *T. b. brucei* incubé avec 10 μ M de sondes pendant 30 min et sans lavages

Ce parasite étant mobile, les clichés obtenus sont moins précis. Cependant, les observations sont identiques à celles décrites pour *P. falciparum*. Un marquage fluorescent est observé pour chaque

composé au niveau du cytosol du parasite, dont le signal fade en raison d'un photoblanchiment rapide. On observe toutefois une concentration des molécules fluorescentes dans des structures parasitaires dont la nature reste à déterminer. Après lavages, les parasites sont moins fluorescents car une partie des sondes sort de la cellule. Comme pour le précédent parasite, des cristaux extracellulaires sont observés pour les composés **84**, **85** et **93**.

Un fait inattendu a cependant été constaté : lors de l'irradiation, les parasites situés dans la zone irradiée s'immobilisent de manière irréversible instantanément et au bout de cinq secondes, lorsque les parasites sont incubés avec les composés **84** et **93**, respectivement. Ceci n'a pas été observé pour *P. falciparum* car les érythrocytes, ainsi que ces parasites, ne sont pas mobiles à ce stade de développement. Les sondes de la série dinaphtyle sont donc photo-toxiques et induisent la mort du trypanosome quasi-instantanément. Avec les composés **83** et **85**, la mort est constatée au bout du même temps que pour le témoin (*i.e.* irradiation des trypanosomes sans sonde), à savoir : de 30 à 60 secondes.

Par manque de temps, les tests de cytotoxicité n'ont pu être réalisés pour le céto-FMDIBO **85**.

III.2. – Evaluation de la toxicité

Les tests d'inhibition *in cellulo* de la croissance des parasites et la cytotoxicité sur des cellules de mammifères des sondes obtenues ont été réalisés, à l'exception du céto-FMDIBO **85**. Ces tests sont nécessaires pour une application en milieu biologique et correspondent à des temps longs (48 à 72 h). Il faut noter que notre projet se base sur une observation par imagerie au bout d'un temps plus court, en général inférieur à 2 h après l'ajout du cyclooctyne.

III.2.1. Tests d'inhibition de la croissance sur les parasites

Résultats sur *Trypanosoma brucei*

L'activité trypanocide des molécules synthétisées a été mesurée après 72 h par métabolisation de la résazurine sur les formes sanguines de *T. b. brucei* et *T. b. gambiense* (agent responsable de la maladie du sommeil chez l'Homme). Les molécules présentent une activité trypanocide significative, avec des valeurs de concentration inhibant de 50% le développement parasitaire (CI_{50}) de 3,1 à 12,5 μ M sur *T. b. brucei* et de 4,1 à 12,8 μ M sur *T. b. gambiense* (Tableau 27).

Molécule	céto-DIBO (34)	céto-TMDIBO (83)	céto-DINO (84)	DINO (93)
CI_{50} (μ M) <i>T. b. b.</i> (72 h)	5,8 ± 1,7	9,1 ± 2,1	3,1 ± 1,6	12,5 ± 2,5
CI_{50} (μ M) <i>T. b. g.</i> (72 h)	11,8 ± 1,0	12,8 ± 0,4	4,1 ± 0,3	6,3 ± 1,6

Tableau 27 : Résultats d'inhibition de la croissance sur les formes sanguines de *Trypanosoma brucei brucei* (*T. b. b.*) et *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. g.*)
Référence : Pentamidine : CI_{50} *T. b.* = 0,011 μ M

Le DINO **93** est le moins toxique des quatre sur *T. b. brucei* et il est à noter que le céto-DINO **84** est quatre fois plus toxique que lui, alors que leurs structures sont très similaires. Néanmoins, pour *T. b. gambiense*, ces deux dernières sondes ont un pouvoir inhibiteur quasi-similaire et sont les plus

toxiques, tandis que le céto-DIBO **34** et le céto-TMDIBO **83** sont environ trois fois moins toxiques. Par comparaison, la pentamidine, molécule trypanocide de référence, présente une CI_{50} de 11 nM.

Résultats sur *Plasmodium falciparum*

L'activité antipaludique des molécules synthétisées a été mesurée après 48 h par incorporation d'hypoxanthine tritiée. Comme précédemment, ces molécules ne sont pas totalement dénuées d'activité antiparasitaire et présentent une activité antipaludique notable. Des valeurs de CI_{50} ont été obtenues de 1,8 à 5,7 μ M sur *P. falciparum* (Tableau 28).

Molécule	céto-DIBO (34)	céto-TMDIBO (83)	céto-DINO (84)	DINO (93)
CI_{50} (μ M) <i>P. f.</i> (48 h)	3,3 \pm 0,5	1,8 \pm 0,4	5,7 \pm 1,6	1,8 \pm 0,3

Tableau 28 : Résultats d'inhibition de la croissance sur la souche FCB1 de *Plasmodium falciparum* (*P. f.*)
Référence : Chloroquine : CI_{50} *P. f.* = 0,072 μ M

On note que le DINO **93** a un pouvoir inhibiteur similaire à celui du céto-TMDIBO **83**, et ces deux molécules sont les plus toxiques pour le parasite. Par comparaison, la chloroquine, molécule antipaludique de référence, présente une CI_{50} de 72 nM sur cette souche de *P. falciparum*.

III.2.2. Résultats sur les lignées de cellules de myoblastes de rats L6

La cytotoxicité des sondes synthétisées sur des cellules de mammifères a été mesurée après 72 h par métabolisation de la résazurine. Ces molécules présentent une cytotoxicité significative avec des valeurs de CI_{50} de 2,6 à 19 μ M sur des myoblastes de rats (Tableau 29).

Molécule	céto-DIBO (34)	céto-TMDIBO (83)	céto-DINO (84)	DINO (93)
CI_{50} (μ M) L6 (72 h)	2,6 \pm 1,7	2,9 \pm 1,1	19 \pm 2,5	3,4 \pm 0,6

Tableau 29 : Résultats de cytotoxicité sur des lignées de cellules myoblastiques de rats L6

Ainsi, nous avons évalué la qualité de la fluorescence et de la pénétration de quatre nouveaux cyclooctynes sur les parasites que nous étudions : *P. falciparum* et *T. brucei*. Ces sondes traversent bien les membranes cellulaires et s'accumulent dans le parasite. Le céto-TMDIBO **83** donne la fluorescence la moins intense qui s'affaiblit aussi le plus rapidement. Les sondes de la série dinaphtyle provoquent quant à elles la mort du trypanosome en moins de cinq secondes, certainement par photosensibilisation, et leur photoblanchiment n'est pas négligeable. Le céto-FMDIBO **85** partage les mêmes propriétés que le céto-TMDIBO **83**, mais forme d'importants cristaux dans le milieu de culture, comme le céto-DINO **84** et son homologue hydroxyle **93**. De plus, la toxicité de ces composés n'est pas négligeable mais les valeurs de CI_{50} ont été obtenues au bout de temps longs : cette toxicité ne devrait pas gêner nos observations de fluorescence qui sont réalisées sur quelques heures seulement.

Pour évaluer les propriétés de détection bio-orthogonales de ces nouvelles sondes *via* la SPAAC, il est nécessaire de vérifier qu'elles sont capables de réagir en milieu biologique avec des fonctions azotures. Parmi les cyclooctynes synthétisés, le composé **83** a été choisi car il présente la meilleure solubilité en milieu aqueux.

Chapitre IV : Marquage sur *T. brucei*

Un de nos derniers objectifs dans la synthèse de dérivés fluorescents du céto-DIBO est de vérifier que ces composés sont capables de réagir en milieu biologique et de manière bio-orthogonale avec une fonction azoture, et plus précisément, dans les cellules de parasites que nous étudions.

Il existe quelques exemples de marquages décrits pour *Plasmodium falciparum*. En 2014, l'équipe de Vial et coll.¹⁰⁸ ont par exemple développé une approche basée sur la chimie bio-orthogonale pour détecter de potentielles cibles protéiques d'une molécule à activité antipaludique en étude clinique, l'albitiazolium **102**. Des dérivés bifonctionnels de ce dernier (**103**), à la fois photoactivables (grâce à une fonction azoture en position aromatique) et « clickables » (grâce à une fonction azoture en position benzylique), ont été synthétisés puis incubés avec des cellules de *Plasmodium* libres (Figure 93). Ces derniers ont été obtenus par un traitement à la saponine de globules rouges infectés.

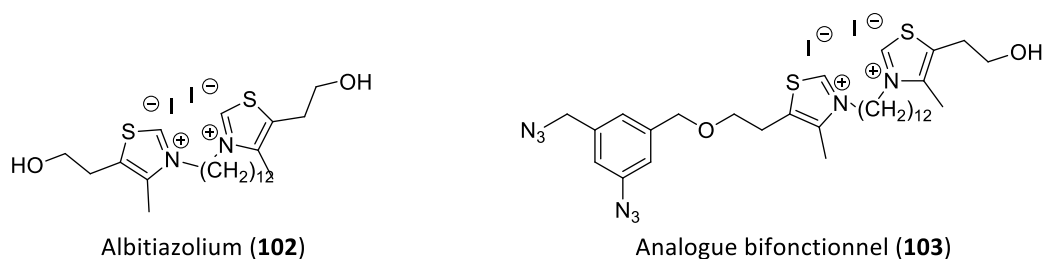


Figure 93 : Structures de l'albitiazolium et d'un analogue photoactivable¹⁰⁸

Les parasites ont alors été irradiés à 254 nm, lysés puis placés sur une résine d'agarose commerciale greffée de fonctions alcynes (Figure 94). La réaction CuAAC est alors réalisée sur une nuit, les protéines éventuellement en interactions avec l'albitiazolium modifié sont alors analysées par chromatographie LC-MS/MS.

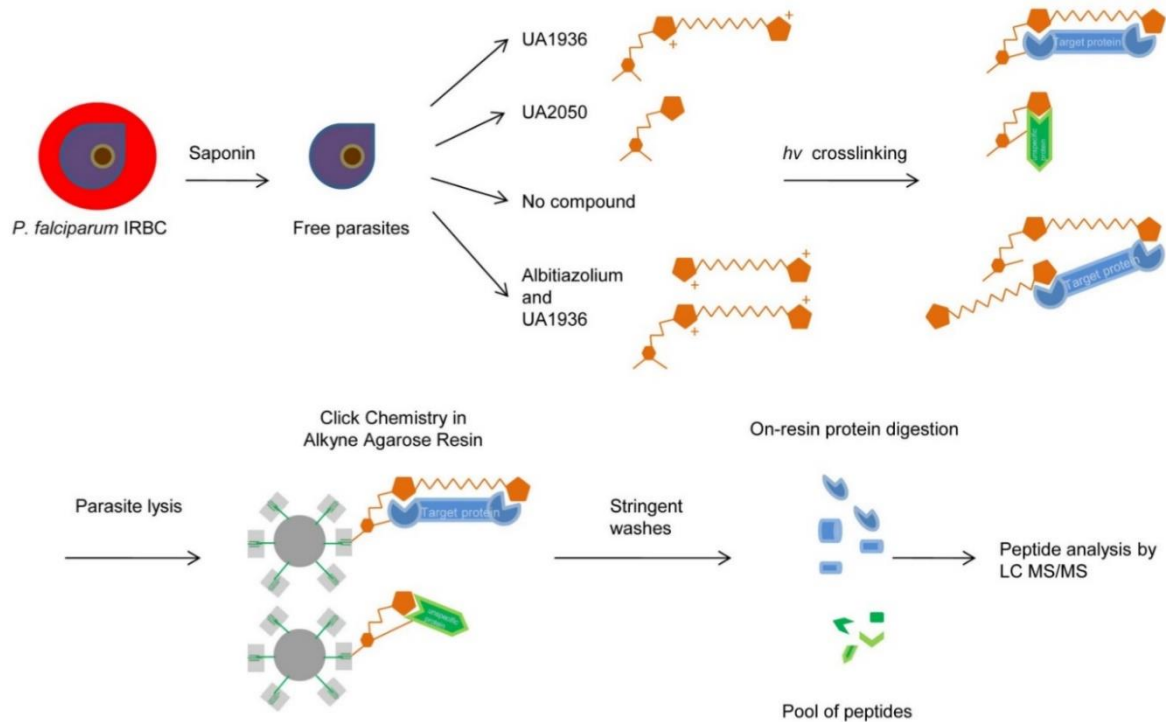


Figure 94 : Procédure pour la détection dans des cellules de *Plasmodium* libres de protéines en interaction avec une molécule d'intérêt modifiée grâce à la chimie bio-orthogonale¹⁰⁸

Plus récemment,¹⁰⁹ l'équipe de Ward a développé des dérivés comportant des fonctions azotures (pour une détection par SPAAC) ou alcynes (pour une détection par CuAAC) en incorporant le motif endoperoxyde de l'artémisinine dans le but d'identifier les cibles moléculaires de cet agent antipaludique (Figure 95). Contrairement à précédemment, la réaction de chimie « click » est réalisée *in situ* avec des partenaires biotinylés (possédant une fonction dibenzocyclooctyne ou azoture) sur des cellules de *Plasmodium* au stade asexué intraérythrocytaire. Les protéines éventuellement en interaction avec le motif endoperoxyde sont alors isolées par une purification par affinité et identifiées par LC-MS/MS.

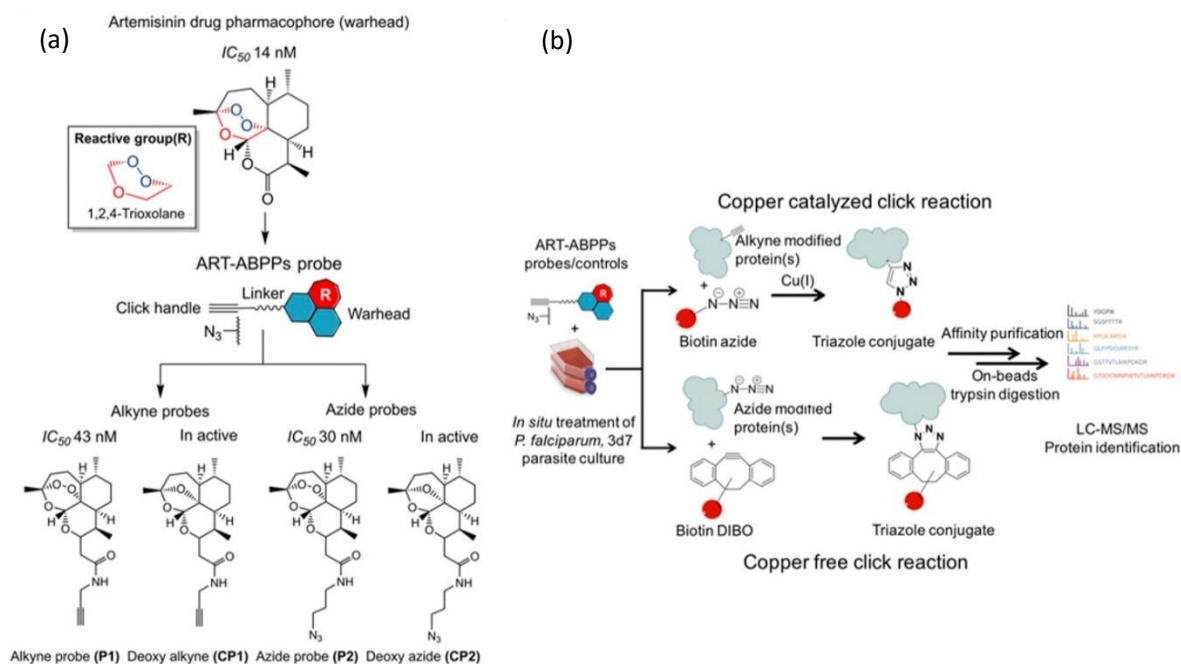


Figure 95 : (a) Structures des analogues bio-orthogonaux de l'artémisine et (b) procédure générale pour la détection, dans des cellules de *Plasmodium*, de protéines en interaction avec le motif mimant l'artémisine par détections CuAAC et SPAAC¹⁰⁹

En revanche, aucun exemple n'est décrit pour un marquage bio-orthogonal sur les formes sanguines de *Trypanosoma brucei*. Pour valider les propriétés bio-orthogonale de nos sondes, nous avons choisi de travailler sur ces parasites, sur l'espèce responsable de la maladie du sommeil chez le bétail (*T. brucei brucei*), sans danger pour l'homme. Nous avons choisi d'utiliser la sonde qui possède le plus de caractéristiques en accord avec notre projet : le céto-TMDIBO **83**. Pour le second partenaire de la SPAAC, notre choix s'est porté sur un azoture fluorescent, l'azoture de tétraméthylaminorhodamine **104** ou TAMRA-N₃. Cet azoture fluorescent nous a permis de vérifier au préalable par microscopie de fluorescence que lui-même entre bien dans la cellule, mais ne semble pas rester après lavages.

Dans un premier temps, nous avons tenu à vérifier que la SPAAC fonctionnait correctement et avec une cinétique adaptée à notre projet (Figure 96). Comme pour les précédentes réactions de chimie « click », celle-ci a été réalisée dans le méthanol à température ambiante et à l'abri de la lumière, sur de très faibles quantités (0,45 μ mol). Le suivi de la réaction a été réalisé par LC-MS et a permis de constater une conversion totale après 2 h 40 de réaction. Les deux triazoles **105** ont été formés mais non isolés, sous la forme d'un mélange 4:1 et ils possèdent les mêmes propriétés de fluorescence que le composé **104**.

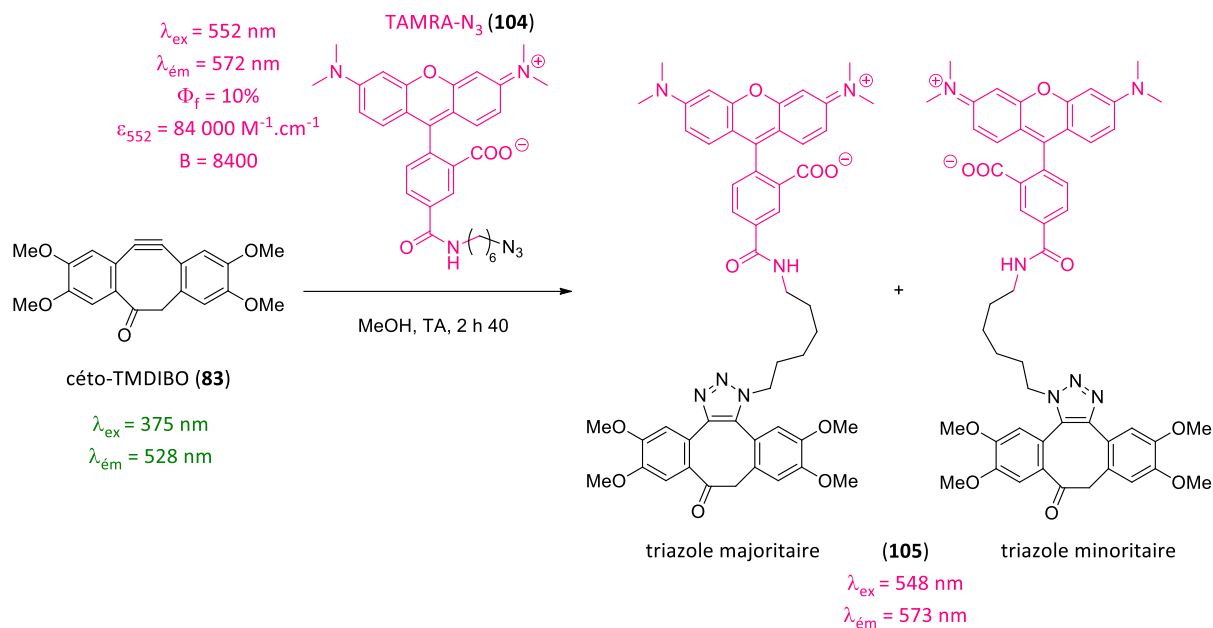


Figure 96 : Réaction de la SPAAC entre le céto-TMDIBO et l'azoture de TAMRA

I – Méthodes de détection

De manière à pouvoir détecter et analyser les adduits potentiellement formés en milieu biologique, nous avons réfléchi à deux techniques de détection basées sur la HPLC : une méthode d'analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) et une méthode couplée à un spectrofluoromètre (UHPLC-Fluo). Ces techniques sensibles permettraient dans le cas de la LC-MS/MS la détection spécifique des fragments « fils » issus des espèces ioniques des molécules « parents » impliquées dans la réaction, et la détection spécifique d'espèces fluorescentes dans le cas de la UHPLC-Fluo. Ces expériences ont été réalisées dans le service HPLC avec l'aide de Nathalie Hue (pour la LC-MS/MS) et Franck Pélissier (pour la UHPLC-Fluo).

Une gamme de chaque molécule impliquée dans la réaction (céto-TMDIBO **83**, TAMRA-N₃ **104** et le mélange de triazoles **105**) a été réalisée à différentes concentrations pour pouvoir déterminer le seuil de détection de chacune des techniques par des courbes de calibration, en vue d'une quantification. Les résultats obtenus pour les deux techniques sont similaires : 10⁻³ μM pour le composé **83** et 10⁻⁴ μM pour les composés **104** et **105**. Ces deux techniques sont donc très sensibles et permettent de séparer chacun des composés. Toutefois, notre choix s'est porté sur la LC-MS/MS car elle permet d'avoir un signal plus important pour le composé **83**.

II – Réaction de chimie « click » *in cellulo*

Les expériences de chimie « click » *in cellulo* ont été réalisées au MNHN par le Pr. Philippe Grellier, les traitements et extractions des cellules de parasites ont été effectués au sein de notre laboratoire et les analyses ont été réalisées dans le service HPLC.

Le but de l'expérience est de vérifier que la réaction SPAAC a bien lieu en milieu biologique et au niveau intracellulaire.

II.1. Incubation initiale de l'azoture

Pour cela, nous avons commencé par incuber le partenaire azoture **104** avec les trypanosomes vivants, à l'abri de la lumière et pendant une heure (Figure 97). Après élimination du TAMRA-N₃ **104** extracellulaire par des lavages au milieu de culture, la sonde **83** a été incubée pendant un temps variable, de manière à estimer le temps nécessaire à la réalisation de la réaction. Nous avons choisi de travailler en condition équimolaire avec une concentration en réactifs de 10 μM, compromis entre la saturation du signal du composé **104** et la détection du composé **83**. En parallèle, des témoins correspondant à l'incubation avec les parasites, soit avec le composé **83**, soit avec le composé **104**, ont été préparés.

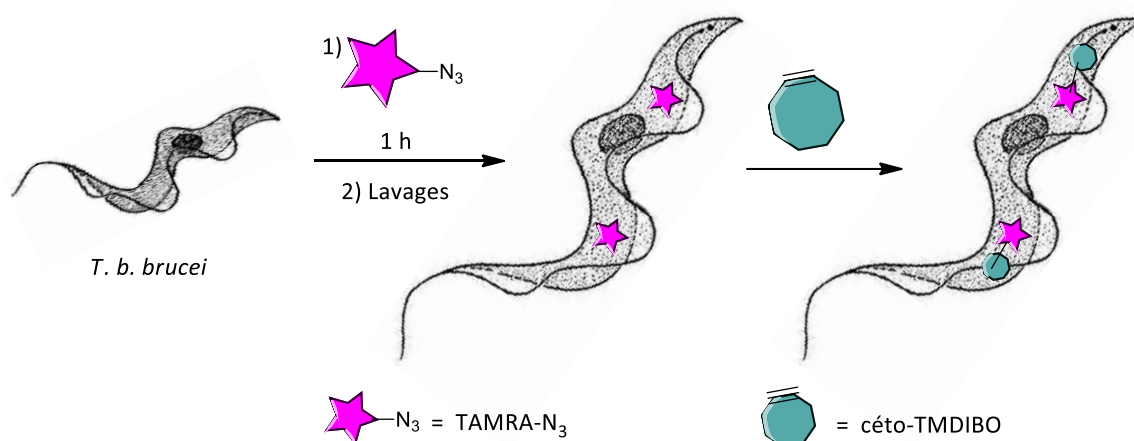


Figure 97 : Schématisation du procédé de chimie « click » *in cellulo* appliqué pour la réaction entre le TAMRA-N₃ et le céto-TMDIBO sur des trypanosomes vivants

Pour chaque expérience, des échantillons ont été prélevés à différents temps d'incubation (2 h et 6 h), lavés au PBS (tampon phosphate saturé en sels) et centrifugés. Les culots obtenus ont ensuite été extraits avec un mélange de méthanol et d'acétate d'éthyle (1:4, v/v), puis repris dans le méthanol avant d'être analysés en LC-MS/MS. Les concentrations en produits ont été estimées à partir d'échantillons témoins des composés **83**, **104** et **105** préparés à une concentration connue. Il est nécessaire de préciser que les aires des chromatogrammes présentés ci-dessous sont reliées à la capacité d'ionisation des composés **83**, **104** et **105**.

Pour les échantillons correspondant à 2 h d'incubation, les chromatogrammes obtenus ne présentent pas de pic correspondant au composé **104** et les pics des deux triazoles **105** sont présents. Cela signifie que la SPAAC est bien réalisable en condition biologique (Figure 98).

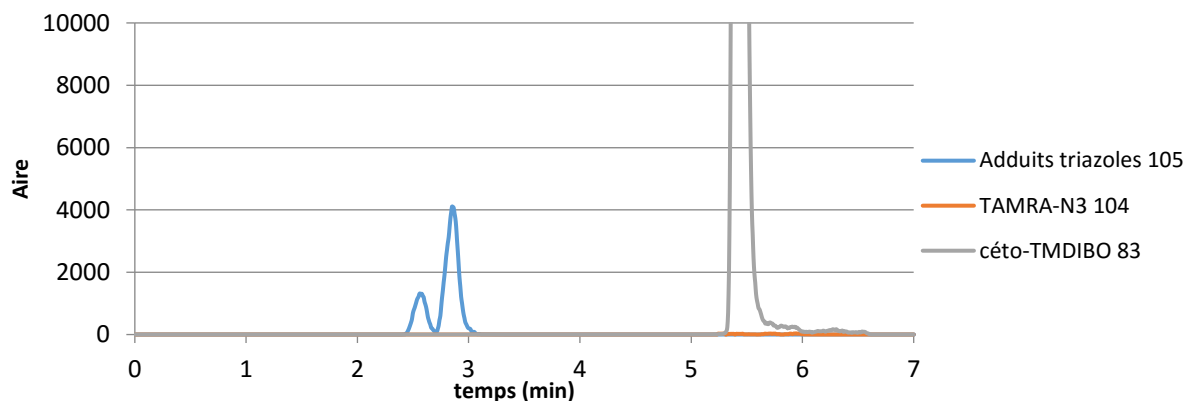


Figure 98 : Chromatogrammes obtenus par LC-MS/MS après 2 h d'incubation dans les parasites

Toutefois, la quantité de composé **105** est faible et proche de la limite du seuil de détection, et une importante quantité de composé **83** est détectée, ce qui signifie que les deux réactifs de départ n'étaient pas en condition équimolaire lors de l'ajout du cyclooctyne, probablement à cause d'une importante proportion de TAMRA-N₃ éliminée au cours des lavages. Ceci a été vérifié avec les témoins où la quantité de composé **104** semble être très inférieure à celle du composé **83**. Ces résultats rejoignent les observations préliminaires en microscopie de fluorescence, signifiant que cette molécule ne présente pas d'affinité particulière pour le parasite, contrairement au céto-TMDIBO **83**.

L'analyse des échantillons correspondant à 6 h d'incubation apporte une information supplémentaire : la réaction de chimie « click » étant vraisemblablement terminée après 2 h d'incubation, ces échantillons informent sur la capacité des produits présents à rester dans la cellule du parasite avec le temps. On observe globalement la diminution des intensités, confirmée pour les échantillons témoins. Cependant, celle-ci est plus significative pour les adduits triazoles **105** (Figure 99) et l'azoture **104** (Figure 100), indiquant que ces composés ont tendance à sortir de la cellule. En comparaison, au bout du même temps d'incubation, la diminution de l'intensité du signal correspondant au composé **83** est moins marquée (Figure 101).

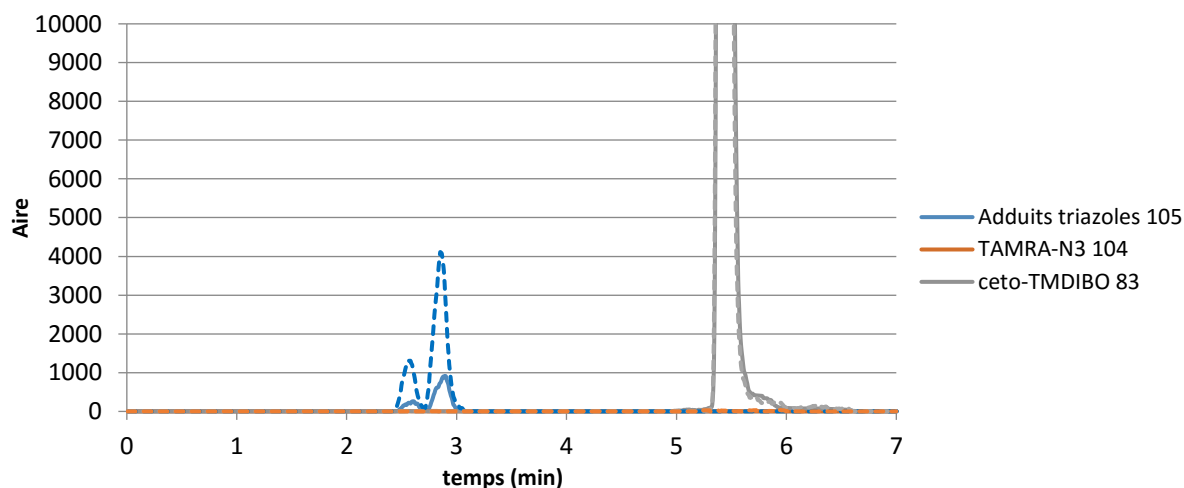


Figure 99 : Chromatogrammes obtenus par LC-MS/MS après 6 h d'incubation avec les parasites (en pointillés : après 2 h d'incubation)

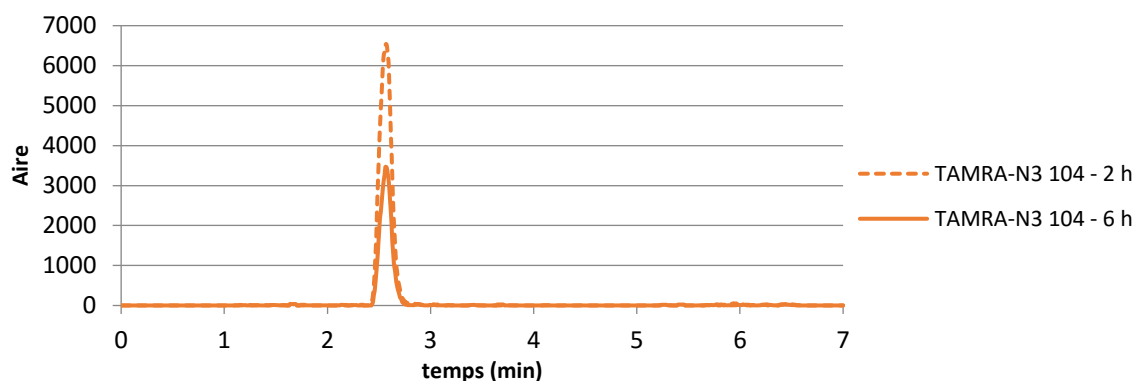


Figure 100 : Chromatogramme obtenu par LC-MS/MS pour le témoin TAMRA-N₃

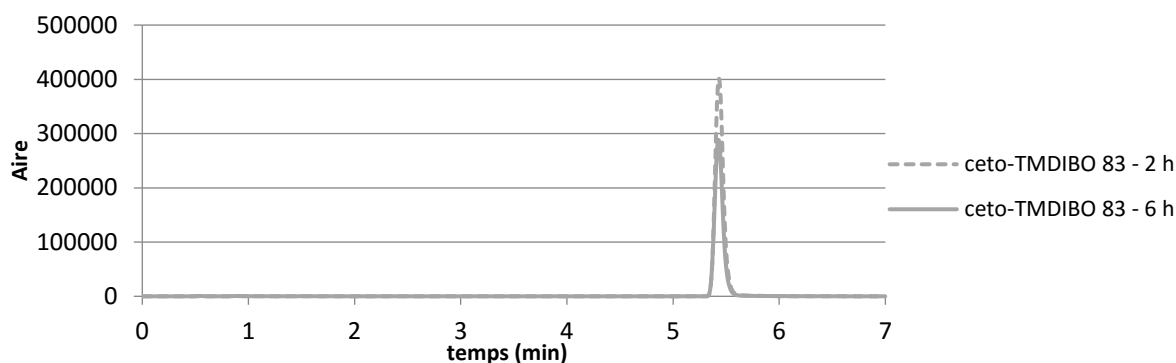


Figure 101 : Chromatogramme obtenu par LC-MS/MS pour le témoin ceto-TMDIBO

Ce protocole a permis de mettre en évidence que la réaction SPAAC était possible en milieu biologique. Toutefois, la mobilité importante du partenaire azoture **104** ne permet pas d'affirmer que les triazoles **105** détectés ont été synthétisés uniquement à l'intérieur du parasite.

II.2. Incubation initiale du cyclooctyne

Pour prouver avec certitude que la réaction de chimie « click » a lieu au niveau intracellulaire et pour également améliorer l'intensité du signal en s'éloignant des seuils de détection, nous avons réalisé le protocole en inversant l'ordre d'incubation des réactifs. De façon similaire à précédemment, le ceto-TMDIBO **83** a été incubé en premier à une concentration de 10 μ M, suivi du TAMRA-N₃ **104** en condition équimolaire. Des échantillons ont été prélevés au bout de 2 h d'incubation, temps déterminé à l'issue des résultats précédents au bout duquel la conversion est totale. Des échantillons témoins ont également été préparés en incubant les trypanosomes soit avec le composé **83**, soit avec le composé **104**.

Contrairement à l'expérience précédente, les fractions aqueuses des lavages au PBS de chaque échantillon ont été conservées, de manière à estimer les pertes en produits **83**, **104** et **105**, mais aussi le nombre d'extraction suffisant. Dans un premier temps, les échantillons de lavages ont été extraits de la même manière que précédemment (mélange méthanol/acétate d'éthyle), mais les résultats ne furent pas reproductibles, en raison de pertes aléatoires probables lors de l'évaporation des échantillons (à l'évaporateur rotatif). Le protocole d'extraction a donc été optimisé en utilisant un appareil d'évaporation sous vide de type centrifugeuse ou Génévac (occasionnant moins de pertes lors de l'évaporation de l'acétate d'éthyle).

On a ainsi estimé à quatre le nombre d'extractions nécessaires pour obtenir un maximum de produits, en observant la quantité extraite par lavage en HPLC. Les résultats obtenus pour les échantillons de lavage correspondant au marquage par chimie « click » sont présentés sous la forme des histogrammes ci-dessous (Figure 102) :

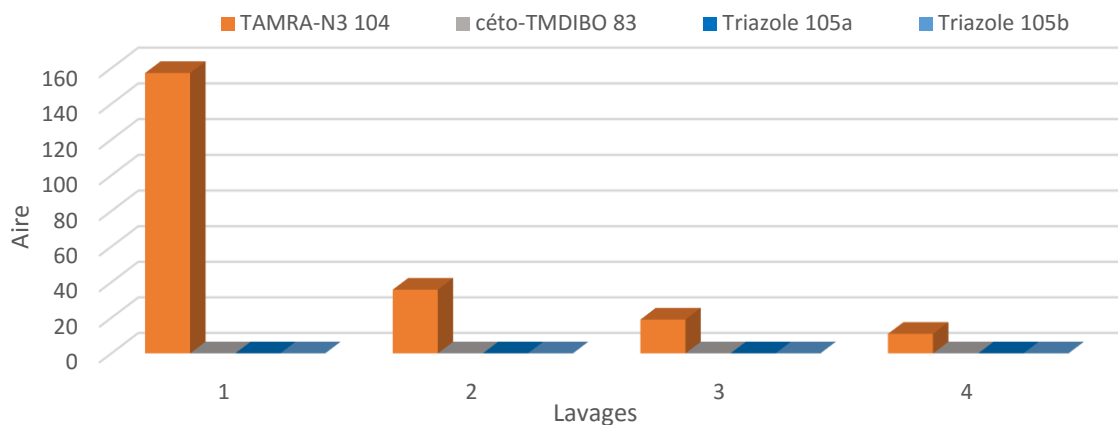


Figure 102 : Proportions en composés 83, 104 et 105 détectées par LC-MS/MS dans les lavages après 2 h d'incubation

Comme cela était suspecté, une importante proportion en composé **104** est présente dans les lavages, et surtout dans le premier. Les composés **83** et **105** ne sont pas détectés.

Le protocole d'extraction des culots a ainsi été optimisé en extrayant quatre fois au méthanol et en utilisant une centrifugeuse, permettant de bien séparer les débris cellulaires du surnageant. Ce nouveau procédé ne nécessite pas d'évaporation, et les surnageants rassemblés peuvent être directement analysés en LC-MS/MS.

Contrairement au premier protocole d'incubation, après deux heures, les pics de chaque réactif sont détectés, signifiant que la conversion n'est pas totale (Figure 103).

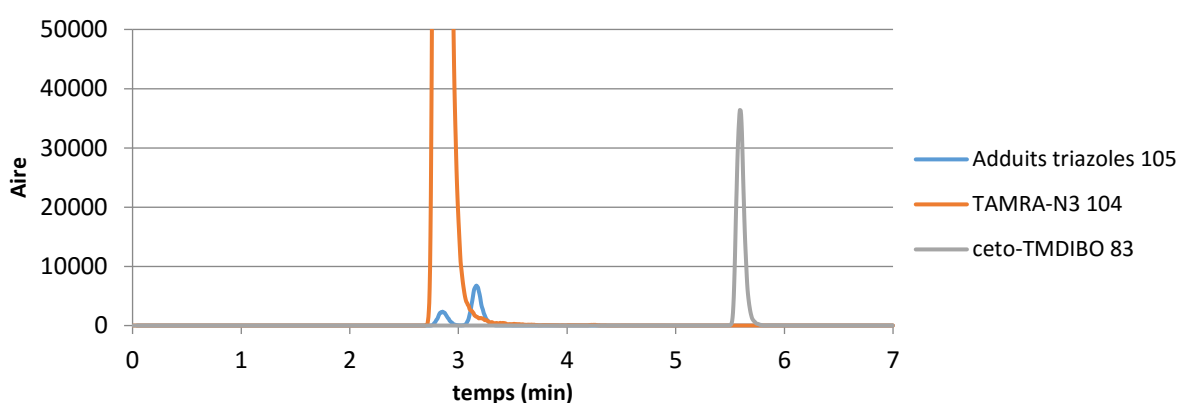


Figure 103 : Chromatogramme obtenu par LC-MS/MS après 2 h d'incubation

Ceci peut s'expliquer par le fait que cette fois-ci, aucun des réactifs n'était en excès après le lavage intermédiaire au milieu de culture. Le ceto-TMDIBO **83** étant plus affiné pour le parasite que le TAMRA-N₃ **104**, sa proportion intracellulaire varie peu au cours des lavages. Ainsi, lors de l'ajout de l'azoture, il n'y a pas une différence importante de concentration et l'équilibre de la réaction n'est pas poussé vers la formation des triazoles **105**, comme précédemment. De plus, le ceto-TMDIBO **83** a une localisation

intracellulaire alors que le TAMRA-N₃ **104**, moins affin de la cellule et plus mobile, entre et sort de la cellule, diminuant ainsi la probabilité de rencontre. Un autre paramètre participant à la faible conversion est la cinétique de réaction des cyclooctynes qui n'est pas significativement rapide par rapport à d'autres réactions bio-orthogonales.

Malgré ces conditions peu favorables, la SPAAC a eu lieu et en quantité détectable par LC-MS/MS. De plus, les conditions de ce protocole démontrent que la détection de fonctions azotures par le céto-TMDIBO **83** a été réalisée au niveau intracellulaire et est possible en condition diluée et équimolaire. La quantification de cette réaction s'avère cependant difficile en raison de la forte dynamique du TAMRA-N₃ **104** ainsi que des adduits triazoles **105** dont la concentration intracellulaire est trop variable.

Conclusion

L'utilisation de la voie de synthèse de Leeper du TMDIBO **33** a abouti à la synthèse de quatre nouvelles sondes fluorescentes, dérivés du céto-DIBO **34**. Cependant, cette synthèse s'est révélée difficile, peu reproductible et a conduit à des produits faiblement solubles. L'étape particulièrement limitante est l'obtention de la fonction alcyne intracyclique, fonction clé pour la détection de molécules actives par voie bio-orthogonale.

Globalement, les propriétés de fluorescence des nouveaux dérivés ont été améliorées par l'ajout de nouveaux substituants mais restent à optimiser : en effet, la longueur d'onde d'excitation reste proche de l'UV et les rendements quantiques de fluorescence obtenus sont inférieurs au composé parent.

Ces composés sont réactifs vis-à-vis de la réaction SPAAC (à l'exception de la série dinaphtyle) et la vitesse de réaction du céto-FMDIBO **85** a été augmentée 13 fois, et ce composé se situe parmi les cyclooctynes les plus réactifs. Les triazoles obtenus ne sont pas fluorescents, mais permettent de différencier le signal de la sonde libre et de la sonde liée avec une détection « on-off ».

Par ailleurs, il a été vérifié que ces composés entrent bien dans les cellules des parasites que nous étudions et ne marquent que leur cytosol, mais leur faible solubilité en milieu aqueux reste importante. Nous avons cependant pu démontrer que ces sondes étaient capables de réagir et de détecter *in cellulo* de petites molécules ayant une fonction azoture.

A ce stade, de nombreux points du cahier des charges ont déjà été consolidés, mais pour améliorer et aller plus loin nous tenons à avoir des sondes de type « on-on' ».

Synthèse de
dibenzocyclooctynes
fluorescents par
photochimie : sondes
de 2^{ème} génération

de 2^{ème} génération
fluorescentes

Chapitre I : Etudes de modélisation

Au vu des précédents résultats encourageants, nous avons cherché à comprendre pourquoi les sondes que nous avons synthétisées ne donnaient pas de triazoles fluorescents. Ceci avait été observé pour le composé parent, le céto-DIBO **34**, dans les travaux de Boons *et al.*⁵⁴ Celui-ci avait supposé que l'extinction de la fluorescence était due au groupement triazole. Nous nous sommes également intéressés à de potentiels dérivés pour lesquels ce phénomène pourrait être inversé.

Pour cela, nous nous sommes appuyés sur des calculs de modélisation moléculaire réalisés par le Dr. Gilles Clavier au PPSM de l'ENS Cachan.

I – Etude du céto-DIBO et de ses adduits synthétisés

La synthèse de dérivés du céto-DIBO **34** a abouti pour chaque essai à une dibenzocyclooctynone fluorescente. Cependant, pour chaque composé, la fluorescence n'est pas conservée après une réaction SPAAC avec l'azoture de benzyle ou l'azoture d'arylthiophène polysubstitué. Pour expliquer cette modulation de la fluorescence, des études de modélisation moléculaire sur le composé parent ont été réalisées et pourront être extrapolés à ces dérivés.

I.1. Résultats pour le céto-DIBO

Les calculs sur le céto-DIBO **34** ont révélé qu'au cours de l'excitation, l'absorption d'un photon engendre le déplacement d'un électron d'une orbitale HOMO à une orbitale LUMO par une transition de type $\pi \rightarrow \pi^*$. L'espèce se retrouve à un état excité S_1 dont le niveau en énergie est éloigné de l'état excité triplet T_1 qui peut conduire à un retour à l'état fondamental sans émission de photon ($\Delta_{(S_1-T_1)} = 0,85$ eV). La désexcitation de l'espèce excitée du céto-DIBO **34** semble donc se produire de manière similaire à l'excitation (*via* une transition $\pi \rightarrow \pi^*$), sans inversion de spin et de manière radiative (Figure 104).

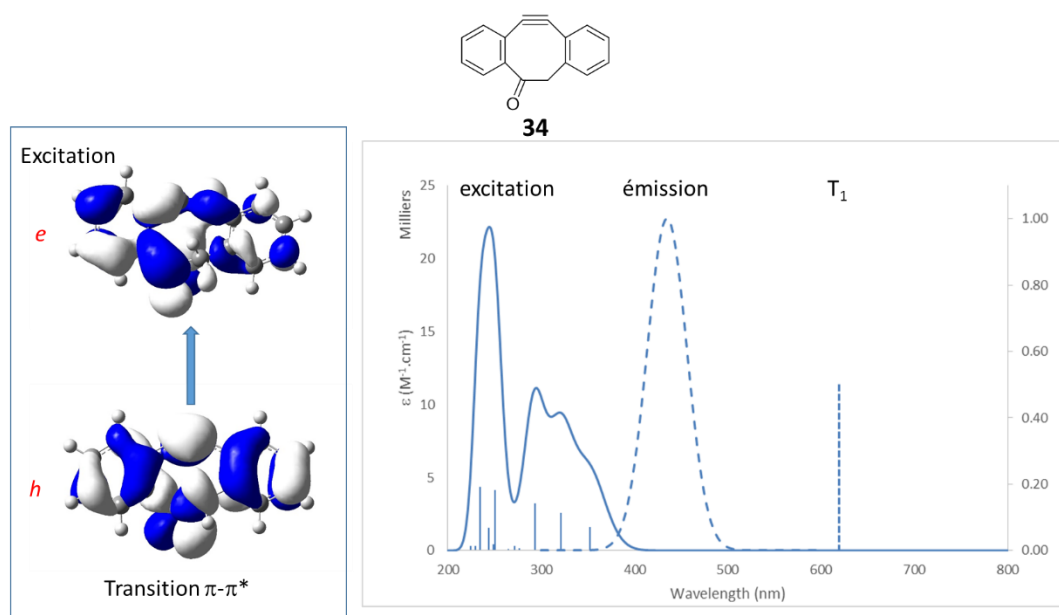


Figure 104 : Calcul de modélisation pour le céto-DIBO

Les calculs pour les produits triazoles issus de la réaction de cyclisation entre le céto-DIBO et l'azoture de benzyle d'une part (**44**), et entre le céto-DIBO et l'azoture d'arylthiophène polysubstitué d'autre part (**106**), ont montré que l'écart énergétique à l'état excité entre les états singulet et triplet était différent. En effet, il est beaucoup moins important ($\Delta_{(S1-T1)} = 0,48$ eV pour le composé **44** et 0,03 eV pour le composé **106**) impliquant que l'état triplet est suffisamment proche pour devenir une voie de relaxation compétitive. Dans les deux situations, les triazoles à l'état excité se relaxeraient donc en passant par cet état triplet d'énergie plus stable et reviendraient à l'état fondamental de manière non radiative.

Contrairement au céto-DIBO, pour le composé **44** la transition à la suite de l'excitation est de nature $n \rightarrow \pi^*$ du doublet non-liant de la cétone vers le motif phényle (Figure 105). D'après ces calculs, le motif triazole n'intervient pas dans l'extinction de la fluorescence.

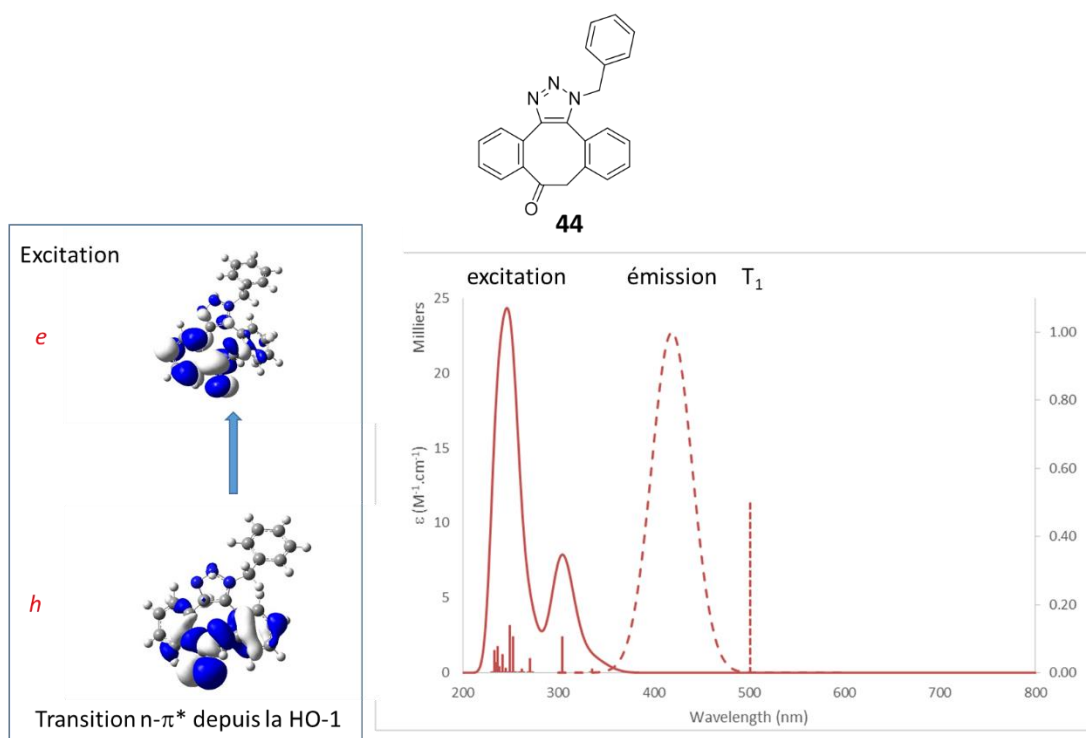


Figure 105 : Calculs de modélisation pour l'adduit triazole de benzyle du céto-DIBO

En revanche, pour le composé **106** la nature de la transition est très différente car il s'agit d'une transition de type transfert de charge intramoléculaire (Figure 106). En effet, la densité électronique est localisée sur des zones très différentes de la molécule à l'état fondamental et à l'état excité. Au cours de l'excitation, cette densité est transférée du motif dibenzocyclooctynone vers la fonction thiophène. Cette dernière est généralement un groupement électrodonneur, mais les substituants présents (groupement nitrile et ester) appauvrissent considérablement en électrons le noyau thiophène, ce qui participe au transfert de charge. Après l'excitation, la molécule se retrouve à un état localement excité (LE) peu stable, puis passe à un état excité plus bas en énergie après la torsion du thiophène (de manière quasi-perpendiculaire par rapport au triazole). Ce type de transition peut donner lieu à de la fluorescence, mais la présence à l'état excité d'un état triplet très proche en énergie favorise les relaxations non radiatives.

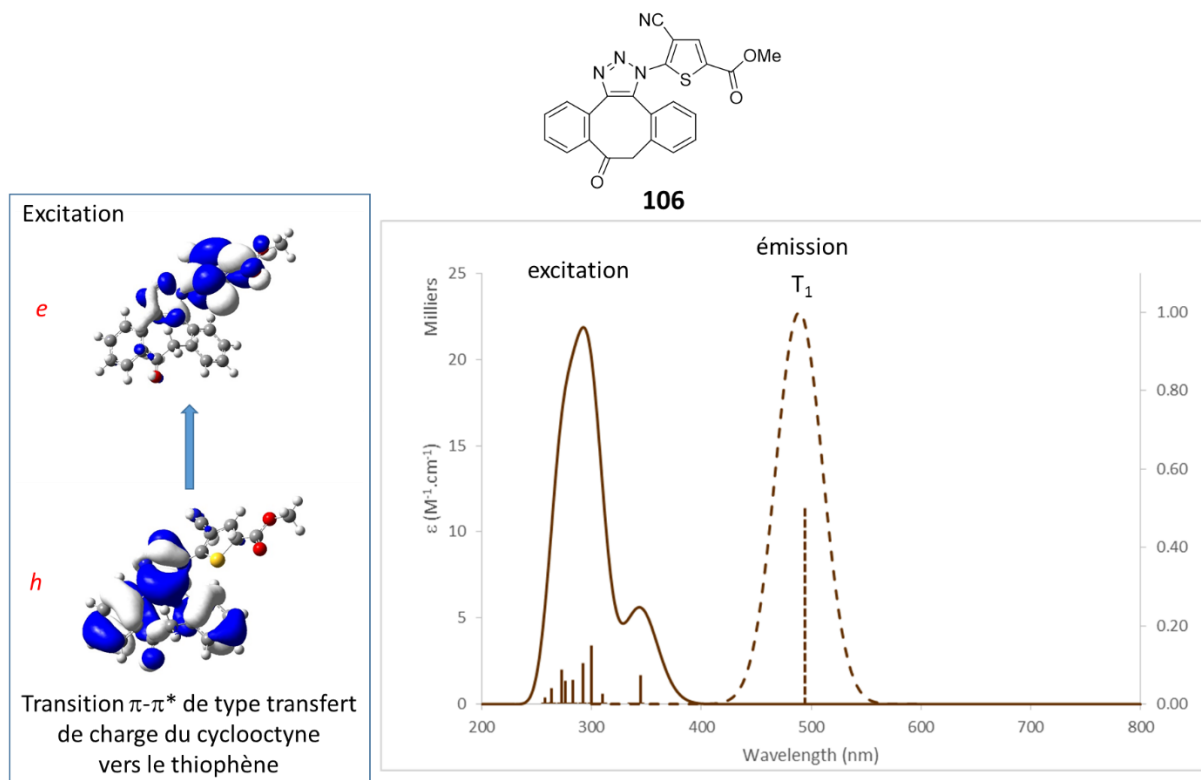


Figure 106 : Calculs de modélisation pour l'adduit triazole d'arylthiophène du céto-DIBO

I.2. Cas particulier du DINO

La particularité de la série dinaphtyle est un intermédiaire réactionnel fluorescent : le DINO **93**. Celui-ci est la version réduite du céto-DINO **84** et comme cela a été relaté, cette différence confère des propriétés différentes à ces deux molécules, que cela soit en termes de propriétés photophysiques, cinétiques ou de photo-toxicité. Nous nous sommes donc brièvement intéressés à l'étude par modélisation moléculaire de ces deux composés.

Les calculs de l'écart énergétique entre les niveaux excités S₁ et T₁ ont abouti à des valeurs plus grandes que pour le céto-DIBO **34** : $\Delta_{(S_1-T_1)} = 1,37$ eV pour le composé **93** et 0,94 eV pour le composé **84** (Figure 107). Ces écarts importants sont en faveur de processus radiatifs, d'autant plus que pour les deux situations la transition impliquée serait de type $\pi \rightarrow \pi^*$.

La seule différence majeure est l'écart énergétique entre les orbitales HOMO et LUMO, amoindri dans le cas du composé **84**. En effet, l'introduction d'un groupement électroattracteur, comme une fonction cétone, abaisse fortement le niveau d'énergie de la LUMO (celui de la HOMO diminuant dans une moindre mesure). Ceci a pour conséquence le décalage vers le proche infrarouge des spectres d'absorption et d'émission et pourrait expliquer les différences photophysiques entre le DINO et le céto-DINO.

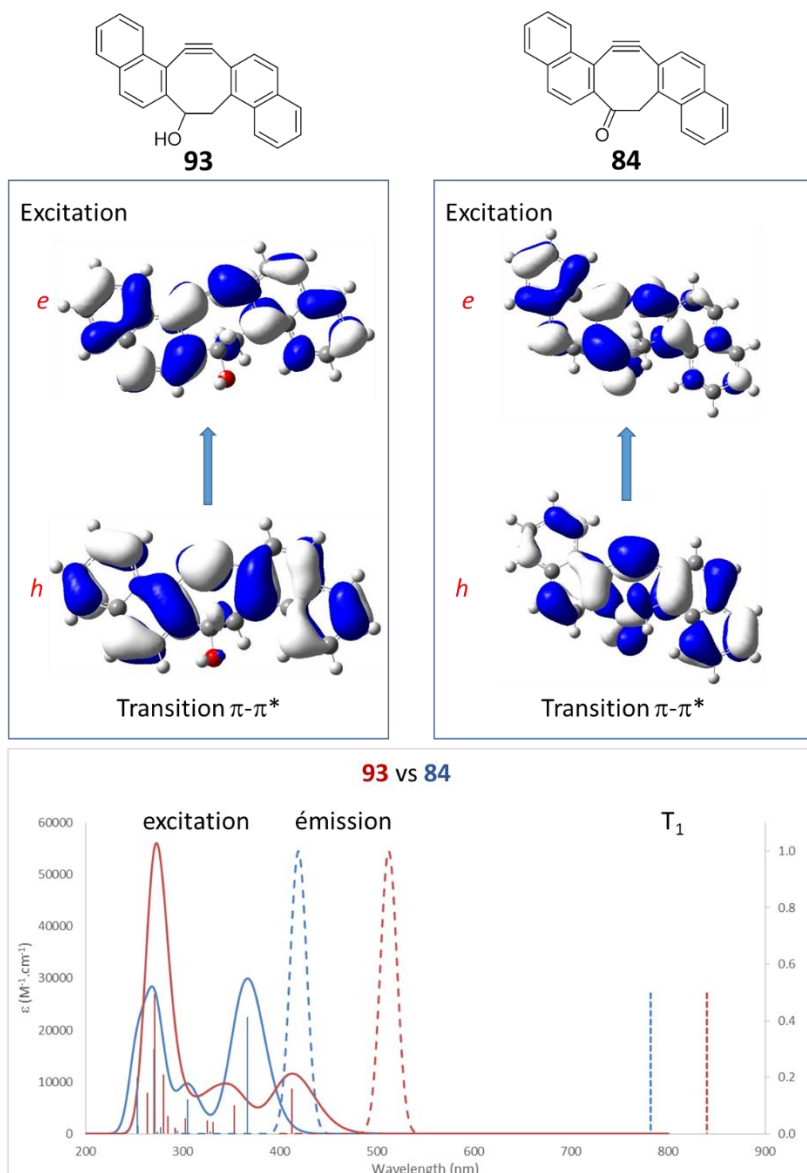


Figure 107 : Calculs de modélisation pour le DINO et le céto-DINO

II – Calculs de prévision : vers des adduits fluorescents

Pour parvenir à obtenir des cyclooctynes aboutissant à des adduits fluorescents à la suite d'une réaction de chimie « click », nous avons souhaité étudier grâce à la modélisation moléculaire quelles modifications pourraient favoriser de tels résultats.

II.1. Influence des substituants sur le triazole

II.1.1. Groupements électroattracteurs

Nous nous sommes intéressés à l'effet de groupements électroattracteurs (Figure 108) sur les propriétés photophysiques des adduits triazoles. Des calculs de modélisation ont ainsi été réalisés sur des dérivés substitués par des groupements nitro (**107**).

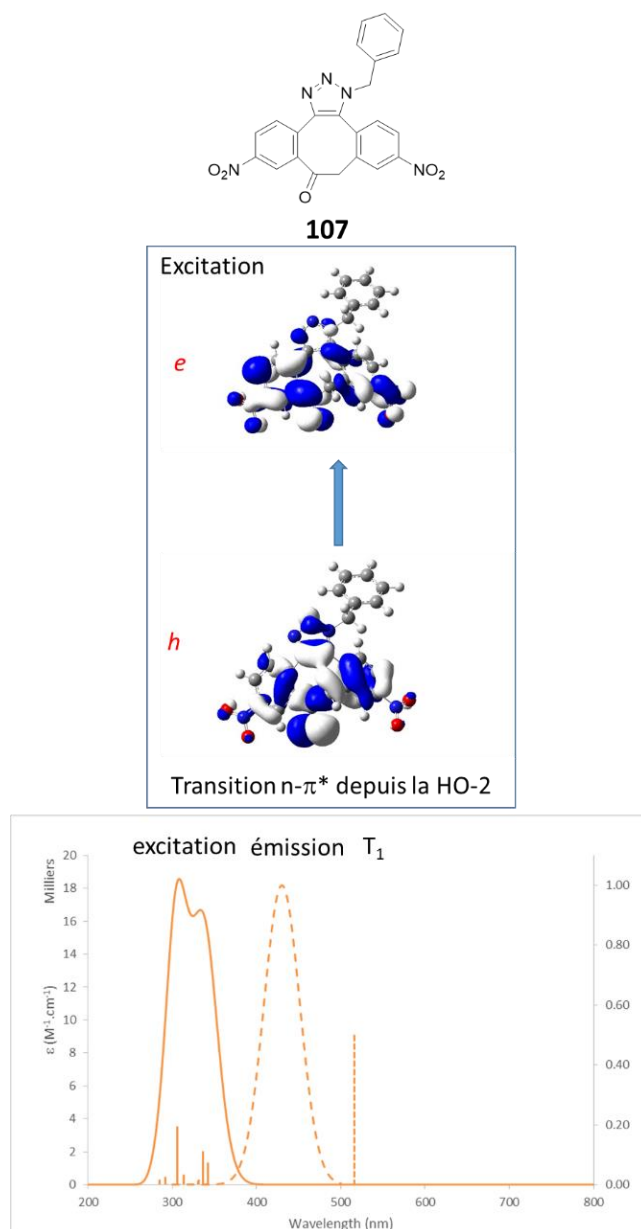


Figure 108 : Calculs prévisionnels de modélisation pour les adduits triazoles de benzyle du composé **107**

La présence de groupements nitro implique une transition de type $n \rightarrow \pi^*$ du doublet non-liant de la cétone vers le motif phényle, comme ce qui a été observé pour le composé **44** (Figure 100). L'écart calculé entre les états excités singulet et triplet est similaire ($\Delta_{(S_1-T_1)} = 0,48$ eV pour le composé **107**).

II.1.2. Groupements électrodonneurs

La présence de groupements électrodonneurs, comme des fonctions méthoxy, diméthylamine ou acétamide, sur l'adduit triazole a été étudiée (Figure 109).

Dans les trois situations, les calculs indiquent que pour les adduits triazoles de benzyle **108**, **109** et **110**, la transition suite à l'excitation des molécules semble être de nature $\pi \rightarrow \pi^*$, contrairement au triazole **44**, et n'induit pas de différence majeure entre les états fondamental et excité.

Les calculs indiquent également que l'état excité triplet semble assez bas en énergie, entraînant un écart entre les états excités singulet et triplet grand : $\Delta_{(S_1-T_1)} = 0,82$ eV pour le composé **108**, 0,75 eV pour le composé **109** et 0,85 eV pour le composé **110**. Ces valeurs sont proches de celle obtenue pour le composé **34**, signifiant qu'une possible conservation de la fluorescence est envisageable pour les triazoles de benzyle de ces trois dérivés car les processus radiatifs seraient privilégiés.

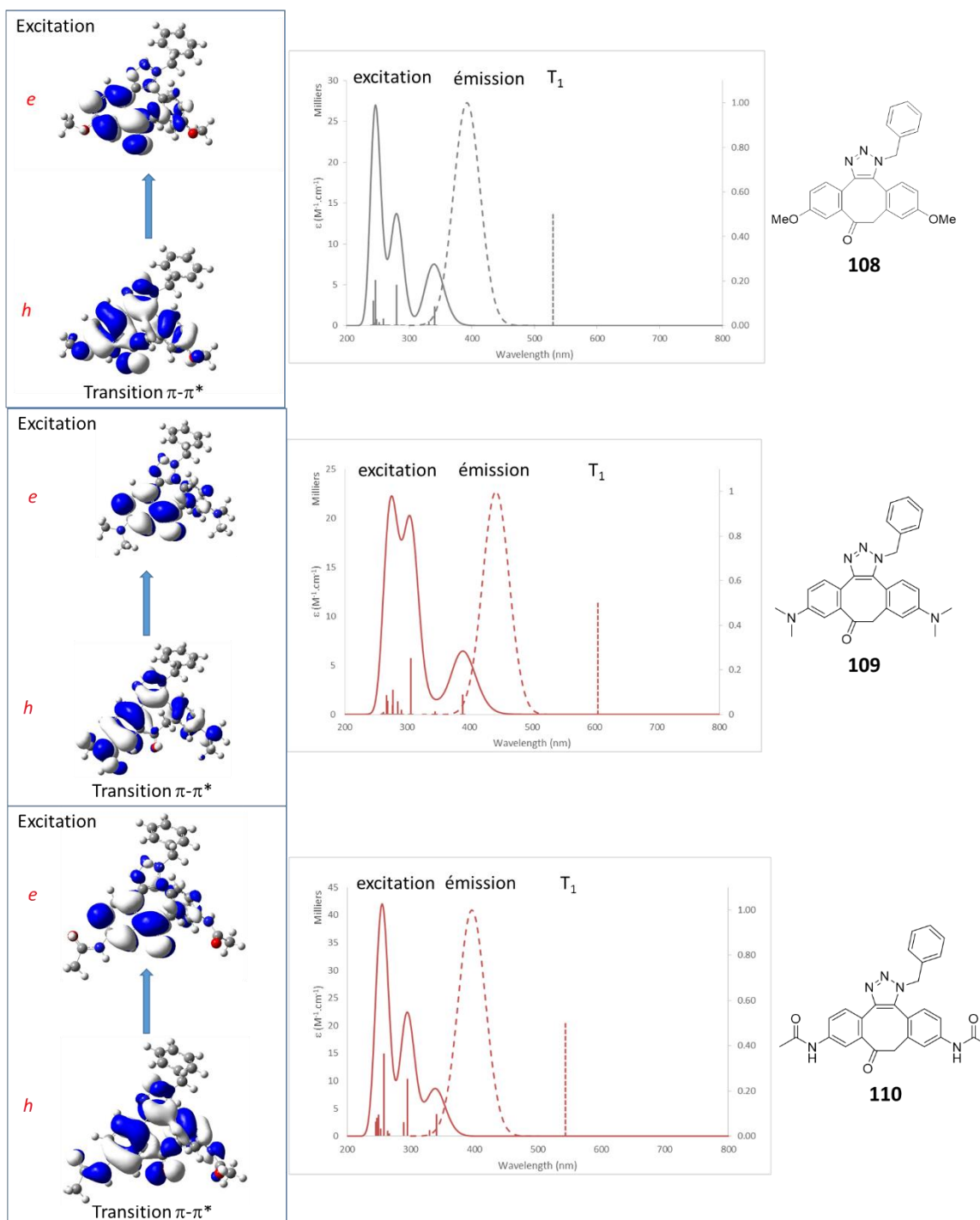


Figure 109 : Calculs prévisionnels pour les adduits triazoles de benzyle des composés **108**, **109** et **110**

II.2. Résultats sur les dipolarophiles 3,8-disubstitués

Les résultats des calculs de modélisation obtenus sur les adduits triazoles nous ont amenés à étudier l'influence d'éventuelles modifications sur le dipolarophile, et plus précisément l'influence de la nature des substituants en positions 3 et 8 du motif dibenzocyclooctyne, pouvant permettre d'obtenir des adduits fluorescents (Figure 110) : la diméthoxydibenzocyclooctynone **111** (céto-DMDIBO), la tétraméthylaminodibenzocyclooctynone **112** (céto-TADIBO) et la diacétamidodibenzocyclooctynone **113** (céto-AcADIBO).

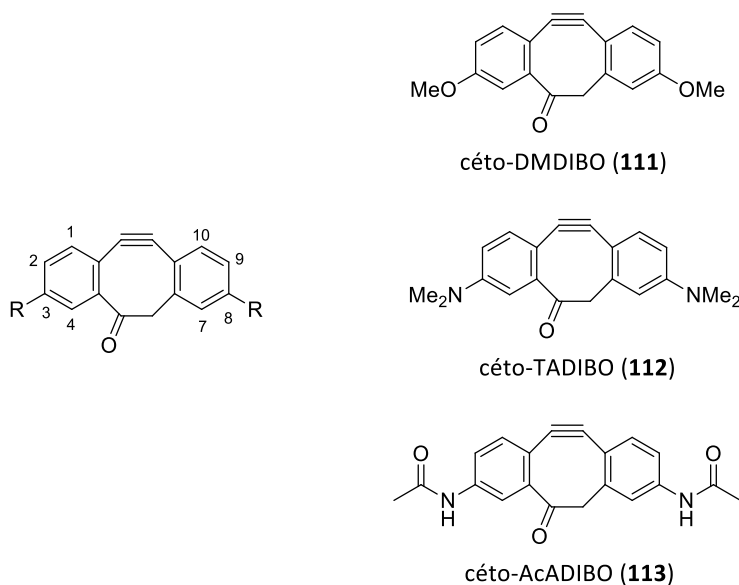


Figure 110 : Dibenzocyclooctynones-3,8-disubstituées

Dans les trois situations, les calculs indiquent que les cyclooctynes sont potentiellement fluorescents car les écarts énergétiques entre S_1 et T_1 sont grands ($\Delta_{(S_1-T_1)} = 0,74$ eV pour le composé **111**, 0,63 eV pour le composé **112** et 0,80 eV pour le composé **113**) (Figure 111).

Il est intéressant de noter que le céto-DMDIBO est un dérivé du céto-TMDIBO ayant deux groupements méthoxy en moins.

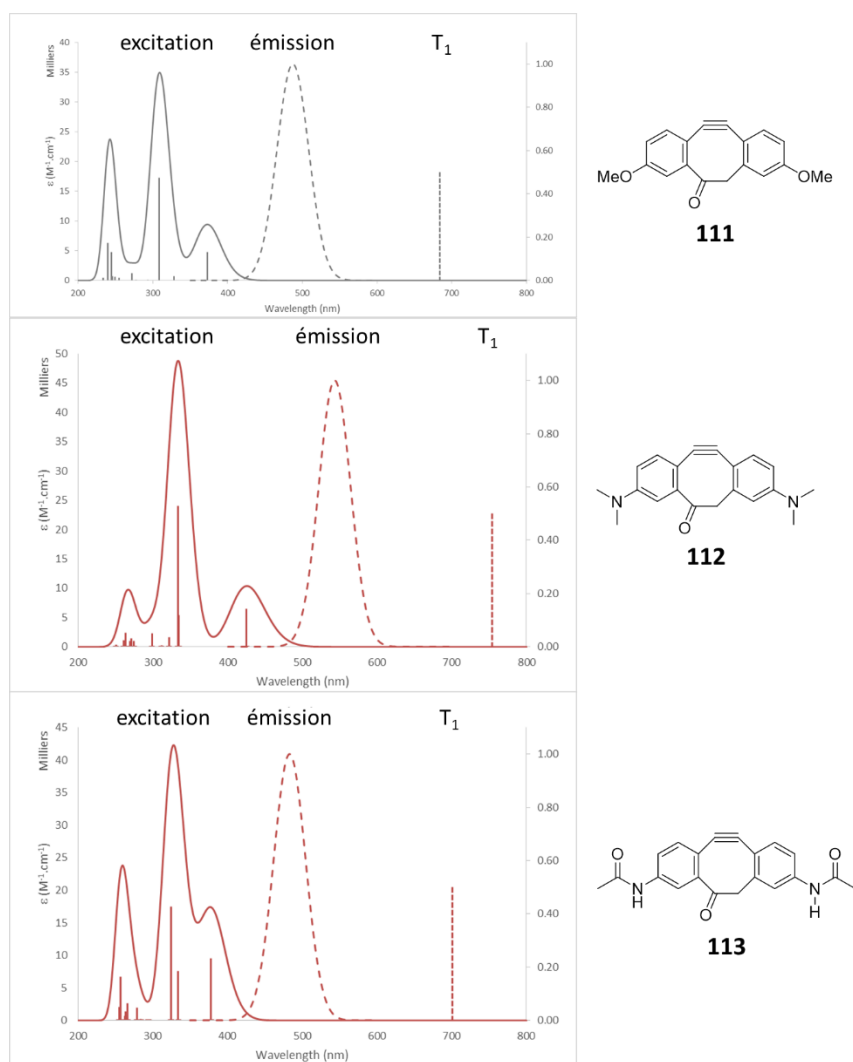


Figure 111 : Calculs de modélisation prévisionnels pour les cyclooctynes 111, 112 et 113

La synthèse de dérivés du céto-DIBO a permis d'obtenir des dérivés fluorescents mais sans pouvoir conserver ces propriétés photophysiques lors d'une réaction SPAAC. La compréhension de ce phénomène par des calculs de modélisation moléculaire a permis de mettre en évidence la présence à l'état excité S_1 d'un état triplet T_1 proche en énergie dans le cas des molécules triazoles, favorisant des relaxations non radiatives. L'obtention d'adduits non fluorescents n'est pas un paramètre compatible avec notre cahier des charges.

Pour y remédier, de nouveaux calculs, prévisionnels, ont été réalisés et indiquent que l'état excité triplet serait plus bas en énergie (et donc moins compétitif) pour des triazoles dérivés de dibenzocyclooctynones substitués par des groupements électrodonneurs en position 3 et 8. Ceci serait également vérifié pour des substituants de type acétamide. Sur la base de ces prévisions, nous avons envisagé d'obtenir de nouveaux dérivés du céto-DIBO 3,8-disubstitués enrichis en électrons, et plus particulièrement le céto-DMDIBO **111**.

Chapitre II : Synthèse de dérivés du céto-DIBO « de deuxième génération »

Les résultats de calculs de modélisation nous ont amenés à envisager la synthèse du céto-DMDIBO **111**, de manière à obtenir des triazoles fluorescents après la SPAAC (Figure 112). Un tel dérivé du céto-DIBO 3,8-disubstitués répondrait à un paramètre essentiel du cahier des charges en permettant la différenciation du signal fluorescent de la sonde libre et de la sonde liée.

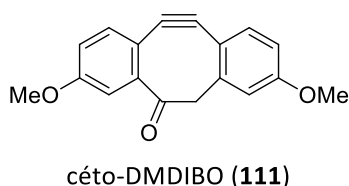


Figure 112 : Structure de la dibenzocyclooctynone **111**

Néanmoins, le céto-DMDIBO n'est pas accessible par les voies de synthèse précédemment utilisées pour la synthèse du céto-DIBO⁵⁴ et du TMDIBO.⁵³ En effet, dans le cas de la méthode de Boons, la 5-dibenzosubérénone commerciale correspondante n'est pas disponible, tandis que l'étape de formation de l'éther cyclique pour la méthode de Leeper conduirait à un composé n'ayant pas la bonne régioisométrie (Figure 113).



Figure 113 : Etape de formation de l'éther cyclique par la voie de synthèse du TMDIBO conduisant à des dérivés 3,9-disubstitués

Pour obtenir le céto-DMDIBO, nous avons ainsi souhaité développer une voie de synthèse adaptée et plus « universelle » que les précédentes. Pour cela, nous tenions à adopter une autre méthode d'accès aux cyclooctynes, et notamment une alternative à la double étape de bromation-élimination permettant de passer de la fonction alcène à la fonction alcyne intracyclique, qui avait été particulièrement limitante pour les sondes synthétisées précédemment et dépendante de la structure des dérivés. Au vu des différentes méthodes possibles pour accéder aux cycloalcyne, nous avons opté pour la voie passant par la photolyse d'une fonction cyclopropénone (ou méthode C de la Figure 66). En effet, parmi ces méthodes, celle-ci est décrite dans la littérature comme étant rapide et efficace. De plus, la force motrice de cette réaction est la perte irréversible du monoxyde de carbone et l'accès à une fonction cyclopropénone intracyclique permettrait par la même occasion d'obtenir le cycle à 8 chaînons.

Nous avons ainsi entrepris la synthèse du céto-DMDIBO suivant une première stratégie basée sur la synthèse d'un intermédiaire éther d'énol silylé et une seconde approche visant à obtenir un intermédiaire benzylphénylcarbinol.

I – Stratégie initiale basée sur un intermédiaire d'éther d'énol silylé

Dans un premier temps, pour obtenir des dibenzocyclooctynones-3,8-disubstituées *via* des intermédiaires diarylcyclopropénones intracycliques, nous avons envisagé la rétrosynthèse suivante (Figure 114), adaptée à la synthèse du composé **111** :

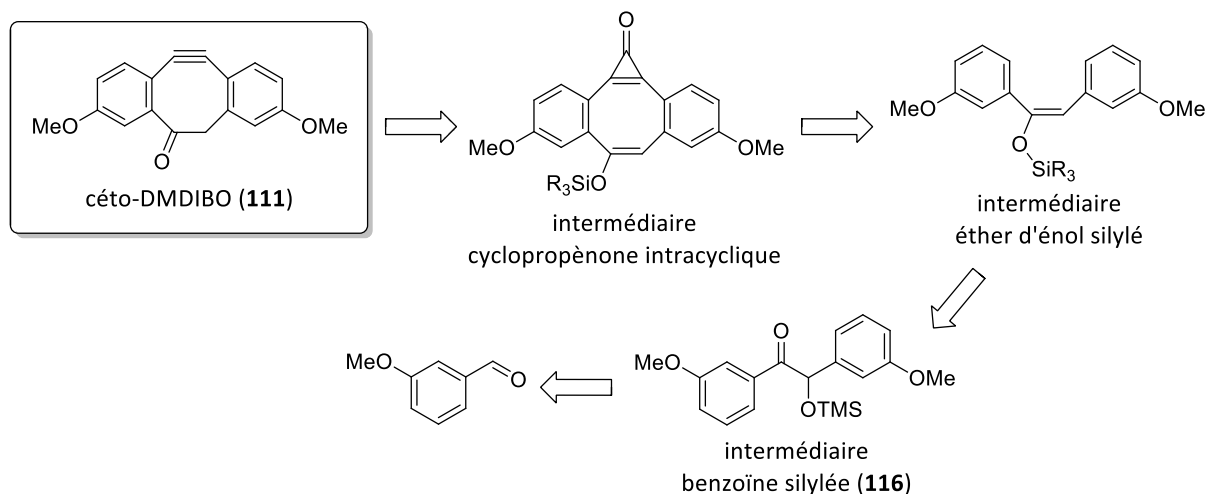


Figure 114 : Stratégie initiale pour la synthèse de dibenzocyclooctynones-3,8-disubstituées

Initialement, la formation d'une benzoïne silylée **116**, par la condensation du 3-méthoxybenzaldéhyde puis la protection de l'hydroxyle formé, pourrait conduire à un intermédiaire clé : un éther d'énol silylé de configuration *E*. Cette réaction correspond à un réarrangement de Brook réalisé en présence d'un silyllithium¹³⁴ et conduisant exclusivement à cet isomère.

L'avantage de cet intermédiaire est double : la pré-organisation de sa configuration pourrait faciliter la cyclisation lors de la double alkylation de Friedel-Crafts pour former le cycle à 8 chaînons (en plus de la présence de groupements méthoxy en *meta* de l'éther d'énol silylé qui orientent la SEar en *ortho* et en *para*) et la fonction éther d'énol silylé correspond à une fonction carbonyle masquée que l'on pourrait obtenir par simple déprotection avec un fluorure. La dibenzocyclooctynone-3,8-disubstituée pourrait alors être obtenue par photolyse de la fonction cyclopropénone.

Par ailleurs, la première étape de cette stratégie constitue le point de diversification des dibenzocyclooctynones-3,8-disubstituées finales. En effet, l'aldéhyde de départ peut être condensé avec un benzaldéhyde substitué différemment pour fournir des cyclooctynes dissymétriques.

I.1. Obtention de la benzoïne silylée

La préparation de la benzoïne **117** par condensation du benzaldéhyde correspondant a été réalisée suivant les conditions décrites par Alexakis et coll.¹³⁵ Celle-ci est catalysée par l'ion cyanure dans le DMSO et sous ultrasons et conduit à des rendements supérieurs à 90% (Figure 115).

¹³⁴ Robertson, B. D.; Hartel, A. M. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 2088-2090.

¹³⁵ Romanov-Michailidis, F.; Besnard, C.; Alexakis, A. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4906-4909.

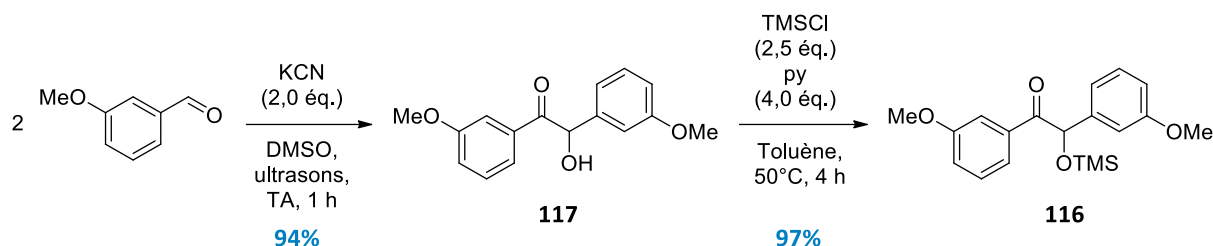


Figure 115 : Synthèse de la benzoïne silylée

La fonction alcool de la benzoïne est ensuite protégée par un groupement triméthylsilyle en présence d'un excès de pyridine et à chaud avec un rendement de 97% d'après le protocole d'Onishi *et al.*¹³⁶ Le choix de ce groupement protecteur est crucial pour réaliser ensuite le réarrangement de Brook.

I.2. Réarrangement de Brook

L'obtention de l'éther d'énol silylé **119** a été réalisée d'après les conditions optimisées par Hartel *et al.*¹²⁷ pour divers dérivés acyloïnes en utilisant un réactif de silyllithium. Les exemples décrits par Hartel et Robertson ont conduit majoritairement à la formation de l'éther d'énol silylé de configuration *E* avec l'emploi du diphenylméthylsilyllithium, accompagnée d'un sous-produit de dimérisation du type disiloxane. Comme cela a été décrit, il n'a pas été possible de séparer le produit souhaité de ce produit secondaire.

Nous avons donc préparé un silyllithium alternatif (Figure 116) suivant le protocole de Joost *et al.*¹³⁷ dont les résultats indiquent que la version diphenyl-*tert*-butyle ne gêne pas l'étape de purification.

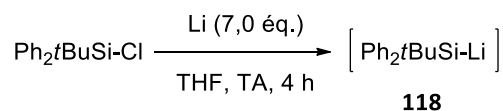


Figure 116 : Préparation du diphenyl-*tert*-butylsilyllithium

Le diphenyl-*tert*-butylsilyllithium **118** a été synthétisé en faisant réagir du chlorure de silyle correspondant avec un excès de lithium. Un tel composé est très réactif et ne peut être ni isolé, ni conservé. Il est utilisé rapidement et sous la forme d'une solution brute dans le solvant étheré de la réaction, dont la concentration ne peut qu'être estimée.

Sur la benzoïne silylée **116** synthétisée plus haut, l'utilisation de **118** a conduit à la formation exclusive et immédiate de l'éther d'énol silylé **119** *E* avec un rendement supérieur à 80% (Figure 117), qui a pu être isolé.

¹³⁶ Onishi, Y.; Ito, T.; Yasuda, M.; Baba, A. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8227-8235.

¹³⁷ Joost, M.; Gualco, P.; Mallet-Ladeira, S.; Amgoune, A.; Bourissou, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7160-7163.

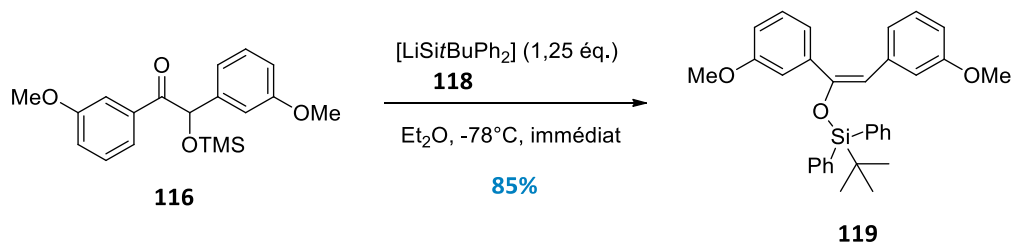


Figure 117 : Synthèse de l'éther d'énol silylé par un réarrangement de Brook

Un mécanisme a été proposé par Smith *et al.*¹³⁸ pouvant expliquer la stéréochimie particulière de ce réarrangement, notamment pour les séries aromatiques (Figure 118) :

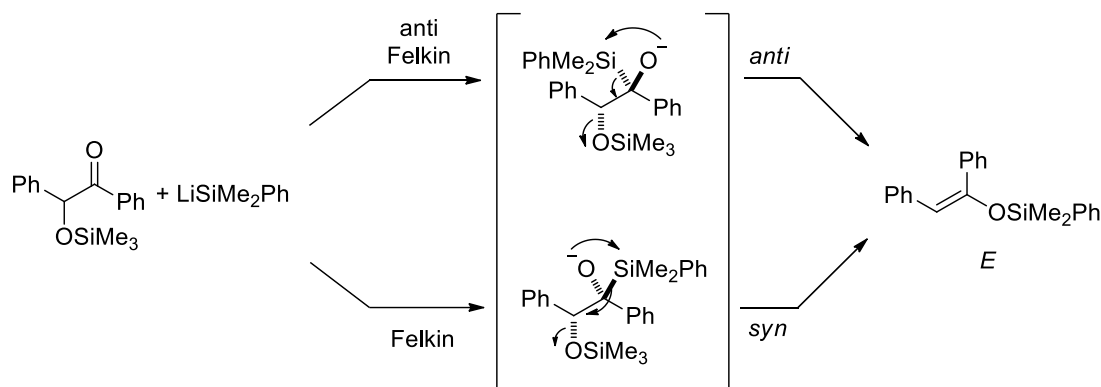


Figure 118 : Mécanisme proposé par Smith *et al.* expliquant la stéréochimie du réarrangement de Brook¹³³

Suite à l'addition du silyle sur le carbonyle, l'espèce formée peut être représentée par les modèles de Felkin : la liaison C-O du carbonyle étant soit en *anti* du groupement éther de triméthylsilyle, soit du même côté. Dans les deux états de transition, le réarrangement de Brook correspondant à l'attaque de l'oxygène sur le silicium adjacent induit une *syn*-élimination de l'éther silylé et ainsi à la formation d'une double liaison de configuration *E*.

I.3. Essais de double alkylation de Friedel-Crafts

L'éther d'énol silylé **119** a été engagé dans la réaction de Friedel-Crafts pour former le cycle à 8 chaînons sous forme de fonction cyclopropénone intracyclique, dans des conditions similaires à celles décrites par Popik *et al.*^{126,90} Malgré plusieurs essais, le produit souhaité **120** n'a jamais été observé (Figure 119). En effet, dans ces conditions réactionnelles, l'élimination du groupement silylé est quasi-instantanée, même lors d'expériences réalisées à -78°C , et aboutit à la formation majoritaire de la désoxybenzoïne **121** (dont la quantité isolée correspond à 20% de la quantité de matière introduite), en même temps qu'une importante dégradation (alors qu'en présence de l'acide de Lewis AlCl_3 , l'éther de diphenyl-*tert*-butylsilyle est décrit comme stable jusqu'à 80°C ¹³⁹).

¹³⁸ Fleming, I.; Roberts, R. S.; Smith, S. C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1998**, 1215-1228.

¹³⁹ Greene, T. W.; Peter, G. M. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc., **2006**, page 995.

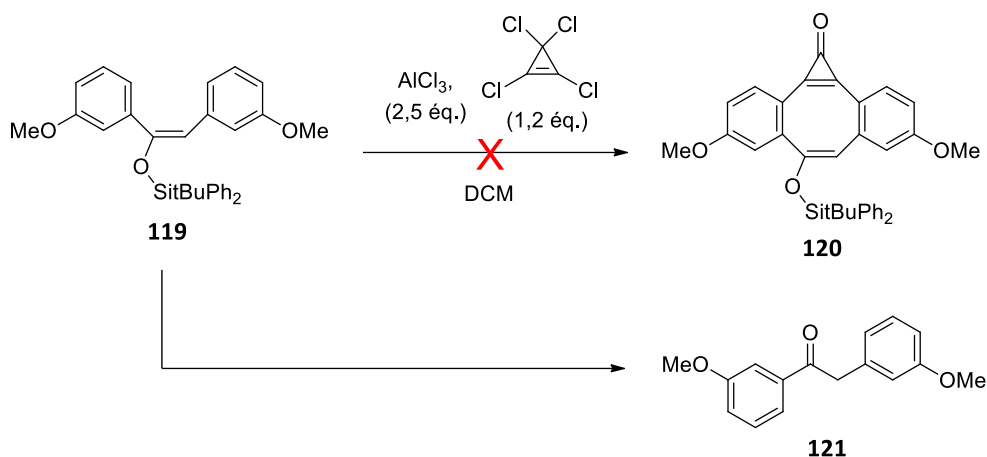


Figure 119 : Réactivité de l'éther d'énol silylé dans les conditions de la double alkylation de Friedel-Crafts

La desoxybenzoïne **121** obtenue a également été engagée dans la réaction de substitution électrophile aromatique mais n'a conduit qu'à des dégradations supplémentaires. Ceci nous a contraints à abandonner cette voie de synthèse et à adopter une stratégie différente.

II – Stratégie secondaire

II.1. Description de la voie de synthèse

Comme la voie de synthèse précédente n'a pas abouti à la formation de la cyclopropénone intracyclique, nous avons modifié le début de la synthèse de manière à obtenir un intermédiaire benzylphénylcarbinol **122** ou 1,2-phényléthanol (Figure 120), qui serait engagé dans la réaction de Friedel-Crafts après protection de la fonction hydroxyle. Le reste de la synthèse est identique à celle présentée précédemment.

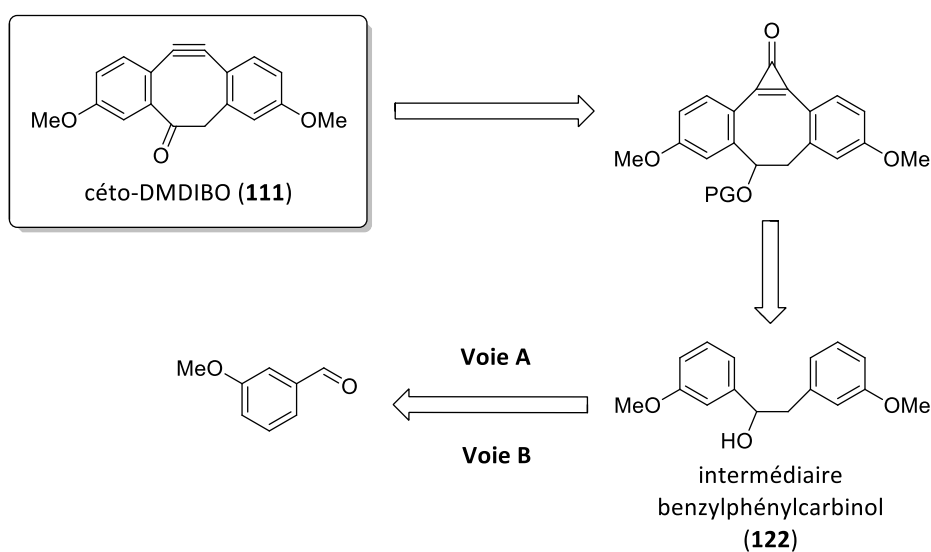


Figure 120 : Deuxième stratégie de synthèse des dibenzocyclooctynes-3,8-disubstituées

Deux voies d'obtention de cet intermédiaire ont été étudiées à partir du benzaldéhyde commercial substitué en position *mé*ta, toutes deux offrant une diversification possible des substituants en raison de la disponibilité des précurseurs correspondants, permettant la synthèse de composés finaux symétriques ou non. Une première voie, directe, correspond à une réaction de Grignard entre le benzaldéhyde et un organomagnésien formé à partir d'un halogénure de benzyle en présence de magnésium (Voie A). La seconde, indirecte, débute par une réaction de Wittig entre le benzaldéhyde et un ylure de phosphore formé à partir d'un halogénure de benzyle en présence de triphénylphosphine, suivi d'une étape d'hydroboration et d'oxydation pour passer de l'éthylénique à l'alcool (Voie B).

II.2. Synthèse du céto-3,8-diméthoxydibenzocyclooctyne

II.2.1. Obtention du benzylphénylcarbinol

Par réaction de Grignard (Voie A)

La réaction de Grignard sur le 3-méthoxybenzaldéhyde est réalisée selon le protocole décrit par Friscourt *et al.*¹⁴⁰ Le chlorure de 3-méthoxybenzylmagnésium (ou réactif de Grignard) est formé par l'ajout lent du chlorure de benzyle correspondant à un excès de magnésium à froid et en condition diluée. La cinétique d'ajout et la concentration de cette étape sont des paramètres cruciaux pour minimiser la formation du produit d'homocouplage. Pour la même raison, la température ne doit pas dépasser la température ambiante.

Une fois l'organomagnésien formé, le benzaldéhyde est ajouté pour former le composé **122** avec un rendement moyen et une conversion de 89% (Figure 121).

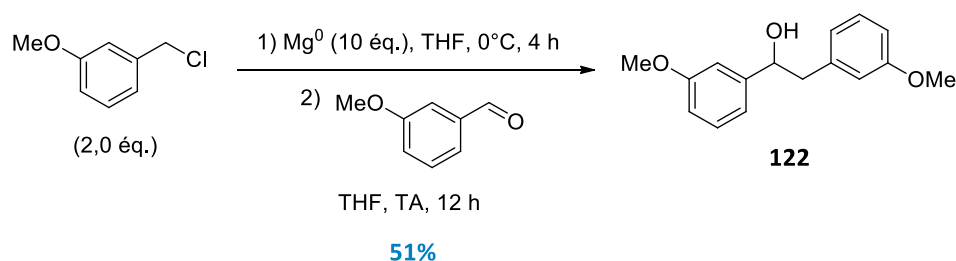


Figure 121 : Synthèse du 1,2-diphényléthanol par réaction de Grignard

Malgré plusieurs essais d'optimisation, cette étape n'a pas permis d'obtenir une conversion totale (Tableau 30). Un temps de réaction plus long favorise la formation du produit d'homocouplage pour la réaction de formation du réactif de Grignard, tandis que l'augmentation du temps de la réaction de Grignard engendre une dégradation du milieu réactionnel.

¹⁴⁰ Friscourt, F.; Ledin, P. A.; Mbua, N. E.; Flanagan-Steet, H. R.; Wolfert, M. A.; Steet, R.; Boons, G.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5381-5389.

T° (formation du réactif de Grignard)	[BnCl]	Temps de réaction (pour la réaction de Grignard)	Rendement	Conversion
TA	0,66 M	4 h	31%	73%
0°C	2,5 M	4 h	33%	65%
0°C	0,66 M	>24 h	34%	97%
0°C	0,66 M	12 h	51%	89%

Tableau 30 : Influence de la température, de la concentration et du temps de réaction sur le rendement et la conversion

Par réaction de Wittig, suivi d'une hydroboration/oxydation (Voie B)

La formation de l'intermédiaire **122** a également été réalisée en deux étapes à partir du même synthon commercial (Figure 122). Dans un premier temps, le bromure de phosphonium **123** est préparé quantitativement à partir d'un excès de phosphine et de bromure de 3-méthoxybenzyle au reflux de l'acétonitrile. Le 3-méthoxybenzaldéhyde réagit ensuite avec l'ylure de phosphore, formé *in situ* à partir du sel de phosphonium, *via* une réaction de Wittig inspirée du protocole de Fischer et Nuckolls,¹⁴¹ au reflux du dichlorométhane pour former un mélange de stilbène **124** *E/Z* avec un bon rendement. L'isomère *Z* est formé majoritairement car l'ylure de phosphore est déstabilisé par le noyau aromatique enrichi en électrons.

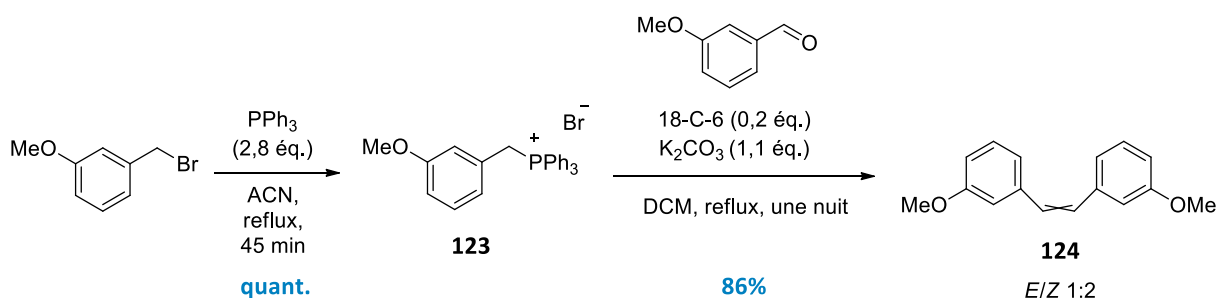


Figure 122 : Réaction de Wittig

Pour obtenir le composé **122**, une étape d'hydroboration de la fonction alcène a été réalisée, suivi d'une oxydation en milieu basique, suivant le protocole décrit par Gray *et al.*¹⁴² (Figure 123).

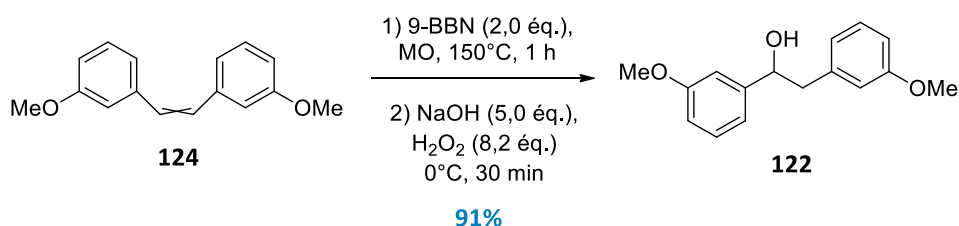


Figure 123 : Réaction d'hydroboration suivi d'une oxydation en alcool

L'hydroboration est effectuée dans un appareil à micro-ondes et à une température élevée. La conversion de l'alcène est efficace sur le mélange *E/Z* de produit **124**. L'alcool **122** est obtenu en ajoutant à froid un excès de peroxyde d'hydrogène et de soude, conduisant à la rupture de la liaison C-B par oxydation avec un rendement supérieur à 90%.

¹⁴¹ Fischer, F. R.; Nuckolls, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7257-7260.

¹⁴² Gray, E. E.; Rabenold, L. E.; Goess, B. C. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 6177-6179.

Au final, le 1,2-diphényléthanol **122** est obtenu par cette méthode indirecte avec un rendement de 78% sur deux étapes, contre 51% par la méthode directe de la réaction de Grignard.

II.2.2. Formation de la cyclopropénone intracyclique

Un essai de cyclisation de Friedel-Crafts sur l'alcool non protégé a été réalisé de manière à obtenir la cyclopropénone intracyclique directement en espérant s'affranchir d'une double étape de protection/déprotection. Dans ces conditions, la double alkylation de Friedel-Crafts a bien lieu mais s'accompagne majoritairement de la substitution de l'hydroxyle par un atome de chlore (Figure 124), ainsi que d'une importante dégradation du milieu réactionnel. La quantité de composé **125** isolé correspond à 12% de la quantité de matière introduite.

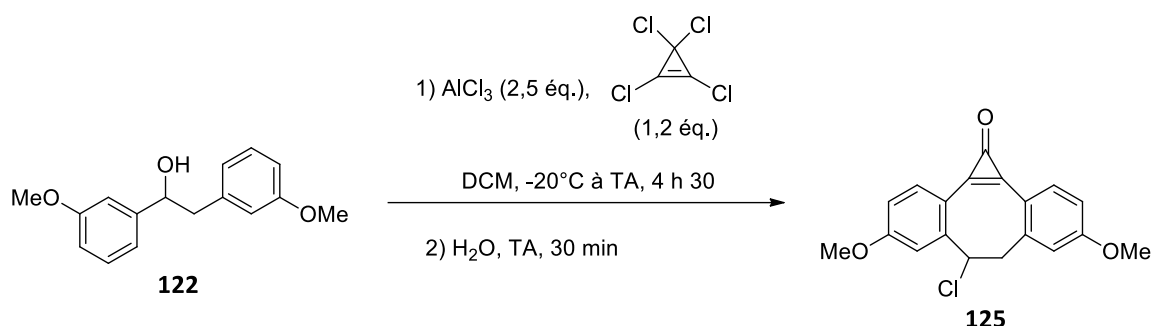


Figure 124 : Double alkylation de Friedel-Crafts sur l'hydroxyle libre

Une étape de protection de l'intermédiaire **122** a alors été réalisée *via* une acétylation selon les conditions décrites par Weber et Khorana¹⁴³ et l'équipe de Boons¹³⁵ (Figure 125) et a conduit à un bon rendement. Ce groupement protecteur est plus stable vis-à-vis des conditions de la réaction de Friedel-Crafts¹³⁴ et plus facile à enlever que les fonctions trialkylsilyles précédemment utilisées pour les cyclooctynes de première génération.

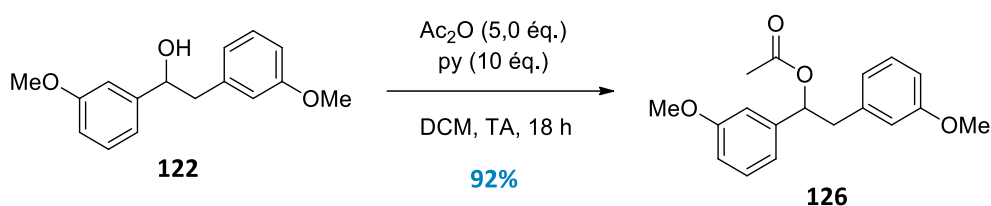
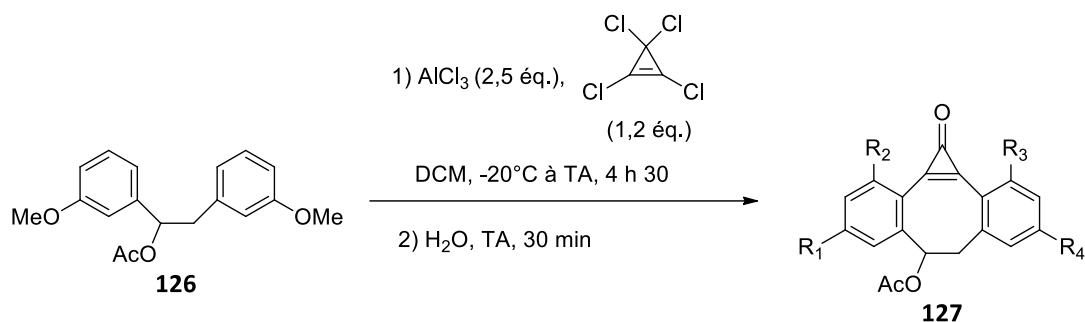


Figure 125 : Protection de la fonction hydroxyle par acétylation

Le cycle à 8 chaînons a été formé par la synthèse de la fonction cyclopropénone intracyclique **127** dans les conditions mises au point par Boons.¹³⁴ Cette réaction a permis d'isoler trois régioisomères de position nommés suivant la substitution des groupements méthoxy (Tableau 31), le régioisomère majoritaire étant le composé d'intérêt **127a** (méthoxy en position R₁ et R₄ ou 3,8) obtenu avec un rendement correct. La formation de ces composés est justifiée par la double orientation de la substitution électrophile aromatique en *para* et en *ortho* conférée par les fonctions méthoxy et par la libre rotation des liaisons autour des carbones benzyliques.

¹⁴³ Weber, H.; Khorana, H. G. *J. Mol. Biol.* **1972**, *72*, 219-250.



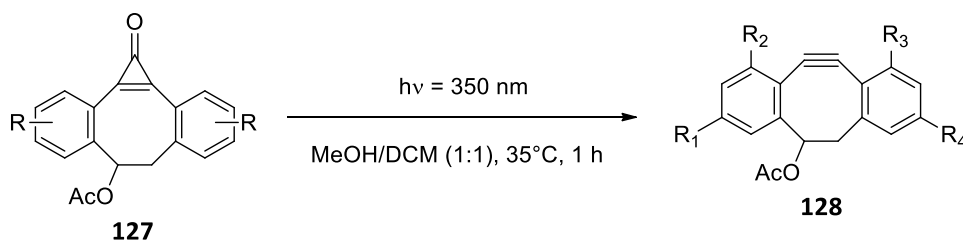
Composé	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Rendement
127a	OMe	H	H	OMe	59%
127b	H	OMe	H	OMe	14%
127c	OMe	H	OMe	H	(mélange 3:1)

Tableau 31 : Double alkylation de Friedel-Crafts sur l'hydroxyle protégé

Les composés ayant un groupement méthoxy en *ortho* par rapport à la cyclopropénone (**127b** et **127c**) ont été obtenus sous la forme d'un mélange (3:1, respectivement) inséparable avec un rendement quatre fois inférieur par rapport au régioisomère **127a** amenant le rendement global de cyclisation de cette réaction à 73%. La poursuite de la voie de synthèse a été effectuée en incluant ces deux produits pouvant aboutir à l'obtention de trois dibenzocyclooctynes au lieu d'un seul. Les résultats de ces isomères seront comparés à ceux du composé majoritaire **127a** et les composés seront numérotés comme précédemment suivant un même intermédiaire, à l'exception des produits dibenzocyclooctynols et dibenzocyclooctynes.

II.2.3. Obtention du cycloalcyne par photodécarbonylation

Les cyclopropénones intracycliques obtenues ont été irradiées à 350 nm pour former les dibenzocycloalcynes correspondants *via* une décarbonylation photochimique (Tableau 32). L'ajout de dichlorométhane améliore la solubilité, notamment pour les régioisomères **127b** et **127c**. Pour ces derniers, une seule tentative a été réalisée et a conduit à un nouveau mélange (2:1, respectivement) non séparable avec un rendement moindre.



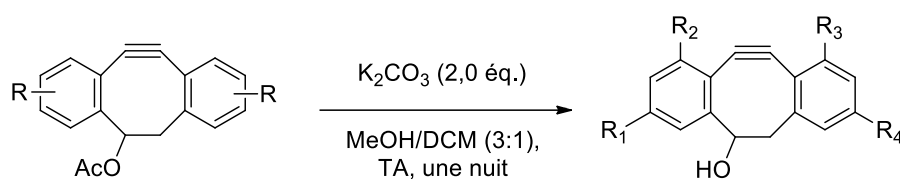
Composé	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Rendement
128a	OMe	H	H	OMe	68%
128b	H	OMe	H	OMe	43%
128c	OMe	H	OMe	H	(mélange 2:1)

Tableau 32 : Réaction de photodécarbonylation

Cette méthode de formation de la fonction alcyne intracyclique est nettement plus efficace que celle utilisée pour les sondes de première génération puisqu'elle permet d'obtenir les cyclooctynes avec un bon rendement en ne nécessitant qu'une heure de réaction.

II.2.4. Obtention de la dibenzocyclooctynone

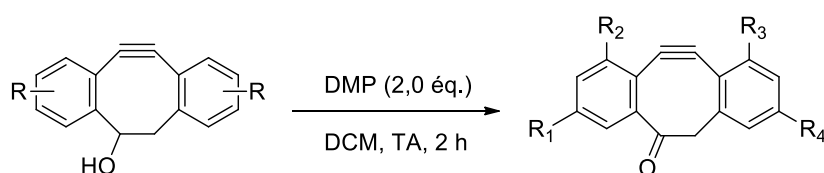
La déprotection de l'alcool pour conduire au dibenzocyclooctynol a été réalisée suivant le procédé de Kim *et al.*¹⁴⁴ en utilisant du carbonate de potassium dans le méthanol (Tableau 33). De même que pour la réaction précédente, l'ajout de dichlorométhane a été nécessaire pour améliorer la solubilité du réactif de départ. Après une nuit de réaction à température ambiante, les dibenzocyclooctynols ont été obtenus avec de bons rendements, les régioisomères **129** et **130** étant inséparables (mélange 2:1, respectivement).



Composé	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Rendement
129	OMe	H	H	OMe	93%
130	H	OMe	H	OMe	87%
131	OMe	H	OMe	H	(mélange 2:1)

Tableau 33 : Formation du dibenzocyclooctynol par déprotection de l'alcool

L'étape finale de la voie de synthèse est l'oxydation en dibenzocyclooctynone, réalisée avec le périodinate de Dess-Martin. Les rendements obtenus sont similaires (Tableau 34). Cette étape a permis de séparer les deux isomères **132** et **133** ayant une fonction méthoxy en ortho et de déterminer que le produit **133** est le plus minoritaire.



Composé	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Rendement
111	OMe	H	H	OMe	66%
132	H	OMe	H	OMe	42%
133	OMe	H	OMe	H	16%

Tableau 34 : Oxydation finale en dibenzocyclooctynone

Pour conclure, trois nouvelles dibenzocyclooctynones disubstituées ont été obtenues avec une nouvelle voie de synthèse et à partir d'un même synthon commercial, dont les rendements globaux sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 35) :

¹⁴⁴ Kim, M.-J.; Choi, Y. K.; Kim, S.; Kim, D.; Han, K.; Ko, S.-B.; Park, J. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1295-1298.

<i>Sonde</i>			
	3,8-céto-DMDIBO (111)	1,8-céto-DMDIBO (132)	3,10-céto-DMDIBO (133)
<i>Précurseur commercial</i>			
<i>Rendement global via la voie A (6 étapes)</i>	11,6%	1,03%	0,39%
<i>Rendement global via la voie B (7 étapes)</i>	17,7%	1,58%	0,60%

Tableau 35 : Rendements globaux à partir du synthon commercial commun

Deux approches initiales ont été testées, toutes deux permettant une diversification des substituants et la synthèse de cyclooctynes symétriques ou dissymétriques, la seconde offrant un meilleur rendement. Cette nouvelle voie de synthèse passe par la formation d'une cyclopropénone intracyclique permettant d'une part, de former le cycle à 8 chaînons, et d'autre part, d'accéder à la fonction alcyne intracyclique de manière plus aisée et efficace que pour les voies de Boons⁵⁴ et Leeper.⁵³ Néanmoins, on constate que le rendement global pour obtenir le composé **111** désiré est inférieur à celui du composé **83** (17,7% au lieu de 24,5%) alors qu'il y a une à deux étapes en moins. Toutefois, chaque étape offre un rendement supérieur à 50% et les étapes clé (formation du cyclooctane et du cycloalcyne) ne constituent plus des étapes limitantes.

Ces trois sondes de deuxième génération sont fluorescentes et leurs propriétés ont été étudiées et analysées.

Chapitre III : Evaluation des sondes « de deuxième génération »

I – Propriétés photophysiques

L'ensemble des spectres d'absorption et d'émission (Figure 126) ont été réalisés en solution dans le méthanol à 25°C pour pouvoir comparer les propriétés photophysiques de la série céto-DMDIBO aux sondes précédentes. Il faut noter que les dérivés DMDIBO ont une bonne solubilité dans ce solvant. La référence choisie pour la mesure du rendement quantique de fluorescence est, comme précédemment, le sulfate de quinine 0,1 M dans H₂SO₄.

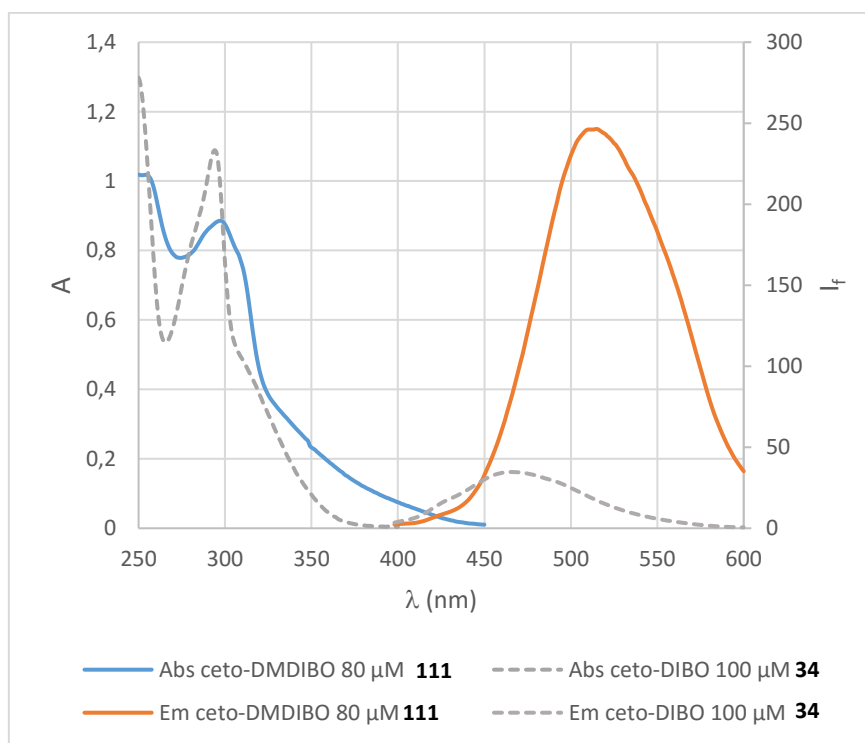
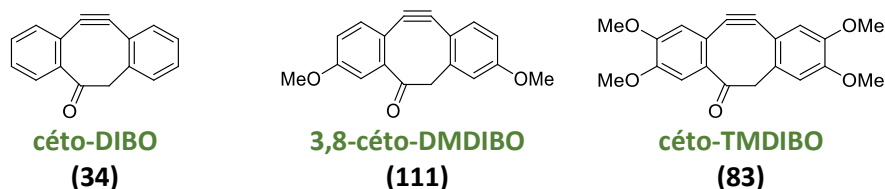


Figure 126 : Courbes d'absorption et d'émission du 3,8-céto-DMDIBO par rapport au céto-DIBO

Les différentes caractéristiques photophysiques obtenues comparées aux composés parents sont résumées dans le tableau ci-dessous (Tableau 36) :



λ_{ex} (nm)	375	375	375
$\lambda_{ém}$ (nm)	470	514	528
$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	5390	7211	7727
Φ_f	26%	7,3%	3-5%
ϵ_{375} (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	155	1700	3915
B	40	136	157
τ (ns)	4,8	6,3	4,6
k_r (10 ⁷ s ⁻¹)	5,41	1,16	0,87
k_{nr} (10 ⁷ s ⁻¹)	15,4	14,7	20,9

Tableau 36 : Propriétés photophysiques du 3,8-céto-DMDIBO par rapport au céto-DIBO et au céto-TMDIBO

La longueur d'onde d'émission a subi un déplacement bathochrome par rapport au composé **34**, mais cet effet n'est pas plus important que pour les précédentes molécules : en effet, par comparaison avec le composé **83**, on observe une différence de 14 nm.

Le rendement quantique est cependant inférieur à 10%, comme pour le dérivé tétraméthoxy **83**, signifiant que le composé **111** est trois fois moins efficace en tant que fluorophore par rapport au composé parent. Comme décrit plus haut, ceci serait le résultat de la présence de doublets non-liants conjugués au système π . La brillance est plus importante à 375 nm par rapport au céto-DIBO **34**. En comparant au céto-TMDIBO **83**, ce paramètre est moins grand malgré un rendement quantique plus élevé. Ceci s'explique par la présence de deux groupements méthoxy supplémentaires sur le composé tétraméthoxy **83** qui contribuent à l'augmentation de l'absorbance et donc du coefficient d'extinction molaire ($\epsilon_{375} = 1700 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ avec deux méthoxy et $3915 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ avec quatre méthoxy).

De plus, la durée de vie à l'état excité est de 6 ns pour le 3,8-céto-DMDIBO **111** (correspondant à la plus haute valeur obtenue, toute série confondue). Cette longue durée de vie explique la faible efficacité de fluorescence, de même que la valeur obtenue pour k_r , par rapport au composé parent **34**.

Contrairement aux sondes précédemment synthétisées, le composé **111** absorbe au-delà de 400 nm (Figure 126), ce qui permet de l'exciter à une seconde longueur d'onde (420 nm), en plus de la longueur d'onde d'excitation appliquée habituellement à ces composés (375 nm). Cette seconde longueur d'onde entraîne un signal de fluorescence inférieur à celui obtenu après excitation à 375 nm car son intensité est plus faible ($\epsilon_{420} = 500 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et $B = 40$), mais il reste détectable.

Ainsi, la nature de ces substituants par rapport au composé **34** d'une part, et le nombre de ces groupements méthoxy par rapport au composé **83** d'autre part, a entraîné le changement de plusieurs paramètres à la fois.

Les régioisomères de ce DMDIBO **132** et **133** sont également fluorescents et quelques caractéristiques sont présentées ci-dessous (Tableau 37) :

	1,8-céto-DMDIBO (132)	3,10-céto-DMDIBO (133)	3,8-céto-DMDIBO (111)
λ_{ex} (nm)	375	375	375
$\lambda_{ém}$ (nm)	497	507	514
$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	6546	6943	7211

Tableau 37 : Propriétés photophysiques des régioisomères du composé 111

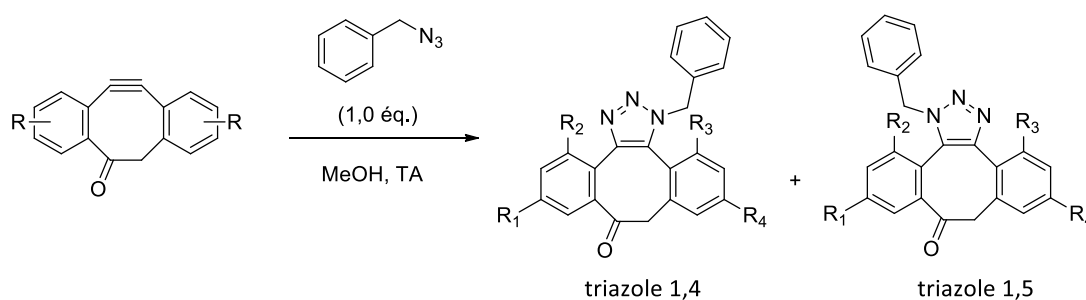
La position des méthoxy influence modérément la longueur d'onde d'émission et lorsqu'un de ces groupements est en *ortho* par rapport à l'alcyne, on observe un effet hypsochrome modéré.

II – Réactivité vis-à-vis des azotures

La réactivité des régioisomères de la série DMDIBO vis-à-vis des fonctions azotures a été étudiée de manière à déterminer, comme pour les sondes précédentes, si la SPAAC se réalise bien et suivant une cinétique adéquate. Un autre objectif est de vérifier, le cas échéant, les prédictions des calculs de modélisation annonçant des produits triazoles ayant conservé un signal fluorescent.

II.1. Réaction SPAAC

Nous avons reproduit les conditions de la SPAAC décrites pour le céto-DIBO,⁵⁴ dans le méthanol à température ambiante et à l'abri de la lumière, avec un modèle azoture en condition équimolaire, l'azoture de benzyle (Tableau 38).



Composé	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Temps	Conversion	Rendement	Proportions triazoles 1,4:1,5
108	OMe	H	H	OMe	1 h 40	100%	89%	78:22
134	H	OMe	H	OMe	45 h	100%	43%	77:23
135*	OMe	H	OMe	H	>63 h	99%	99%	64:36

Tableau 38 : Réactivité des régioisomères céto-DMDIBO vis-à-vis de l'azoture de benzyle

*Estimations par LC-MS à partir du chromatogramme UV à une longueur d'onde caractéristique des produits

On observe ainsi que chaque régioisomère est capable de réagir avec une fonction azote pour former un mélange de triazoles dont l'isomère 1,4 est majoritaire, mais cette réactivité n'est pas cinétiquement égale. En effet, pour le régioisomère 3,8-disubstitué **111** la conversion totale est atteinte après 1 h 40 de réaction contre plus de 40 h pour les deux autres. Ceci pourrait s'expliquer par

la gêne stérique appliquée par les méthoxy en *ortho* de l'alcyne et qui gênerait l'accès au dipôle. Cependant, le composé 3,10-disubstitué **133** réagit plus lentement que le composé 1,8-disubstitué **132**, ce qui pourrait signifier qu'en plus de la gêne stérique, il y aurait une gêne électronique : des groupements électrodonneurs proches du dipolarophile peuvent modifier la distribution de la densité électronique et altérer sa réactivité. Le rendement obtenu pour le dérivé *ortho*-substitué **134** témoigne de la moins bonne solubilité de ce composé. Les résultats pour les triazoles **135** issus du composé **133** ont été estimés d'après les analyses effectuées en LC-MS.

En outre, il est intéressant de noter que pour chaque cas, les triazoles obtenus sont séparables et celui majoritairement formé est fluorescent et semble émettre à une longueur d'onde différente (Figure 127).

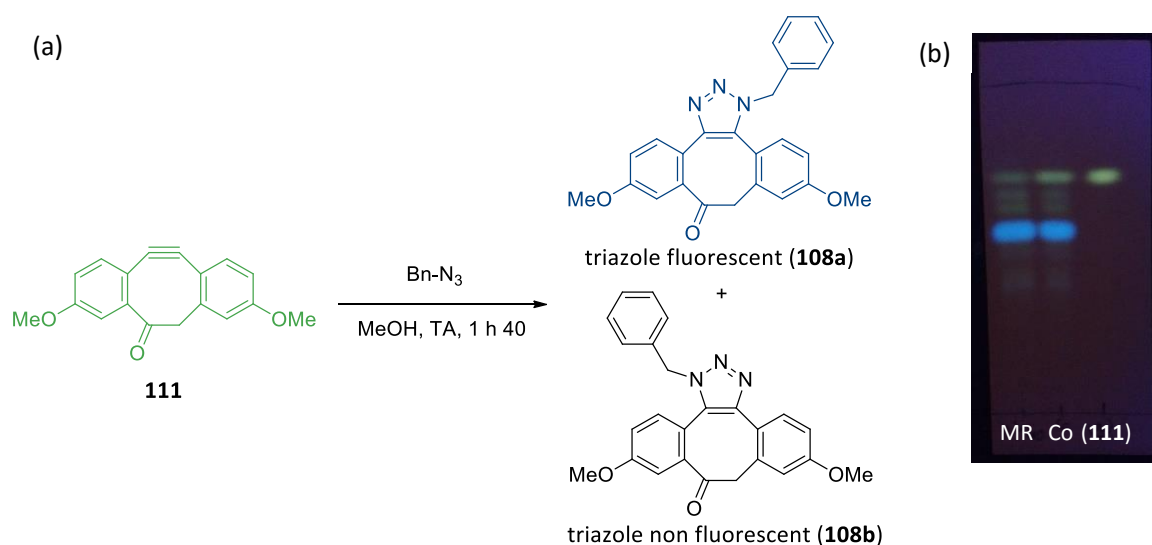


Figure 127 : Réaction SPAAC (a) entre le composé 111 et l'azoture de benzyle et (b) observée à 366 nm sur plaque CCM (MR : milieu réactionnel, Co : co-spottage et (111) : le cyclooctyne)

II.2. Etude cinétique

Seules les propriétés du régioisomère **111** ont été étudiées car il répond aux caractéristiques de la chimie « click ». Le suivi cinétique a été réalisé dans les mêmes conditions que pour les précédentes cyclooctynones, afin de pouvoir les comparer (dans l'acétonitrile et à 25°C). Pour cette nouvelle sonde, l'objectif a constitué à suivre la disparition de la fonction alcyne à 309 nm en fonction du temps et à différentes concentrations d'excès en azoture de benzyle, en condition de pseudo-1^{er} ordre (Tableau 39).

	céto-DIBO (34)	céto-DMDIBO (111)	céto-TMDIBO (83)
λ étudiée (nm)	317	309	320
k_2 ($M^{-1}.s^{-1}$)	0,2590	0,3214	0,6316

Tableau 39 : Constante de vitesse de second ordre obtenue pour la réaction entre le composé 111 et l'azoture de benzyle dans l'acétonitrile à 25°C et comparée aux constantes de vitesse des composés 34 et 83

La valeur obtenue pour cette nouvelle sonde est plus grande que pour le composé parent, mais la vitesse de cette sonde dans la réaction SPAAC est deux fois plus lente que pour le céto-TMDIBO **83**, composé ayant deux groupements méthoxy supplémentaires.

II.3. Etudes du 1,4-triazole de benzyle du 3,8-céto-DMDIBO

L'obtention d'un triazole fluorescent **108a** à la suite d'une réaction SPAAC prédite par des calculs de modélisation a permis de répondre à un critère important du cahier des charges. Ses propriétés de fluorescence propres ont été étudiées et des calculs de modélisation ont été réalisés de manière à comprendre pourquoi la formation du second triazole **108b** entraîne une extinction de la fluorescence.

II.3.1. Propriétés photophysiques

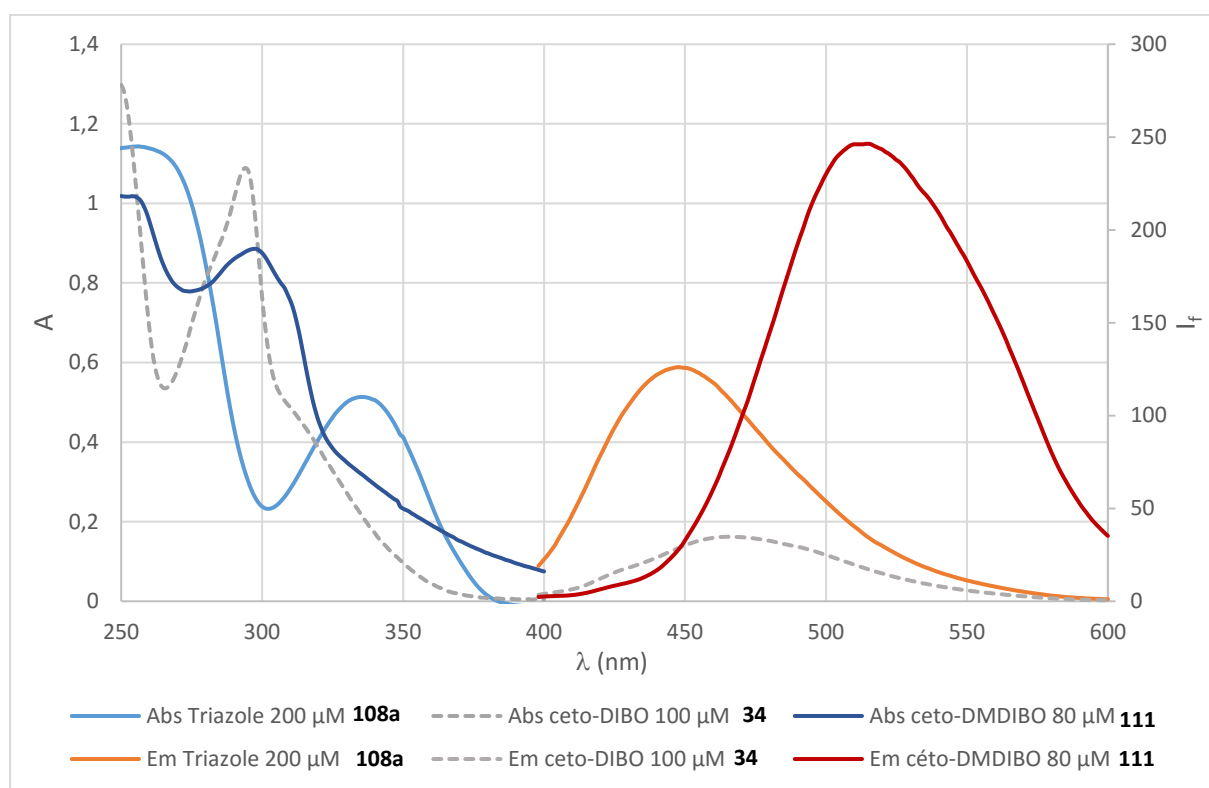
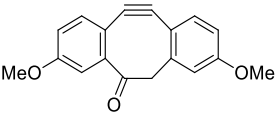


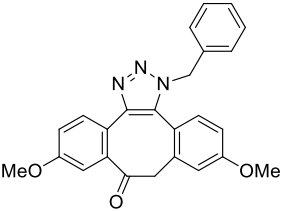
Figure 128 : Courbes d'absorption et d'émission du triazole **108a** par rapport au céto-DIBO et au 3,8-céto-DMDIBO

Les spectres ont été effectués dans le méthanol (Figure 128) et le rendement quantique de fluorescence a été calculé par rapport au sulfate de quinine. Les résultats sont comparés à ceux de la dibenzocyclooctynone correspondante **111** (Tableau 40). Le triazole **108a** émet à une longueur d'onde plus petite que le cyclooctyne correspondant. La réaction SPAAC a ainsi entraîné un effet hypsochrome du spectre d'émission, qui résulte en une diminution du déplacement de Stokes. Ce triazole n'absorbe pas au-delà de 400 nm et la longueur d'onde maximale d'excitation applicable est de 375 nm. Toutefois, celle-ci se situe au pied du spectre d'excitation et entraîne des propriétés photophysiques plus faibles que pour le cyclooctyne **111**. En effet, le rendement quantique de fluorescence du triazole **108a** est de 1,7% et le coefficient d'extinction molaire à cette longueur d'onde est de seulement $40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, ce qui entraîne une brillance inférieure à 1.

Comparée au cyclooctyne **111**, la durée de vie de fluorescence du triazole **108a** est six fois plus courte, ce qui est favorable pour une désexcitation radiative. Néanmoins, cet adduit possède une faible efficacité de fluorescence : la constante de vitesse radiative est similaire à celle du cyclooctyne parent, mais celle correspondant aux processus de relaxation non radiatifs a été considérablement augmentée ($k_{nr} = 98,3 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ pour le composé **108a** contre $14,7 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ pour le composé **111**), expliquant pourquoi le rendement quantique de fluorescence est très faible.



3,8-céto-DMDIBO
(111)



triazole 1,4
(108a)

$\lambda_{ex} \text{ (nm)}$	375	375
$\lambda_{ém} \text{ (nm)}$	514	448
$\Delta\nu \text{ (cm}^{-1}\text{)}$	7211	4345
Φ_f	7,3%	1,7%
ϵ_{375} ($M^{-1}.cm^{-1}$)	1700	40
B	136	0,7
$\tau_f \text{ (ns)}$	6,3	1,0
$k_r \text{ (10}^7 \text{ s}^{-1}\text{)}$	1,16	1,70
$k_{nr} \text{ (10}^7 \text{ s}^{-1}\text{)}$	14,7	98,3

Tableau 40 : Propriétés photophysiques du triazole 108a par rapport à la sonde 111 correspondante

II.3.2. Etude de modélisation moléculaire

La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre le composé **111** et l'azoture benzyle a conduit à la formation de deux régioisomères triazoles 1,4 et 1,5 (**108a** et **108b**). Ce dernier ne présente pas de propriétés photophysiques et ces deux composés ont été étudiés en modélisation moléculaire.

Les calculs ont montré dans les deux cas qu'une transition de type $\pi \rightarrow \pi^*$ était privilégiée, ce qui est favorable pour une relaxation radiative. Néanmoins, l'écart énergétique entre les états excités singulet et triplet ne sont pas les mêmes pour les deux triazoles : $\Delta_{(S1-T1)} = 0,82 \text{ eV}$ pour le triazole **108a** et $0,35 \text{ eV}$ pour le triazole **108b**. L'écart pour ce dernier est faible indiquant qu'à l'état excité le fluorophore privilégiera une désexcitation par voie non radiative, *via* une inversion de spin (Figure 129).

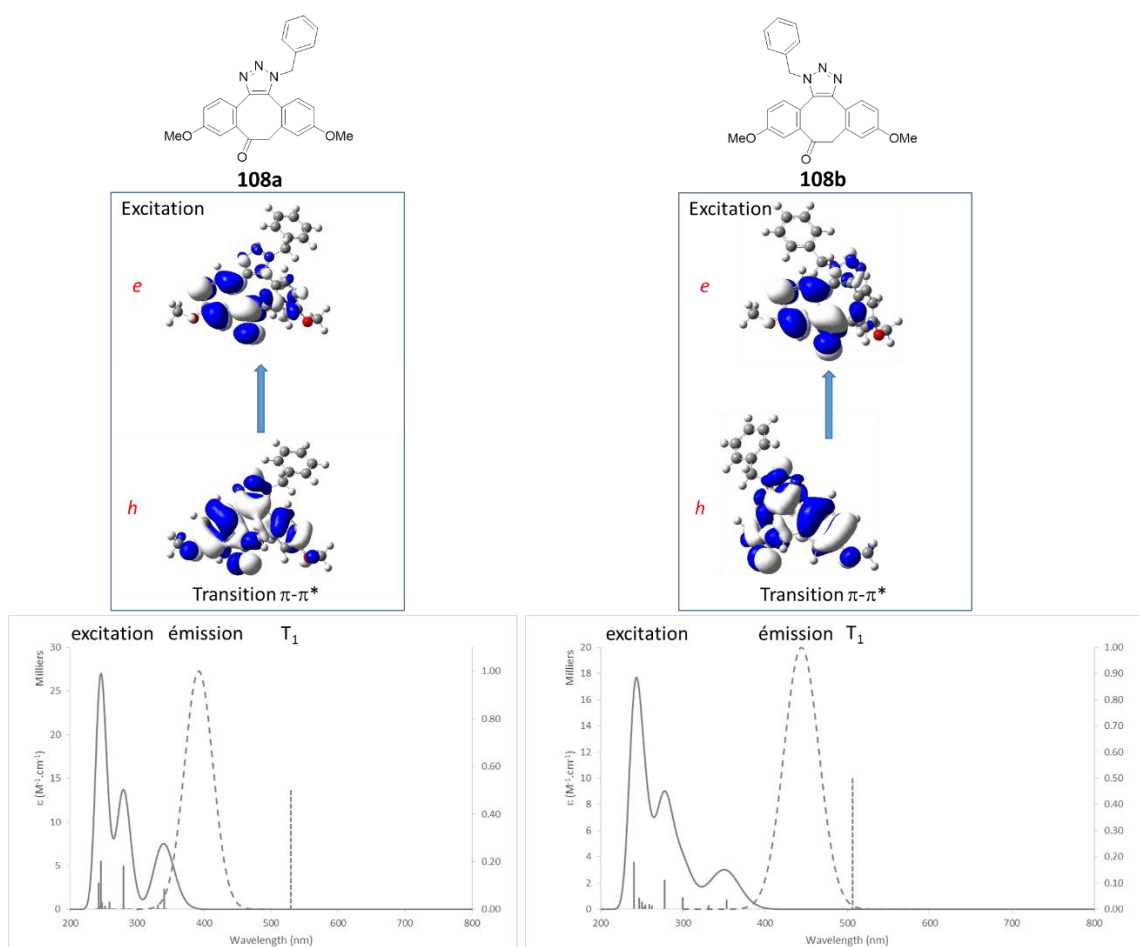


Figure 129 : Calculs de modélisation pour les triazoles 1,4 (108a) et 1,5 (108b) issus de la réaction du 3,8-céto-DMDIBO (111) avec l'azoture de benzyle

Une explication orbitalaire peut élucider ce phénomène (Figure 130). En effet, en admettant dans les deux cas que la transition est de type HOMO \rightarrow LUMO, on observe que l'orbitale HOMO (en rouge) est positionnée différemment sur ces deux triazoles : elle englobe à chaque fois un phényle et le noyau triazole, mais pour le composé **108a** elle est positionnée sur le phényle proche de la cétone et pour le composé **108b** sur le phényle à l'opposé de la cétone. Autrement dit, elle se positionne à l'opposé du benzyle. L'orbitale LUMO (en bleu) est toujours située sur le phényle proche de la fonction cétone.

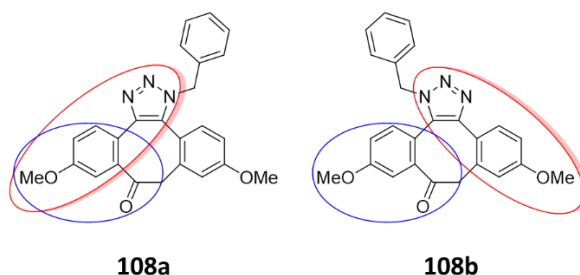


Figure 130 : Localisation des orbitales HOMO (en rouge) et LUMO (en bleu) des triazoles de benzyle 108a et 108b obtenue par calculs de modélisation

Or, si le recouvrement orbitalaire HOMO-LUMO est important, alors la différence énergétique des niveaux S_1 et T_1 est grande. *A contrario*, si le recouvrement est faible, cette différence devient faible.

III – Comportement en milieu biologique

Comme pour les précédentes molécules synthétisées, nous avons étudié au microscope confocal de fluorescence les propriétés du 3,8-céto-DMDIBO **111** sur des cellules vivantes de *Plasmodium falciparum* (agent responsable du paludisme) et sur les formes sanguines de l'espèce *Trypanosoma brucei brucei* (agent responsable de la maladie du sommeil chez le bétail), de manière à vérifier que ces molécules étaient capables de traverser les membranes des parasites. L'éventuelle toxicité des composés **111** et **108a** a également été étudiée sur les parasites.

III.1. Imagerie de fluorescence

Sur les images présentées ci-dessous, le signal correspondant à l'autofluorescence des parasites a été soustrait de manière à ne visualiser que le signal issu des sondes.

III.1.1. Marquage de *P. falciparum*

Le composé **111** a été incubé avec des cellules de *Plasmodium* vivants pendant 30 minutes à l'abri de la lumière à une concentration de 10 μ M. Les clichés de microscopie obtenus, avant et après lavage au milieu de culture, sont présentés ci-dessous (Figure 131) :

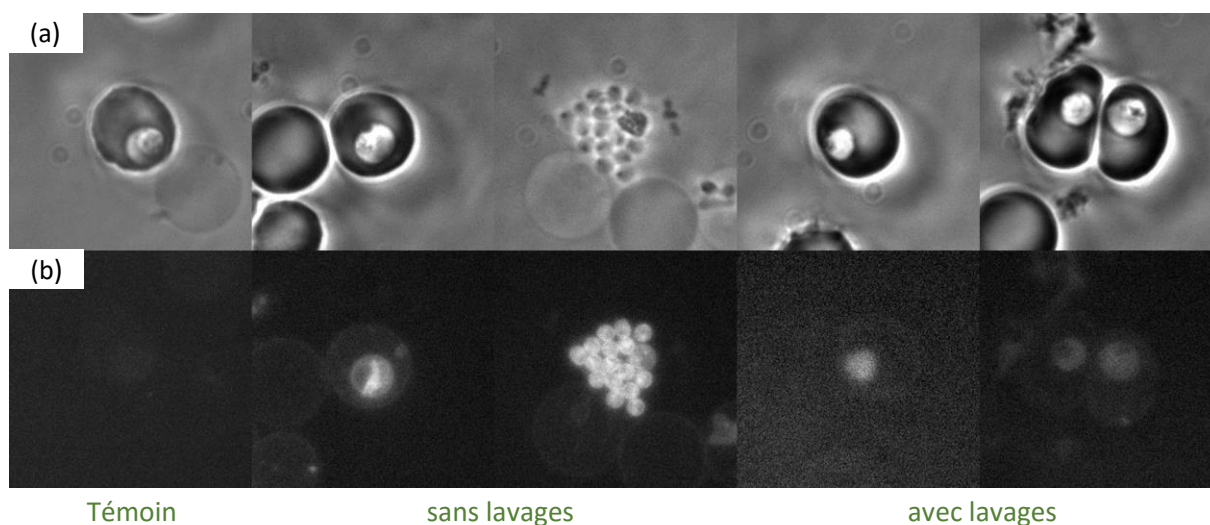


Figure 131 : Clichés de microscopie confocale (a) en contraste de phase et (b) de fluorescence (filtre DAPI, bandes passantes pour l'excitation : 365 ± 20 nm et pour l'émission : passe-haut 400 nm), de *P. f.* incubé avec 10 μ M de composé **111 pendant 30 min avec et sans lavages**

Comme pour les précédents dérivés, un marquage fluorescent est observé dans le parasite, au niveau du cytosol. Ce nouveau dérivé est donc également capable de traverser les membranes de l'érythrocyte et du parasite. Aucune fluorescence n'est cependant observée ni dans le milieu extracellulaire, ni dans l'hématie. En outre, on distingue un léger marquage de la membrane du globule rouge. On peut toutefois noter l'absence de cristaux extracellulaires témoignant de la meilleure solubilité du 3,8-céto-DMDIBO par rapport aux précédentes sondes.

Le composé **111** possède en revanche les mêmes propriétés que les autres dérivés, car son signal fluorescent est faible et photoblanchit rapidement. Après lavage au milieu de culture, on observe un faible marquage persistant essentiellement dans le parasite.

III.1.2. Marquage de *T. brucei*

De la même manière, le composé **111** a été incubé avec des trypanosomes vivants, à l'abri de la lumière et pendant 30 minutes, à une concentration de 10 μM . Des images de microscopie avant et après lavages au milieu de culture sont présentées ci-dessous (Figure 132) :

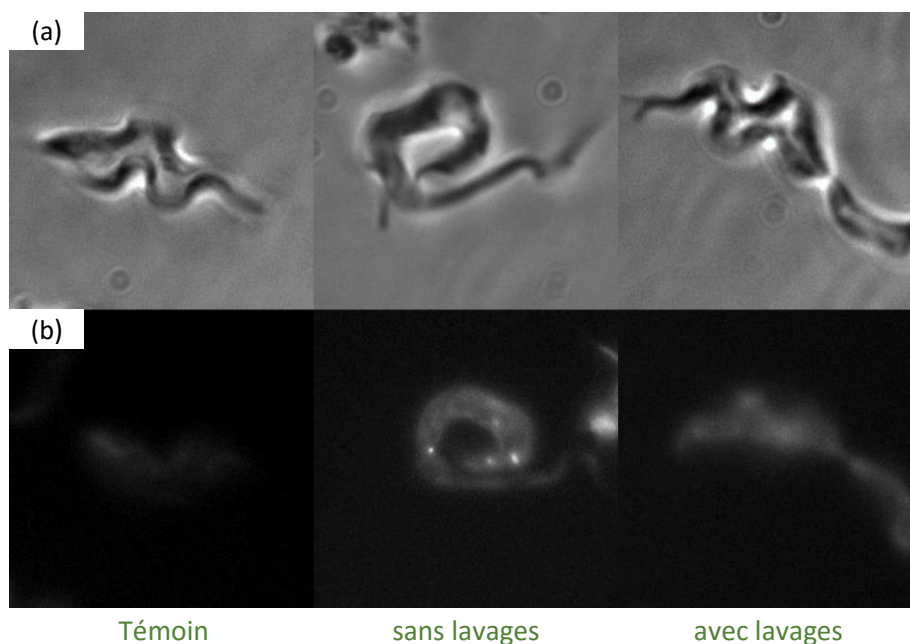


Figure 132 : Clichés de microscopie confocale (a) en contraste de phase et (b) de fluorescence (filtre DAPI, bandes passantes pour l'excitation : 365 ± 20 nm et pour l'émission : passe-haut 400 nm), de *T. b. brucei* incubé avec 10 μM de composé **111 pendant 30 min avec et sans lavages**

A l'instar des précédentes sondes, le 3,8-céto-DMDIBO marque le cytosol des trypanosomes. Ces derniers étant mobiles, nous avons pu vérifier que cette molécule n'entraînait pas de photosensibilité. Comme pour les autres composés, on observe une concentration de molécules fluorescentes dans des structures parasitaires indéterminées. Après lavage, la fluorescence persiste et semble être plus importante que dans le cas des cellules de *Plasmodium*. Néanmoins, ce signal est faible et le photoblanchiment apparaît rapidement.

III.2. Evaluation de la toxicité

Les tests d'inhibition *in cellulo* de la croissance des parasites ont été réalisés à la fois pour la sonde **111** et pour l'adduit **108a**. Ces tests sont nécessaires pour une application en milieu biologique sur des organismes vivants.

III.2.1. Tests d'inhibition de la croissance sur *T. brucei*

L'activité trypanocide des composés **111** et **108a** a été mesurée après 72 h par métabolisation de la résazurine sur les formes sanguines de *T. b. brucei*. Les molécules présentent une activité trypanocide significative et similaire au composé parent **34** avec des valeurs de CI_{50} d'environ 6 μM (Tableau 41).

<i>Molécule</i>	céto-DIBO (34)	céto-DMDIBO (111)	Adduit triazole (108a)
CI_{50} (μM) <i>T. b. b.</i> (72 h)	5,8 ± 1,7	6,9 ± 0,3	5,1 ± 0,9

Tableau 41 : Résultats d'inhibition de la croissance sur les formes sanguines de *T. b. b.*
Référence : Pentamidine : CI_{50} *T. b.* = 0,011 μM

Ainsi, le passage de la sonde libre à la sonde couplée ne change que modérément la toxicité sur *T. b. brucei*. Ces molécules sont tout de même un peu plus toxiques que le céto-TMDIBO **83** et le DINO **93**.

III.2.2. Tests d'inhibition de la croissance sur *P. falciparum*

L'activité antipaludique des molécules **111** et **108a** a été mesurée après 48 h par incorporation d'hypoxanthine tritiée. Contrairement au composé parent **34** et aux molécules synthétisées jusqu'alors, ces composés présentent la plus faible toxicité sur *P. falciparum* avec des valeurs de CI_{50} supérieures à 28 μM (Tableau 42).

<i>Molécule</i>	céto-DIBO (34)	céto-DMDIBO (111)	Adduit triazole (108a)
CI_{50} (μM) <i>P. f.</i> (48 h)	3,3 ± 0,5	28,7 ± 4,2	29,7 ± 4,2

Tableau 42 : Résultats d'inhibition de la croissance sur la souche FCB1 de *P. f.*
Référence : Chloroquine : CI_{50} *P. f.* = 0,072 μM

Comme pour les résultats sur *T. b. brucei*, on note que le passage de la sonde libre à la sonde couplée n'engendre pas de différence significative en termes de toxicité sur les parasites.

Conclusion

Sur la base de la modélisation moléculaire, nous avons pu synthétiser un nouveau dérivé du céto-DIBO, fluorescent et plus soluble. Celui-ci peut donner un adduit fluorescent, dont la longueur d'onde d'émission est différente du cyclooctyne, permettant une possible différenciation du signal de la sonde libre et de la sonde couplée. Cette nouvelle sonde pénètre les deux parasites que nous étudions et ne marque que leur cytosol. Même si les propriétés photophysiques de celle-ci ne sont pas idéales, ainsi que celles de son adduit triazole (rendement quantique de fluorescence très bas, photoblanchiment rapide, longueur d'onde d'excitation proche de l'UV), ces résultats constituent un réel progrès et démontrent que l'extinction de la fluorescence observée pour les adduits triazoles n'est pas systématique et qu'une modulation appropriée pourrait amener à obtenir des molécules conformes en tout point au cahier des charges.

Conclusion générale

Ces travaux de thèse se sont concentrés sur le développement d'un outil fluorescent pour la détection de molécules actives *in cellulo* chez deux parasites : *Plasmodium falciparum* et *Trypanosoma brucei*. Ce projet s'inscrit dans un contexte où la recherche de nouvelles molécules actives au sein du laboratoire pour lutter contre ces parasites a abouti à une question importante : ces molécules sont-elles capables d'entrer dans le parasite ?

Cet outil fluorescent est basé sur le concept de la chimie « click », sans catalyseur, impliquant les fonctions alcyne intracyclique et azoture. L'objectif a été la conception et la synthèse de nouveaux dérivés du céto-DIBO **34**, dibenzocyclooctynones fluorescentes, de manière à répondre à un cahier des charges très contraignant, rappelé ci-dessous (Figure 133) :

Chimie	Biologie	Photophysique
Reconnaissance spécifique de la molécule d'intérêt	Non réactifs vis-à-vis des fonctions biologiques	$\lambda_{\text{ex}} > 340 \text{ nm}$
Lien covalent à la molécule d'intérêt	Traverser les membranes et sans contraintes	Grand déplacement de Stokes $\Delta\nu$
Réaction rapide et stœchiométrique	Accumulation dans le cytosol	Modification de la fluorescence
Réalisation en conditions physiologiques	Quantification sonde libre VS sonde couplée	Faible photoblanchiment
		Grand rendement quantique de fluorescence Φ_f

Figure 133 : Cahier des charges des sondes fluorescentes

I – Sondes de première génération

Une première approche a consisté en la synthèse de dérivés par la voie de Leeper décrite pour le TMDIBO et a abouti à quatre nouveaux dérivés, malgré une synthèse difficile (Figure 134).

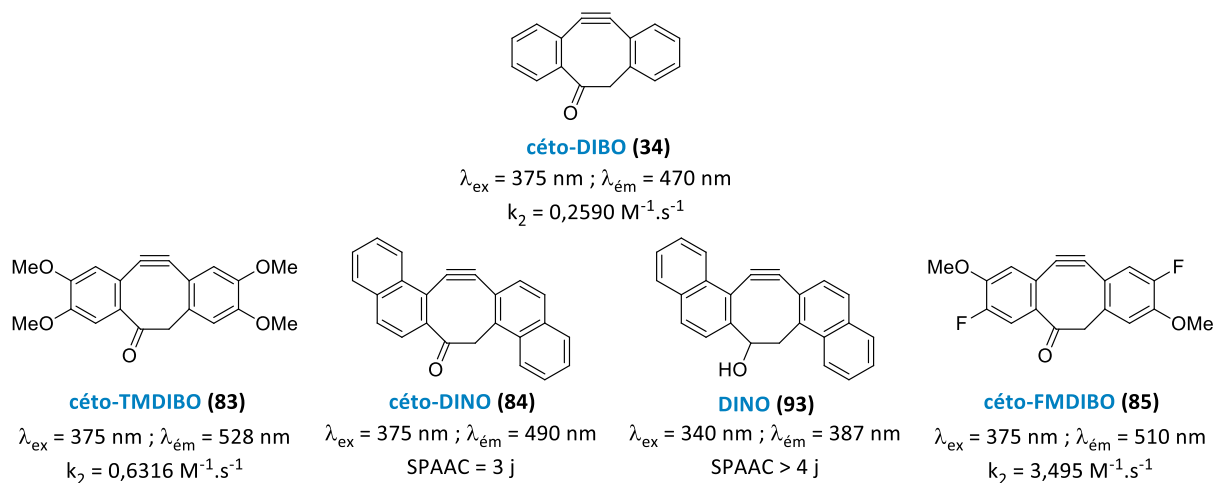


Figure 134 : Dibenzocyclooctynones fluorescentes de première génération

Nous avons montré que ces sondes sont capables de réagir avec des fonctions azotures avec des cinétiques compatibles avec notre projet (à l'exception des dérivés dinaphtyles). De plus, le composé **85** présente une constante de vitesse bimoléculaire rivalisant avec celle du TMTM **31**, cyclooctyne décrit dans la littérature comme le plus réactif. En outre, les adduits formés ne possèdent pas de propriétés de fluorescence et à l'instar des cyclooctynes correspondants, sont peu solubles.

Nous avons aussi démontré que ces sondes entrent bien dans les parasites que nous étudions et engendrent un marquage cytosolique. Nous avons également confirmé qu'une de ces sondes (le composé **83**) pouvait détecter par chimie « click » un fluorophore commercial possédant une fonction azoture. Cette détection a été vérifiée *in cellulo*, en conditions équimolaire et diluée (10 μ M), sur des cellules de trypanosomes vivants incubées avec le TAMRA- N_3 **104**, malgré sa grande mobilité due à une faible affinité pour la cellule du parasite.

II – Sondes de deuxième génération

L'obtention systématique de triazoles non fluorescents nous a conduits à réaliser des études de modélisation moléculaire avec l'aide du Dr. Gilles Clavier afin de comprendre ce phénomène et d'envisager d'y remédier. Ainsi, ces sondes fluorescentes de première génération aboutissent à des adduits dont la présence, à l'état excité, d'un état triplet proche en énergie contribue à l'extinction de la fluorescence par désexcitation non radiative. D'après ces calculs, ceci ne serait dû ni au noyau triazole, ni à la nature du dipôle 1,3, mais à la position des substituants sur les sondes elles-mêmes.

Ainsi, pour parvenir à former des adduits fluorescents, la synthèse du composé **111** substitué par des groupements électrodonneurs a été envisagée. Un tel composé n'étant pas accessible par la voie de synthèse utilisée pour les précédentes sondes, nous avons développé une nouvelle voie dans laquelle l'obtention de la fonction alcyne intracyclique est plus simple, et qui peut aboutir à la synthèse de cyclooctynes dissymétriques. Cette voie s'est révélée moins difficile et a abouti au dérivé **111** souhaité, mais également à deux régioisomères 1,8- et 3,10-disubstitués (**132** et **133**), tous trois fluorescents (Figure 135). La réactivité de ces régioisomères vis-à-vis de la SPAAC n'est cependant pas assez efficace.

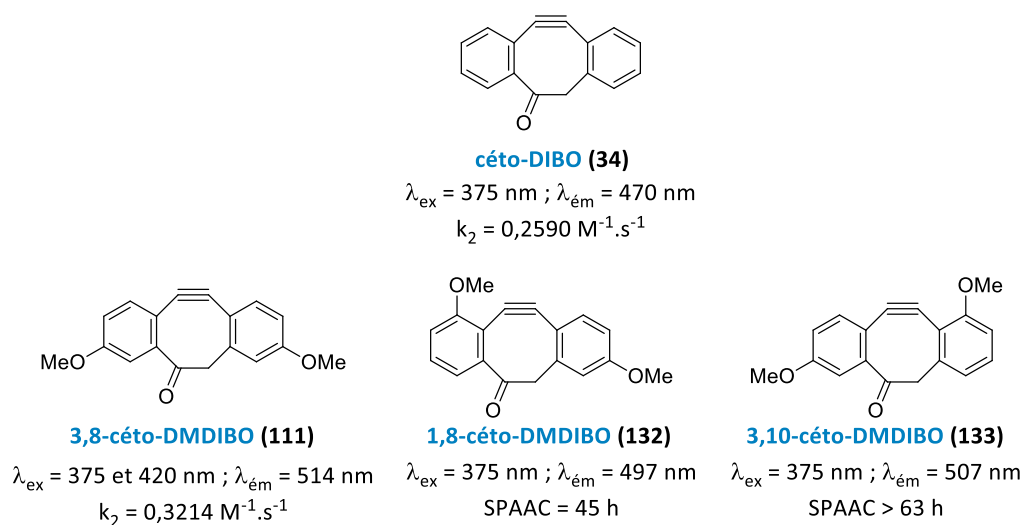


Figure 135 : Dibenzocyclooctynes fluorescents de deuxième génération

Chacune de ces sondes conduit à la formation d'un adduit fluorescent, ce qui valide les calculs de modélisation et contredit les premières hypothèses de Boons concernant le noyau triazole. Les propriétés photophysiques du céto-DMDIBO **111** et du triazole 1,4 **108a** (Figure 136) peuvent être encore améliorées pour notre projet (rendements quantiques de fluorescence faible et longueur d'onde d'excitation proche de l'UV), mais ces résultats représentent une ouverture très encourageante car ils ont permis d'obtenir une sonde répondant à un grand nombre de critères du cahier des charges, les paramètres restant à améliorer n'étant plus que l'augmentation du rendement quantique de fluorescence, la diminution du photoblanchiment et la possibilité de quantifier la réaction SPAAC.

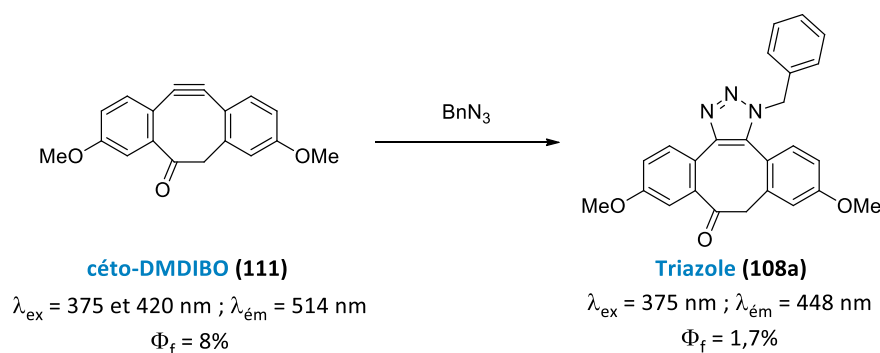


Figure 136 : Propriétés de fluorescence des composés **111** et **108a**

III – Perspectives

A l'instar des expériences de chimie « click » *in cellulo* réalisées avec le céto-TMDIBO **83**, il est nécessaire de démontrer que le 3,8-céto-DMDIBO **111** est capable de détecter de petites molécules ayant une fonction azoture au sein des parasites et de vérifier qu'une différenciation du signal de cette sonde libre par rapport au signal de l'adduit formée est possible. Si cela est vérifié, un essai sur la détection des arylthiophènes tétrasubstitués **1** et **2** permettra de répondre à la question initiale concernant leur capacité à entrer dans les parasites pour inhiber la FTase.

De manière à améliorer les propriétés de fluorescence des sondes de deuxième génération, il serait utile de synthétiser des dérivés comme le céto-TADIBO **112** et le céto-AcADIBO **113**, voire des dérivés dissymétriques. Il est préférable d'associer à la synthèse de tels dérivés des études de modélisation moléculaire.

Enfin, il serait intéressant d'appliquer cet outil de fluorescence, une fois optimisé, à d'autres molécules actives et même sur d'autres types cellulaires.

Partie expérimentale

Chapitre I : Généralités

I – Solvants et réactifs

Les réactifs et le THF anhydre commerciaux sont utilisés sans purification préalable.

Les solvants anhydres DCM, ACN et toluène sont purifiés sur un appareil à colonnes Innovative Technology Inc. PureSolv.

II - Chromatographies sur couche mince, épaisse et flash

Les réactions sont suivies sur CCM (gel de silice 60 F₂₅₄ Merck, 0,15 mm d'épaisseur) au moyen d'une lampe UV ($\lambda = 254$ et 366 nm).

Le molybdate sulfurique aqueux est utilisé comme agent révélateur.

Les chromatographies sur couche épaisse sont effectuées sur des plaques préparatives d'épaisseurs variables (0,5, 1 et 2 mm) selon la quantité à purifier.

Les chromatographies flash (sur colonne) sont réalisées à l'aide d'un appareil de purification Combiflash Companion® commercialisé par la société Serlabo fonctionnant avec des colonnes de silice prépackée Redisep (taille : 4 à 120 g, granulométrie de 50 μ M).

III - Appareils d'analyse

III.1. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de RMN ¹H, ¹³C et ¹⁹F sont obtenus sur les appareils Brüker Avance 300® (300 MHz pour le proton et le fluor, 75 MHz pour le carbone) ou Brüker Avance 500® (500 MHz pour le proton et le fluor, 125 MHz pour le carbone).

Le chloroforme deutéré (CDCl₃), le diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO-*d*₆) et l'acétonitrile deutéré (CD₃CN) sont employés comme solvants. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en parties par million (ppm) par rapport au chloroforme (7,26 ppm pour les spectres ¹H et 77,2 ppm pour les spectres ¹³C), au diméthylsulfoxyde (2,50 ppm pour les spectres ¹H et 39,5 ppm pour les spectres ¹³C) et à l'acétonitrile (1,95 ppm pour les spectres ¹H, 1,60 et 117,8 ppm pour les spectres ¹³C). Les constantes de couplage *J* sont exprimées en Hertz (Hz). Dans le cas des spectres ¹⁹F, le spectromètre calibre les spectres obtenus par rapport au déplacement chimique du deutérium du solvant utilisé. Les spectres ¹⁹F-CPD (Composite Pulse Decoupling) correspondent aux spectres ¹⁹F découplés proton et permettent parfois de voir la constante de couplage ¹J avec le carbone.

Les abréviations suivantes sont utilisées : s (singulet), d (doublet), t (triplet) et m (multiplet).

L'attribution précise des signaux des protons, fluors et carbones a été accomplie par analyse des spectres COSY, DEPT, HSQC et HMBC sur le logiciel NMRnotebook®. Néanmoins, il n'est pas toujours possible d'assigner précisément un déplacement chimique à un proton ou un carbone aromatique. C'est pourquoi, dans ces situations, l'attribution sera désignée par **Har** s'il s'agit d'un proton ou **CHar** ou **Car** s'il s'agit respectivement d'un carbone tertiaire ou d'un carbone quaternaire.

III.2. Spectrométrie de masse (SM)

Les spectres de masse basse et haute résolution par électronébulisation (ESI : *Electro Spray Ionisation*) ont été effectués sur une chaîne chromatographique Waters Acquity UPLC couplée à un spectromètre de masse Waters LCT Premier XE composé d'une source électrospray (ESI) et d'un analyseur à temps de vol.

Les spectres de masse MALDI (Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice) ont été réalisés sur un appareil Voyager DE-STR (AB Sciex) lorsqu'il s'agit de masse moyenne, et sur un appareil MALDI-TOF UltrafleXtreme (Brüker) lorsqu'il s'agit de masse haute résolution, en utilisant une matrice DCTB (2-[(2E)-3-(4-*tert*-butylphényl)-2-méthylprop-2-énylidène]malononitrile).

Les spectres de masse APPI (Photo-Ionisation à Pression Atmosphérique) de haute résolution par électronébulisation ont été réalisés sur un spectromètre Q-ToF 6540 (Agilent) avec une ionisation positive par réaction avec des photons émis par une lampe UV.

III.3. Spectrométrie UV-visible

Les spectres d'absorption UV-Visible ont été enregistrés avec un spectrophotomètre à double faisceau Cary 5000 (Varian, Palo Alto, CA, USA) à l'ENS Cachan. Le domaine spectral des deux lampes (arc deutérium pour l'UV et halogène au tungstène pour le visible) s'étend entre 175 et 3300 nm. Les cuves utilisées sont en quartz de la marque Hellma de trajet optique 1 cm et de volume 1 mL.

Les suivis cinétiques par UV ont été réalisés avec un spectrophotomètre Cary 500 à l'ICSN, similaire à celui précédemment décrit.

III.4. Spectrométrie de fluorescence

Les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence ont été réalisés à l'ENS Cachan sur un spectrofluoromètre Fluoromax-4 de Jobin-Yvon, en L (Horiba, Kyoto, Japon). L'excitation est effectuée par une lampe à arc Xénon de 150 W dont le domaine spectral s'étend de 200 à 950 nm. Les longueurs d'ondes à l'excitation comme à l'émission sont sélectionnées par des monochromateurs constitués de réseaux blazés de 1200 traits.mm⁻¹. Les bandes passantes de ces monochromateurs sont ajustées par ordinateur. La fluorescence est collectée perpendiculairement à l'excitation par un photomultiplicateur refroidi par un étage Peltier. Les spectres sont enregistrés sur un ordinateur sous Windows XP doté du logiciel FluoEssence. Des cuves de fluorescence en quartz de trajet optique 1 cm de la marque Hellma ont été utilisées pour ces mesures.

III.5. Fluorescence résolue en temps par comptage de photons

Le montage de comptage à photon unique, réalisé à l'ENS Cachan et utilisé pour la mesure des déclins de fluorescences en solution des différentes molécules synthétisées est présenté ci-dessous (Figure 137). Cette méthode repose sur le fait que la probabilité de détecter un photon à un instant t après une impulsion d'excitation est proportionnelle à l'intensité de fluorescence à cet instant.

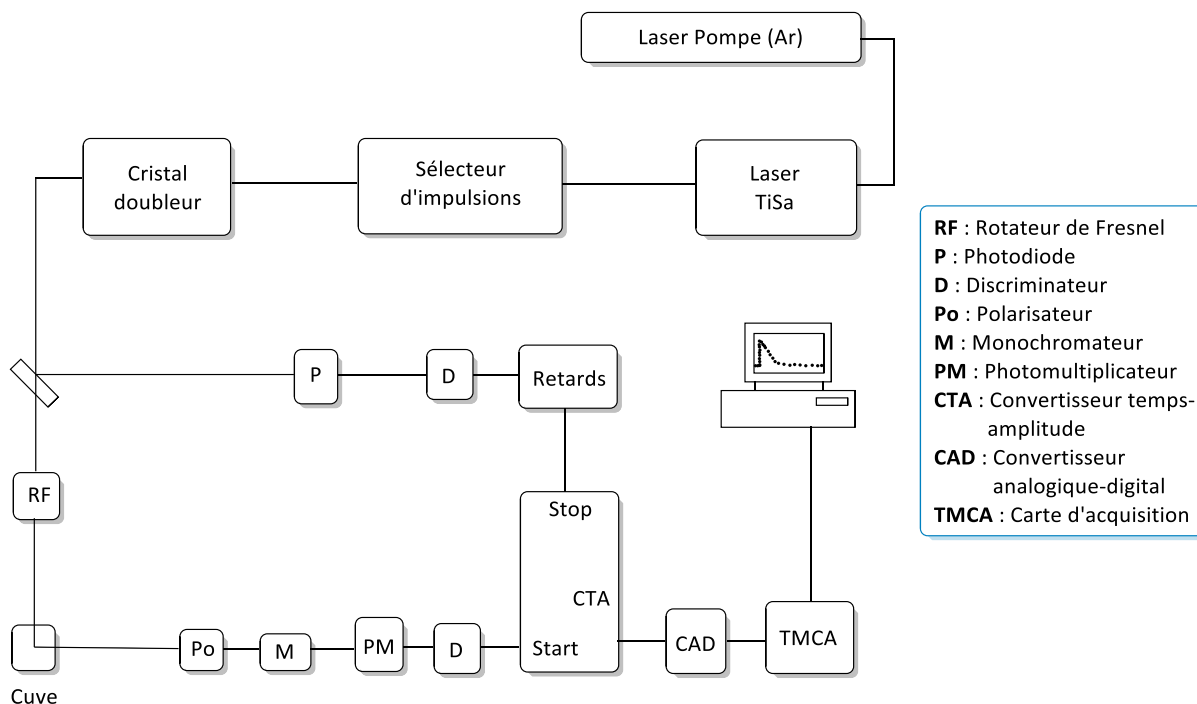


Figure 137 : Montage expérimental du comptage à photon unique résolue en temps

La source impulsionnelle utilisée est un laser Tsunami (Spectra Physics, Mountain View, CA, USA) à modes bloqués constitué d'un cœur de saphir dopé par des ions titane (TiSa). Il est pompé par un laser à argon ionisé BeamLock. Les impulsions délivrées, avec un taux de répétition de 80 MHz et une polarisation verticale, ont une largeur à mi-hauteur de 1,3 ps et ont une longueur d'onde de 750 nm (ce laser est accordable entre 700 et 1000 nm). Le taux de répétition est ensuite abaissé à 4 MHz par un sélecteur d'impulsions acousto-optique. On a ainsi une impulsion toutes les 250 ns, ce qui permet l'étude de molécules ayant des durées de vie de fluorescence assez longues.

Le faisceau traverse un module comportant un cristal de triborate de lithium (LiB_3O_5) qui possède un excellent rendement de génération de second harmonique. La fréquence est ainsi doublée pour obtenir une longueur d'onde diminuée de moitié dans l'UV de 375 nm. La polarisation en sortie de cristal est alors horizontale. Le faisceau laser traverse un rotateur de Fresnel (RF) qui permet de faire tourner le plan de polarisation. On peut ainsi exciter l'échantillon suivant une polarisation verticale ou horizontale.

La fluorescence émise par l'échantillon ainsi excité est alors détectée perpendiculairement après passage par un polarisateur (Po) qui choisit la polarisation mesurée, puis un monochromateur (M) à réseau holographique (Jobin-Yvon, Horiba, H10) ou par un filtre passe-haut ayant une fréquence de coupure légèrement au-delà de la longueur d'onde du laser afin d'éliminer les réflexions du laser tout en laissant passer la fluorescence émise. Les photons de fluorescence sont détectés par un

photomultiplicateur (PM) à galette de microcanaux (Hamamatsu Multi Chanel Plate R3809U) qui les convertit en électrons par effet photoélectrique. L'électron ainsi décroché de la cathode est converti en une avalanche de quelques 10^7 électrons par un système de dynodes. Les avalanches ayant une amplitude suffisante sont sélectionnées par un discriminateur (D) à fraction constante qui permet de négliger une partie du bruit et des impulsions parasites (la dénomination « à fraction constante » signifiant que le discriminateur déclenche sur le maximum de l'impulsion). A la sortie de celui-ci, le signal électrique est envoyé au convertisseur temps-amplitude (CTA, Tennelec TC864) en déclenchant le signal « start ».

Dans le même temps, une partie du faisceau laser est envoyée sur la photodiode (P). L'impulsion issue de la photodiode, sélectionnée par un autre discriminateur et retardée (par une série de retards connus et réglables) est également envoyée sur le CTA et constitue le signal « stop ». Pour que l'impulsion de la photodiode arrive sur le chronomètre après « start », celle-ci est retardée dans une série de câbles jusqu'à un retard de 160 ns. L'amplitude du signal de sortie du CTA est d'ailleurs proportionnelle à ce retard. Il est alors numérisé par un convertisseur analogique-digital (CAD), puis acquis par l'ordinateur au moyen d'une carte d'acquisition (TMCA). Au niveau de la numérisation, on définit également le nombre de canaux temporels sur lequel est ensuite reconstruit le déclin. Les photons ayant un retard compris entre $n\delta t$ et $(n+1)\delta t$ sont comptés dans le $n^{\text{ième}}$ canal. L'histogramme du nombre de photons comptés par chacun des canaux reconstruit le déclin de la fluorescence (Figure 138).

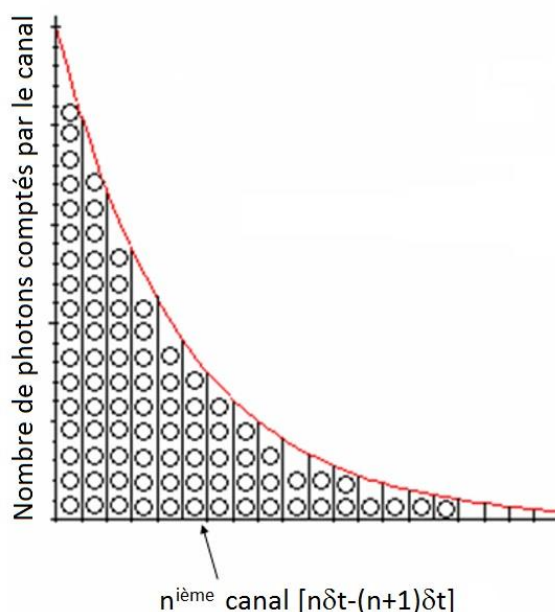


Figure 138 : Reconstruction du déclin de fluorescence par comptage de photon unique

III.6. Rayonet RPR-100

Les réactions de photolyse ont été effectuées sur un réacteur photochimique Rayonet RPR-100 équipé de 16 tubes (14 W chacun) arrangés de manière circulaire et irradiant avec une intensité de sortie maximale centrée à 350 nm. La température observée dans des conditions normales d'utilisation est approximativement de 35°C en présence d'un ventilateur.

III.7. Infrarouge (IR)

Les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistrés sur un spectromètre Perkin-Elmer Spectrum BX. Les produits sont déposés purs sur la cellule de détection. Les valeurs des bandes d'absorption sont exprimées en cm^{-1} .

III.8. Point de fusion (Pf)

Les points de fusion ont été déterminés en tube capillaire sur un appareil Büchi B-450 et ne sont pas corrigés.

III.9. Chromatographie liquide à ultra-haute pression (UPLC)

Les données UPLC pour l'analyse de réactions en masse sont obtenues à partir de l'appareil Waters Acquity UPLC équipé d'un détecteur TQD. Les produits contenus dans les échantillons sont analysés après passage sur une colonne Waters HSS C_{18} de $1,8 \mu\text{m}$ de dimension $2,1 \times 50 \text{ mm}$ par un détecteur de masse de type triple quadripôle (où une tension de cône de 20 à 40 V est appliquée). Cet appareil enregistre les rapports m/z compris entre 50 et 1000 et possède un détecteur UV à barrettes de diodes qui permet de visualiser les composés répondant à l'UV entre 200 et 400 nm.

L'instrument utilisé pour la détermination des seuils de détection en masse consiste en un spectromètre de masse de type triple quadripôle modèle TSQ Vantage (Thermo Scientific), couplé à une chaîne chromatographique Ultimate 3000 (Dionex) et à un détecteur à barrettes de diodes (PDA, *Photo Diode Array*) de type Accela (Thermo Scientific). L'appareil est équipé du logiciel Xcalibur 2.1 relié à une interface Chromeleon 6.80 pour la gestion spécifique du module de chromatographie.

La détermination des seuils de détection en fluorescence est réalisée sur un appareil Waters Alliance HPLC couplé à un détecteur de fluorescence.

La méthode fait intervenir deux mélanges de solvant : $\text{H}_2\text{O} + 0,1\%$ d'acide formique (solvant 1) et $\text{ACN} + 0,1\%$ d'acide formique (solvant 2). La procédure utilisée comporte trois phases :

- une élution isochratique d'un mélange solvant 1/solvant 2 : 95:5 pendant 5 min ;
- une élution par un gradient solvant 1 /solvant 2 de 95:5 à 0:100 en 3,5 min ;
- une élution du solvant 2 pendant 1 min.

IV - Appareil micro-ondes

L'appareillage micro-ondes qui a été utilisé est un appareil Microwave 300 (Anton Paar). Il s'agit d'un appareil constitué d'un réacteur monomode à ondes focalisées par un guide d'ondes. Toutes les réactions ont été réalisées dans des récipients en pyrex scellés. Le récipient contenant le mélange réactionnel est introduit dans le réacteur monomode. La puissance, la température et le temps de réaction sont programmés directement sur l'appareil. Ainsi, cet appareil permet l'asservissement de la puissance ou de la température ainsi que l'enregistrement des courbes de température et de puissance en fonction du temps pendant les expériences.

V – Microscopie de fluorescence

Le système d'acquisition est basé sur un microscope confocal inversé Nikon Eclipse TE300 comportant un condenseur à contraste de phase et muni d'un dispositif pour l'épifluorescence équipé par des blocs de Ploem monobande ou multibande optimisé soit pour la détection d'un fluorophore soit pour la multiexcitation dans le cadre de la colocalisation de plusieurs sondes.

L'acquisition est réalisée au moyen d'une « caméra » CCD refroidie à -25°C (CCD interligne de 1392 par 1040 photosites avec une taille de puits de 6,45 µm, numérisation à 20 Mhz sur 12 bits soit 4096 niveaux de gris, Roper Instrument France). L'ensemble du processus d'acquisition, roue à filtres d'excitation (Sutter Instrument Corporation), système piezo (Physik Instrumente [PI] GmbH, Allemagne) pour le micro déplacement en Z de l'objectif et caméra, est sous le contrôle du logiciel Metamorph (Molecular Device, Silicon Valley, USA). Le système d'illumination est basé sur une lampe à vapeur de mercure classique (émission très intenses pour les raies 334, 365, 405, 435, 546, 577-579, faible entre les raies).

Les filtres d'excitation, d'émission et les miroirs dichroïques proviennent de chez Chroma ou Semrock (USA). La détection du DAPI est utilisée pour l'ensemble des expériences car les bandes passantes correspondent le mieux aux propriétés de fluorescence des produits étudiés :

- Excitation interférentiel 365/20
- Dichroïque 400
- Emission Passe-haut 400

L'objectif est un Planfluor 100x Phaco 3 avec une ouverture numérique de 1,3 correspondant à une résolution limite de $0,61 \lambda / 1,3$ soit 0,211 µm pour une longueur d'onde d'émission de 0,45 µm (DAPI). Le temps d'intégration typique pour une image est de l'ordre de 100 ms. Les images sont brutes sans soustraction du fond et des courants de noir et sans correction de nuances.

VI – Matériel et tests biologiques

VI.1. Culture des parasites

VI.1.1. Culture de *P. falciparum*

La souche de *P. falciparum* utilisée est de type FcB1, provenant de Colombie et résistante à la chloroquine. Selon la méthode de Trager et Jensen, elle est cultivée sur des hématies O⁺ à un hématoците de 4%, sous une atmosphère composée de 91% de N₂, 3% de CO₂ et 6% d'O₂ à 37°C.

Les hématies sont lavées deux fois dans du milieu de culture RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) sans sérum juste avant utilisation. Si nécessaire, 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine sont ajoutés au milieu. Enfin, 5 à 8% (v/v) de sérum humain décomplémenté (30 minutes à 56°C) est additionné, le tout est filtré en condition stérile et peut être conservé une à deux semaines à 4°C. Pour les faibles parasitemies, le milieu est chargé quotidiennement par aspiration et plusieurs fois par jour dans le cas de parasitemies plus importantes (> 5%). Les cultures à parasitemie élevée sont diluées avec de nouvelles hématies, préalablement lavées par centrifugation avec le milieu de culture. La parasitemie est estimée sur frottis sanguins colorés au Diff Quick[®] par comptage d'au

moins 1000 hématies. Cette coloration repose sur l'action complémentaire de deux colorants neutres et sur l'affinité des éléments cellulaires basiques ou éosinophiles (cytoplasme des hématies et du parasite coloré en rose) tandis que le bleu de méthylène (colorant basique) va se fixer sur les éléments cellulaires acides tels que l'ADN. Les hématies de mammifères étant anucléées, la coloration au bleu de méthylène se concentre sur le parasite au sein des hématies infectées.

VI.1.2. Culture de *T. brucei*

Les formes sanguines de *Trypanosoma brucei brucei* de la souche 90-13, non pathogène pour l'homme et utilisée pour les expériences d'imagerie de fluorescence et de marquage *via* la chimie « click », est maintenue en culture axénique dans le milieu de culture Hirumi (HMI9) complété avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur, à 37°C, sous une atmosphère de 5% de CO₂.^{145,146} Pour toutes les expériences, les parasites proviennent de cultures en phase de croissance logarithmique, sont concentrés par centrifugation à 3000 g et utilisés immédiatement.

VI.2. Test d'inhibition de la croissance des parasites

VI.2.1. Evaluation *in cellulo* de l'activité antipaludique

L'évaluation est basée sur la technique de microdilution semi-automatique de Desjardins.

Elle utilise comme précurseur radioactif l'hypoxanthine tritiée, un intermédiaire de synthèse des acides nucléiques du parasite. Les hématies humaines étant dépourvues de noyau et de la machinerie de synthèse d'ADN, l'incorporation d'hypoxanthine tritiée dans les cultures parasitées est le reflet du développement parasitaire.

L'inhibition de la croissance parasitaire pour chaque concentration de produit est déterminée par comparaison entre la radioactivité incorporée dans une culture traitée et celle incorporée dans une culture non traitée (contrôle) contenant la même quantité de DMSO et maintenue sur une même plaque. La valeur de CI₅₀ est calculée à partir de la moyenne des courbes dose-réponse obtenues pour plusieurs expériences indépendantes.

Une culture asynchrone de *P. falciparum* est mise en présence de concentrations successives décroissantes de la drogue testée dans une plaque 96 puits. Le volume total de chaque puits est de 200 µL : 100 µL de la molécule diluée dans le milieu de culture (à une concentration deux fois supérieure à la concentration finale désirée) et 100 µL de suspension d'hématies parasitées dans du milieu de culture (1% de parasitémie, 2% d'hématocrite). La chloroquine a également été testée et constitue la molécule de référence. La plaque est incubée 24 heures à 37°C sous une atmosphère appauvrie en oxygène puis 25 µL d'hypoxanthine tritiée (0,5 µCi) sont distribués dans chaque puits.

La plaque est une nouvelle fois incubée dans les mêmes conditions pendant 24 heures puis congelée à -80°C pour lyser les cellules. Après décongélation, le lysat cellulaire est aspiré sur papier en fibre en verre afin de récupérer l'ADN parasitaire. Le filtre est lavé, séché et imbibé de liquide scintillant. La radioactivité est alors mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Wallac 1450 MicroBeta® Trilux.

¹⁴⁵ Hirumi, H.; Hirumi, K. *Parasitol. Today* **1994**, *10*, 80-84.

¹⁴⁶ Bastos, I. M.; Motta, F. N.; Charneau, S.; Santana, J. M.; Dubost, L.; Augustyns, K.; Grellier, P. *Microbes Infect.* **2010**, *12*, 457-466.

VI.2.2. Evaluation *in cellulo* de l'activité trypanocide

Le test effectué sur les formes sanguines de *T. brucei gambiense* et de *T. brucei brucei* est réalisé sur la souche Feo et 90-13, respectivement. La prolifération des parasites est mesurée à l'aide d'une molécule fluorescente, l'AlamarBlue®. Il s'agit d'un réactif pro-fluorescent qui permet une mesure quantitative de la prolifération de nombreuses lignées cellulaires.¹⁴⁷ Ce réactif est un indicateur de croissance basé sur la détection de l'activité métabolique par réduction de la résazurine, bleue et non fluorescente, en résosfurine, rose et fluorescente (Figure 139).

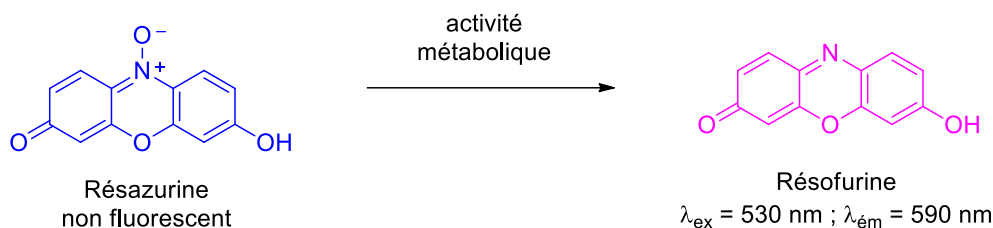


Figure 139 : Test à l'AlamarBlue®

La fluorescence de ce produit, proportionnelle au nombre de cellules, change en réponse à la réduction chimique du milieu de culture lors de la croissance cellulaire. L'AlamarBlue® (solution commerciale) est donc ajouté à raison de 100 μL par puits et laissé au moins 3 heures jusqu'à ce qu'une fluorescence soit mesurable sans ambiguïté dans les témoins. La fluorescence est mesurée aux longueurs d'ondes d'excitation de 530-560 nm et d'émission 590-630 nm. L'intensité du signal de fluorescence mesurée est proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans le milieu. Le pourcentage d'inhibition est calculé par rapport à la fluorescence des puits de contrôle et soustraction de bruit de fond (puits négatifs).

Le test est effectué dans des plaques 24 puits. Dans chaque puits, 1 mL de suspension est déposé ainsi que 10 μL d'inhibiteur potentiel dans le DMSO. Les cellules croissent 3 jours à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO_2 puis la fluorescence est lue grâce à un spectrophotomètre Bio-Tek FL600 Microplate Fluorescence Reader et permet de déterminer le pourcentage d'inhibition d'un produit en fonction de la fluorescence des témoins.

VII - Modélisation

VII.1. Calculateur et logiciels

Les modélisations quantiques des molécules ont été effectuées par le Dr. Gilles Clavier avec le logiciel Gaussian (Gaussian 09, Revision D.01¹⁴⁸) au Meso-centre de l'ENS de Cachan. Les résultats ont été visualisés avec le logiciel Gaussview (version 5.0).

¹⁴⁷ O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421-5426.

¹⁴⁸ Gaussian 09, Revision D.01, Frisch, M.; Trucks, G.; Schlegel, H.; Scuseria, G.; Robb, M.; Cheeseman, J.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H.; Izmaylov, A.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, Jr., J.; Peralta, J.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J.; Brothers, E.; Kudin, K.; Staroverov, V.; Keith, T.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J.; Iyengar, S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J.; Klene, M.; Knox, J.; Cross, J.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R.; Yazyev, O.; Austin, A.; Cammi,

VII.2. Optimisation de géométrie à l'état fondamental

Les géométries ont été optimisées avec les méthodes de la densité de la fonctionnelle hybride B3LYP et la base 6-31+G(d). Un calcul de fréquences a été réalisé pour confirmer l'obtention d'une géométrie correspondant à un minimum d'énergie (aucune fréquence imaginaire).

VII.3. TD-DFT

La modélisation des transitions optiques (spectres d'absorption) a été effectuée par un calcul de TD-DFT (*Time-Dependent Density Functional Theory*), utilisant la fonctionnelle hybride PBE0 qui a été optimisée pour les calculs de spectroscopie^{149,150} et la base 6-311+G(d,p) sur la molécule à sa géométrie à l'état fondamental. Une optimisation de géométrie du premier état excité a ensuite été réalisée (PBE0/6-11+G(d,p)) pour obtenir sa structure, suivie d'un nouveau calcul de TD-DFT incluant les états singulets et triplets pour expliciter les propriétés de fluorescence. La localisation du trou et de l'électron dans les états excités a été obtenue par la méthode « *Natural Transition Orbitals* » (NTO).¹⁵¹

VIII – Visualisation de la chimie « click » par LC-MS/MS

VIII.1. Préparation des formes sanguines de *Trypanosoma brucei brucei*

180 mL de milieu de culture contenant $7,2 \times 10^5$ parasites/mL sont centrifugés (3000 rpm, 5 min, frein 4, TA). Le culot est repris dans 60 mL de milieu de culture (2×10^6 parasites/mL), conservés à 37°C et avec une atmosphère à 5% CO₂ et divisés ainsi :

- 10mL dans une boîte de 25 cm² (témoin céto-TMDIBO)
- 10mL dans une boîte de 25 cm² (témoin TAMRA-N₃)
- 40 mL dans une boîte de 75 cm² (céto-TMDIBO + TAMRA-N₃)

VIII.2. Protocole d'incubation initiale des parasites avec le TAMRA-N₃

VIII.2.1. Marquage par chimie « click » *in cellulo*

40 µL de TAMRA-N₃ à 10 mM (concentration finale : 10 µM) sont ajoutés aux 40 mL de culture de parasites préparée plus haut et les parasites sont incubés 1 h, à 37°C et avec une atmosphère à 5% CO₂. Après ce temps, le milieu de culture est centrifugé (3000 rpm, 5 min, TA) et le culot est repris dans 40 mL de milieu de culture. 40µL de céto-TMDIBO à 10 mM (concentration finale : 10 µM) sont ajoutés et les parasites sont incubés 2 h et 6 h, à 37°C et avec 5% CO₂. Le milieu de culture est centrifugé (3000 rpm, 5 min, frein 5, TA) et les culots obtenus sont placés dans un tube eppendorf avec 1,5 mL de PBS (tampon phosphate saturé en sel contenant 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ et 1,76 mM de KH₂PO₄).

Une première centrifugation est appliquée (10 000 g, 1 min, TA) et le surnageant éliminé. Le culot est ainsi repris à l'identique trois fois et puis congelé à -80°C.

R.; Pomelli, C.; Ochterski, J.; Martin, R.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V.; Voth, G.; Salvador, P.; Dannerberg, J.; Dapprich, S.; Daniels, A.; Farkas, O.; Foresman, J.; Ortiz, J.; Cioslowski, J.; Fox, D. *Gaussian Inc.*, Wallingford CT, **2013**.

¹⁴⁹ Adamo, C.; Jacquemin, D. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 845-856.

¹⁵⁰ Jacquemin, D.; Perpete, E. A.; Ciofini, I.; Adamo, C. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 326-334.

¹⁵¹ Martin, R. L. J. *Chem. Phys.* **2003**, *118*, 4775-4777.

VIII.2.2. Témoin TAMRA-N₃

10 µL de TAMRA-N₃ à 10 mM (concentration finale : 10 µM) sont ajoutés aux 10 mL de culture de parasites préparée plus haut et les parasites sont incubés 1 h, à 37°C et avec une atmosphère à 5% CO₂. Après ce temps, le milieu de culture est centrifugé (3000 rpm, 5 min, TA) et le culot est repris dans 10 mL de milieu de culture. 10µL de DMSO sont ajoutés et les parasites sont incubés 2 h et 6 h, à 37°C et avec 5% CO₂. Le milieu de culture est centrifugé (3000 rpm, 5 min, frein 5, TA) et le culot obtenu est lavé quatre fois avec 1,5 mL de PBS avant d'être congelé à -80°C.

VIII.2.3. Témoin céto-TMDIBO

10 µL de DMSO sont ajoutés aux 10 mL de culture de parasites préparée plus haut et les parasites sont incubés 1 h, à 37°C et avec une atmosphère à 5% CO₂. Après ce temps, le milieu de culture est centrifugé (3000 rpm, 5 min, TA) et le culot est repris dans 10 mL de milieu de culture. 10 µL de céto-TMDIBO à 10 mM (concentration finale : 10 µM) sont ajoutés et les parasites sont incubés 2 h et 6 h, à 37°C et avec 5% CO₂. Le milieu de culture est centrifugé (3000 rpm, 5 min, frein 5, TA) et le culot obtenu est lavé quatre fois avec 1,5 mL de PBS avant d'être congelé à -80°C.

VIII.2.4. Protocoles d'extraction des culots

Les culots sont décongelés avant d'ajouter 100 µL d'eau millipore. Les fractions sont homogénéisées au vortex puis congelées dans l'azote liquide, décongelées dans un bain à 37°C et de nouveau homogénéisées. Ce cycle est répété trois fois. 450 µL d'un mélange méthanol/acétate d'éthyle (1:2, v/v) sont ajoutés, les fractions sont agitées et la phase organique est isolée. La phase aqueuse est ainsi extraite trois fois, les phases organiques réunies sont évaporées à l'évaporateur rotatif avant d'être reprises dans 500 µL de méthanol. Après filtration, l'échantillon est analysé en chromatographie UHPLC.

VIII.3. Protocole d'incubation initiale des parasites avec le céto-TMDIBO

VIII.3.1. Marquage par chimie « click » *in cellulo*

40 µL de céto-TMDIBO à 10 mM (concentration finale : 10 µM) sont ajoutés aux 40 mL de culture de parasites préparée plus haut et les parasites sont incubés 1 h, à 37°C et avec une atmosphère à 5% CO₂. Après ce temps, le milieu de culture est centrifugé (3000 rpm, 5 min, TA) et le culot est repris dans 40 mL de milieu de culture. 40µL de TAMRA-N₃ à 10 mM (concentration finale : 10 µM) sont ajoutés et les parasites sont incubés 2 h, à 37°C et avec 5% CO₂. Le milieu de culture est divisé en quatre séries (A, B, C et D), chacune est centrifugée (3000 rpm, 5 min, frein 5, TA) et les culots obtenus sont placés dans un tube eppendorf avec 1,5 mL de PBS.

Une première centrifugation est appliquée à chaque culot (10 000 g, 1 min, TA) et le surnageant isolé constitue l'échantillon de premier lavage pour chaque série. Les culots sont ainsi repris à l'identique trois fois pour aboutir au final à 4x4 échantillons de lavage au PBS de 1,5 mL et 4 échantillons correspondant aux culots restants. Tous ces échantillons sont congelés à -80°C. Au final, on estime que chaque culot contient l'équivalent de 2x10⁷ parasites.

VIII.3.2. Témoin TAMRA-N₃

10 µL de DMSO sont ajoutés aux 10 mL de culture de parasites préparée plus haut et les parasites sont incubés 1 h, à 37°C et avec une atmosphère à 5% CO₂. Après ce temps, le milieu de culture est

centrifugé (3000 rpm, 5 min, TA) et le culot est repris dans 10 mL de milieu de culture. 10 µL de TAMRA-N₃ à 10 mM (concentration finale : 10 µM) sont ajoutés et les parasites sont incubés 2 h, à 37°C et avec 5% CO₂. Le milieu de culture est centrifugé (3000 rpm, 5 min, frein 5, TA) et le culot obtenu est placé dans un tube eppendorf avec 1,5 mL de PBS.

Une première centrifugation est appliquée (10 000 g, 1 min, TA) et le surnageant isolé constitue l'échantillon de premier lavage pour le témoin TAMRA-N₃. Le culot est ainsi repris à l'identique trois fois pour aboutir au final à 4 échantillons de lavage au PBS de 1,5 mL et un échantillon correspondant au culot restant. Ces échantillons sont congelés à -80°C.

VIII.3.3. Témoin céto-TMDIBO

10 µL de céto-TMDIBO à 10 mM (concentration finale : 10 µM) sont ajoutés aux 10 mL de culture de parasites préparée plus haut et les parasites sont incubés 1 h, à 37°C et avec une atmosphère à 5% CO₂. Après ce temps, le milieu de culture est centrifugé (3000 rpm, 5 min, TA) et le culot est placé dans un tube eppendorf avec 1,5 mL de PBS.

Une première centrifugation est appliquée (10 000 g, 1 min, TA) et le surnageant isolé constitue l'échantillon de premier lavage pour le témoin céto-TMDIBO. Le culot est ainsi repris à l'identique trois fois pour aboutir au final à 4 échantillons de lavage au PBS de 1,5 mL et un échantillon correspondant au culot restant. Ces échantillons sont congelés à -80°C.

VIII.3.4. Protocoles d'extraction des cellules de parasites

Extraction des culots

Les culots sont décongelés avant d'ajouter 100 µL d'eau millipore. Les fractions sont homogénéisées au vortex puis congelées dans l'azote liquide, décongelées dans un bain à 37°C et de nouveau homogénéisées. Ce cycle est répété trois fois. 150 µL de méthanol sont ajoutés et les fractions sont agitées avant d'être placées dans une centrifugeuse à 10 000 g pendant 1 min à 20°C. Le surnageant est isolé et le culot est ainsi repris trois fois dans 150 µL de méthanol. Le volume final de surnageant est de 600 µL. Après filtration, l'échantillon peut être directement analysé en chromatographie UHPLC sans évaporation.

Extraction des échantillons de lavage

Les échantillons correspondant aux différents lavages au PBS effectués sont extraits cinq fois avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques réunies sont évaporées grâce à un appareil GénéVac. Les tubes sont repris dans 1 mL de méthanol. Après filtration, les échantillons sont analysés par chromatographie UHPLC.

VIII.4. Procédure pour l'analyse des échantillons par LC-MS/MS

Une méthode d'analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) a été mise au point pour l'analyse des quatre composés (céto-TMDIBO, TAMRA-N₃ et les deux adduits triazoles). La séparation chromatographique est réalisée en mode UHPLC (*Ultra High Pressure Liquid Chromatography*). Le couplage est effectué par l'intermédiaire d'une source electrospray en amont d'un analyseur triple quadripolaire. La détection en mode MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) permet d'assurer la spécificité de la méthode.

Pour la partie spectrométrie de masse, la technique Electrospray (ESI, *ElectroSpray Ionisation*) en mode positif a été mise à profit.

Pour la partie UHPLC, la recherche des conditions expérimentales les plus satisfaisantes (Tableau 43) a conduit au choix des paramètres suivants :

- Colonne : Acquity UPLC HSS C₁₈ T3 1,8 µm 100 x 2,1 mm, équipée d'une pré-colonne (Waters)
- Température du four à colonne fixée à 40°C, débit réglé à 0,4 ml/min

Temps (min)	H₂O+ 0,5% HCOOH (%)	CH₃CN+ 0,1% HCOOH (%)
0	57	43
3,5	57	43
6,2	0	100
7,0	0	100
7,5	57	43
10	57	43

Tableau 43 : Gradient optimisé sur la colonne Acquity HSS T3

Recherche des fragments et optimisation des transitions

La démarche analytique consiste tout d'abord en l'étude des spectres de masse obtenus pour les molécules d'intérêt. Ainsi, l'analyseur de type triple quadripôle est utilisé en mode balayage sur le premier quadripôle (Q1), en ESI⁺.

Dans un deuxième temps, le profil de fragmentation de chaque espèce [M+H]⁺ est étudié au moyen d'expériences de type *Daughter Scan*. Concrètement, le premier quadripôle (Q1) est réglé de façon à ne laisser passer que l'ion d'intérêt (ion dit "parent" ou "précurseur"). Cet ion traverse ensuite la cellule de collision (deuxième quadripôle Q2) dans laquelle on introduit un gaz dit "de collision" (ici de l'argon) à une pression choisie pour générer des ions-fragments (ou "ions fils"), qui vont être analysés finalement par le troisième quadripôle (Q3), qui balaie sur la gamme de masse d'intérêt. On obtient alors un spectre MS/MS ou de fragmentation sur lequel figurent les espèces ioniques spécifiques de la molécule sélectionnée comme précurseur et issues de sa fragmentation.

Optimisation du profil de fragmentation

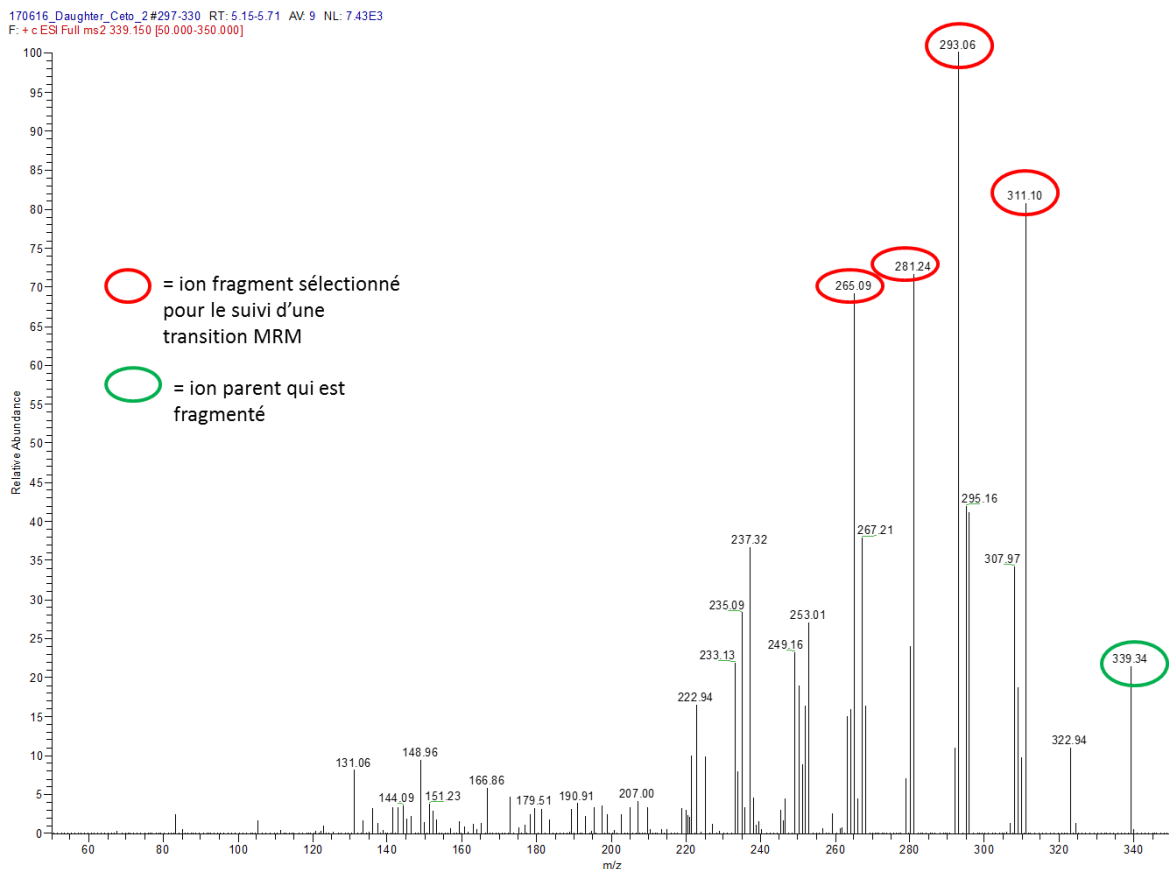
L'étape suivante consiste à optimiser le profil de fragmentation de chaque ion précurseur en faisant varier l'énergie de collision, en vue d'expériences de type MRM. Ce mode consiste à balayer simultanément sur les deux quadripôles Q1 et Q3 de manière à suivre un ion-parent et son fragment, qui est issu d'une décomposition induite dans la cellule de collision Q2. Ainsi, il s'agit de sélectionner une transition, c'est-à-dire une fragmentation, entre le précurseur protoné [M+H]⁺ et un ion fils (Tableau 44, Figures 140 à 143).

Composé	Transition	Énergie de collision (eV)
céto-TMDIBO	1 339 > 311	15
	2 339 > 293	22
	3 339 > 281	24
	4 339 > 265	26
TAMRA-N ₃	1 555 > 527	20
	2 555 > 430	30
	3 555 > 386	40
Adduits triazoles	1 893 > 386	51
	2 893 > 413	55
	3 447 > 386	35
	4 447 > 433	12
	5 447 > 539	21

Tableau 44 : Fragments et énergies de collision sélectionnés pour les expériences de type MRM

Toutes les solutions sont injectées trois fois et séparées par des injections de "blancs" qui correspondent à du méthanol. Ces expériences ont permis d'éliminer l'éventualité de phénomènes de contamination par effet de traîne (*carry-over effect*).

Pour ce qui concerne le traitement des données enregistrées, chaque pic qui traduit la réponse ionique pour une transition est intégré. L'étude de chaque transition est alors possible séparément ou par la somme de plusieurs.

Figure 140 : Spectre de fragmentation (MS/MS) de l'ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 339 du céto-TMDIBO 83

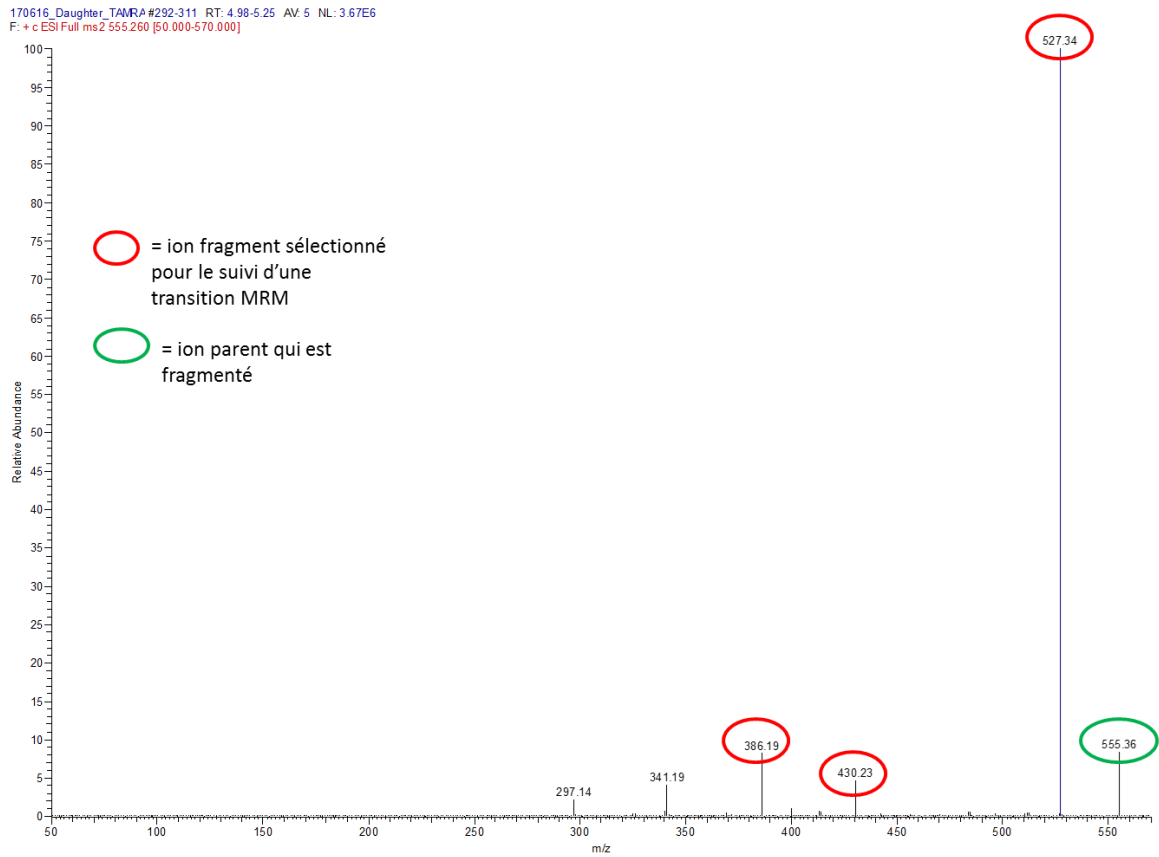


Figure 141 : Spectre de fragmentation (MS/MS) de l'ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 555 de TAMRA-N₃ 104

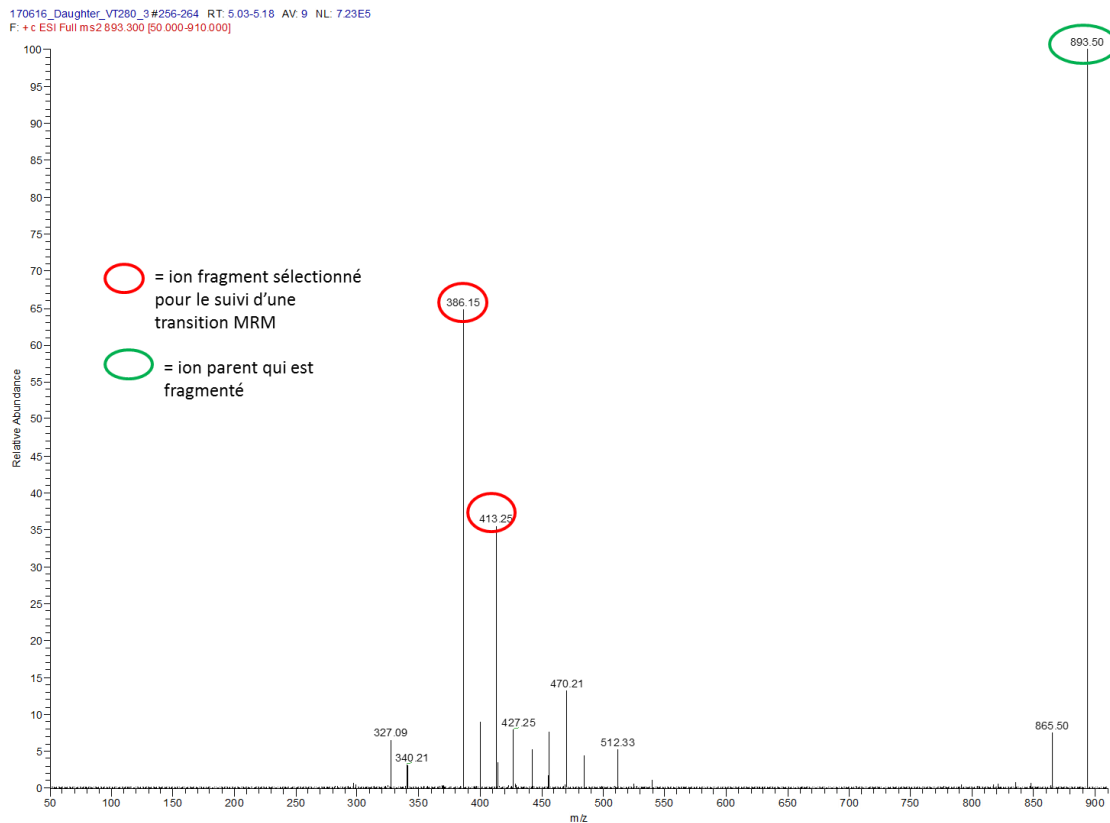


Figure 142 : Spectre de fragmentation (MS/MS) de l'ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 893 du triazole 105a

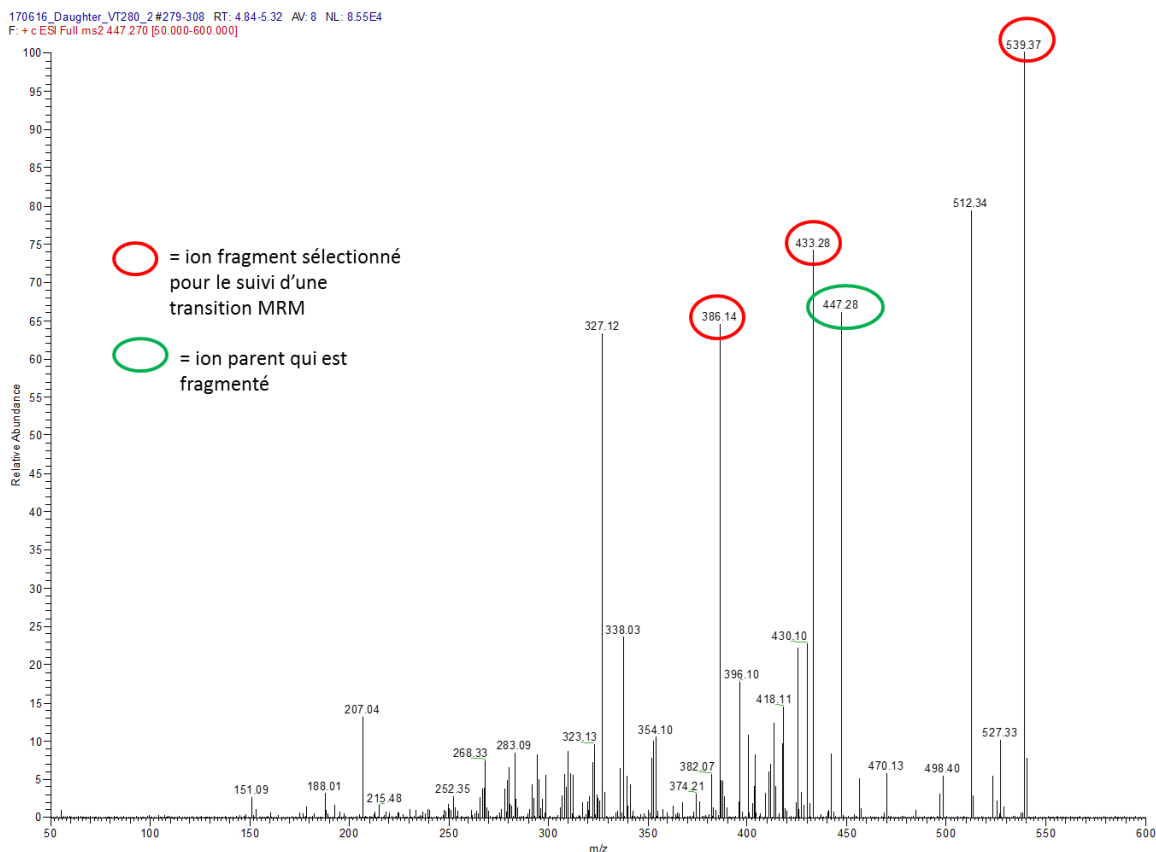


Figure 143 : Spectre de fragmentation (MS/MS) de l'ion précurseur $[M+2H]^{2+}$ à m/z 447 du triazole 105b

IX - Protocoles expérimentaux

IX.1. Détermination du rendement quantique de fluorescence (Φ_f)

Le rendement quantique de fluorescence d'un fluorophore donné est déterminé par rapport à une référence dont le rendement quantique est connu et dont l'émission est proche de celle du composé étudié. Ce rendement est défini comme le rapport du nombre de photons émis au nombre de photons absorbés.

Les échantillons sont préparés de manière à avoir une absorbance inférieure à 0,1 et pour chaque échantillon du composé x est préparé un échantillon de référence ayant la même absorbance à la longueur d'onde d'excitation étudiée. Les mesures sont réalisées dans les mêmes conditions (longueur d'onde d'excitation, fentes...) et le rendement quantique est alors calculé par la relation suivante :

$$\Phi_{f(x)} = \Phi_{f(\text{réf})} \times \frac{1-10^{-A_{\text{réf}}}}{1-10^{-A_x}} \times \frac{S_x}{S_{\text{réf}}} \times \left(\frac{n_x}{n_{\text{réf}}} \right)^2$$

avec Φ_f le rendement quantique, A l'absorbance, S l'aire sous la courbe d'émission et n l'indice de réfraction du solvant utilisé.

IX.2. Détermination de la durée de vie de fluorescence (τ_f)

Les déclin enregistrés ont été traités à l'aide du logiciel Globals. Les courbes de déclin de fluorescence ont été analysées par une somme d'exponentielles discrètes. L'intensité de fluorescence en fonction du temps devient :

$$I_F(t) = \sum_i \alpha_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right)$$

où α_i sont les coefficients préexponentiels et τ_i les constantes de temps associés.

L'ajustement numérique des différents paramètres du modèle s'effectue selon la méthode des moindres carrés non linéaire. Le critère déterminant est la quantité χ_R^2 , qui mesure l'erreur entre les données expérimentales et le modèle mathématique :

$$\chi_R^2 = \frac{\sum_i R_i^2}{N-n} \quad \text{avec} \quad R_i = \frac{I_F^{\text{exp}} - I_F^{\text{calc}}}{\sqrt{I_F^{\text{exp}}}}$$

où R_i sont les résidus pondérés (dans le cas du comptage de photons), N est le nombre de points expérimentaux et n le nombre de paramètres à ajuster. Un ajustement numérique satisfaisant doit fournir une valeur de χ_R^2 proche de 1 (comprise entre 0,8 et 1,2).

IX.3. Détermination de la constante de vitesse de second ordre (k_2)

L'alcyne est dissout dans l'acétonitrile à une concentration connue. A $t = 0$, l'azoture de benzyle est ajouté de manière à avoir une concentration au moins 10 fois supérieure à celle de l'alcyne. Le suivi cinétique est réalisé sur plusieurs échantillons à différents excès d'azoture de benzyle, en suivant la disparition de la longueur d'onde caractéristique de la fonction alcyne, à 25°C. Les courbes du logarithme népérien de l'absorbance en fonction du temps à la vitesse initiale ($\ln(A) = f(t)$) sont tracées et les valeurs des constantes de vitesse de pseudo-1^{er} ordre k' sont obtenues en rassemblant les pentes des droites obtenues. La constante de vitesse bimoléculaire est obtenue en traçant la courbe des constantes apparentes k' en fonction de la concentration en azoture de benzyle, dont la pente correspond à k_2 .

Chapitre II : Produits synthétisés

Protocoles généraux

Protocole A : Transformation du dibenzocyclooctène en dibenzocyclooctyne

Le dibenzocyclooctène (5,90 mmol, 1,0 éq.) est solubilisé dans 30 mL de dichlorométhane anhydre à 0°C (ou à une autre température si précisé). Après quelques minutes d'agitation, le dibrome (1,05 éq.) est ajouté goutte-à-goutte. Le mélange réactionnel est agité 1,5 heure à 0°C. La réaction est arrêtée avec une solution aqueuse saturée de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_{3\text{sat}}$). La phase aqueuse est extraite deux fois avec du DCM. Les phases organiques rassemblées sont lavées deux fois avec une solution aqueuse de saumure (NaCl_{sat}), puis séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le brut réactionnel est utilisé directement dans l'étape suivante, sans purification.

La diisopropylamine (4,0 éq.) est placée sous atmosphère d'argon avec 35 mL de tétrahydrofurane anhydre à 0°C. Le *n*-butyllithium (1,6 M dans le THF) (4,0 éq.) est ajouté goutte-à-goutte pour former le diisopropylamidure de lithium (LDA). Le mélange est agité 30 minutes à 0°C. Le composé dibromé (5,90 mmol, 1,0 éq.), solubilisé dans 35 mL de THF anhydre, est ajouté au LDA (ou une autre base si précisé). Le mélange réactionnel est agité pendant 1,5 heure. La réaction est arrêtée avec une solution aqueuse saturée de chlorure d'ammonium ($\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$). La phase aqueuse est extraite deux fois avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques réunies sont séchées sur MgSO_4 , filtrées puis concentrées. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée.

Protocole B : Oxydation du benzocyclooctynol

Le dibenzocyclooctynol (0,15 mmol, 1,0 éq.) est solubilisé dans 9,0 mL de DCM anhydre. Le réactif de Dess-Martin (1,5 éq.) est ajouté à la solution. Le mélange est agité pendant une heure à température ambiante, à l'abri de la lumière.

La réaction est ensuite arrêtée avec une $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_{3\text{sat}}$. Le mélange est extrait deux fois avec du DCM. Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau distillée, NaCl_{sat} , puis séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée.

Protocole C : Réaction de chimie « click »

Le dibenzocyclooctyne (0,05 mmol, 1,0 éq.) est solubilisé dans 5,5 mL de méthanol. L'azoture de benzyle (1,0 éq.) est ajouté et la réaction est laissée sous agitation à température ambiante à l'abri de la lumière jusqu'à conversion totale.

Le solvant est évaporé et le brut obtenu est purifié par chromatographie sur plaque préparative.

Protocole D : Réaction de dimérisation d'aldéhydes en éther cyclique

L'aldéhyde (10,0 mmol, 2,0 éq.) est placé sous atmosphère inerte, avant d'être solubilisé dans 100 mL de DCM anhydre et placé à -78°C. L'iodure de triméthylsilyle (1,5 éq.) est ajouté goutte-à-goutte et la réaction est laissée sous agitation à -78°C pendant 5 heures puis à température ambiante pendant 3 jours (ou plus, si indiqué).

La réaction est arrêtée avec $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_{3\text{sat}}$, puis extraite trois fois avec du DCM. Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium ($\text{NaHCO}_{3\text{sat}}$), séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée.

Protocole E : Réaction d'ouverture de l'éther cyclique

L'éther cyclique (10,0 mmol, 1,0 éq.) est placé sous atmosphère inerte, avant d'être solubilisé dans 101 mL de THF anhydre et placé à -78°C. Le *n*-butyllithium (1,6 M dans du THF) (2,4 éq.) est ajouté goutte-à-goutte et le mélange est laissé sous agitation de -78°C à température ambiante sur 4 heures.

La réaction est arrêtée avec de l'eau et extraite deux fois avec AE. Les phases organiques réunies sont lavées avec NaCl_{sat} , séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le brut obtenu est purifié par recristallisation et le filtrat par chromatographie sur colonne de silice prépackée.

Protocole F : Protection de la fonction alcool du dibenzocycloocténol

Le dibenzocycloocténol (5,2 mmol, 1,0 éq.) est placé dans un tube à vis et sous atmosphère inerte, avant d'être solubilisé dans 6 mL de DCM anhydre. L'imidazole (3,0 éq.) est ajouté, suivi du chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (5,0 éq.). Le mélange est placé sous agitation à 60°C pendant 3 heures (ou différent, si indiqué).

La réaction est diluée dix fois dans DCM et arrêtée avec un volume équivalent de HCl 1 M. La phase aqueuse est extraite deux fois avec du DCM et les phases organiques rassemblées sont lavées avec NaCl_{sat} , séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée.

Protocole G : Déprotection de la fonction alcool du dibenzocyclooctynol

Le dibenzocyclooctynol protégé (0,23 mmol, 1,0 éq.) est placé sous atmosphère inerte avant d'être solubilisé dans 4,0 mL de THF anhydre. Le mélange est placé à -20°C (ou à une autre température, si précisé) et du fluorure de tétra-*n*-butylammonium (1 M dans du THF) (1,5 éq.) est ajouté goutte-à-goutte. La réaction est laissée sous agitation à cette température pendant 5 heures (ou plus, si indiqué).

La réaction est arrêtée avec l'ajout de $\text{NaHCO}_{3\text{sat}}$, puis extraite trois fois avec AE. Les phases organiques réunies sont lavées avec NaCl_{sat} , séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée.

Protocole H : Réaction de double alkylation de Friedel-Crafts

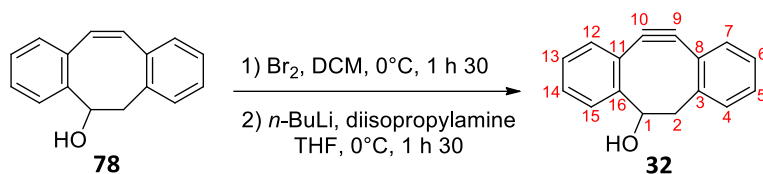
Le chlorure d'aluminium (2,5 éq.) est placé sous atmosphère inerte avant d'être solubilisé dans 86 mL de DCM anhydre ($C = 0,05 \text{ M}$). Le tétrachlorocyclopropène (1,2 éq.) est ajouté et le mélange est laissé sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante. L'aromatique (1,72 mmol, 1,0 éq.) est placé sous atmosphère inerte avant d'être solubilisé dans 34,4 mL de DCM anhydre ($C = 0,05 \text{ M}$). Cette solution est ajoutée goutte-à-goutte à la première, préalablement placée à -20°C . La réaction est agitée à cette température pendant une heure, puis laissée remonter à température ambiante sur 2 heures et agitée à cette température pendant encore une heure.

De l'eau est ensuite ajoutée à température ambiante et le milieu réactionnel est laissé sous agitation encore 30 minutes à une heure, avant d'être extrait trois fois avec DCM. Les phases organiques rassemblées sont séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée.

Protocole I : Réaction de photolyse de la cyclopropénone

La cyclopropénone (0,22 mmol, 1,0 éq.) est placée dans un tube en quartz sous atmosphère d'argon. Un mélange MeOH/DCM (7,4 mL, 1:1, v/v), préalablement dégazé à l'argon pendant 30 minutes à une heure, est ajouté. Le tube est placé sous irradiation à 350 nm pendant une heure.

Le solvant est évaporé et le brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée.

dibenzocyclooctynol (DIBO) **32**

Masse molaire : 220,26 g.mol⁻¹

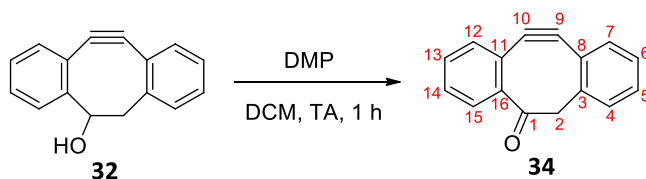
Formule brute : C₁₆H₁₂O

Protocole général A appliqué à 1,32 g d'alcool **78**. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée (gradient : heptane à heptane/AE (9:1, v/v) en 30 minutes) pour obtenir le composé **32** (365 mg, 28% de rendement sur 2 étapes) sous la forme d'un solide amorphe blanc.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 7,77 (d, 1H, **H12**, *J* = 7,9 Hz) ; 7,50-7,25 (m, 7H, **H4**, **H5**, **H6**, **H7**, **H13**, **H14** et **H15**) ; 4,6 (dd, 1H, **H1**, *J* = 3,7 et 2,1 Hz) ; 3,12 (dd, 1H, **H2a**, *J* = 14,8 et 2,1 Hz) ; 2,95 (dd, 1H, **H2b**, *J* = 14,7 et 3,7 Hz).

Les analyses obtenues sont en accord avec la littérature.⁵⁴

dibenzocyclooctynone (céto-DIBO) **34**

Masse molaire : 218,25 g.mol⁻¹

Formule brute : C₁₆H₁₀O

Protocole général B appliqué à 365 mg de dibenzocyclooctynol **32**. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée (gradient : heptane à heptane/AE (95:5, v/v) en 25 minutes) pour obtenir le composé **34** (270 mg, 74% de rendement) sous la forme d'un solide amorphe jaune.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 7,57 (d, 1H, **H15**, *J* = 7,6 Hz) ; 7,55-7,48 (m, 2H, **H12** et **H13**) ; 7,45-7,31 (m, 5H, **H4**, **H5**, **H6**, **H7** et **H14**) ; 4,20 (d, 1H, **H2a**, *J* = 10,8 Hz) ; 3,67 (d, 1H, **H2b**, *J* = 10,8 Hz).

Propriétés photophysiques

λ_{ex} max = 295, 318 nm

λ_{ém} = 470 nm

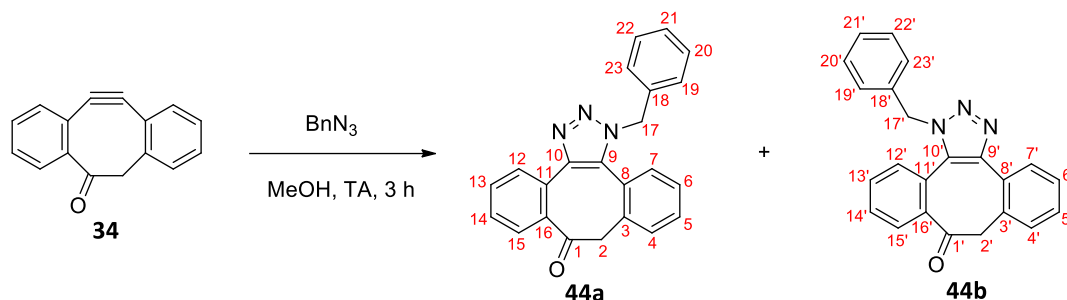
Φ_f = 26%

Δν = 5390 cm⁻¹

τ = 4,8 ns

Les analyses obtenues sont en accord avec la littérature.⁵⁴

1-benzyl-1H-dibenzo[3,4:7,8]cycloocta[1,2-d][1,2,3]triazol-8(9H)-one et 1-benzyl-1H-dibenzo[3,4:7,8]cycloocta[1,2-d][1,2,3]triazol-9(8H)-one **44**



Masse molaire : 351,40 g.mol⁻¹

Formule brute : C₂₇H₁₇N₃O

Protocole général C (mélange réactionnel agité pendant 3 h) appliqué à 10 mg de cyclooctynone **34**. Le brut est purifié par chromatographie sur plaque préparative (éluant : heptane/AE (1:1, v/v)) pour obtenir les triazoles **44** (15 mg, rendement quantitatif) sous la forme d'un mélange **44a:44b** (77:23) ayant l'aspect d'un solide amorphe blanc.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃)

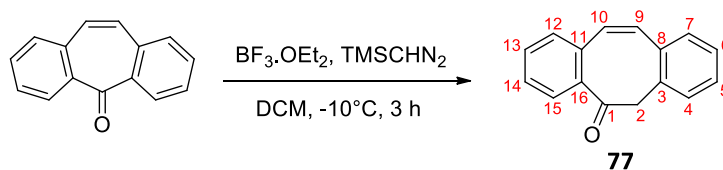
Triazole 44a

δ (ppm) : 8,30 (d, 1H, **H15**, *J* = 8,1 Hz) ; 8,03 (d, 1H, **H12**, *J* = 7,9 Hz) ; 7,65 (t, 1H, **H13**, *J* = 7,4 Hz) ; 7,55-7,43 (m, 4H, **H7**, **H20**, **H21** et **H22**) ; 7,38-7,32 (m, 2H, **H6** et **H14**) ; 7,31-7,25 (m, 3H, **H4**, **H19** et **H23**) ; 7,10-7,04 (m, 1H, **H5**) ; 5,70 (d, 1H, **H17a**, *J* = 15,3 Hz) ; 5,60 (d, 1H, **H17b**, *J* = 15,3 Hz) ; 3,77 (d, 1H, **H2a**, *J* = 12,2 Hz) ; 3,68 (d, 1H, **H2b**, *J* = 12,2 Hz).

Triazole 44b

δ (ppm) : 8,17 (d, 1H, **H15'**, *J* = 8,0 Hz) ; 7,73-7,70 (m, 1H, **H12'**) ; 7,65-7,40 (m, 5H, **H7'**, **H13'**, **H20'**, **H21'** et **H22'**) ; 7,38-7,32 (m, 2H, **H6'** et **H14'**) ; 7,31-7,25 (m, 3H, **H5'**, **H19'** et **H23'**) ; 7,20 (d, 1H, **H4'**, *J* = 7,7 Hz) ; 5,70 (d, 2H, **H17a'**, *J* = 15,3 Hz) ; 5,60 (d, 1H, **H17b'**, *J* = 15,3 Hz) ; 3,77 (d, 1H, **H2a'**, *J* = 12,2 Hz) ; 3,68 (d, 1H, **H2b'**, *J* = 12,2 Hz).

Expérience réalisée par le Dr. Guillaume Pousse. Les analyses obtenues sont en accord avec la littérature.⁵⁴

(Z)-dibenzo[*a,e*][8]annulen-5(6H)-one **77**

Masse molaire : 220,26 g.mol⁻¹

Formule brute : C₁₆H₁₂O

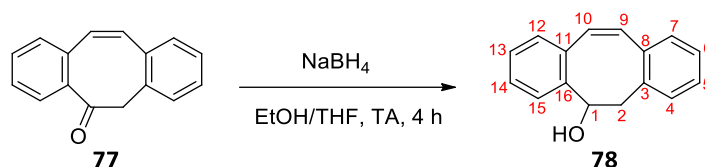
La 5-dibenzosuberénone (1,0 g, 4,86 mmol, 1,0 éq.) est solubilisée dans 17,5 mL de DCM anhydre. L'éthérate de trifluorure de bore (0,90 mL, 7,28 mmol, 1,5 éq.) est ajouté goutte-à-goutte à -10°C et le mélange est agité pendant une heure. Le triméthylsilyldiazométhane (4,85 mL, 9,72 mmol, 2,0 éq.) est ensuite ajouté goutte-à-goutte et le milieu réactionnel est agité 2 heures à -10°C.

La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau distillée. La phase aqueuse est extraite trois fois avec DCM. Les phases organiques rassemblées sont ensuite séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée (gradient : heptane/DCM (95:5 à 7:3, v/v) en 30 minutes). Le composé **77** (0,85 g, 78% de rendement) est isolé sous la forme d'un solide amorphe blanc-cassé.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 8,30 (d, 1H, **H15**, *J* = 8,2 Hz) ; 7,55-7,15 (m, 7H, **H4**, **H5**, **H6**, **H7**, **H12**, **H13** et **H14**) ; 7,10 (d, 1H, **H9**, *J* = 13,0 Hz) ; 7,05 (d, 1H, **H10**, *J* = 13,0 Hz) ; 4,07 (s, 2H, **H2**).

Les analyses obtenues sont en accord avec la littérature.⁵⁴

(Z)-5,6-dihydrodibenzo[*a,e*][8]annulen-5-ol **78**

Masse molaire : 222,28 g.mol⁻¹

Formule brute : C₁₆H₁₄O

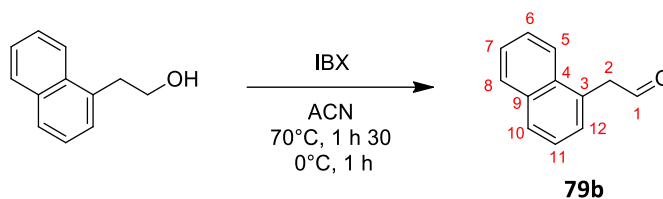
La cétone **77** (1,35 g, 6,13 mmol, 1,0 éq.) est solubilisée dans 90 mL de mélange EtOH/THF (1:1, v/v). Le borohydrure de sodium (1,16 g, 30,6 mmol, 5,0 éq.) est ajouté lentement par portion. Le mélange est agité 4 heures à température ambiante.

La réaction est arrêtée en ajoutant à 0°C de l'eau distillée. La phase aqueuse est ensuite extraite deux fois avec DCM. Les phases organiques réunies sont séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut est ensuite purifié sur colonne de silice prépackagée (gradient : heptane à heptane/AE (9:1, v/v) en 25 minutes). Le produit **78** (1,32 g, 97% de rendement) est isolé sous la forme d'un solide amorphe blanc.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 7,48 (d, 1H, **H12**, *J* = 8,5 Hz) ; 7,30-7,06 (m, 7H, **H4**, **H5**, **H6**, **H7**, **H13**, **H14** et **H15**) ; 6,90 (d, 1H, **H9**, *J* = 12,4 Hz) ; 6,85 (d, 1H, **H10**, *J* = 12,4 Hz) ; 5,30 (dd, 1H, **H1**, *J* = 10,0 et 6,3 Hz) ; 3,48 (dd, 1H, **H2a**, *J* = 13,8 et 6,3 Hz) ; 3,35 (dd, 1H, **H2b**, *J* = 13,8 et 10,0 Hz).

Les analyses obtenues sont en accord avec la littérature.⁵⁴

2-(naphthalen-1-yl)acétaldéhyde **79b**

Masse molaire : 170,21 g.mol⁻¹

Formule brute : C₁₂H₁₀O

L'acide 2-iodoxybenzoïque (4,9 g, 17,4 mmol, 1,5 éq.) est ajouté à une solution d'alcool (2,0 g, 11,6 mmol, 1,0 éq.) dans 110 mL de ACN anhydre. Le mélange est placé sous agitation à 70°C pendant 1,5 heure, puis refroidi à 0°C et laissé à cette température pendant une heure.

Le solide blanc est filtré et le filtrat évaporé pour donner l'aldéhyde **79b** (1,95 g, 99% de rendement) sous la forme d'une huile jaune. Lorsque l'aldéhyde obtenu n'est pas pur, celui-ci est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 9,80 (t, 1H, **H1**, *J* = 2,4 Hz) ; 7,95-7,88 (m, 2H, **H5** et **H8**) ; 7,87 (d, 1H, **H10**, *J* = 8,1 Hz) ; 7,61-7,40 (m, 4H, **H6**, **H7**, **H11** et **H12**) ; 4,12 (d, 2H, **H2**, *J* = 2,4 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

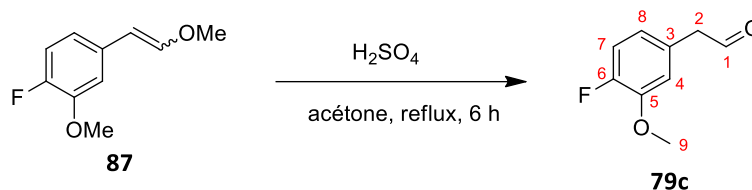
δ (ppm) : 199,5 (**C1**) ; 134,0 (**C9**) ; 133,4 (**C4**) ; 132,3 (**C3**) ; 128,9 (**C8**) ; 128,5 (**C10**) ; 128,4 (**C12**) ; 126,7 (**C7**) ; 126,1 (**C11**) ; 125,6 (**C6**) ; 123,5 (**C5**) ; 48,4 (**C2**).

SM (MALDI, DCM + ACN) : *m/z* 170,2 [M]⁺.

Haute résolution calculée pour C₁₂H₁₀O⁺ [M]⁺ : 170,0732, trouvée : 170,0721.

IR

v (cm⁻¹) = 3047, 2824, 2725 (**C-H ar**) ; 1722 (**C=O**) ; 1597 (**C=C-CH₂ ou CH₂-C=O**) ; 1511 (**C-C ar**) ; 1395 (**O=C-H**) ; 1217, 1165, 1078, 1037, 777 (**C-C ar**).

2-(4-fluoro-3-methoxyphenyl)acetaldehyde **79c**

Masse molaire : 168,16 g.mol⁻¹

Formule brute : C₉H₉FO₂

L'éther d'énol brut **87** (3,6 g bruts, 1,0 éq.) est solubilisé avec 18 mL d'acétone (C = 0,4 M) dans un tube à vis. Une solution d'acide sulfurique (1 M) (140 µL, 0,14 µmol, 0,05 éq.) est ensuite ajoutée, et le mélange est agité au reflux de l'acétone pendant 6 h.

Le solvant est ensuite évaporé, et le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackagée (gradient : heptane/DCM (7:3 à 3:7, v/v) en 12 minutes). Le composé **79c** (422 mg, 89% de rendement sur deux étapes) est obtenu sous la forme d'une huile jaune.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 9,72 (t, 1H, **H1**, *J* = 2,1 Hz) ; 7,04 (dd, 1H, **H7**, *J*_{HF} = 11,2 Hz et *J* = 8,1 Hz) ; 6,79 (dd, 1H, **H4**, *J*_{HF} = 8,0 Hz et *J* = 1,6 Hz) ; 6,73 (ddd, 1H, **H8**, *J* = 8,1 Hz, *J*_{HF} = 4,0 Hz et *J* = 1,6 Hz) ; 3,86 (s, 3H, **H9**) ; 3,65 (d, 2H, **H2**, *J* = 2,1 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 198,9 (**C1**) ; 153,3 (d, **C5**, *J*_{13CF} = 20,6 Hz) ; 151,8 (d, **C6**, *J*_{13CF} = 245,6 Hz) ; 128 (d, **C3**, *J*_{13CF} = 3,6 Hz) ; 121,9 (d, **C8**, *J*_{13CF} = 7,1 Hz) ; 116,3 (d, **C7**, *J*_{13CF} = 18,2 Hz) ; 114,6 (d, **C4**, *J*_{13CF} = 2,2 Hz) ; 56,2 (**C9**) ; 50,1 (**C2**).

RMN ¹⁹F (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : -137,3 (ddd, 1F, **F6**, *J*_{HF} = 11,2 et 8,0 et 4,0 Hz).

RMN ¹⁹F-CPD (300 MHz, CDCl₃)

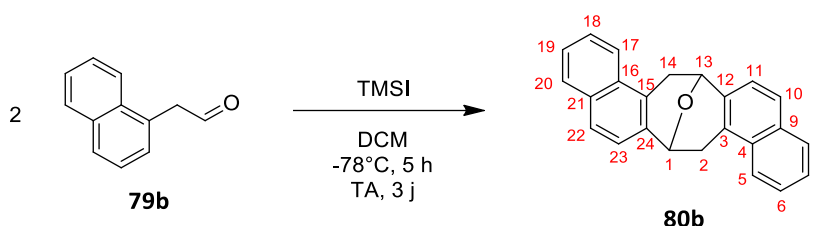
δ (ppm) : -137,3 (s, 1F, **F6**, *J*_{13CF} = 245,6 Hz).

SM (APPI, DCM + ACN) : *m/z* 168,1 [M]⁺.

Haute résolution calculée pour C₉H₉FO₂⁺ [M]⁺ : 168,0587, trouvée : 168,0577.

IR

ν (cm⁻¹) = 3440, 2925, 2853 (**C-H ar**) ; 1723 (**C=O**) ; 1465 (**C=C-CH₂ ou CH₂-C=O**) ; 1420 (**C-C ar**) ; 1270 (**C-O**) ; 1153 (**C-F**) ; 1121, 1032, 815, 783, 734 (**C-C ar**).

7,8,15,16-tetrahydro-7,15-epoxycycloocta[1,2-*a*:5,6-*a'*]dinaphthalene **80b**

Masse molaire : 322,41 g.mol⁻¹

Formule brute : C₂₄H₁₈O

Protocole général D appliqué à 1,97 g d'aldéhyde **79b**. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackagée (gradient : heptane à heptane/AE (95:5, v/v) en 30 minutes) pour aboutir au produit **80b** (1,55 g, 83% de rendement) sous la forme d'un solide amorphe blanc.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 7,89 (d, 2H, **H5** et **H17**, *J* = 8,3 Hz) ; 7,75 (d, 2H, **H8** et **H20**, *J* = 7,0 Hz) ; 7,66 (d, 2H, **H10** et **H22**, *J* = 8,4 Hz) ; 7,49 (d, 2H, **H7** et **H19**, *J* = 7,0 Hz) ; 7,42 (d, 2H, **H6** et **H18**, *J* = 7,0 Hz) ; 7,30 (d, 2H, **H11** et **H23**, *J* = 8,4 Hz) ; 5,64 (d, 2H, **H1** et **H13**, *J* = 6,3 Hz) ; 3,82 (dd, 2H, **H2a** et **H14a**, *J* = 16,5 et 6,3 Hz) ; 3,39 (d, 2H, **H2b** et **H14b**, *J* = 16,5 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 135,0 (**C3** et **C15**) ; 132,6 (**C4** et **C16**) ; 132,0 (**C9** et **C21**) ; 128,5 (**C8** et **C20**) ; 126,7 (**C12** et **C24**) ; 126,5 (**C10** et **C22**) ; 126,2 (**C7** et **C19**) ; 125,4 (**C6** et **C18**) ; 123,6 (**C11** et **C23**) ; 122,5 (**C5** et **C17**) ; 70,0 (**C1** et **C13**) ; 32,2 (**C2** et **C14**).

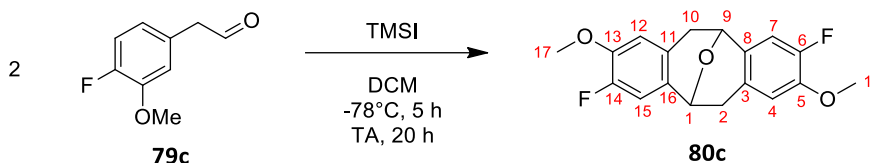
SM (MALDI, DCM + ACN) : *m/z* 322,1 [M]⁺.

Haute résolution calculée pour C₂₄H₁₈O⁺ [M]⁺ : 322,1352, trouvée : 322,1359.

IR

ν (cm⁻¹) = 3053, 2928 (**C-H ar**) ; 1926, 1717 (**C-O**) ; 1599, 1509 (**C=C-CH₂ ou CH₂-C=O**) ; 1396, 1073 (**C-H ar**) ; 812, 745 (**C-C ar**).

Point de fusion : 210°C.

3,9-difluoro-2,8-dimethoxy-5,6,11,12-tetrahydro-5,11-epoxydibenzo[a,e][8]annulene **80c**Masse molaire : 318,32 g.mol⁻¹Formule brute : C₁₈H₁₆F₂O₃

Protocole général D (mélange réactionnel agité 20 heures à température ambiante) appliqué à 222 mg de l'aldéhyde **79c**. Le brut obtenu est recristallisé dans le MeOH, en le solubilisant dans un minimum de DCM, pour obtenir le composé **80c** (231 mg, 96% de rendement) sous la forme d'un solide amorphe blanc.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 6,80 (d, 2H, **H7** et **H15**, $J_{\text{HF}} = 11,4$ Hz) ; 6,57 (d, 2H, **H4** et **H12**, $J_{\text{HF}} = 8,4$ Hz) ; 5,19 (d, 2H, **H1** et **H9**, $J = 5,7$ Hz) ; 3,81 (s, 6H, **H17** et **H18**) ; 3,45 (dd, 2H, **H2a** et **H10a**, $J = 16,1$ et 5,7 Hz) ; 2,65 (d, 2H, **H2b** et **H10b**, $J = 16,1$ Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 151,0 (d, **C6** et **C14**, $J_{13\text{CF}} = 245,0$ Hz) ; 146,7 (d, **C5** et **C13**, $J_{13\text{CF}} = 10,8$ Hz) ; 129,6 (d, **C8** et **C16**, $J_{13\text{CF}} = 5,2$ Hz) ; 127,1 (d, **C3** et **C11**, $J_{13\text{CF}} = 3,7$ Hz) ; 113,5 (d, **C4** et **C12**, $J_{13\text{CF}} = 1,7$ Hz) ; 112,4 (d, **C7** et **C15**, $J_{13\text{CF}} = 18,3$ Hz) ; 68,7 (d, **C1** et **C9**, $J_{13\text{CF}} = 1,4$ Hz) ; 56,1 (**C17** et **C18**) ; 35,6 (**C2** et **C10**).

RMN ¹⁹F (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : -137,3 (dd, 2F, **F14** et **F6**, $J_{\text{HF}} = 11,4$ et 8,4 Hz).

RMN ¹⁹F-CPD (300 MHz, CDCl₃)

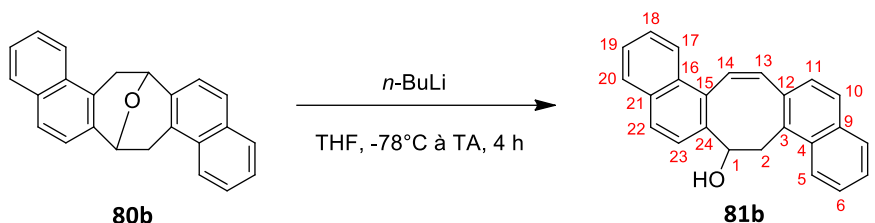
δ (ppm) : -137,3 (s, 2F, **F14** et **F6**, $J_{13\text{CF}} = 245,0$ Hz).

SM (MALDI, THF) : m/z 318,1 [M]⁺.

IR

ν (cm⁻¹) = 2973, 2924, 2850 (**C-H ar**) ; 1463, 1447 (**C=C-CH₂**) 1344, 1312 (**HC-O**) ; 1262, 1228 (**C-O**) ; 1195, 1109 (**C-F ar**) ; 1077 (**C-C ar**) ; 1017 (**C-O-C al**) ; 870, 859, 817 (**C-C ar**).

Point de fusion : 223°C.

(Z)-7,8-dihydrocycloocta[1,2-*a*:5,6-*a'*]dinaphthalen-7-ol **81b**Masse molaire : 322,41 g.mol⁻¹Formule brute : C₂₄H₁₈O

Protocole général E appliqué à 1,56 g d'éther cyclique **80b**. Le brut obtenu est purifié par recristallisation (heptane/AE (95:5, v/v)) et le filtrat par chromatographie sur colonne de silice prépackée (gradient : heptane à heptane/AE (9:1, v/v) en 30 minutes) pour aboutir au composé **81b** (1,56 g, rendement quantitatif) sous la forme d'un solide amorphe blanc.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 8,23 (d, 1H, **H5**, *J* = 8,0 Hz) ; 8,11 (d, 1H, **H8**, *J* = 8,4 Hz) ; 7,74 (d, 2H, **H10** et **H22**, *J* = 8,0 Hz) ; 7,68 (d, 1H, **H17**, *J* = 8,6 Hz) ; 7,61-7,48 (m, 4H, **H6**, **H7**, **H18** et **H20**) ; 7,47-7,39 (m, 2H, **H11** et **H23**) ; 7,37-7,19 (m, 3H, **H13**, **H14** et **H19**) ; 5,84 (ddd, 1H, **H1**, *J* = 10,5 et 6,8 et 4,2 Hz) ; 3,95 (d, 1H, **H2a**, *J* = 6,8 Hz) ; 3,94 (d, 1H, **H2b**, *J* = 10,5 Hz) ; 2,14 (d, 1H, -OH, *J* = 4,2 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 138,2 (**C24**) ; 134,2 (**C15**) ; 134,0 (**C13**) ; 132,6 (**C3**) ; 132,2 (**C16**) ; 132,3 (**C4**) ; 131,9 (**C9**) ; 131,4 (**C12**) ; 130,2 (**C21**) ; 128,6 (**C14**) ; 128,5 (**C10**) ; 128,3 (**C22**) ; 128,1 (**C17**) ; 126,6 (**C7**) ; 126,6 (**C6**) ; 126,5 (**C19**) ; 126,2 (**C18**) ; 126,1 (**C19**) ; 125,8 (**C11**) ; 125,5 (**C23**) ; 125,0 (**C8**) ; 124,1 (**C5**) ; 73,8 (**C1**) ; 39,5 (**C2**).

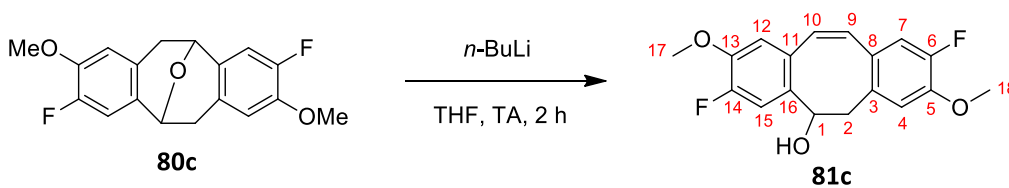
SM (MALDI, DCM + ACN) : *m/z* 322,1 [M]⁺.

Haute résolution calculée pour C₂₄H₁₈O⁺ [M]⁺ : 322,1358, trouvée : 322,1375.

IR

v (cm⁻¹) = 3351 (**O-H**) ; 3054, 2886, 2308 (**C-H ar**) ; 1599, 1480 (**C=C-CH₂ ou CH₂-C=O**) ; 1078, 1025 (**C-H ar**) ; 807 (**C-C ar**).

Point de fusion : 172°C.

(Z)-3,9-difluoro-2,8-dimethoxy-5,6-dihydrodibenzo[a,e][8]annulén-5-ol **81c**Masse molaire : 318,32 g.mol⁻¹Formule brute : C₁₈H₁₆F₂O₃

Protocole général E (réaction réalisée à température ambiante pendant 2 heures) appliqué à 1,0 g d'éther cyclique **80c**. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée (gradient : heptane à heptane/AE (4:1, v/v) en 35 minutes). Le produit **81c** (467 mg, 47% de rendement) est obtenu sous la forme d'un solide amorphe blanc-cassé.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 7,13 (d, 1H, **H15**, *J*_{HF} = 12,1 Hz) ; 6,76 (d, 1H, **H7**, *J*_{HF} = 11,6 Hz) ; 6,71 (d, 1H, **H4**, *J*_{HF} = 8,5 Hz) ; 6,68 (d, 1H, **H10**, *J* = 12,0 Hz) ; 6,62 (d, 1H, **H9**, *J* = 12,0 Hz) ; 6,57 (d, 1H, **H12**, *J*_{HF} = 8,5 Hz) ; 5,12 (dd, 1H, **H1**, *J* = 10,0 et 5,1 Hz) ; 3,79 (s, 3H, **H17**) ; 3,76 (s, 3H, **H18**) ; 3,30 (dd, 1H, **H2a**, *J* = 14,0 et 5,7 Hz) ; 3,12 (dd, 1H, **H2b**, *J* = 14,0 et 10,2 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 151,4 (d, **C14**, *J*_{13CF} = 247,3 Hz) ; 150,5 (d, **C6**, *J*_{13CF} = 246,1 Hz) ; 146,6 (d, **C13**, *J*_{13CF} = 10,8 Hz) ; 146,3 (d, **C5**, *J*_{13CF} = 10,8 Hz) ; 133,9 (d, **C11**, *J*_{13CF} = 4,8 Hz) ; 132,3 (d, **C3**, *J*_{13CF} = 3,6 Hz) ; 130,8 (**C10**) ; 130,6 (**C9**) ; 130,4 (d, **C16**, *J*_{13CF} = 3,6 Hz) ; 129,2 (d, **C8**, *J*_{13CF} = 6,6 Hz) ; 116,6 (d, **C15**, *J*_{13CF} = 18 Hz) ; 116,0 (d, **C7**, *J*_{13CF} = 18 Hz) ; 114,5 (d, **C4**, *J*_{13CF} = 10,8 Hz) ; 114,5 (d, **C12**, *J*_{13CF} = 10,8 Hz) ; 73,3 (**C1**) ; 56,2 (**C17**) ; 56,2 (**C18**) ; 42,2 (**C2**).

RMN ¹⁹F (300 MHz, CDCl₃)

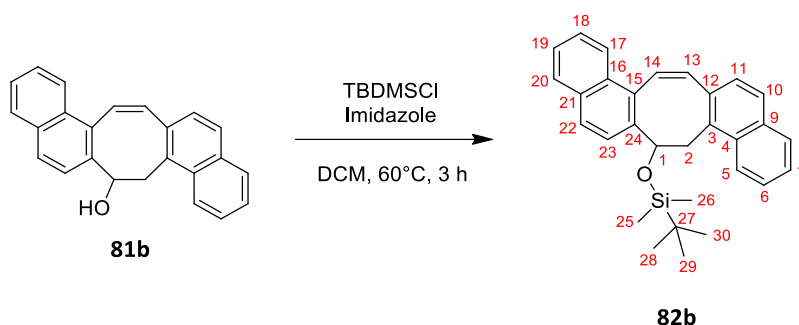
δ (ppm) : -136,0 (dd, 1F, **F14**, *J*_{HF} = 12,1 et 8,5 Hz) ; -138,8 (dd, 1F, **F6**, *J*_{HF} = 11,6 et 8,5 Hz).

SM (MALDI, THF) : *m/z* 318,1 [M]⁺.

IR

v (cm⁻¹) = 3380 (**O-H**) ; 2938, 2845 (**C-H ar**) ; 1446 (**C=C-CH₂**) ; 1333 (**HC-O**) ; 1263, 1193 (**C-O**) ; 1247 (**C-OH ar**) ; 1193, 1091 (**C-F ar**) ; 1005, 883, 849 (C-C ar) ; 734, 703 (**C-C ar**).

Point de fusion : 97°C.

(Z)-tert-butyl((7,8-dihydrocycloocta[1,2-a:5,6-a']dinaphthalen-7-yl)oxy)dimethylsilane **82b**Masse molaire : 436,67 g.mol⁻¹Formule brute : C₃₀H₃₂OSi

Protocole général F appliqué à 1,08 g de dibenzocycloocténol **81b**. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackagée (éluant : heptane/AE (95:5, v/v)) pour conduire au composé **82b** (1,36 g, 93% de rendement) sous la forme d'un solide amorphe blanc.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 8,17 (d, 1H, **H5**, *J* = 8,6 Hz) ; 7,99 (d, 1H, **H8**, *J* = 8,1 Hz) ; 7,76-7,72 (m, 3H, **H6**, **H10** et **H22**) ; 7,69 (d, 1H, **H17**, *J* = 8,5 Hz) ; 7,54-7,37 (m, 5H, **H6**, **H7**, **H11**, **H18** et **H19**) ; 7,28-7,24 (m, 2H, **H13** et **H14**) ; 7,18 (d, 1H, **H20**, *J* = 8,6 Hz) ; 6,13 (dd, 1H, **H1**, *J* = 10,8 et 5,1 Hz) ; 3,96 (dd, 1H, **H2a**, *J* = 16,2 et 10,8 Hz) ; 3,75 (dd, 1H, **H2b**, *J* = 16,2 et 5,1 Hz) ; 0,96 (s, 9H, **H28** et **H29** et **H30**) ; 0,10 (s, 3H, **H25**) ; 0,01 (s, 3H, **H26**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

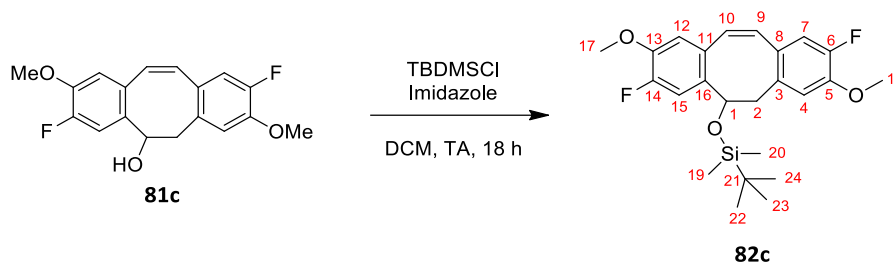
δ (ppm) : 141,0 (**C3**) ; 135,7 (**C24**) ; 133,0 (**C15**) ; 132,7 (**C12**) ; 132,4 (**C9**) ; 132,2 (**C21**) ; 131,0 (**C16**) ; 129,7 (**C4**) ; 128,3 (**C8**) ; 128,2 (**C20**) ; 128,1 (**C22**) ; 127,9 (**C10**) ; 127,0 (**C11**) ; 126,3 (**C6**) ; 125,9 (**C17** et **C18**) ; 125,7 (**C5** et **C7**) ; 125,5 (**C14**) ; 125,4 (**C13**) ; 124,7 (**C19**) ; 124,3 (**C23**) ; 71,1 (**C1**) ; 43,5 (**C2**) ; 26,0 (**C28** et **C29** et **C30**) ; 18,4 (**C27**) ; -4,63 (**C25**) ; -4,76 (**C26**).

SM (MALDI, THF) : *m/z* 436,2 [M]⁺.**IR**

ν (cm⁻¹) = 3052, 2928, 2855 (C-H ar) ; 1508, 1470 (C=C-CH₂) ; 1251 (C-O) ; 1082 (Si-O) ; 1066, 837 (Si-(*t*Bu)(CH₃)₂) ; 777, 748 (C-C ar).

Point de fusion : 144°C.

(Z)-tert-butyl(diméthyl)((3,9-difluoro-2,8-diméthoxy-5,6-dihydrodibenzo[*a,e*][8]annulén-5-yl)oxy)silane **82c**



Masse molaire : 432,58 g.mol⁻¹

Formule brute : C₂₄H₃₀F₂O₃Si

Protocole général F (réaction réalisée à température ambiante pendant 18 heures) appliqué à 236 mg de dibenzocycloocténol **81c**. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée (gradient : heptane à heptane/AE (4:1, v/v) en 40 minutes) pour conduire au produit **82c** (274 mg, 86% de rendement) sous la forme d'un solide amorphe blanc-cassé.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 7,23 (d, 1H, **H15**, *J*_{HF} = 12,2 Hz) ; 6,75 (d, 1H, **H7**, *J*_{HF} = 11,8 Hz) ; 6,72 (d, 1H, **H10**, *J* = 12,0 Hz) ; 6,62 (d, 1H, **H9**, *J* = 12,0 Hz) ; 6,60 (d, 1H, **H4**, *J* = 8,5 Hz) ; 6,59 (d, 1H, **H12**, *J* = 8,1 Hz) ; 5,35 (dd, 1H, **H1**, *J* = 9,9 et 5,7 Hz) ; 3,80 (s, 3H, **H17**) ; 3,79 (s, 3H, **H18**) ; 3,40 (dd, 1H, **H2a**, *J* = 15,4 et 5,7 Hz) ; 3,01 (dd, 1H, **H2b**, *J* = 15,4 et 9,9 Hz) ; 0,88 (s, 9H, **H22**, **H23** et **H24**) ; 0,00 (s, 3H, **H19**) ; -0,07 (s, 3H, **H20**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 151,8 (d, **C14**, *J*_{13CF} = 246,3 Hz) ; 150,0 (d, **C6**, *J*_{13CF} = 246,3 Hz) ; 146,1 (d, **C13**, *J*_{13CF} = 12,7 Hz) ; 145,8 (d, **C5**, *J*_{13CF} = 11,3 Hz) ; 136,5 (d, **C11**, *J* = 5,9 Hz) ; 132,9 (**C10**) ; 132,6 (d, **C3**, *J* = 3,6 Hz) ; 130,1 (d, **C16**, *J* = 3,7 Hz) ; 129,1 (**C9**) ; 128,4 (d, **C8**, *J* = 6,2 Hz) ; 117,1 (d, **C7**, *J*_{13CF} = 17,7 Hz) ; 115,3 (d, **C4**, *J* = 1,8 Hz) ; 113,5 (d, **C15**, *J*_{13CF} = 19,2 Hz) ; 112,5 (d, **C12**, *J* = 1,9 Hz) ; 70,6 (**C1**) ; 56,1 (**C17**) ; 56,0 (**C18**) ; 46,9 (**C2**) ; 29,7 (**C21**) ; 25,8 (**C22**, **C23** et **C24**) ; -4,79 (**C20**) ; -4,86 (**C19**).

RMN ¹⁹F (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : -136,1 (dd, 1F, **F14**, *J*_{HF} = 12,2 et 8,1 Hz) ; -140,0 (dd, 1F, **F6**, *J*_{HF} = 11,8 et 8,5 Hz).

RMN ¹⁹F-CPD (300 MHz, CDCl₃)

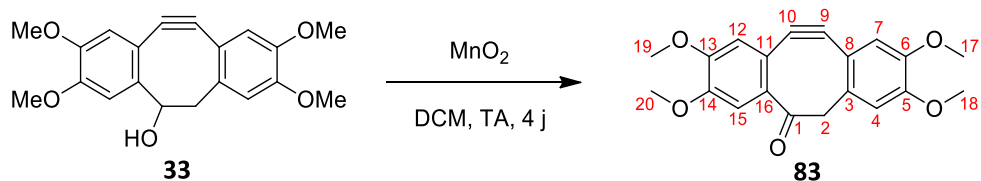
δ (ppm) : -136,1 (s, 1F, **F14**, *J*_{13CF} = 246,3 Hz) ; -140,0 (s, 1F, **F6**, *J*_{13CF} = 246,3 Hz).

SM (MALDI, THF) : *m/z* 432,2 [M]⁺.

IR

ν (cm⁻¹) = 2955, 2930, 2856 (C-H ar) ; 1464 (C=C-CH₂) ; 1342 (HC-O) ; 1274, 1260 (C-O) ; 1102 (C-F) ; 1072 (Si-O) ; 888, 867, 777 (C-C ar) ; 837 (Si-(tBu)(CH₃)₂).

Point de fusion : 98°C.

2,3,8,9-tetraméthoxy-11,12-didéhydrodibenzo[*a,e*][8]annulén-5(6*H*)-one (céto-TMDIBO) **83**

Masse molaire : 338,35 g.mol⁻¹

Formule brute : C₂₀H₁₈O₅

L'oxyde de manganèse (2,56 g, 29,4 mmol, 20 éq.) est ajouté à une solution de dibenzocyclooctynol **33** (500 mg, 1,47 mmol, 1,0 éq.) dans le DCM anhydre (20 mL). Le mélange est agité à température ambiante pendant 4 jours, à l'abri de la lumière.

La réaction est ensuite filtrée et le filtrat est concentré. Le brut est purifié sur par chromatographie sur colonne de silice (gradient : heptane à heptane/AE (1:1, v/v) en 30 minutes) pour donner la dibenzocyclooctynone **83** (250 mg, 50% de rendement) sous la forme d'un solide amorphe jaune.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 7,13 (s, 1H, **H12**) ; 7,02 (s, 1H, **H7**) ; 6,77 (s, 1H, **H15**) ; 6,75 (s, 1H, **H4**) ; 3,98 (s, 3H, **H18**) ; 3,96 (s, 6H, **H19** et **H20**) ; 3,90 (s, 3H, **H17**) ; 1,57 (s, 2H, **H2**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 197,8 (**C1**) ; 151,3 (**C5**) ; 150,0 (**C13**) ; 148,7 (**C14**) ; 148,3 (**C6**) ; 147,8 (**C3**) ; 141,1 (**C16**) ; 115,8 (**C11**) ; 115,7 (**C7**) ; 114,6 (**C8**) ; 111,7 (**C4**) ; 111,4 (**C15**) ; 109,5 (**C12**) ; 108,2 (**C10**) ; 108,1 (**C9**) ; 56,2 (**C18**) ; 56,1 (**C17**, **C19**, et **C20**) ; 49,3 (**C2**).

SM (ESI⁺, DCM + MeOH) : *m/z* 339,1 [M+H]⁺.

Haute résolution calculée pour C₂₀H₁₉O⁺ [M+H]⁺ : 339,1232, trouvée : 339,1227.

IR

ν (cm⁻¹) = 3053 (**C-H ar**) ; 2928 (**CC triple**) ; 1663 (**C=O**) ; 1595, 1509 (**C=C-CH₂ ou CH₂-C=O**) ; 1465, 1426, 1396, 1307, 1260, 1218, 1074 (**C-H ar**) ; 995, 963, 944, 897, 865, 828, 813, 788, 746 (**C-C ar**).

Point de fusion : 176°C.

Expérience réalisée par le Dr. Guillaume Pousse.

Propriétés photophysiques

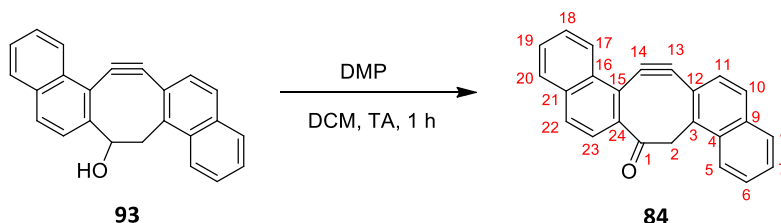
λ_{ex} max = 305, 361 nm

λ_{ém} = 528 nm

Φ_f = 3-5%

Δν = 7727 cm⁻¹

τ = 4,6 ns

dinaphtylcyclooctynone (céto-DINO) **84**Masse molaire : 318,37 g.mol⁻¹Formule brute : C₂₄H₁₄O

Protocole général B appliqué à 48,5 mg de cyclooctynol **93**. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée (éluant : heptane/AE (95:5, v/v)). Le produit **84** (17,4 mg, 87% de rendement) est obtenu sous la forme d'un solide amorphe jaune.

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)

δ (ppm) : 8,52 (d, 1H, **H17**, *J* = 8,8 Hz) ; 8,18 (d, 1H, **H22**, *J* = 7,9 Hz) ; 8,14-8,10 (m, 2H, **H5** et **H10**) ; 8,06 (d, 1H, **H8**, *J* = 8,2 Hz) ; 8,02 (d, 1H, **H20**, *J* = 8,5 Hz) ; 7,81-7,71 (m, 4H, **H7**, **H18**, **H19** et **H23**) ; 7,69-7,62 (m, 2H, **H6** et **H11**) ; 4,91 (d, 1H, **H2a**, *J* = 13,3 Hz) ; 4,15 (d, 1H, **H2b**, *J* = 13,3 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)

δ (ppm) : 198,7 (**C1**) ; 154,0 (**C24**) ; 146,4 (**C3**) ; 133,9 (**C16**) ; 133,5 (**C9**) ; 132,9 (**C4**) ; 128,9 (**C21**) ; 128,8 (**C8**) ; 128,5 (**C10** et **C23**) ; 128,4 (**C19**) ; 128,2 (**C20**) ; 127,5 (**C18**) ; 127,0 (**C11**) ; 126,4 (**C22**) ; 124,8 (**C17**) ; 124,6 (**C5** et **C7**) ; 122,4 (**C6**) ; 120,6 (**C14**) ; 120,3 (**C13**) ; 116,9 (**C15**) ; 109,4 (**C12**) ; 43,5 (**C2**).

SM (MALDI, THF) : *m/z* 318,1 [M]⁺.

IR

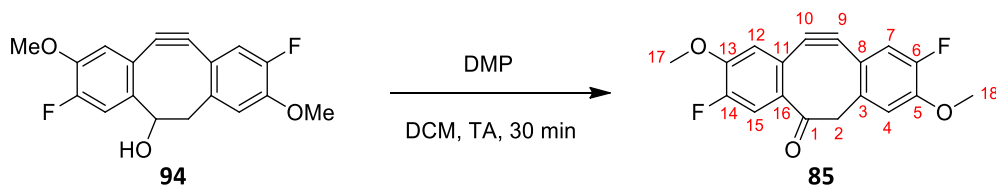
ν (cm⁻¹) = 3056, 2926 (C-H ar) ; 2147 (CC triple) ; 1678 (C=O) ; 1589 (C=C-CH₂ ou CH₂-C=O) ; 1433, 1396, 1336, 1231, 1054, 1024 (C-H ar) ; 861, 824, 810, 767, 745 (C-C ar).

Point de fusion : 157°C.

Propriétés photophysiquesλ_{ex} max = 336 nmλ_{ém} = 490 nmΦ_f = 11%Δν = 6260 cm⁻¹

τ = 4,5 ns

3,9-difluoro-2,8-dimethoxy-11,12-didehydrodihydrodibenzo[*a,e*][8]annulén-5(6H)-one (céto-FMDIBO) **85**



Masse molaire : 314,29 g.mol⁻¹

Formule brute : C₁₈H₁₂F₂O₃

Protocole général B appliqué à 49,5 mg de cyclooctynol **94**. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée (éluant : heptane/AE (95:5, v/v)). Le produit **85** (39,5 mg, 80% de rendement) est obtenu sous la forme d'un solide amorphe blanc.

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)

δ (ppm) : 7,53 (d, 1H, **H4**, *J* = 8,6 Hz) ; 7,47 (d, 1H, **H15**, *J* = 11,3 Hz) ; 7,38 (d, 1H, **H7**, *J* = 11,5 Hz) ; 7,31 (d, 1H, **H12**, *J* = 8,0 Hz) ; 3,97 (s, 3H, **H18**) ; 3,96 (s, 3H, **H17**) ; 1,27 (s, 2H, **H2**).

RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)

δ (ppm) : 197,1 (**C1**) ; 151,0 (d, **C14**, *J*_{13CF} = 250,0 Hz) ; 150,4 (d, **C6**, *J*_{13CF} = 229,3 Hz) ; 149,4 (d, **C13**, *J*_{13CF} = 11,2 Hz) ; 148,2 (d, **C5**, *J*_{13CF} = 10,6 Hz) ; 147,3 (d, **C16**, *J*_{13CF} = 4,9 Hz) ; 145,5 (d, **C3**, *J*_{13CF} = 3,1 Hz) ; 118,2 (d, **C11**, *J*_{13CF} = 4,2 Hz) ; 117,2 (d, **C12**, *J*_{13CF} = 1,9 Hz) ; 115,9 (d, **C15**, *J*_{13CF} = 20,3 Hz) ; 114,2 (d, **C8**, *J*_{13CF} = 9,0 Hz) ; 113,0 (d, **C7**, *J*_{13CF} = 20,3 Hz) ; 111,1 (d, **C4**, *J*_{13CF} = 1,8 Hz) ; 110,2 (**C10**) ; 108,3 (**C9**) ; 56,6 (**C18**) ; 56,4 (**C17**) ; 48,2 (**C2**).

RMN ¹⁹F (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ (ppm) : -133,7 (dd, 1F, **F14**, *J*_{HF} = 11,2 et 8,4 Hz) ; -136,1 (dd, 1F, **F6**, *J*_{HF} = 10,6 et 9,8 Hz).

RMN ¹⁹F-CPD (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ (ppm) : -133,7 (s, 1F, **F14**, *J*_{13CF} = 249,6 Hz) ; -136,1 (s, 1F, **F6**, *J*_{13CF} = 244,8 Hz).

SM (APPI, DCM + ACN) : *m/z* 314,1 [M]⁺.

Haute résolution calculée pour C₁₈H₁₂F₂O₃⁺ [M]⁺ : 314,0755, trouvée : 314,0729.

IR

ν (cm⁻¹) = 2941 (**C-H ar**) ; 2160 (**CC triple**) ; 1686 (**C=O**) ; 1605, 1571, 1495, 1446 (**C=C-CH₂**) ; 1329, 1223 (**C-O**) ; 1179, 1072 (**C-F**) ; 1029, 880, 843, 749 (**C-C ar**).

Point de fusion : 196°C.

Propriétés photophysiques

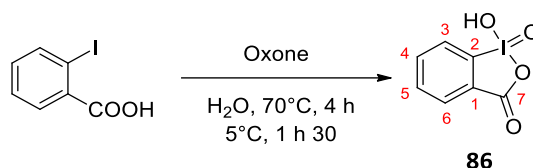
$\lambda_{\text{ex max}}$ = 300 nm

$\lambda_{\text{ém}}$ = 510 nm

Φ_f = 13%

$\Delta\nu$ = 7059 cm⁻¹

τ = 5,4 ns

acide 2-iodoxybenzoïque (IBX) **86**

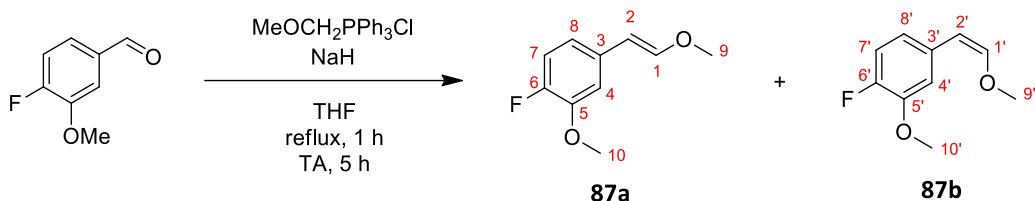
Masse molaire : 280,02 g.mol⁻¹

Formule brute : C₇H₅IO₄

L'oxone (78,9 g, 256 mmol, 2,5 éq.) est placée dans 325 mL d'eau distillée, puis l'acide 2-iodobenzoïque (25,2 g, 101 mmol, 1,0 éq.) est ajouté. Le mélange est mis sous agitation mécanique à 70°C pendant 4 h, puis à 5°C pendant 1 h 30.

Le mélange réactionnel est filtré sur Büchner en lavant quatre fois avec de l'eau et deux fois avec de l'acétone. La poudre blanche est laissée sécher pendant une nuit pour donner le composé **86** (22,5 g, 79% de rendement) sous la forme d'un solide amorphe blanc.

Les analyses obtenues sont en accord avec la littérature.¹²⁸

(E)- et (Z)-1-fluoro-2-methoxy-4-(2-methoxyvinyl)benzene 87

Masse molaire : 182,19 g.mol⁻¹

Formule brute : C₁₀H₁₁FO₂

L'hydruide de sodium (60% dans l'huile) (1,9 g, 46,7 mmol, 1,2 éq.) est ajouté lentement par portion sous atmosphère d'argon à une solution de chlorure de (méthoxyméthyl)(triphényl)phosphonium (16 g, 46,7 mmol, 1,2 éq.) dans 45 mL de THF anhydre. La réaction est agitée au reflux du THF pendant une heure puis refroidie à 0°C. Le 4-fluoro-3-méthoxybenzaldéhyde (6,0 g, 38,9 mmol, 1,0 éq.) est ensuite ajouté et le mélange est agité 5 h à température ambiante.

La réaction est arrêtée avec un mélange NH₄Cl_{sat}/eau (1:1, v/v) et la phase aqueuse est extraite trois fois avec AE. Les phases organiques réunies sont lavées avec NaCl_{sat}, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut peut être purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée (gradient : heptane à heptane/AE (95:5, v/v) en 40 minutes) pour donner le composé **87** (5,2 g, 74% de rendement) sous la forme d'un mélange *E/Z* (41:59) ayant l'aspect d'une huile incolore. Mais il est généralement utilisé tel quel dans la suite de la synthèse, sans purification.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)*Composé 87a*

δ (ppm) : 7,22 (dd, 1H, **H8**, *J* = 8,4 et 1,7 Hz) ; 6,95 (dd, 1H, **H7**, *J* = 8,4 Hz et *J*_{HF} = 5,0 Hz) ; 6,93 (d, 1H, **H4**, *J* = 1,7 Hz) ; 6,88 (d, 1H, **H1**, *J* = 13,1 Hz) ; 5,69 (d, 1H, **H2**, *J* = 13,1 Hz) ; 3,81 (s, 3H, **H10**) ; 3,72 (s, 3H, **H9**).

Composé 87b

δ (ppm) : 6,89 (d, 1H, **H4'**, *J* = 2,2 Hz) ; 6,74 (dd, 1H, **H8'**, *J* = 8,4 Hz et *J* = 2,2 Hz) ; 6,67 (ddd, 1H, **H7'**, *J* = 8,4 ; *J*_{HF} = 4,3 et *J* = 2,2 Hz) ; 6,04 (d, 1H, **H1'**, *J* = 7,2 Hz) ; 5,09 (d, 1H, **H2'**, *J* = 7,2 Hz) ; 3,81 (s, 3H, **H10'**) ; 3,61 (s, 3H, **H9'**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)*Composé 87a*

δ (ppm) : 150,9 (d, **C6**, *J*_{13CF} = 244,0 Hz) ; 148,8 (**C5**) ; 120,8 (d, **C7**, *J*_{13CF} = 6,4 Hz) ; 116,2 (**C1**) ; 115,9 (**C4**) ; 115,7 (**C3**) ; 113,3 (d, **C8**, *J*_{13CF} = 1,6 Hz) ; 104,3 (**C2**) ; 56,6 (**C9**) ; 56,2 (**C10**).

Composé 87b

δ (ppm) : 150,9 (d, **C6'**, *J*_{13CF} = 244,0 Hz) ; 148,7 (**C4'**) ; 147,6 (**C5'**) ; 147,6 (**C1'**) ; 117,4 (d, **C7'**, *J*_{13CF} = 6,6 Hz) ; 115,4 (**C3'**) ; 110,2 (d, **C8'**, *J*_{13CF} = 1,4 Hz) ; 104,9 (**C2'**) ; 60,8 (**C9'**) ; 56,1 (**C10'**).

RMN ¹⁹F (300 MHz, CDCl₃)*Composé 87a*

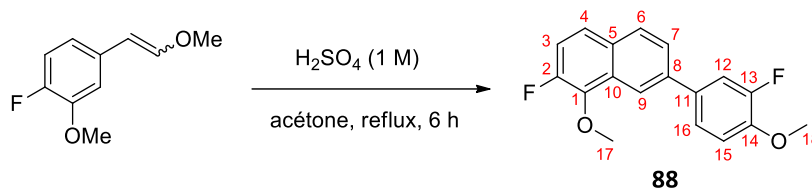
δ (ppm) : -138,4 (d, 1F, **F6**, *J*_{HF} = 5,0 Hz).

Composé 87b

δ (ppm) : -139,3 (dd, 1F, **F6'**, $J_{\text{HF}} = 4,3$ Hz).

SM (APPI, DCM + ACN) : m/z 182,1 [M]⁺.

Haute résolution calculée pour $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{FO}_2^+$ [M]⁺ : 182,0743, trouvée : 182,0733.

2-fluoro-7-(3-fluoro-4-methoxyphenyl)-1-methoxynaphthalene **88**

Masse molaire : 300,30 g.mol⁻¹

Formule brute : C₁₈H₁₄F₂O₂

L'éther d'énol **87** (272 mg, 0,75 mmol, 2,0 éq.) est solubilisé avec 3,8 mL d'acétone (C = 0,4 M) dans un tube à vis. Une solution d'acide sulfurique (1 M) (37 µL, 37 µmol, 0,05 éq.) est ensuite ajoutée, et le mélange est agité au reflux de l'acétone pendant 6 h.

Le solvant est ensuite évaporé, et le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackagée (gradient : heptane/DCM (7:3 à 3:7, v/v) en 12 minutes). Le composé **88** (25 mg, 10% de rendement) est obtenu sous la forme d'une huile incolore.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆)

δ (ppm) : 8,13 (s, 1H, **H9**) ; 7,93 (d, 1H, **H6**, J = 8,5 Hz) ; 7,80 (dd, 1H, **H3**, J = 13,6 et 7,6 Hz) ; 7,79 (d, 1H, **H12**, J = 12,8 Hz) ; 7,57 (d, 1H, **H7**, J = 8,5 Hz) ; 7,50 (d, 1H, **H15**, J = 8,7 Hz) ; 7,31 (d, 1H, **H16**, J = 8,7 Hz) ; 7,30 (d, 1H, **H4**, J = 7,6 Hz) ; 3,97 (s, 3H, **H17**) ; 3,96 (s, 3H, **H18**).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆)

δ (ppm) : 151,8 (d, **C13**, J = 249,0 Hz) ; 151,2 (d, **C2**, J = 244,5 Hz) ; 147,3 (d, **C14**, J = 24,0 Hz) ; 147,4 (d, **C1**, J = 21,0 Hz) ; 136,9 (**C8**) ; 135,4 (**C11**) ; 130,0 (**C5**) ; 128,0 (d, **C10**, J = 7,9 Hz) ; 127,2 (**C6**) ; 124,9 (d, **C16**, J = 1,5 Hz) ; 124,5 (d, **C9**, J = 4,9 Hz) ; 119,0 (d, **C4**, J = 6,5 Hz) ; 116,2 (d, **C3**, J = 18,2 Hz) ; 112,3 (d, **C15**, J = 4,7 Hz) ; 112,1 (d, **C12**, J = 17,4 Hz) ; 108,4 (d, **C7**, J = 1,7 Hz) ; 56,0 (**C17**) ; 55,9 (**C18**).

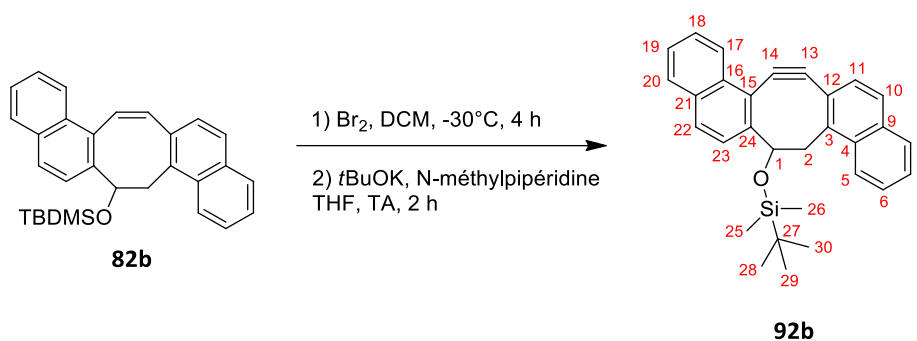
RMN ¹⁹F (300 MHz, DMSO-d₆)

δ (ppm) : -133,5 (dd, 1F, **F13**, J_{HF} = 12,8 et 9,3 Hz) ; -137,5 (dd, 1F, **F2**, J_{HF} = 13,6 et 8,1 Hz).

RMN ¹⁹F-CPD (300 MHz, DMSO-d₆)

δ (ppm) : -133,5 (s, 1F, **F13**, J_{13CF} = 249,0 Hz) ; -137,5 (dd, 1F, **F2**, J_{13CF} = 244,5 Hz).

SM (MALDI, THF) : m/z 300,1 [M]⁺.

tert-butyl((7,8-dihydrocycloocta[1,2-*a*:5,6-*a'*]dinaphthalen-7-yl)oxy)silane **92b**Masse molaire : 434,65 g.mol⁻¹Formule brute : C₃₀H₃₀OSi

Protocole général A (dibromation réalisée à -30°C pendant 4 heures, double déshydrohalogénéation réalisée avec 5,0 éq. de *tert*-butylate de potassium et 10 éq. de N-méthylpipéridine à température ambiante pendant 2 heures) appliqué à 1,95 g de dibenzocyclooctène **82b**. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée (gradient : heptane à heptane/AE (95:5, v/v) en 30 minutes). Le produit **92b** (1,10 g, 58% de rendement) est obtenu sous la forme d'un solide amorphe jaune.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 8,35 (d, 1H, **H17**, *J* = 8,4 Hz) ; 8,23 (d, 1H, **H5**, *J* = 8,1 Hz) ; 8,04-7,86 (m, 4H, **H8**, **H10**, **H20** et **H22**) ; 7,83 (d, 1H, **H23**, *J* = 8,4 Hz) ; 7,64-7,48 (m, 5H, **H6**, **H7**, **H11**, **H18**, **H19**) ; 4,65 (sl, 1H, **H1**) ; 4,23 (dd, 1H, **H2a**, *J* = 14,8 et 2,3 Hz) ; 2,83 (dd, 1H, **H2b**, *J* = 14,8 et 2,9 Hz) ; 0,98 (s, 9H, **H28** et **H29** et **H30**) ; -0,23 (s, 3H, **H25**) ; -0,36 (s, 3H, **H26**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

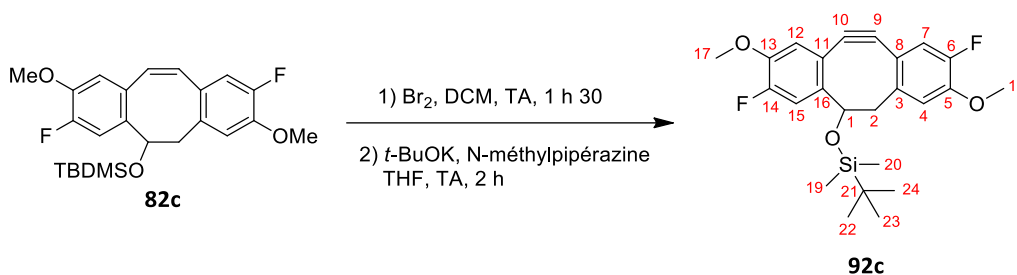
δ (ppm) : 156,0 (**C24**) ; 150,2 (**C3**) ; 133,1 (**C16**) ; 132,5 (**C9**) ; 132,4 (**C4**) ; 130,4 (**C21**) ; 128,9 (**C22**) ; 128,0 (**C8**) ; 127,6 (**C20**) ; 127,1 (**C7**) ; 126,7 (**C5**) ; 126,5 (**C18**) ; 126,4 (**C11**) ; 126,1 (**C19**) ; 126,1 (**C6**) ; 124,5 (**C17**) ; 123,3 (**C10**) ; 123,4 (**C23**) ; 121,5 (**C15**) ; 119,6 (**C12**) ; 118,9 (**C13**) ; 111,3 (**C14**) ; 77,7 (**C1**) ; 45,2 (**C2**) ; 31,9 (**C27**) ; 25,9 (**C28** et **C29** et **C30**) ; -5,13 (**C25**) ; -5,27 (**C26**).

SM (MALDI, THF) : *m/z* 434,2 [M]⁺.**IR**

ν (cm⁻¹) = 3054, 2953 (**C-H ar**) ; 2927, 2855 (**CC triple**) ; 1923, 1507, 1471 (**C=C-CH₂**) ; 1359, 1252, 1090 (**C-O**) ; 1070 (**Si-O**) ; 835 (**Si-(*t*Bu)(CH₃)₂**) ; 772 (**C-C ar**).

Point de fusion : 57°C.

tert-butyl(diméthyl)((3,9-difluoro-2,8-diméthoxy-11,12-didéhydro-5,6-dihydrodibenzo[*α,e*][8]annulén-5-yl)oxy)silane **92c**



Masse molaire : 430,57 g.mol⁻¹

Formule brute : C₂₄H₂₈F₂O₃Si

Protocole général A (dibromation réalisée à température ambiante, double déshydrohalogénéation réalisée avec 5,0 éq. de *tert*-butylate de potassium et 10 éq. de N-méthylpiperidine à température ambiante pendant 1,5 h) appliqué à 320 mg de dibenzocyclooctène **82c**. Le brut obtenu sous la forme d'un solide rouge foncé est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : heptane/AE (98:2, v/v)). Le composé **92c** (123 mg, 39% de rendement sur 2 étapes) est isolé sous la forme d'un solide amorphe blanc.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 7,42 (d, 1H, **H15**, $J_{\text{HF}} = 12,6$ Hz) ; 7,01 (d, 1H, **H7**, $J_{\text{HF}} = 11,2$ Hz) ; 6,94 (d, 1H, **H4**, $J_{\text{HF}} = 8,4$ Hz) ; 6,86 (d, 1H, **H12**, $J_{\text{HF}} = 8,1$ Hz) ; 4,40 (m, 1H, **H1**, $J = 3,0$ et 1,7 Hz) ; 3,90 (s, 3H, **H17**) ; 3,88 (s, 3H, **H18**) ; 3,00 (dd, 1H, **H2a**, $J = 14,7$ et 1,7 Hz) ; 2,82 (dd, 1H, **H2b**, $J = 14,7$ et 3,0 Hz) ; 0,93 (s, 9H, **H21**, **H22** et **H23**) ; -0,08 (s, 3H, **H19**) ; -0,09 (s, 3H, **H20**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 152,5 (d, **C14**, $J_{13\text{CF}} = 248,7$ Hz) ; 150,8 (d, **C6**, $J_{13\text{CF}} = 245,2$ Hz) ; 150,1 (d, **C16**, $J_{13\text{CF}} = 5,6$ Hz) ; 148,5 (**C3**) ; 147,3 (d, **C5**, $J_{13\text{CF}} = 10,8$ Hz) ; 146,1 (d, **C13**, $J_{13\text{CF}} = 11,6$ Hz) ; 116,3 (d, **C11**, $J_{13\text{CF}} = 3,5$ Hz) ; 115,6 (**C8**) ; 115,5 (**C4**) ; 113,8 (d, **C7**, $J_{13\text{CF}} = 7,1$ Hz) ; 113,5 (d, **C15**, $J_{13\text{CF}} = 6,0$ Hz) ; 112,0 (**C9**) ; 110,7 (**C12**) ; 109,6 (**C10**) ; 75,4 (**C1**) ; 56,5 (**C18**) ; 56,5 (**C17**) ; 50,4 (**C2**) ; 25,9 (**C22**, **C23** et **C24**) ; 18,2 (**C21**) ; -4,53 (**C19**) ; -4,95 (**C20**).

RMN ¹⁹F (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : -133,5 (dd, 1F, **F14**, $J_{\text{HF}} = 12,6$ et 8,1 Hz) ; -137,3 (dd, 1F, **F6**, $J_{\text{HF}} = 11,2$ et 8,4 Hz).

RMN ¹⁹F-CPD (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : -133,5 (s, 1F, **F14**, $J_{13\text{CF}} = 248,7$ Hz) ; -137,3 (s, 1F, **F6**, $J_{13\text{CF}} = 245,2$ Hz).

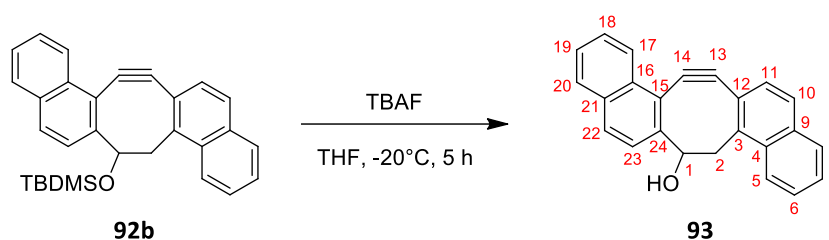
SM (APPI, THF) : m/z 430,2 [M]⁺.

Haute résolution calculée pour C₂₄H₂₈F₂O₃Si⁺ [M]⁺ : 430,1776, trouvée : 430,1765.

IR

ν (cm⁻¹) = 2957, 2930 (**C-H ar**) ; 2855 (**CC triple**) ; 1613, 1512, 1492 (**C=C-CH₂**) ; 1333, 1275, 1254 (**C-O**) ; 1156, 1143 (**C-F**) ; 1066 (**Si-O**) ; 887, 876, 866, 775, 750 (**C-C ar**) ; 835 (**Si-(tBu)(CH₃)₂**).

Point de fusion : 62°C.

dinaphthylcyclooctynol (DINO) **93**

Masse molaire : 320,39 g.mol⁻¹

Formule brute : C₂₄H₁₆O

Protocole général G appliqué à 133 mg de dibenzocyclooctynol protégé **92b**. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackagée (gradient : heptane à heptane/AE (4:1, v/v) en 25 minutes) pour donner le composé **93** (74,7 mg, 71% de rendement) sous la forme d'un solide amorphe blanc.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ (ppm) : 8,39 (d, 1H, **H5**, *J* = 8,6 Hz) ; 8,14-7,99 (m, 5H, **H8**, **H10**, **H17**, **H20** et **H22**) ; 7,95 (d, 1H, **H23**, *J* = 8,3 Hz) ; 7,73-7,55 (m, 5H, **H6**, **H7**, **H11**, **H18**, **H19**) ; 6,11 (d, 1H, -OH, *J* = 5,7 Hz) ; 4,41 (ddd, 1H, **H1**, *J* = 5,7 ; 2,5 et 2,0 Hz) ; 4,18 (dd, 1H, **H2a**, *J* = 14,3 Hz et 2,0 Hz) ; 2,66 (dd, 1H, **H2b**, *J* = 14,3 et 2,5 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆)

δ (ppm) : 157,2 (**C24**) ; 150,2 (**C3**) ; 132,8 (**C4**) ; 132,0 (**C15**) ; 131,9 (**C12**) ; 129,6 (**C9**) ; 128,7 (**C23**) ; 128,1 (**C6**) ; 127,6 (**C8**) ; 127,1 (**C7** et **C18**) ; 127,0 (**C20**) ; 126,4 (**C19**) ; 126,2 (**C22**) ; 125,7 (**C11**) ; 124,3 (**C5**) ; 123,3 (**C10**) ; 123,1 (**C17**) ; 120,7 (**C16**) ; 119,0 (**C3**) ; 117,7 (**C14**) ; 111,2 (**C13**) ; 75,5 (**C1**) ; 43,9 (**C2**).

SM (MALDI, THF) : *m/z* 320,1 [M]⁺.

IR

v (cm⁻¹) = 3319 (**O-H**) ; 3223, 2283 (**C-H ar**) ; 2325 (**CC triple**) ; 1263 (**C-O**) ; 1036, 1026, 862, 812, 761, 739 (**C-C ar**).

Point de fusion : 223°C.

Propriétés photophysiques

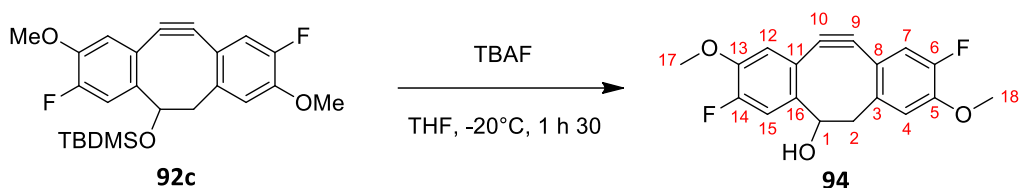
$\lambda_{\text{ex max}} = 267 \text{ nm}$

$\lambda_{\text{ém}} = 387 \text{ nm}$

$\Phi_f = 18\%$

$\Delta\nu = 3572 \text{ cm}^{-1}$

$\tau = 1,1 \text{ ns}$

3,9-difluoro-2,8-dimethoxy-11,12-didehydrodihydrodibenzo[*a,e*][8]annulén-5(6H)-ol (FMDIBO) **94**Masse molaire : 316,30 g.mol⁻¹Formule brute : C₁₈H₁₄F₂O₃

Protocole général G (mélange réactionnel agité pendant 1,5 heure et avec 2,0 éq. de fluorure de tétra *n*-butylammonium) appliqué à 109 mg de dibenzocyclooctynol **92c**. Le FMDIBO **94** n'étant soluble dans aucun solvant, une cristallisation dans DCM/heptane (5:95, v/v) est réalisée et permet d'enlever les impuretés. Le composé **94** (80 mg, rendement quantitatif) est isolé sous la forme d'un solide amorphe blanc.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ (ppm) : 7,44 (d, 1H, **H15**, $J_{\text{HF}} = 12,7$ Hz) ; 7,32 (d, 1H, **H4**, $J_{\text{HF}} = 8,6$ Hz) ; 7,28 (d, 1H, **H7**, $J_{\text{HF}} = 11,5$ Hz) ; 7,17 (d, 1H, **H12**, $J_{\text{HF}} = 8,2$ Hz) ; 5,89 (d, 1H, -OH, $J = 5,0$ Hz) ; 4,24 (dd, 1H, **H1**, $J = 3,0$ et 1,7 Hz) ; 3,90 (s, 3H, **H18**) ; 3,86 (s, 3H, **H17**) ; 3,10 (dd, 1H, **H2a**, $J = 14,5$ et 1,7 Hz) ; 2,63 (dd, 1H, **H2b**, $J = 14,5$ et 3,0 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆)

δ (ppm) : 151,5 (d, **C14**, $J_{13\text{CF}} = 249,8$ Hz) ; 150,6 (d, **C16**, $J_{13\text{CF}} = 1,7$ Hz) ; 149,9 (d, **C6**, $J_{13\text{CF}} = 243,0$ Hz) ; 149,3 (d, **C3**, $J_{13\text{CF}} = 2,9$ Hz) ; 147,0 (d, **C5**, $J_{13\text{CF}} = 10,5$ Hz) ; 145,6 (d, **C13**, $J_{13\text{CF}} = 11,9$ Hz) ; 116,2 (d, **C11**, $J_{13\text{CF}} = 3,4$ Hz) ; 116,0 (**C4**) ; 114,41 (d, **C8**, $J_{13\text{CF}} = 9,2$ Hz) ; 113,1 (d, **C7**, $J_{13\text{CF}} = 9,2$ Hz) ; 113,0 (d, **C15**, $J_{13\text{CF}} = 9,5$ Hz) ; 111,7 (**C9**) ; 111,2 (**C12**) ; 109,5 (**C10**) ; 73,2 (**C1**) ; 56,3 (**C18**) ; 56,2 (**C17**) ; 48,7 (**C2**).

RMN ¹⁹F (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ (ppm) : -133,9 (dd, 1F, **F14**, $J_{\text{HF}} = 12,7$ et 8,2 Hz) ; -137,5 (dd, 1F, **F6**, $J_{\text{HF}} = 11,5$ et 8,6 Hz).

RMN ¹⁹F-CPD (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ (ppm) : -133,9 (s, 1F, **F14**, $J_{13\text{CF}} = 249,8$ Hz) ; -137,5 (s, 1F, **F6**, $J_{13\text{CF}} = 243,0$ Hz).

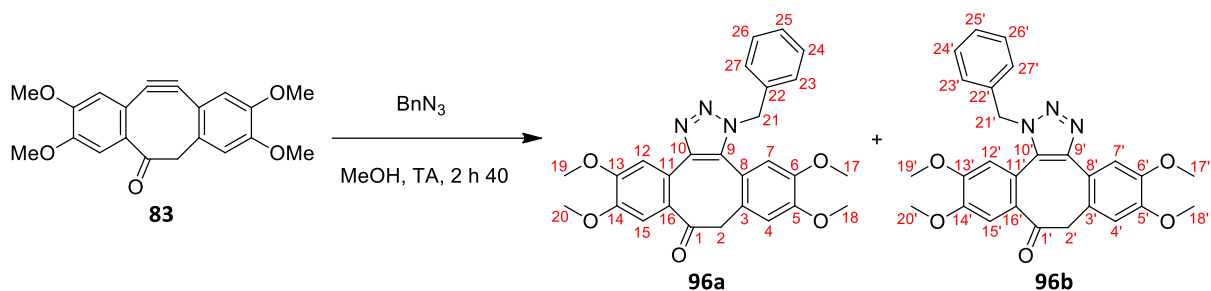
SM (APPI, THF) : m/z 316,1 [M]⁺.

Haute résolution calculée pour C₁₈H₁₄F₂O₃⁺ [M]⁺ : 316,0911, trouvée : 316,0885.

IR

ν (cm⁻¹) = 3228 (O-H) ; 2964, 2917 (C-H ar) ; 2146 (CC triple) ; 1610, 1572, 1495 (C=C-CH₂) ; 1449, 1330, 1312, 1221 (C-O), 1178, 1066 (C-F), 870, 749 (C-C ar).

Point de fusion : 233°C.

1- et 3-benzyl-5,6,11,12-tetraméthoxy-1,9-dihydro-8*H*-dibenzo[3,4:7,8]cycloocta[1,2-*d*][1,2,3]triazol-8-one **96**Masse molaire : 471,50 g.mol⁻¹Formule brute : C₂₇H₂₅N₃O₅

Protocole général C (mélange réactionnel agité pendant 2 h 40) appliqué à 15,3 mg de cyclooctynone **83**. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur plaque préparative (éluant : heptane/AE (3:7, v/v)). Les triazoles **96** (11,8 mg, 55% de rendement) sont obtenus sous la forme d'un mélange **96a:96b** (91:9) ayant l'aspect d'un solide amorphe jaune.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃)*Triazole 96a*

δ (ppm) : 7,78 (s, 1H, **H15**) ; 7,47 (s, 1H, **H12**) ; 7,30-7,22 (m, 3H, **H24**, **H25** et **H26**) ; 7,12-7,09 (m, 2H, **H23** et **H27**) ; 6,90 (s, 1H, **H4**) ; 6,47 (s, 1H, **H7**) ; 5,78 (d, 1H, **H21a**, *J* = 15,8 Hz) ; 5,32 (d, 1H, **H21b**, *J* = 15,8 Hz) ; 3,96 (s, 3H, **H19**) ; 3,87 (s, 3H, **H17**) ; 3,85 (s, 3H, **H20**) ; 3,61 (d, 1H, **H2a**, *J* = 12,1 Hz) ; 3,57 (d, 1H, **H2b**, *J* = 12,1 Hz) ; 3,41 (s, 3H, **H18**).

Triazole 96b

δ (ppm) : 7,72 (s, 1H, **H15'**) ; 7,30-7,22 (m, 3H, **H24'**, **H25'** et **H26'**) ; 7,17 (s, 1H, **H12'**) ; 7,12-7,09 (m, 2H, **H23'** et **H27'**) ; 6,78 (s, 1H, **H4'**) ; 6,40 (s, 1H, **H7'**) ; 5,74 (d, 1H, **H21a'**, *J* = 15,7 Hz) ; 5,47 (d, 1H, **H21b'**, *J* = 15,7) ; 3,86 (s, 3H, **H19'**) ; 3,84 (s, 3H, **H17'**) ; 3,81 (s, 3H, **H20'**) ; 3,67 (d, 1H, **H2a'**, *J* = 13,1 Hz) ; 3,49 (d, 1H, **H2b'**, *J* = 13,1 Hz) ; 3,34 (s, 3H, **H18'**).

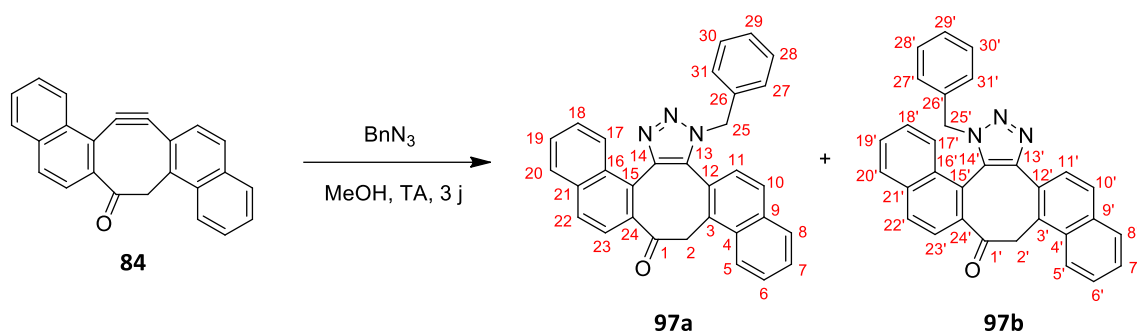
RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃)*Triazole 96a*

δ (ppm) : 195,6 (**C1**) ; 152,9 (**C13**) ; 151,7 (**C6**) ; 150,0 (**C14**) ; 148,8 (**C5**) ; 148,2 (**C10**) ; 135,9 (**C9**) ; 134,0 (**C22**) ; 129,1 (**C7**) ; 129,1 (**C23** et **C27**) ; 128,6 (**C25**) ; 128,4 (**C24** et **C26**) ; 128,3 (**C12**) ; 127,5 (**C4**) ; 126,7 (**C15**) ; 126,4 (**C11**) ; 126,0 (**C8**) ; 119,9 (**C16**) ; 116,8 (**C3**) ; 56,4 (**C17**) ; 56,0 (**C18**) ; 55,7 (**C19**) ; 55,6 (**C20**) ; 52,1 (**C21**) ; 47,9 (**C2**).

Triazole 96b

δ (ppm) : 194,2 (**C1'**) ; 152,5 (**C13'**) ; 151,3 (**C6'**) ; 149,1 (**C14'**) ; 148,2 (**C5'**) ; 146,3 (**C9'**) ; 134,5 (**C10'**) ; 134,0 (**C22'**) ; 129,1 (**C7'**, **C23'** et **C27'**) ; 128,4 (**C24'**, **C25'** et **C26'**) ; 126,7 (**C4'**, **C11'**, **C12'** et **C15'**) ; 126,0 (**C8'**) ; 114,7 (**C16'**) ; 113,6 (**C3'**) ; 56,2 (**C17'**) ; 56,0 (**C18'**) ; 56,0 (**C19'**) ; 55,6 (**C20'**) ; 53,0 (**C21'**) ; 46,9 (**C2'**).

SM (APPI, DCM + ACN) : *m/z* 471,2 [M]⁺.Haute résolution calculée pour C₂₇H₂₅N₃O₅⁺ [M]⁺ : 471,1794, trouvée : 471,1750.

15-benzyl-8,15-dihydro-7H-dinaphtho[1',2':3,4;1'',2'':7,8]cycloocta[1,2-d][1,2,3]triazol-7-one **97**Masse molaire : 451,52 g.mol⁻¹Formule brute : C₃₁H₂₁N₃O

Protocole général C (mélange réactionnel agité pendant 3 jours) appliqué à 14,6 mg de cyclooctynone **84**. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur plaque préparative (éluant : heptane/AE (1:1, v/v)). Les triazoles **97** (12 mg, 58% de rendement) sont obtenus sous la forme d'un mélange **97a:97b** (73:27) ayant la forme d'un solide amorphe blanc.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)*Triazole 97a*

δ (ppm) : 8,15 (d, 1H, **H17**, *J* = 8,4 Hz) ; 8,02-7,95 (m, 2 **Har**) ; 7,81-7,67 (m, 5 **Har**) ; 7,60-7,40 (m, 5 **Har**) ; 7,28 (d, 1H, **H18**, *J* = 8,5 Hz) ; 7,07-7,02 (m, 2 **Har**) ; 6,50 (d, 1H, **H22**, *J* = 7,1 Hz) ; 5,67 (s, 2H, **H25a** et **H25b**) ; 4,31 (d, 1H, **H2a**, *J* = 14,7 Hz) ; 3,50 (d, 1H, **H2b**, *J* = 14,7 Hz).

Triazole 97b

δ (ppm) : 8,02 (d, 1H, **H17'**, *J* = 8,4 Hz) ; 7,90 (d, 1H, **H5'**, *J* = 8,7 Hz) ; 7,81-7,67 (m, 5 **Har**) ; 7,52-7,37 (m, 6 **Har**) ; 7,23-7,06 (m, 2 **Har**) ; 7,02-6,98 (m, 2 **Har**) ; 5,76 (d, 1H, **H25a'**, *J* = 14,6 Hz) ; 4,83 (d, 1H, **H25b'**, *J* = 14,6 Hz) ; 4,36 (d, 1H, **H2a'**, *J* = 15,2 Hz) ; 3,57 (d, 1H, **H2b'**, *J* = 15,2 Hz).

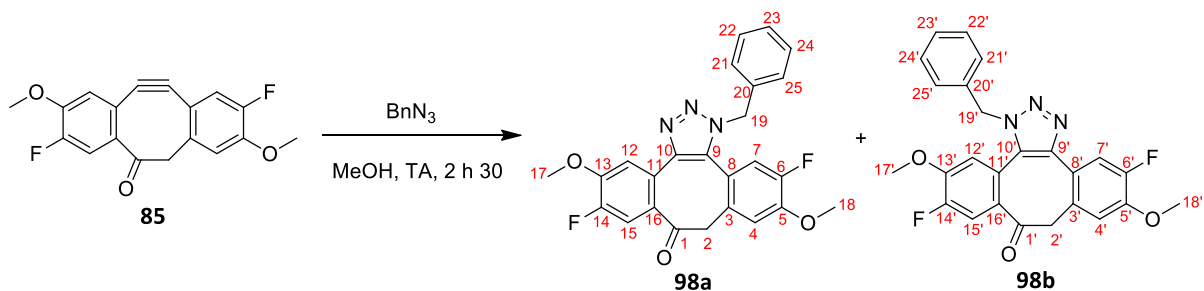
RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃)*Triazole 97a*

δ (ppm) : 198,4 (**C1**) ; 145,2 (**C14**) ; 135,6 (**C13** et **Car**) ; 134,7 (2 **Car**) ; 134,3 (**Car**) ; 134,0 (**Car**) ; 132,9 (**Car**) ; 132,1 (**Car**) ; 131,9 (**Car**) ; 129,3 (**CHar**) ; 128,9 (2 **CHar**) ; 128,7 (**CHar**) ; 128,7 (**CHar**) ; 128,6 (2 **CHar**) ; 128,3 (2 **CHar**) ; 127,9 (**CHar**) ; 127,8 (**CHar**) ; 127,6 (2 **CHar**) ; 127,3 (**CHar**) ; 127,0 (**CHar**) ; 125,7 (**CHar**) ; 124,6 (**CHar**) ; 123,3 (**Car**) ; 52,8 (**C25**) ; 46,4 (**C2**).

Triazole 97b

δ (ppm) : 198,2 (**C1'**) ; 147,9 (**C13'**) ; 136,2 (**C14'**) ; 135,0 (**Car**) ; 134,2 (**Car**) ; 133,7 (**Car**) ; 132,9 (**Car**) ; 132,3 (**Car**) ; 131,1 (2 **Car**) ; 130,2 (2 **CHar**) ; 130,1 (**CHar**) ; 128,8 (2 **CHar**) ; 128,6 (**CHar**) ; 128,5 (**Car**) ; 128,1 (**CHar**) ; 127,4 (2 **CHar**) ; 127,3 (2 **CHar**) ; 126,4 (**CHar**) ; 125,9 (**CHar**) ; 125,8 (**CHar**) ; 125,5 (**CHar**) ; 125,4 (**CHar**) ; 125,0 (**Car**) ; 124,2 (**CHar**) ; 54,1 (**C25'**) ; 52,8 (**C25**) ; 46,6 (**C2'**) ; 46,4 (**C2**).

SM (ESI⁺, DCM + ACN) : *m/z* 452,2 [M+H]⁺.Haute résolution calculée pour C₃₁H₂₂N₃O⁺ [M+H]⁺ : 452,1763, trouvée : 452,1752.

1- et 3-benzyl-6,12-difluoro-5,11-diméthoxy-3,9-dihydro-8*H*-dibenzo[3,4:7,8]cycloocta[1,2-*d*][1,2,3]triazol-8-one **98**Masse molaire : 447,44 g.mol⁻¹Formule brute : C₂₅H₁₉F₂N₃O₃

Protocole général C (mélange réactionnel agité pendant 2 h 30) appliqué à 16,4 mg de cyclooctynone **85**. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur plaque préparative (éluant : heptane/AE (1:1, v/v)). Les triazoles **98** (15,1 mg, 65% de rendement) sont obtenus sous la forme d'un mélange **98a:98b** (83:17) ayant l'aspect d'un solide amorphe orange.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃)*Triazole 98a*

δ (ppm) : 8,01 (d, 1H, **H15**, *J*_{HF} = 12,8 Hz) ; 7,54 (d, 1H, **H4**, *J*_{HF} = 8,2 Hz) ; 7,30-7,27 (m, 3H, **H22**, **H23** et **H24**) ; 7,09 (d, 1H, **H12**, *J* = 7,5 Hz) ; 7,09 (d, 1H, **H25**, *J* = 5,8 Hz) ; 7,0 (d, 1H, **H21**, *J* = 8,3 Hz) ; 6,92 (d, 1H, **H7**, *J* = 11,1 Hz) ; 5,67 (d, 1H, **H19a**, *J* = 15,3 Hz) ; 5,50 (d, 1H, **H19b**, *J* = 15,3 Hz) ; 4,00 (s, 3H, **H17**) ; 3,91 (s, 3H, **H18**) ; 3,62 (d, 1H, **H2a**, *J* = 12,1 Hz) ; 3,54 (d, 1H, **H2b**, *J* = 12,1 Hz).

Triazole 98b

δ (ppm) : 7,94 (d, 1H, **H15'**, *J*_{HF} = 12,3 Hz) ; 7,43 (d, 1H, **H4'**, *J* = 11,1 Hz) ; 7,36-7,30 (m, 3H, **H22'**, **H23'** et **H24'**) ; 7,16 (d, 1H, **H12'**, *J* = 7,5 Hz) ; 7,16 (d, 1H, **H7'**, *J* = 6,9 Hz) ; 6,91 (d, 1H, **H21'**, *J* = 8,0 Hz) ; 6,54 (d, 1H, **H25'**, *J* = 7,8 Hz) ; 5,78 (d, 1H, **H19a'**, *J* = 15,9 Hz) ; 5,51 (d, 1H, **H19b'**, *J* = 15,9 Hz) ; 3,87 (s, 3H, **H17'**) ; 3,74 (d, 1H, **H2a'**, *J* = 13,6 Hz) ; 3,54 (d, 1H, **H2b'**, *J* = 13,6 Hz) ; 3,43 (s, 3H, **H18'**).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃)*Triazole 98a*

δ (ppm) : 193,0 (**C1**) ; 152,0 (d, **C14**, *J*_{13CF} = 250,6 Hz) ; 151,2 (d, **C6**, *J*_{13CF} = 246,3 Hz) ; 150,2 (Car) ; 150,0 (Car) ; 146,0 (**C10**) ; 135,4 (**C9**) ; 134,8 (Car) ; 131,9 (Car) ; 129,3 (Car) ; 129,0 (**C21** et **C25**) ; 128,6 (**C23**) ; 127,2 (**C22** et **C24**) ; 117,9 (d, **C15**, *J*_{13CF} = 19,9 Hz) ; 117,8 (Car) ; 116,7 (**C12**) ; 115,6 (d, **C7**, *J*_{13CF} = 18,7 Hz) ; 115,4 (Car) ; 113,7 (d, **C4**, *J*_{13CF} = 2,2 Hz) ; 56,5 (**C17**) ; 56,4 (**C18**) ; 52,6 (**C19**) ; 47,0 (**C2**).

Triazole 98b

δ (ppm) : 193,0 (**C1'**) ; 151,6 (d, **C14'**, *J*_{13CF} = 248,0 Hz) ; 151,0 (d, **C6'**, *J*_{13CF} = 248,0 Hz) ; 151,0 (Car) ; 150,0 (Car) ; 146,0 (**C9'**) ; 135,4 (**C10'**) ; 134,6 (Car) ; 133,1 (Car) ; 131,9 (Car) ; 129,3 (**C21'** et **C25'**) ; 128,6 (**C23'**) ; 127,2 (**C22'** et **C24'**) ; 126,7 (Car) ; 118,9 (CHar) ; 116,8 (CHar) ; 116,1 (CHar) ; 115,6 (Car) ; 113,3 (CHar) ; 56,3 (**C17'**) ; 55,9 (**C18'**) ; 53,1 (**C19'**) ; 48,3 (**C2'**).

RMN ¹⁹F (300 MHz, CDCl₃)*Triazole 98a*

δ (ppm) : -134,5 (dd, 1F, **F14**, *J*_{HF} = 12,8 et 8,3 Hz) ; -134,9 (dd, 1F, **F6**, *J*_{HF} = 11,1 et 8,2 Hz).

Triazole 98b

δ (ppm) : -131,3 (dd, 1F, **F14'**, $J_{\text{HF}} = 12,3$ et $7,5$ Hz) ; -135,6 (dd, 1F, **F6'**, $J_{\text{HF}} = 11,1$ et $8,3$ Hz).

RMN ^{19}F -CPD (300 MHz, CDCl_3)

Triazole 98a

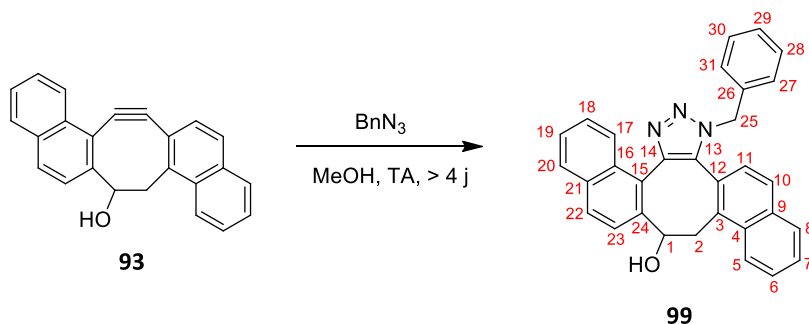
δ (ppm) : -134,5 (s, 1F, **F14**, $J_{13\text{CF}} = 250,6$ Hz) ; -134,9 (s, 1F, **F6**, $J_{13\text{CF}} = 246,3$ Hz).

Triazole 98b

δ (ppm) : -131,3 (s, 1F, **F14'**, $J_{13\text{CF}} = 238,7$ Hz) ; -135,6 (s, 1F, **F6'**, $J_{13\text{CF}} = 248,0$ Hz).

SM (APPI, DCM + ACN) : m/z 447,1 $[\text{M}]^+$.

Haute résolution calculée pour $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3^+$ $[\text{M}]^+$: 447,1394, trouvée : 447,1351.

15-benzyl-8,15-dihydro-7*H*-dinaphtho[1',2':3,4;1'',2'':7,8]cycloocta[1,2-*d*][1,2,3]triazol-7-ol **99**

Masse molaire : 453,53 g.mol⁻¹

Formule brute : C₃₁H₂₃N₃O

Protocole général C (mélange réactionnel agité pendant 4,5 jours) appliqué à 15,0 mg de cyclooctynol **93**. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur plaque préparative (éluant : heptane/AE (1:1, v/v)). Le triazole **99** (8,6 mg, 41% de rendement, 80% de conversion) est obtenu sous la forme d'un solide amorphe blanc.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 8,04 (dd, 1H, **H17**, *J* = 6,0 et 2,5 Hz) ; 7,92 (d, 1H, **H10**, *J* = 8,7 Hz) ; 7,88 (dd, 1H, **H22**, *J* = 7,0 et 2,1 Hz) ; 7,75-7,62 (m, 4 **Har**) ; 7,60-7,36 (m, 5H, **H27**, **H28**, **H29**, **H30** et **H31**) ; 7,17-7,01 (m, 3 **Har**) ; 6,60-6,54 (m, 2 **Har**) ; 5,86 (d, 1H, **H25a**, *J* = 14,4 Hz) ; 5,13 (d, 1H, **H25b**, *J* = 14,4 Hz) ; 4,79 (dd, 1H, **H1**, *J* = 11,2 et 4,2 Hz) ; 3,78 (dd, 1H, **H2a**, *J* = 17,0 et 11,2 Hz) ; 3,59 (dd, 1H, **H2b**, *J* = 17,0 et 4,2 Hz).

RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 150,6 (**C14**) ; 143,2 (**C13**) ; 134,9 (**Car**) ; 133,4 (**Car**) ; 132,8 (**Car**) ; 132,7 (**Car**) ; 131,7 (**Car**) ; 131,1 (**CHar**) ; 130,1 (**Car**) ; 129,7 (**CHar**) ; 129,1 (**CHar**) ; 128,9 (**CHar**) ; 128,5 (**C27** et **C31**) ; 128,3 (**C28**, **C29** et **C30**) ; 127,9 (**CHar**) ; 127,3 (**CHar**) ; 126,7 (**CHar**) ; 126,4 (**CHar**) ; 126,2 (**CHar**) ; 126,2 (**Car**) ; 124,5 (**CHar**) ; 124,1 (**CHar**) ; 122,0 (**CHar**) ; 120,9 (**Car**) ; 119,8 (**Car**) ; 69,2 (**C1**) ; 54,0 (**C25**) ; 43,1 (**C2**).

SM (ESI⁺, DCM + ACN) : *m/z* 454,2 [M+H]⁺.

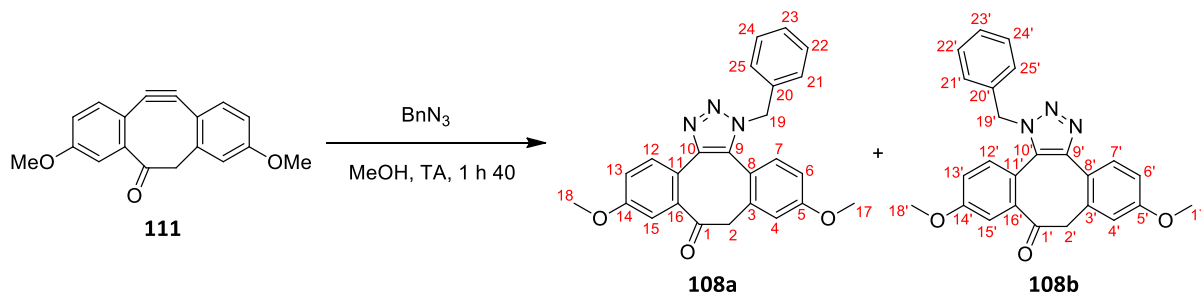
Haute résolution calculée pour C₃₁H₂₄N₃O⁺ [M+H]⁺ : 454,1919, trouvée : 454,1917.

IR

ν (cm⁻¹) = 3411 (**O-H**) ; 3284 (**C-H ar**) ; 3096 (**C-N**) ; 2944 (**CC triple**) ; 1596 (**C=C-CH₂ ou CH₂-C=O**) ; 1296, 1263, 1146, 1102, 1074, 1034 (**C-H ar**) ; 983, 910, 888, 869, 793, 767 (**C-C ar**).

Point de fusion : 241°C.

1-benzyl-6,11-diméthoxy-1H-dibenzo[3,4:7,8]cycloocta[1,2-d][1,2,3]triazol-8(9H)-one et 1-benzyl-6,11-diméthoxy-1H-dibenzo[3,4:7,8]cycloocta[1,2-d][1,2,3]triazol-9(8H)-one **108**



Masse molaire : 411,45 g.mol⁻¹

Formule brute : C₂₅H₂₁N₃O₃

Protocole général C (réaction agitée pendant 1 h 40) appliqué à 29,4 mg de cyclooctynone **111**. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur plaque préparative (éluant : heptane/AE (1:1, v/v)) pour conduire au 1,4-triazole **108a** majoritaire (30,8 mg, 69% de rendement) obtenu sous la forme d'une huile orange et au 1,5-triazole **108b** minoritaire (8,9 mg, 20% de rendement) obtenu sous la forme d'une huile jaune. Rendement de la réaction : 89%.

Le composé 108a

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 7,88 (d, 1H, **H12**, *J* = 8,7 Hz) ; 7,71 (d, 1H, **H4**, *J* = 2,8 Hz) ; 7,21-7,17 (m, 3H, **H22**, **H23** et **H24**) ; 7,11 (dd, 1H, **H13**, *J* = 8,7 et 2,8 Hz) ; 7,07 (d, 1H, **H7**, *J* = 8,5 Hz) ; 7,00 (dd, 2H, **H21** et **H25**, *J* = 7,2 et 3,7 Hz) ; 6,91 (d, 1H, **H15**, *J* = 2,4 Hz) ; 6,76 (dd, 1H, **H6**, *J* = 8,5 et 2,5 Hz) ; 5,59 (d, 1H, **H19a**, *J* = 15,3 Hz) ; 5,43 (d, 1H, **H19b**, *J* = 15,3 Hz) ; 3,76 (s, 3H, **H18**) ; 3,74 (s, 3H, **H17**) ; 3,62 (d, 1H, **H2a**, *J* = 11,8 Hz) ; 3,57 (d, 1H, **H2b**, *J* = 11,8 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 194,1 (**C1**) ; 160,5 (**C14**) ; 158,3 (**C5**) ; 145,2 (**C10**) ; 135,6 (**C9**) ; 134,3 (**C16**) ; 134,1 (**C20**) ; 133,6 (**C7**) ; 132,4 (**C3**) ; 128,4 (**C12**) ; 127,8 (**C22** et **C24**) ; 127,3 (**C23**) ; 126,2 (**C21** et **C25**) ; 123,5 (**C11**) ; 119,9 (**C13**) ; 116,7 (**C8**) ; 113,3 (**C4**) ; 112,8 (**C6**) ; 112,3 (**C15**) ; 54,5 (**C18**) ; 54,5 (**C17**) ; 51,3 (**C19**) ; 47,0 (**C2**).

SM (ESI⁺, DCM + ACN) : *m/z* 412,2 [M+H]⁺.

Haute résolution calculée pour C₂₅H₂₂N₃O₃⁺ [M+H]⁺ : 412,1661, trouvée : 412,1655.

IR

ν (cm⁻¹) = 3404, 2937 (**C-H ar**) ; 2838 (**C-N**) ; 1775 (**C=O**) ; 1675, 1598, 1563, 1489, 1462 (**C=C-CH₂**) ; 1287, 1243 (**C-O**) ; 1227, 1154, 1086, 1015 (**C-H ar**) ; 876, 820, 732 (**C-C ar**).

Propriétés photophysiques

λ_{ex} max = 349 nm

λ_{ém} = 448 nm

Φ_f = 1,7%

Δν = 4345 cm⁻¹

τ = 1,0 ns

*Le composé 108b***RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)**

δ (ppm) : 7,60 (d, 1H, **H12'**, *J* = 2,4 Hz) ; 7,54 (d, 1H, **H7'**, *J* = 8,3 Hz) ; 7,21-7,16 (m, 3H, **H22'**, **H23'** et **H24'**) ; 7,02-6,97 (m, 4H, **H4'**, **H15'**, **H21'** et **H25'**) ; 6,85-6,78 (m, 2H, **H6'** et **H13'**) ; 5,57 (s, 2H, **H19a'** et **H19b'**) ; 3,78 (s, 3H, **H18'**) ; 3,72 (s, 3H, **H17'**) ; 1,94 (s, 2H, **H2a'** et **H2b'**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

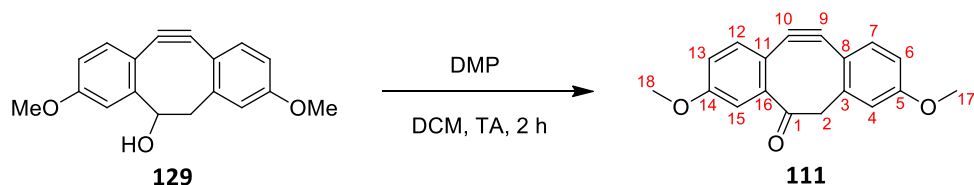
δ (ppm) : 196,6 (**C1'**) ; 160,6 (**C5'**) ; 160,1 (**C14'**) ; 145,5 (**C9'**) ; 137,3 (**C10'**) ; 135,1 (**C20'**) ; 134,6 (**C16'**) ; 132,8 (**C3'**) ; 129,0 (**C11'**) ; 129,8 (**C7'**) ; 128,9 (**C22'** et **C24'**) ; 128,5 (**C12'**) ; 127,4 (**C21'** et **C25'**) ; 123,1 (**C8'**) ; 120,0 (**C23'**) ; 119,0 (**C13'**) ; 114,4 (**C4'**) ; 114,1 (**C6'**) ; 114,0 (**C15'**) ; 55,6 (**C18'**) ; 55,4 (**C17'**) ; 53,1 (**C19'**) ; 49,4 (**C2'**).

SM (ESI⁺, DCM + ACN) : *m/z* 412,2 [M+H]⁺.

Haute résolution calculée pour C₂₅H₂₂N₃O₃⁺ [M+H]⁺ : 412,1661, trouvée : 412,1677.

IR

v (cm⁻¹) = 2957, 2932 (**C-H ar**) ; 2840 (**C-N**) ; 1667 (**C=O**) ; 1604, 1578, 1516, 1486, 1455, 1425 (**C=C-CH₂**) ; 1356, 1319 (**C-O**) ; 1287, 1256, 1230, 1209, 1165, 1085, 1031 (**C-H ar**) ; 983, 879, 826, 761 (**C-C ar**).

3,8-dimethoxydibenzocyclooctynone (3,8-céto-DMDIBO) **111**

Masse molaire : 278,30 g.mol⁻¹

Formule brute : C₁₈H₁₄O₃

Protocole général B appliqué à 83,6 mg d'alcool **129**. Le brut obtenu sous la forme d'un solide jaune-orange est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée (gradient : heptane à heptane/AE (9:1, v/v) en 30 minutes). La cyclooctynone **111** (54,6 mg, 66% de rendement) est obtenue sous la forme d'une huile orange.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 7,16-7,09 (m, 2H, **H7** et **H12**) ; 7,02-6,99 (m, 2H, **H4** et **H15**) ; 6,91 (dd, 1H, **H13**, *J* = 8,5 et 2,7 Hz) ; 6,74 (dd, 1H, **H6**, *J* = 8,5 et 2,7 Hz) ; 4,09 (d, 1H, **H2a**, *J* = 12,1 Hz) ; 3,76 (s, 6H, **H17** et **H18**) ; 3,48 (d, 1H, **H2b**, *J* = 12,1 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 199,9 (**C1**) ; 160,2 (**C14**) ; 159,3 (**C5**) ; 155,5 (**C3**) ; 149,3 (**C16**) ; 127,1 (**C12**) ; 126,4 (**C7**) ; 117,6 (**C13**) ; 117,2 (**C4**) ; 115,9 (**C11**) ; 114,5 (**C8**) ; 113,2 (**C6**) ; 112,9 (**C15**) ; 110,0 (**C10**) ; 108,2 (**C9**) ; 55,6 (**C18**) ; 55,5 (**C17**) ; 49,4 (**C2**).

SM (ESI⁺, DCM + ACN) : *m/z* 279,1 [M+H]⁺.

Haute résolution calculée pour C₁₈H₁₅O₃⁺ [M+H]⁺ : 279,1021, trouvée : 279,1021.

IR

ν (cm⁻¹) = 2937, 2838 (**C-H ar**) ; 2167 (**CC triple**) ; 1775 (**C=O**) ; 1682, 1596, 1563, 1490, 1462 (**C=C-CH₂**) ; 1288, 1243 (**C-O**) ; 1227, 1153, 1106, 1014 (**C-H ar**) ; 873, 819, 733 (**C-C ar**).

Propriétés photophysiques

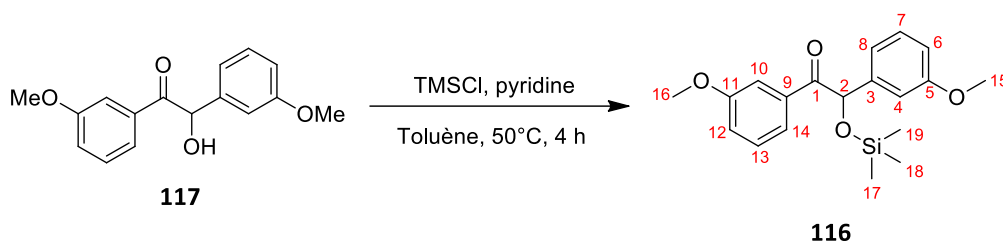
λ_{ex} max = 307 et 340 nm

λ_{ém} = 514 nm

Φ_f = 7,3%

Δν = 7211 et 4354 cm⁻¹

τ = 6,3 ns

2-(*tert*-butoxy)-1,2-bis(3-methoxyphenyl)ethan-1-one **116**

Masse molaire : 344,48 g.mol⁻¹

Formule brute : C₁₉H₂₄O₄Si

Le chlorure de triméthylsilyle (70 µL, 0,56 mmol, 1,5 éq.) est placé dans un tube à vis avec 300 µL de toluène anhydre. Une solution de composé **117** (100 mg, 0,37 mmol, 1,0 éq.) dans 200 µL de toluène anhydre en présence de pyridine (60 µL, 0,74 mmol, 2,0 éq.) est préparée puis ajoutée goutte-à-goutte à la première à température ambiante. La réaction est agitée à 50°C pendant 4 h.

Les sels de pyridinium sont filtrés, et le filtrat évaporé. Le produit **116** (109 mg, 86% de rendement) est obtenu sous la forme d'une huile incolore.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 7,61 (ddd, 1H, **H14**, *J* = 7,8 et 1,5 et 0,9 Hz) ; 7,47 (dd, 1H, **H10**, *J* = 2,4 et 1,5 Hz) ; 7,38 (dd, 1H, **H13**, *J* = 8,0 et 7,8 Hz) ; 7,24 (dd, 1H, **H7**, *J* = 8,2 et 8,0 Hz) ; 7,14 (ddd, 1H, **H12**, *J* = 8,2 et 2,7 et 0,9 Hz) ; 6,98 (d, 1H, **H4**, *J* = 2,4 Hz) ; 6,96 (dd, 1H, **H8**, *J* = 8,0 et 0,9 Hz) ; 6,83 (ddd, 1H, **H6**, *J* = 8,2 et 2,4 et 0,9 Hz) ; 6,19 (s, 1H, **H2**) ; 3,77 (s, 3H, **H16**) ; 3,71 (s, 3H, **H15**) ; 0,08 (s, 9H, **H17**, **H18** et **H19**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

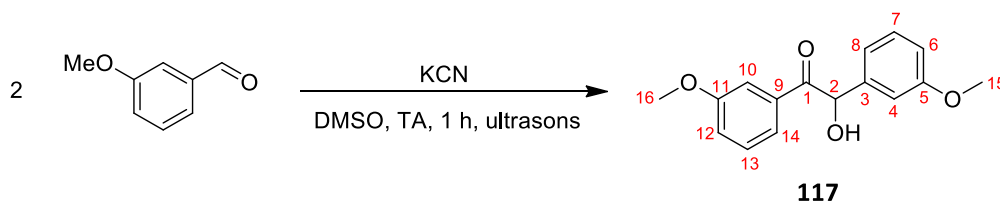
δ (ppm) : 197,3 (**C1**) ; 159,3 (**C11**) ; 159,2 (**C5**) ; 140,4 (**C9**) ; 135,9 (**C3**) ; 129,7 (**C7** et **C13**) ; 121,3 (**C14**) ; 119,3 (**C8**) ; 119,1 (**C12**) ; 113,5 (**C10**) ; 113,1 (**C4**) ; 113,0 (**C6**) ; 76,8 (**C2**) ; 55,3 (**C16**) ; 55,0 (**C15**) ; 0,13 (**C17**, **C18** et **C19**).

SM (ESI⁺, DCM + ACN) : *m/z* 345,1 [M+H]⁺.

Haute résolution calculée pour C₁₉H₂₅O₄Si⁺ [M+H]⁺ : 345,1477, trouvée : 345,1524.

IR

ν (cm⁻¹) = 2957, 2836 (C-H ar) ; 1677 (C=O) ; 1597, 1582, 1487, 1454, 1430 (C=C-CH₂) ; 1318, 1251 (C-O) ; 1149, 1111 (C-H ar) ; 1040 (Si-O) ; 994, 840, 783, 753, 695 (C-C ar) ; 875 (Si-(CH₃)₃).

2-hydroxy-1,2-bis(3-méthoxyphényl)éthan-1-one **117**

Masse molaire : 272,30 g.mol⁻¹

Formule brute : C₁₆H₁₆O₄

Le 3-méthoxybenzaldéhyde (1 mL, 8,23 mmol, 2,0 éq.) est solubilisé dans 6 mL de DMSO sous atmosphère inerte et du cyanure de potassium (1,07 g, 16,4 mmol, 2,0 éq.) y est ajouté. Le mélange est placé aux ultrasons pendant 1 h et à température ambiante.

Le milieu réactionnel est dilué dans l'eau et la phase aqueuse est extraite trois fois avec du méthyl-*tert*-butyléther. Les phases organiques rassemblées sont lavées avec de l'eau, puis séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée (gradient : heptane à heptane/AE (9:1, v/v) en 25 minutes) pour donner le composé **117** (993 mg, 94% de rendement pour 94% de conversion) sous la forme d'un solide amorphe blanc.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 7,59 (ddd, 1H, **H14**, *J* = 7,8 et 1,4 et 1,0 Hz) ; 7,46 (dd, 1H, **H10**, *J* = 2,6 et 1,4 Hz) ; 7,36 (dd, 1H, **H13**, *J* = 8,1 et 7,8 Hz) ; 7,21 (dd, 1H, **H7**, *J* = 8,0 et 7,7 Hz) ; 7,13 (ddd, 1H, **H12**, *J* = 8,1 et 2,6 et 1,0 Hz) ; 6,98 (dd, 1H, **H4**, *J* = 2,5 et 1,5 Hz) ; 6,94 (ddd, 1H, **H8**, *J* = 7,7 et 1,5 et 0,9 Hz) ; 6,79 (ddd, 1H, **H6**, *J* = 8,0 et 2,5 et 0,9 Hz) ; 6,03 (s, 1H, **H2**) ; 3,75 (s, 3H, **H16**) ; 3,69 (s, 3H, **H15**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 198,8 (**C1**) ; 159,2 (**C11**) ; 159,2 (**C5**) ; 141,2 (**C9**) ; 136,0 (**C3**) ; 129,7 (**C13**) ; 127,5 (**C7**) ; 121,3 (**C14**) ; 119,4 (**C8**) ; 119,1 (**C12**) ; 113,4 (**C10**) ; 113,0 (**C4** et **C6**) ; 75,5 (**C2**) ; 55,3 (**C16**) ; 55,0 (**C15**).

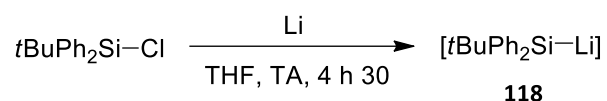
SM (ESI⁺, DCM + ACN) : *m/z* 273,1 [M+H]⁺ ; *m/z* 255,1 [M+H-H₂O]⁺.

Haute résolution calculée pour C₁₆H₁₅⁺ [M+H-H₂O]⁺ : 255,1016, trouvée : 255,1035.

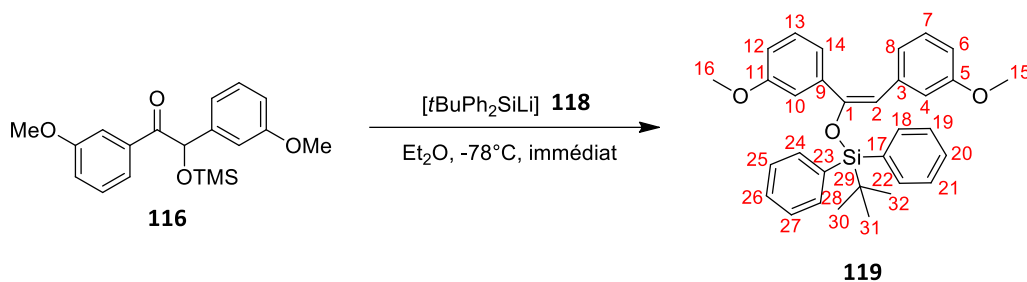
IR

ν (cm⁻¹) = 3439 (**O-H**) ; 3009, 2939, 2835 (**C-H ar**) ; 1670 (**C=O**) ; 1598, 1485, 1473, 1462, 1429 (**C=C-CH₂**) ; 1381, 1333, 1272, 1227 (**C-O**) ; 1178, 1153, 1080, 1065, 1035, 1005 (**C-H ar**) ; 995, 900, 869, 810, 785, 764, 709, 692 (**C-C ar**).

Point de fusion : 50-53°C.

(*tert*-butyldiphénylesilyl)lithium 118Masse molaire : 246,35 g.mol⁻¹Formule brute : C₁₆H₁₉LiSi

Le lithium (50 mg, 7,0 mmol, 7,0 éq) est placé dans 1,2 mL de THF anhydre sous atmosphère inerte. Le chlorure de *tert*-butyldiphénylesilyle (0,21 mL, 1,0 mmol, 1,0 éq) est ajouté à température ambiante et la réaction est placée sous forte agitation à cette température pendant 4 h. Une solution noire-rouge est obtenue avec une concentration en composé **118** de 0,83 M, à utiliser dans les heures qui suivent.

(E)-((1,2-bis(3-methoxyphenyl)vinyl)oxy)(*tert*-butyl)diphenylsilane **119**

Masse molaire : 494,71 g.mol⁻¹

Formule brute : C₃₂H₃₄O₃Si

Le composé **116** (300 mg, 0,87 mmol, 1,0 éq.) est placé sous atmosphère inerte dans 10,5 mL de Et₂O anhydre. La solution est placée à -78°C, puis une solution de *tert*-butyldiphénylsilyllithium **118**, fraîchement préparée dans du THF anhydre, est ajoutée goutte-à-goutte de manière à avoir une concentration finale en réactif **118** de 0,46 M.

A la fin de l'addition, la réaction est immédiatement arrêtée avec un volume équivalent de NH₄Cl_{sat} à -78°C, et laissée remonter à température ambiante. La phase aqueuse est extraite deux fois avec du DCM et les phases organiques rassemblées sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackagée (gradient : heptane à heptane/AE (95:5, v/v) en 30 minutes). Le produit **119** (364 mg, 85% de rendement) est obtenu sous la forme d'une huile visqueuse.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 7,76-7,70 (m, 4H, **H18**, **H22**, **H24** et **H28**) ; 7,52-7,46 (m, 6H, **H19**, **H20**, **H21**, **H25**, **H26** et **H27**) ; 7,22 (dd, 1H, **H13**, *J* = 7,9 Hz) ; 6,96 (dd, 1H, **H7**, *J* = 8,0 Hz) ; 6,89 (ddd, 1H, **H12**, *J* = 7,9 et 2,5 et 1,0 Hz) ; 6,88 (d, 1H, **H14**, *J* = 7,9 et 1,0 Hz) ; 6,82 (dd, 1H, **H10**, *J* = 2,5 et 1,0 Hz) ; 6,58 (dd, 1H, **H6**, *J* = 8,0 et 2,5 Hz) ; 6,24 (d, 1H, **H8**, *J* = 7,8 Hz) ; 6,17 (dd, 1H, **H4**, *J* = 2,5 et 2,1 Hz) ; 5,68 (s, 1H, **H2**) ; 3,61 (s, 3H, **H16**) ; 3,48 (s, 3H, **H15**) ; 1,02 (s, 9H, **H30**, **H31** et **H32**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

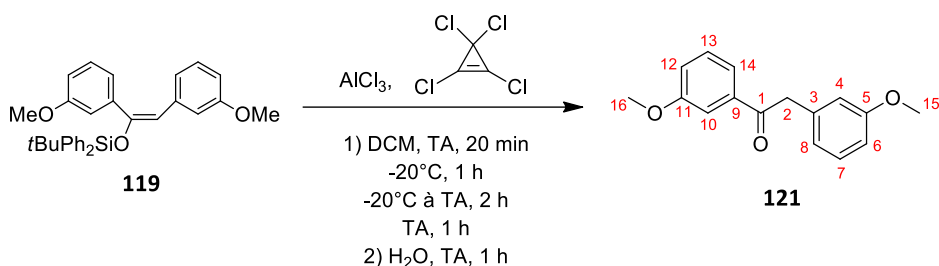
δ (ppm) : 158,9 (**C11**) ; 158,8 (**C5**) ; 150,9 (**C1**) ; 138,0 (**C9**) ; 137,0 (**C3**) ; 135,1 (**C18**, **C22**, **C24** et **C28**) ; 131,9 (**C17** et **C23**) ; 130,2 (**C20** et **C26**) ; 129,3 (**C13**) ; 129,0 (**C7**) ; 127,9 (**C19**, **C21**, **C25** et **C27**) ; 120,8 (**C14**) ; 120,7 (**C8**) ; 114,3 (**C12**) ; 113,8 (**C10**) ; 113,3 (**C4**) ; 111,5 (**C6**) ; 111,4 (**C2**) ; 54,8 (**C16**) ; 54,6 (**C15**) ; 26,4 (**C30**, **C31** et **C32**) ; 19,0 (**C29**).

SM (ESI⁺, DCM + ACN) : *m/z* 495,2 [M+H]⁺.

Haute résolution calculée pour C₃₂H₃₅O₃Si⁺ [M+H]⁺ : 495,2311, trouvée : 495,2368.

IR

ν (cm⁻¹) = 3071, 2999, 2932, 2833 (**C-H ar**) ; 1633 (**C=C**) ; 1487, 1463 (**C-O**) ; 1361, 1314, 1285, 1265, 1247, 1205, 1178 (**C-H ar**) ; 1073 (**Si-O**) ; 997, 953, 888, 821, 779 (**C-C ar**) ; 867 (**Si-(*t*Bu)(Ph₂)**).

1,2-bis(3-methoxyphenyl)ethan-1-one **121**

Masse molaire : 256,30 g.mol⁻¹

Formule brute : C₁₆H₁₆O₃

Protocole générale X appliqué à 47,5 mg de composé **119**. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée (gradient : heptane à heptane/AE (95:5, v/v) en 30 minutes). Le produit **121** (4,92 mg, 20% de la quantité de matière introduite) est obtenu sous la forme d'une huile légèrement jaune.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ (ppm) : 7,64 (ddd, 1H, **H13**, *J* = 7,7 et 2,4 et 1,6 Hz) ; 7,50 (dd, 1H, **H14**, *J* = 2,6 et 1,6 Hz) ; 7,44 (t, 1H, **H10**, *J* = 8,1 Hz) ; 7,24-7,18 (m, 2H, **H12** et **H7**) ; 6,85-6,77 (m, 3H, **H4**, **H6** et **H8**) ; 4,34 (s, 2H, **H2**) ; 3,80 (s, 3H, **H16**) ; 3,71 (s, 3H, **H15**).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆)

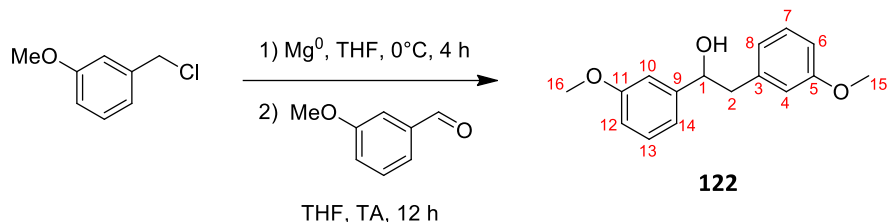
δ (ppm) : 197,3 (**C1**) ; 159,4 (**C5**) ; 159,2 (**C11**) ; 137,7 (**C9**) ; 136,5 (**C3**) ; 129,9 (**C7**) ; 129,3 (**C10**) ; 121,8 (**C13**) ; 120,9 (**C14**) ; 119,2 (**C8**) ; 115,4 (**C4**) ; 112,9 (**C6**) ; 111,8 (**C12**) ; 55,3 (**C16**) ; 54,9 (**C15**) ; 44,8 (**C2**).

SM (ESI⁺, DCM + ACN) : *m/z* 257,1 [M+H]⁺.

Haute résolution calculée pour C₁₆H₁₇O₃⁺ [M+H]⁺ : 257,1133, trouvée : 257,1187.

IR

ν (cm⁻¹) = 3014, 3003, 2911 (**C-H ar**) ; 1686 (**C=O**) ; 1615, 1587, 1491, 1461, 1450, 1427 (**C=C-CH₂**) ; 1333, 1317 (**C-O**) ; 1301, 1259, 1164, 1151, 1045, 1023 (**C-H ar**) ; 993, 875, 863, 848, 791, 769 (**C-C ar**).

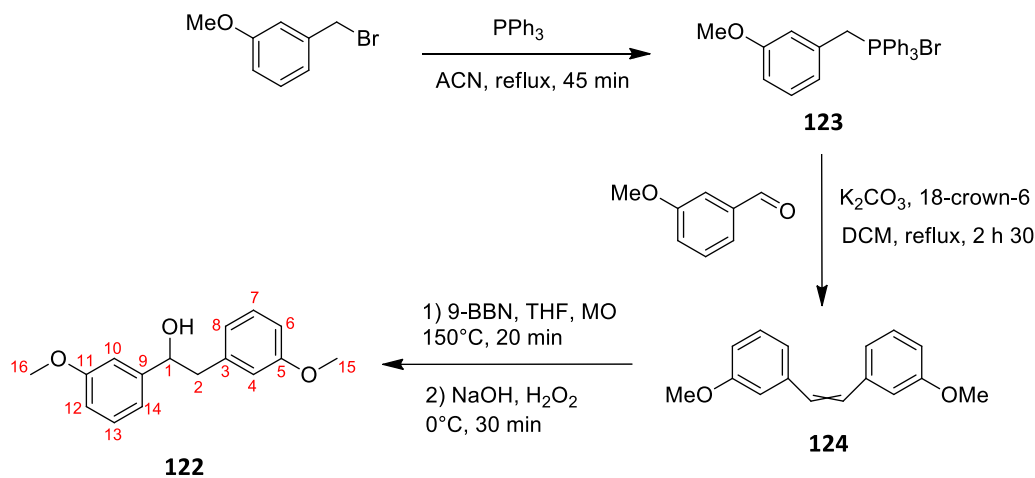
1,2-bis(3-méthoxyphényl)ethanol **122**Masse molaire : 258,31 g.mol⁻¹Formule brute : C₁₆H₁₈O₃**Protocole 1 : Voie A***Préparation du réactif de Grignard :*

Le magnésium (1,92 g, 80 mmol, 10 éq.) est placé dans 6,4 mL de THF anhydre sous atmosphère inerte. Le 1,2-dibromoéthane (80 µL) est ajouté en tant qu'initiateur, à température ambiante. Une solution de chlorure de 3-méthoxybenzyle (2,4 mL, 16 mmol, 2,0 éq.) dans 24 mL de THF anhydre est ajoutée goutte-à-goutte à la solution contenant le magnésium, à 0°C sur 3 h 30 à l'aide d'un pousse-seringue. La réaction est agitée encore 30 min à 0°C.

Réaction de Grignard :

Le 3-méthoxybenzaldéhyde (976 µL, 8,0 mmol, 1,0 éq.) est solubilisé dans 150 mL de THF anhydre puis ajouté lentement au réactif de Grignard à 0°C. La réaction est agitée à température ambiante pendant une nuit.

La réaction est arrêtée avec NH₄Cl_{sat} et extraite trois fois avec AE. Les phases organiques réunies sont séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée (gradient : heptane à heptane/AE (9:1, v/v) en 25 minutes) et le composé **122** (1,0 g, 51% de rendement pour 89% de conversion) est obtenu sous la forme d'une huile incolore.

Proctole 2 : Voie B*Préparation du sel de phosphonium :*

Le bromure de 3-méthoxybenzyle (700 μL , 5,0 mmol, 1,0 éq) est solubilisé dans 20 mL de ACN anhydre. La triphénylphosphine (3,72 g, 14 mmol, 2,8 éq.) est ajoutée et la réaction est agitée au reflux de ACN pendant 45 minutes.

La réaction est laissée revenir à température ambiante et le solvant est évaporé. Le concentré obtenu est repris dans du toluène et le précipité est filtré sur fritté. Le bromure de phosphonium **123** (2,36 g, rendement quantitatif) est obtenu sous la forme d'un solide amorphe blanc et utilisé sans purification supplémentaire. Les analyses obtenues sont conformes avec la littérature.¹⁴¹

Réaction de Wittig :

Le 3-méthoxybenzaldéhyde (490 μL , 4,0 mmol, 1,0 éq.) est solubilisé dans 20 mL de DCM anhydre. Le sel **123** (1,39 g, 3,0 mmol, 1,0 éq.) préalablement synthétisé, du carbonate de potassium (608 mg, 4,4 mmol, 1,2 éq.) et de l'éther 18-couronne-6 (184 mg, 0,7 mmol, 0,2 éq.) sont ajoutés. La réaction est agitée au reflux du DCM pendant 2 h 30.

Le milieu réactionnel est alors filtré et concentré. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée (gradient : heptane à heptane/AE (8:2, v/v) en 30 minutes). Le composé **124** (620 mg, 86% de rendement) est obtenu sous la forme d'un solide amorphe jaune pastel, dont les analyses obtenues sont conformes avec la littérature.¹⁴¹

Réaction d'hydroboration/oxydation :

Le composé **124** (80 mg, 0,33 mmol, 1,0 éq.) est placé dans un tube micro-ondes G10 et sous atmosphère inerte. Le 9-borabicyclo[3.3.1]nonane (0,5 M dans du THF anhydre) (1,3 mL, 2,6 mmol, 2,0 éq.) est ajouté et le tube est placé sous irradiation micro-ondes à 150°C pendant 20 min. La réaction est arrêtée avec de la soude (1,5 M dans H₂O) (1,05 mL, 1,65 mmol, 5,0 éq.) à température ambiante, puis avec du peroxyde d'hydrogène (30% dans H₂O) (443 μL , 4,32 mmol, 13 éq.) à 0°C et goutte-à-goutte. Le mélange est laissé sous agitation à cette température pendant 30 min.

Le milieu réactionnel est extrait trois fois avec du méthyl-*tert*-butyléther. Les phases organiques rassemblées sont séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur plaque préparative (éluant : heptane/AE (6:4, v/v)) pour obtenir le produit **122** (78,4 mg, 91% de rendement) sous la forme d'une huile légèrement jaune.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 7,32-7,21 (m, 2H, **H13** et **H7**) ; 6,98-6,94 (m, 2H, **H12** et **H14**) ; 6,87-6,75 (m, 4H, **H4**, **H6**, **H8** et **H10**) ; 4,89 (dd, 1H, **H1**, $J = 8,4$ et $4,8$ Hz) ; 3,82 (s, 3H, **H16**) ; 3,79 (s, 3H, **H15**) ; 3,04 (dd, 1H, **H2a**, $J = 13,6$ et $4,8$ Hz) ; 2,96 (dd, **H2b**, $J = 13,6$ et $8,4$ Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

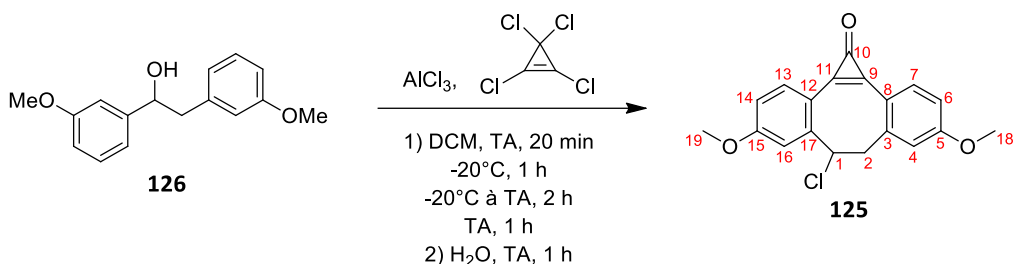
δ (ppm) : 159,7 (**C11** et **C5**) ; 145,5 (**C9**) ; 139,6 (**C3**) ; 129,5 (**C13**) ; 129,4 (**C7**) ; 121,8 (**C8**) ; 118,2 (**C14**) ; 115,1 (**C4**) ; 113,2 (**C12**) ; 112,2 (**C10**) ; 111,3 (**C6**) ; 75,1 (**C1**) ; 55,3 (**C16**) ; 55,2 (**C15**) ; 46,1 (**C2**).

SM (ESI⁺, DCM + ACN) : m/z 259,1 [M+H]⁺ ; m/z 241,1 [M+H-H₂O]⁺.

Haute résolution calculée pour C₁₆H₁₇O₂⁺ [M+H-H₂O]⁺ : 241,1229, trouvée : 241,1234.

IR

ν (cm⁻¹) = 3676 (**O-H**) ; 3408, 2972, 2902 (**C-H ar**) ; 1658, 1597, 1584, 1489, 1456, 1434 (**C=C-CH₂**) ; 1394, 1383 (**C-O**) ; 1249, 1150, 1035 (**C-H ar**) ; 968, 910, 870, 834, 816, 806, 791, 767 (**C-C ar**).

6-chloro-4,9-diméthoxy-6,7-dihydro-1H-dibenzo[a,e]cyclopropa[c][8]annulène **125**

Masse molaire : 326,77 g.mol⁻¹

Formule brute : C₁₉H₁₅ClO₃

Protocole général H appliqué à 29,5 mg du composé **122**. Le brut est purifié par chromatographie sur plaque préparative (éluant : DCM/MeOH (98:2, v/v) pour aboutir au produit **123** majoritaire (4,5 mg, 12% de la quantité de matière introduite).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 7,91 (dd, 2H, **H7** et **H13**, *J* = 8,3 et 2,9 Hz) ; 7,48 (s, 1H, **H16**) ; 6,96 (s, 1H, **H4**) ; 6,93-6,88 (m, 2H, **H6** et **H14**) ; 4,90 (dd, 1H, **H1**, *J* = 4,0 et 1,3 Hz) ; 3,88 (s, 3H, **H19**) ; 3,85 (s, 3H, **H18**) ; 3,45 (dd, 1H, **H2a**, *J* = 15,6 et 4,0 Hz) ; 3,28 (dd, 1H, **H2b**, *J* = 15,6 et 1,3 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 163,1 (**C15**) ; 162,9 (**C5**) ; 152,9 (**C10**) ; 145,8 (**C11**) ; 144,4 (**C9**) ; 144,2 (**C3**) ; 143,0 (**C17**) ; 135,8 (**C13**) ; 135,7 (**C7**) ; 116,4 (**C12**) ; 116,0 (**C14**) ; 113,0 (**C4**) ; 112,8 (**C16**) ; 112,7 (**C6**) ; 112,5 (**C8**) ; 63,1 (**C1**) ; 55,7 (**C19**) ; 55,7 (**C18**) ; 50,7 (**C2**).

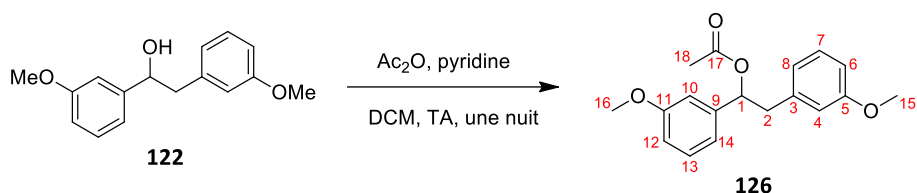
SM (ESI⁺, DCM + ACN) : *m/z* 327,1 [M+H]⁺.

Haute résolution calculée pour C₁₉H₁₆ClO₃⁺ [M+H]⁺ : 327,0680, trouvée : 327,0789.

IR

ν (cm⁻¹) = 2920, 2849 (**C-H ar**) ; 1851, 1737 (**C=O**) ; 1606, 1558, 1450, 1427 (**C=C-CH₂**) ; 1338, 1311 (**C-O**) ; 1291, 1276, 1235, 1219, 1192, 1166, 1132, 1106 (**C-H ar**) ; 960, 915, 883, 871 (**C-C ar**) ; 813 (**C-Cl**).

Point de fusion : 212°C.

1,2-bis(3-methoxyphenyl)ethyl acetate **126**

Masse molaire : 300,35 g.mol⁻¹

Formule brute : C₁₈H₂₀O₄

L'alcool **122** (345 mg, 1,34 mmol, 1,0 éq.) est placé sous atmosphère inerte, avant d'être solubilisé dans 3,44 mL de DCM anhydre. La pyridine anhydre (1,08 mL, 13,4 mmol, 10 éq.) est ajoutée à température ambiante, puis le tout est placé à 0°C et l'anhydride acétique (633 µL, 6,70 mmol, 5,0 éq.) est ajouté goutte-à-goutte. Après quelques minutes, le milieu réactionnel est replacé à température ambiante et laissé sous agitation pendant une nuit.

La réaction est diluée cinq fois dans DCM et la phase organique est lavée deux fois avec HCl 1 M, une fois avec NaHCO_{3sat}, puis avec NaCl_{sat}, avant d'être séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. Le brut obtenu sous forme d'huile est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée (gradient : heptane à heptane/AE (85:15, v/v) en 30 minutes). Le produit **126** (369 mg, 92% de rendement) est obtenu sous la forme d'une huile légèrement jaune.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 7,25 (dd, 1H, **H13**, *J* = 8,9 et 7,8 Hz) ; 7,18 (t, 1H, **H7**, *J* = 7,8 Hz) ; 6,90 (dt, 1H, **H14**, *J* = 7,8 et 2,3 et 1,5 Hz) ; 6,86-6,81 (m, 2H, **H10** et **H12**) ; 6,77 (ddd, 1H, **H6**, *J* = 7,9 et 2,2 et 0,8 Hz) ; 6,73 (dt, 1H, **H8**, *J* = 7,9 et 2,3 et 1,0 Hz) ; 6,66 (dd, 1H, **H4**, *J* = 2,2 et 1,0 Hz) ; 5,92 (dd, 1H, **H1**, *J* = 7,9 et 6,0 Hz) ; 3,79 (s, 3H, **H16**) ; 3,76 (s, 3H, **H15**) ; 3,17 (dd, 1H, **H2a**, *J* = 13,7 et 7,9 Hz) ; 3,03 (dd, 1H, **H2b**, *J* = 13,7 et 6,0 Hz) ; 2,05 (s, 3H, **H18**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 170,1 (**C17**) ; 159,5 (**C11**) ; 159,4 (**C5**) ; 141,7 (**C9**) ; 138,6 (**C3**) ; 129,4 (**C13**) ; 129,2 (**C7**) ; 121,9 (**C8**) ; 118,9 (**C14**) ; 115,0 (**C4**) ; 113,4 (**C12**) ; 112,2 (**C10**) ; 112,2 (**C6**) ; 76,4 (**C1**) ; 55,2 (**C16**) ; 55,1 (**C15**) ; 43,0 (**C2**) ; 21,2 (**C18**).

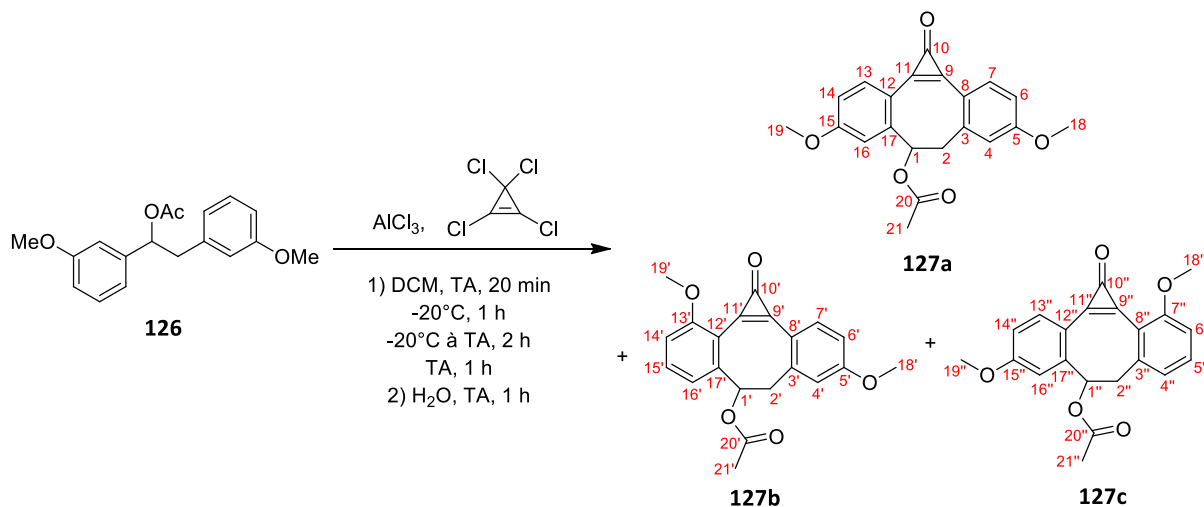
SM (ESI⁺, DCM + ACN) : *m/z* 301,1 [M+H]⁺ ; *m/z* 241,1 [M+H-OCOCH₃]⁺.

Haute résolution calculée pour C₁₆H₁₇O₂⁺ [M+H-OCOCH₃]⁺ : 241,1229, trouvée : 241,1228.

IR

ν (cm⁻¹) = 3676, 2970, 2837 (**C-H ar**) ; 1737 (**C=O**) ; 1601, 1586, 1490, 1455, 1435 (**C=C-CH₂**) ; 1394, 1371 (**C-O**) ; 1318, 1257, 1228, 1152, 1039 (**C-H ar**) ; 996, 873, 781, 731, 697 (**C-C ar**).

4,9- ; 2,9 et 4,11-diméthoxy-1-oxo-6,7-dihydro-1H-dibenzo[a,e]cyclopropa[c][8]annulén-6-yl acetate
127



Masse molaire : 350,36 g.mol⁻¹

Formule brute : C₂₁H₁₈O₅

Protocole général H appliqué à 517 mg de composé **126**. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée (gradient : DCM à DCM/MeOH (98:2, v/v) en 30 minutes). Le composé **127a** majoritaire (357 mg, 59% de rendement) est obtenu sous la forme d'un solide amorphe blanc à jaune ; les composés secondaires **127b** et **127c** (83 mg, 14% de rendement) sont obtenus sous forme de mélange (2:1). Rendement total de la réaction : 72%.

Le composé 127a

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 8,00 (t, 2H, **H13** et **H7**, *J* = 8,9 Hz) ; 7,10 (d, 1H, **H16**, *J* = 2,0 Hz) ; 6,96 (dd, 2H, **H4** et **H14**, *J* = 8,6 et 2,0 Hz) ; 6,93 (d, 1H, **H6**, *J* = 2,0 Hz) ; 5,81 (t, 1H, **H1**, *J* = 2,9 Hz) ; 3,93 (s, 3H, **H19**) ; 3,91 (s, 3H, **H18**) ; 3,26 (dd, 1H, **H2a**, *J* = 15,9 et 2,9 Hz) ; 3,18 (dd, 1H, **H2b**, *J* = 15,9 et 2,9 Hz) ; 2,28 (s, 3H, **H21**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 167,4 (**C20**) ; 162,8 (**C15**) ; 162,6 (**C5**, **C9** et **C11**) ; 153,0 (**C10**) ; 145,6 (**C17**) ; 144,4 (**C3**) ; 143,1 (**C12**) ; 141,0 (**C8**) ; 136,0 (**C13**) ; 135,7 (**C7**) ; 116,6 (**C16**) ; 112,4 (**C4**) ; 111,8 (**C14**) ; 110,7 (**C6**) ; 76,3 (**C1**) ; 55,6 (**C18** et **C19**) ; 46,2 (**C2**) ; 21,0 (**C21**).

SM (ESI⁺, DCM + ACN) : *m/z* 351,1 [M+H]⁺.

Haute résolution calculée pour C₂₁H₁₉O₅⁺ [M+H]⁺ : 351,1232, trouvée : 351,1223.

Les composés 127b et 127c

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

Cyclopropénone 127b

δ (ppm) : 8,00 (d, 1H, **H7'**, *J* = 8,4 Hz) ; 7,37 (t, 1H, **H15'**, *J* = 7,9 Hz) ; 7,02 (d, 1H, **H4'**, *J* = 2,5 Hz) ; 6,93-6,85 (m, 3H, **H6'**, **H14'** et **H16'**) ; 5,71 (t, 1H, **H1'**, *J* = 2,8 Hz) ; 3,97 (s, 3H, **H19'**) ; 3,84 (s, 3H, **H18'**) ; 3,19 (dd, 1H, **H2a'**, *J* = 15,6 et 2,8 Hz) ; 3,02 (dd, 1H, **H2b'**, *J* = 15,6 et 2,8 Hz) ; 2,18 (s, 3H, **H21'**).

Cyclopropénone 127c

δ (ppm) : 8,00 (d, 1H, **H7''**, $J = 8,4$ Hz) ; 7,37 (t, 1H, **H15''**, $J = 7,9$ Hz) ; 7,02 (d, 1H, **H4''**, $J = 2,5$ Hz) ; 6,93-6,85 (m, 3H, **H6''**, **H14''** et **H16''**) ; 5,71 (t, 1H, **H1''**, $J = 2,8$ Hz) ; 3,84 (s, 3H, **H19''**) ; 3,82 (s, 3H, **H18''**) ; 3,19 (dd, 1H, **H2a''**, $J = 15,6$ et $2,8$ Hz) ; 3,02 (dd, 1H, **H2b''**, $J = 15,6$ et $2,8$ Hz) ; 2,18 (s, 3H, **H21''**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)*Cyclopropénone 127b*

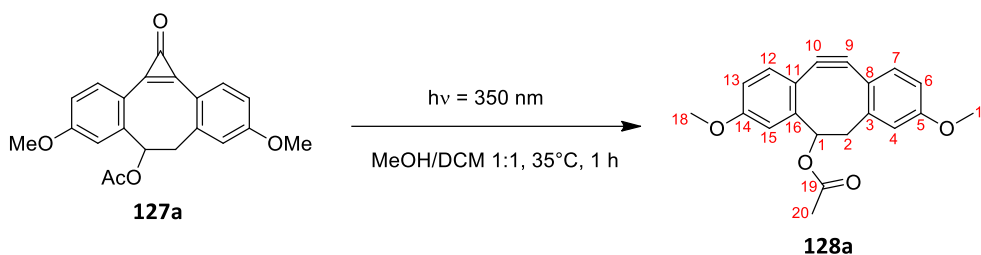
δ (ppm) : 169,2 (**C20'**) ; 163,0 (**C13'**) ; 161,4 (**C5'**) ; 153,1 (**C10'**) ; 145,7 (**C9'**) ; 144,1 (**C11'** et **C17'**) ; 143,4 (**C3'**) ; 140,3 (**C12'**) ; 137,8 (**C8'**) ; 136,6 (**C7'**) ; 133,6 (**C15'**) ; 122,0 (**C16'**) ; 111,7 (**C4'**) ; 110,7 (**C6'**) ; 110,0 (**C14'**) ; 76,5 (**C1'**) ; 56,4 (**C19'**) ; 55,6 (**C18'**) ; 46,2 (**C2'**) ; 21,0 (**C21'**).

Cyclopropénone 127c

δ (ppm) : 169,2 (**C20''**) ; 163,0 (**C13''**) ; 161,4 (**C5''**) ; 153,1 (**C10''**) ; 145,7 (**C9''**) ; 144,1 (**C11''** et **C17''**) ; 143,4 (**C3''**) ; 140,3 (**C12''**) ; 137,8 (**C8''**) ; 136,6 (**C7''**) ; 133,6 (**C15''**) ; 122,0 (**C16''**) ; 111,7 (**C4''**) ; 110,7 (**C6''**) ; 110,0 (**C14''**) ; 76,5 (**C1''**) ; 55,6 (**C19''**) ; 55,4 (**C18''**) ; 46,2 (**C2''**) ; 21,0 (**C21''**).

SM (ESI⁺, DCM + ACN) : m/z 351,1 [M+H]⁺.

Haute résolution calculée pour C₂₁H₁₉O₅⁺ [M+H]⁺ : 351,1188, trouvée : 351,1242.

acétate de 3,8-diméthoxydibenzocyclooctynol **128a**

Masse molaire : 322,35 g.mol⁻¹

Formule brute : C₂₀H₁₈O₄

Protocole général I appliqué à 70 mg de cyclopropénone **127a**. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée (éluant : heptane/AE (9:1, v/v)). Le produit **128a** (43,7 mg, 68% de rendement) est obtenu sous la forme d'un solide amorphe blanc.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 7,20-7,11 (m, 2H, **H12** et **H7**) ; 6,97 (sl, 1H, **H15**) ; 6,82 (sl, 1H, **H4**) ; 6,76-6,70 (m, 2H, **H6** et **H13**) ; 5,51 (sl, 1H, **H1**) ; 3,78 (s, 3H, **H18**) ; 3,76 (s, 3H, **H17**) ; 2,98 (dd, 1H, **H2a**, *J* = 15,1 et 1,8 Hz) ; 2,88 (dd, 1H, **H2b**, *J* = 15,1 et 3,6 Hz) ; 2,17 (s, 3H, **H20**).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 168,5 (**C19**) ; 159,5 (**C14**) ; 159,4 (**C5**) ; 152,5 (**C3**) ; 152,1 (**C16**) ; 127,1 (**C12**) ; 126,6 (**C7**) ; 116,8 (**C13**) ; 116,1 (**C11**) ; 113,9 (**C8**) ; 111,9 (**C4**) ; 111,8 (**C10**) ; 111,6 (**C6**) ; 111,3 (**C15**) ; 108,8 (**C9**) ; 76,1 (**C1**) ; 55,4 (**C18**) ; 55,4 (**C17**) ; 46,4 (**C2**) ; 21,2 (**C20**).

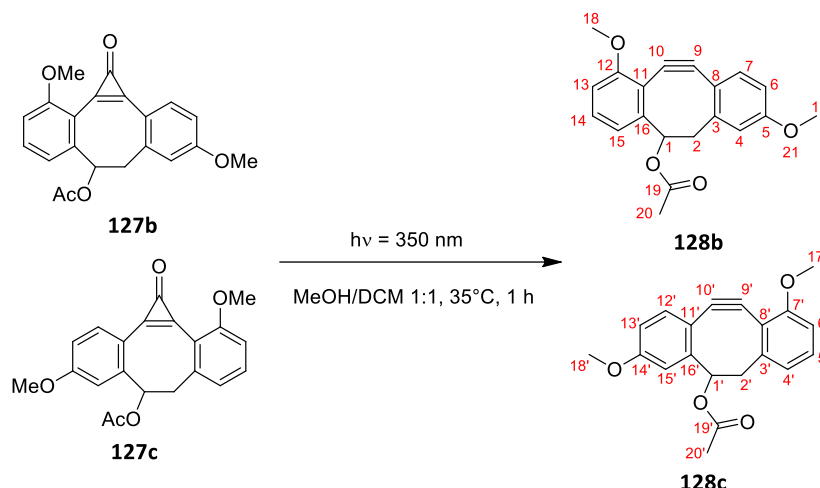
SM (APPI, DCM + AOH) : *m/z* 322,1 [M]⁺.

Haute résolution calculée pour C₂₀H₁₈O₄⁺ [M]⁺ : 322,1205, trouvée : 322,1198.

IR

ν (cm⁻¹) = 2938, 2838 (**C-H ar**) ; 2165 (**CC triple**) ; 1734 (**C=O**) ; 1610, 1563, 1489, 1474, 1423 (**C=C-CH₂**) ; 1377, 1338 (**C-O**) ; 1292, 1163, 1229, 1104, 1084, 1022 (**C-H ar**) ; 987, 937, 879, 866, 856, 819 (**C-C ar**).

Point de fusion : 143°C.

acétates de 1,8- et 3,10-diméthoxydibenzocyclooctynol **128b** et **128c**Masse molaire : $322,35 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Formule brute : $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_4$

Protocole général I appliqué à 83 mg de mélange des cyclopropénones **127b** et **127c**. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur plaque préparative (éluant : heptane/AE (6:4, v/v)) pour aboutir aux composés **128b** et **128c** (33,1 mg, 43% de rendement) sous la forme d'un mélange (3:1) ayant l'aspect d'un solide amorphe blanc.

RMN ^1H (500 MHz, CD_3CN)*Composé 128b*

δ (ppm) : 7,35 (d, 1H, **H7**, $J = 8,5 \text{ Hz}$) ; 7,30 (t, 1H, **H14**, $J = 7,7 \text{ Hz}$) ; 7,15 (d, 1H, **H4**, $J = 2,4 \text{ Hz}$) ; 7,01 (d, 1H, **H15**, $J = 7,7 \text{ Hz}$) ; 6,97 (d, 1H, **H13**, $J = 7,7 \text{ Hz}$) ; 6,94 (dd, 1H, **H6**, $J = 8,5$ et $2,4 \text{ Hz}$) ; 5,47 (dd, 1H, **H1**, $J = 3,7$ et $2,1 \text{ Hz}$) ; 3,92 (s, 3H, **H18**) ; 3,87 (s, 3H, **H17**) ; 3,18 (dd, 1H, **H2a**, $J = 15,1$ et $2,1 \text{ Hz}$) ; 2,84 (dd, 1H, **H2b**, $J = 15,1$ et $3,7 \text{ Hz}$) ; 2,23 (s, 3H, **H20**).

Composé 128c

δ (ppm) : 7,38 (t, 1H, **H5'**, $J = 7,9 \text{ Hz}$) ; 7,33 (d, 1H, **H4'**, $J = 7,9 \text{ Hz}$) ; 7,17 (d, 1H, **H6'**, $J = 7,9 \text{ Hz}$) ; 7,03 (d, 1H, **H15'**, $J = 2,6 \text{ Hz}$) ; 7,00 (d, 1H, **H12'**, $J = 8,2 \text{ Hz}$) ; 6,91 (dd, 1H, **H13'**, $J = 8,2$ et $2,6 \text{ Hz}$) ; 5,45 (dd, 1H, **H1'**, $J = 3,9$ et $2,3 \text{ Hz}$) ; 3,92 (s, 3H, **H17'**) ; 3,84 (s, 3H, **H18'**) ; 3,16 (dd, 1H, **H2a'**, $J = 14,9$ et $2,3 \text{ Hz}$) ; 2,86 (dd, 1H, **H2b'**, $J = 14,9$ et $3,9 \text{ Hz}$) ; 2,22 (s, 3H, **H20'**).

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3CN)*Composé 128b*

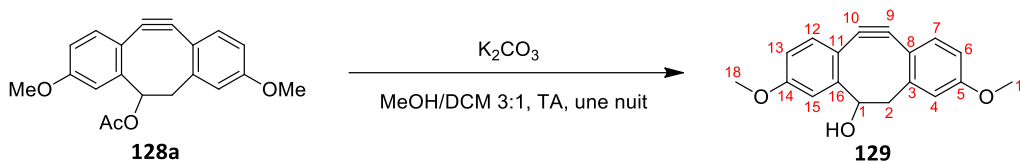
δ (ppm) : 169,4 (**C19**) ; 159,8 (**C12**) ; 155,9 (**C5**) ; 152,7 (**C3**) ; 151,9 (**C16**) ; 128,7 (**C7**) ; 127,2 (**C14**) ; 122,4 (**C15**) ; 112,9 (**C8** et **C11**) ; 111,8 (**C10**) ; 111,7 (**C6**) ; 110,9 (**C4**) ; 109,7 (**C13**) ; 109,3 (**C9**) ; 75,2 (**C1**) ; 55,3 (**C18**) ; 54,9 (**C17**) ; 45,3 (**C2**) ; 20,0 (**C20**).

Composé 128c

δ (ppm) : 169,4 (**C19'**) ; 159,8 (**C7'**) ; 156,0 (**C14'**) ; 152,5 (**C3'**) ; 152,3 (**C16'**) ; 128,8 (**C12'**) ; 126,7 (**C5'**) ; 122,4 (**C4'**) ; 116,6 (**C13'**) ; 116,3 (**C15'**) ; 112,4 (**C11'**) ; 111,8 (**C10'**) ; 109,9 (**C15'**) ; 109,5 (**C8'**) ; 109,3 (**C9'**) ; 75,3 (**C1'**) ; 55,3 (**C17'**) ; 54,9 (**C18'**) ; 45,6 (**C2'**) ; 20,0 (**C20'**).

SM (ESI^+ , $\text{DCM} + \text{ACN}$) : m/z 323,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; m/z 263,1 $[\text{M}+\text{H}-\text{OCOCH}_3]^+$.

Haute résolution calculée pour $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_2^+ [\text{M}+\text{H}-\text{OCOCH}_3]^+$: 263,1071, trouvée : 263,1078.

3,8-diméthoxydibenzocyclooctynol (3,8-DMDIBO) **129**

Masse molaire : 280,32 g.mol⁻¹

Formule brute : C₁₈H₁₆O₃

L'acétate **128a** (109 mg, 0,34 mmol, 1,0 éq.) est solubilisé dans 8 mL d'un mélange MeOH/DCM (3:1, v/v) sous atmosphère inerte. Du carbonate de potassium (93,5 mg, 0,68 mmol, 2,0 éq.) est ajouté à température ambiante et la réaction est laissée à cette température pendant une nuit.

Les solvants sont évaporés et le produit brut est repris dans de l'eau et extrait trois fois avec du DCM. Les phases organiques rassemblées sont lavées avec du NaCl_{sat}, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut obtenu sous la forme d'un solide blanc-ocre est purifié par chromatographie sur colonne de silice prépackée (éluant : heptane/AE (9:1, v/v)). Le composé **129** (88,6 mg, 93% de rendement) est obtenu sous forme d'un solide amorphe blanc.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 7,33 (d, 1H, **H15**, *J* = 2,5 Hz) ; 7,23 (d, 2H, **H7** et **H12**, *J* = 8,3 Hz) ; 7,02 (d, 1H, **H4**, *J* = 2,5 Hz) ; 6,82 (dd, 2H, **H6** et **H13**, *J* = 8,3 et 2,5 Hz) ; 4,64 (dd, 1H, **H1**, *J* = 3,3 et 2,4 Hz) ; 3,88 (s, 3H, **H18**) ; 3,85 (s, 3H, **H17**) ; 2,99 (dd, 1H, **H2a**, *J* = 14,5 et 2,4 Hz) ; 2,98 (dd, 1H, **H2b**, *J* = 14,5 et 3,3 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 159,8 (**C14**) ; 159,3 (**C5**) ; 157,1 (**C3**) ; 153,0 (**C16**) ; 126,9 (**C12**) ; 126,7 (**C7**) ; 116,3 (**C8**) ; 116,2 (**C13**) ; 113,5 (**C11**) ; 112,0 (**C4**) ; 112,0 (**C6**) ; 111,7 (**C10**) ; 110,6 (**C15**) ; 109,6 (**C9**) ; 75,2 (**C1**) ; 55,5 (**C18**) ; 55,4 (**C17**) ; 48,9 (**C2**).

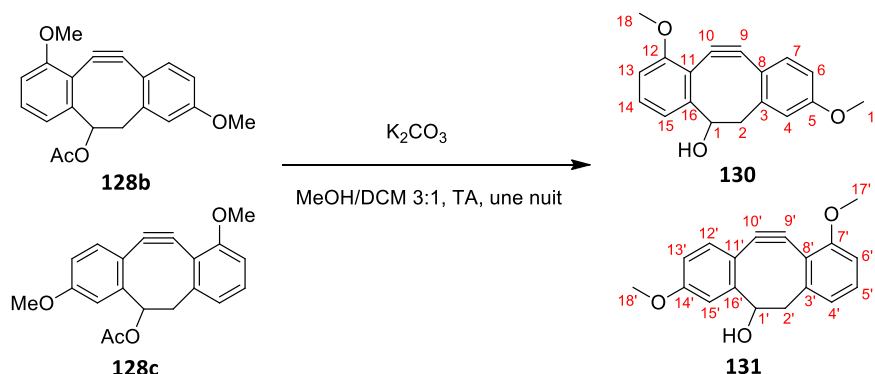
SM (ESI⁺, DCM + ACN) : *m/z* 280,1 [M]⁺.

Haute résolution calculée pour C₁₈H₁₆O₃⁺ [M⁺] : 280,1099, trouvée : 280,1096.

IR

ν (cm⁻¹) = 3335 (**O-H**) ; 2938, 2834 (**C-H ar**) ; 2154 (**CC triple**) ; 1608, 1563, 1490, 1474, 1456, 1421 (**C=C-CH₂**) ; 1337, 1314 (**C-O**) ; 1289, 1266, 1234, 1191, 1148, 1105 (**C-H ar**) ; 925, 891, 870, 852 (**C-C ar**).

Point de fusion : 148°C.

1,8- et 3,10-diméthoxydibenzocyclooctynols (1,8- et 3,10-DMDIBO) **130** et **131**

Masse molaire : 280,32 g.mol⁻¹

Formule brute : C₁₈H₁₆O₃

Le mélange de composés **128b** et **128c** (70,3 mg, 0,22 mmol, 1,0 éq.) est solubilisé dans 5,5 mL d'un mélange MeOH/DCM (3:1, v/v) sous atmosphère inerte. Du carbonate de potassium (61 mg, 0,44 mmol, 2,0 éq.) est ajouté à température ambiante et la réaction est laissée à cette température pendant une nuit.

Les solvants sont évaporés et le brut est repris dans de l'eau et extrait trois fois avec du DCM. Les phases organiques rassemblées sont lavées avec du NaCl_{sat}, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le brut obtenu sous la forme d'un solide blanc-ocre est purifié par chromatographie sur plaque préparative (éluant : heptane/AE (6:4, v/v)). Les composés **130** et **131** (53,5 mg, 87% de rendement) sont obtenus sous forme d'un mélange (2:1) ayant l'aspect d'un solide amorphe blanc.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃)

Composé 130

δ (ppm) : 7,27-7,25 (m, 1H, **H7**) ; 7,19-7,14 (m, 2H, **H14** et **H15**) ; 6,97 (d, 1H, **H4**, *J* = 2,5 Hz) ; 6,77 (d, 1H, **H13**, *J* = 8,2 Hz) ; 6,74 (dd, 1H, **H6**, *J* = 8,1 et 2,5 Hz) ; 4,56 (dd, 1H, **H1**, *J* = 3,5 et 2,2 Hz) ; 3,86 (s, 3H, **H18**) ; 3,79 (s, 3H, **H17**) ; 3,00 (dd, 1H, **H2a**, *J* = 14,7 et 2,2 Hz) ; 2,86 (dd, 1H, **H2b**, *J* = 14,7 et 3,5 Hz).

Composé 131

δ (ppm) : 7,27-7,25 (m, 1H, **H12'**) ; 7,19-7,14 (m, 2H, **H4'** et **H5'**) ; 6,94 (d, 1H, **H15'**, *J* = 2,5 Hz) ; 6,80-6,78 (m, 2H, **H6'** et **H13'**) ; 4,56 (dd, 1H, **H1'**, *J* = 3,5 et 2,0 Hz) ; 3,87 (s, 3H, **H17'**) ; 3,77 (s, 3H, **H18'**) ; 2,96 (dd, 1H, **H2a'**, *J* = 14,7 et 2,0 Hz) ; 2,87 (dd, 1H, **H2b'**, *J* = 14,7 et 3,5 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃)

Composé 130

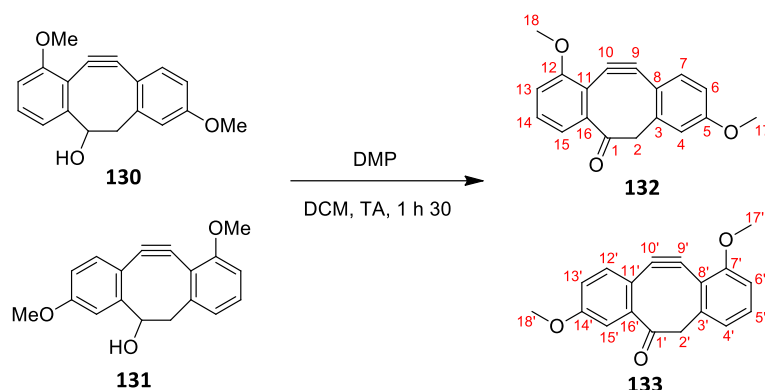
δ (ppm) : 160,1 (**C12**) ; 157,4 (**C5**) ; 156,1 (**C3**) ; 152,8 (**C16**) ; 128,6 (**C7**) ; 127,2 (**C14**) ; 122,5 (**C15**) ; 113,5 (**C8**) ; 113,4 (**C11**) ; 112,1 (**C4**) ; 110,6 (**C6**) ; 109,5 (**C13**) ; 109,2 (**C9** et **C10**) ; 75,2 (**C1**) ; 55,9 (**C17**) ; 55,5 (**C18**) ; 48,4 (**C2**).

Composé 131

δ (ppm) : 159,6 (C7') ; 156,9 (C14') ; 156,1 (C3') ; 153,2 (C16') ; 128,7 (C12') ; 127,0 (C5') ; 116,5 (C13') ; 116,2 (C15') ; 113,5 (C11') ; 113,4 (C8') ; 112,1 (C4') ; 109,4 (C6') ; 107,0 (C9' et C10') ; 75,2 (C1') ; 56,0 (C18') ; 55,5 (C17') ; 48,8 (C2').

SM (ESI⁺, DCM + ACN) : m/z 281,1 [M+H]⁺.

Haute résolution calculée pour C₁₈H₁₇O₃⁺ [M+H]⁺ : 281,1133, trouvée : 281,1172.

1,8- et 3,10-diméthoxydibenzocyclooctynones (1,8- et 3,10-céto-DMDIBO) **132** et **133**

Masse molaire : 278,30 g.mol⁻¹

Formule brute : C₁₈H₁₄O₃

Protocole général B appliqué à 48,3 mg de mélange de composés **130** et **131**. Le brut est purifié par chromatographie sur plaque préparative (éluant : heptane/AE (1:1, v/v)) pour aboutir à la cyclooctynone **132** majoritaire (20 mg, 42% de rendement) sous la forme d'un solide amorphe jaune et à la cyclooctynone **133** minoritaire (7,9 mg, 16% de rendement) sous la forme d'une huile jaune. Rendement total de la réaction : 58%.

Le composé 132

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 7,21 (t, 1H, **H14**, *J* = 8,1 Hz) ; 7,16 (d, 1H, **H7**, *J* = 8,6 Hz) ; 7,02 (d, 1H, **H13**, *J* = 8,1 Hz) ; 7,01 (d, 1H, **H4**, *J* = 2,8 Hz) ; 6,91 (dd, 1H, **H6**, *J* = 8,6 et 2,8 Hz) ; 6,78 (d, 1H, **H15**, *J* = 8,1 Hz) ; 4,06 (d, 1H, **H2a**, *J* = 11,2 Hz) ; 3,83 (s, 3H, **H18**) ; 3,77 (s, 3H, **H17**) ; 3,54 (d, 1H, **H2b**, *J* = 11,2 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 199,9 (**C1**) ; 159,5 (**C12**) ; 156,0 (**C5**) ; 156,0 (**C16**) ; 149,1 (**C3**) ; 129,7 (**C7**) ; 127,3 (**C14**) ; 123,8 (**C15**) ; 117,2 (**C13**) ; 114,3 (**C8**) ; 113,2 (**C4**) ; 111,7 (**C11**) ; 110,3 (**C6**) ; 107,7 (**C9** et **C10**) ; 56,0 (**C17**) ; 55,6 (**C18**) ; 49,0 (**C2**).

SM (ESI⁺, DCM + ACN) : *m/z* 279,1 [M+H]⁺.

Haute résolution calculée pour C₁₈H₁₅O₃⁺ [M+H]⁺ : 279,0976, trouvée : 279,1024.

IR

ν (cm⁻¹) = 3004, 2936, 2838 (**C-H ar**) ; 2149 (**CC triple**) ; 1686 (**C=O**) ; 1602, 1560, 1486, 1471, 1438 (**C=C-CH₂**) ; 1301, 1270 (**C-O**) ; 1229, 1187, 1151, 1070, 1030 (**C-H ar**) ; 946, 890, 869, 848, 821 (**C-C ar**).

Point de fusion : 118°C.

Propriétés photophysiques

λ_{ex} = 375 nm

λ_{ém} = 497 nm

Δν = 6546 cm⁻¹

Le composé 133**RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃)**

δ (ppm) : 7,24 (t, 1H, **H5'**, *J* = 8,0 Hz) ; 7,15 (d, 1H, **H12'**, *J* = 8,4 Hz) ; 7,07 (d, 1H, **H6'**, *J* = 8,0 Hz) ; 6,98 (d, 1H, **H15'**, *J* = 2,5 Hz) ; 6,94 (d, 1H, **H4'**, *J* = 8,0 Hz) ; 6,75 (dd, 1H, **H13'**, *J* = 8,4 et 2,5 Hz) ; 4,08 (d, 1H, **H2a'**, *J* = 11,0 Hz) ; 3,88 (s, 3H, **H17'**) ; 3,78 (s, 3H, **H18'**) ; 3,49 (d, 1H, **H2b'**, *J* = 11,0 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 199,6 (**C1'**) ; 160,5 (**C7'**) ; 155,7 (**C14'**) ; 155,3 (**C16**) ; 149,7 (**C3**) ; 129,0 (**C12'**) ; 126,7 (**C5'**) ; 120,1 (**C4'**) ; 117,7 (**C13'**) ; 115,9 (**C11'**) ; 114,1 (**C8'**) ; 113,4 (**C15'**) ; 112,9 (**C6'**) ; 105,7 (**C9'** et **C10'**) ; 56,2 (**C18'**) ; 55,5 (**C17'**) ; 49,3 (**C2**).

SM (ESI⁺, DCM + ACN) : *m/z* 279,1 [M+H]⁺.

Haute résolution calculée pour C₁₈H₁₅O₃⁺ [M+H]⁺ : 279,0976, trouvée : 279,1035.

IR

ν (cm⁻¹) = 2930, 2838 (**C-H ar**) ; 2162 (**CC triple**) ; 1684 (**C=O**) ; 1604, 1591, 1563, 1486, 1471, 1438 (**C=C-CH₂**) ; 1270, 1236 (**C-O**) ; 1186, 1167, 1151, 1100, 1071, 1085 (**C-H ar**) ; 863, 828, 783 (**C-C ar**).

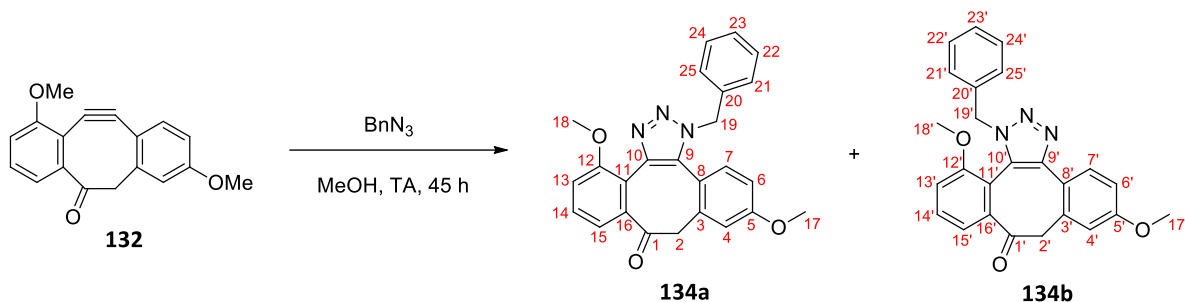
Propriétés photophysiques

$$\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{ém}} = 507 \text{ nm}$$

$$\Delta\nu = 6943 \text{ cm}^{-1}$$

1-benzyl-4,11-diméthoxy-1H-dibenzo[3,4:7,8]cycloocta[1,2-d][1,2,3]triazol-8(9H)-one et 1-benzyl-6,13-diméthoxy-1H-dibenzo[3,4:7,8]cycloocta[1,2-d][1,2,3]triazol-9(8H)-one **134**



Masse molaire : 411,45 g.mol⁻¹

Formule brute : C₂₅H₂₁N₃O₃

Protocole général C (réaction agitée pendant 45 h) appliqué à 9,7 mg de cyclooctynone **132**. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur plaque préparative (éluant : heptane/AE (1:1, v/v)) pour conduire au 1,4-triazole **134a** majoritaire (4,8 mg, 34% de rendement) obtenu sous la forme d'une huile orange et au 1,5-triazole **134b** minoritaire (1,4 mg, 10% de rendement) obtenu sous la forme d'une huile jaune. Rendement de la réaction : 43%.

Le composé **134a**

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 7,82 (d, 1H, **H7**, *J* = 8,6 Hz) ; 7,66 (d, 1H, **H4**, *J* = 2,8 Hz) ; 7,29 (t, 1H, **H14**, *J* = 8,1 Hz) ; 7,12-7,06 (m, 4H, **H6**, **H22**, **H23** et **H24**) ; 6,91 (d, 1H, **H15**, *J* = 8,1 Hz) ; 6,87 (d, 1H, **H21**, *J* = 7,1 Hz) ; 6,86 (d, 1H, **H25**, *J* = 7,8 Hz) ; 6,78 (d, 1H, **H13**, *J* = 8,1 Hz) ; 5,68 (d, 1H, **H19a**, *J* = 14,9 Hz) ; 5,33 (d, 1H, **H19b**, *J* = 14,9 Hz) ; 3,76 (s, 3H, **H18**) ; 3,69 (s, 3H, **H17**) ; 3,54 (d, 1H, **H2a**, *J* = 12,1 Hz) ; 3,34 (d, 1H, **H2b**, *J* = 12,1 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 195,4 (**C1**) ; 159,4 (**C5**) ; 156,3 (**C12**) ; 147,0 (**C10**) ; 136,6 (**C9**) ; 135,4 (**C16**) ; 135,1 (**C3**) ; 134,5 (**C7**) ; 131,8 (**C14**) ; 130,7 (**C20**) ; 128,5 (**C22** et **C24**) ; 128,0 (**C23**) ; 127,6 (**C21** et **C25**) ; 124,4 (**C11**) ; 121,5 (**C6**) ; 120,7 (**C15**) ; 114,9 (**C8**) ; 113,2 (**C4**) ; 109,6 (**C13**) ; 55,6 (**C17**) ; 55,5 (**C18**) ; 53,5 (**C19**) ; 48,0 (**C2**).

SM (ESI⁺, DCM + ACN) : *m/z* 412,2 [M+H]⁺.

Haute résolution calculée pour C₂₅H₂₂N₃O₃⁺ [M+H]⁺ : 412,1661, trouvée : 412,1654.

IR

ν (cm⁻¹) = 3012, 2952 (C-H ar) ; 2848 (C-N) ; 1668 (C=O) ; 1600, 1583, 1507, 1461 (C=C-CH₂) ; 1398, 1344, (C-O) ; 1263, 1226, 1182, 1141, 1125, 1085 (C-H ar) ; 980, 952, 912, 892, 871 (C-C ar).

Le composé **134b**

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) : 7,52 (d, 1H, **H4'**, *J* = 3,0 Hz) ; 7,22 (t, 1H, **H14'**, *J* = 8,0 Hz) ; 7,17-7,14 (m, 3H, **H22'**, **H23'** et **H24'**) ; 7,09 (d, 1H, **H7'**, *J* = 8,5 Hz) ; 7,00 (dd, 1H, **H6'**, *J* = 8,5 et 3,0 Hz) ; 6,97-6,94 (m, 2H, **H21'** et **H25'**) ; 6,85 (d, 1H, **H15'**, *J* = 8,0 Hz) ; 6,79 (d, 1H, **H13'**, *J* = 8,0 Hz) ; 5,60 (d, 1H, **H19a'**, *J* = 15,1 Hz) ;

5,49 (d, 1H, **H19b'**, $J = 15,1$ Hz) ; 3,77 (s, 3H, **H17'**) ; 3,75 (s, 3H, **H18'**) ; 3,69 (d, 1H, **H2a'**, $J = 14,0$ Hz) ; 3,32 (d, 1H, **H2b'**, $J = 14,0$ Hz).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)

δ (ppm) : 195,6 (**C1'**) ; 159,2 (**C5'**) ; 156,9 (**C12'**) ; 141,6 (**C9'**) ; 136,5 (**C10'**) ; 134,6 (**C16'**) ; 134,0 (**C3'**) ; 131,6 (**C7'**) ; 130,8 (**C20'**) ; 129,3 (**C14'**) ; 127,8 (**C22'** et **C24'**) ; 127,4 (**C23'**) ; 126,5 (**C21'** et **C25'**) ; 120,4 (**C15'**) ; 118,8 (**C6'**) ; 117,8 (**C8'**) ; 113,3 (**C4'**) ; 112,2 (**C11'**) ; 109,1 (**C13'**) ; 55,0 (**C18'**) ; 54,5 (**C17'**) ; 51,7 (**C19'**) ; 48,3 (**C2'**).

SM (ESI⁺, DCM + ACN) : m/z 412,2 [M+H]⁺.

Haute résolution calculée pour $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_3^+$ [M+H]⁺ : 412,1661, trouvée : 412,1662.

IR

ν (cm^{-1}) = 2961, 2924 (**C-H ar**) ; 2853 (**C-N**) ; 1740 (**C=O**) ; 1674, 1603, 1582, 1509, 1468, 1437 (**C=C-CH₂**) ; 1352, 1324 (**C-O**) 1207, 1072, 1018 (**C-H ar**) ; 984, 869, 840, 797, 774 (**C-C ar**).

Bibliographie

1. Oliff, A. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Rev. Cancer* **1999**, *1423*, C19–C30.
2. Cestac, P.; Doisneau-Sixou, S.; Favre, G. *Ann. Pharm. Fr.* **2005**, *63*, 76-84.
3. Yokoyama, K.; Trobridge, P.; Buckner, F. S.; Scholten, J.; Stuart, K. D.; Van Voorhis, W. C.; Gelb, M. H. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1998**, *94*, 87–97.
4. Eastman, R. T. *J. Lipid Res.* **2005**, *47*, 233–240.
5. Lethu, S. « Etudes des relations structure-activité des 3-arylthiophènes : une nouvelle classe d'inhibiteurs de la protéine farnésyltransférase ». *Université Paris-Sud XI*, **2009**, Gif-sur-Yvette.
6. Bosc, D. « Synthèse et évaluation biologique d'hétérocycles à cinq chaînons, inhibiteurs de la protéine farnésyltransférase ». *Université Paris-Sud XI*, **2011**, Gif-sur-Yvette.
7. Kho, Y.; Kim, S. C.; Jiang, C.; Barma, D.; Kwon, S. W.; Cheng, J.; Jaunbergs, J.; Weinbaum, C.; Tamanoi, F.; Falck, J.; Zhao, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 12479-12484.
8. Rudenko, G. *Essays Biochem.* **2011**, *51*, 47–62.
9. Redecke, L.; Nass, K.; DePonte, D. P.; White, T. A.; Rehders, D.; Barty, A.; Stellato, F.; Liang, M.; Barends, T. R. M.; Boutet, S.; Williams, G. J.; Messerschmidt, M.; Seibert, M. M.; Aquila, A.; Arnlund, D.; Bajt, S.; Barth, T.; Bogan, M. J.; Caleman, C.; Chao, T.-C.; Doak, R. B.; Fleckenstein, H.; Frank, M.; Fromme, R.; Galli, L.; Grotjohann, I.; Hunter, M. S.; Johansson, L. C.; Kassemeyer, S.; Katona, G.; Kirian, R. A.; Koopmann, R.; Kupitz, C.; Lomb, L.; Martin, A. V.; Mogk, S.; Neutze, R.; Shoeman, R. L.; Steinbrener, J.; Timneanu, N.; Wang, D.; Weierstall, U.; Zatsepin, N. A.; Spence, J. C. H.; Fromme, P.; Schlichting, I.; Duszhenko, M.; Betzel, C.; Chapman, H. N. *Science* **2013**, *339*, 227–230.
10. Langousis, G.; Hill, K. L. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 505–518.
11. <http://www.warrenphotographic.co.uk/>.
12. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>.
13. Baum, J.; Papenfuss, A. T.; Baum, B.; Speed, T. P.; Cowman, A. F. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 621-628.
14. ©LCC : Laboratoire de Chimie de Coordination, UPR 8241, CNRS.
15. Josling, G. A.; Llinás, M. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 573-587.
16. Clichés de microscopie confocale, CeMIM, MNHN.
17. <http://jibbio.wordpress.com/>.
18. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>.
19. Prasher, D. C.; Eckenrode, V. K.; Ward, W. W.; Prendergast, F. G.; Cormier, M. J. *Gene*, **1992**, *111*, 229-233.
20. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
21. Hang, H. C.; Yu, C.; Kato, D. L.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 14846-14851.
22. Patterson, D. M.; Nazarova, L. A.; Prescher, J. A. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 592-605.
23. Hoz, S. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 3545-3547.
24. Singh, N.; Karpichev, Y.; Sharma, R.; Gupta, B.; Sahu, A. K.; Satnami, M. L.; Ghosh, K. K. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 2827-2848.
25. Dirksen, A.; Dawson, P. E. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *12*, 2543-2548.
26. King, M.; Wagner, A. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 825-839.
27. Agarwal, P.; van der Weijden, J.; Sletten, E. M.; Rabuka, D.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 46-51.
28. Agarwal, P.; Kudirka, R.; Albers, A. E.; Barfield, R. M.; de Hart, G. W.; Drake, P. M.; Jones, L. C.; Rabuka, D. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 846-851.
29. Wade, J. D.; Domagala, T.; Rothacker, J.; Catimel, B.; Nice, E. *Lett. Pept. Sci.* **2002**, *8*, 211-220.
30. Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974-6998.
31. <http://www.isites.harvard.edu>.
32. Seelig, B.; Jäschke, A. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7729-7732.
33. Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518-13519.
34. Selvaraj, R.; Fox, J. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 753-760.

35. Knall, A. C.; Slugovc, C. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5131-5142.
36. Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 2297-2299.
37. Yang, J.; Šečkutė, J.; Cole, C. M.; Devaraj, N. K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 7476-7479.
38. Chen, W.; Wang, D.; Dai, C.; Hamelberg, D.; Wang, B. *Chem. Comm.* **2012**, *48*, 1736-1738.
39. Kumar, S.; Kumar, V.; Singh, S. P. *Pericyclic Reactions: A Mechanistic and Problem-Solving Approach*; Academic Press, **2015**, p.247.
40. Michael, A. J. *Prakt. Chem.* **1893**, *48*, 94-95.
41. Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565-598.
42. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
43. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
44. Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. *Science*, **2013**, *340*, 457-460.
45. Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
46. Alder, K.; Stein, G. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1931**, *485*, 211-222.
47. Wittig, G.; Krebs, A. *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260-3275.
48. Codelli, J. A.; Baskin, J. M.; Agard, N. J.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486-11493.
49. Sletten, E. M.; Nakamura, H.; Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11799-11805.
50. Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3097-3099.
51. Dommerholt, J.; Schmidt, S.; Temming, R.; Hendriks, L. J.; Rutjes, F. P.; van Hest, J. C.; Lefeber, D. J.; Friedl, P.; van Delft, F. L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 9422-9425.
52. Varga, B. R.; Kállay, M.; Hegyi, K.; Béni, S.; Kele, P. *Chemistry*, **2012**, *18*, 822-828.
53. Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 2253-2255.
54. Stöckmann, H.; Neves, A. A.; Stairs, S.; Ireland-Zecchini, H.; Brindle, K. M.; Leeper, F. J. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 932-936.
55. Mbua, N. E.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Steet, R.; Boons, G.-J. *ChemBioChem.* **2011**, *12*, 1912-1921.
56. Neves, A. A.; Stöckmann, H.; Wainman, Y. A.; Kuo, J. C.-H.; Fawcett, S.; Leeper, F. J.; Brindle, K. M. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 934-941.
57. Neves, A. A.; Wainman, Y. A.; Wright, A.; Kettunen, M. I.; Rodrigues, T. B.; McGuire, S.; Hu, D.-E.; Bulat, F.; Crich, S. G.; Stöckmann, H.; Leeper, F. J.; Brindle, K. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1286-1290.
58. Kuzmin, A.; Poloukhtine, A.; Wolfert, M. A.; Popik, V. V. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 2076-2085.
59. Debets, M. F.; van Delft, F. L. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 97-99.
60. Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688-3690.
61. McNitt, C. D.; Popik, V. V. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 8200-8202.
62. de Almeida, G.; Sletten, E. M.; Nakamura, H.; Palaniappan, K. K.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 2443-2447.
63. Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5937-5939.
64. Friscourt, F.; Fahrni, C. J.; Boons, G.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18809-18815.
65. Laverman, P.; Meeuwissen, S. A.; van Berkel, S. S.; Oyen, W. J.; van Delft, F. L.; Rutjes, F. P.; Boerman, O. C. *Nucl. Med. Biol.* **2009**, *36*, 749-757.
66. van Dongen, S. F.; Verdurmen, W. P.; Peters, R. J.; Nolte, R. J.; Brock, R.; van Hest, J. C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 7213-7216.
67. Ning, X.; Temming, R. P.; Dommerholt, J.; Guo, J.; Ania, D. B.; Debets, M. F.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J.; van Delft, F. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3065-3068.
68. MacKenzie, D. A.; Sherratt, A. R.; Chigrinova, M.; Cheung, L. L.; Pezacki, J. P. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 81-88.

69. McKay, C. « Alkyne-nitrone cycloadditions for functionalizing cell surface proteins ». *University of Ottawa*, **2012**, Canada.
70. McKay, C. S.; Blake, J. A.; Cheng, J.; Danielson, D. C.; Pezacki, J. P. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10040-10042.
71. McKay, C. S.; Chigrinova, M.; Blake, J. A.; Pezacki, J. P. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 3066-3070.
72. Gutsmedl, K.; Wirges, C. T.; Ehmke, V.; Carell, T. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2405-2408.
73. Jawalekar, A. M.; Reubsæet, E.; Rutjes, F. P.; van Delft, F. L. *Chem. Comm.* **2011**, *47*, 3198-3200.
74. Singh, I.; Heaney, F. *Chem. Comm.* **2011**, *47*, 2706-2708.
75. Heaney, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 3043-3058.
76. Wallace, S.; Chin, J. W. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1742-1744.
77. Huisgen, R.; Grashey, R.; Gotthardt, H.; Schmidt, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1962**, *1*, 48-49.
78. Narayanam, M. K.; Liang, Y.; Houk, K. N.; Murphy, J. M. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 1257-1261.
79. Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17570-17573.
80. Shaughnessy, K. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 1827-1835.
81. Kodama, K.; Fukuzawa, S.; Nakayama, H.; Kigawa, T.; Sakamoto, K.; Yabuki, T.; Matsuda, N.; Shirouzu, M.; Takio, K.; Tachibana, K.; Yokoyama, S. *ChemBioChem.* **2006**, *7*, 134-139.
82. Kodama, K.; Fukuzawa, S.; Nakayama, H.; Sakamoto, K.; Kigawa, T.; Yabuki, T.; Matsuda, N.; Shirouzu, M.; Takio, K.; Yokoyama, S.; Tachibana, K. *ChemBioChem.* **2007**, *8*, 232-238.
83. Li, N.; Lim, R. K.; Edwardraja, S.; Lin, Q. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15316-15319.
84. Li, J.; Lin, S.; Wang, J.; Jia, S.; Yang, M.; Hao, Z.; Zhang, X.; Chen, P. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7330-7338.
85. Ojida, A.; Tsutsumi, H.; Kasagi, N.; Hamachi, I. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3301-3305.
86. Spicer, C. D.; Davis, B. G. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1698-1700.
87. Spicer, C. D.; Triemer, T.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 800-803.
88. Yusop, R. M.; Unciti-Broceta, A.; Johansson, E. M.; Sánchez-Martin, R. M.; Bradley, M. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 239-243.
89. Lin, Y. A.; Chalker, J. M.; Floyd, N.; Bernardes, G. J.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9642-9643.
90. Poloukhine, A. A.; Mbua, N. E.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J.; Popik, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15769-15776.
91. Song, W.; Wang, Y.; Yu, Z.; Vera, C. I.; Qu, J.; Lin, Q. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 875-885.
92. Link, A. J.; Tirrell, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164-11165.
93. Link, A. J.; Vink, M. K.; Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R.; Tirrell, D. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 10180-10185.
94. Kiick, K. L.; Saxon, E.; Tirrell, D. A.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 19-24.
95. Seitchik, J. L.; Peeler, J. C.; Taylor, M. T.; Blackman, M. L.; Rhoads, T. W.; Cooley, R. B.; Refakis, C.; Fox, J. M.; Mehl, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2898-2901.
96. Li, Z.; Wang, D.; Li, L.; Pan, S.; Na, Z.; Tan, C. Y.; Yao, S. Q. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 9990-9998.
97. Thirumurugan, P.; Matosiuk, D.; Jozwiak, K. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4905-4979.
98. Saxon, E.; Bertozzi, C. R. *Science*, **2000**, *287*, 2007-2010.
99. Laughlin, S. T.; Baskin, J. M.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R. *Science*, **2008**, *320*, 664-667.
100. Chang, P. V.; Dube, D. H.; Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9516-9518.
101. Mas Pons, J.; Dumont, A.; Sautejeau, G.; Fugier, E.; Baron, A.; Dukan, S.; Vauzeilles, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1275-1278.
102. Jao, C. Y.; Roth, M.; Welti, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 15332-15337.
103. Neef, A. B.; Schultz, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1498-1500.
104. Martin, D. O.; Vilas, G. L.; Prescher, J. A.; Rajaiah, G.; Falck, J. R.; Bertozzi, C. R.; Berthiaume, L. G. *FASEB J.* **2008**, *22*, 797-806.

105. Salic, A.; Mitchison, T. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2415-2420.
106. Buck, S. B.; Bradford, J.; Gee, K. R.; Agnew, B. J.; Clarke, S. T.; Salic, A. *Biotechniques* **2008**, *44*, 927-929.
107. Neef, A. B.; Luedtke, N. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 20404-20409.
108. Penarete-Vargas, D. M.; Boisson, A.; Urbach, S.; Chantelauze, H.; Peyrottes, S.; Fraise, L.; Vial, H. J. *PLoS One* **2014**, *9*, doi: 10.1371/journal.pone.0113918.
109. Ismail, H. M.; Barton, V.; Phanchana, M.; Charoensutthivarakul, S.; Wong, M. H.; Hemingway, J.; Biagini, G. A.; O'Neill, P. M.; Ward, S. A. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2016**, *113*, 2080-2085.
110. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Bernard Valeur, **2001**, Wiley-VCH Verlag GmbH.
111. PhotochemCAD 2.1
112. Müllera, A. M.; Avlasevichb, Y. S.; Müllenb, K.; Bardeen, C. J. *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *421*, 518-522.
113. Liddle, B. J.; Silva, R. M.; Morin, T. J.; Macedo, F. P.; Shukla, R.; Lindeman, S. V.; Gardinier, J. R. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5637-5646.
114. Anderson, S.; Weaver, M. S.; Hudson, A. J. *Synth. Met.* **2000**, *111-112*, 459-463.
115. Sun, W.-C.; Gee, K. R.; Haugland, R. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3107-3110.
116. Heinz, B.; Schmidt, B.; Root, C.; Satzger, H.; Milota, F.; Fierz, B.; Kiefhaber, T.; Zintha, W.; Gilch, P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 3432-3439.
117. Loper, G. L.; Lee, E. K. C. *Chem. Phys. Lett.* **1972**, *13*, 140-143.
118. Spagnuolo, C. C.; Vermeij, R. J.; Jares-Erijman, E. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12040-12041.
119. Lippert, E.; Lippert, W.; Moll, F.; Nagele, F.; Boos, W.; Prigge, H.; Seibold-Blanckenstein, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1961**, *73*, 695-706.
120. Rotkiewicz, R.; Grellmann, K. H.; Grabowski, Z. R. *Chem. Phys. Lett.* **1973**, *19*, 315-318.
121. Wu, J.; Liu, W.; Ge, J.; Zhang, H.; Wang, P. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3483-3495.
122. Patasis, N. A.; Patane, M. A. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 5757-5821.
123. Yet, L. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2963-3007.
124. *Angle Strained Cycloalkynes*, Krebs, A.; Wilke, J. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **1983**; pp.189-233.
125. Potts, K. T.; Baum, J. S. *Chem. Rev.* **1974**, *74*, 189-213.
126. Poloukhine, A.; Popik, V. V. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7833-7840.
127. Meier, H.; Voigt, E. *Tetrahedron*, **1972**, *28*, 187-198.
128. Frigerio, M.; Santagostino, M.; Sputore, S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4537-4538.
129. *Human Biomolecular Research Institute*, WO2006/25920 A2, **2006**, Pages 43-44.
130. Jung, M. E.; Mossman, A. B.; Lyster, M. A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3698-3701.
131. Jung, M. E.; Miller, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1984-1992.
132. Larghi, E. L.; Kaufman, T. S. *Synthesis*, **2006**, *2*, 187-220.
133. Corey, E. J.; Venkateswarlu, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190-6191.
134. Robertson, B. D.; Hartel, A. M. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 2088-2090.
135. Romanov-Michailidis, F.; Besnard, C.; Alexakis, A. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4906-4909.
136. Onishi, Y.; Ito, T.; Yasuda, M.; Baba, A. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8227-8235.
137. Joost, M.; Gualco, P.; Mallet-Ladeira, S.; Amgoune, A.; Bourissou, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7160-7163.
138. Fleming, I.; Roberts, R. S.; Smith, S. C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1998**, 1215-1228.
139. Greene, T. W.; Peter, G. M. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc., **2006**.
140. Friscourt, F.; Ledin, P. A.; Mbuja, N. E.; Flanagan-Steet, H. R.; Wolfert, M. A.; Steet, R.; Boons, G.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5381-5389.
141. Fischer, F. R.; Nuckolls, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7257-7260.
142. Gray, E. E.; Rabenold, L. E.; Goess, B. C. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 6177-6179.
143. Weber, H.; Khorana, H. G. *J. Mol. Biol.* **1972**, *72*, 219-250.

144. Kim, M.-J.; Choi, Y. K.; Kim, S.; Kim, D.; Han, K.; Ko, S.-B.; Park, J. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1295-1298.
147. O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421-5426.
148. Gaussian 09, Revision D.01, Frisch, M.; Trucks, G.; Schlegel, H.; Scuseria, G.; Robb, M.; Cheeseman, J.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H.; Izmaylov, A.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, Jr., J.; Peralta, J.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J.; Brothers, E.; Kudin, K.; Staroverov, V.; Keith, T.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J.; Iyengar, S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J.; Klene, M.; Knox, J.; Cross, J.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R.; Yazyev, O.; Austin, A.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J.; Martin, R.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V.; Voth, G.; Salvador, P.; Dannerberg, J.; Dapprich, S.; Daniels, A.; Farkas, O.; Foresman, J.; Ortiz, J.; Cioslowski, J.; Fox, D. *Gaussian Inc.*, Wallingford CT, **2013**.
149. Adamo, C.; Jacquemin, D. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 845-856.
150. Jacquemin, D.; Perpète, E. A.; Ciofini, I.; Adamo, C. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 326-334.
151. Martin, R. L. J. *Chem. Phys.* **2003**, *118*, 4775-4777.

