



HAL
open science

Conception de dérivés 2-aryl-benzothiazoles pour la reconnaissance d'agrégats du peptide amyloïde- β par diverses approches physico-chimiques

Alexandre Pocinho

► **To cite this version:**

Alexandre Pocinho. Conception de dérivés 2-aryl-benzothiazoles pour la reconnaissance d'agrégats du peptide amyloïde- β par diverses approches physico-chimiques. Chimie de coordination. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30125 . tel-02276954

HAL Id: tel-02276954

<https://theses.hal.science/tel-02276954>

Submitted on 3 Sep 2019

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Alexandre POCINHO

le mardi 13 février 2018

Titre :

Conception de dérivés 2-aryl-benzothiazoles pour la reconnaissance d'agrégats du peptide amyloïde- β par diverses approches physico-chimiques.

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED SDM : Chimie, Biologie, Santé - CO 042

Unité de recherche :

Laboratoire Chimie de Coordination UPR8241 - CNRS

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr. Christelle HUREAU

Dr. Emmanuel GRAS

Jury :

Dr. Olivier MAURY, Laboratoire de Chimie de l'ENS de Lyon, Lyon, Rapporteur

Dr. Olivier OUARI, Institut Chimie Radicalaire, Marseille, Rapporteur

Dr. Célia BONNET, Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans, Examinatrice

Dr. Suzanne FERY-FORGUES, Laboratoire de SPCMIB, Toulouse, Examinatrice

Dr. Christelle HUREAU, LCC, Toulouse, Directrice de thèse

Dr. Emmanuel GRAS, LCC, Toulouse, Co-directeur de thèse

Dr. Béatrice MESTRE-VOEGTLE, LCC, Membre invité

Remerciements

Cette thèse fut pour moi une aventure scientifique et humaine très riche durant ces 3 années.

En premier lieu, je souhaite remercier les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse ainsi que pour la discussion très riche qui suivie la présentation. Je remercie bien entendu Dr. Oliver Maury et Dr. Olivier Ouari d'avoir lu et rapporté mon manuscrit de thèse avec beaucoup d'attention ainsi qu'également le Dr. Suzanne Fery-Forgues d'avoir présidé ma soutenance avec grande bienveillance.

Je souhaite remercier Christelle Hureau et Emmanuel Gras qui m'ont fait l'honneur de travailler avec eux sur ces travaux à l'interface de la biologie/physico-chimie et de la chimie/synthèse organique et pour m'avoir poussé à me dépasser quand il le fallait.

Merci Manu pour m'avoir enseigné ton savoir et test connaissances en chimie organique ainsi également pour tes super blagues et citations et pour ta bonne humeur. Tu m'as définitivement convaincu de l'intérêt de la synthèse sur les grandes quantités et merci également de tout le support que tu as apporté pour qu'on ne manque de rien en synthèse. Tu m'as toujours poussé à regarder plus loin dans la chimie organique.

Merci Christelle pour m'avoir fait découvrir la physico-chimie avec le peptide A β , peptide ô combien surprenant mais également de m'avoir initié aux techniques de RPE et d'électrochimie qui étaient pour moi très nébuleuses. Merci également d'avoir été ma coloc de bureau, j'ai beaucoup apprécié nos échanges à l'instar de ceux que j'ai eu avec Manu. Je suis ravi de t'avoir fait connaître celui qui pour moi est le roi des animaux en science, le fameux rat-taupe nu.

Je remercie également Peter Fallor de m'avoir accueilli à l'époque au sein de son équipe, ton insatiable appétit pour la science est un exemple pour nous tous.

Je remercie ensuite Béatrice Mestre pour avoir encadré une partie de mes travaux de thèse et de m'avoir initié à la fluorescence et au MALDI ; et je remercie également Fabrice Collin de m'avoir aidé aux travaux sur le marquage du peptide et l'analyse par Spectrométrie de masse, je n'aurai pu accomplir sans ce travail sans ton optimisme et ta bonne humeur.

Parmi le personnel de la plateforme technique du LCC je souhaiterais remercier Sonia Mallet-Ladeira et Carine Duhayon pour les structures RX de mes molécules, Isabelle Borget et Alain Moreau pour les analyses élémentaires. Christian Bijani pour la RMN du peptide avec les molécules, et Lionel Rechinat pour les mesures et la cinétique RPE avec mes ligands et l'A β . De même, je souhaite remercier le service de spectrométrie de masse de l'Université Toulouse III Paul Sabatier.

Je souhaiterais pouvoir ici montrer ma reconnaissance envers toutes les personnes qui ont pu faire de cette thèse ce qu'elle est (en espérant n'avoir oublié personne).

Tout d'abord je souhaiterais remercier très chaleureusement Viviane Peyrou de m'avoir aidé, enseigner et de m'avoir remis à niveau sur le savoir-faire en chimie organique. Tu m'as tout appris sur le fonctionnement du laboratoire, les bonnes pratiques de labo et les différents trucs et astuces. Ton savoir-faire technicien m'aura été d'une grande aide pour accomplir mes travaux de thèse. Ton soutien m'a apporté beaucoup.

L'équipe ne serait pas ce qu'elle serait sans la présence de mes (très) nombreux collègues qui ont partagé ma vie de laboratoire pendant ces trois années. Omar, merci d'avoir partagé avec moi le labo durant une bonne partie de ma thèse et également pour m'avoir prodigué de nombreux conseils en chimie organique, et plus légèrement pour les nombreuses discussions et les blagues (je n'oserais penser meilleur interlocuteur que toi). Inga et Simon, vos efforts et votre aide ont permis d'élargir la portée de mes travaux de thèse, merci infiniment. Marie et Carine, merci pour les nombreuses heures de brainstorming/pause-café, d'avoir partagé avec moi la casquette chimie/bio. Amandine, Clémence, et Valentina, merci d'avoir fait de l'équipe F une équipe soudée et d'avoir organisé les activités pour l'équipe. Je n'oublie pas non plus Elena (en particulier des discussions sur l'Espagne, et pour m'avoir produit du peptide A β), Sara (pour la discussion sur la biologie et le Mexique), Olivia (pour ton savoir sur A β), Melisa (où comment subtilement faire des divisions par zéro pour empêcher l'ordinateur de planter), Olena (pour avoir été une super colocatrice de bureau et également pour tes astuces de labo), Paulina (tes progrès en français m'ont bluffé), Djamila (j'ai beaucoup apprécié nos discussions), Mireia (la matrona de la mafia espagnol), Daniel (pour les discussions en chimie organique) et Xudong (je te souhaite toute la réussite pour ta thèse). Merci également à Laurent pour l'aide qu'il m'a apporté en savoir-faire en électrochimie.

Je remercie également les membres de l'équipe K (Michel, Julien, Cyril, Pierre et Colin) pour les discussions et les invitations. Je remercie également les membres de l'équipe D (Chongwei, Kévin, Dimitri et Cécile) pour nos échanges et discussions.

Je suis également reconnaissant envers Pr. Isabelle Hallery et Dr. Pascal Hoffmann qui m'ont permis de pouvoir travailler en tant que chargé d'enseignement en TP de Chimie respectivement chez les L1 et L3. Cette expérience fut riche d'enseignements pour moi (et pour mes élèves je l'espère également !).

Plus personnellement je remercie les membres de ma famille de m'avoir soutenu durant cette thèse, je dédie cette thèse à mon grand-père Miguel qui m'a dit un jour « fais ce que tu aimes ou aime ce que tu fais » phrase que je me suis obligé à appliquer tout au long de ma thèse. Et bien évidemment, Émilie, je ne saurai jamais assez te remercier d'avoir enduré avec moi ces années de thèse et d'avoir été un soutien indéfectible, cette thèse n'aurait pas été possible sans toi.

Liste des abréviations

A

AAC : Azide-alkyne cycloaddition

A β : Amyloïde Bêta

A β DP : protéases dégradant l'A β

ACN : acétonitrile

ADDL : A β -derived diffusible ligand

Ala : alanine

APP : Amyloid precursor protein

APP α : APP clivée par l' α -sécrétase

APP β : APP clivée par la β -sécrétase

APTS : Acide paratoluènesulfonique

Asp : asparagine

α -syn : α -synucléine

AUC : Aire sous la courbe

B

BHE : Barrière hémato-encéphalique

Boc₂O : Dicarbonate de di-tert-butyle

BzT : Benzothiazole

BTA : 2-(4'-2-(4-Methylaminophenyl)benzothiazole

C

CIS : Conversion intersystème

Cp : Cyclopentadiène

Cu : Cuivre

CV : Cyclic voltametry

D

DA : diazine

D- π -A : Donneur- π - Accepteur

DABO : Dioxazaborocane

DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène

DCM : Dichlorométhane

DEAD : Diéthyl azodiacarboxylate

DIPEA : N,N-diisopropyléthylamine

DMAP : Diméthylaminopyridine

DMF : Diméthylformamide

DMSO : Diméthyle sulfoxyde

DPPA : Diphénylphosphoryle azide

E

EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
ERO : Espèces réactives de l'oxygène
ESI : Electrospray Ionisation

G

Gd : gadolinium
GC-MS: Chromatographie gazeuse – Spectrométrie de masse

I

I : Iode
 i_C : Courant capacitif
 i_F : Courant faradique
IFE : Inner filter effect
Ig : Immunoglobuline
IR : Infra-rouge
IRM : imagerie par résonance magnétique

F

Fc : Ferrocène
FDG : [^{18}F] Fluorodésoxyglucose
FRET : Transfert d'énergie par résonance de type Forster
FSB : (E,E)-1-fluoro-2,5-bis(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrilbenzène

H

HFIP : Hexafluoroisopropanol
HPLC: High Performance Liquid Chromatography

K

K_D : Constante de dissociation
 K_I : Constante d'inhibition

L

LAMP : Loop mediated isothermal amplification

M

MA : Maladie d'Alzheimer
MALDI : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*
mCBPA : acide métachloroperbenzoïque

P

PA : Photoacoustique
PABA : Acide 4-aminobenzoïque
PEG : Polyéthylène glycol
PiB : Pittsburgh B
PM : Poids moléculaire

S

SAA : Sérum amyloïde A
SB : Stilbène
SET : Single electron transfer
SM : Spectrométrie de Masse
SMR : Suzuki-Miyaura Reaction
S_N2 : Substitution nucléophile de type 2
S_NAr : Substitution nucléophile aromatique
STD : Saturation Transfer Difference
SWV : Squarewave Voltammetry

R

RC : Rouge Congo
R_f : Rapport frontal
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RPE : Résonance paramagnétique électronique
RX : Rayons X

N

NHS : N-hydroxysuccinimide

T

tBuO⁻ : Tert-butylate
tBuONO : Tert-butyl nitrite
Tc : Technetium
TCFH : *N,N,N',N'*-tétraméthylchloroformamidinium hexafluorophosphate
TEA : Triéthylamine
TEMP : Tomographie d'émission monophonotique
TEMPO : (2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)oxyl
TEP : Tomographie par émission de positrons
TFE : Trifluoroéthanol
THF : Tétrahydrofurane
ThT : Thioflavine T

U

UV : Ultra-violet

Table des matières

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Rappels bibliographiques.....	3
Introduction.....	3
I. Les maladies amyloïdes.....	4
I.1. Définition.....	4
I.2. Histologie/Description.....	4
I.2.a. Amyloses Systémiques.....	4
I.2.b. Amyloses Locales.....	5
II. La maladie d'Alzheimer.....	7
II.1. Généralités.....	7
II.2. Signes cliniques.....	8
II.3. Histopathologie.....	9
II.3.a. Anatomie du cerveau.....	9
II.3.b. Enchevêtrements neurofibrillaires et plaques séniles.....	9
III. L'amyloïde- β	10
III.1. Généralités.....	10
III.2. La cascade amyloïde.....	12
III.3. Structure des fibres et site d'interaction.....	13
IV. Outils moléculaires utilisés dans l'étude des plaques d'agrégation.....	14
IV.1. Les structures « historiques » et leurs techniques.....	14
IV.1.a. Biréfringence avec le Rouge Congo.....	14
IV.1.b. Les Thioflavines T et S et la fluorescence.....	15
IV.1.c. Les autres structures d'affinité pour l'A β	18
IV.1.d. Conclusion sur les structures de bases.....	19
IV.2. Les techniques d'études in vitro/ex vivo.....	19
IV.2.a. Fluorescence.....	19
IV.2.b. Résonance Paramagnétique Électronique.....	24
IV.3. Études <i>in vivo</i>	25
IV.3.a. Tomographie par Émission de Positons.....	25
IV.3.b. Tomographie par Emission Monophotonique.....	29

IV.3.c. Imagerie par Résonnance Magnétique.....	32
IV.4. Conclusion sur les techniques.....	34
V. Le motif Benzothiazole.....	36
VI. Conclusion et projet de recherche.....	37
Bibliographie du Chapitre I.....	39
Chapitre II : Synthèse des dérivés 2-aryl-BzT et de la NMA.....	45
I. Voies d'accès autour du motif benzothiazole.....	45
I.1. Rappels bibliographiques.....	45
I.1.a. A partir d'aminothiophénol.....	45
I.1.b. A partir de l'aniline.....	46
I.1.c. A partir du noyau thiazole.....	46
I.1.d. Choix de la voie utilisée.....	47
I.2. Couplages C-C entre les BzT et les dérivés aryles.....	47
I.2.a. Couplage de Stille.....	47
I.2.b. Couplage de Miyaura-Suzuki.....	48
I.2.c. Couplage par activation de la liaison C-H.....	49
I.3. Voies de synthèse privilégiées pour la synthèse de la NMA.....	50
II. Synthèse du fragment A.....	50
II.1 Formation du cycle benzothiazole.....	50
II.2. Synthèse du composé 3	51
II.3. Iodation du composé 3	52
II. Synthèse autour du fragment B.....	54
II.1. Protection de la 4-bromoaniline.....	54
II.2. Méthylation du composé 2'	56
II.3. Synthèse du composé 4'	57
III. Formation du motif C et variations de fonctions.....	58
III.1 Synthèse du composé 5a par réaction de Suzuki-Miyaura.....	58
III.2. Réduction en alcool du composé 5a	60
III.3. Oxydation du composé 6a	61
III.4. Réaction d'amination réductrice du composé 7a	62
IV. Déprotection du Boc de 8a et purification de la NMA 8b par production de sels chlorhydrates.....	65
IV.1. La déprotection de la fonction Boc.....	65
IV.2 La formation des sels chlorhydrates de la NMA.....	65

V. Conclusion.....	67
Bibliographie du chapitre II.....	68
Chapitre III : Synthèses de dérivés du 2-aryl-BzT pour les études en physico-chimie.....	73
I. Introduction.....	73
II. Synthèse des composés 12b et 16b : la sonde 2-aryl-BzT radicalaire.....	74
II.1. Synthèse du composé 12b par amination réductrice.....	75
II.1.a. Voie 1 : intégration du motif 4-amino-TMP.....	75
II.1.b. Voie 2 : intégration du motif 4-amino-TEMPO.....	77
II.2. Synthèse du composé 16b par amidation.....	80
II.2.a. Production des composés 13a/13b	80
II.2.b. Voie 1 : intégration du motif 4-amino-TMP.....	81
II.2.c. Voie 2 : introduction du 4-amino-TEMPO.....	82
III.Synthèse du composé 9b : la sonde 2-aryl-BzT de photoaffinité.....	84
III.1. Formation de la diaziridine.....	84
III.2. Formation de la diazine et activation du groupement carboxylate.....	85
III.3. Réaction de couplage entre la NMA protégée au Boc et le dérivé diazine.....	86
III.3.a. Description de la réaction de couplage.....	86
III.3.b. Description des spectres RMN du composé 9a	87
III.3.c. Déprotection de la fonction Boc portée par le composé 9a	90
IV. La Chimie click et la fonction azoture.....	91
IV.1. Généralités.....	91
IV.2. Réactivité des azotures.....	92
IV.3. La réaction de cycloaddition (3+2) de Huisgen.....	94
IV.4. Fonctionnalisation du motif 2-aryl-BzT par cycloaddition de Huisgen.....	95
IV.5. Voie d'accès au dérivé azoture.....	96
IV.5.a. Voie A indirecte par la formation du dérivé tosylate.....	97
IV.5.b. Voie B directe à partir de l'alcool.....	101
IV.6. Déprotection de la méthylaniline du composé 18a	103
V.Réaction avec les composés 18a/18b	103
V.1. Formation de l'amine.....	103
V.1.a. Hydrogénation catalytique.....	104
V.1.b. La réaction de Staudinger.....	104
V.2. La cycloaddition Azoture-Alcyne catalysée au cuivre (CuAAC).....	106

VI. Publication de la structure du complexe $[\text{Cu}(\text{Cl}_2)(\mathbf{20a})]_n$	107
VII. Conclusion et perspectives.....	114
Bibliographie du Chapitre III.....	115
Chapitre IV : Techniques de suivi d'agrégation de l'amyloïde-β	119
I. Introduction.....	119
II. Mesures d'affinités des différentes sondes pour les fibres.....	120
II.1. Principe et protocole.....	120
II.2 Résultats et interprétations.....	121
II.2.a. Analyse des pourcentages d'insertion.....	121
II.2.b. Évaluation d'une constante de dissociation approximée K'_d	123
II.3. Conclusion et perspectives.....	125
III. Suivi de l'agrégation par la fluorescence de la NMA.....	125
III.1. Principe de fluorescence.....	125
III.2. Expérience et résultats.....	127
III.2.a. Suivi de l'agrégation du peptide $A\beta_{28}$ avec la ThT et la NMA.....	127
III.2.b. Suivi de l'agrégation en présence simultanée de la ThT et de la NMA.....	130
III.3. Conclusion et perspectives.....	132
IV. Suivi de l'agrégation par voltampérométrie cyclique de la sonde Fc-BTA.....	134
IV.1. Principe de l'électrochimie pour l'étude de l'agrégation.....	134
IV.1.a. Voltampérométrie cyclique (CV : cyclic voltammetry).....	134
IV.1.b. Voltampérométrie à vague carrée (SWV : Squarewave voltametry).....	135
IV.1.c. L'électrochimie pour suivre l'agrégation.....	137
IV.2. Expériences et résultats.....	140
IV.2.a. Influence des fibres $A\beta_{28}$ sur le voltammogramme du Fc-BTA.....	140
IV.2.b. Résultats et interprétations.....	140
IV.2.c. Calcul du K'_d	143
IV.3. Conclusion et perspectives.....	144
V. Suivi de l'agrégation de la sonde TEMPO-BTA.....	146
V.1. Principes des mesures RPE pour suivre l'agrégation.....	146
V.2. Expériences et résultats.....	149
V.2.a. Influence du peptide $A\beta_{28}$ sous forme agrégée ou non sur le signal RPE du TEMPO-BTA...	149
V.2.b Suivi de l'agrégation par RPE.....	151
V.2.c. Calcul de la constante de dissociation K'_d	153

V.2.d. Calcul du temps de corrélation τ_c	154
V.3. Conclusion et perspectives sur le suivi d'agrégation par RPE.....	154
VI. Conclusion générale sur l'étude de l'agrégation.....	155
Bibliographie du chapitre IV.....	157
Chapitre V : Vers une caractérisation du site d'interaction entre le peptide Aβ et le motif 2-aryl-BzT.....	159
I. Investigation de l'interaction ligand/protéine par cristallographie aux RX et criblage <i>in silico</i>	160
I.1. Cristallographie aux RX.....	160
I.2. Cryomicroscopie électronique (Cryo-ME).....	160
I.3. Criblage <i>in silico</i>	161
II. Investigation de l'interaction TEMPO-BTA et du peptide A β par RMN.....	162
II.1. Utilisation de la RMN pour détecter les sites d'intérêts.	162
II.2. Expériences et résultats.....	164
II.3. Conclusion et perspectives.....	167
III. Investigation de l'interaction DA-BTA et le peptide A β par SM.....	168
III.1. Principe et choix de la fonction de photomarquage.....	168
III.1.a. Nitrène via le motif azoture de phényle.....	170
III.1.b. Radical carbocentré via le motif benzophénone.....	171
III.1.c. Carbène via le motif diazirine.....	172
III.1.d. Résumés des caractéristiques des fonctions chimiques de photomarquage.....	173
III.2. Expériences et résultats.....	175
III.2.a. Protocole.....	175
III.2.b. Résultats préliminaires et interprétations.....	175
III.3. Conclusion et perspectives.....	178
IV. Conclusion générale sur la caractérisation du site d'interaction.....	178
Bibliographie du Chapitre V.....	179
Conclusion générale.....	183
Annexes.....	188
Parties expérimentales.....	189

Introduction générale

Introduction générale

« La démence est une marée montante que l'on voit progresser dans le monde », a déclaré le Dr. Margaret Chan, Directrice générale de l'OMS lors de la conférence ministérielle sur l'action mondiale contre la démence en 2012 à Genève. En 2015, l'OMS considère la démence comme une priorité de santé publique et en 2017, l'Assemblée mondiale de la Santé a approuvé le Plan mondial d'action de la santé publique contre la démence 2017-2025.

La maladie d'Alzheimer représente plus de la moitié des cas de démences à travers le monde touchant plus de 45 millions de personnes. Cette maladie ne connaît aucun traitement curatif et touche principalement les personnes âgées. À cause d'une population mondiale vieillissante grâce aux progrès de la médecine, du niveau de vie et d'une baisse de la natalité, en particulier dans les pays développés, les cas de démences augmenteront d'année en année avec un coût pour la société de plus en plus grand. Les démences restent des maladies difficiles à diagnostiquer, pourtant un diagnostic précoce permettrait une meilleure prise en charge des patients avec un coût moins important pour la société.

C'est dans cette optique que plusieurs sondes ont été développées afin de cibler les plaques séniles trouvées dans le cerveau des malades d'Alzheimer. Ces plaques formées par le peptide A β constituent un marqueur de la maladie d'Alzheimer. Ces dernières perturbent le bon fonctionnement des neurones, puisqu'elles peuvent se former dans la fente synaptique gênant ainsi les transmissions de l'information synaptique par le biais des neurotransmetteurs. Les techniques de diagnostic actuelles reposent entre autre sur la détection de ces plaques avec l'utilisation de sondes radioactives dans la Tomographie par Emission de Positron ou bien encore d'agents de contraste pour l'Imagerie par Résonance Magnétique. Pourtant il a été suggéré que les formes précoces précédant la formation des plaques sont les plus dommageables pour le cerveau du patient.

C'est dans ce cadre global que nos travaux de thèse se situent. Ils sont focalisés sur l'élaboration de sondes susceptibles de détecter des formes précoces de l'A β .

Le premier chapitre situe le contexte du projet de la thèse. Les maladies amyloïdes y sont présentées et plus précisément la maladie d'Alzheimer. Les symptômes et les différents marqueurs histopathologiques de la maladie y sont également décrits. Le chapitre s'intéresse par la suite à l'origine et à la formation du peptide A β et de son implication dans la cascade amyloïde. Une description de l'agencement spatial sous formes de fibres conduisant à la formation de sites d'interaction pour les sondes moléculaires est ensuite énoncé. Ces dernières utilisées dans les études *in vitro* et *in vivo* y sont décrites en mettant en avant leurs différences structurales et leur utilisation dans différentes techniques physicochimiques dont

les avantages et les inconvénients sont décrits. Pour finir, ce chapitre comprend une description du motif 2-aryl-benzothiazole et de ses propriétés physico-chimiques.

Le deuxième chapitre est consacré à une partie des travaux de synthèse qui ont permis l'élaboration des principaux dérivés du 2-aryl-benzothiazole. Un bref résumé de la synthèse des motifs benzothiazole introduit ce chapitre qui présente par la suite la voie de synthèse choisie pour produire les différents dérivés. Cette voie comporte la synthèse d'une part du motif benzothiazole et d'autre part du motif aryle qui sont ensuite couplés pour aboutir au motif 2-aryl-benzothiazole. Une série de réactions permettent par la suite de produire les différents dérivés du 2-aryl-BzT portant une fonction chimique différente en position 6 du noyau BzT comme les fonctions acides carboxyliques, alcools et aldéhyde ou encore amine. La synthèse d'un dérivé amine secondaire la NMA sera notamment décrite.

Ces dérivés servent de base afin d'ajouter des fonctions spécifiques, ce qui est décrit au cours du chapitre III. Celui-ci présente la deuxième partie des synthèses effectuées pour produire les sondes permettant les études physico-chimiques. Ce chapitre présente les principales difficultés rencontrées ainsi que les stratégies développées pour les dépasser, et produire les sondes Fc-BTA, TEMPO-BTA et DA-BTA chacune étant associée respectivement aux techniques suivantes : électrochimie, RPE/RMN et spectrométrie de masse par photoaffinité.

Une partie des sondes produites ont été utilisées pour des études par des techniques de fluorescence, de RPE et d'électrochimie pour le suivi d'agrégation. Le chapitre IV présente les résultats préliminaires obtenus.

Pour terminer, le chapitre V s'intéresse à l'étude du site d'interaction entre les sondes et le peptide A β monomérique par RMN et par spectrométrie de masse sur les fibres en utilisant le marquage par photoaffinité.

Chapitre I

Table des matières

Chapitre I : Rappels bibliographiques	3
Introduction	3
I. Les maladies amyloïdes.....	4
I.1. Définition	4
I.2 Histologie/Description	4
I.2.a. Amyloses Systémiques	4
I.2.b. Amyloses Locales.....	5
II. La maladie d'Alzheimer	7
II.1. Généralités.....	7
II.2 Signes cliniques.....	8
II.3. Histopathologie.....	9
II.3.a. Anatomie du cerveau	9
II.3.b. Enchevêtrement neurofibrillaires et plaques séniles.....	9
III. L'amyloïde- β	10
III.1. Généralités.....	10
III.2. La cascade amyloïde	12
III.3 Structure des fibres et site d'interaction	13
IV. Outils moléculaires utilisés dans l'étude des plaques d'agrégation.	14
IV.1 Les structures « historiques » et leurs techniques.	14
IV.1.a. Biréfringence avec le Rouge Congo.....	14
IV.1.b. Les Thioflavines T et S et la fluorescence.....	15
IV.1.c. Les autres structures d'affinité pour l'A β	18
IV.1.d. Conclusion sur les structures de bases.	19
IV.2. Les techniques d'études <i>in vitro/ex vivo</i>	19
IV.2.a. Fluorescence	19
IV.2.b. Résonance Paramagnétique Électronique (<i>in vitro</i>).....	24
IV.3 Études <i>in vivo</i>	25
IV.3.a. Tomographie par Émission de Positons	25
IV.3.b. Tomographie par Emission Monophotonique	29
IV.3.c. Imagerie par Résonance Magnétique	32
IV.4 Conclusion sur les techniques	34
V. Le motif Benzothiazole	36
VI. Conclusion et projet de recherche.....	37
Bibliographie du Chapitre I.....	39

Chapitre I : Rappels bibliographiques

Introduction

L'étude des maladies amyloïdes ou amyloses présentent un intérêt majeur pour la communauté scientifique. La compréhension du mécanisme de formation des agrégats amyloïdes caractéristiques des amyloses et leur détection permettent de déterminer l'origine de formation et l'identification de certains précurseurs moléculaires promouvant ladite agrégation. La connaissance de ces précurseurs est à même de conduire au développement de différents outils pour la détection de ceux-ci. Une identification de ces entités moléculaires aura un impact positif sur le diagnostic précoce de la maladie améliorant la prise en charge du malade, mais aussi des développements thérapeutiques.

Dans le cadre de cette thèse, des outils moléculaires ont été développés pour favoriser l'étude du peptide amyloïde- β (A β) et les agrégats dudit peptide présents dans la maladie d'Alzheimer (MA). Cette maladie est extrêmement étudiée car elle présente un impact important en termes de santé publique. Nos travaux porteront sur le développement d'outils moléculaires basés sur les 2-aryl-benzothiazoles (2-aryl-BzT) et présentant une affinité envers les agrégats amyloïdes. Plusieurs molécules ont donc ainsi été conçues et synthétisées servant à l'étude des agrégats via différentes techniques.

Ce premier chapitre a pour objet une description des données bibliographiques majeures relatives aux différentes thématiques abordées ci-dessus, il est divisé en 4 parties :

Les amyloses feront l'objet d'une première partie consacrée à leur définition ainsi qu'une présentation succincte pour trois d'entre-elles.

La maladie d'Alzheimer sera présentée en deuxième partie avec une description plus poussée de la pathologie et de son impact sur notre société.

Le peptide amyloïde- β et ses différentes formes seront présentés en troisième partie.

Les outils moléculaires servant à l'étude *in vivo* ou *in/ex vivo* des agrégats d'amyloïde- β ainsi que la chimie de synthèse autour du motif 2-aryl-benzothiazole (2-aryl-BzT) feront l'objet de la quatrième et dernière partie.

I. Les maladies amyloïdes

I.1. Définition

L'amylose (ou amyloïdose) est une pathologie caractérisée par dépôts amyloïdes dans les organes du corps humain. Les peptides ou protéines ayant la propriété de former ces dépôts amyloïdes impliqués dans des processus pathologiques sont dits amyloïdogéniques. Ici, par abus de langage, on les nommera peptides ou protéines amyloïdes. Les protéines amyloïdes sont des protéines insolubles qui se déposent généralement dans le milieu extracellulaire des organes touchés. À terme, ces dépôts provoquent une modification de l'apparence de l'organe touché jusqu'à la destruction de celui-ci.

Il existe jusqu'à 36 protéines susceptibles de former des amyloïdes connues à ce jour [1] avec des tailles, séquences, origines et lieux de dépôts amyloïdes différents. Les amyloses se divisent en deux catégories : les amyloses systémiques et les amyloses locales.

I.2 Histologie/Description

I.2.a. Amyloses Systémiques

Ce sont les amyloses dont les protéines amyloïdes sont présentes dans le sérum sanguin et peuvent donc être distribuées ensuite à l'ensemble des organes par la circulation sanguine. Dès lors, ces protéines amyloïdes se déposent dans les organes nécessitant le plus de sang comme le foie, les reins ou le cœur par exemple (**Fig. 1**).

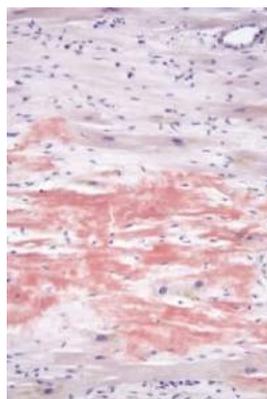


Figure 1. Micrographie de dépôts d'amyloïdes (en rouge) dans le cas d'une amylose cardiaque. (Copyright © 2011 Michael Bonert)

Il existe 2 types principaux d'amyloses systémiques : l'amylose AL et l'amylose AA.

L'amylose AL ou amylose primaire est une amylose dont le peptide amyloïde est une chaîne légère d'immunoglobuline (Ig). Ces Ig sont produites par les plasmocytes, qui dans un cas pathologique prolifèrent sans mécanisme de contrôle. Le nombre de plasmocytes augmente entraînant la surproduction de chaînes légères d'Ig. Ces peptides produits sont donc sécrétés dans la circulation sanguine pour s'agréger sous forme de dépôts amyloïdes dans divers organes.

L'amylose AA ou amylose secondaire survient des suites d'une inflammation chronique issue d'une maladie inflammatoire (souvent auto-immune). Le composé principal des dépôts amyloïdes est le sérum amyloïde A (SAA), un ensemble d'apolipoprotéines produites par le foie. En cas d'inflammation ponctuelle, le taux de SAA augmente puis diminue lorsque l'inflammation diminue. Lors d'une inflammation prolongée, la SAA est très augmentée et les protéines produites se déposent dans les tissus.

1.2.b. Amyloses Locales

Ce sont les amyloses dont le peptide amyloïde ne provient pas de la circulation sanguine mais de l'organe lui-même. Ces amyloses sont issues d'une dérégulation de la production du peptide amyloïdogénique correspondant.

Nous présenterons ici 3 cas d'amyloses locales : i) le diabète sucré de type 2, une amylose n'impliquant pas le système nerveux central ; ii) la maladie de Parkinson dont le dépôt amyloïde est intracellulaire et iii) la maladie d'Alzheimer, dont les dépôts amyloïdes sont extracellulaires.

- i) Dans le cas du diabète sucré de type 2 dit non-insulinodépendant, on retrouve des dépôts d'agrégats d'amyline au sein des îlots de Langerhans du pancréas qui produisent l'insuline (**Fig. 2**).**[2]** L'amyline dont le rôle est de réguler le métabolisme énergétique **[3]** est naturellement co-sécrétée avec l'insuline dans un ratio 1:10-100 (amyline/insuline).**[4, 5]** Dans le diabète de type 2, l'insuline et l'amyline seront sécrétées en grande quantité. Le dépôt d'amyline entraîne la destruction de ces îlots par interaction avec les membranes des cellules.**[6]** Cela induit la diminution de production d'insuline, aggravant ainsi le diabète.

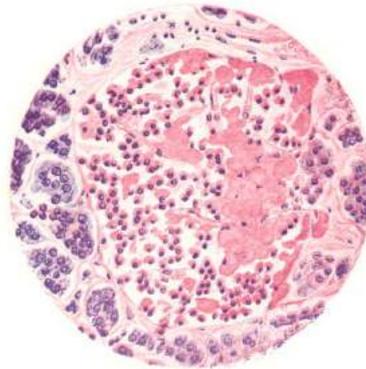


Figure 2. Micrographie de dépôts amyloïdes (en rose) dans le pancréas. (Opie, 1901) [7]

- ii) Dans le cas de la maladie de Parkinson, il y a présence de corps de Lewy au sein des neurones à l'extrémité présynaptique (**Fig. 3**). [8] Ces corps sont composés principalement de la protéine α -synucléine (α -syn) composée de 140 acides aminés. Dans les conditions physiologiques normales, cette protéine est sous forme tétramérique. [9] Dans la maladie de Parkinson, l' α -syn s'agrège pour former les corps de Lewy. Ces agrégats α -syn s'accumulent au sein de la substantia nigra et se propageront dans les neurones voisins. [10, 11] La substantia nigra est composée de neurones dopaminergiques contrôlant le putamen, structure du cerveau responsable de l'apprentissage et de la régulation des capacités motrices du corps. À terme, l'accumulation de corps de Lewy cause la destruction des neurones dopaminergiques qui ne peuvent plus stimuler le putamen, provoquant les effets débilissants de la neuropathie : c'est le syndrome moteur.



Figure 3. Agrégats de α -synucléines (en marron) sous forme de corps de Lewy dans un neurone. (Spillantini, 1997) [8]

- iii) Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, des plaques amyloïdes sont retrouvées dans le cerveau des malades (**Fig.4**). Celles-ci sont composées du peptide amyloïde- β ($A\beta$) dont les propriétés feront l'objet d'une partie ultérieure (cf. §III). Ces plaques amyloïdes se déposent à proximité des neurones autour de la zone de l'hippocampe : la zone du cerveau responsable de la mémoire et de l'orientation

spatiale ; puis ensuite dans le cortex cérébral [12] responsable des processus cognitifs. Ce dépôt empêche une transmission neuronale correcte. Les neurones, n'étant plus excités, finissent par être détruits,[13] provoquant la perte de mémoire et des facultés cognitives : c'est le syndrome intellectuel.

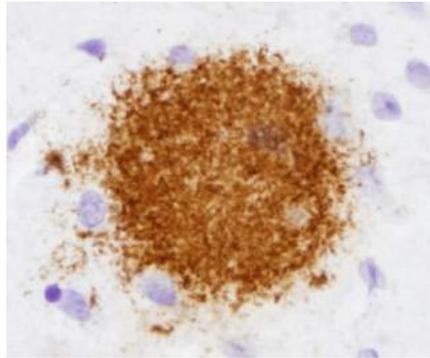


Figure 4. Plaque amyloïde diffuse retrouvée dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. (photographie issue de www.neuropathology-weg.org)

Cette première partie nous a permis de voir quelques exemples de différents types d'amyloses existantes. L'équipe de recherche dans laquelle cette thèse a été effectuée travaille principalement sur la maladie d'Alzheimer. Elle est présentée dans la deuxième partie de ce chapitre.

II. La maladie d'Alzheimer

II.1. Généralités

Découverte par Aloïs Alzheimer en 1906, les symptômes décrits ont été reportés dans l'article « Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde » [14] (« À propos d'une maladie particulière du cortex cérébral ») dont une traduction a été écrite en 1995 par Stelzmann *et al.*[15] Alzheimer décrivait ici une patiente de 51 ans de l'asile qui présentait une perte de la mémoire, des hallucinations auditives et des délires. Elle souffrait également de paranoïa, de désorientation et de déficience cognitive. Lors de l'autopsie, un cerveau atrophié avec des signes de dégénérescence est observé. Des coupes de cerveau ont montré la présence de fibrilles dans les neurones mais également de petits foyers en forme de grains de millet dispersés dans le cortex. Ces deux marqueurs biologiques sont les enchevêtrements neurofibrillaires et les plaques séniles dont les caractéristiques seront décrites au §II.3.b.

La maladie d'Alzheimer (MA) représente plus de 50 % des formes de démence. Elle possède 2 formes : l'une dite sporadique, la plus répandue, touchant majoritairement les personnes âgées à partir de 70 ans, l'autre d'origine génétique beaucoup plus rare qui touche les individus dès l'âge de 40 ans, parfois même

plus précocément. Les principales études statistiques sur la démence indiquent environ 46,8 millions de cas à travers le monde en 2015, dont une incidence de 9,9 millions de nouveaux cas par an, selon le World Alzheimer Report 2015 (**Fig. 5**). La démence est directement corrélée avec l'âge : elle touche moins de 10 % des 65-80 ans, ce taux dépassant les 30 % au-delà de 90 ans. [16]

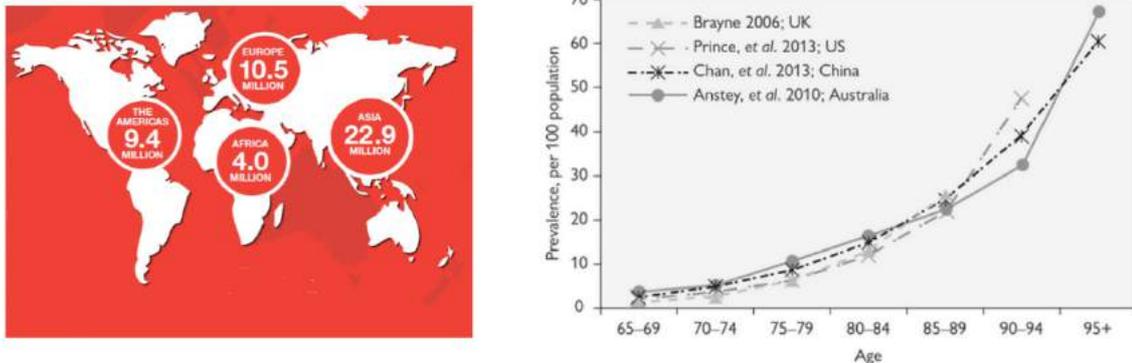


Figure 5. A gauche : Répartition des cas de démences à travers le monde en 2015. (World Alzheimer report 2015). A droite : Prévalence des cas de démences en pourcent à travers le monde (Alzheimer's Disease, Gunhild Waldemar, Alistair Burns, 2017) [16]

Selon World Alzheimer Report 2016,[17] le coût estimé de la démence à travers le monde s'élève à 818 milliards de dollars (U.S.) et devrait d'atteindre les mille milliards en 2018. Ce coût colossal s'explique par le fait que cette maladie n'est actuellement pas curable, seuls les symptômes peuvent être traités, et ce avec une efficacité modérée. La prise en charge des malades de démences se fait au travers de structures adaptées et de personnels de soin pour pallier à la perte d'autonomie des patients. Il existe aussi un coût financier non négligeable pour l'entourage du malade.

Concernant la France d'après la fondation France Alzheimer, on compte environ 850 000 personnes touchées par la MA en 2012 avec environ 250 000 nouveaux cas diagnostiqués par an. Plus de 2 millions de cas sont attendus d'ici 2040.

De plus, la difficulté à diagnostiquer les cas de démences rend la prise en charge du patient difficile.

II.2 Signes cliniques

Selon l'ouvrage Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders,[18] la MA présente les signes cliniques suivants : (i) une perte progressive de la mémoire, d'abord sur le court puis le long terme. Ceci est dû au fait que les lésions sont localisées en premier lieu dans l'hippocampe qui est la partie du cerveau responsable de la mémoire. (ii) Cette zone est également impliquée dans la navigation spatiale, le patient souffrira donc de désorientation. (iii) Le changement d'humeur ou de comportement, avec des signes de confusion, des difficultés pour parler ou avaler viennent également s'ajouter à la liste des symptômes.

Cette accumulation de symptômes handicapants et la détérioration progressive de l'ensemble des processus cognitifs interfèrent dans l'exécution de tâches quotidiennes mais elle impacte également l'environnement social et professionnel du patient. Ces signes cliniques représentent une première approche au diagnostic de la MA, mais sont peu spécifiques comparés à d'autres démences. La découverte de marqueurs biologiques permet un diagnostic plus précis.[19]

II.3. Histopathologie

II.3.a. Anatomie du cerveau

L'autopsie du cerveau révèle des différences de tailles entre le cerveau d'un patient sain et d'un patient atteint de la MA (**Fig. 6**). En effet, à cause de la dégradation des neurones, le cerveau malade présente une atrophie généralement symétrique et se propageant dans toutes les directions. On a ainsi une réduction globale de la taille du cerveau. En plus de cette réduction, on note une profondeur accrue des sillons du cerveau.[20]

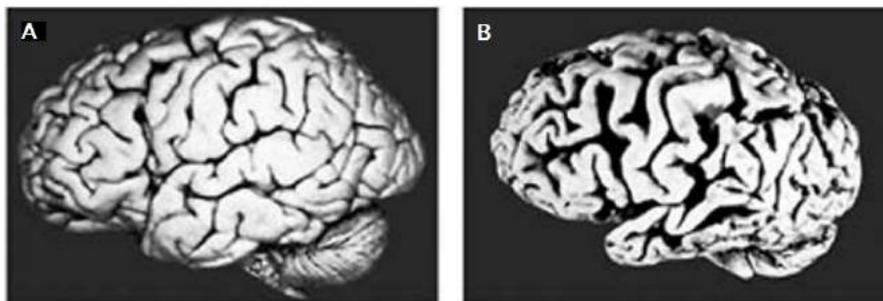


Figure 6. Comparaison d'un cerveau sain (A) et d'un cerveau atteint d'Alzheimer (B). (Mattson, 2004) [21]

Le rétrécissement du cortex impacte directement le mécanisme de pensée, et celui de l'hippocampe qui entraîne la perte de facultés de mémoire et de navigation spatiale. Les chercheurs se sont donc intéressés aux causes de la dégradation des neurones.

II.3.b. Enchevêtrement neurofibrillaires et plaques séniles.

Les enchevêtrements neurofibrillaires (**Fig. 7A**) et les plaques séniles (**Fig. 7B**) ont été décrits pour la première fois dans l'article d'Alzheimer. [14, 15] Ils sont les marqueurs histo-pathologiques témoignant des altérations de l'activité neuronale. Ils sont intracellulaires pour les enchevêtrements fibrillaires et extracellulaires pour les plaques séniles. La composition des enchevêtrements a été découverte en 1986 par

Grundke-Ibal et al.,[22] et correspond à la protéine Tau hyperphosphorylée. Cette protéine est normalement impliquée dans le mécanisme de stabilisation des microtubules du cytosquelette du neurone. L'hyperphosphorylation de Tau est également retrouvée dans d'autres maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson atypique ou encore la maladie de Pick.

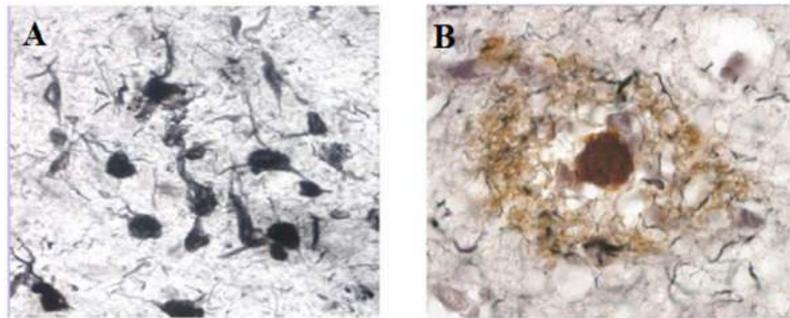


Figure 7. Marqueurs neuropathologiques de la MA : (A) Enchevêtrements fibrillaires et (B) Plaques Séniles. (Sastre,2006) [23]

Les plaques séniles sont quant à elles composées du peptide amyloïde- β . Ce peptide contrairement à la protéine Tau est spécifique à la MA. Voilà pourquoi il a longtemps représenté un sujet d'étude majeur pour les chercheurs dans la compréhension de la maladie. Et il est proposé que l'apparition des plaques d'A β précède celle des enchevêtrements fibrillaires.[24]

III. L'amyloïde- β

III.1. Généralités

L'amyloïde- β (A β) désigne un ensemble de peptides globalement hydrophobes composés de 39 à 43 acides aminés et comportant une partie N-terminale hydrophile, dont la séquence totale a été élucidée pour la première fois par Mori en 1992.[25] Les formes comprenant 40 et 42 acides aminés, nommés respectivement A β 40 et A β 42, sont les formes majoritaires du peptide dans le cerveau malade dont les séquences en acides aminés sont illustrées ci-dessous (**Fig. 8**).



Figure 8. Séquence primaire de l'A β 40/42.

Le peptide A β est produit à partir la protéine précurseur de l'amyloïde (amyloid precursor protein : APP) par coupure sélective par la β -sécrétase et la γ -sécrétase. L'APP est une protéine transmembranaire dont on

a pu démontrer le rôle dans la formation de synapse,[26] la régulation de l'activité neuronale,[27] et supposer son activité dans l'export de Fer.[28]

L'APP comporte 2 voies de protéolyse : une dite non amyloïdogénique qui ne produit pas le peptide amyloïde- β et une dite amyloïdogénique produisant ce dernier.[29]

Dans la voie non amyloïdogénique (**Fig.9A**) l'APP est clivée par l' α -sécrétase pour donner 2 fragments, l'APP α qui part dans le milieu extracellulaire et l' α -CTF qui reste dans la membrane. Ce dernier subit une coupure par la γ -sécrétase pour donner 2 nouveaux fragments : i) le fragment p3, aussi nommé peptide amyloïde- β 17-40/42, est extracellulaire et hydrophobe. Son rôle est encore mal connu puisqu'il a été démontré qu'il serait à la fois neuroprotecteur [30] et qu'il serait également impliqué dans l'augmentation de la réponse inflammatoire dans la MA et dans la mort cellulaire de neuroblastome par apoptose.[31] ii) Le fragment AICD intracellulaire a un rôle supposé dans la transcription de certains gènes.[32]

Dans la voie amyloïdogénique (**Fig. 9B**) l'APP est clivée par la β -sécrétase pour donner elle aussi 2 fragments. Le fragment APP β extracellulaire et le fragment β -CTF restant dans la membrane. Ce dernier subit également une coupure par la γ -sécrétase pour donner le peptide A β d'un côté et le fragment AICD de l'autre.

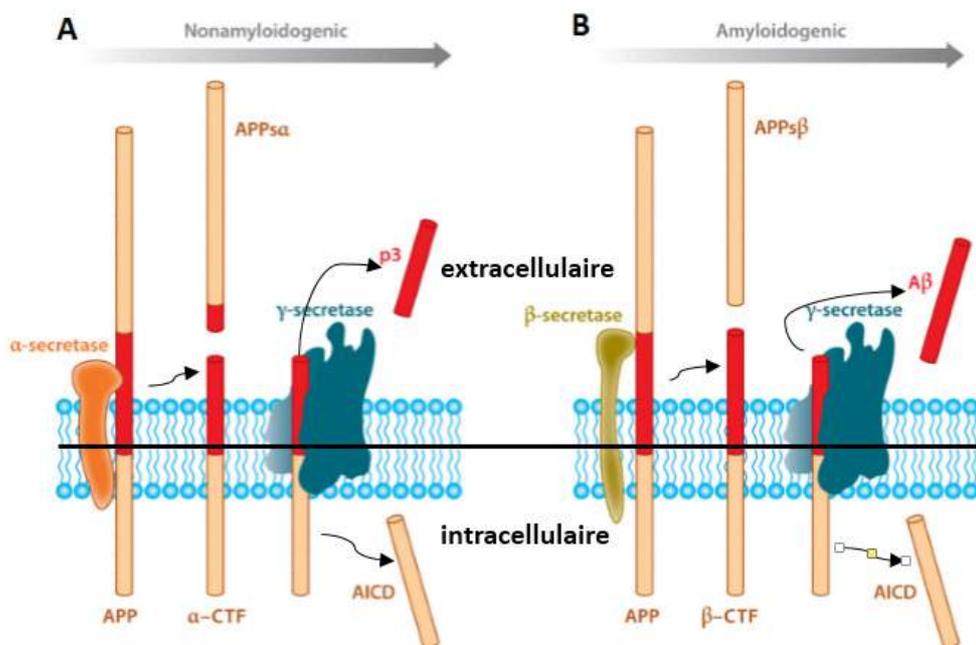


Figure 9. Dessin représentant l'APP et ses différentes voies de clivages peptidiques. La voie A non amyloïdogéniques produisant le fragment p3. La voie B amyloïdogénique produisant l'A β . (O'Brien, 2011) [29]

Le peptide A β est produit en minorité en conditions physiologiques normales sans nécessairement conduire à la MA.[33] La régulation du peptide A β est permise par l'activité protéolytique des protéases dégradant l'A β (A β DPs).[34] C'est la dérégulation de la production du peptide A β qui serait à l'origine de la formation des plaques et des dégâts sur les neurones : c'est l'hypothèse de la cascade amyloïde qui sera traitée dans la partie suivante.

III.2. La cascade amyloïde

L'hypothèse de la cascade amyloïde, telle énoncée par John A. Hardy et Higgins en 1992, établirait l'origine des plaques amyloïdes β et des enchevêtrements neurofibrillaires.[35] En effet, l'accumulation du peptide A β , et la formation de plaques, impacterait l'homéostasie des ions calcium en augmentant leur concentration dans le milieu intracellulaire. Cette augmentation d'ions calcium en intracellulaire déclencherait une cascade de signaux qui mène à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau. L'hyperphosphorylation de Tau aurait pour conséquence l'enchevêtrement neurofibrillaire au sein du neurone. Ainsi l'hypothèse de la cascade positionne la formation de la plaque amyloïde comme cause de la dégradation du neurone et de l'hyperphosphorylation de la protéine Tau.

La formation des plaques d'A β se fait au travers d'un processus d'agrégation (**Fig. 10**). Cette agrégation démarre avec les formes solubles et monomériques du peptide A β qui s'assemblent pour former des agrégats oligomériques. Ces oligomères servent de base pour former des fibres. Les peptides se replient sous forme de feuillet β pour donner des protofibrilles qui à leur tour s'assemblent pour former des fibrilles. Ces fibrilles s'agrègent ensuite pour former les plaques qui se déposent sur les neurones, causant la déstabilisation des membranes cellulaires jusqu'à la neurodégénération.

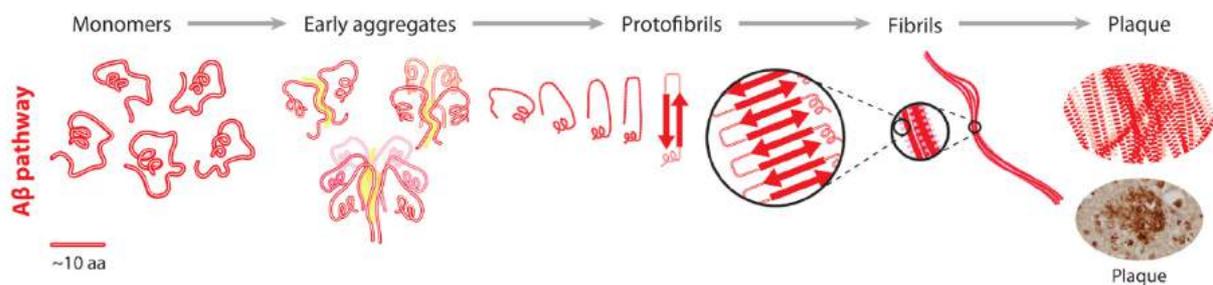


Figure 10. Représentation de l'agrégation du peptide A β en plaques séniles. (Graham, 2017) [36]

Dix ans plus tard, une revue écrite par Hardy et Selkoe met à jour l'hypothèse de cascade amyloïde.[27] Plusieurs chercheurs ont démontré que la présence de la plaque amyloïde ne justifie pas la sévérité des symptômes. Il a été établi entre autre qu'en dépit d'une inhibition de la formation de fibrilles le peptide

A β 42 demeurerait neurotoxique. Des intermédiaires oligomériques nommés ADDLs (pour A β -derived diffusible ligand) sont formés et causent des dégâts sur les cellules nerveuses en culture.[37] De même que les protofibrilles métastables peuvent également induire une neurotoxicité en altérant l'activité électrique des neurones provoquant ainsi leur destruction.[38] Ceci conditionne l'évolution de l'hypothèse qui suggère de considérer davantage les espèces oligomériques d'A β plutôt que les plaques comme espèces toxiques.[39]

D'autres hypothèses ont été énoncées concernant l'origine des molécules neurotoxiques. Certaines d'entre elles impliquent la production de peptides tronqués en N-terminal de la séquence peptidique d'A β . Un article récent de l'équipe de Belfort suggère la formation d'un peptide tronqué par perte des 2 premiers acides aminés (Asp et Ala) donnant lieu à la cyclisation de l'acide glutamique pour former un dérivé pyroglutamate d'A β présentant une stabilité, une abondance et une toxicité accrue par rapport aux peptides A β 40 et A β 42, en raison d'une mauvaise dégradation.[40]

Malgré la forte suspicion de la toxicité des espèces oligomériques, la méconnaissance de leur structure et la difficulté à les isoler du fait de leur métastabilité rendent leur étude difficile. La plaque amyloïde reste dès lors un sujet d'étude majoritaire sur la MA, car elle offre un cadre d'étude plus reproductible et une démarche de rationalisation plus fiable.

III.3 Structure des fibres et site d'interaction

La plaque A β mais également les agrégats amyloïdes d'autres protéines partagent une structure commune. Les travaux de Sunde et Blake [41] par cristallographie par diffraction aux rayons X ont démontré l'existence d'une structure dite « cross- β -sheet » dans laquelle le peptide amyloïde se replie sur lui-même en feuillet β avec un espacement d'environ 10-11 Å. Les peptides amyloïdes s'additionnent les uns sur les autres formant l'axe fibrillaire, l'espace entre chaque feuillet β vaut 4,8 Å (**Fig. 11**).

Cet agencement particulier des fibres permet l'existence d'un sillon hydrophobe formé par les chaînes latérales des peptides (**Fig. 11**) où de nombreux ligands peuvent s'insérer.[42] Ces ligands ont permis l'étude des fibres amyloïdes- β ainsi que du phénomène d'agrégation. La partie suivante exposera les différents outils qui ont permis de telles études.

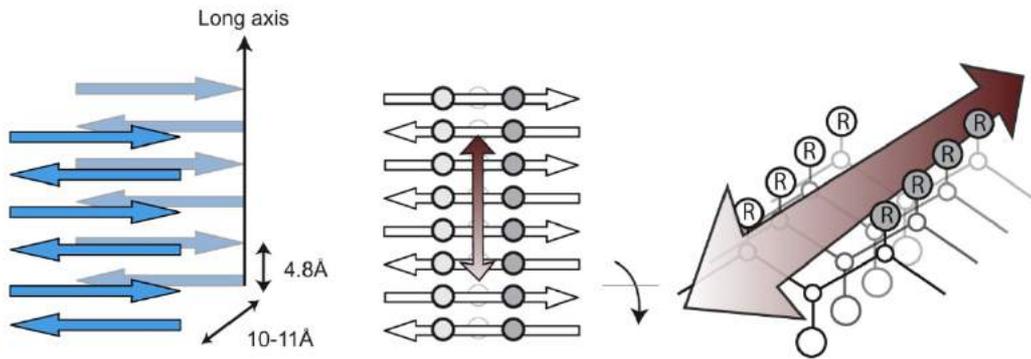


Figure 11. Structure cross- β -sheet de la fibre d'A β . La double flèche représente le sillon hydrophobe des chaînes latérales. (Biancala, 2010) [43]

IV. Outils moléculaires utilisés dans l'étude des plaques d'agrégation.

Cette partie présentera les différentes molécules produites pour l'étude du peptide A β dans la MA. Une première partie sera consacrée aux structures des molécules « historiques » avec la technique qui lui est associée. Une seconde partie sera ensuite consacrée aux différentes améliorations apportées à ces structures ainsi qu'à leur utilisation *in vitro* et *in vivo* dans l'étude de la MA.

IV.1 Les structures « historiques » et leurs techniques.

IV.1.a. Biréfringence avec le Rouge Congo

La coloration histologique des tissus fut une des premières utilisées dans l'étude des plaques amyloïdes. L'une des molécules utilisée est le Rouge Congo (CR). Elle fut synthétisée à l'origine en 1883 par Paul Bottiger travaillant pour Bayer dans le but de trouver un colorant à textile sans utiliser de mordant (un produit fixant les colorants sur les textiles). Sa structure présente un motif dimérique constitué d'azobenzènes (**Fig. 12**). Des groupements sulfonates assurent à la molécule une bonne solubilité dans l'eau (25 g/L à 20 °C), bien que celle-ci présente une tendance à s'auto-assembler par interaction π - π conduisant à une suspension colloïdale.

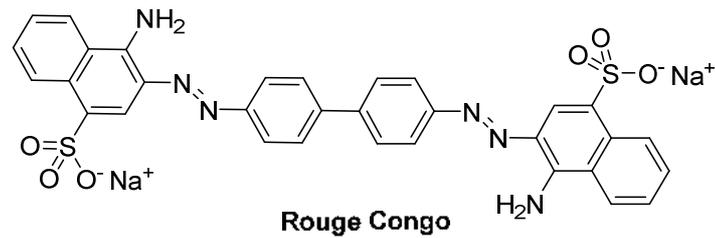


Figure 12. Structure du Rouge Congo.

La découverte de l'affinité du CR pour les fibres amyloïdes provient de sa capacité à colorer les plaques amyloïdes en rose-rouge sous lumière blanche mais surtout de posséder une biréfringence verte pomme (Fig. 13).

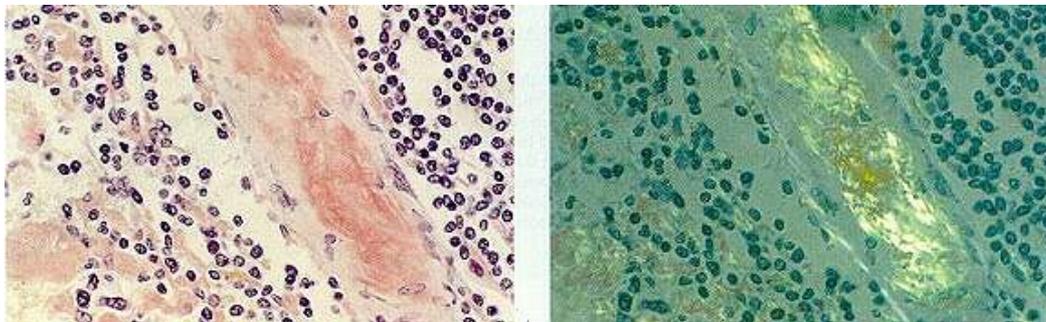


Figure 13. Plaque amyloïde coloré au CR sous lumière blanche (à gauche) et sous lumière polarisée (à droite).

Cette biréfringence est due à l'orientation du CR se positionnant parallèlement à l'axe de la fibre amyloïde au niveau du sillon formé par les chaînes latérales (Fig. 11).[44] Le CR est encore utilisé de nos jours pour le diagnostic des maladies amyloïdes systémiques par coloration d'une biopsie de l'organe dans lequel on suspecte la présence de dépôts amyloïdes. Cependant il ne peut être utilisé pour le diagnostic de la MA puisque la biopsie cérébrale est hautement risquée pour le patient, en particulier au regard de l'information qu'elle peut apporter. Ceci a conduit les chercheurs à développer des sondes ayant une structure apparentée au CR pouvant être utilisées dans d'autres techniques moins invasives. L'utilisation du CR sera limitée aux applications *in vitro* ou *ex vivo*.

IV.1.b. Les Thioflavines T et S et la fluorescence.

La fluorescence est un phénomène de luminescence d'un matériau ou d'une molécule en solution qui après avoir été excité par un photon va émettre un photon de plus faible énergie. Ce phénomène peut être expliqué à l'aide du diagramme de Jablonski (Fig. 14). En effet, l'absorption d'un photon d'énergie $h\nu_A$ par la molécule va porter celle-ci dans un état excité ($S=1$) depuis l'état fondamental ($S=0$). La molécule retourne

ensuite à l'état fondamental rapidement en 10^{-12} s en émettant un photon d'énergie $h\nu_B$ ($\nu_B < \nu_A$). La fluorescence est à différencier de la phosphorescence où la molécule depuis l'état S=1 passe à l'état triplet T=1 de manière non-radiative. Puis la molécule retourne à l'état fondamental depuis l'état triplet en émettant un photon d'énergie $h\nu_C$ avec ($\nu_C < \nu_B < \nu_A$) avec un temps beaucoup plus lent de l'ordre de 10^{-9} s.[45]

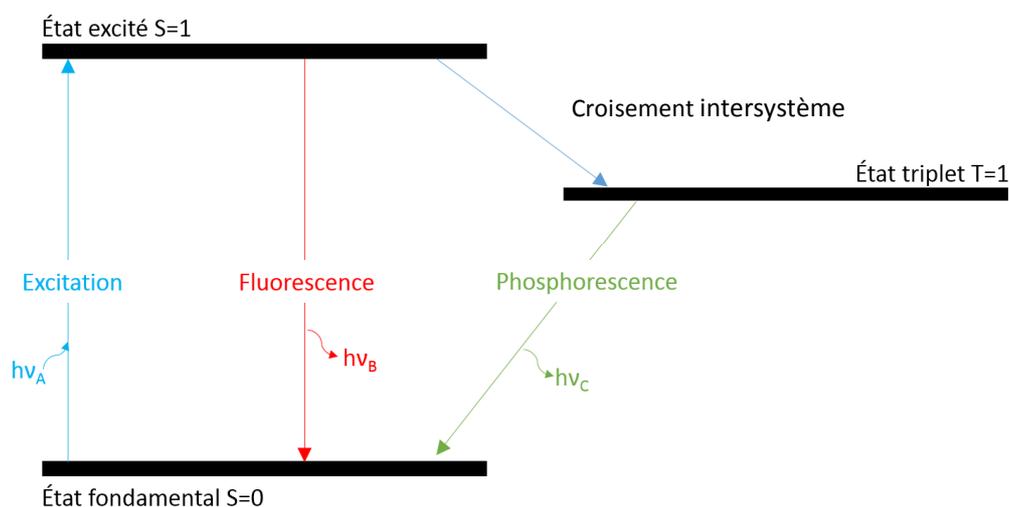


Figure 14. Diagramme de Jablonski simplifié présentant les transitions d'état de la molécule.

La fluorescence est une technique largement utilisée pour les études liées à la MA et l'hypothèse de la cascade amyloïde, en particulier celles faisant intervenir la Thioflavine T (ThT). La structure de la ThT présente un motif BzT dérivé en position 2 par une N,N-diméthylaniline et en 6 par un groupement méthyl. L'azote du cycle thiazole est méthylé donnant une charge positive permanente à la molécule (Fig.15), ceci lui permet d'être parfaitement soluble dans l'eau comparé aux BzT neutres. Une partie sera consacrée à cet aspect ultérieurement (cf. §V). Elle fut utilisée pour la détection des agrégats amyloïdes pour la première fois par Vassar et Culling en 1959.[46] La ThT est utilisée de nos jours en tant que standard dans l'étude de l'agrégation *in vitro* du peptide A β et la quantification des agrégats suite aux travaux de LeVine en 1999.[47] Il est à noter qu'il existe la Thioflavine S (Fig. 15) également utilisée dans certaines études *ex vivo* pour détecter les agrégats d'A β . [48, 49]

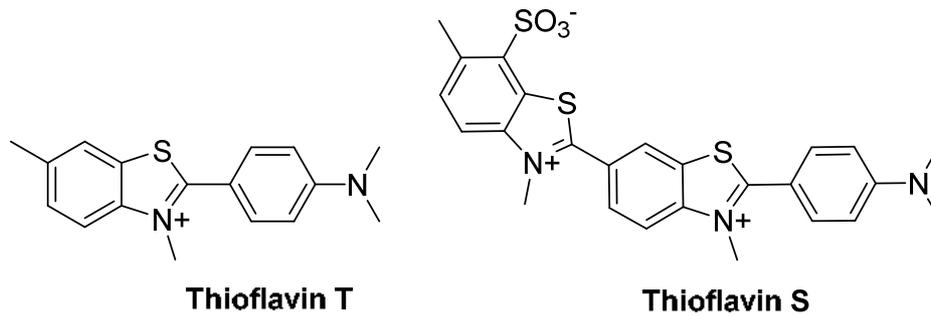


Figure 15. Structure de la Thioflavine T et de la Thioflavine S

L'utilisation de la ThT dans l'étude de l'agrégation repose sur le principe suivant :

En solution, la ThT présente une longueur d'onde d'absorption (λ_{abs}) à 412 nm en UV-Vis. Lorsque celle-ci est liée aux fibres, sa λ_{abs} se décale vers le rouge, passant à 440 nm. En fluorescence, lorsque la molécule est liée aux agrégats amyloïdes, l'excitation est à λ_{exc} de 440 nm et l'émission $\lambda_{\text{ém}}$ à 482 nm. Par ailleurs, l'intensité de fluorescence de la ThT liée est supérieure de plusieurs ordres de grandeur à celle de la ThT libre (**Fig. 16**). L'effet bathochrome en absorption et l'exaltation de l'émission sont exploités pour étudier la cinétique à laquelle l'agrégation du peptide se fait. En effet, la ThT se lie aux feuillettes β des agrégats. Ceux-ci seront très majoritairement présents au moment de la formation des protofibrilles c'est-à-dire en fin d'étape de nucléation. À partir de ce moment-là, l'élongation des fibrilles pour former les fibres se fera très rapidement, incorporant de plus en plus de ThT puisqu'il se formera de plus en plus de structures en feuillettes β jusqu'à l'agrégation complète des fibres qui se traduira par un plateau (**Fig. 16**).[50]

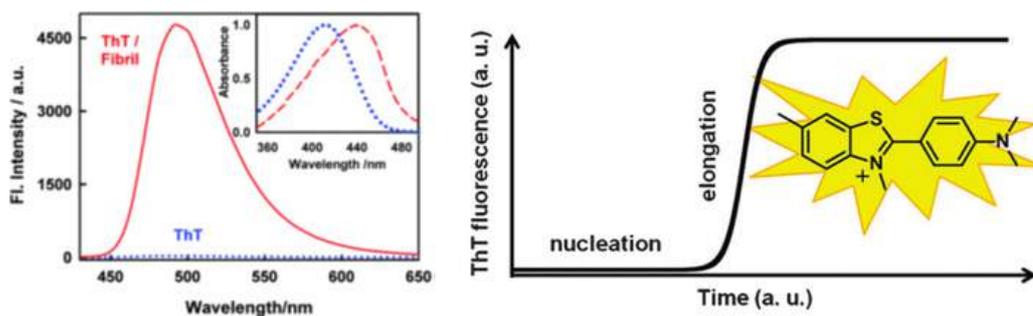


Figure 16. Spectre d'émission de la ThT (spectre d'absorption en inset) en présence et absence du peptide (à gauche) / Suivi de la agrégation de l'A β par la ThT.(Noel, 2013) [50]

Bien que véritable « gold standard » pour l'étude de l'agrégation des amyloïdes, la ThT souffre de quelques défauts. Elle ne peut être utilisée pour des applications *in vivo* en raison de : i) sa charge positive permanente lui assure une grande solubilité dans l'eau mais l'empêche de traverser la Barrière Hémato-Encéphalique

(BHE) à l'instar du CR. ii) De plus, ses longueurs d'onde d'émission et d'excitation ne sont pas assez grandes pour permettre une pénétration efficace du rayonnement dans les tissus biologiques.

Son utilisation *in vitro* présente aussi quelques biais. iii) L'exaltation de sa fluorescence sera dépendante de la nature même des fibres A β , [47] comme tout fluorophore elle souffre également d'un effet de filtre interne (IFE : inner filter effect) rendant difficile les mesures quantitatives, [51, 52] et enfin elle possède une affinité relativement limitée pour les fibres avec une constante de dissociation (K_d) de l'ordre du μM . [53]

Ces problèmes peuvent être résolus en agissant sur différents aspects : i) travailler avec des molécules neutres pour augmenter les chances de traverser la BHE, ii) utiliser des fluorophores pouvant émettre dans l'infra-rouge (IR) pour augmenter la pénétrabilité des rayonnements à travers les tissus biologiques. iii) travailler avec des molécules possédant un déplacement de Stokes (c'est-à-dire la différence entre la λ_{abs} et $\lambda_{\text{ém}}$) suffisamment grande pour limiter l'IFE. Nous verrons dans la partie consacrée à la fluorescence les différentes molécules proposées par les chercheurs pour pallier les faiblesses de la ThT.

IV.1.c. Les autres structures d'affinité pour l'A β .

Curcumine

La curcumine est une molécule naturelle provenant du curcuma traditionnellement utilisée en Inde en cuisine et médecine. C'est une molécule apparentée aux polyphénols dont la structure est assez singulière. Il s'agit de 2 noyaux phénoliques liés par une chaîne conjuguée 1,6-heptadiène-3,5-dione (Fig. 17) dont les 2 formes céto et énoles sont possibles avec une forme énoles majoritaire.

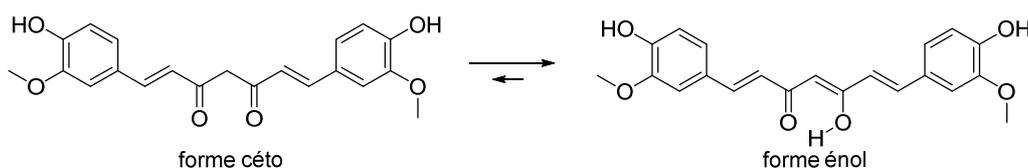


Figure 17. Structure de la curcumine.

La curcumine a démontré des affinités pour l'A β permettant l'inhibition de l'agrégation de celui-ci. [54-57] Il est également utilisé en tant que colorant des plaques pour certaines expériences *ex vivo*. [58]

Stilbène

Les stilbènes (SB), dont le membre le plus simple est le diphényléthylène (Fig. 18), ont démontré une affinité pour les agrégats A β tout comme les noyaux BzT. [59, 60] et ont été utilisés pour développer des structures

associés à une ou plusieurs techniques d'analyse des agrégats d'A β . Par ailleurs elles possèdent la propriété de s'isomériser sous l'influence de la lumière.

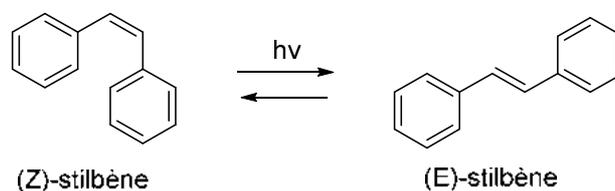


Figure 18. Isomérisation du diphényléthylène.

IV.1.d. Conclusion sur les structures de bases.

Nous avons vu ici les différentes structures d'affinité pour les agrégats d'A β . Nous pouvons constater des points communs structuraux entre les différentes molécules : elles comportent un ou plusieurs sites aromatiques qui peuvent être conjugués. Cette conjugaison permet de leur conférer un caractère relativement plan avec un cœur hydrophobe nécessaire à l'interaction avec le canal hydrophobe des fibres d'A β . La partie suivante passera en revue les différentes améliorations apportées à ces structures afin de les adapter pour les différentes techniques d'études.

IV.2. Les techniques d'études *in vitro/ex vivo*.

IV.2.a. Fluorescence

La fluorescence est l'une des techniques qui a connu le plus de développement de nouvelles molécules d'intérêt pour la MA. Simple à mettre en œuvre et peu chère comparée aux ligands radioactifs par exemple, elle fut popularisée par l'utilisation de la ThT qui a largement prédominé dans les études *in vitro* malgré les défauts qu'on lui connaît. Les efforts des chercheurs ont visé à créer de nouvelles structures de reconnaissances de l'A β possédant de propriétés fluorescentes utilisables *in vivo* c'est-à-dire avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission dans l'IR.

Le tableau ci-après présente une liste non exhaustive d'exemples de fluorophores utilisées (**Tableau 1**).

Tableau 1. Liste des principales caractéristiques de fluorescence des composés 1 à 11.

Composé	Structure analogue	λ_{exc} (nm)	$\lambda_{ém}$ (nm)	Affinité Kd (nM)	Type A β	Types d'études	Remarques	Réfs
1	curcumine	600	670 670 650	24±5,7 23±1,6 27±15,8	Monomères Oligomères A β 40/42	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	X	[61]
2	curcumine	530	585	480	Oligomères	<i>In vitro</i> <i>Ex vivo</i>	X	[62]
3	Naphtalène/CR	371	500	1,86±0,22	Agrégats A β 40	<i>In vitro</i>	Utilisable en TEP	[63]
4	Naphtalène /CR	554	619	14,5±3,9	Agrégats A β 42	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i> <i>Ex vivo</i>	X	[64]
5	Naphtalène/CR	410	540	870±280	Agrégats A β 42	<i>In vitro</i>	X	[65]
6	SB	338	680	X	X	X	X	[66]
7	SB	614	648	44,1	Agrégats A β 42	<i>In vitro</i> <i>Ex vivo</i>	X	[67]
8a	Chalcone (Fig. 22) /SB	400	532	1590±130	Agrégats A β 42	<i>In vitro</i> <i>Ex vivo</i>	X	[68]
8b	Chalcone/SB	440	554	2300±280	Agrégats A β 42	<i>In vitro</i> <i>Ex vivo</i>	X	[68]
9	Chalcone/SB	445	685	790±50	Agrégats A β 42	<i>In vitro</i> <i>Ex vivo</i>	X	[69]
10	Phénothiazine (Fig. 23)	500	670	7,5±0,4	Agrégats A β 42	<i>In vitro</i> <i>Ex vivo</i>	Peut inhiber l'agrégation. Utilisable en TEP.	[70]
11	Porphyrine	399	610	2240	Agrégats A β 40	<i>In vitro</i>	Observe la formation des fibrilles dans les cellules	[71]
12	Croconium (Fig. 23)	760	811	X	Agrégats A β 40	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i> <i>Ex vivo</i>	Utilisable en TEP et PA.	[72]

TEP : Tomographie par Emission de Positron ; PA : Photoacoustique

Fluorophores basés sur la curcumine

Des molécules basées sur la curcumine ont été utilisées. Chacune ayant subi une optimisation dans des buts différents. Par exemple, l'équipe de Ran a développé une molécule appelée le CRANAD-3 (**1**) (**Fig. 18**) dont la partie dione de la curcumine a permis d'ajouter un motif difluorure de bore similaire aux motifs BODIPY permettant d'accéder à des longueurs d'onde d'émission et d'excitation proche de l'IR.[73] Les BODIPY ont également été utilisés avec une structure proche de la curcumine par l'équipe de Chang. Dans cette molécule, le BD-Oligo (**2**), il ne subsiste de la curcumine que la partie vinylphénol à laquelle a été ajouté le motif BODIPY (**Fig.18**). Cette structure originale a permis de gagner en affinité sur les formes oligomériques avec une augmentation notable de la fluorescence par rapport aux fibres, cette sélectivité confère un avantage supplémentaire comparé à la ThT.

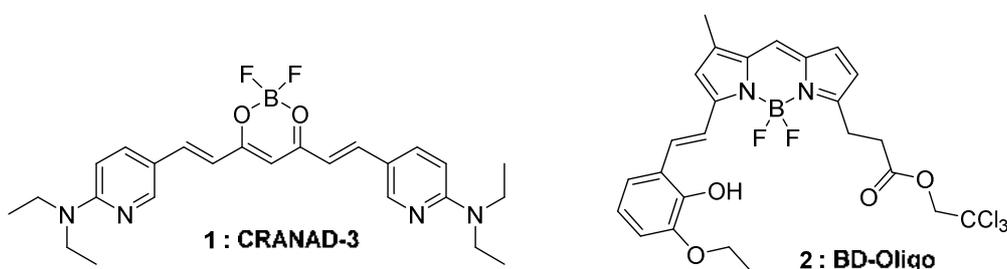


Figure 19. Structure du CRANAD-3 et du BD-Oligo.

Fluorophores basés sur le CR

Le CR étant une structure étendue, certaines molécules ont repris uniquement le caractère plan et aromatique en ne conservant par exemple que la partie naphthyle (2 cycles aromatiques fusionnés) du CR et en travaillant davantage sur les couples de fonctions donneurs et accepteurs de doublets nécessaire à la fluorescence de la molécule. Ainsi des molécules type Donneur- π -Accepteur (D- π -A) ont été élaborées comme le FDDNP (**3**) (également le premier traceur radioactif utilisé pour la Tomographie par Emission de Positron (TEP) grâce à la présence du fluor) (**Fig. 20**).[63] Cependant ses propriétés fluorescentes ($\lambda_{exc} = 371 \text{ nm}$ / $\lambda_{em} = 500 \text{ nm}$) ne sont pas très adaptées pour l'étude *in vivo*. Voilà pourquoi une autre équipe les a amélioré en ajoutant une chaîne buta-1,3-diène afin d'améliorer la composante π du système D- π -A pour donner le DANIR (**4**) permettant de déplacer vers le rouge les λ_{exc} et λ_{em} à respectivement 554 et 619 nm (**Fig. 20**).[64] Cependant les structures aromatiques comme le naphthyle ne présentent pas une solubilité idéale. Ainsi certaines structures comme l'ARCAM (**5**) de l'équipe de Shah se sont vues ajouter une chaîne polyéthylène glycol (PEG) afin de gagner en solubilité (**Fig. 20**).[65]

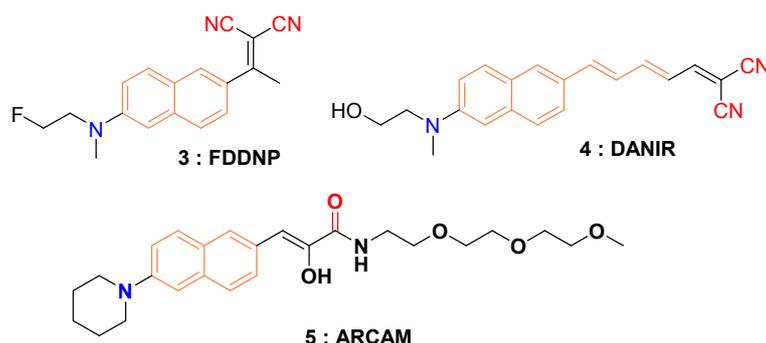


Figure 20. Dérivés CR à noyau naphthyle de structure D (bleu) – π (orange) - A (rouge). **3** : FDDNP ; **4** : DANIR et **5** : ARCAM.

Fluorophores basés sur le SB

Des molécules ont également été développées à partir du stilbène, certaines stratégies par exemples reposaient sur la conservation du motif stilbène avec l'ajout d'un fluorophore basé sur le motif BODIPY séparé par une longue chaîne PEG en guise de linker pour la solubilité (**6**) (**Fig. 21**). Ceci permettait d'avoir d'une part le motif de reconnaissance des agrégats d'A β avec le stilbène et d'autre part les propriétés de fluorescence intéressantes du motif BODIPY-like.[66] Cependant le risque d'élaborer des structures aussi grandes peut fortement limiter la traversée dans la BHE. Malheureusement, le composé **6** n'a pas été testé par la suite en condition *in vivo*. Une autre stratégie consiste à intégrer le motif de reconnaissance avec la structure fluorescente comme la molécule BAP-1 (**7**) de l'équipe d'Ono (**Fig. 21**). [67] Avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission au-delà de 600 nm, elle a pu être testée sur la détection *ex vivo* des plaques d'A β dans le cerveau de souris MA après injection intraveineuse démontrant la capacité de passage de la BHE.

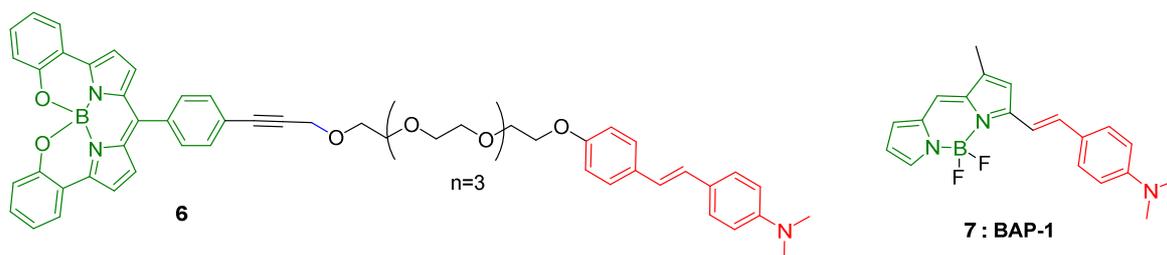


Figure 21. Structure des composés **6** et **7** : BAP-1. En vert la partie fluorescente, en rouge le motif SB affiné pour les agrégats A β .

D'autres structures intéressantes dérivées du stilbène comme les chalcones (**8a**, **8b** et **9**) ont été également utilisées pour marquer les plaques A β (**Fig. 22**). Des études ont mis en évidence une affinité pour certains sites spécifiques présents dans les agrégats amyloïdes chez l'Homme mais pas chez l'animal.[74] Tout

comme la ThT, certains dérivés présentent une augmentation importante de la fluorescence en présence des fibres.[68, 69]

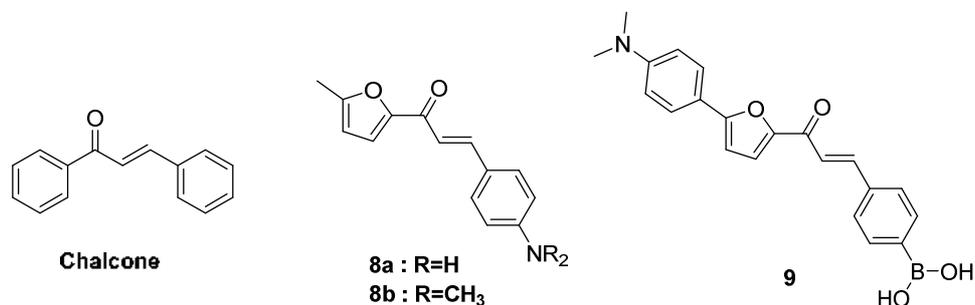


Figure 22. Structures des composés **8a**, **8b** et **9** dérivés de la chalcone.

Autres structures

Plus récemment, des structures différentes des structures historiques (CR, ThT, SB...) ont été développées afin de conférer des propriétés autres que la fluorescence par exemple comme les dérivés de phénothiazine (**10**) susceptible de d'inhiber l'agrégation dans le cerveau en plus de la détection par fluorescence (**Fig.23**).[70] Ou encore l'usage d'un motif porphyrinique, le NMM (**11**), qui permet de suivre la formation des fibres d'A β au sein même des cellules neuronales (**Fig.23**).[71] Enfin, le motif croconium avec le CDA-3 (**12**) ayant des propriétés de fluorescence idéales pour le *in vivo* ($\lambda_{exc} = 760 \text{ nm} / \lambda_{em} = 811 \text{ nm}$), qui peut être utilisé pour le PET grâce à la présence d'un fluor. Par ailleurs cette structure présente également des propriétés photoacoustiques (PA) permettant de développer de nouvelles techniques non invasives de diagnostic de la MA (**Fig.23**).[72]

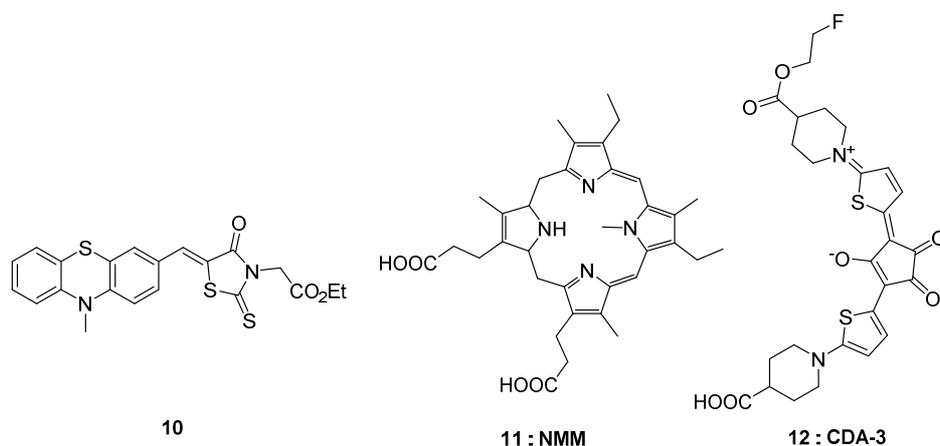


Figure 23. Structures des composés **10**, **11 : NMM** et **12 : CDA-3**.

IV.2.b. Résonance Paramagnétique Électronique (*in vitro*)

La Résonance Paramagnétique Électronique (RPE), à l'instar de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), est une technique basée sur la sensibilité magnétique des particules possédant un spin magnétique non nul et non nucléaire. Cette technique présente l'avantage d'être plus sensible que la RMN car le rapport gyromagnétique de l'électron $\gamma_e/2\pi$ est bien supérieur à celui du proton $\gamma_H/2\pi$ (respectivement 28 025 MHz.T⁻¹ et 42,5 MHz.T⁻¹). Par ailleurs, la présence d'électrons célibataires est très rare dans les milieux biologiques, ce qui permet d'obtenir un bon rapport signal/bruit.[75]

Pourtant, il n'existe à ce jour qu'une seule étude RPE impliquant un ligand ayant une affinité pour les agrégats d'A β qui a été faite par l'équipe de Yamada en 2011.[76] Ce ligand est basé un motif 2-aryl-BzT auquel un motif radical nitroxyl a été greffé soit sur la partie BzT (**13**) soit sur la partie aryle (**14**) (**Fig. 24**). Ces études ont pu mettre en évidence l'affinité de ces ligands pour les fibres d'A β par mesure du temps de corrélation rotationnel. C'est une propriété intrinsèque du radical qui change selon la viscosité du milieu, la température, et la taille de la molécule porteuse du radical. Ainsi une liaison aux agrégats de peptides change la mesure du temps de corrélation rotationnel.[77]

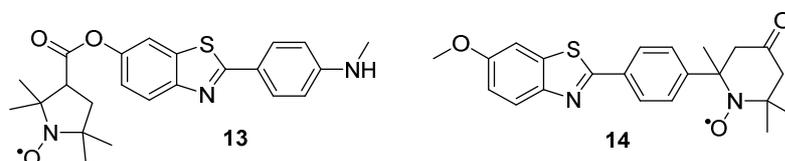


Figure 24. Structure des dérivés radical nitroxyle du benzothiazole **13** & **14**.

Ces deux structures ont été élaborées afin d'observer s'il existe des différences d'effets sur l'interaction avec l'A β par rapport à la position du radical. Il a été montré que la fluorescence du dérivé **13** ne semble pas être affectée par la présence du radical contrairement au dérivé **14**. De plus, le radical **13** semblerait inhiber l'agrégation contrairement le radical **14** qui la promeut lorsque leur concentration augmente. La même expérience avec les mêmes dérivés privés du radical montrent que les ligands n'ont aucune influence sur l'agrégation concluant sur l'influence possible du radical nitroxyle sur l'agrégation.

Il semblerait donc que le dérivé **13** soit un meilleur candidat que le dérivé **14** pour l'usage d'une sonde bimodale fluorescence/RPE.

L'apport d'un tel type de ligand permettrait également d'évaluer par différents technique de RPE pulsée (PELDOR, DEER) la distance interspin entre chaque site d'interaction des ligands des agrégats d'A β . [78] Ce qui justifie la mise point de développements synthétiques efficaces pour accéder à ce type de substrats.

IV.3 Études *in vivo*

IV.3.a. Tomographie par Émission de Positons

La TEP est une technique d'imagerie qui repose sur la capacité du noyau radioactif à émettre une particule β^+ appelée positon dont le trajet dans la matière sera relativement court. En effet β^+ étant la particule antimatière de l'électron, elle effectue avec ce dernier, une réaction d'annihilation qui génère 2 photons de même énergie (511 keV) émis dans la même direction mais en sens opposé l'un de l'autre. Ces 2 photons seront alors perçus par les capteurs dans une courte fenêtre de temps. La position de la réaction d'annihilation sera alors déterminée et tous les évènements cumulés permettent de donner l'image tridimensionnelle (**Fig. 25**).

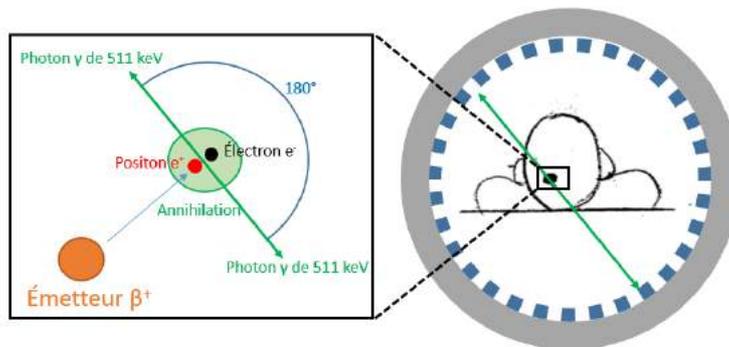


Figure 25. Schéma explicatif du principe de la TEP.

Le tableau ci-après, adapté de [79] répertorie les différents noyaux utilisés pour l'imagerie TEP (**Tableau 2**) :

Tableau 2. Propriétés des principaux noyaux radioactifs utilisés en PET.

Noyaux émetteur β^+	Temps de demi-vie $t_{1/2}$ (min)	Energie maximale du rayonnement β^+ (MeV)	Libre parcours moyen (mm)
^{11}C	20,3	0,97	4,1
^{13}N	10	1,20	5,4
^{15}O	2	1,74	8,2
^{18}F	110	0,64	2,6
^{64}Cu	762	0,66	2,7
^{68}Ga	68,1	1,94	9,0

Parmi les noyaux les plus utilisés pour l'imagerie par PET, le fluor 18 (^{18}F) dont la période radioactive est de 110 minutes et le carbone 11 (^{11}C) dont la période radioactive est d'environ 20 minutes ont eu une place prépondérante pour le marquage des petites molécules. En particulier, le FDG (^{18}F) fluorodésoxyglucose) un marqueur PET commercial, a été exploité pour tenter de mettre en évidence une dégénérescence cérébrale. En effet dans la MA, le cerveau fonctionnant moins bien, il nécessite un métabolisme de glucose bien moins important que chez la personne saine.[80] Cependant une activité en déclin du cerveau n'est pas toujours synonyme de MA. Ainsi, chez les personnes en état de dépression sévère, on note également une baisse de l'activité cérébrale.[81] C'est pour cette raison qu'il a été développé des marqueurs plus spécifiques de la MA, en l'occurrence des sondes ayant une affinité pour les plaques séniles dont une liste non exhaustive est donnée dans le tableau ci-après (**Tableau 3**).

Tableau 3. Principales propriétés des composés 15 à 21 utilisés en PET.

Composé	Structure analogue	Noyau radioactif	Réaction d'ajout	Constante dissociation (nM)	Références
15	BzT	^{11}C	$\text{S}_{\text{N}}2$	1-2	[82]
16	BzT	^{18}F	$\text{S}_{\text{N}}\text{A}$	0-7	[83, 84]
17	BzT/SB	^{18}F	$\text{S}_{\text{N}}2$	17,7	[85]
18	BzT	^{68}Ga	Chélation du métal	10,8	[86]
19	BzT	^{64}Cu	Chélation du métal	244	[87]
20	BzT	^{64}Cu	Chélation du métal	34	[87]
19	SB	^{11}C	$\text{S}_{\text{N}}2$	X	[88]
20a	SB	^{18}F	$\text{S}_{\text{N}}2$	2	[89, 90]
20b	SB	^{18}F	$\text{S}_{\text{N}}2$	2-4	[91]
21	CR	11	$\text{S}_{\text{N}}2$	27	[92]

Basé sur le motif BzT

Le premier radiotracteur en TEP créé pour la détection des plaques d'A β dans le cerveau est le composé de Pittsburgh B (PiB ; **15**), un dérivé neutre de la ThT, dont l'absence de charge permet le passage de la BHE (**Fig. 25**).^[82] Il semble se lier spécifiquement aux plaques A β ce qui augmente son accumulation dans le cerveau chez la personne atteinte de la MA et donc donne un signal plus intense en TEP au bout d'un temps donné par rapport au sujet sain (**Fig. 25**). L'ajout du noyau radioactif se fait par l'attaque du groupement NH₂ sur l'iodométhane marqué au cours d'une réaction de substitution nucléophile de type 2 (S_N2).

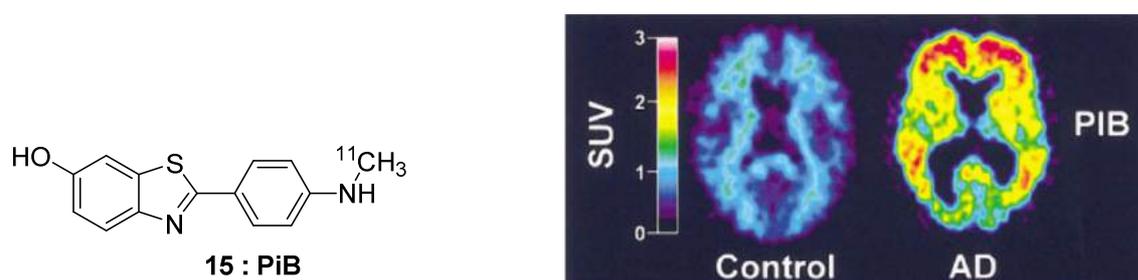


Figure 26. Structure du composé **14** : PiB (à gauche) / Comparaison d'une imagerie TEP du cerveau chez un patient sans et un patient MA après administration du PiB (à droite).

L'inconvénient est que la synthèse de ce ligand doit se faire le plus rapidement possible en raison de la faible période radioactive du ¹¹C (20 min), ce qui signifie qu'on l'on perd environ 97 % de l'activité radioactive 1h40 après la génération du ¹¹C. Le flutemetamol (**15**),^[83, 84] a ainsi été développé pour remplacer le ¹¹C par le fluor 18 (¹⁸F) qui a une période radioactive plus longue (110 min). Approuvé en 2013 pour un usage clinique, il possède la même structure que le PiB, à ceci près qu'il possède un ¹⁸F sur sa partie aryle en position ortho de la méthylamine (**Fig. 26**).

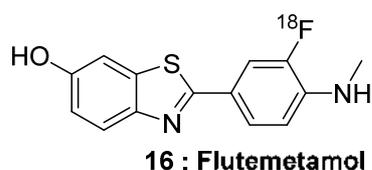


Figure 27. Structure du composé **15** : Flutemetamol.

L'introduction du fluor s'effectue donc par une substitution nucléophile aromatique (S_NAr). Cette réaction est peu favorable puisque d'une part le carbone subissant la S_NAr est en ortho du groupement NHMe et que le groupement attracteur se trouve en méta ce qui ne favorise pas la formation de l'intermédiaire de Meisenheimer. Cela signifie qu'en dépit d'une période radioactive plus longue du noyau, le temps et la difficulté de synthèse augmentent également. L'idéal est de pouvoir donc ajouter le ¹⁸F au cours d'une

réaction de S_N2 plus aisée comme c'est le cas par exemple pour le [18F]-7B (**17**) combinant le motif stilbène et le motif BzT (**Fig. 27**).[85]



Figure 28. Structure du composé **7B**.

Une autre stratégie repose également sur l'adjonction d'une structure chélatante au motif de reconnaissance de peptide (**Fig. 29**). L'équipe de Watanabe a ainsi développé un traceur composé d'un chélateur du Gallium 68 (⁶⁸Ga) ajouté à un motif 2-aryl-benzofurane (**18**).[86] L'avantage de l'emploi d'un chélateur accolé à une entité de reconnaissance est qu'il permet de changer la technique d'étude par le changement du centre métallique, par exemple le technétium 99m (^{99m}Tc) pour la Tomographie d'Emission MonoPhonotique (TEMP) (cf. §IV.2.b.) ou encore l'utilisation du Gadolinium pour l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) (cf. §IV.2.c.). Le gallium a été également remplacé par le cuivre 64 (⁶⁴Cu) pour l'imagerie TEP tout d'abord en conversant la même structure (**19**) puis en retirant les groupements acétates (**20**) ce qui a permis d'améliorer l'affinité du ligand envers l'Aβ42 (243,5 nM pour le composé **19** contre 33,7 nM pour le composé **20**).[87]

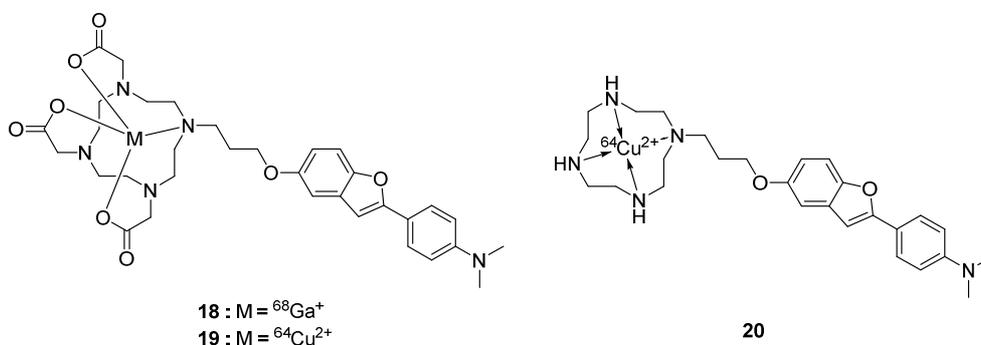


Figure 29. Structure des composés **18**, **19** et **20**.

Basé sur le motif SB

Le premier radiotracer basé sur le SB et testé en essai clinique fut le SB-13 (**21**) à partir duquel ont été développées 2 molécules utilisées en diagnostic clinique : le Florbetabir (**22a**) [89, 90] approuvé par l'Europe et les USA en 2013 pour l'usage clinique, et le Florbetaben (**22b**) (**Fig. 30**).[91] On peut remarquer

ici l'ajout d'une chaîne PEG qui permet l'ajout du ^{18}F par $\text{S}_{\text{N}}2$ mais également pour augmenter la solubilité des SB dans l'eau.

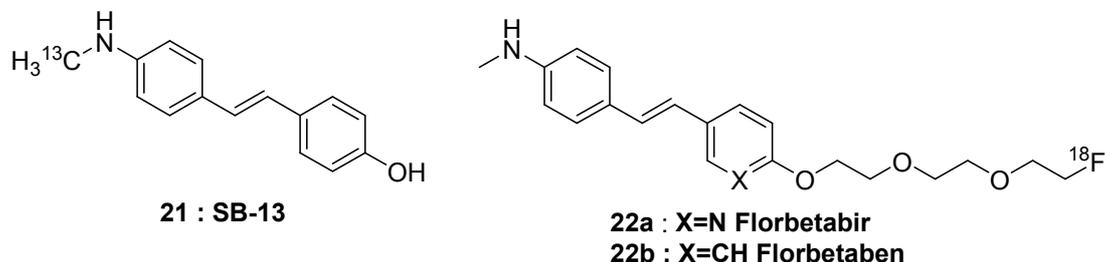


Figure 30. Structure des composés **21** : SB-3 ; **22a** : Florbetapir et **22b** : Florbetapen.

Basé sur le CR

Un dérivé du CR a également vu le jour. Il s'agit de l'X-04 (**23**) dont la structure par rapport au CR a été réduite et rendue neutre pour augmenter les chances de passage de la BHE (**Fig. 31**).^[92] Cependant le radiomarquage n'a pas un excellent rendement. En effet il y a 3 sites possibles de réaction du $^{13}\text{CH}_3\text{I}$ avec un groupement OH. Cette structure a permis tout de même la synthèse du (E,E)-1-fluoro-2,5-bis(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene (FSB) qui sera utilisée pour une technique particulière d'IRM (cf. §IV.3.c.).

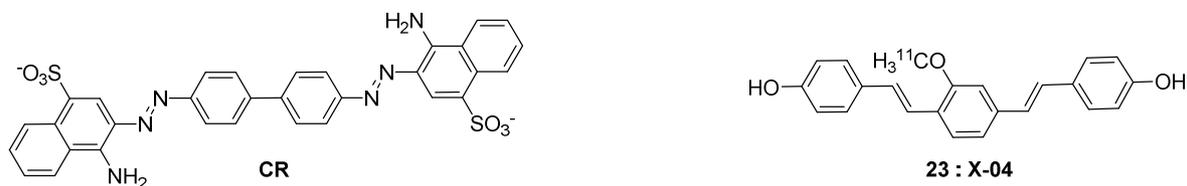


Figure 31. Structure du composé **23** : X-04 comparée à celle du CR.

IV.3.b. Tomographie par Emission Monophotonique

La TEMP, tout comme la TEP, est une technique d'imagerie reposant sur l'utilisation des traceurs radioactifs. Ici, les isotopes sont des émetteurs de particules γ , des photons de haute énergie. L'acquisition de l'image se fait grâce à une γ -caméra qui tourne autour du patient afin de capter les photons γ . On peut ainsi reconstruire une image en 3D de l'organe et de son métabolisme. Les émetteurs de particules γ traditionnellement utilisés sont le technétium 99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) qui a une période radioactive de 6 heures, et l'iode 123 (^{123}I) dont la période radioactive est de 13,2 heures (**Tableau 4**). Il est à noter que pour les tests en laboratoire l'iode 125 (^{125}I) sera préféré en raison de son temps de demi-vie plus long qui est de 59 jours.

Tableau 4. Noyaux radioactifs utilisés en TEMP.

Noyaux émetteur γ	Temps de demi-vie $t_{1/2}$ (h)	Energie du rayonnement (keV)
^{99m}Tc	6	140
^{123}I	13,2	159

Le tableau suivant présente une liste non exhaustive de structures élaborées en vue d'une utilisation en TEMP (Tableau 5).

Tableau 5. Liste des principales propriétés des composés 24 à 28.

Composé	Structure analogue	Noyau radioactif	Réaction d'ajout	Affinité (nM)	Type d'agrégats	Références
24a	BzT	^{125}I	$\text{S}_{\text{N}}\text{A}$	0,9±0,2	Agrégats d'A β 40	[93]
24b	BzT	^{125}I	$\text{S}_{\text{N}}\text{A}$	0,8±0,2	Agrégats d'A β 40	[93]
25	BzT	^{125}I	$\text{S}_{\text{N}}\text{A}$	15±5	Agrégats d'A β 40	[94]
26	BzT	^{99m}Tc	chélation	X	Agrégats d'A β	[95]
27	BzT	^{99m}Tc	chélation	X	Agrégats d'A β	[96]
28	CR	^{99m}Tc	chélation	630	Fibrilles A β 40	[97]
29	CR	^{99m}Tc	chélation	160	Fibrilles A β 40	[97]
30	CR	^{99m}Tc	chélation	X	Agrégats d'A β	[98]

Basé sur le BzT

L'iode a été ajouté dans un cycle aromatique par une iododéstanylation avec I^+ sur des dérivés stanneux de molécules basées sur le motif 2-aryl-BZT comme le TZDM (**24a**), ou basées sur le motif 2-aryl-benzoxazole comme l'IBOX (**24b**) (Fig. 32).[93] Le remplacement du soufre par l'oxygène a permis une entrée plus rapide dans le cerveau mais un temps de lavage plus lent. Un autre dérivé de la BzT, le 2-arylbenzodiazole comme l'IMPY (**25**) a été utilisé en guise traceur radioactif (Fig. 32). Ce motif particulier présente bien une bonne affinité pour le peptide A β mais qui demeure moindre par rapport au motif BzT.[94]

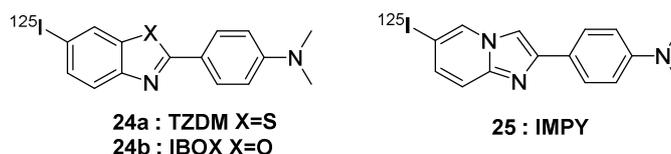


Figure 32. Structure des composés **24a** : TZDM, **24b** : IBOX, **25** : IMPY.

L'élaboration d'une structure chélatante accolée au motif BzT a également été produite. Il s'agit d'un chélateur du $^{99\text{m}}\text{Tc}$. La structure chélatante a été accolée en position 2 (**26**) ou en position 6 du 2-aryl-BzT (**27**) (**Fig. 33**). Il s'avère que le composé **26** est incapable de traverser la BHE à cause de son instabilité métabolique qui le transforme en composé polaire.[95] Le composé **27** quant à lui est capable de pénétrer la BHE.[96] Ces observations suggèrent que la position 6 du BzT est à privilégier davantage que la position 2 en vue d'une modification ultérieure.

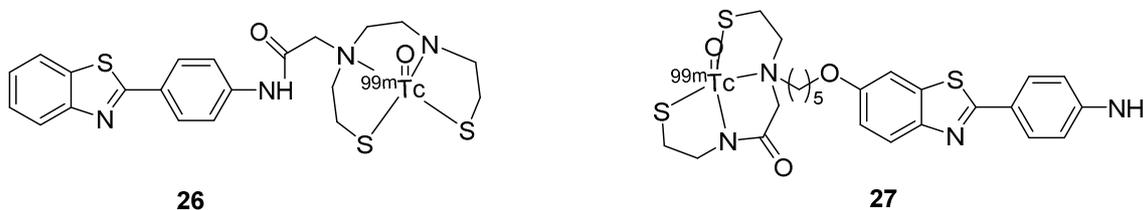


Figure 33. Structure des composés **26** et **27**.

Basé sur le CR

Des sondes basées sur le CR ont également été mises au point avec l'utilisation d'un chélateur du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ intégré à la structure (**Fig. 34**). Celui-ci peut par exemple être intégré à la structure de reconnaissance des agrégats d'A β basée sur le CR (**28** ; **29**).[97] Cependant l'affinité de ces dérivés n'est pas élevée par rapport à d'autres molécules ($K_d = 630 \text{ nM}$ et 160 nM respectivement). De plus leur capacité à traverser la BHE n'a pas été démontrée. Une autre version du composé **29** a été synthétisée dans laquelle la structure chélatante est ajoutée à la structure par l'intermédiaire d'une liaison amide au lieu d'être intégrée (**30**), elle échoue cependant à passer la BHE en raison de son haut poids moléculaire.[98]

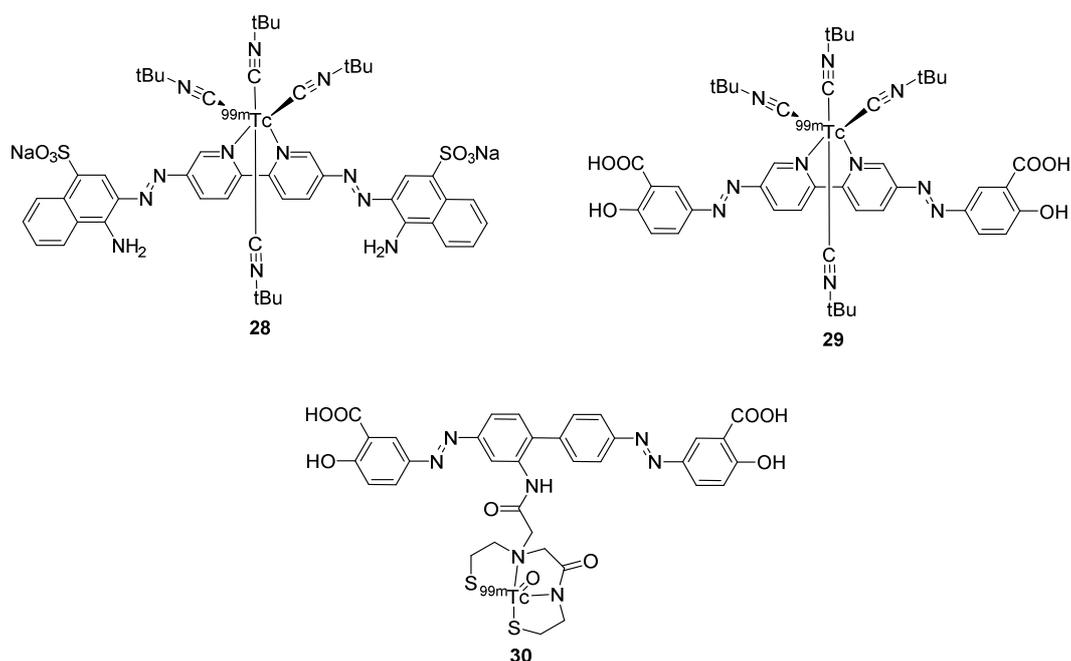


Figure 34. Structures des composés **28,29** et **30**.

IV.3.c. Imagerie par Résonance Magnétique

L'IRM est une technique d'imagerie basée sur la propriété des noyaux qui possèdent un spin magnétique sensible aux variations de champ magnétique. Dans le corps, ce sont les protons de l'eau des tissus qui seront les noyaux magnétiques utilisés. Tout comme dans la RMN utilisée en chimie analytique, le spin magnétique du proton sera aligné avec celui de l'appareil qui génère un champ magnétique fort. Ensuite, des champs magnétiques oscillants sont appliqués pour modifier légèrement cet alignement de spin lors du phénomène de précession. A l'arrêt des champs magnétiques oscillants, les spins retournent à leur alignement d'origine au bout d'un temps donné qui sera mesuré par l'appareil pour générer l'image. En créant un gradient de champs magnétiques oscillants, cela permet d'avoir accès à l'ensemble des tissus du corps.

Actuellement, cette technique est utilisée dans le diagnostic de la MA pour vérifier la diminution volumétrique de l'hippocampe, [99, 100] ou encore l'atrophie cérébrale globale. La détection spécifique des agrégats d'A β par IRM fait actuellement l'objet de recherches.

Basé sur le motif BzT

Quelques sondes IRM formées, à partir du PiB auquel un complexe de gadolinium Gd(III) a été greffé, ont été conçues (**31a**, **31b**, **31c**) (**Fig. 35**).^[101-103] En IRM, les complexes de Gd(III) servent d'agents de contraste pour améliorer le signal en IRM. Couplés aux 2-aryl-BzT, ils permettent d'augmenter le contraste spécifiquement aux lieux de dépôts des agrégats d'A β . Cependant, ces complexes de Gd échouent à passer la BHE en quantité suffisante pour être détectés par IRM. En effet la stabilisation du Gd(III) requiert un grand nombre de fonctions chélatantes, en particulier de ligands ioniques, rendant le complexe plus hydrophile. De plus la masse de ces 3 molécules approche les 1000 Da ce qui est trop haut pour traverser efficacement la BHE par diffusion passive selon les règles de Lipinski (cf. V).

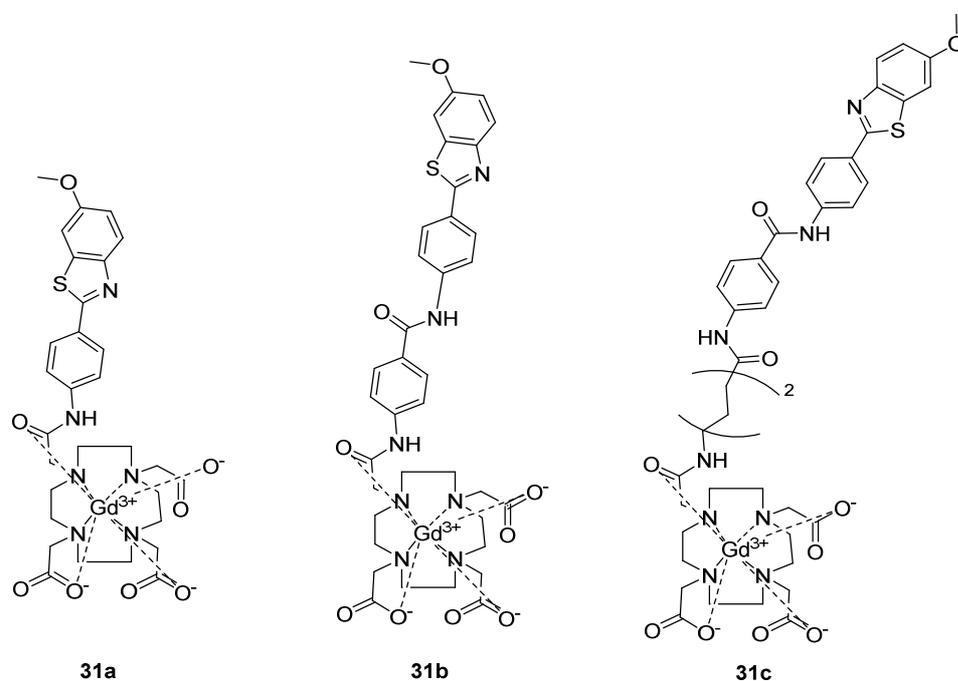


Figure 35. Structure des composés **31a**, **31b** et **31c**.

Basé sur le CR

Un autre type de sonde IRM a été développé autour du motif du CR pour donner le FSB (**Fig. 36**).^[104] Des tests chez la souris transgénique ont permis de démontrer que cette molécule est capable de traverser la BHE, et de se lier de manière spécifique aux plaques d'A β .

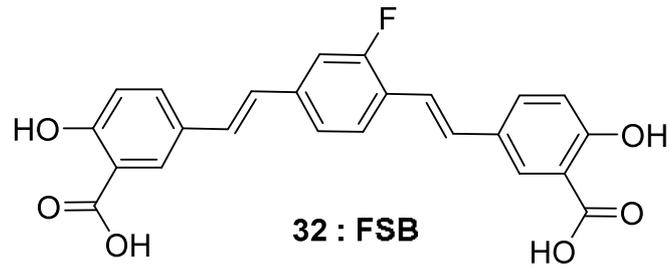


Figure 36. Structure du composé 32 : FSB.

L'intérêt de ce type d'approche est d'utiliser le signal proton de l'eau pour obtenir la structure du cerveau et le signal IRM du ^{19}F afin de localiser les plaques d'A β . [105] La comparaison d'une coupe de cerveau par IRM avec la même coupe de cerveau, à laquelle des anticorps anti-A β ont été ajoutés, pour faire de l'immunohistofluorescence nous montre des localisations proches entre le signal du ^{19}F par IRM et la présence de plaque d'A β (Fig. 33). De plus, ce type de technique permet d'éviter l'emploi de complexes à base de Gd(III) connus pour être néphrotoxiques chez les personnes atteinte d'insuffisance rénale sévère. [106]

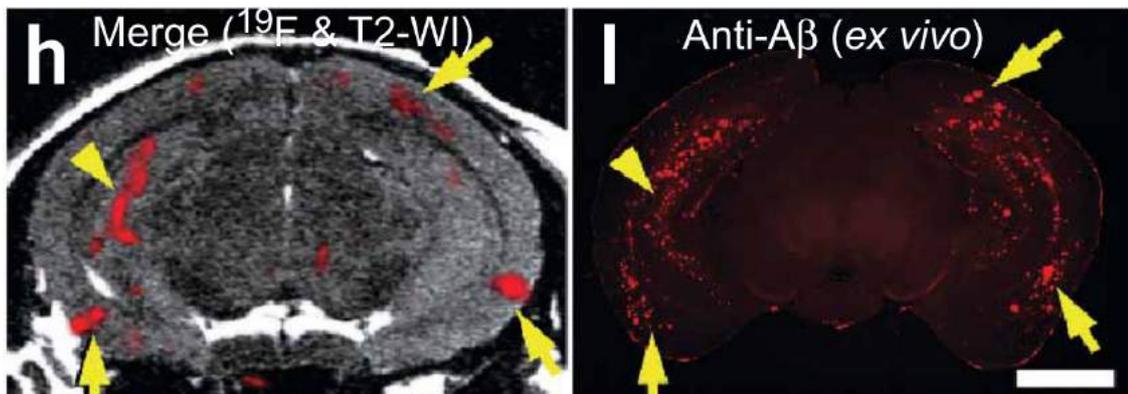


Figure 37 Comparaison de l'IRM du fluor et celui du marquage d'A β par immunofluorescence [105] (Higuchi, 2005)

IV.4 Conclusion sur les techniques

Nous avons jusqu'ici passé en revue les différentes techniques in vitro et in vivo permettant d'étudier la MA. Chacune présente des avantages et des défauts qui sont présentés dans le tableau ci-après (Tableau 6).

Tableau 6. Avantages et inconvénients des différentes techniques, d'après [107] [108]

Techniques	Avantages	Inconvénients
Fluorescence	<ul style="list-style-type: none"> - Faible concentration : nM - Plutôt bon marché et accessible - Plutôt Sensible - Grande stabilité temporelle - Spécifique de l'interaction donc plutôt résolutive 	<ul style="list-style-type: none"> - Equipement pour le NIRF peu répandu - Rayonnement peu pénétrant (< 1 cm) - Phénomène de background corporel
RPE	<ul style="list-style-type: none"> - Sensible - Permet des cartographies très précises de site d'interaction. 	<ul style="list-style-type: none"> - Concentration moyenne d'utilisation : μM - Très peu/Pas d'application clinique
PET	<ul style="list-style-type: none"> - Très faible concentration : pM - nM - Plutôt résolutive (5-7 mm) - Rayonnement très pénétrant 	<ul style="list-style-type: none"> - Très chère - Irradiation - Moins répandue que la TEMP
TEMP	<ul style="list-style-type: none"> - Très faible concentration : pM – nM - Rayonnement très pénétrant 	<ul style="list-style-type: none"> - Plutôt chère - Irradiation sur longue durée - Moins résolutive que TEP (10 mm)
IRM	<ul style="list-style-type: none"> - Non radioactive - Permet d'accéder aux structures du corps humain entier - Extrêmement résolutive 	<ul style="list-style-type: none"> - Concentration élevée : μM – mM - Peu sensible - Gd peut être toxique - Très chère

Chaque technique peut ainsi compléter les faiblesses des autres. Par exemple, la fluorescence est très peu pénétrante contrairement à la TEP mais elle est bien plus spécifique et sa durée de vie est virtuellement infinie si elle est bien conservée. L'IRM permet d'avoir accès aux structures du corps entier mais est limitée par son manque de sensibilité pour la détection des liaisons. Cela peut être compensé par l'utilisation d'un traceur radioactif. C'est ainsi que la recherche médicale s'intéresse de plus en plus aux sondes multimodales. Elles permettent à partir d'une seule molécule d'effectuer plusieurs examens, parfois simultanément. Cela permet d'avoir les informations souhaitées en un temps plus court ce qui est un avantage pour le patient qui attend moins longtemps, et également pour la santé publique qui profite au long terme d'une économie d'argent.

V. Le motif Benzothiazole

Les parties précédentes ont permis de passer en revue les différents types de structures existantes démontrant une affinité pour les agrégats d'A β . Dans le cadre de ce projet, nous avons porté notre choix sur le motif 2-aryl-benzothiazole. Ce choix a été motivé par le fait que ces dérivés présentent globalement des constantes de dissociation ou d'inhibition de l'ordre du nanomolaire dans la littérature démontrant une affinité appropriée. Par ailleurs, le motif benzothiazole est une base moléculaire extrêmement étudiée ayant une grande quantité d'applications dans le domaine de la santé. Il peut être utilisé comme antimicrobien, anticonvulsivant, antidiabétique par exemple. [50, 109]

Les travaux de Klunk [110, 111] ont mis en évidence que la charge positive permanente de la ThT lui était défavorable pour l'utilisation *in vivo* puisqu'elle ne peut traverser la BHE. L'utilisation du dérivé neutre permet d'améliorer grandement le caractère lipophile, le dérivé 6-Me-BTA-1 présente un coefficient de partage octanol/eau ($P_{\text{oct/eau}}$) 600 fois supérieur par rapport à la ThT ($P_{\text{ThT}} = 3,71 \ll P_{\text{BTA-1}} = 2290$), assurant ainsi sa meilleure capacité à pénétrer la BHE (Fig. 38).

Le coefficient de partage fait partie de l'un des critères retenus par Lipinski dans ses célèbres « règle des cinq » (RO5 = rule of five) [112, 113]. Ces RO5, élaborées en 1997, permettent de prédire si une molécule possède les propriétés physico-chimiques nécessaires pour une administration orale ; c'est-à-dire suffisamment soluble pour circuler dans la lumière du tube digestif et suffisamment lipophile pour être absorbé par le système digestif. Cette approche heuristique permet d'augmenter les chances de succès qu'une molécule pharmaceutique puisse être mise sur le marché.

Voici les règles telles qu'énoncées à l'origine, la molécule devra comporter :

- Un maximum de 5 donneurs de liaison d'hydrogène
- Un maximum de 10 accepteurs de liaison d'hydrogène
- Une masse molaire inférieure à 500 daltons
- Un Log P inférieur à 5

Bien entendu ces règles peuvent également être utilisées afin de développer des molécules utilisables *in vivo* pour le diagnostic par exemple. Par contre, il ne s'agit pas de règles absolues, il existe beaucoup d'exceptions aux règles de Lipinski.

Des mesures de pKa par RMN ^1H ont évalué un seul pKa aux alentours de 2,0 pour le dérivé 6-Me-BTA-0 au niveau de l'azote en position 4', démontrant sa neutralité à pH physiologique (Fig. 38). La variation du

nombre de groupements méthyle liés sur ce même azote joue également sur son affinité avec les agrégats d'Aβ40. Ainsi, il a été démontré que le 6-Me-BTA-1 possède l'affinité la plus grande envers les agrégats d'Aβ40 ($K_i = 20,2 \pm 3,0$ nM) par rapport au 6-Me-BTA-0/2 (BTA-0 : $30,3 \pm 5,9$ nM et BTA-2 = 143 ± 19 nM). [110, 111, 114]

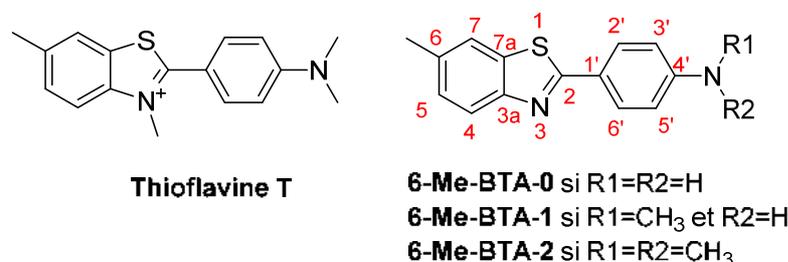


Figure 38 Structures des différents dérivés non-chargés de la ThT.

Cependant, le fait de vouloir rendre la molécule la plus hydrophobe possible limite, *de facto*, sa solubilité dans l'eau. Une molécule hydrophobe s'accumule bien dans les tissus adipeux et se lie à certaines protéines sériques, ce qui limite donc son élimination. Elle peut aussi précipiter dans la circulation sanguine. Cette mauvaise solubilité est compensée par l'ajout de DMSO dans l'eau pour l'améliorer. Ceci est généralement suffisant pour les études *in vitro/ex vivo* où les systèmes d'études (solvant utilisé, température, tampon, sels, etc.) sont généralement maîtrisés. Par contre cette solution est moins applicable pour les études cliniques où la limitation de produit injecté au patient est à prendre en compte.

VI. Conclusion et projet de recherche

À travers ces rappels bibliographiques nous avons pu constater que la MA reste un sujet soulevant encore de nos jours beaucoup de questions quant à son étiologie et ses mécanismes d'action. Les outils moléculaires d'études de la MA sont nombreux et chaque technique associée à ces molécules a ses propres avantages et inconvénient. La détection des formes précoces de l'Aβ reste un enjeu scientifique majeur.

Ainsi, dans le cadre de nos travaux de thèse, nous avons pour but de synthétiser différents motifs 2-aryl-BzT afin de les utiliser dans différentes techniques pour permettre un suivi de l'agrégation du peptide Aβ ainsi que l'étude du site d'interaction entre les fibres et le ligand.

Nous avons donc dans un premier temps élaboré différents dérivés des 2-aryl-BzT dont la fonction chimique en position 6 est variable. Parmi ces dérivés, on propose la NMA (**Fig. 39**) : un dérivé neutre de la ThT comportant une fonction amine secondaire : ceci permet d'avoir un proton « labile » conférant à la molécule une charge positive. Cependant en raison de l'équilibre pKa, une fraction de la molécule pourrait être neutre

et donc susceptible de traverser la BHE. Cette molécule pourrait constituer un nouvel outil pouvant être utilisé à la fois en étude *in vitro* et *in vivo*. En raison de ses propriétés uniques nous espérons une affinité pour les fibres A β mais également une affinité étendue aux agrégats précoces tels que les oligomères par exemple.

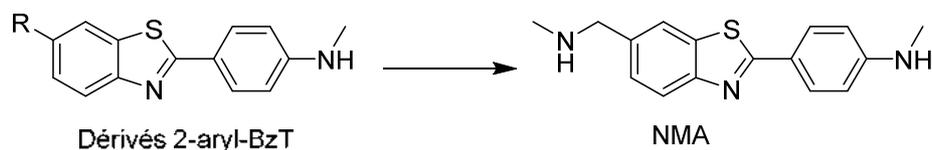


Figure 39. Structure commune des 2-aryl-BzT et structure de la NMA.

Dans un deuxième temps, on présentera la fonctionnalisation de ces dérivés 2-aryl-BzT permettant de leur attribuer des fonctions chimiques spécifiques pouvant être utilisées dans différentes techniques. On présentera ainsi la synthèse des ligands suivants : Fc-BTA utilisé en électrochimie grâce au ferrocène, TEMPO-BTA utilisé en RMN et RPE grâce au radical nitroxyl paramagnétique et DA-BTA utilisé en spectroscopie de masse grâce à la fonction diazirine (**Fig. 40**).

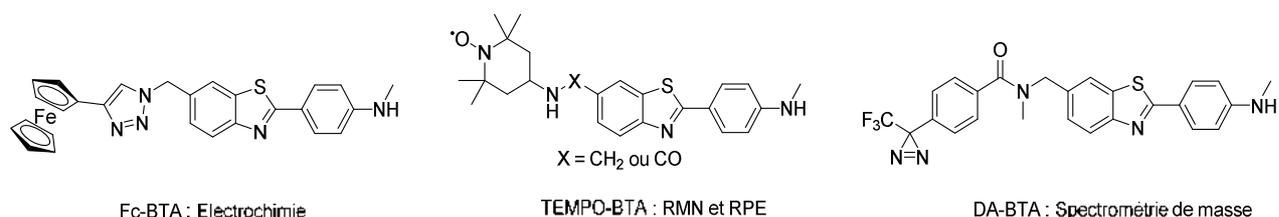


Figure 40. Structure du Fc-BTA, TEMPO-BTA et DA-BTA sondes des agrégats d'A β utilisables respectivement en électrochimie, RPE/RMN et spectrométrie de masse.

Dans un dernier temps, on présentera les résultats préliminaires de l'utilisation de chacun de ces 4 ligands dans leur technique associée. Les études par fluorescence, électrochimie et RPE permettront des études sur l'agrégation du peptide A β , la spectrométrie de masse et la RMN permettront une première approche de la caractérisation du site d'interaction entre le 2-aryl-BzT et le peptide agrégé.

Bibliographie du Chapitre I.

1. Sipe, J.D., et al., *Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines*. Amyloid, 2016. **23**(4): p. 209-213.
2. Cooper, G.J., et al., *Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(23): p. 8628-32.
3. Lutz, T.A., *The role of amylin in the control of energy homeostasis*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **298**(6): p. R1475-84.
4. Butler, P.C., et al., *Effects of meal ingestion on plasma amylin concentration in NIDDM and nondiabetic humans*. Diabetes, 1990. **39**(6): p. 752-6.
5. Sanke, T., et al., *Plasma islet amyloid polypeptide (Amylin) levels and their responses to oral glucose in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients*. Diabetologia, 1991. **34**(2): p. 129-32.
6. Janson, J., et al., *The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles*. Diabetes, 1999. **48**(3): p. 491-498.
7. Opie, E.L., *The Relation Of Diabetes Mellitus to Lesions of the Pancreas. Hyaline Degeneration of the Islands Of Langerhans*. J Exp Med, 1901. **5**(5): p. 527-40.
8. Spillantini, M.G., et al., *Alpha-synuclein in Lewy bodies*. Nature, 1997. **388**(6645): p. 839-40.
9. Bartels, T., J.G. Choi, and D.J. Selkoe, *α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation*. Nature, 2011. **477**(7362): p. 107-110.
10. Desplats, P., et al., *Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(31): p. 13010-5.
11. Goedert, M., *Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(7): p. 492-501.
12. Serrano-Pozo, A., et al., *Neuropathological alterations in Alzheimer disease*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. **1**(1): p. a006189.
13. Seeman, P. and N. Seeman, *Alzheimer's disease: β -amyloid plaque formation in human brain*. Synapse, 2011. **65**(12): p. 1289-1297.
14. Alzheimer, A., *Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtlich Medizin, 1907. **64**(1-2): p. 3.
15. Alzheimer, A., et al., *An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde"*. Clin Anat, 1995. **8**(6): p. 429-31.
16. *Alzheimer's Disease*. 2nd ed. ed. 2017: Oxford Neurology Library. 144.
17. Prince, M., et al., *World Alzheimer Report 2016*. 2016, Alzheimer's Disease International.
18. *American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder*. Fifth Edition ed. 2013: American Psychiatric Association.
19. Dubois, B., et al., *Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria*. The Lancet Neurology, 2014. **13**(6): p. 614-629.
20. Soto-Rojas, L.O., et al., *Neuroinflammation and Alteration of the Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease*, in *Alzheimer's Disease - Challenges for the Future*, I. Zerr, Editor. 2015, InTech: Rijeka. p. Ch. 03.
21. Mattson, M.P., *Pathways towards and away from Alzheimer's disease*. Nature, 2004. **430**(7000): p. 631-9.

22. Grundke-Iqbal, I., et al., *Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(13): p. 4913-7.
23. Sastre, M., T. Klockgether, and M.T. Heneka, *Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms*. Int J Dev Neurosci, 2006. **24**(2-3): p. 167-76.
24. Holtzman, D.M., J.C. Morris, and A.M. Goate, *Alzheimer's disease: the challenge of the second century*. Sci Transl Med, 2011. **3**(77): p. 77sr1.
25. Mori, H., et al., *Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer's disease*. J Biol Chem, 1992. **267**(24): p. 17082-6.
26. Priller, C., et al., *Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein*. J Neurosci, 2006. **26**(27): p. 7212-21.
27. Turner, P.R., et al., *Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory*. Progress in Neurobiology, 2003. **70**(1): p. 1-32.
28. Duce, J.A., et al., *Iron-export ferroxidase activity of beta-amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease*. Cell, 2010. **142**(6): p. 857-67.
29. O'Brien, R.J. and P.C. Wong, *Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease*. Annu Rev Neurosci, 2011. **34**: p. 185-204.
30. Han, W., et al., *Peptide p3 may play a neuroprotective role in the brain*. Med Hypotheses, 2011. **76**(4): p. 543-6.
31. Wei, W., et al., *Abeta 17-42 in Alzheimer's disease activates JNK and caspase-8 leading to neuronal apoptosis*. Brain, 2002. **125**(Pt 9): p. 2036-43.
32. Slomnicki, L.P. and W. Lesniak, *A putative role of the Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain (AICD) in transcription*. Acta Neurobiol Exp (Wars), 2008. **68**(2): p. 219-28.
33. Haass, C., et al., *Amyloid Beta-Peptide Is Produced by Cultured-Cells during Normal Metabolism*. Nature, 1992. **359**(6393): p. 322-325.
34. Saido, T. and M.A. Leissring, *Proteolytic degradation of amyloid beta-protein*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(6): p. a006379.
35. Hardy, J.A. and G.A. Higgins, *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis*. Science, 1992. **256**(5054): p. 184-5.
36. Graham, W.V., A. Bonito-Oliva, and T.P. Sakmar, *Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies*. Annu Rev Med, 2017. **68**: p. 413-430.
37. Lambert, M.P., et al., *Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Aβ1–42 are potent central nervous system neurotoxins*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(11): p. 6448-6453.
38. Hartley, D.M., et al., *Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons*. J Neurosci, 1999. **19**(20): p. 8876-84.
39. Klein, W., *Targeting small Aβ oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?* Trends in Neurosciences, 2001. **24**(4): p. 219-224.
40. Murray, B., B. Sharma, and G. Belfort, *N-Terminal Hypothesis for Alzheimer's Disease*. ACS Chem Neurosci, 2017. **8**(3): p. 432-434.
41. Sunde, M. and C. Blake, *The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction*. Adv Protein Chem, 1997. **50**: p. 123-59.
42. Reinke, A.A. and J.E. Gestwicki, *Insight into amyloid structure using chemical probes*. Chem Biol Drug Des, 2011. **77**(6): p. 399-411.
43. Biancalana, M. and S. Koide, *Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(7): p. 1405-12.

44. Howie, A.J. and D.B. Brewer, *Optical properties of amyloid stained by Congo red: history and mechanisms*. Micron, 2009. **40**(3): p. 285-301.
45. Lakowicz, J., R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd edition ed. 2006, University of Maryland School of Medicine: Springer.
46. Vassar, P.S. and C.F. Culling, *Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues*. Arch Pathol, 1959. **68**: p. 487-98.
47. LeVine, H., [18] *Quantification of β -sheet amyloid fibril structures with thioflavin T*. Methods in Enzymology, 1999. **309**: p. 274-284.
48. Kelenyi, G., *Thioflavin S fluorescent and Congo red anisotropic stainings in the histologic demonstration of amyloid*. Acta Neuropathol, 1967. **7**(4): p. 336-48.
49. Vallet, P.G., et al., *A comparative study of histological and immunohistochemical methods for neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol, 1992. **83**(2): p. 170-8.
50. Noel, S., et al., *The benzazole scaffold: a SWAT to combat Alzheimer's disease*. Chem Soc Rev, 2013. **42**(19): p. 7747-62.
51. Fonin, A.V., et al., *Fluorescence of dyes in solutions with high absorbance. Inner filter effect correction*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e103878.
52. Sulatskaya, A.I., et al., *Thioflavin T fluoresces as excimer in highly concentrated aqueous solutions and as monomer being incorporated in amyloid fibrils*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 2146.
53. Groenning, M., *Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status*. J Chem Biol, 2010. **3**(1): p. 1-18.
54. Kim, H., et al., *Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of beta-amyloid*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(22): p. 8537-41.
55. Yang, F., et al., *Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo*. J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 5892-901.
56. Ono, K., et al., *Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro*. J Neurosci Res, 2004. **75**(6): p. 742-50.
57. Yanagisawa, D., et al., *Curcuminoid binds to amyloid-beta1-42 oligomer and fibril*. J Alzheimers Dis, 2011. **24 Suppl 2**: p. 33-42.
58. Koronyo-Hamaoui, M., et al., *Identification of amyloid plaques in retinas from Alzheimer's patients and noninvasive in vivo optical imaging of retinal plaques in a mouse model*. Neuroimage, 2011. **54 Suppl 1**: p. S204-17.
59. Kung, H.F., et al., *Novel stilbenes as probes for amyloid plaques*. Journal of the American Chemical Society, 2001. **123**(50): p. 12740-12741.
60. Braymer, J.J., et al., *Development of bifunctional stilbene derivatives for targeting and modulating metal-amyloid-beta species*. Inorg Chem, 2011. **50**(21): p. 10724-34.
61. Zhang, X., et al., *Near-infrared fluorescence molecular imaging of amyloid beta species and monitoring therapy in animal models of Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(31): p. 9734-9.
62. Teoh, C.L., et al., *Chemical Fluorescent Probe for Detection of Abeta Oligomers*. J Am Chem Soc, 2015. **137**(42): p. 13503-9.
63. Agdeppa, E.D., et al., *Binding characteristics of radiofluorinated 6-dialkylamino-2-naphthylethylidene derivatives as positron emission tomography imaging probes for beta-amyloid plaques in Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2001. **21**(24): p. Rc189.
64. Fu, H., et al., *Amyloid-beta Deposits Target Efficient Near-Infrared Fluorescent Probes: Synthesis, in Vitro Evaluation, and in Vivo Imaging*. Anal Chem, 2016. **88**(3): p. 1944-50.

65. Guan, Y., et al., *Real-Time Monitoring of Alzheimer's-Related Amyloid Aggregation via Probe Enhancement-Fluorescence Correlation Spectroscopy*. ACS Chemical Neuroscience, 2015. **6**(9): p. 1503-1508.
66. Parhi, A.K., et al., *Synthesis of Fluorescent Probes based on Stilbenes and Diphenylacetylenes targeting β -Amyloid Plaques*. Tetrahedron letters, 2008. **49**(12): p. 3395-3399.
67. Ono, M., et al., *BODIPY-based molecular probe for imaging of cerebral beta-amyloid plaques*. ACS Chem Neurosci, 2012. **3**(4): p. 319-24.
68. Jung, S.J., et al., *Development of fluorescent probes that bind and stain amyloid plaques in Alzheimer's disease*. Arch Pharm Res, 2015. **38**(11): p. 1992-8.
69. Jung, S.J., et al., *Discovery of boronic acid-based fluorescent probes targeting amyloid-beta plaques in Alzheimer's disease*. Bioorg Med Chem Lett, 2016. **26**(7): p. 1784-8.
70. Dao, P., et al., *Development of Phenothiazine-Based Theranostic Compounds That Act Both as Inhibitors of beta-Amyloid Aggregation and as Imaging Probes for Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease*. ACS Chem Neurosci, 2017. **8**(4): p. 798-806.
71. Li, M., et al., *N-Methyl Mesoporphyrin IX as an Effective Probe for Monitoring Alzheimer's Disease beta-Amyloid Aggregation in Living Cells*. ACS Chem Neurosci, 2017.
72. Liu, Y., et al., *Highly specific noninvasive photoacoustic and positron emission tomography of brain plaque with functionalized croconium dye labeled by a radiotracer*. Chem Sci, 2017. **8**(4): p. 2710-2716.
73. Ulrich, G., R. Ziessel, and A. Harriman, *The chemistry of fluorescent bodipy dyes: versatility unsurpassed*. Angew Chem Int Ed Engl, 2008. **47**(7): p. 1184-201.
74. Fosso, M.Y., et al., *Differential Effects of Structural Modifications on the Competition of Chalcones for the PIB Amyloid Imaging Ligand-Binding Site in Alzheimer's Disease Brain and Synthetic A β Fibrils*. ACS Chem Neurosci, 2016. **7**(2): p. 171-6.
75. Drescher, M., *EPR spectroscopy: applications in chemistry and biology*. 2012: Springer.
76. Mito, F., et al., *Monitoring the aggregation processes of amyloid-beta using a spin-labeled, fluorescent nitroxyl radical*. Chem Commun (Camb), 2011. **47**(17): p. 5070-2.
77. Steinhoff, H.J., *A simple method for determination of rotational correlation times and separation of rotational and polarity effects from EPR spectra of spin-labeled biomolecules in a wide correlation time range*. J Biochem Biophys Methods, 1988. **17**(4): p. 237-47.
78. Prisner, T., M. Rohrer, and F. MacMillan, *Pulsed EPR spectroscopy: biological applications*. Annu Rev Phys Chem, 2001. **52**: p. 279-313.
79. Pimlott, S.L. and A. Sutherland, *Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease*. Chem Soc Rev, 2011. **40**(1): p. 149-62.
80. Landau, S.M., et al., *Associations between cognitive, functional, and FDG-PET measures of decline in AD and MCI*. Neurobiol Aging, 2011. **32**(7): p. 1207-18.
81. Su, L., et al., *Cerebral metabolism in major depressive disorder: a voxel-based meta-analysis of positron emission tomography studies*. BMC Psychiatry, 2014. **14**(1): p. 321.
82. Klunk, W.E., et al., *Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B*. Ann Neurol, 2004. **55**(3): p. 306-19.
83. Vandenberghe, R., et al., *¹⁸F-flutemetamol amyloid imaging in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: a phase 2 trial*. Ann Neurol, 2010. **68**(3): p. 319-29.
84. Curtis, C., et al., *Phase 3 trial of flutemetamol labeled with radioactive fluorine 18 imaging and neuritic plaque density*. JAMA Neurol, 2015. **72**(3): p. 287-94.
85. Sundaram, G.S., et al., *Synthesis, characterization, and preclinical validation of a PET radiopharmaceutical for interrogating A β (beta-amyloid) plaques in Alzheimer's disease*. EJNMMI Res, 2015. **5**(1): p. 112.

86. Watanabe, H., et al., *A (68)Ga complex based on benzofuran scaffold for the detection of beta-amyloid plaques*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014. **24**(20): p. 4834-7.
87. Watanabe, H., et al., *Synthesis and evaluation of copper-64 labeled benzofuran derivatives targeting beta-amyloid aggregates*. *Bioorg Med Chem*, 2016. **24**(16): p. 3618-23.
88. Verhoeff, N.P., et al., *In-vivo imaging of Alzheimer disease beta-amyloid with [11C]SB-13 PET*. *Am J Geriatr Psychiatry*, 2004. **12**(6): p. 584-95.
89. Okamura, N. and K. Yanai, *Florbetapir (18F), a PET imaging agent that binds to amyloid plaques for the potential detection of Alzheimer's disease*. *IDrugs*, 2010. **13**(12): p. 890-9.
90. Cortes-Blanco, A., et al., *Florbetapir (18F) for brain amyloid positron emission tomography: highlights on the European marketing approval*. *Alzheimers Dement*, 2014. **10**(5 Suppl): p. S395-9.
91. Sabri, O., et al., *Beta-amyloid imaging with florbetaben*. *Clin Transl Imaging*, 2015. **3**(1): p. 13-26.
92. Klunk, W.E., et al., *Imaging A β Plaques in Living Transgenic Mice with Multiphoton Microscopy and Methoxy-X04, a Systemically Administered Congo Red Derivative*. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2002. **61**(9): p. 797-805.
93. Zhuang, Z.-P., et al., *IBOX(2-(4'-dimethylaminophenyl)-6-iodobenzoxazole): a ligand for imaging amyloid plaques in the brain*. *Nuclear Medicine and Biology*, 2001. **28**(8): p. 887-894.
94. Zhuang, Z.P., et al., *Structure-activity relationship of imidazo[1,2-a]pyridines as ligands for detecting beta-amyloid plaques in the brain*. *J Med Chem*, 2003. **46**(2): p. 237-43.
95. Serdons, K., et al., *Synthesis and evaluation of a (99m)Tc-BAT-phenylbenzothiazole conjugate as a potential in vivo tracer for visualization of amyloid beta*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007. **17**(22): p. 6086-90.
96. Chen, X., et al., *Synthesis and biological evaluation of 99mTc, Re-monoamine-monoamide conjugated to 2-(4-aminophenyl)benzothiazole as potential probes for beta-amyloid plaques in the brain*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008. **18**(4): p. 1442-5.
97. Han, H., C.G. Cho, and P.T. Lansbury, *Technetium complexes for the quantitation of brain amyloid*. *Journal of the American Chemical Society*, 1996. **118**(18): p. 4506-4507.
98. Dezutter, N.A., et al., *99mTc-MAMA-chrysamine G, a probe for beta-amyloid protein of Alzheimer's disease*. *Eur J Nucl Med*, 1999. **26**(11): p. 1392-9.
99. Mak, E., et al., *Multi-modal MRI investigation of volumetric and microstructural changes in the hippocampus and its subfields in mild cognitive impairment, Alzheimer's disease, and dementia with Lewy bodies*. *Int Psychogeriatr*, 2017. **29**(4): p. 545-555.
100. Blanken, A.E., et al., *Associations between hippocampal morphometry and neuropathologic markers of Alzheimer's disease using 7 T MRI*. *Neuroimage Clin*, 2017. **15**: p. 56-61.
101. Martins, A.F., et al., *Gd³⁺ complexes conjugated to Pittsburgh compound B: potential MRI markers of β -amyloid plaques*. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2014. **19**(2): p. 281-295.
102. Martins, A.F., et al., *Interaction of PiB-derivative metal complexes with beta-amyloid peptides: selective recognition of the aggregated forms*. *Chemistry*, 2015. **21**(14): p. 5413-22.
103. Martins, A.F., et al., *Associating a negatively charged GdDOTA-derivative to the Pittsburgh compound B for targeting Abeta amyloid aggregates*. *J Biol Inorg Chem*, 2016. **21**(1): p. 83-99.
104. Sato, K., et al., *Fluoro-substituted and 13C-labeled styrylbenzene derivatives for detecting brain amyloid plaques*. *Eur J Med Chem*, 2004. **39**(7): p. 573-8.
105. Higuchi, M., et al., *19F and 1H MRI detection of amyloid beta plaques in vivo*. *Nat Neurosci*, 2005. **8**(4): p. 527-33.
106. Rogosnitzky, M. and S. Branch, *Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms*. *Biometals*, 2016. **29**(3): p. 365-76.

107. Hwang, B.-H., M.-H. Kim, and K. Chang, *Molecular Imaging of High-Risk Atherosclerotic Plaques: Is It Clinically Translatable?* Korean Circ J, 2011. **41**(9): p. 497-502.
108. Stirrat, C.G., A. Vesey, and O. McBride, *Ultra-small superparamagnetic particles of iron oxide in magnetic resonance imaging of cardiovascular disease*. Journal of Vascular Diagnostics, 2014. **2**: p. 99-112.
109. Gill, R.K., R.K. Rawal, and J. Bariwal, *Recent advances in the chemistry and biology of benzothiazoles*. Arch Pharm (Weinheim), 2015. **348**(3): p. 155-78.
110. Klunk, W.E., et al., *Uncharged thioflavin-T derivatives bind to amyloid-beta protein with high affinity and readily enter the brain*. Life Sciences, 2001. **69**(13): p. 1471-1484.
111. Klunk, W.E., et al., *The Binding of 2-(4'-Methylaminophenyl)Benzothiazole to Postmortem Brain Homogenates Is Dominated by the Amyloid Component*. The Journal of Neuroscience, 2003. **23**(6): p. 2086-2092.
112. Lipinski, C.A., et al., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1997. **23**(1-3): p. 3-25.
113. Leeson, P., *Drug discovery: Chemical beauty contest*. Nature, 2012. **481**(7382): p. 455-6.
114. Leuma Yona, R., et al., *Thioflavin derivatives as markers for amyloid-beta fibrils: insights into structural features important for high-affinity binding*. ChemMedChem, 2008. **3**(1): p. 63-6.

Chapitre II

Table des matières

Chapitre II : Synthèse des dérivés 2-aryl-BzT et de la NMA.	45
I. Voies d'accès autour du motif benzothiazole.	45
I.1. Rappels bibliographiques.....	45
I.1.a. A partir d'aminothiophénol.....	45
I.1.b. A partir de l'aniline.....	46
I.1.c. A partir du noyau thiazole.....	46
I.1.d. Choix de la voie utilisée.....	47
I.2. Couplages C-C entre les BzT et les dérivés aryles.	47
I.2.a. Couplage de Stille.	47
I.2.b. Couplage de Miyaura-Suzuki.....	48
I.2.c. Couplage par activation de la liaison C-H.....	49
I.3. Voies de synthèse privilégiées pour la synthèse de la NMA.....	50
II. Synthèse du fragment A.....	50
II.1 Formation du cycle benzothiazole.....	50
II.2. Synthèse du composé 3	51
II.3. Iodation du composé 3	52
III. Synthèse autour du fragment B.	54
III.1. Protection de la 4-bromoaniline.....	54
III.2. Méthylation du composé 2'	56
III.3. Synthèse du composé 4'	57
IV. Formation du motif C et variations de fonctions.	58
IV.1 Synthèse du composé 5a par réaction de Suzuki-Miyaura.....	58
IV.2. Réduction en alcool du composé 5a	60
IV.3. Oxydation du composé 6a	61
IV.4. Réaction d'amination réductrice du composé 7a	62
V. Déprotection du Boc de 8a et purification de la NMA 8b par production de sels chlorhydrates.....	65
V.1. La déprotection de la fonction Boc.....	65
V.2 La formation des sels chlorhydrates de la NMA.	65
VI. Conclusion.....	67
Bibliographie du chapitre II.....	68

Chapitre II : Synthèse des dérivés 2-aryl-BzT et de la NMA.

I. Voies d'accès autour du motif benzothiazole.

I.1. Rappels bibliographiques

La production de dérivés de la ThT pour l'étude de la plaque amyloïde a conduit les chercheurs à développer différentes sources de voies d'accès aux motifs 2-aryl-BzT. Il existe un panel conséquent de réactions permettant d'accéder à ces motifs. L'accès aux 2-aryl-BzT peut se faire de deux principales manières :

- Formation du BzT puis couplage avec la partie aryle en position 2.
- Couplage des 2 dérivés aryles par la formation d'un cycle thiazole.

La littérature étant très large, une liste non exhaustive de différentes réactions est présentée ici, ces réactions étant parmi les plus récurrentes. Différents réactifs sont utilisés, certains pouvant donner accès directement aux 2-aryl-BzT, d'autres seulement à des dérivés du BzT qui seront ensuite couplés à un cycle aryle.

I.1.a. A partir d'aminothiophénol

Le 2-aminothiophénol est le premier réactif utilisé pour la synthèse des BzT par la réaction d'Hofmann en 1887.[1] Le noyau BzT est obtenu par réaction avec le phénylisothiocyanate pour obtenir le 2-(N-aminophényle)-BzT (**Fig. 1**).

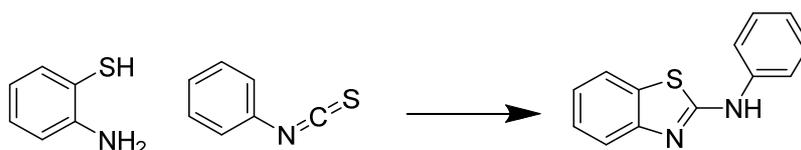


Figure 1. Formation de la 2-(N-aminophényle)-BzT par Hofmann et al.

La réaction permet un accès facile aux noyaux BzT. Depuis, de nombreuses autres réactions à partir du 2-aminothiophénol ont été utilisées pour obtenir des noyaux BzT.

Parmi celles-ci, on retrouve de manière très récurrente l'utilisation du benzaldéhyde permettant d'accéder aisément aux dérivés 2-aryl-BzT (**Fig.2**).[2-4]

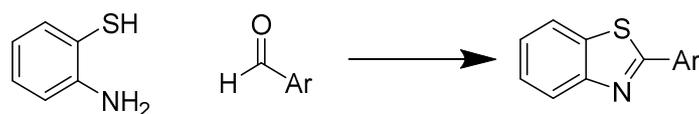


Figure 2. Schéma simple de la synthèse des 2-aryle-BzT à partir de l'aminothiophénol.

I.1.b. A partir de l'aniline

La synthèse du noyau BzT à partir d'aniline a été pour la première fois utilisée en 1901 par Hegerschoff à partir d'arylthiourée avec l'utilisation du dibrome.[5, 6] L'arylthiourée peut être obtenue à partir de l'aniline par réaction avec le thiocyanate de sodium. L'aniline doit être substituée en position para pour éviter que le thiocyanate réagisse sur cette position.[7] Le dérivé thiourée peut ensuite réagir par substitution électrophile afin d'accéder au 2-aminobenzothiazole en présence du dibrome (**Fig. 3A**). Un avantage majeur de cette réaction est qu'il est possible de pouvoir former la thiourée et le noyau BzT en « one-pot ».[8] Le noyau BzT peut également être obtenu à partir d'anilide converti, grâce au réactif de Lawesson, en thioacétanilide. Ce dernier, en présence de $K_3Fe_2(CN)_6$ subit une cyclisation pour former le noyau BzT (**Fig. 3B**).[9]

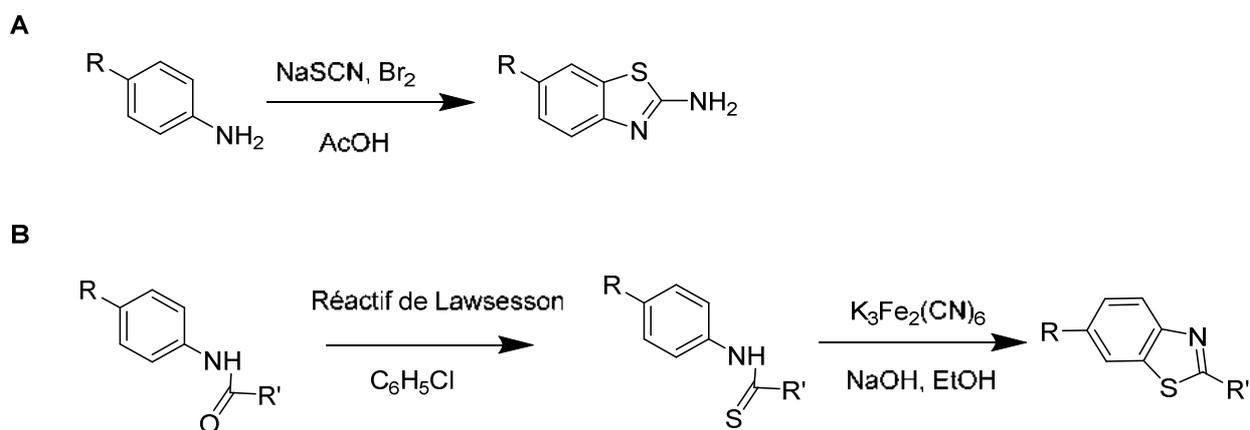


Figure 3. A : Synthèse de la 2-amino-BzT à partir de l'aniline. B : Synthèse du noyau BzT à partir d'acétanilide.

Les anilines, ainsi que leur dérivé en para, constituent une grande famille de molécules, il est donc possible d'obtenir différents dérivés pour enrichir la diversité des 2-amino-BzT.

I.1.c. A partir du noyau thiazole

De manière moins conventionnelle, il est possible d'accéder au motif BzT non pas en formant le cycle thiazole à partir d'un dérivé benzyle mais en formant le benzyle à partir du motif thiazole lors de réaction de Diels-Alder (**Fig. 4**).[10] Seulement, cette voie d'accès aux BzT reste difficile en raison de la moindre

disponibilité des thiazoles comparés à l'aniline par exemple, ce qui limite la diversité moléculaire qu'on peut obtenir par ce type de réaction.

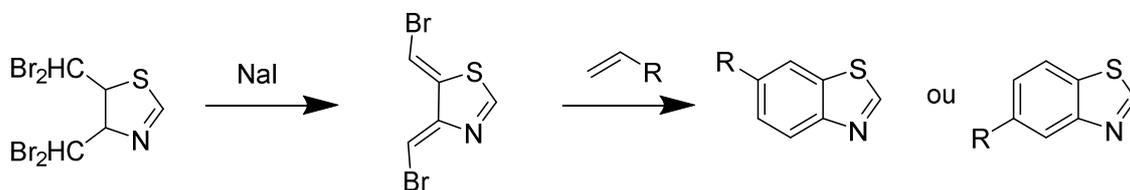


Figure 4. Synthèse des noyaux BzT par réaction de Diels-Alder.

I.1.d. Choix de la voie utilisée

Comme énoncé en introduction de cette partie les motifs 2-aryl-BzT peuvent être obtenus soit en formant d'abord le noyau BzT avant couplage avec un aryle, soit en combinant un dérivé 2-thioaniline avec un dérivé benzaldéhyde pour former directement le motif 2-aryl-BzT. Dans le cadre de nos travaux, nous avons opté pour la voie de Hugerschhoff avec les anilines qui permet de pouvoir effectuer des synthèses avec des quantités supérieures à la dizaine de grammes. Par ailleurs, cela permet d'effectuer les modifications souhaitées sur le motif BzT ou aryle avant leur couplage. La position para de l'aniline servant de pivot à toutes les fonctions ou dérivés possible des 2-aryl-BzT.

I.2. Couplages C-C entre les BzT et les dérivés aryles.

Le couplage des cycles aromatiques est une technique largement utilisées pour accéder aux composés bi-aryles. Nous nous intéresserons ici à des exemples de couplages qui ont permis d'accéder aux 2-aryl-BzT.

I.2.a. Couplage de Stille.

Le couplage de Stille, découvert en 1978, met en jeu un dérivé halogéné et un dérivé d'étain : le ArSnBu_3 (**Fig.5**).[11] La réaction de couplage est catalysée par le palladium. Le cycle se déroule en 3 étapes : i) addition oxydante du palladium dans la liaison C-X, ii) transmétallation avec l'aryltrialkylétain puis iii) élimination réductrice pour régénérer le catalyseur.

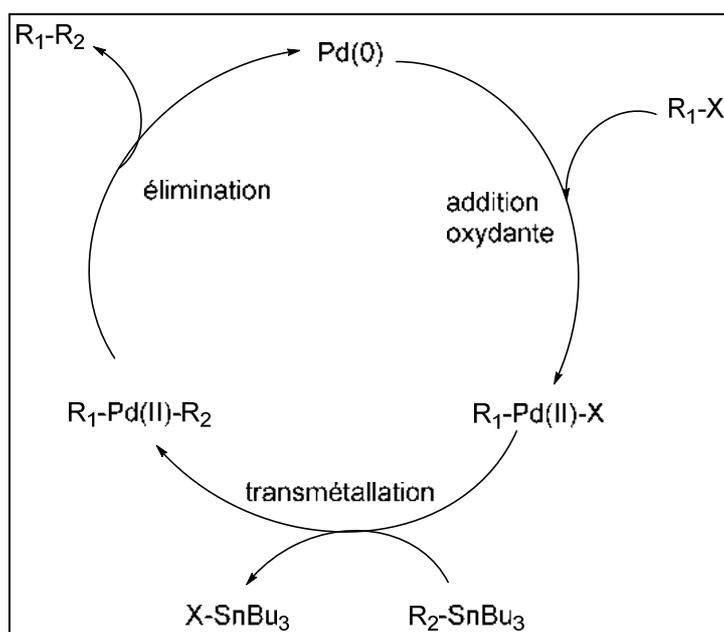


Figure 5. Cycle catalytique simplifié de la réaction de Stille.

Cette réaction a été mise à contribution dans la synthèse de 2-aryl-BzT (**Tableau 1**) :

Tableau 1. Exemples de couplage de Stille avec le motif BzT.

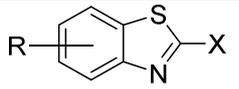
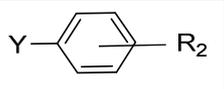
		Catalyseur	Température (°C)	Temps (h)	Rendement (%)	Références
Cl	-SnBu ₃	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	120	20	86	[12]
-SnBu ₃	-Br	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	120	20	56	[12]
-SMe	-SnBu ₃	PdCl(PPh ₃) ₂ (CH ₂ Ph)/ CuMeSal	50	20	89	[13]

I.2.b. Couplage de Miyaura-Suzuki

Le couplage de Miyaura-Suzuki (SMR : Suzuki-Miyaura Reaction) est l'une des méthodes les plus répandues dans l'obtention des espèces biaryliques depuis sa découverte en 1979.[14] La réaction de couplage utilise les complexes de Pd tout comme le couplage de Stille. La différence réside dans l'utilisation de dérivés d'acides ou d'esters boroniques au lieu de dérivés stanneux. Le cycle catalytique reste globalement le même celui du couplage de Stille (**Fig. 5**). Une illustration plus précise sera donnée lorsque

cette réaction sera abordée au cours de la synthèse de la NMA (§III.1). La SMR requiert cependant l'utilisation d'une base. Une sélection de réactions de couplage avec le noyau BzT effectuées par SMR est donnée dans le **Tableau 2** :

Tableau 2. Résumé des conditions expérimentales de la SMR.

		Catalyseur	Température (°C)	Temps (h)	Rendement (%)	Références
Br	B(OH) ₂	Pd ₂ (dba) ₃	100	6	40-72	[15]
Br	B(OH) ₂	Pd(PPh ₃) ₄	150	0,75	>90	[16]
Br	B(OH) ₂	Pd(OAc) ₂	100	5	84	[17]
Cl	B(OH) ₂	Pd(OAc) ₂	80	0,25	93	[18]
Br	B(pin) ₂	Pd(dppf)Cl ₂	80	1,5	94	[19]
Cl	B(OH) ₂	Pd(PPh ₃) ₄	X	X	X	[20, 21]

I.2.c. Couplage par activation de la liaison C-H

La dernière réaction de couplage se produit par l'activation de la liaison C-H (**Fig. 6**).



Figure 6. Schéma simplifié de la réaction de couplages par la liaison C-H.

Ce type de réaction est beaucoup plus récent dans la littérature que les réactions de couplage classique en raison des derniers développements sur l'activation des liaisons C-H peu réactives par rapport aux liaisons C-X. Cette réaction permet un couplage avec un grand nombre de dérivés (**Tableau 3**).

Tableau 3. Résumé des conditions expérimentales des couplages de la liaison C-H.

	Catalyseur	Additif	Solvant	Température (°C)	Temps (h)	Rendement (%)	Références
Y =							
-CH ₂ -COOH	Cu(OAc) ₂	X	DMSO	120-120	17-42	38-95	[22]
-CHO	K ₂ S ₂ O ₈	X	DMSO/H ₂ O	100	3	38-73	[23]
-Br	Pd/Cu	Cs ₂ CO ₃	Toluène	100	6-22	56-98	[24]
-B(pin) ₂	CuCl	tBuOLi	DMF	40	0,16	32-97	[25]

I.3. Voies de synthèse privilégiées pour la synthèse de la NMA

Parmi les voies de synthèses énoncées ci-dessus, nous avons privilégié une synthèse du noyau BzT à partir d'un dérivé d'aniline (**Fragment A**) beaucoup plus accessible que les dérivés thiazoles ou les dérivés aminothiophénols ce qui permet de le produire en grande quantité. Il est possible ensuite d'avoir accès aux dérivés 2-halogéno-BzT depuis le 2-amino-BzT par la réaction de Sandmeyer.[26]

Dans ces travaux, nous avons opté pour une synthèse en 3 étapes principales : i) La formation d'un **fragment A** à partir de l'acide 4-aminobenzoïque (PABA). ii) La formation un **fragment B** porteur d'une méthylamine issu de la 4-bromoaniline. iii) Ces deux parties seront ensuite couplées par SMR pour former un **motif C** dont les fonctions en position 6 seront modifiées afin de synthétiser la molécule NMA souhaitée (**Fig.7**).

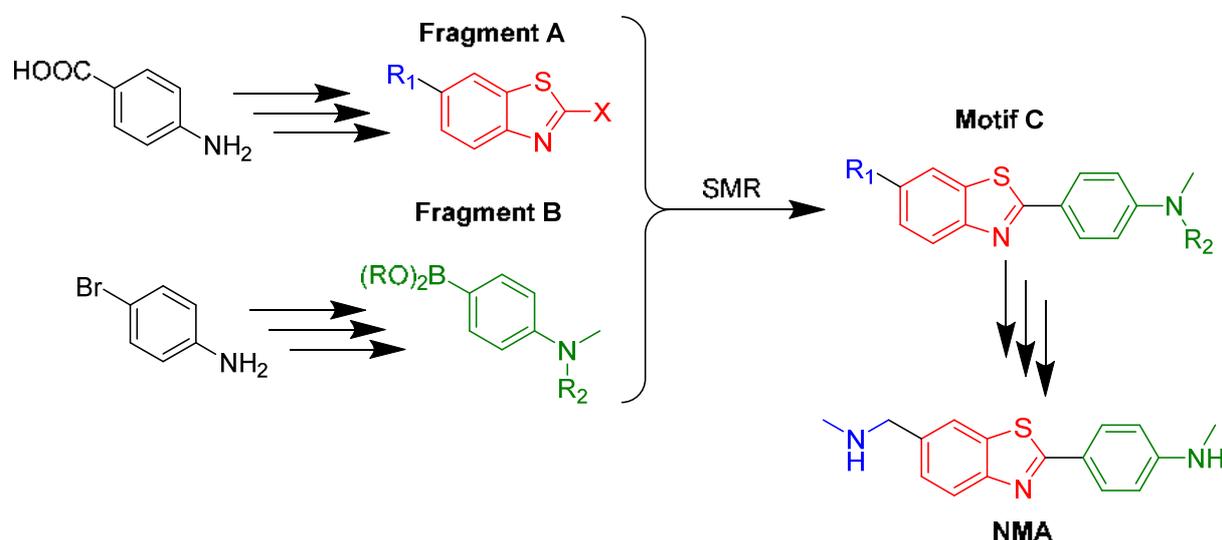


Figure 7. Schéma des étapes-clés de synthèse de la NMA.

II. Synthèse du fragment A

II.1 Formation du cycle benzothiazole.

La formation de l'acide 2-amino-1,3-benzothiazole-6-carboxylique s'effectue à partir du PABA par addition de thiocyanate d'ammonium (NH_4SCN) et de dibrome (Br_2) dans l'acide acétique (AcOH). Cette réaction décrite par Hegershoff en 1901 et 1903,[5, 6] est encore utilisée de nos jours.[8, 27-31] La synthèse se fait avec un bon rendement de 80% (**Fig.8**) et présente aussi l'avantage de pouvoir être conduite sur plusieurs dizaines de grammes (jusqu'à 30 grammes au cours de ces travaux de thèse).

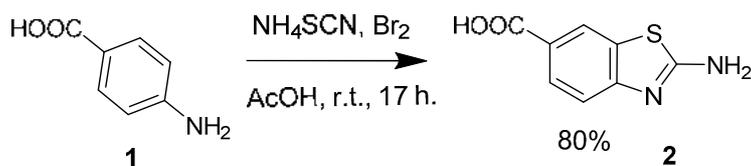


Figure 8. Schéma de la réaction pour obtenir le produit 2.

Le mécanisme de la réaction se décompose en deux étapes : i) addition de la fonction aniline sur le carbone du thiocyanate pour former le dérivé thiourée ; ii) substitution électrophile aromatique par le dérivé thiourée. Une prototropie conduit à l'aromaticité du cycle thiazole (**Fig. 9**).

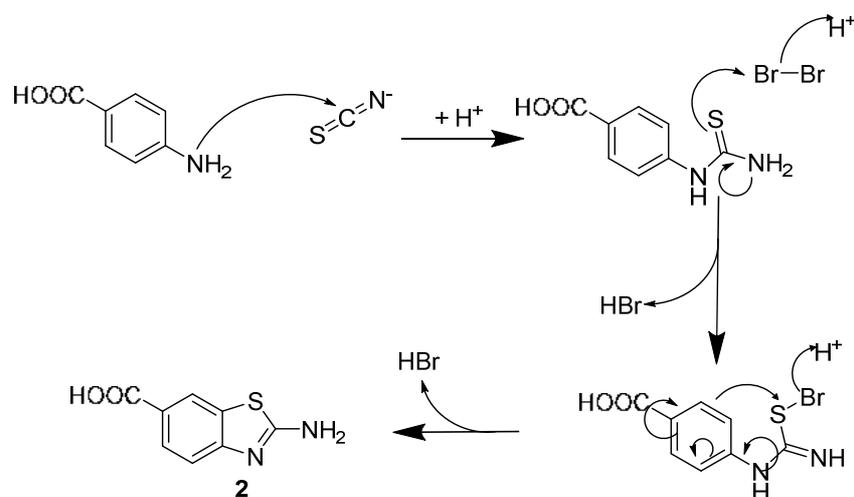


Figure 9. Mécanisme de la réaction d'Hugeschoff.

II.2. Synthèse du composé 3.

La synthèse de **3** se fait par estérification de Fischer du composé **2**.^[32, 33] Le produit **2** est solubilisé dans de l'éthanol auquel on ajoute une solution d'acide sulfurique dilué dans de l'éthanol au goutte-à-goutte à 0°C. Le milieu réactionnel est ensuite porté à reflux pour la nuit (**Fig 10**).

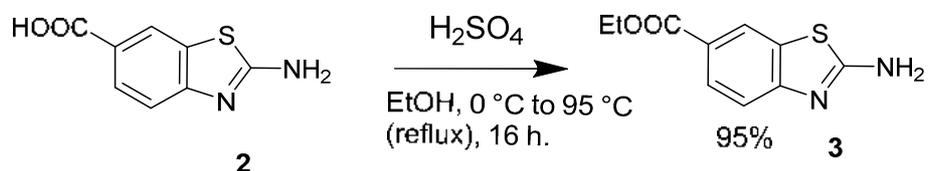


Figure 10. Schéma de la réaction pour obtenir le composé 3.

L'acide sulfurique est ajouté en excès afin de déplacer la réaction vers la formation de l'ester.

II.3. Iodation du composé 3.

Le remplacement de l'amine en position 2 du composé **3** par l'iode se fait par la réaction de Sandmeyer (**Fig. 11**).^[26] Cette réaction s'effectue via la production d'un composé diazonium depuis l'amine permettant l'introduction d'un halogène par addition sur le cycle **[34]** (sauf le fluor qui lui est introduit par réaction de Balz-Schiemann),^[35] et libérant du diazote. Cette méthode a été adaptée maintes fois dans la littérature pour déplacer le diazonium avec des groupements nucléophiles autres que les halogènes comme des cyanures,^[36] des hydroxyles ^[37] ou encore des pentafluoroethylthiols.^[38] Dans notre cas, nous avons effectué cette réaction à partir du produit **3** solubilisé dans l'acétonitrile (ACN) auquel est ajouté l'acide paratoluène sulfonique (APTS), de l'iodure de potassium (KI) et de l'iodure de cuivre (CuI) en quantité catalytique (1 %). Le tert-butyle nitrite (tBuONO) est ensuite ajouté au goutte-à-goutte. Cette réaction s'effectue avec un rendement modéré de 60%.

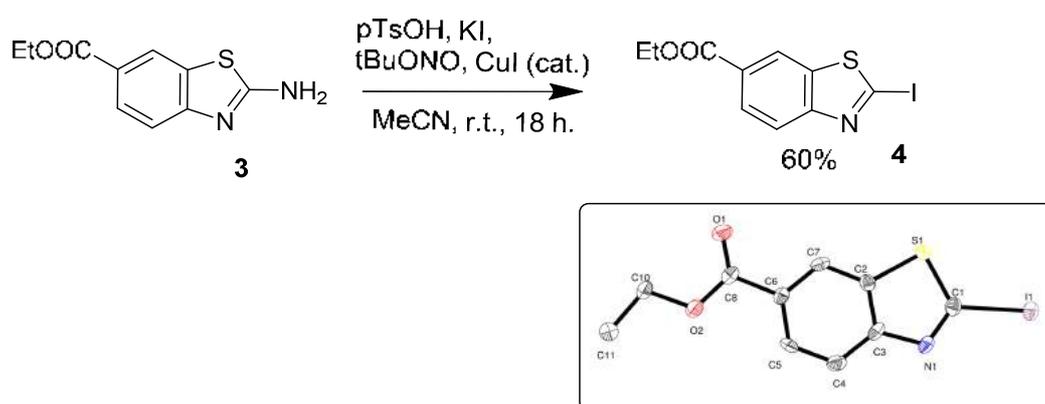


Figure 11. Schéma de la réaction pour obtenir le produit 4 avec sa structure cristallographique.

Le mécanisme de cette réaction est en deux étapes : i) le nitrite réagit en milieu acide pour produire l'ion nitrosonium réagissant avec l'amine en position 2 du composé **3** pour former le diazonium.

ii) En fonction de la présence ou non d'iodure de cuivre(I) (CuI) le mécanisme d'addition de l'iode sur le BzT diffère. Voie A : L'iode s'additionne sur le carbone ce qui élimine le diazote pour former le produit **4** désiré. Voie B : La présence de CuI, par un mécanisme de transfert monoélectronique (SET : Single Electron Transfer), permet le départ du diazonium en générant un carbone radicalaire et la formation du diiodure de cuivre(II) (CuI₂). Celui-ci en présence du carbone radicalaire, transfère l'iode radical pour régénérer le CuI et forme le produit désiré (**Fig. 12**).

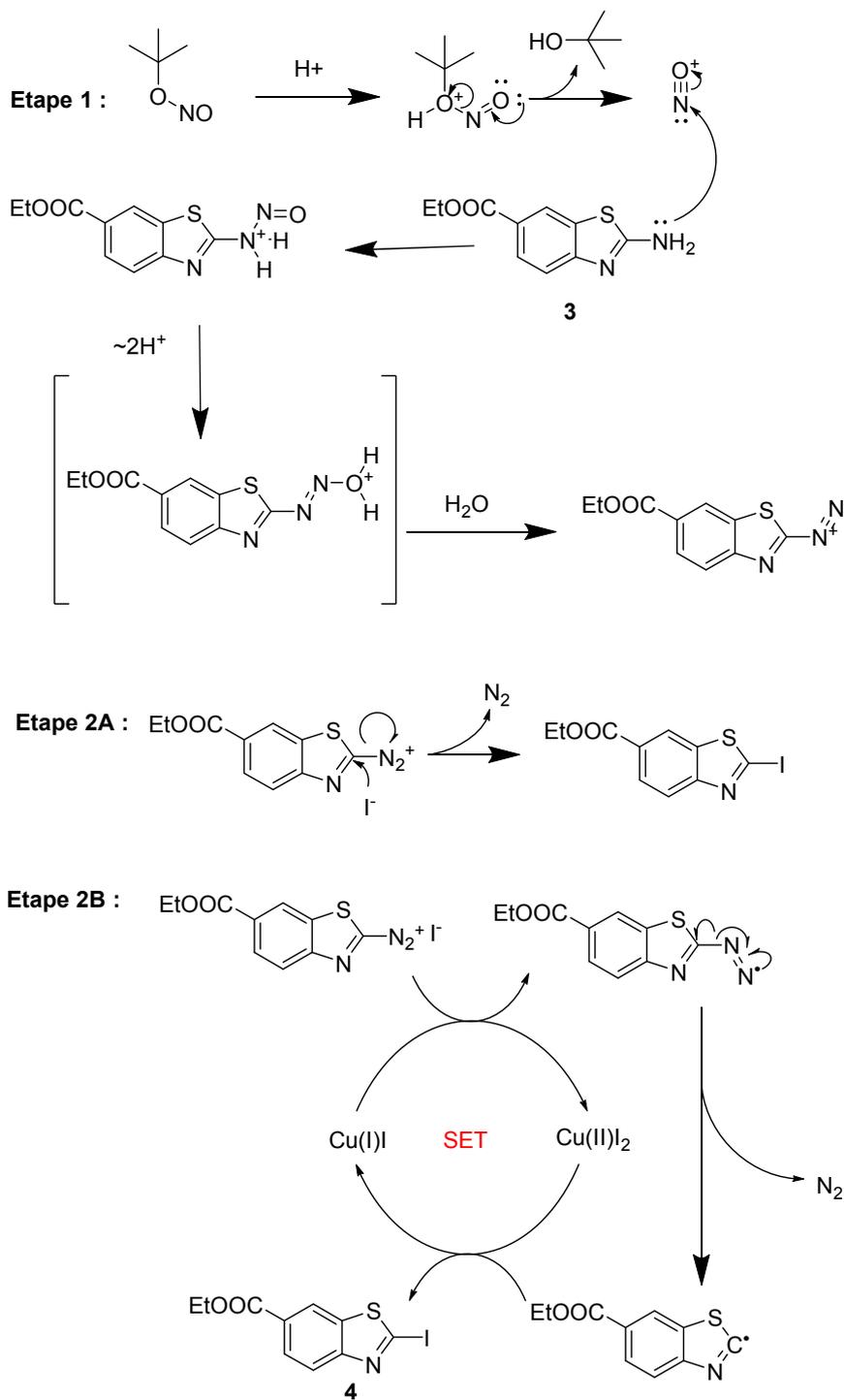


Figure 12. Mécanisme de la réaction de Sandmeyer.

L'ajout de Cu(I) améliore significativement le rendement réactionnel. Sans le Cu(I), le rendement ne dépasse pas les 25% alors que l'ajout de CuI permet d'atteindre les 60% (**Tableau 4**). Le rendement faible de la voie A suggère que le carbocation intermédiaire se dégrade ou réagit dans le milieu réactionnel.

Tableau 4. Conditions expérimentales de la réaction du composé 3 vers le composé 4.

Voie	Réactif 1	Réactif 2	Réactif 3	Catalyseur	Réactif 5	Solvant	Durée (jrs)	Rendement (%)
A	3	APTS	KI	X	tBuONO	ACN	2	23%
B	3	APTS	KI	CuI (10%)	tBuONO	ACN	3	47-60%

Cette réaction peut être également à la synthèse à l'échelle de plusieurs grammes, un rendement sur produit isolé de 60% a été obtenu à partir de 10 g de produit 2.

III. Synthèse autour du fragment B.

III.1. Protection de la 4-bromoaniline.

La transformation de 1' en 2' (**Fig. 13**) s'est faite par 2 protocoles de synthèse différents :

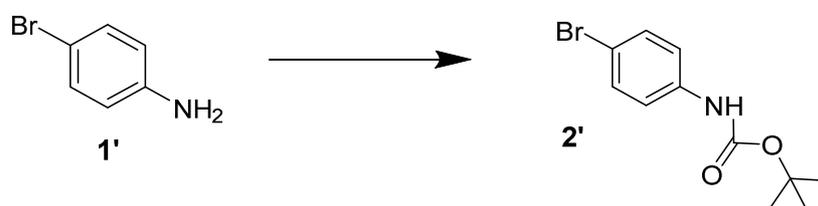


Figure 13. Schéma de la réaction de synthèse du composé 2'.

Dans un premier temps nous avons effectué la réaction en milieu basique via l'utilisation de l'hydrure de sodium (NaH) dans le THF.[39-43] Cette voie consiste à augmenter le caractère nucléophile de la fonction amine en la déprotonant par l'ajout de NaH, une base forte. Cette déprotonation exacerbe le caractère base de Lewis de l'aniline puisque seul l'un des 2 doublets de l'amide est conjugué avec le noyau aromatique (**Fig. 14**). L'ajout de dicarbonate de di-tert-butyle (Boc₂O) qui est alors attaqué par l'amidure libre du dioxyde de carbone (CO₂) ainsi que le tert-butylate (tBuO⁻) avec la formation de produit protégé.

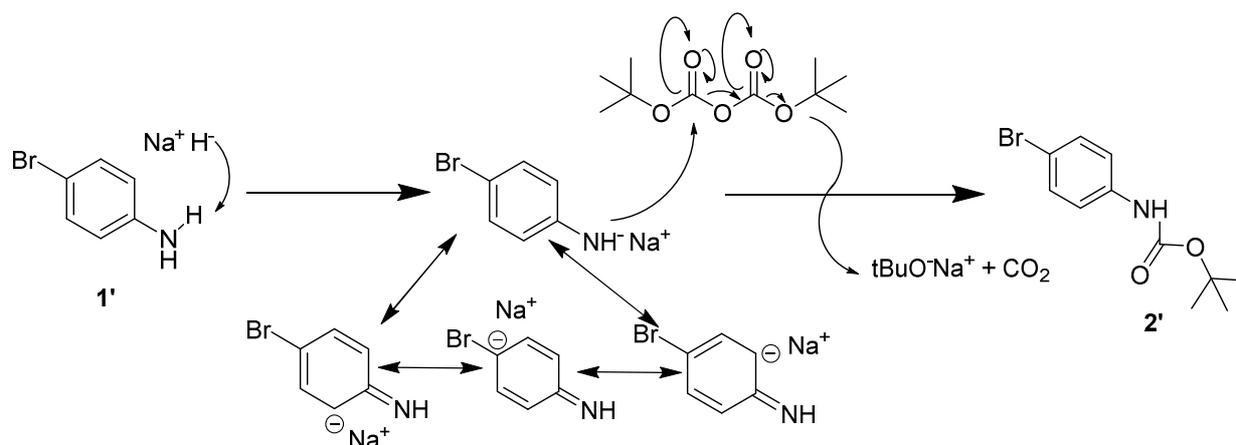


Figure 14. Mécanisme réactionnel de la protection au Boc avec l'utilisation du NaH.

Cette réaction se produit sans difficulté sur quelques grammes mais lors de l'augmentation d'échelle nous avons observé une chute du rendement (~92 % à 49 %). Une première stratégie a été de diviser les lots en plusieurs milieux réactionnels à l'aide d'un carrousel pour faire des synthèses en parallèle. Cependant la difficulté de contrôle des milieux réactionnels, en particulier l'usage de l'argon, avec le carrousel a orienté la synthèse vers une voie B plus simple à mettre en œuvre.

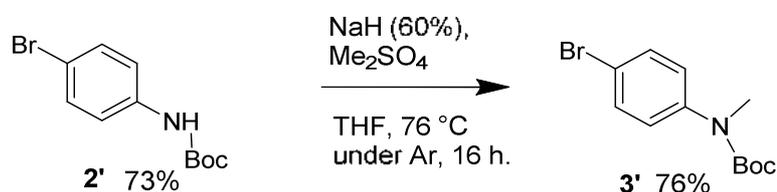
Les travaux de Heydari *et al.*[44] rapportent des protections d'amine avec le Boc dans des solvants fluorés telles que l'hexafluoroisopropanol (HFIP) ou encore le trifluoroéthanol (TFE). La voie B, présentée ici, est adaptée de ces travaux. Cette réaction se produit simplement en ajoutant la 4-bromoaniline et le Boc₂O dans le TFE et de laisser la réaction sous agitation. Le produit désiré précipite en solution, ce qui permet une purification aisée par filtration et lavage. Cela n'améliore pas le rendement par rapport à la voie A mais cela permet une économie de temps de traitement et également une augmentation d'échelle puisque cette réaction peut être effectuée sur des quantités de l'ordre de la dizaine de grammes (**Tableau 5**). Le filtrat peut être évaporé pour précipiter davantage le produit jusqu'au moment où le produit de départ précipite également. Cependant on augmente le risque d'obtenir un mélange. Une voie de synthèse encore plus simple existe, puisqu'elle ne nécessite pas de solvant. La réaction se fait sous vide afin d'éliminer le tBuOH, et le CO₂ à mesure de leur formation.[45] Cette réaction a été conduite avec 5 grammes de produit avec un rendement quantitatif.

Tableau 5. Conditions expérimentales utilisées dans les voies A et B.

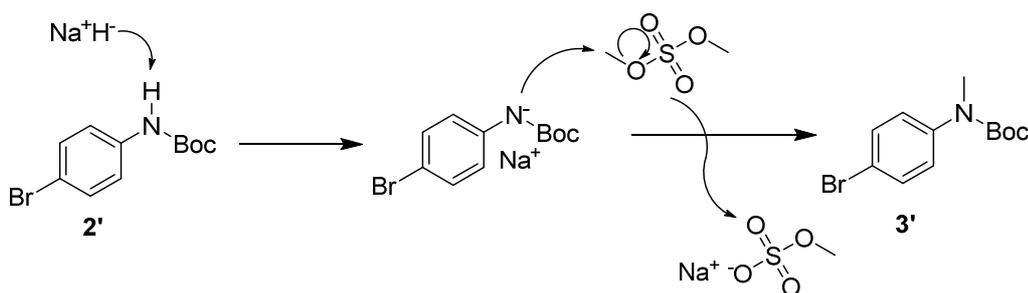
Voie	Réactif 1	Réactif 2	Solvant	Température (°C)	Durée (heures)	Rendement
A	Boc ₂ O	NaH	THF anhydre	r.t. puis 76	16	40-96 %
B	Boc ₂ O	X	TFE	r.t.	16-72	40-96 %
C	Boc ₂ O	X	X	45	1	100 %

III.2. Méthylation du composé 2'.

Le composé **3'** est obtenu par méthylation du composé **2'** à l'aide du diméthyle sulfate (Me₂SO₄) avec le protocole utilisé précédemment (**Fig. 15**).

Figure 15. Schéma de la réaction pour obtenir le composé **3'**.

C'est une réaction de type S_N2 classique. La nucléophilie de l'azote de la fonction carbamate est activée par l'utilisation de NaH. L'amidure de sodium résultant attaque le groupement méthyle du Me₂SO₄ libérant ainsi le mésylate (MeSO₄⁻), un groupement partant. Le produit obtenu est une huile visqueuse jaune plus ou moins foncée. Le produit peut être purifié par l'utilisation de la Flash Chromatographie, bien que le produit désiré **3'** et réactif de départ **2'** migrent en même temps sur silice dans les conditions d'éluion avec des mélanges de cyclohexane/acétate d'éthyle, cela permet malgré tout d'éliminer le Me₂SO₄ (**Fig. 16**).

Figure 16. Mécanisme réactionnel de la synthèse du composé **3'**.

Par ailleurs, le produit purifié ne peut être stocké sur de longues périodes à température ambiante. Après quelques mois de stockage dans une armoire, l'apparition de cristaux nous a révélé la formation d'un dérivé urée dont la structure a été résolue par diffraction aux RX. On suppose un mécanisme impliquant 2

molécules **3'** au cours duquel on a l'élimination d'une molécule de CO₂, d'isobutène et d'isopropanol pour former le dérivé urée (**Fig. 17**).

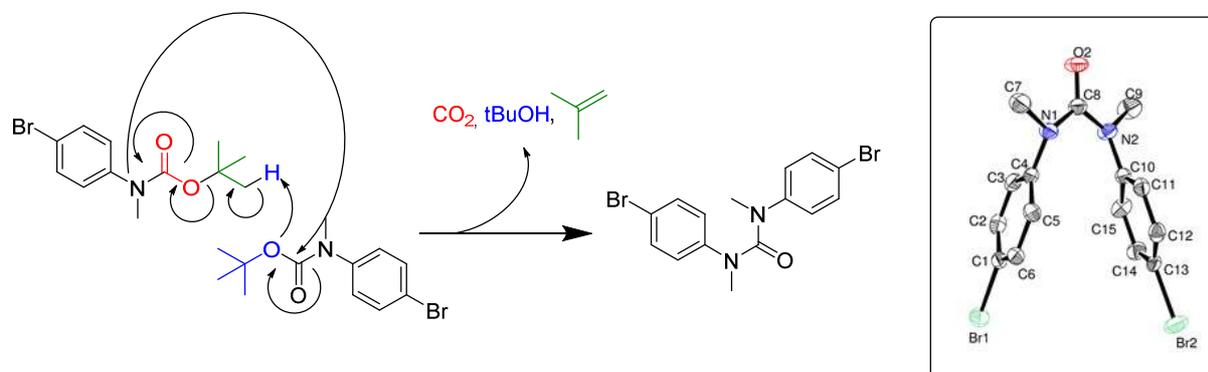


Figure 17. Mécanisme supposé de formation du dérivé urée et sa structure cristallographique.

Par ailleurs, la réaction produit également des cristaux de sels de mésylate de 4-bromo-N,N,N-triméthylanilium (**Fig. 18**). On suppose qu'ils sont dus à des traces de 4-bromoaniline présents dans le milieu réactionnel qui ont réagi avec le Me₂SO₄.

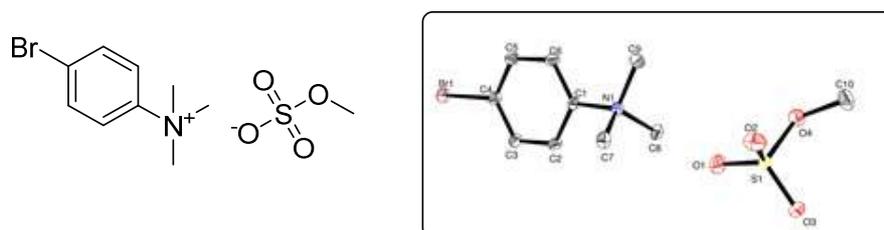


Figure 18. Représentation de Lewis et structure cristallographique du mésylate de 4-bromo-N,N,N-triméthylanilium.

III.3. Synthèse du composé **4'**.

La réaction d'obtention du composé **4'** à partir du composé **3'** d'après les travaux développés dans notre équipe,[46] sur la formation d'esters boroniques nommés « dioxazaborocanes » ou DABO (**Fig. 19**).[47] Ce dernier est choisi car il présente une bonne stabilité à l'air et à l'humidité permettant une isolation, une caractérisation et un stockage facile.[48, 49] Ceci est dû à la liaison dative entre l'azote et le bore qui confère à ce dernier un caractère tétravalent, qui de plus n'inhibe pas la transmétallation lors de la réaction de Suzuki-Miyaura (SMR : Suzuki-Miyaura Reaction).[46, 50]

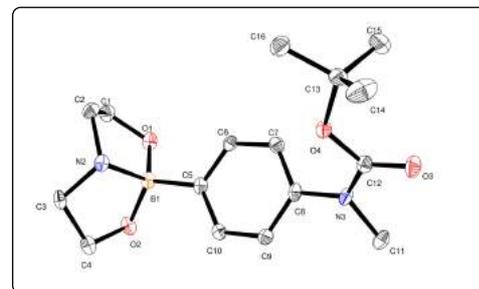
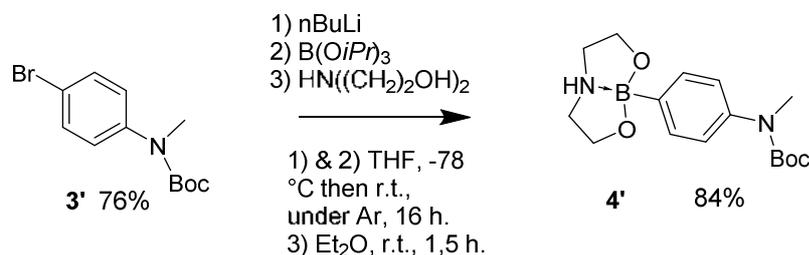


Figure 19. Schéma de la synthèse du composé **4'** et sa structure cristallographique.

La réaction démarre avec un échange entre le brome et le lithium. Le dérivé du lithium formé attaque le triisopropyle de borate pour former un bore tétravalent. Le traitement NH₄Cl aqueux donne le dérivé d'acide borique correspondant par déalkoxylation et hydrolyse des esters d'isopropyle. Le milieu réactionnel est évaporé pour être ensuite repris dans de l'éther diéthylique. L'ajout de diéthanolamine permet de former le dérivé dioxazaborocane souhaité, qui précipite en solution, avec un rendement satisfaisant de 84 % (**Fig. 20**).

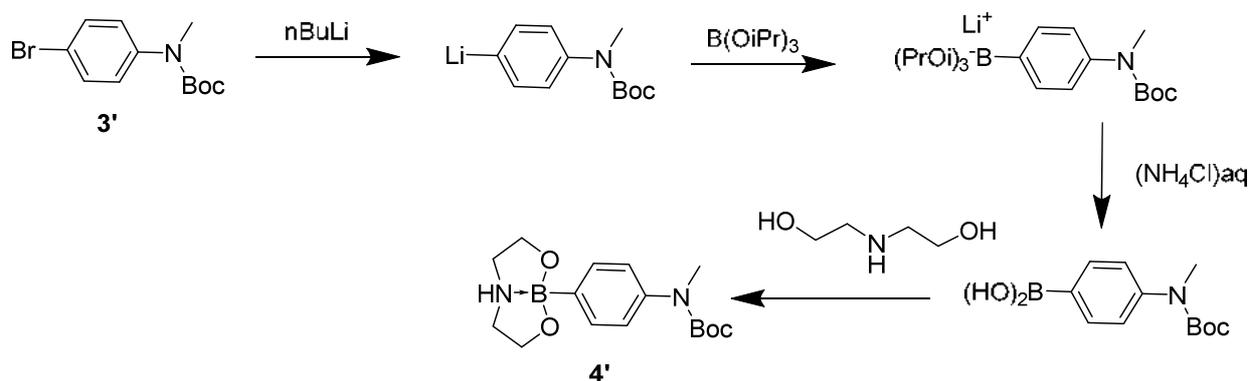


Figure 20. Enchaînement réactionnel de la synthèse du composé **4'**.

IV. Formation du motif C et variations de fonctions.

IV.1 Synthèse du composé **5a** par réaction de Suzuki-Miyaura.

La synthèse du composé **5** se fait par la réaction de couplage de Suzuki-Miyaura, [14, 51] qui est une méthode largement utilisée pour le couplage biarylique (**Fig. 21**).

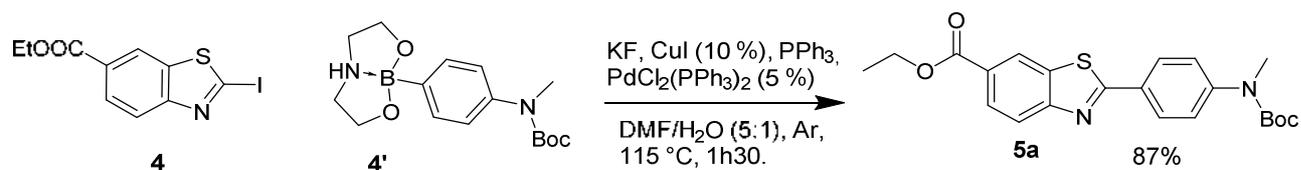


Figure 21. Schéma de synthèse du composé 5.

La réaction a été optimisée par l'ajout de PPh_3 et de CuI . Le PPh_3 permet la réduction du Pd(II) en Pd(0) par la formation du $\text{Pd(0)(PPh}_3)_4$ et d'initier la réaction de couplage. L'ajout du Cu(I) permet à priori de faciliter également la transmetallation du Pd sur la liaison C-B, ce phénomène ayant déjà été observé lors des couplages de Stille. [52-54] Les ions fluorures, en plus de leur rôle de « base » envers le bore pour le déprotéger de la diéthanolamine, permettent d'accélérer la réaction en favorisant le passage du trans-palladium en cis-palladium (Fig. 22).[55, 56] Cette isomérisation permet de faciliter l'élimination réductrice du Pd , régénérant d'une part le catalyseur et d'autre part le produit désiré. La réaction s'effectue entre 1h et 1h30 avec un rendement allant jusqu'à 87% (Tableau 6).

Tableau 6. Conditions expérimentales pour la synthèse du composé 5.

Condi-tions	R1	R2	R3	R4	R5	R6	Solvant	Température	Durée (heure)	Rendement
1	4	4'	KF	$\text{Pd(PPh}_3)_2\text{Cl}_2$	X	X	DMF/ H_2O	105°C	3	32%
2	4	4'	KF	$\text{Pd(PPh}_3)_2\text{Cl}_2$	CuI	PPh_3	DMF/ H_2O	105°C	1,5	46-87%

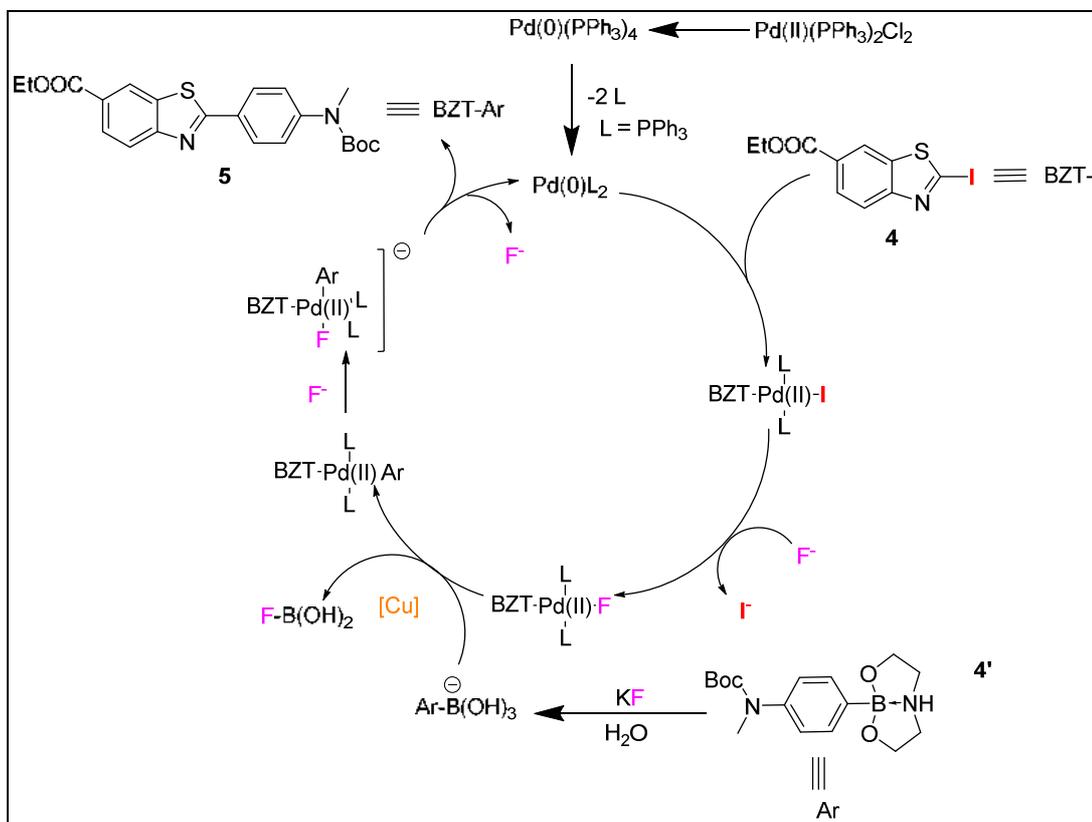


Figure 22. Cycle catalytique du Pd dans la SMR. A gauche du cycle, l'intervention du fluor dans l'isomérisation du complexe de Pd.

IV.2. Réduction en alcool du composé 5a.

La réaction de synthèse du composé **6** est une réduction de la fonction ester d'éthyle en alcool correspondant à l'aide du tétrahydroaluminat de lithium (LAH) (**Fig. 23**).

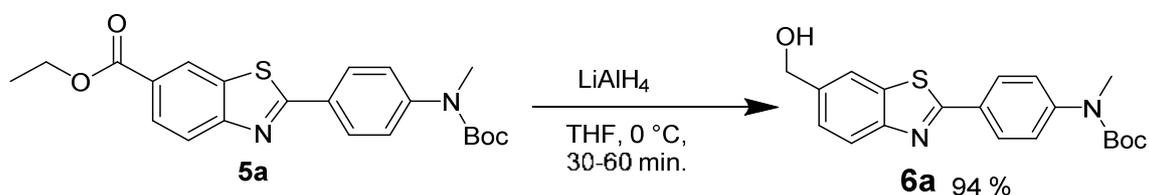


Figure 23. Schéma réactionnel de synthèse du composé **6**.

C'est un réducteur puissant largement utilisé pour la réduction des composés carbonyles. [57-63] Dans cette réaction, l'ester est ajouté dans le THF anhydride, l'ensemble est placé à 0°C sous argon et le LAH en solution dans le THF est ajouté au goutte-à-goutte, l'avancement de la réaction est vérifié par CCM. Un changement de couleur est à noter également, le milieu réactionnel passe du vert émeraude à l'ambre en fin

de réaction. La réaction est ensuite traitée à l'éther diéthylique saturé en eau pour former l'alcool désiré et éliminer le reste de LAH sous forme d'hydroxyde de lithium et d'aluminium (**Fig. 24**). Cependant ces sels forment des émulsions qui gélifient le milieu réactionnel, il faut ajouter dans ce cas une solution saturée de NH_4Cl aqueux pour casser le gel. La réaction se déroule en environ 1h et donne des rendements compris entre 70-99% si l'émulsion a été correctement traitée, sinon ils sont en dessous de 40%.

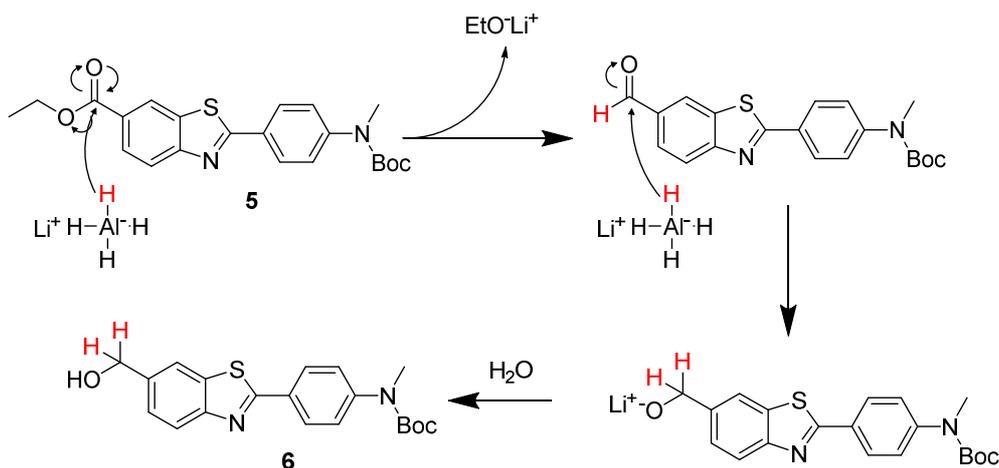


Figure 24. Mécanisme réactionnel de la synthèse du composé **6a**.

IV.3. Oxydation du composé **6a**.

La réaction de synthèse du composé **7a** passe par une étape d'oxydation douce de l'alcool pour obtenir l'aldéhyde (**Fig. 25**). [64, 65]

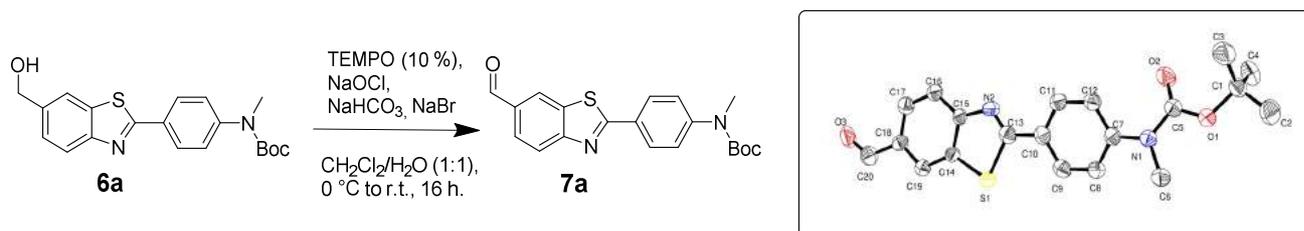
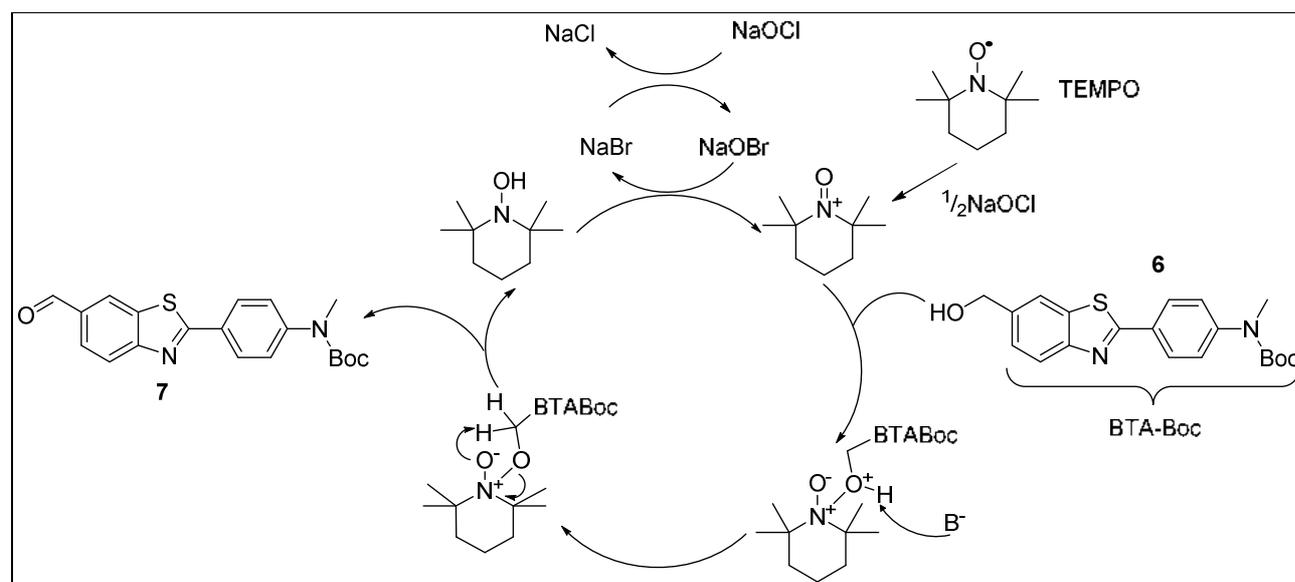


Figure 25. Schéma réactionnel de synthèse du composé **7a** et sa structure cristallographique.

C'est une oxydation catalysée par le TEMPO, un radical nitroxyle stable qui en présence d'oxydant devient l'ion nitrosonium. L'azote devient, dès lors, un centre électrophile réactif qu'un doublet de l'oxygène de l'alcool peut attaquer. L'intermédiaire généré permet au groupement CH_2 en α de l'oxygène de transférer un de ses protons au TEMPO pour ensuite être éliminé. Au final on obtient l'aldéhyde et le nitroxyde, ce

dernier est oxydé à nouveau par le couple NaOCl/NaBr pour recommencer le cycle (**Fig. 26**). La présence d'une base n'est pas indispensable à la réaction mais elle permet d'améliorer le rendement en facilitant l'élimination du proton de l'oxonium. Le rendement de la réaction varie en fonction de la qualité du composé **6** utilisé, de la qualité du NaOCl utilisé, mais également de la manière dont celui-ci est ajouté au cours de la réaction. Il vaut mieux ajouter le NaOCl en petite quantité, en plusieurs fractions, qu'une grande quantité en une seule fois (**Tableau 7**). Cette réaction peut également conduire à la formation du dérivé COOH.[21]

Tableau 7. Conditions expérimentales de la synthèse du composé 7.



Condi-tions	Réactif 1	Réactif 2	Réactif 3	Réactif 4	Réactif 5	Solvant	Temps (h)	Tpt (°C)	Rendement (%)
1	6a	TEMPO (10 %)	NaOCl	NaBr	X	CH ₂ Cl ₂	2-18	0 puis r.t.	65-88
2	6a	TEMPO (10 %)	NaOCl	NaBr	NaHCO ₃	CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O	2-6	0 puis r.t.	10-90

Figure 26. Cycle catalytique de l'oxydation du composé **6a** en **7a** par l'utilisation de TEMPO/NaBr/NaOCl.

IV.4. Réaction d'amination réductrice du composé **7a**.

L'amination réductrice, envisagée pour convertir la molécule **7a** en **8a** est une réaction classique très utilisée pour introduire les fonctions amines à partir de carbonyles comme les aldéhydes ou les cétones.[66-68] Elle

consiste en l'addition de l'amine sur le carbonyle pour former l'imine puis en l'ajout d'un réducteur pour former l'amine (**Fig. 27**).

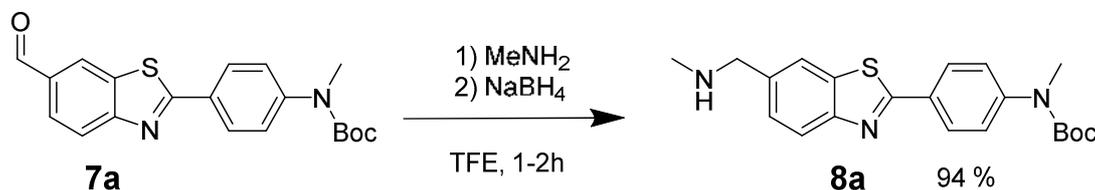


Figure 27. Schéma réactionnel de la synthèse du composé **8a**.

Le doublet de la fonction amine attaque le carbone électrophile de l'aldéhyde pour former l'imine par élimination d'une molécule d'eau. Une fois l'imine formée, le NaBH_4 est ajouté afin de la réduire en amine. La cinétique de réaction doit être contrôlée finement. En effet, la réaction risque de réduire également l'aldéhyde en alcool pour redonner la molécule **6a**. La cinétique de formation de l'imine est difficile à contrôler par CCM puisque l'imine peut s'hydrolyser partiellement sur la silice. La RMN constitue donc un outil de choix puisqu'il devient aisé de contrôler la disparition du singulet du proton de l'aldéhyde (9-10 ppm) et l'apparition du singulet du proton $\text{N}=\text{CH}$ de l'imine (7 à 8 ppm) afin de déterminer quand ajouter le réducteur. L'IR permet de pouvoir également discriminer les fonctions aldéhydes (1693 cm^{-1}) et imine (1640 cm^{-1}), cependant son utilisation reste limitée car l'imine peut partiellement se dégrader en aldéhyde et fausser la cinétique (cf Chapitre III §II.1.a). Les premières tentatives de réduction de l'amine ont conduit à la production d'alcool en raison de l'équilibre de la formation de l'imine à partir de l'aldéhyde (**Fig. 28**).

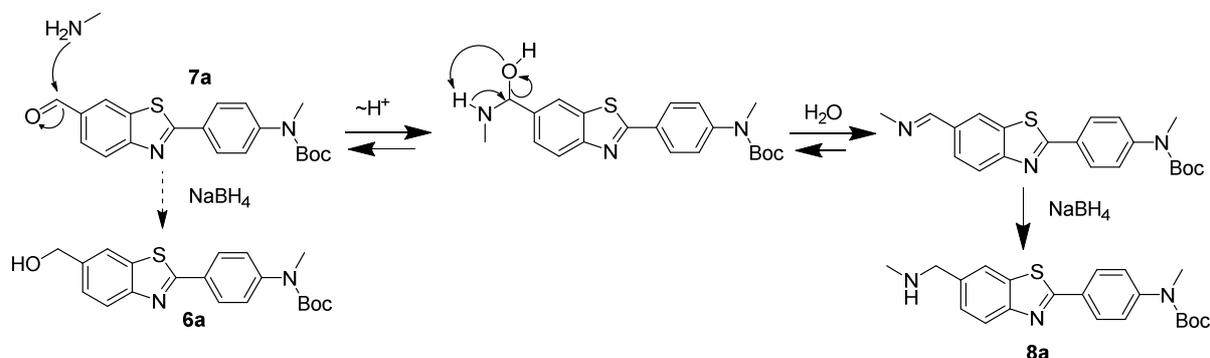


Figure 28. Enchaînement réactionnel de la synthèse du composé **8a** à partir de **7a** et du retour au composé **6a**.

Afin de prévenir cette formation d'alcool, le NaBH_3CN a été utilisé. En milieu neutre le NaBH_3CN est sélectif de l'imine sur l'aldéhyde.[69-71] Cependant l'essai avec le NaBH_3CN a conduit à la formation de molécules « dimériques ». En effet, l'aldéhyde, ne pouvant être réduit en alcool, peut avec le dérivé amine conduire à un iminium réduit à son tour pour donner la molécule dimérique (**Fig. 29**).

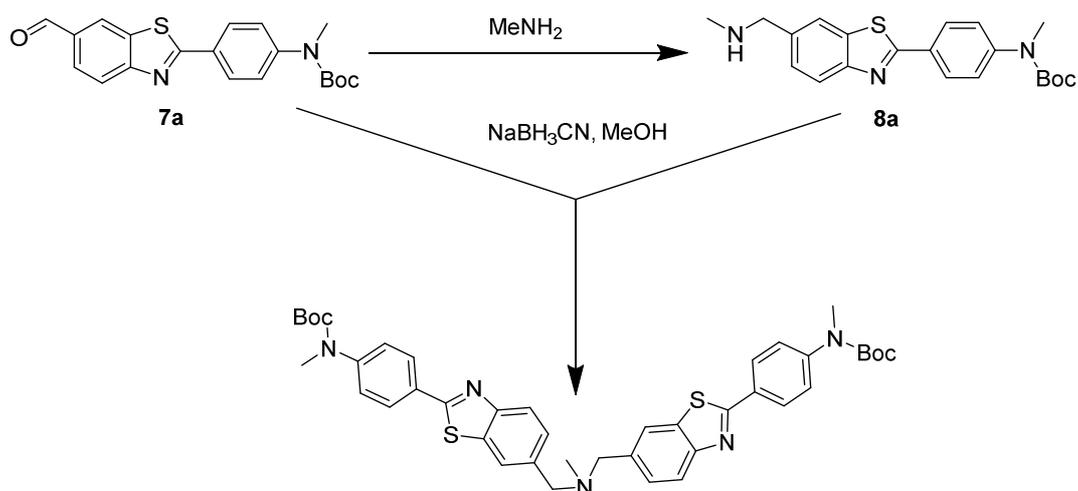


Figure 29. Schéma de synthèse du composé dimérique.

La difficulté à obtenir le composé **8a** a orienté la synthèse vers un protocole plus simple. Des travaux ont démontré l'efficacité des aminations réductrices dans le TFE sans nécessité de solvant sec ou d'atmosphère inerte et avec des temps de réactions inférieurs à 2 heures.[72] Ce protocole permet une cinétique plus rapide de formation de l'imine (maximum ½ heure à 40°C contre 1-2 h à 80°C dans le MeOH). Le réducteur utilisé est le NaBH₄. On forme donc ainsi le produit **8a** désiré avec un rendement compris entre 60-94% (**Tableau 8**).

Tableau 8. Conditions expérimentales de la synthèse du composé 8.

Conditions	Réactif 1	Réactif 2	Réactif 3	Solvant	Tpt	Temps (heure)	Produit formé	Rendement (%)
1	7a	MeNH ₂	NaBH ₄	MeOH	25°C	19	8a	33-96
2	7a	MeNH ₂	NaBH ₄	MeOH	80°C puis r.t.	20	8a	62
3	7a	MeNH ₂	NaBH ₃ CN	MeOH	80°C puis r.t.	19	8a	2
4	7a	MeNH ₂	NaBH ₄	TFE	40°C	1-2	8a	62-94

V. Déprotection du Boc de 8a et purification de la NMA 8b par production de sels chlorhydriques.

V.1. La déprotection de la fonction Boc.

Le composé **8b** est déprotégé de sa fonction Boc pour obtenir l'azote du motif méthylaniline. La réaction se fait en dissolvant le composé **8a** dans un mélange équimolaire de dichlorométhane et d'acide trifluoroacétique (TFA) à 0°C. La réaction se fait en 2 heures avec une conversion totale (**Fig. 30**).

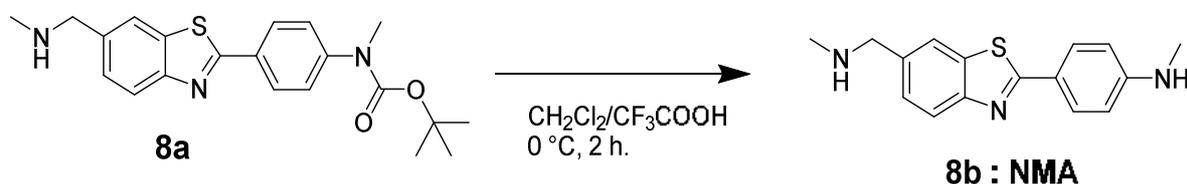


Figure 30. Schéma de réaction de la synthèse du composé **8b** : NMA.

Le mécanisme de la réaction est relativement simple (**Fig. 31**). Un proton active l'oxygène du carbonyle de la fonction carbamate ce qui permet de successivement libérer un isobutène stable, puis le CO_2 afin de donner le produit désiré **8b** : la NMA.

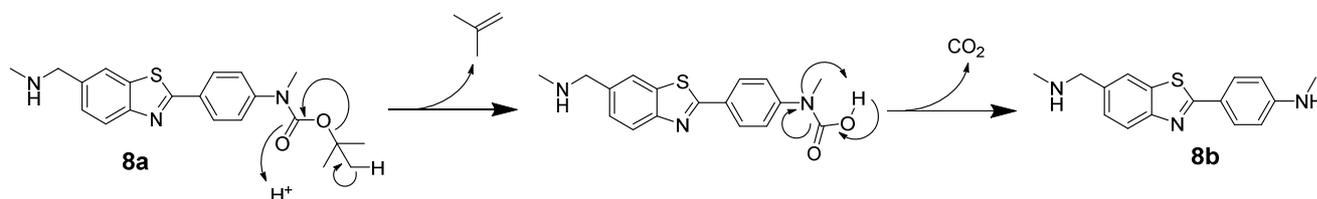


Figure 31. Mécanisme réactionnel de la déprotection de la fonction Boc en milieu acide.

V.2 La formation des sels chlorhydriques de la NMA.

La formation de sels chlorhydriques de la NMA a été choisie afin d'une part de purifier le produit de la réaction de déprotection de la fonction Boc et d'autre part d'avoir une espèce facilement soluble en solution aqueuse.

Un premier protocole (**Fig. 32a**) a été effectué en diluant la NMA dans du MeOH auquel on ajoute à au goutte-à-goutte de l'acide chlorhydrique (HCl) aqueux à environ 12 mol/L. Le sel précipite partiellement et peut être récupéré par centrifugation (10 000 tours/min pendant 10 minutes) et en retirant le surnageant. Le surnageant est de nouveau acidifié pour précipiter d'autres sels. Ceci a permis d'obtenir le sel d'intérêt dont la composition exacte a été déterminée par analyse élémentaire. Il a été découvert que le sel de NMA comportait 2 HCl. Cependant les tentatives suivantes de précipitations ont donné des résultats difficiles à interpréter par analyse élémentaire.

Un second protocole (**Fig. 32b**) a été mis en place afin de limiter la présence de solvants contaminants. La NMA est diluée dans de l'éther diéthylique auquel on ajoute 2 équivalents stricts de HCl en solution dosée à 4,4 mol/L dans le dioxane. Le sel de NMA précipite totalement. Le surnageant est alors retiré, puis le sel est lavé à 5 reprises avec l'éther diéthylique avant d'être séché sous vide. L'analyse élémentaire a confirmé que le précipité était bien du dichlorhydrate de NMA avec une molécule d'eau.

Une partie des sels de NMA sera solubilisée dans l'eau milli-Q à une concentration de 10 mM et servira aux études physico-chimiques avec le peptide A β dont les résultats sont présentés au chapitre IV.

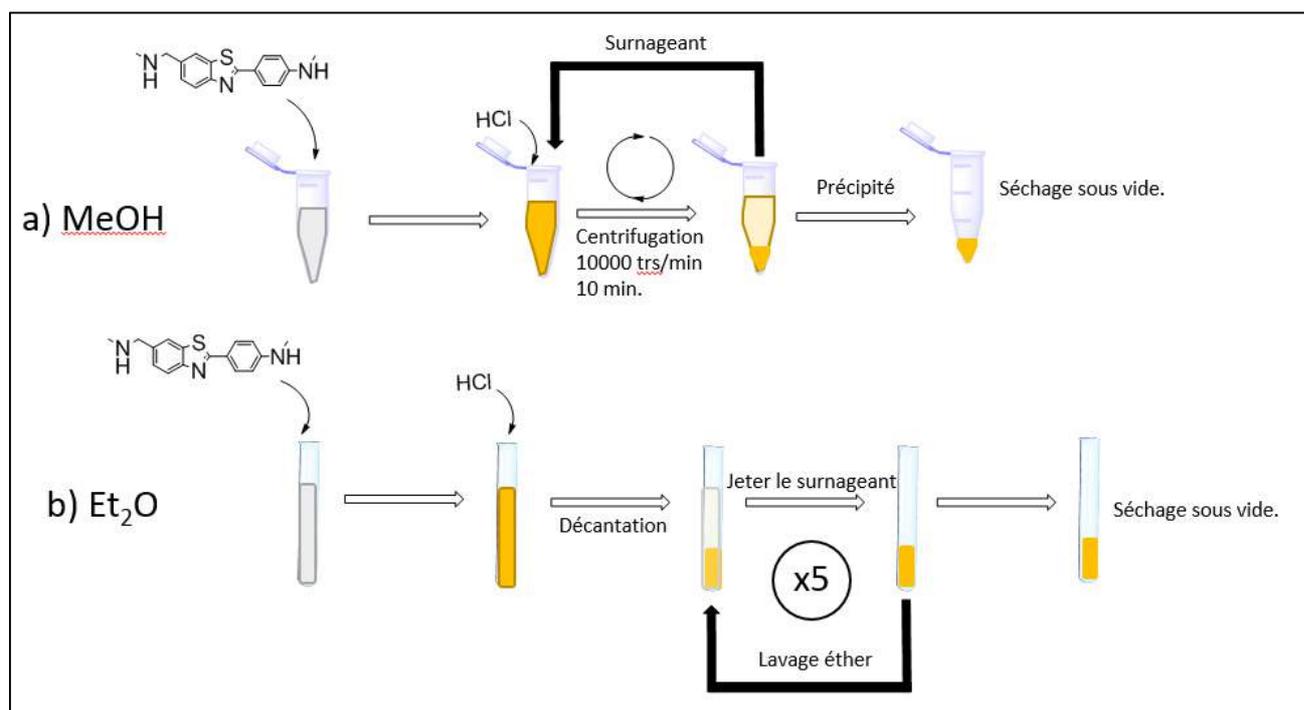


Figure 32. Protocole de formations des sels chlorhydriques de la NMA a) dans le MeOH et b) dans le Et₂O.

VI. Conclusion

La synthèse de la NMA s'est conclue sur un rendement global d'environ 23 % en 11 étapes de synthèse modulaire. Le produit est soluble dans l'eau et ce même à pH physiologique jusqu'à une certaine concentration limite (cf. chapitre IV sur les études physicochimiques). Cette synthèse présente l'avantage de pouvoir être conduite en grandes quantités à l'échelle du gramme et présente par ailleurs l'intérêt de produire différents composés susceptibles d'être modifiés ultérieurement dans le but d'élargir les familles de ligands du peptide A β . Les chapitres suivants traiteront des différentes voies de synthèses utilisées pour parvenir à des ligands originaux à partir des composés produits lors de la synthèse de la NMA.

Bibliographie du chapitre II

1. Hofmann, A.W., *Zur Kenntniss deso-Amidophenylmercaptans*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1887. **20**(1): p. 1788-1797.
2. Hu, R.H., et al., *Catalyst-Free Synthesis of 2-Arylbenthiazoles in an Air/DMSO Oxidant System*. Synlett, 2016. **27**(9): p. 1387-1390.
3. Gorepatil, P.B., Y.D. Mane, and V.S. Ingle, *Samarium(III) Triflate as an Efficient and Reusable Catalyst for Facile Synthesis of Benzoxazoles and Benzothiazoles in Aqueous Medium*. Synlett, 2013. **24**(17): p. 2241-2244.
4. Bahrami, K., M.M. Khodaei, and F. Naali, *Mild and Highly Efficient Method for the Synthesis of 2-Arylbenthiazoles and 2-Arylbenthiazoles*. The Journal of Organic Chemistry, 2008. **73**(17): p. 6835-6837.
5. Hegerschoff, A., *Einwirkung von Halogenen auf Thioharnstoffe*. Ber. Dt. Chem. Ges., 1901. **34**.
6. Hegerschoff, A., *Einwirkung von Brom auf aromatische Thioharnstoffe*. Ber. Dt. Chem. Ges., 1903. **36**.
7. Panizzi, J.-C., et al., *Etude des spectres de vibration du benzothiazole et des oscillations des liaisons CH de quelques uns de ses dérivés*. Canadian Journal of Chemistry, 1971. **49**(6): p. 956-964.
8. Jordan, A.D., C. Luo, and A.B. Reitz, *Efficient conversion of substituted aryl thioureas to 2-aminobenthiazoles using benzyltrimethylammonium tribromide*. J Org Chem, 2003. **68**(22): p. 8693-6.
9. Klunk, W.E., et al., *Imaging the pathology of Alzheimer's disease: amyloid-imaging with positron emission tomography*. Neuroimaging Clin N Am, 2003. **13**(4): p. 781-9, ix.
10. Jouve, K., et al., *Generation and Diels-Alder trapping of 4,5-bis(bromomethylene)-4,5-dihydrothiazole*. European Journal of Organic Chemistry, 1998. **1998**(9): p. 2047-2050.
11. Milstein, D. and J.K. Stille, *A general, selective, and facile method for ketone synthesis from acid chlorides and organotin compounds catalyzed by palladium*. Journal of the American Chemical Society, 1978. **100**(11): p. 3636-3638.
12. Kosugi, M., et al., *Palladium-Catalyzed Coupling between Organic Halides and Organotin Compounds Involving C-N Unsaturated Bonds at the Reaction Centers*. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1986. **59**(2): p. 677-679.
13. Egi, M. and L.S. Liebeskind, *Heteroaromatic Thioether-Organostannane Cross-Coupling*. Organic Letters, 2003. **5**(6): p. 801-802.
14. Miyaura, N., K. Yamada, and A. Suzuki, *A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides*. Vol. 20. 1979. 3437-3440.
15. Majo, V.J., et al., *An efficient palladium catalyzed synthesis of 2-arylbenthiazoles*. Tetrahedron Letters, 2003. **44**(47): p. 8535-8537.
16. Auld, D.S., et al., *A basis for reduced chemical library inhibition of firefly luciferase obtained from directed evolution*. J Med Chem, 2009. **52**(5): p. 1450-8.
17. Kumar, M.R., K. Park, and S. Lee, *Synthesis of Amido-N-imidazolium Salts and their Applications as Ligands in Suzuki-Miyaura Reactions: Coupling of Hetero-aromatic Halides and the Synthesis of Milrinone and Irbesartan*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2010. **352**(18): p. 3255-3266.
18. Yang, J.F., et al., *Room-Temperature Suzuki-Miyaura Coupling of Heteroaryl Chlorides and Tosylates*. European Journal of Organic Chemistry, 2012. **2012**(31): p. 6248-6259.

19. Bort, G., M.S.I. Veitia, and C. Ferroud, *Straightforward synthesis of PET tracer precursors used for the early diagnosis of Alzheimers disease through Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions*. Tetrahedron, 2013. **69**(35): p. 7345-7353.
20. Lu, J.-S., et al., *Formation of Azaborines by Photoelimination of B,N-Heterocyclic Compounds*. Angewandte Chemie International Edition, 2013. **52**(17): p. 4544-4548.
21. Bonin, H., et al., *Highly practical boronic acid surrogates for the Suzuki–Miyaura cross-coupling*. Tetrahedron Letters, 2011. **52**(10): p. 1132-1135.
22. Song, Q., Q. Feng, and M. Zhou, *Copper-Catalyzed Oxidative Decarboxylative Arylation of Benzothiazoles with Phenylacetic Acids and α -Hydroxyphenylacetic Acids with O₂ as the Sole Oxidant*. Organic Letters, 2013. **15**(23): p. 5990-5993.
23. Yang, Z., et al., *Synthesis of 2-Aryl Benzothiazoles via K₂S₂O₈-mediated Oxidative Condensation of Benzothiazoles with Aryl Aldehydes*. The Journal of Organic Chemistry, 2012. **77**(16): p. 7086-7091.
24. Huang, J., et al., *A Highly Efficient Palladium/Copper Cocatalytic System for Direct Arylation of Heteroarenes: An Unexpected Effect of Cu(Xantphos)I*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(11): p. 3674-3675.
25. Yang, F., et al., *Copper-Catalyzed Oxidative Arylation of Heteroarenes under Mild Conditions Using Dioxygen as the Sole Oxidant*. Chemistry – A European Journal, 2011. **17**(23): p. 6321-6325.
26. Sandmeyer, T., *Ueber die Ersetzung der Amidgruppe durch Chlor in den aromatischen Substanzen*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1884. **17**(2): p. 1633-1635.
27. Csomos, P., et al., *An efficient route for the synthesis of 2-arylthiazino[5,6-b]indole derivatives*. Tetrahedron, 2007. **63**(23): p. 4983-4989.
28. Mathur, N., *Studies of solute-solvent interactions and applications of green and blue complexes of copper (II) palmitate with 2-amino benzothiazoles*. Journal of Current Chemical and Pharmaceutical Sciences, 2011. **1**(1).
29. Mahajan, D., J. Bhosale, and R. Bendre, *Synthesis, Characterization and plant growth regulator activity of some substituted 2-amino benzothiazole derivatives*. J. Applicable Chemistry, 2013. **2**: p. 765-771.
30. Sahoo, S.K., et al., *Cu(II) catalysed chemoselective oxidative transformation of thiourea to thioamidoguanidine/2-aminobenzothiazole*. Rsc Advances, 2013. **3**(2): p. 438-446.
31. Naeimi, H. and A. Heidarneshad, *Efficient and facile protocol for one-pot synthesis of 2-amino-substituted benzothiazoles catalyzed by nano-BF₃/SiO₂ under mild conditions*. Research on Chemical Intermediates, 2016. **42**(12): p. 7855-7868.
32. Fischer, E. and A. Speier, *Darstellung der Ester*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1895. **28**(3): p. 3252-3258.
33. Kamal, A., et al., *Combretastatin linked 1,3,4-oxadiazole conjugates as a Potent Tubulin Polymerization inhibitors*. Bioorg Chem, 2016. **65**: p. 126-36.
34. Liu, H.D., et al., *An efficient synthesis of Ceritinib (LDK378) using a Sandmeyer reaction*. Journal of Chemical Research, 2015. **39**(8): p. 475-477.
35. Balz, G. and G. Schiemann, *Über aromatische Fluorverbindungen, I.: Ein neues Verfahren zu ihrer Darstellung*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series), 1927. **60**(5): p. 1186-1190.
36. Barbero, M., S. Cadamuro, and S. Dughera, *Copper-free Sandmeyer cyanation of arenediazonium o-benzenedisulfonimides*. Org Biomol Chem, 2016. **14**(4): p. 1437-41.
37. Taniguchi, T., et al., *Hydrolysis of Diazonium Salts Using a Two-Phase System (CPME and Water)*. Heteroatom Chemistry, 2015. **26**(6): p. 411-416.

38. Matheis, C., et al., *Convenient synthesis of pentafluoroethyl thioethers via catalytic Sandmeyer reaction with a stable fluoroalkylthiolation reagent*. *Organic Chemistry Frontiers*, 2016. **3**(8): p. 949-952.
39. Burke, B.J. and L.E. Overman, *Enantioselective synthesis of six-membered palladacycles having metal-bound stereogenic carbons: isolation and reactivity of palladacycles containing readily accessible beta-hydrogens*. *J Am Chem Soc*, 2004. **126**(51): p. 16820-33.
40. Seganish, W.M. and P. DeShong, *Application of directed orthometalation toward the synthesis of aryl siloxanes*. *J Org Chem*, 2004. **69**(20): p. 6790-5.
41. Gonzalez, P.B., et al., *Experimental and Computational Investigation of the 1,3-Dipolar Cycloaddition of the Ynamide tert-Butyl N-Ethynyl-N-phenylcarbamate with C-Carboxymethyl-N-phenylnitrilimine*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2013. **2013**(36): p. 8108-8114.
42. Tayama, E. and Y. Toma, *Stereoselective preparation of (1Z)- and (1E)-N-Boc-1-amino-1,3-dienes by stereospecific base-promoted 1,4-elimination*. *Tetrahedron*, 2015. **71**(4): p. 554-559.
43. Periyasamy, S. and S. Selvaraj, *Sodium iodide as a novel, chemoselective and highly efficient catalyst for N-tert-butoxy Carbonylation of amines at room temperature*. *J. Chem. Pharm. Res.*, 2016. **8**(1): p. 510-518.
44. Heydari, A., S. Khaksar, and M. Tajbakhsh, *1, 1, 1, 3, 3, 3-Hexafluoroisopropanol: a recyclable organocatalyst for N-Boc protection of amines*. *Synthesis*, 2008. **2008**(19): p. 3126-3130.
45. Viswanadham, B., et al., *Efficient and expeditious chemoselective BOC protection of amines in catalyst and solvent-free media*. *Research on Chemical Intermediates*, 2017. **43**(3): p. 1355-1363.
46. Bonin, H., et al., *Highly practical boronic acid surrogates for the Suzuki-Miyaura cross-coupling*. *Tetrahedron Letters*, 2011. **52**(10): p. 1132-1135.
47. Reilly, M.K. and S.D. Rychnovsky, *DABO Boronates: Stable Heterocyclic Boronic Acid Complexes for Use in Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reactions*. *Synlett*, 2011. **2011**(16): p. 10.1055/s-0030-1261218.
48. Rettig, S.J. and J. Trotter, *Crystal and Molecular-Structure of B-Phenyl-Diptychboroxazolidine, C₆H₅bn(Ch₂ch₂o)₂*. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*, 1975. **53**(10): p. 1393-1401.
49. Rychnovsky, S.D. and M.K. Reilly, *DABO boronates: stable heterocyclic boronic acid complexes for use in Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions*. *Synlett*, 2011(16): p. 2392-2396.
50. Bonin, H., et al., *Base free aryl coupling of diazonium compounds and boronic esters: self-activation allowing an overall highly practical process*. *Chem Commun (Camb)*, 2010. **46**(15): p. 2677-9.
51. Miyaura, N. and A. Suzuki, *Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds*. *Chemical Reviews*, 1995. **95**(7): p. 2457-2483.
52. Han, X., B.M. Stoltz, and E.J. Corey, *Cuprous Chloride Accelerated Stille Reactions. A General and Effective Coupling System for Sterically Congested Substrates and for Enantioselective Synthesis*. *Journal of the American Chemical Society*, 1999. **121**(33): p. 7600-7605.
53. Casado, A.L. and P. Espinet, *Quantitative evaluation of the factors contributing to the "copper effect" in the Stille reaction*. *Organometallics*, 2003. **22**(6): p. 1305-1309.
54. Mee, S.P., V. Lee, and J.E. Baldwin, *Stille coupling made easier-the synergic effect of copper(I) salts and the fluoride ion*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2004. **43**(9): p. 1132-6.
55. Amatore, C., A. Jutand, and G. Le Duc, *The triple role of fluoride ions in palladium-catalyzed Suzuki-Miyaura reactions: unprecedented transmetalation from [ArPdFL₂] complexes*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012. **51**(6): p. 1379-82.
56. Grimaud, L. and A. Jutand, *Role of Fluoride Ions in Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions*. *Synthesis-Stuttgart*, 2017. **49**(6): p. 1182-1189.

57. Nystrom, R.F. and W.G. Brown, *Reduction of organic compounds by lithium aluminum hydride. I. Aldehydes, ketones, esters, acid chlorides and acid anhydrides*. Journal of the American Chemical Society, 1947. **69**(5): p. 1197-1199.
58. Shlyakhtina, N.I., et al., *Synthesis, characterization, and preliminary fluorescence study of a mixed-ligand bis(dicarbollyl)nickel complex bearing a tryptophan-BODIPY FRET couple*. Journal of Organometallic Chemistry, 2015. **798**: p. 234-244.
59. Flick, A.C., et al., *Synthetic Approaches to the New Drugs Approved During 2015*. J Med Chem, 2017.
60. Klinchan, C., et al., *Synthesis and Study of Naphthoquinones Derivatives*. Applied Mechanics and Materials, 2016. **855**: p. 26-30.
61. Li, J.L., et al., *Synthesis of the ABC Tricyclic System of Daphnicyclidin A*. Org Lett, 2017. **19**(7): p. 1497-1499.
62. Richers, J., et al., *Synthesis and Neurotrophic Activity Studies of Illicium Sesquiterpene Natural Product Analogues*. Chemistry, 2017. **23**(13): p. 3178-3183.
63. Xiong, Z., et al., *Synthesis and bioactivities of Phenazine-1-carboxylic acid derivatives based on the modification of PCA carboxyl group*. Bioorg Med Chem Lett, 2017. **27**(9): p. 2010-2013.
64. de Nooy, A.E.J., A.C. Besemer, and H. van Bekkum, *Selective oxidation of primary alcohols mediated by nitroxyl radical in aqueous solution. Kinetics and mechanism*. Tetrahedron, 1995. **51**(29): p. 8023-8032.
65. Sheldon, R.A., et al., *Green, catalytic oxidations of alcohols*. Acc Chem Res, 2002. **35**(9): p. 774-81.
66. Pan, W., et al., *Design, synthesis and evaluation of novel ferulic acid-memoquin hybrids as potential multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease*. Bioorg Med Chem Lett, 2016. **26**(10): p. 2539-43.
67. Li, L.X., Z.M. Li, and Q.R. Wang, *A Novel Construction of 2-Benzazepine Scaffold Based on TiCl₄-Mediated Tandem Mannich Reaction - Aromatic Electrophilic Substitution*. Helvetica Chimica Acta, 2009. **92**(12): p. 2754-2761.
68. Philippe, N., et al., *Highly stereoselective Friedel-Crafts type cyclization. Facile access to enantiopure 1,4-dihydro-4-phenyl isoquinolinones*. Tetrahedron, 2003. **59**(40): p. 8049-8056.
69. Borch, R.F. and H.D. Durst, *Lithium cyanohydridoborate, a versatile new reagent*. Journal of the American Chemical Society, 1969. **91**(14): p. 3996-3997.
70. Borch, R.F., M.D. Bernstein, and H.D. Durst, *Cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent*. Journal of the American Chemical Society, 1971. **93**(12): p. 2897-2904.
71. Lane, C.F., *Sodium Cyanoborohydride - A Highly Selective Reducing Agent for Organic Functional Groups*. Synthesis, 1975. **1975**(03): p. 135-146.
72. Tajbakhsh, M., et al., *Catalyst-Free One-Pot Reductive Alkylation of Primary and Secondary Amines and N,N-Dimethylation of Amino Acids Using Sodium Borohydride in 2,2,2-Trifluoroethanol*. Synthesis-Stuttgart, 2011. **2011**(3): p. 490-496.

Chapitre III

Table des matières

Chapitre III : Synthèses de dérivés du 2-aryl-BzT pour les études en physico-chimie.	73
I. Introduction.....	73
II. Synthèse des composés 12b et 16b : la sonde 2-aryl-BzT radicalaire	74
II.1. Synthèse du composé 12b par amination réductrice	75
II.1.a. Voie 1 : intégration du motif 4-amino-TMP	75
II.1.a. Voie 2 : intégration du motif 4-amino-TEMPO	77
II.2. Synthèse du composé 16b par amidation.	80
II.2.a. Production des composés 13a/13b	80
II.2.b. Voie 1 : intégration du motif 4-amino-TMP	81
II.2.c. Voie 2 : introduction du 4-amino-TEMPO.....	82
III. Synthèse du composé 9b : la sonde 2-aryl-BzT de photoaffinité.....	84
III.1. Formation de la diaziridine.	84
III.2. Formation de la diazirine et activation du groupement carboxylate	85
III.3. Réaction de couplage entre la NMA protégée au Boc et le dérivé diazirine.	86
III.3.a. Description de la réaction de couplage.	86
III.3.b. Description des spectres RMN du composé 9a	87
III.3.c. Déprotection de la fonction Boc portée par le composé 9a	90
IV. La Chimie click et la fonction azoture	91
IV.1. Généralités	91
IV.2. Réactivité des azotures.....	92
IV.3. La réaction de cycloaddition (3+2) de Huisgen	94
IV.4. Fonctionnalisation du motif 2-aryl-BzT par cycloaddition de Huisgen.....	95
IV.5. Voie d'accès au dérivé azoture.....	96
IV.5.a. Voie A indirecte par la formation du dérivé tosylate.	97
IV.5.b. Voie B directe à partir de l'alcool.....	101
IV.6. Déprotection de la méthylaniline du composé 18a	103
V. Réaction avec les composés 18a/18b	103
V.1. Formation de l'amine	103
V.1.a. Hydrogénation catalytique.....	104
V.1.b. La réaction de Staudinger	104
V.2. La cycloaddition Azoture-Alcyne catalysée au cuivre (CuAAC).....	106
VI. Publication de la structure du complexe $[\text{Cu}(\text{Cl}_2)(\mathbf{20a})]_n$	107
VII. Conclusion et perspectives.	114
Bibliographie du Chapitre III.....	115

Chapitre III : Synthèses de dérivés du 2-aryl-BzT pour les études en physico-chimie.

I. Introduction

Comme énoncés dans la partie V du chapitre 1 : les travaux portent sur l'étude de l'agrégation du peptide A β et l'identification du site d'interaction entre les dérivés 2-aryl-BzT et le peptide A β . Pour cela, plusieurs dérivés des 2-aryl-BzT ont été synthétisés. Chacun étant associé à une technique pour permettre soit l'étude de l'agrégation soit l'identification des sites d'interaction (**Fig. 1**).

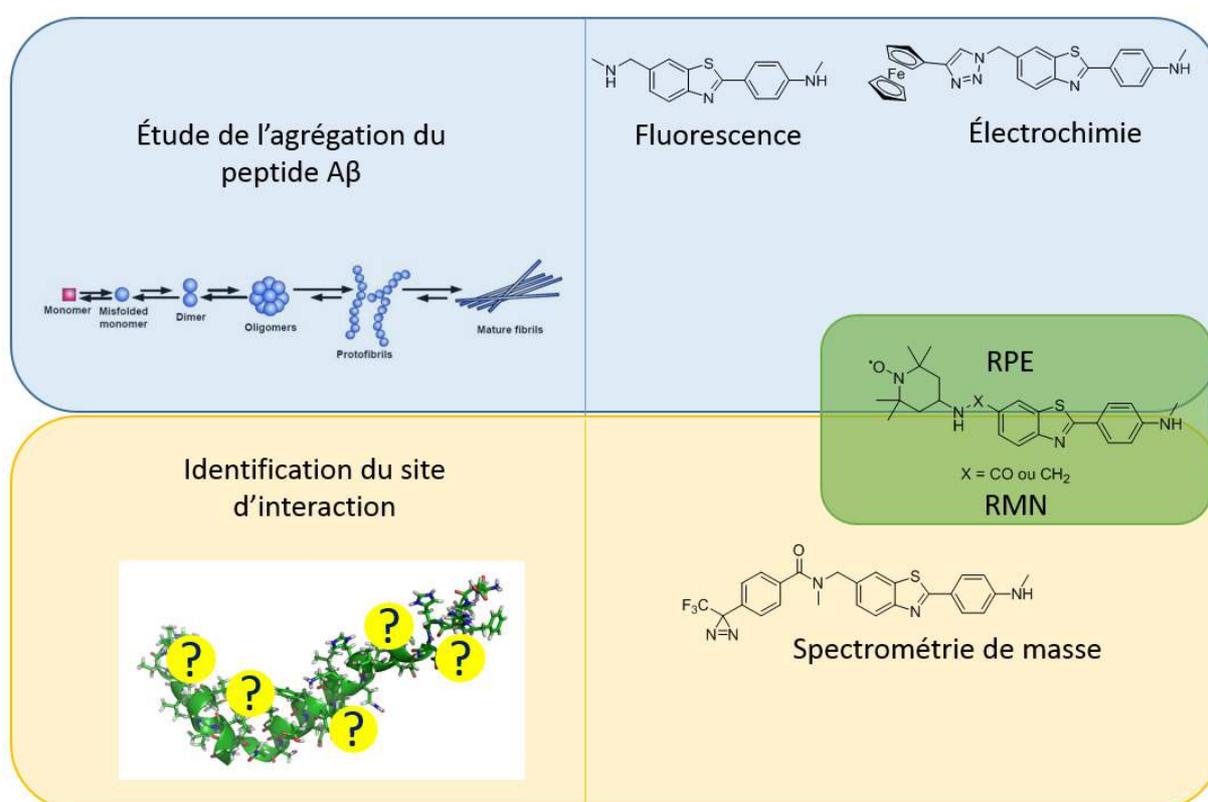


Figure 1. Molécules synthétisées pour l'étude de l'agrégation ou pour l'identification du site d'interaction.

II. Synthèse des composés 12b et 16b : la sonde 2-aryl-BzT radicalaire

L'accès au composé TEMPO-BTA-1 a été envisagé selon 2 approches différentes : la première dans laquelle le dérivé TEMPO sera lié au 2-aryl-BzT par amination réductrice (**Fig. 2A**), et la deuxième dans laquelle la liaison se fera par une liaison amide (**Fig. 2B**). Chacune de ces approches seront déclinées en 2 voies (voies **1** et **2**), une dans laquelle le motif 4-amino-2,2,6,6-tetraméthylpipéridine (4-amino-TMP) sera ajouté avant d'être oxydé en 4-amino-2,2,6,6-tetraméthylpipéridine-1-oxyl (4-amino-TEMPO) et l'autre où l'ajout de la 4-amino-TEMPO se fera directement sur la structure 2-aryl-BzT. L'intérêt de la voie **1** permettra de valider (par RMN, impossible avec le TEMPO) les conditions d'amination réductrice dans un cas, et d'amidation dans l'autre et qui seront extrapolables à la voie **2**.

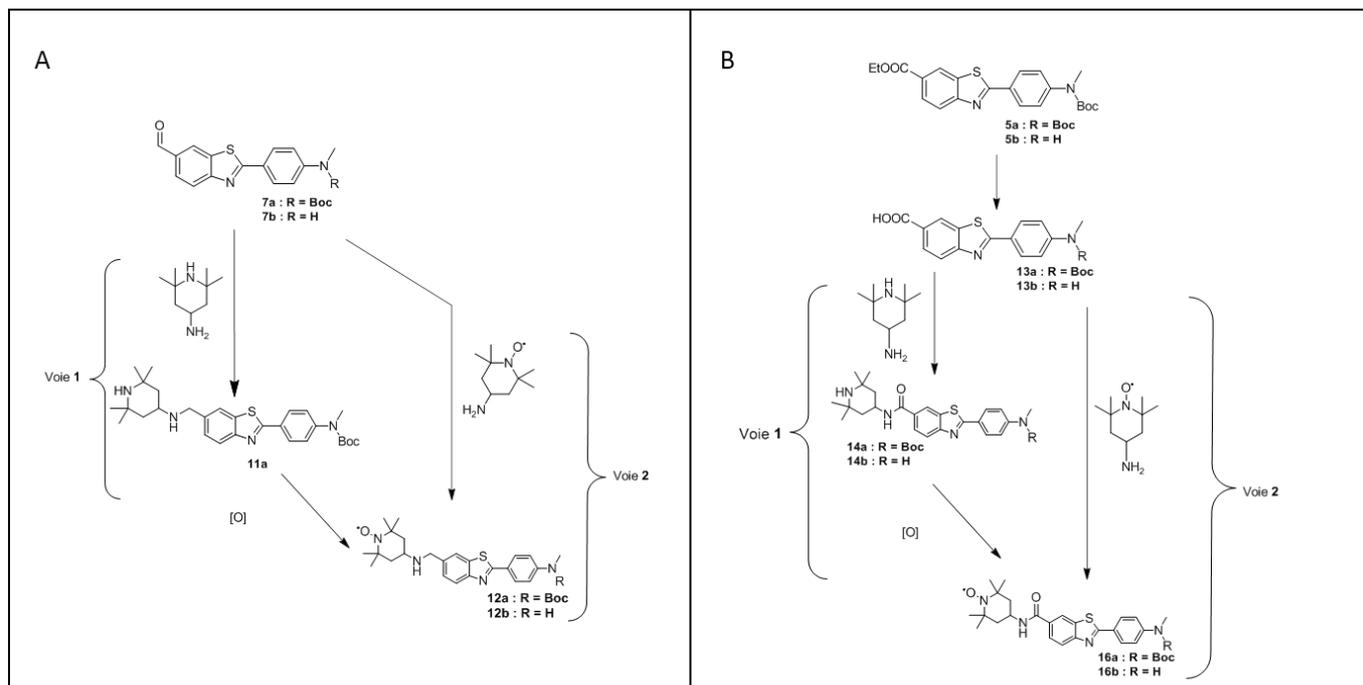


Figure 2. Schémas de synthèse d'ajout de la fonction TEMPO. A : approche par amination réductrice. B : approche par amidation.

II.1. Synthèse du composé 12b par amination réductrice

II.1.a. Voie 1 : intégration du motif 4-amino-TMP

La synthèse du composé **11a** se fait par une réaction d'amination réductrice dans le MeOH par du NaBH₃CN.[1, 2] La CCM (cyclohexane/acétate d'éthyle, 6/4) indique une consommation du réactif de départ (Rf = 0,32) ainsi que la formation de la supposée l'amine. Cependant, le spectre RMN ¹H indique une absence d'un pic entre 4 et 5 ppm intégrant pour 2 protons, ce qui aurait indiqué la présence de groupe CH₂-NH et la présence d'un singulet à 8,50 ppm. On en déduit que la réaction a formé l'imine sans la réduire bien qu'ayant duré 3 jours et avec un traitement au NH₄Cl aqueux, le singulet pouvant être attribué au proton de l'imine -N=CH- fortement déblindé. Cette réaction a été effectuée avec un rendement proche de 80%.

L'imine **10a** a ensuite été réduite en amine **11a** en présence de NaBH₄ dans le MeOH avec un rendement de 85%.

La synthèse du composé **12a** à partir du composé **11a** est une oxydation de l'azote pour former le radical nitroxy. Cette réaction d'oxydation introduit un atome d'oxygène sur l'amine secondaire. Adaptée à partir du brevet de l'équipe de Soma (**Fig. 3**), elle se fait dans le CH₂Cl₂ en présence d'acide métachloroperbenzoïque (mCPBA) en excès sur la nuit.[3]

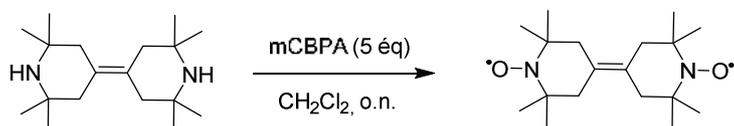


Figure 3. Schéma réactionnel décrit par Soma et al.[3]

Cependant dans notre cas, il existe 2 amines secondaires dans la structure du composé **11a** (**Fig. 4**). Afin de valider la sélectivité sur l'amine du cycle, des tests ont été effectués sur la 4-amino-TMP pour l'oxyder en 4-amino-TEMPO avant de faire la réaction sur le composé **11a**.

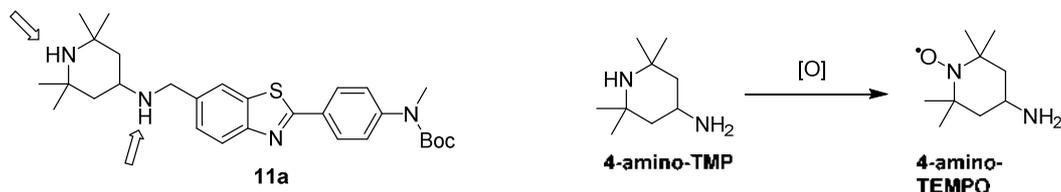


Figure 4. A gauche : site possible d'oxydation d'amine secondaire. A droite : Tests de la sélectivité de l'oxydation avec la 4-amino-TMP

Le milieu réactionnel contenant la 4-amino-TMP, au départ incolore, devient orange-rouge à l'ajout du mCPBA. Des massifs en RMN ^1H élargis sont observés sur le spectre du brut réactionnel après le traitement, en particulier dans la zone comprise entre 7 et 8 ppm pouvant être attribué au mCPBA ou bien à l'acide m-chlorobenzoïque. D'après la RMN, il est difficile de conclure sur le succès de la réaction et la formation du produit puisque la présence d'un électron célibataire perturbe fortement les signaux des protons de son voisinage proche. Sur le spectre RMN de la 4-amino-TEMPO commerciale on ne distingue aucun signal de proton de la molécule, le produit a donc été analysé par SM (ESI). On distingue le pic de plus haute intensité $m/z = 172,08$ dont la masse correspond bien à la 4-amino-TEMPO protonée. Pourtant le pic $m/z = 173,08$ a une intensité relative de 25% au lieu de 9,7% en théorie. Ceci nous amène à supposer que le radical nitroxy a été réduit puis protoné, ce qui peut en partie expliquer l'allure des pics élargis du spectre RMN du produit brut. Un autre pic à $m/z=187,08$ a attiré notre attention, d'après Rosen,[4] il pourrait s'agir du composé 4-oxime-TEMPO réduit, on a donc une indication que l'ajout d'oxygène peut se faire sur les deux azotes (Fig. 5).

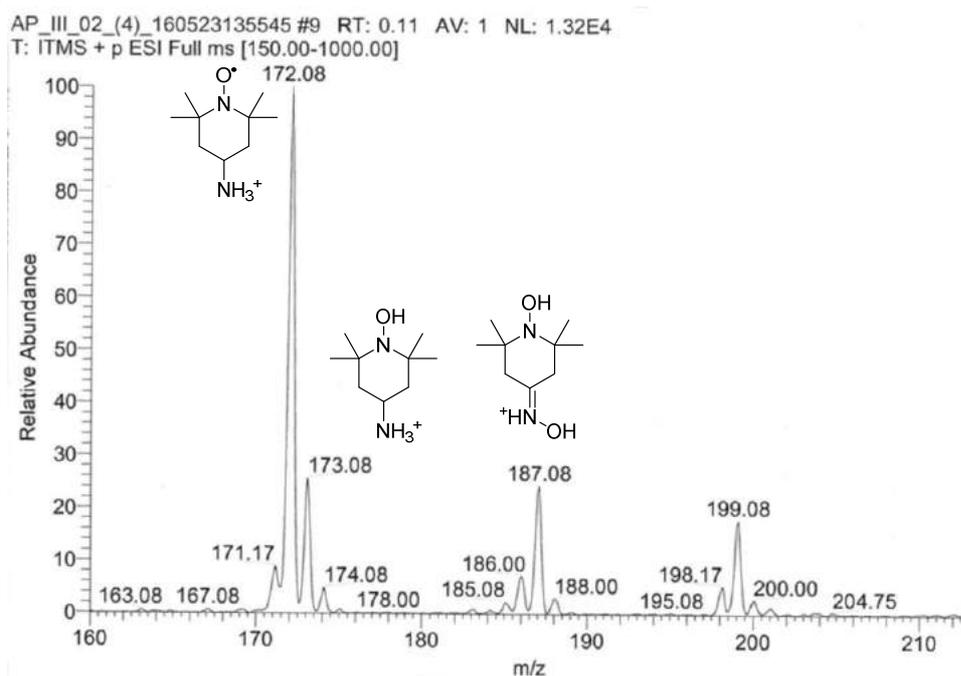


Figure 5. Spectre de masse (ESI) des composés oxydés de la 4-amino-TMP.

La réaction sur modèle, même si elle indique la formation du produit désiré, montre une faible sélectivité. Le transfert de cette réaction sur le cas réel est donc délicat, voilà pourquoi cette réaction en voie **1** a été abandonné au profit de la voie **2**.

II.1.a. Voie 2 : intégration du motif 4-amino-TEMPO

La voie **2** comme précisé précédemment consiste en l'adjonction directe d'un dérivé du TEMPO comportant le radical nitroxyyle sur le composé **7a/7b** (**Fig. 2**). Cependant les aminations réductrices dans les mêmes conditions que celles dans la voie **1** n'ont pu conduire à la formation du composé **12a/12b** désiré (**Tableau 1**) car seul l'alcool correspondant à la réduction du produit de départ était isolé. Une mise au point de cette approche a été effectuée avec une réaction modèle en utilisant la 4-fluorobenzaldéhyde (modèle du composé **7a/7b**) afin de contrôler la formation de l'imine et sa réduction en amine (**Fig. 6**).

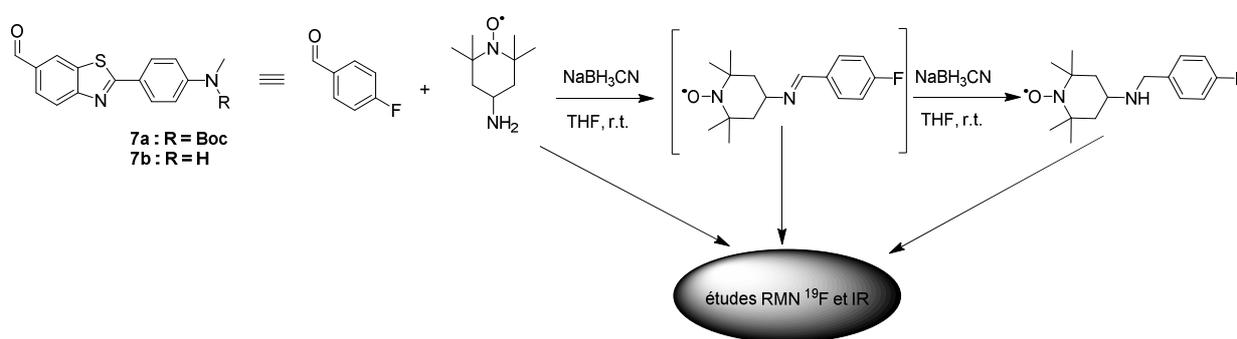


Figure 6. Le 4-fluorobenzaldéhyde, modèle de **7a/b**, et les formes imines et amines des adduits.

L'idée ici est d'utiliser la RMN du ^{19}F pour compléter l'analyse par l'IR des différentes fonctions chimiques : aldéhyde, imine, amine. La réaction est effectuée en mélangeant la 4-fluorobenzaldéhyde, la 4-amino-TEMPO et le NaBH_3CN dans le THF en s'inspirant des travaux de Abdel-Magid *et al.* [5] Nous avons ensuite effectué un suivi de formation de l'imine et de l'amine par RMN du ^{19}F et IR a été faite sur différents temps (0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 22 ; 41 heures). Cela nous a permis de constater un impact mineur du radical nitroxyyle sur le signal ^{19}F RMN. On note 2 pics du fluor à partir d'une ½ heure ; un à -102,4 ppm correspondant au 4-fluorobenzaldéhyde l'autre à -109,4 ppm correspondant vraisemblablement à l'adduit imine formée par la 4-amino-TEMPO et le fluorobenzaldéhyde (**Annexe I**). Un groupe de pic est ensuite apparu après 1h de réaction entre -114,9 et -115,9 ppm. Le pic correspondant au fluorobenzaldéhyde disparaît après 24 h de réaction (**Fig. 7**).

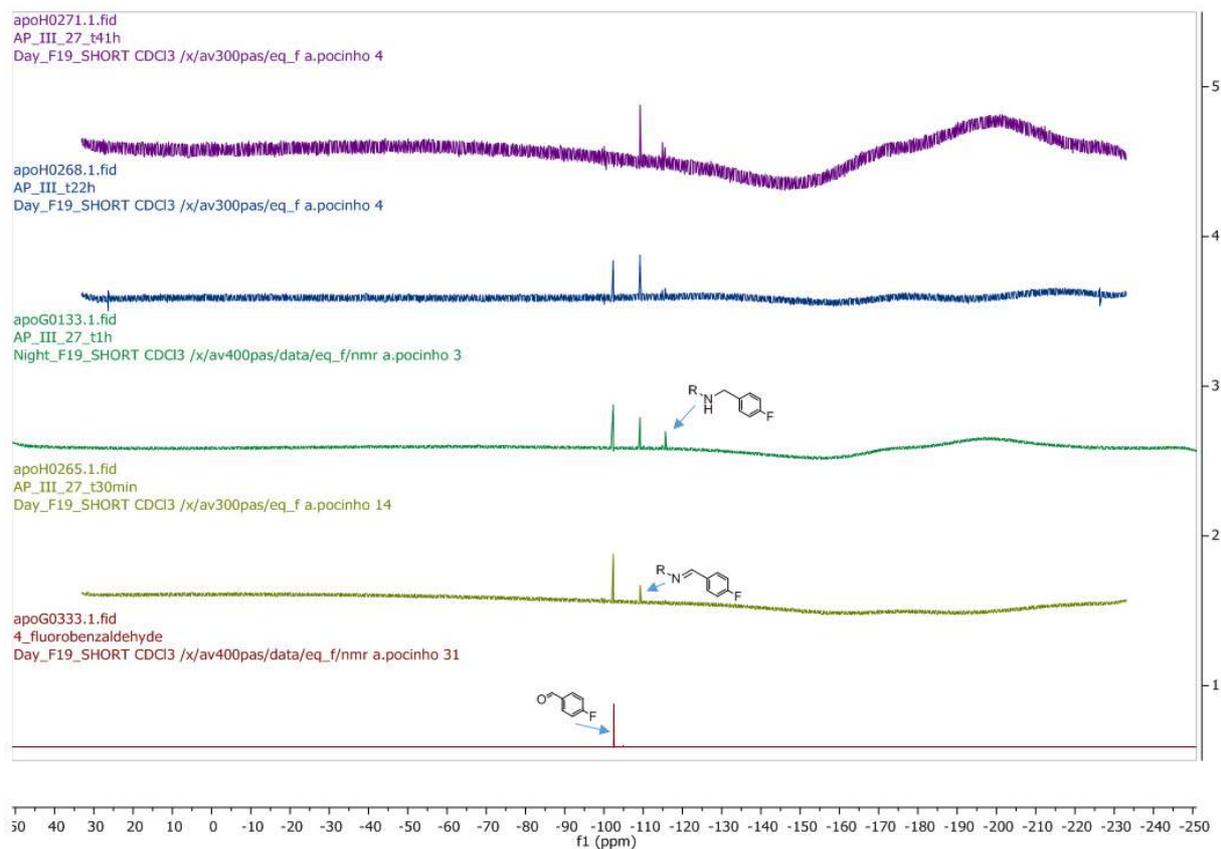


Figure 7. Spectre ^{19}F de la réaction d'amination réductrice à différents temps (du rouge au violet) : 0 ; 0,5 ; 1 ; 22 ; 41 heures.

Les résultats RMN nous ont permis d'évaluer que même après 41 heures on ne formait pas totalement l'amine. Il apparaît donc que la réaction d'amination réductrice ne présente qu'une efficacité modérée dans le THF. Concernant les spectres IR, 2 raies sont observées aux alentours de la zone des entre $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$: une raie vers 1693 cm^{-1} attribuée à l'élongation de la liaison $\text{C}=\text{O}$ de l'aldéhyde ; une autre raie vers 1640 cm^{-1} attribuée à la liaison $\text{C}=\text{N}$ de l'imine (**Annexe II**). Bien que la spectroscopie IR permette de discriminer les raies correspondant à l'aldéhyde et à l'imine, l'évaluation d'une consommation complète de l'aldéhyde reste difficile puisque sa raie correspondante se retrouverait dans le pied de la bande de l'imine. De plus la préparation de l'échantillon pour acquérir son spectre IR oblige à déposer une goutte à l'air libre avant de sécher, ce qui augmente le risque d'hydrolyse de l'imine régénérant l'aldéhyde, faussant ainsi l'évaluation de sa consommation au cours du temps.

Ceci a orienté la synthèse vers une voie plus simple (non anhydre) avec l'utilisation du TFE (décrite dans le chapitre 1) d'après Tajbakhsh *et al.*[6] Elle présente l'avantage de former l'imine quantitativement en moins de 20 minutes avant d'ajouter le NaBH_4 pour faire la réduction qui se fait totalement en 1 à 2 heures. Cette voie d'amination réductrice en solvant TFE est très prometteuse et a été retenue au regard de la vitesse

à laquelle elle produit l'imine puis l'amine. Elle a été testée sur le composé **7b** pour donner directement le composé **12b** d'intérêt pouvant servir aux expériences RPE (**Fig. 8**).

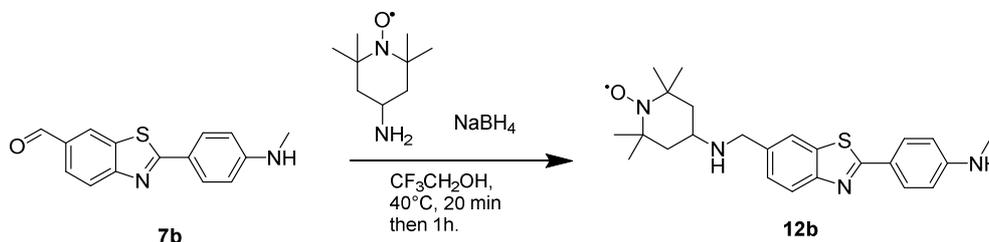


Figure 8. Synthèse du composé **12b** à partir du composé **7b**.

Le rendement extrêmement faible de la réaction avec le TFE est imputé à la difficulté de purification du composé sur colonne en phase directe (**Tableau 1**).

Tableau 1. Conditions de réaction pour la voie B.

Conditions	Réactif 1	Réactif 2	Réactif 3	Solvant	Temps (h)	Rendement
1a	7a	4-amino-TEMPO	NaBH ₃ CN (ajouté après 2h)	MeOH	16	X
1b	7a	4-amino-TEMPO	NaBH ₃ CN (ajout en même temps)	MeOH	16	X
2	7b	4-amino-TEMPO	NaBH ₄	TFE	2-3	10 %

La caractérisation par RMN du composé **12b** reste très difficile à analyser. Cependant son spectre SM en ESI est univoque en dépit de la présence d'un pic $[M+H]^+$ $m/z = 425,08$ qui pourrait là encore indiquer qu'une très large quantité (au moins 70 %) du radical nitroxy a été réduit en nitroxyde par le NaBH₄. Le pic moléculaire $[M+H]^+$ $m/z = 424,08$ attendu est obtenu avec un second pic $m/z = 253,08$ correspondant à un produit de fragmentation benzylique (**Fig. 9**).

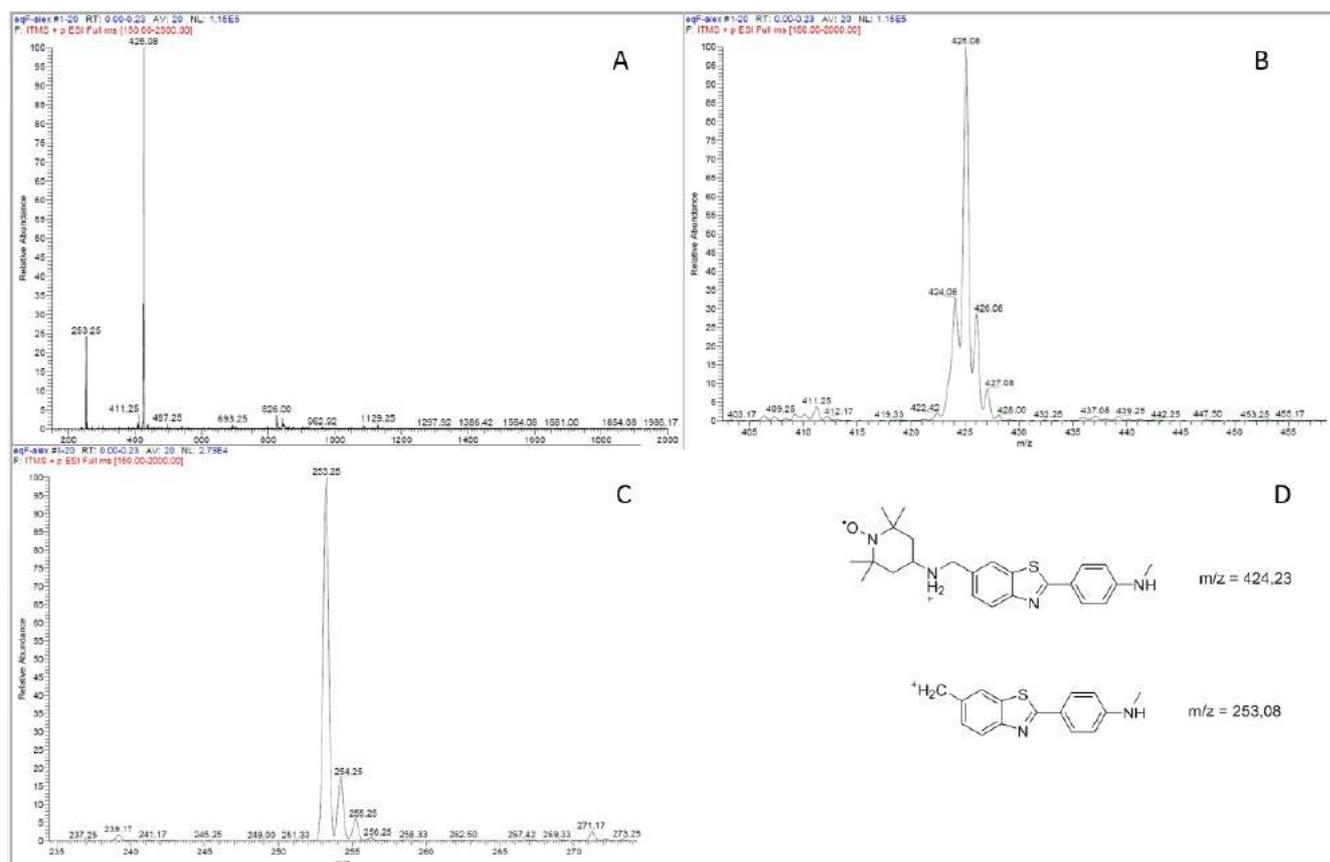


Figure 9. A : Spectre SM du composé **12b**. B : Agrandissement entre 405 et 455. C : Agrandissement entre 235 et 270. D : Structure des ions moléculaires pour le pic $m/z = 424.08$ et $m/z = 253.25$

La synthèse du composé **12b** est donc possible mais elle n'est pas satisfaisante en raison d'une part du faible rendement obtenu et d'autre part de la neutralisation du radical qui la rend très peu utile pour des expériences en RPE. Voilà pourquoi cette molécule n'a pas été utilisée par la suite pour les expériences RPE avec le peptide A β .

II.2. Synthèse du composé 16b par amidation.

II.2.a. Production des composés 13a/13b.

La synthèse du composé **13b** se fait à partir du composé **5a** en 2 étapes : une estérification suivie d'une déprotection ou bien l'inverse (**Fig. 10**).

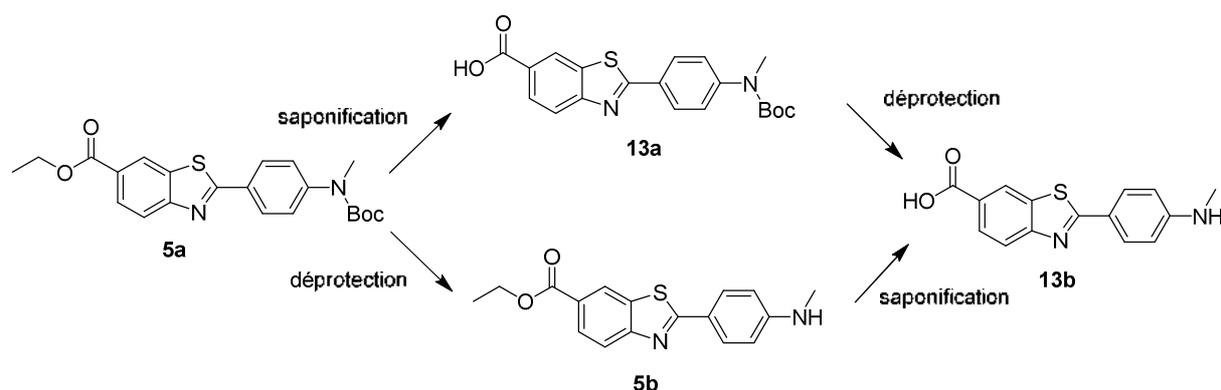


Figure 10. Voies de synthèse des composés **13a** et **13b** à partir du composé **5a**.

Les réactions de saponification se font dans un mélange CH₃OH/ACN avec de l'hydroxyde de potassium avec un rendement compris entre 70 et 100 %. Les réactions de déprotection de la fonction Boc se font de la même manière que décrite dans le chapitre 2 de la synthèse de la NMA §IV.1. Ici l'obtention du produit **5b** s'est faite avec un rendement de 50%, le produit **13b** quant à lui a été obtenu depuis le produit **13a** avec un rendement quantitatif. Les produits **13a** et **13b** ont été utilisés ensuite pour les réactions d'amidation avec les dérivés 4-amino-TMP et 4-amino-TEMPO.

II.2.b. Voie 1 : intégration du motif 4-amino-TMP

Voie directe d'amidation

L'ajout du motif 4-amino-TMP sur le composé **13a/13b** s'est produit en activant *in situ* l'acide carboxylique par 2 procédés :

- Une activation par le couple 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC), et de la diméthylaminopyridine (DMAP), dont les différentes réactions testées sont présentées ci-dessous (**Tableau 2**).

Tableau 2. Réactions effectuées par couplage direct avec le couple EDC/DMAP.

N°	Composé	Réactif	Réactif	Réactif	Temps (h)
1	13b	EDC (1,3 éq)	DMAP (5 éq)	X	8
2	13b	EDC (1,3 éq)	DMAP (1 éq)	X	18
3	13a	EDC (1,3 éq)	DMAP (0,1 éq)	NEt ₃ (1 éq)	72
4	13a	EDC (1,3 éq)	DMAP (0,1 éq)	DBU (1,2 éq)	96

Les voies de synthèse permettent une formation du produit mais également d'autres sous-produits. De plus la purification, très difficile en phase directe, n'a pas permis un isolement du produit désiré de manière efficace. Ceci a conduit à un changement de stratégie d'activation du carboxylate par formation du chlorure d'acyle *in situ* permettant la réaction d'amidation avec l'ajout de l'amine.

- La réaction fut tentée avec le SOCl₂ comme agent de chloration en présence du DMF sans succès.[7, 8] Elle a ensuite été réalisée avec la *N,N,N',N'*-tétraméthylchloroformamidinium hexafluorophosphate (TCFH) comme agent de chloration et de *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) comme base.[9, 10] Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 3**).

Tableau 3. Conditions expérimentales pour la formation *in situ* du chlorure d'acyle.

N°	Acide	Réactif	Réactif	Solvant	Temps (h)	Rendement (%)
1	13a	SOCl ₂	DMF	CH ₂ Cl ₂	18	0
2	13a	TCFH	DIPEA	CH ₂ Cl ₂	18	4

La purification du produit reste difficile en raison de l'amine secondaire qui retient le produit sur la silice en phase directe. Le produit désiré **14a** a été obtenu avec un rendement de 4 %. En dépit du faible rendement il a été décidé de conserver cette voie de réaction pour la tester avec le dérivé 4-amino-TEMPO et donc d'abandonner la voie **1** au profit de la voie **2**.

II.2.c. Voie 2 : introduction du 4-amino-TEMPO

Voie directe d'amidation par l'utilisation du TCFH/DIPEA

L'amidation a donc été testée avec le dérivé 4-amino-TEMPO et le composé **13a** en présence de TCFH/DIPEA. Elle n'a conduit qu'à un rendement de l'ordre de 14 %. Le résultat est meilleur qu'avec le dérivé 4-amino-TMP mais cela reste insuffisant pour obtenir le composé en quantité suffisante. L'approche a donc été changée en utilisant un autre moyen d'activation du carboxylate par l'utilisation de le *N*-hydroxysuccinimide (NHS).

Voie indirecte d'amidation par formation d'un acide activé par la NHS.

Afin de faciliter les purifications, une activation de l'acide carboxylique par le NHS a été choisie, cette approche permet d'isoler un dérivé plutôt stable à l'hydrolyse et pouvant être stocké à basse température. Cette réaction s'effectue dans le THF anhydre avec l'EDC, et la DMAP.[11] Celle-ci se produit en 3 étapes

selon le mécanisme suivant : i) déprotonation de l'acide carboxylique par l'EDC, celle-ci permet d'exacerber le caractère électrophile du carbone de la carbodiimide ii) celui-ci est dès lors attaqué par le carboxylate pour former un adduit carboxylate-EDC qui est à son tour attaqué par la DMAP pour former un adduit carboxyl-DMAP. iii) le NHS est ensuite déprotonné par l'EDC permettant l'attaque sur l'adduit pour régénérer la DMAP et former l'ester activé de l'acide carboxylique (**Fig. 11**). Le produit peut être facilement purifié sur colonne avec un gradient d'un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle.

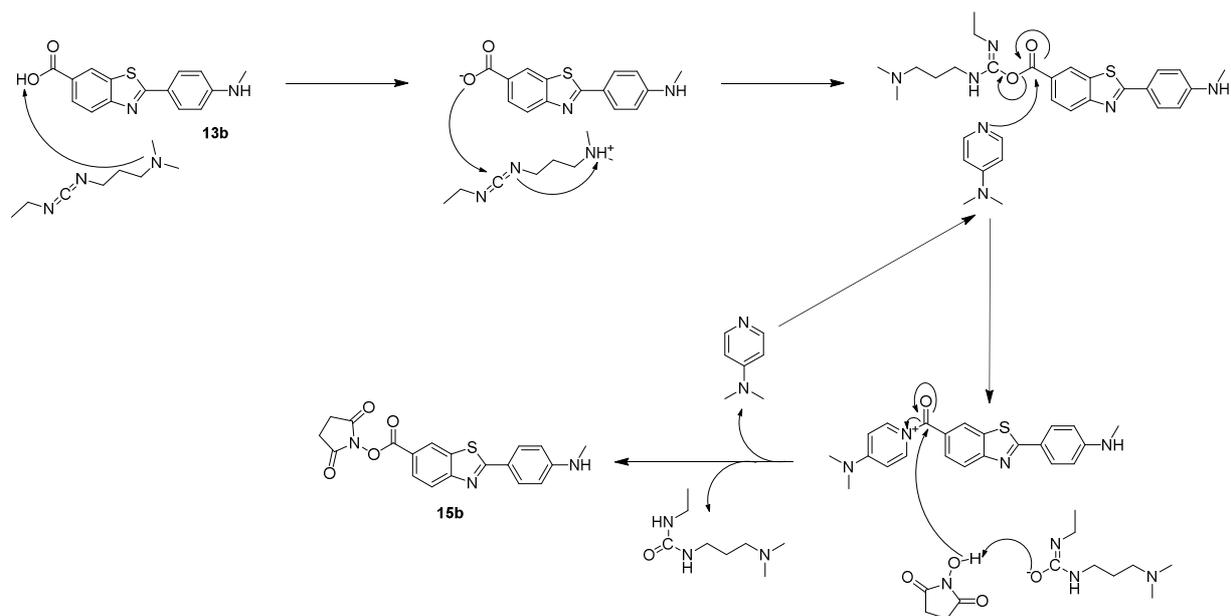


Figure 11. Mécanisme réactionnel de l'activation de l'acide carboxylique par la NHS.

L'ester de NHS peut ensuite être converti en amide par l'ajout de la 4-amino-TEMPO en présence de TEA dans le CH_2Cl_2 , le produit désiré **16b** peut être isolé avec un rendement de 87 % (**Fig. 12**).

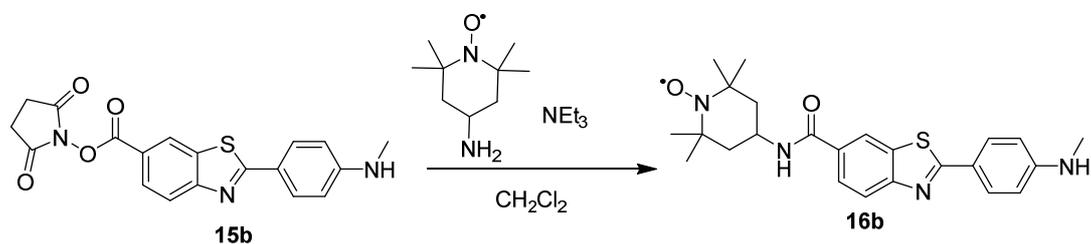


Figure 12. Schéma réactionnel de l'amidation du composé **15b** en **16b**.

Cette voie de synthèse par amidation a permis l'obtention du composé **16b** avec un rendement de 42 % depuis le produit **5a**.

III. Synthèse du composé 9b : la sonde 2-aryl-BzT de photoaffinité

III.1. Formation de la diaziridine.

La formation de la diaziridine est effectuée à partir d'acide 4-trifluoroacétylbenzoïque en 4 étapes de synthèse (**Fig. 13**) :

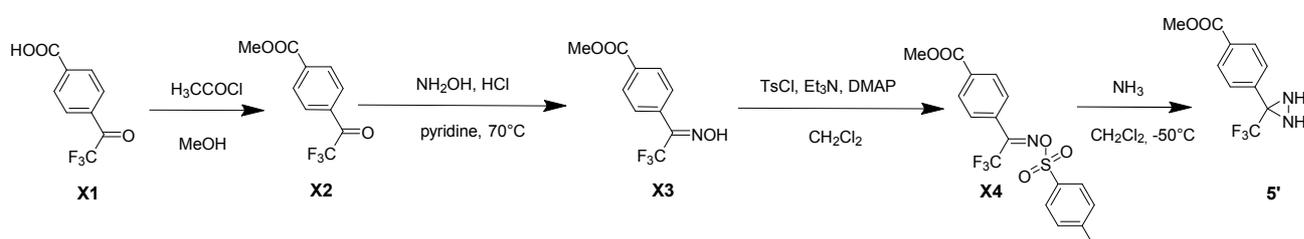


Figure 13. Enchaînement réactionnel pour obtenir le composé **5'** depuis l'acide 4-trifluoroacétylbenzoïque.

Elle commence par la méthylation de la fonction COOH de l'acide 4-trifluoroacétylbenzoïque en présence du chlorure d'acétyle dans le méthanol pour obtenir l'ester de méthyle **X2** correspondant avec un très bon rendement (supérieur à 90%). La formation d'un sous-produit comportant un acétal a été observée et peut s'expliquer par le très fort effet inductif du groupement trifluorométhyle (**Fig. 14**). Cette espèce a cependant pu être engagée pour la suite des réactions sans engendrer de difficultés.

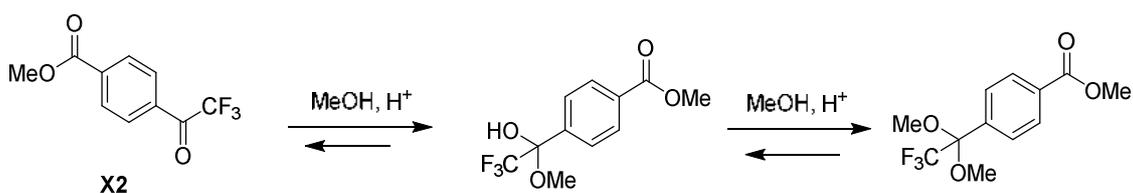


Figure 14. Formation de l'acétal par addition du méthanol.

L'étape suivante est en effet une attaque nucléophile sur le carbonyle de trifluoroacétyle par le chlorhydrate de l'hydroxyle amine dans la pyridine. Cette réaction permet d'obtenir l'oxime désirée **X3**. Le produit est isolé avec un rendement de 93%.

La fonction hydroxyle est ensuite modifiée par l'action de chlorure de tosyloxy en présence de triéthylamine et de DMAP, donnant le produit **X4** avec un rendement à 90%. La combinaison de Et₃N/DMAP permet d'utiliser la DMAP, qui active le chlorure de tosyloxy, en quantité sous stœchiométrique.

La formation du cycle diaziridine s'effectue par l'attaque d'ammoniac sur le carbone sp² de l'imine, conduisant à l'apparition d'une charge négative sur l'azote. La cyclisation en diaziridine s'effectue formellement par une S_N centrée sur l'azote, qui permet de créer la liaison N-N par départ du tosylate (**Fig. 15**). Cette réaction se fait avec un rendement excellent de 98%. Cet intermédiaire **5'** s'est avéré relativement stable dans le temps et peut être conservé à basse température.

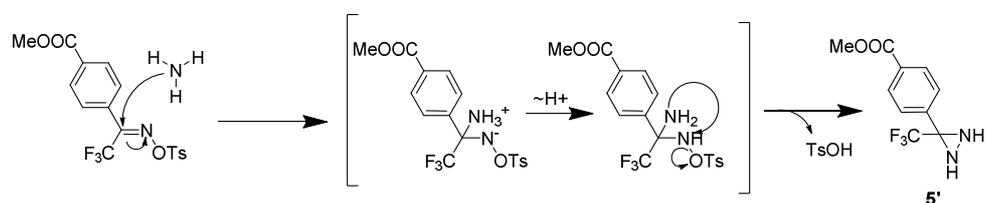


Figure 15. Mécanisme réactionnel de la formation de la fonction diaziridine.

III.2. Formation de la diazirine et activation du groupement carboxylate

La formation du composé **8'** à partir de **5'** se produit en 4 étapes consistant en la formation de la fonction diazirine puis à l'activation de l'acide carboxylique puis le couplage avec la NMA (**Fig. 16**).

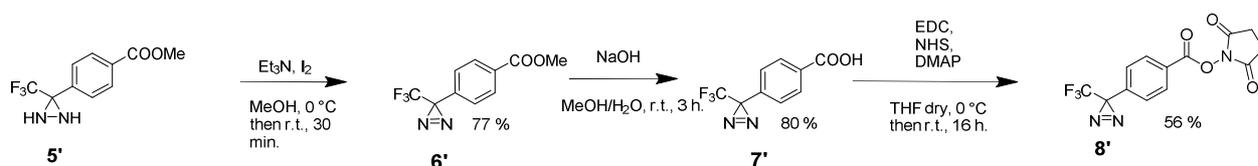


Figure 16. Enchaînement réactionnel pour obtenir le composé **8'** depuis le composé **5'**.

La fonction diaziridine est dans un premier temps oxydée par le diiode en présence d'un excès de triéthylamine pour piéger les molécules d'acide iodhydrique formées lors de la réaction (**Fig. 17**). La diazirine **6'** est obtenue avec un rendement de 77 %. Dès lors, il convient pour toutes les réactions suivantes et le stockage de placer le produit à l'abri de la lumière, la fonction diazirine étant, comme désirée, réactive sous irradiation UV. La poursuite de la synthèse consiste en l'activation de la fonction acide pour pouvoir effectuer le couplage avec les composés **8a**. L'ester est tout d'abord saponifié dans un mélange MeOH/H₂O en présence de NaOH avec un rendement de 80%.

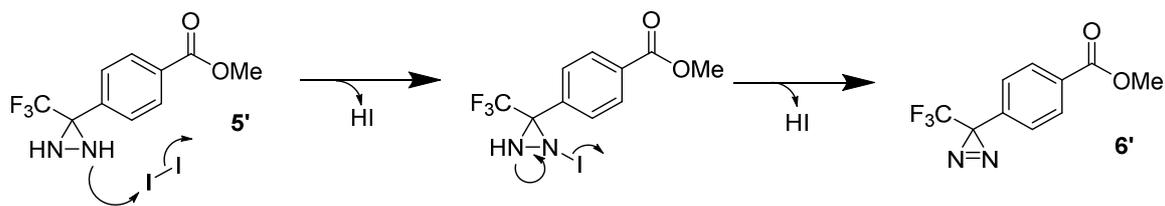


Figure 17. Mécanisme réactionnel de l'oxydation de la fonction diaziridine en la fonction diazirine. Deux équivalents d'acide iodhydrique sont formés.

La dernière étape consiste en l'activation de l'acide carboxylique par formation de l'ester de la NHS par action de EDC en présence de DMAP (**Fig. 18**).[11]

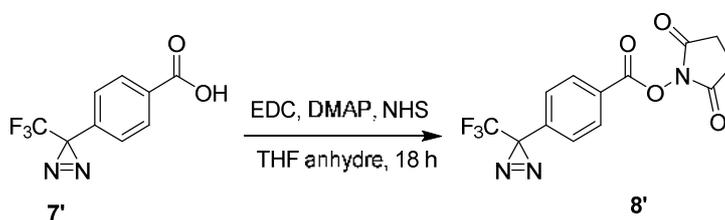


Figure 18. Synthèse du composé **8'**.

III.3. Réaction de couplage entre la NMA protégée au Boc et le dérivé diazirine.

III.3.a. Description de la réaction de couplage.

Le couplage des composés **8'** et **8a** est réalisé dans le CH_2Cl_2 en présence d'une base non nucléophile. La réaction se fait avec un rendement moyen de 36% (**Fig. 19**). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer cette faible valeur : i) la purification est très difficile en raison des R_f très proches du composé **8'** et **9a** ce qui conduit à des successions de purification par chromatographie. L'utilisation d'un excès du composé **8a** et de base pourrait résoudre une partie du problème. ii) l'amine secondaire de la NMA est relativement encombrée, ce qui peut gêner l'attaque nucléophile sur le carboxylate.

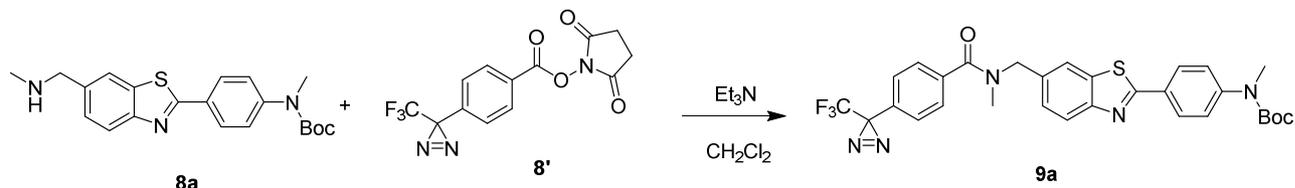


Figure 19. Schéma réactionnel de l'amidation du composé **8'** par le composé **8a**.

III.3.b. Description des spectres RMN du composé **9a**.

Cette réaction conduit à la formation du composé **9a**, la RMN ^1H présente plusieurs caractéristiques à 273 K : i) une paire de singulet à 4,83 ppm et 4,56 ppm dont la somme des intégrations vaut 2 protons. Il s'agit du groupement $-\text{CH}_2-$ lié à l'azote de l'amide (**Fig. 20**). Le singulet à 4,83 ppm intègre pour 1,20 et le singulet à 4,56 ppm intègre pour 0,80. ii) Une autre paire de singulet à 3,00 ppm et 2,85 ppm dont la somme des intégrations vaut 3 protons. Il s'agit du groupement CH_3 sur l'azote de la fonction amide (**Fig. 20**). Le singulet à 3,00 ppm intègre pour 1,20 et l'autre à 2,85 ppm intègre pour 1,80.

L'aspect de ces massifs est dû à l'existence du composé **9a** sous la forme de 2 rotamères du fait de la liaison amide. En effet, le caractère partiellement double de celle-ci conduit à une restriction du degré de liberté de rotation autour de la liaison C-N induisant l'existence de 2 rotamères s-cis-**9a** et s-trans-**9a** observables en RMN (**Fig. 20**).[12, 13]

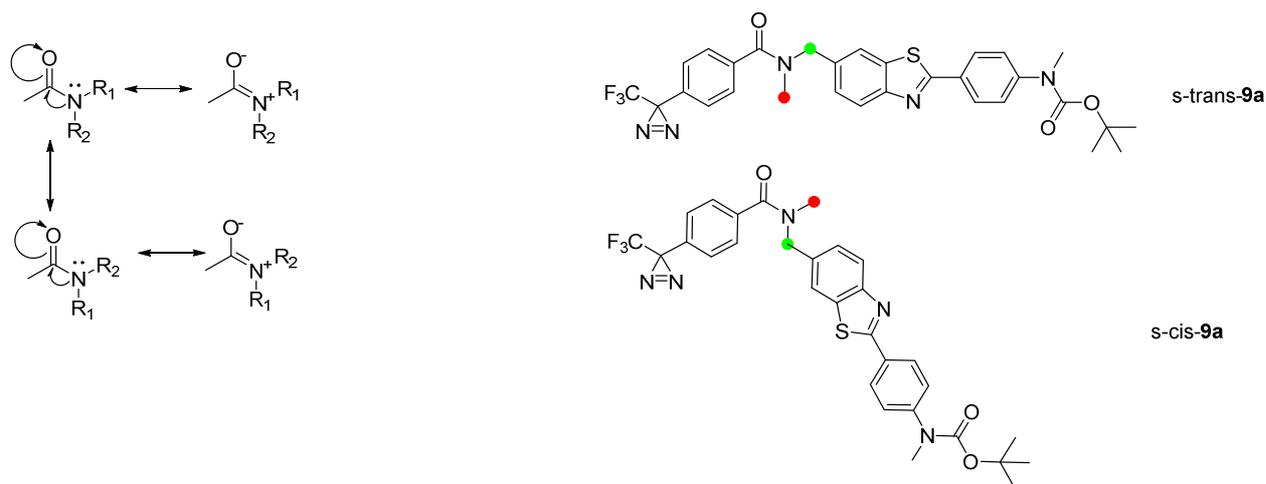


Figure 20. A gauche : Schéma des structures de résonance de la liaison amide mettant en évidence la formations des rotamères. A droite : Structures des rotamères cis et trans du composé **9a**. En vert le groupement CH_2 et en rouge le groupement CH_3 .

Pour s'assurer que ces différents signaux sont bien dûs aux 2 rotamères, des acquisitions ^1H RMN avec variation de température ont été effectuées, les températures variant de 233 à 343 K. On constate clairement une coalescence des pics du CH_2 ou des pics du CH_3 à haute température. En effet à haute température, l'énergie apportée permet de franchir la barrière d'activation de rotation autour de la liaison C-N conduisant à une équivalence chimique des protons (**Fig. 21**).[14]

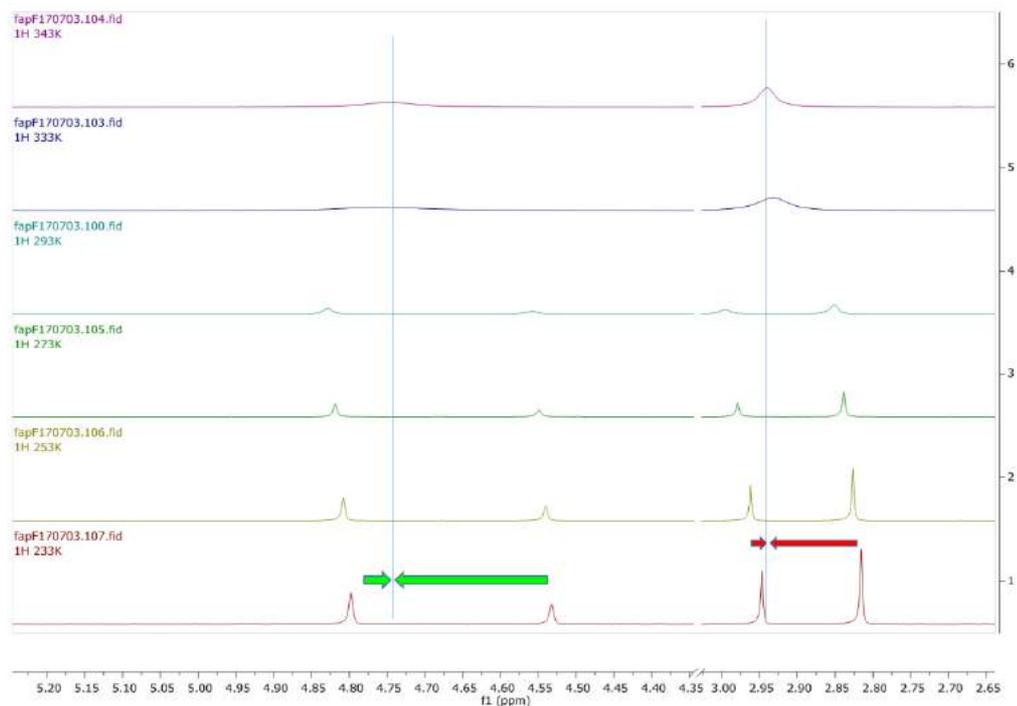


Figure 21. Spectres RMN 1H à différentes températures. Les flèches indiquent le déplacement des massifs protoniques lors du phénomène de coalescence. En vert pour le groupement CH₂ et en rouge pour le groupement CH₃.

À température ambiante, les différences d'intégration pour les pics de chacun des rotamères indiquent une espèce présente à 60 % et l'autre à 40 %. Pour déterminer correctement le rotamère le plus abondant, un spectre NOESY a été effectué à 253 K. À cette température l'ensemble des massifs de protons appartenant aux 2 rotamères sont présents, ce qui permet l'attribution de l'ensemble des déplacements chimiques des protons des deux rotamères. Il apparaît donc un trio de pics pouvant être attribués à l'un et l'autre des rotamères : 2,83 ; 4,81 et 7,58 ppm (rotamère présent à 60 %) et 2,97 ; 4,54 et 7,53 ppm (rotamère présent à 40 %) correspondant respectivement aux groupements CH₃, CH₂, et H aromatique de la diazirine (**Fig. 22**). L'expérience NOESY permet d'identifier ces rotamères à travers l'espace entre les différentes fonctions. Pour l'un des rotamères, ce sera le couplage entre le CH₃ et le H aromatique qui sera observé, dans l'autre ce sera le couplage entre le CH₂ et le H aromatique qui sera observé (**Fig. 22**).

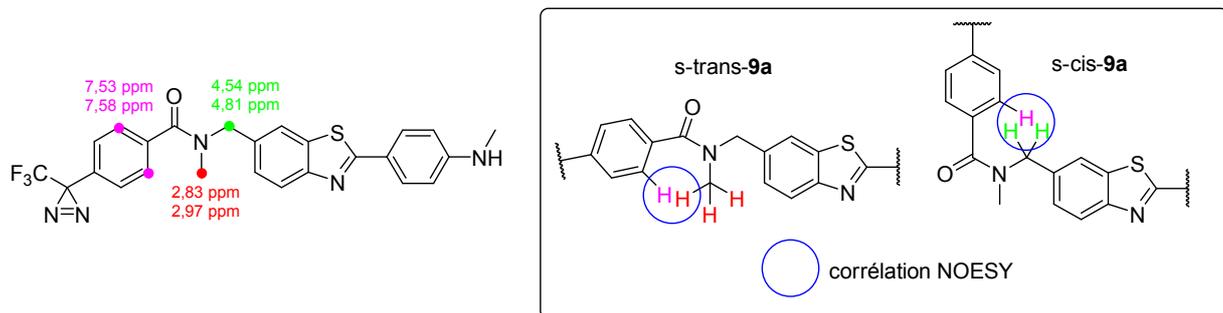


Figure 22. A gauche : Structure de composé **9a** avec les déplacements chimiques des protons pour les 2 rotamères. A droite les corrélations NOESY observables dans les 2 rotamères *s-trans-9a* et *s-cis-9a*.

Les spectres NOESY acquis présentent ainsi une corrélation entre les pics 2,83 et 7,56 ppm attribuée au rotamère *s-trans-9a* et une corrélation entre les pics 7,53 et 4,54 ppm attribuée au rotamère *s-cis-9a* (Fig. 23).

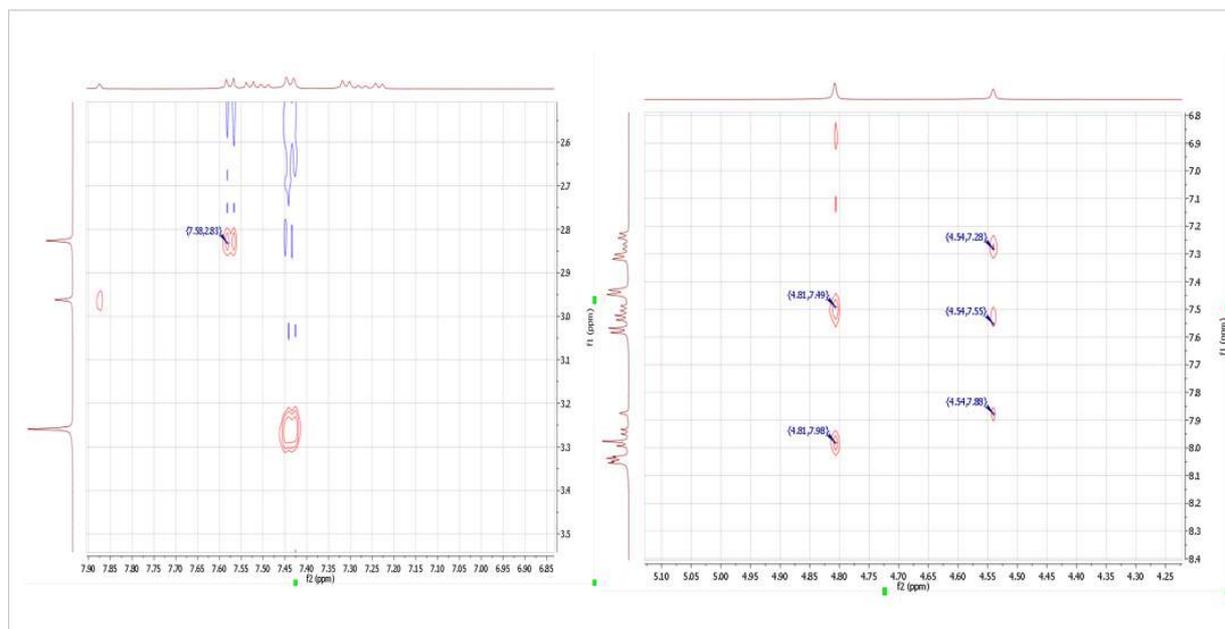
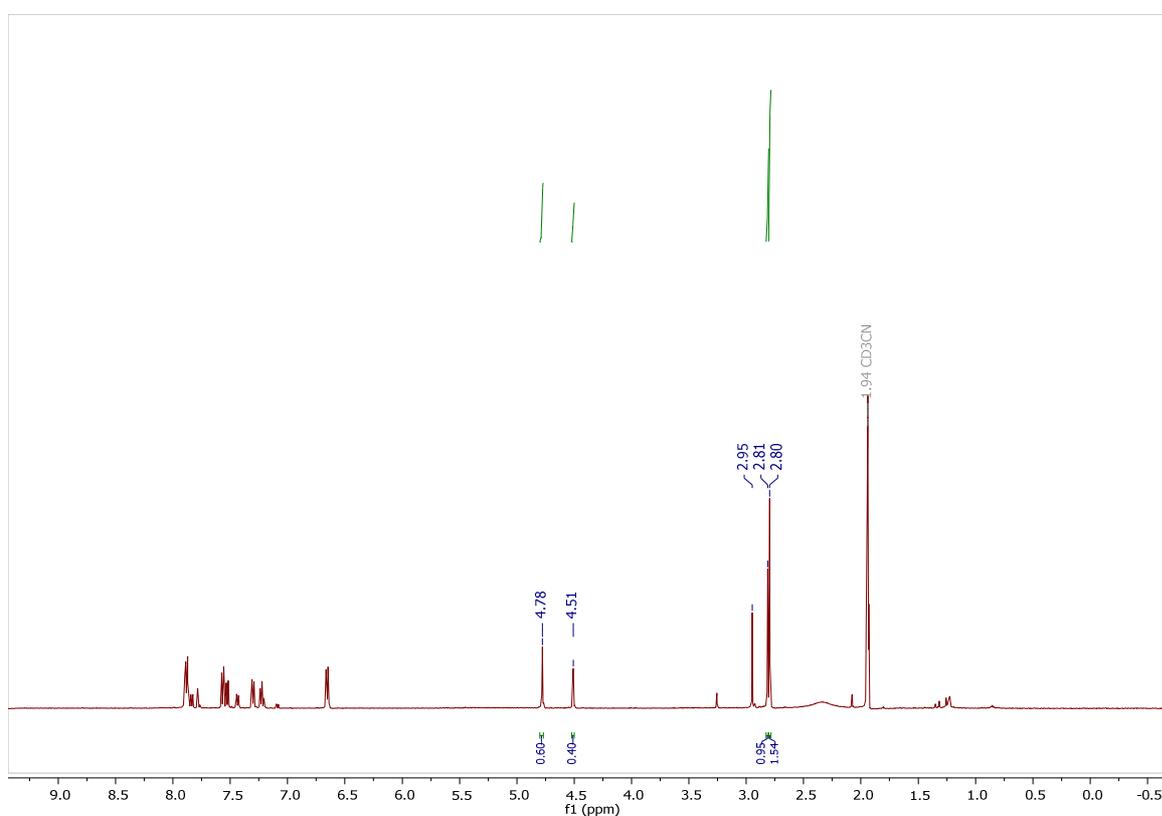


Figure 23. Corrélation NOESY observées à 253 K.

En conclusion, à 298 K, le rotamère présent à 60 % est le *s-trans-9a* et celui présent à 40 % est le *s-cis-9a*. Cette différence de proportion s'explique par le fait que la conformation *s-trans* permet de limiter la gêne stérique du motif 2-aryl-BzT et du motif aryl-diazirine.

III.3.c. Déprotection de la fonction Boc portée par le composé **9a**.

La déprotection du composé **9a** se fait de la même manière que décrite dans le chapitre II de la synthèse de la NMA §IV.1. Dans ce cas, le composé **9b**, d'intérêt pour effectuer le photomarquage du peptide A β , est obtenu avec un rendement moyen de 50 %. Les phénomènes observés en RMN du composé **9b** sont très similaires que celles décrites pour le composé **9a**. Il y a la présence des 2 rotamères selon une proportion de 60 et 40 % identiques (**Fig.24**).



IV. La Chimie click et la fonction azoture

IV.1. Généralités

La chimie « click », telle qu'énoncée par Sharpless *et al.* en 2001,[15] trouve son origine dans l'étude du vivant et la chimie verte. Il s'agit d'un ensemble de réactions chimiques qui comprennent un certain nombre de critères stricts. Ces réactions doivent :

- être modulaires, avec une large gamme d'applications pour différents substituants
- avoir un très haut rendement, ne produisant que des sous-produits inoffensifs
- stéréospécifiques mais pas nécessairement énantiosélectives
- avoir des conditions expérimentales simples, c'est-à-dire insensible à l'eau et à l'oxygène
- utiliser des réactifs de départ accessibles
- pouvoir idéalement se faire sans solvant, sinon dans l'eau ou encore dans un solvant facilement éliminable
- former un produit facilement isolable et pouvant être purifié sans méthode chromatographique. Les auteurs préconisent la distillation ou bien la cristallisation
- produire un composé stable dans les conditions physiologiques
- avoir une grande force motrice thermodynamique, c'est-à-dire supérieure à 20 kcal.mol⁻¹ (ou 84 kJ.mol⁻¹)

Sharpless *et al.* classent ainsi différentes réactions répondant aux critères ci-dessus (**Fig. 25**) :

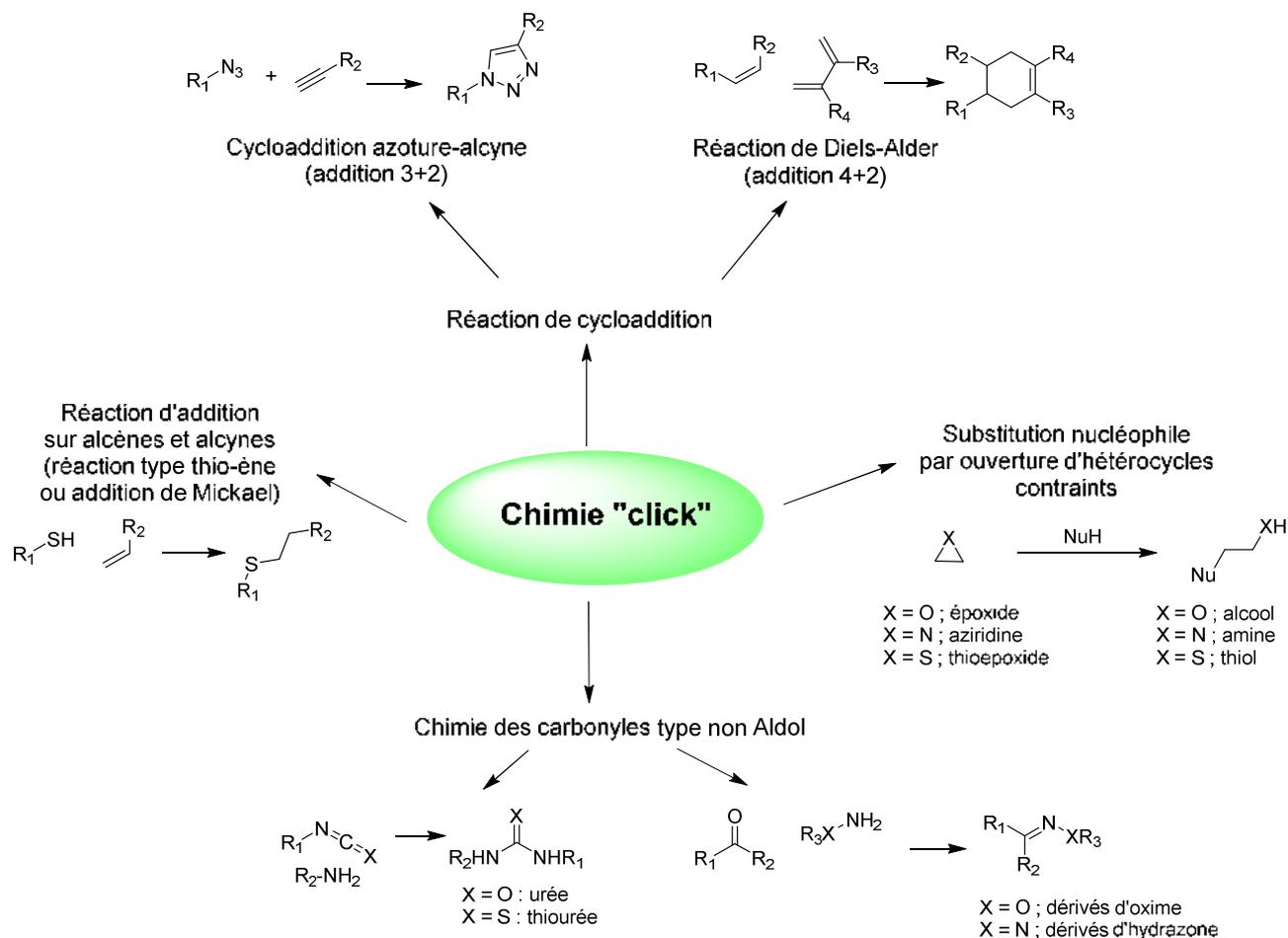


Figure 25. Schéma général sur les différentes réactions de Chimie "click".

Afin de pouvoir coupler des fragments d'intérêt avec le motif 2-aryl-BzT nous avons choisis la fonction azoture $-N_3$. Celle-ci présente une réactivité particulière et des capacités à réagir avec d'autres fonctions permettant différentes réactions de couplage direct comme la cycloaddition (3+2) de Huisgen ou permettant d'accéder à des fonctions permettant les couplages. Ses propriétés chimiques seront présentées et discutées dans la partie suivante.

IV.2. Réactivité des azotures

Les azotures font partie du groupe des composés organiques de la famille des dipôles 1,3 dans lesquels 3 atomes se partagent 4 électrons- π délocalisés comme les composés nitro ou les nitrones et présentent 2 formes mésomères (**Fig. 26**). Ils sont globalement neutres, mais avec une séparation de charges.

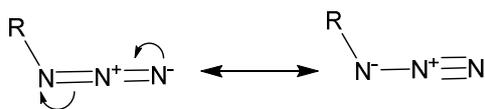


Figure 26. Schéma de la délocalisation des électrons π de la fonction azoture.

Cette fonction s'est montrée intéressante puisqu'elle offre plusieurs possibilités de réactions donnant des dérivés intéressants (**Fig. 27**) :

- i) La cycloaddition 1,3-dipolaire ou (3+2) cycloaddition de Huisgen,[16] elle permet la formation d'un cycle à 5, le 1,2,3-triazole par couplage entre l'azoture et l'alcyne. Cette réaction sera développée dans la partie suivante.
- ii) La formation de fonction aziridine avec l'utilisation d'un alcène par formation d'un nitrène (avec perte de N_2) permet dès lors de former le cycle à 3 contraint pour effectuer de la chimie « click ».[17]
- iii) Avec la triphénylphosphine, il forme un iminophosphorane dans la réaction de Staudinger.[18-20] Cet iminophosphorane peut former des imines par ajout de composés carbonylés lors de réactions « aza-Wittig ».[21, 22] L'imino-phosphorane peut être également réduit en amine dans des conditions très douces. Ces deux réactions génèrent de l'oxyde de triphénylphosphine (PPh_3O), un produit polaire assez difficile à éliminer lors des purifications. Certaines techniques permettent cependant d'effectuer cette purification plus simplement : soit en fixant la triphénylphosphine (PPh_3) sur support solide,[23] ou bien en faisant précipiter le PPh_3O à l'aide de chlorure de zinc.[24]
- iv) La formation d'amine à partir d'azoture peut également être effectuée par hydrogénation catalytique de l'azoture. L'amine générée peut ainsi être couplée à d'autres composés pour former des amides, urées, thiourées, etc.

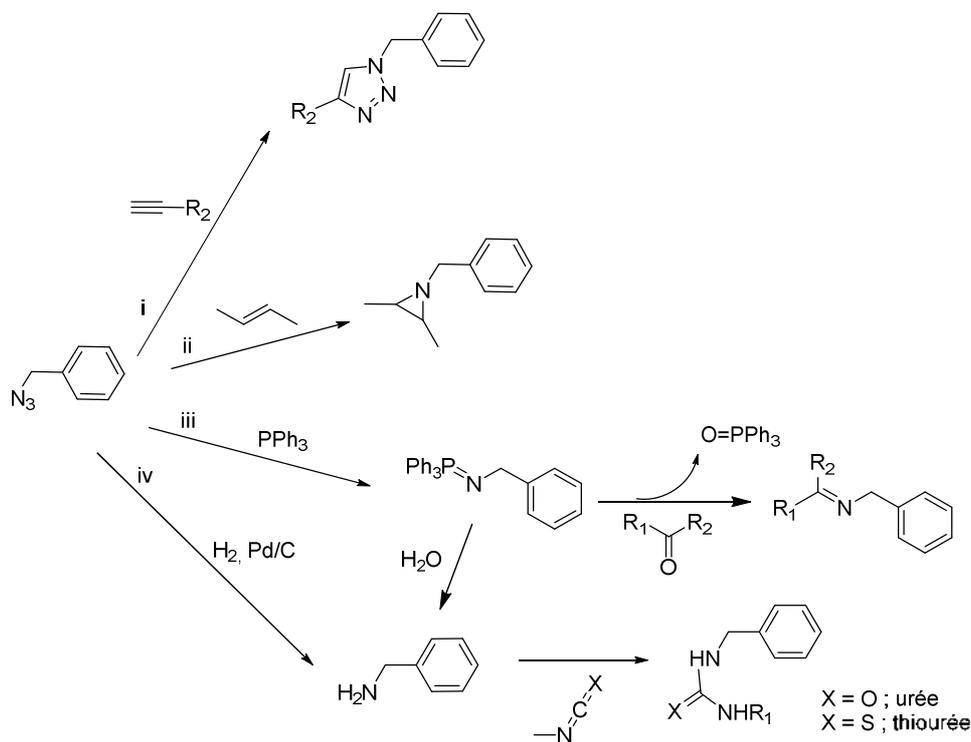


Figure 27. Les différentes voies d'accès à plusieurs fonctions chimiques à partir de l'azoture.

IV.3. La réaction de cycloaddition (3+2) de Huisgen

Rolf Huisgen fut le premier à découvrir l'intérêt de la cycloaddition entre une fonction azoture et une fonction alcyne dans son article intitulé « 1,3-Dipolar Cycloadditions » de 1961.[25] Cette réaction permet à partir de ces 2 fonctions, de produire un cycle 1,2,3-triazole disubstitué en position 1 et 4 ou 1 et 5. La réaction se produit de manière concertée.[26] Le doublet électronique de l'azote chargé négativement attaque l'un des 2 carbones de la fonction alcyne, le doublet π de la fonction alcyne est déplacé pour attaquer la liaison $N=N^+$ de l'azoture fermant ainsi le cycle. Au final on obtient la formation de 2 nouvelles liaisons σ . Cette réaction se produit à haute température et est plutôt lente et produit les 2 régioisomères (**Fig. 28**).

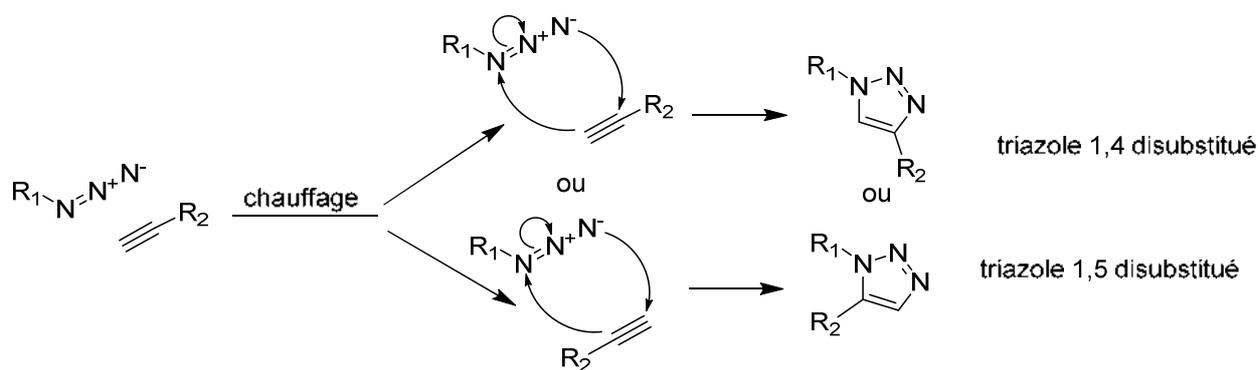


Figure 28. Mécanisme réactionnel de la réaction de Huisgen.

De manière indépendante, les équipes de Sharpless et de Morten ont mis en évidence la capacité du Cu(I) à catalyser cette réaction de cycloaddition de façon régiosélective en 2002.[27, 28] Les sels de Cu(I) ont en effet la propriété de permettre la synthèse du régioisomère substitué aux positions 1 et 4 uniquement. L'équipe de Sharpless découvre plus tard en 2005 que les sels de ruthénium quant eux, permettent la régiosélectivité opposée de cette réaction en produisant le régioisomère substitués aux positions 1 et 5.[29] Ces découvertes ont permis l'utilisation croissante de la cycloaddition azide-alcyne (azide-alkyne cycloaddition = AAC) pour la synthèse de nombreuses molécules, entre autre celles à visée biologique. En effet, le cycle 1,2,3-triazole fait parti des fonctions dites « biosisostères » des fonctions amides, ça signifie que la fonction triazole confère globalement la même géométrie et le même volume occupé dans la structure de la molécule que la fonction amide avec des moments dipolaires proches (Fig. 29).[30-33]

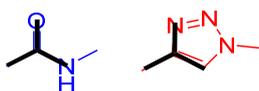


Figure 29. Isostérie de la fonction amide et triazole.

IV.4. Fonctionnalisation du motif 2-aryl-BzT par cycloaddition de Huisgen

Dans le cadre de nos travaux nous nous sommes intéressés aux couplages directs par cycloaddition (3+2) de Huisgen. En effet comme vu dans la partie V du chapitre 1, le motif BzT a servi de base afin d'élaborer différentes molécules pour les études *in vitro* et *in vivo* du peptide A β mais peu d'entre elles utilisent la CuAAC pour fonctionnaliser le motif 2-aryl-BzT. À ce jour, l'équipe de Seyfried a synthétisé le « clickable PiB » comportant un alcyne permettant le couplage avec d'autres fluorophores ou bien des billes magnétiques (Fig. 30).[34]

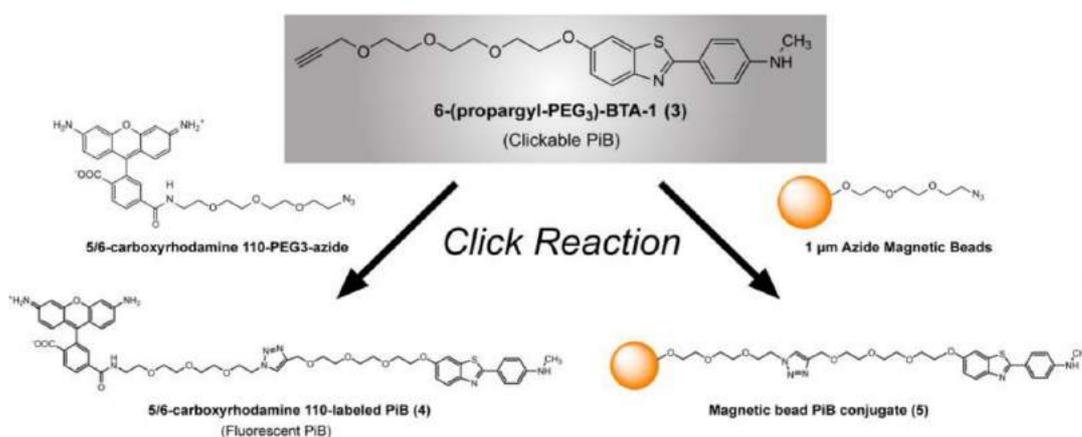


Figure 30. Schéma de couplage du "Clickable PiB". (Seyfried, 2017) [34]

Dans ces travaux, nous proposons ici la synthèse de 2 nouveaux composés originaux par l'utilisation de la fonction azoture portée par le motif 2-aryl-BzT (**Fig. 31**).

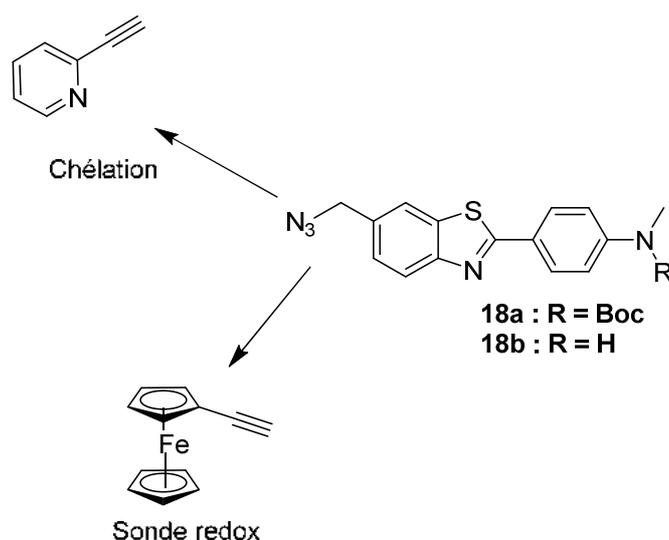


Figure 31. Dérivés alcyne utilisés pour l'accès aux sondes originales du motif 2-aryl-BzT.

IV.5. Voie d'accès au dérivé azoture

2 voies de synthèse ont été employées afin d'accéder au dérivé azoture du 2-aryl-BzT (**Fig. 32**) :

- Une voie **A** indirecte générale où le composé **6a** est fonctionnalisé par l'ajout d'un groupement tosylé sur l'alcool. La formation d'un tel dérivé permet d'avoir un bon groupement partant sur

le carbone benzylique. On peut ainsi fonctionnaliser le dérivé 2-aryl-BzT par l'ajout d'une espèce nucléophile dont bien sûr l'ion azoture.

- Une voie **B** directe spécifique où le composé **6a** est directement converti en azoture.

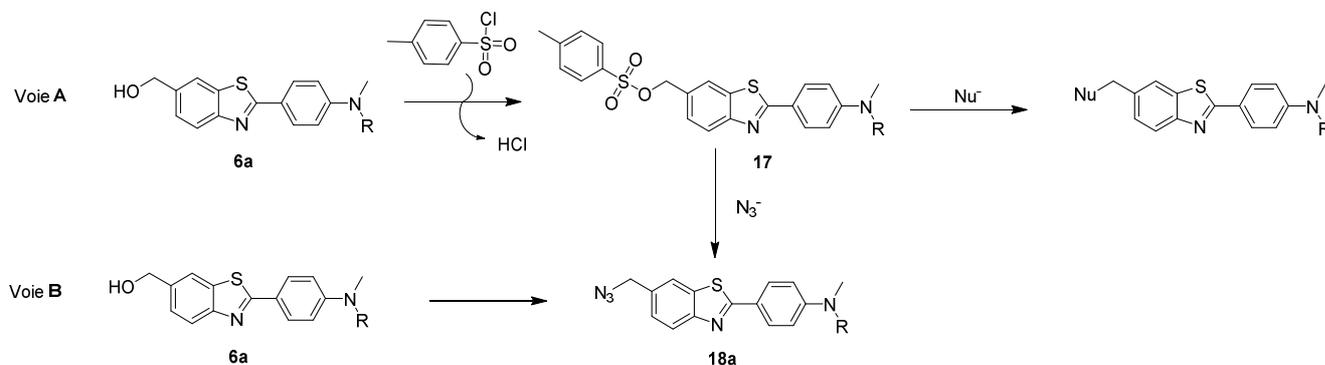


Figure 32. Les 2 voies d'accès au dérivé azoture du 2-aryl-BzT.

IV.5.a. Voie A indirecte par la formation du dérivé tosylate.

Formation du dérivé tosylate

Afin de trouver le bon protocole de tosylation, une série de synthèse a été effectuée à partir d'une molécule modèle : l'alcool benzylique. L'idée est de pouvoir utiliser différents protocoles de tosylation et d'en vérifier l'avancement par CCM et RMN ^1H . La réaction qui permettra d'obtenir le dérivé tosylate de la manière la plus aisée possible sera choisie pour être effectuée sur le dérivé **6a** (Fig. 33).

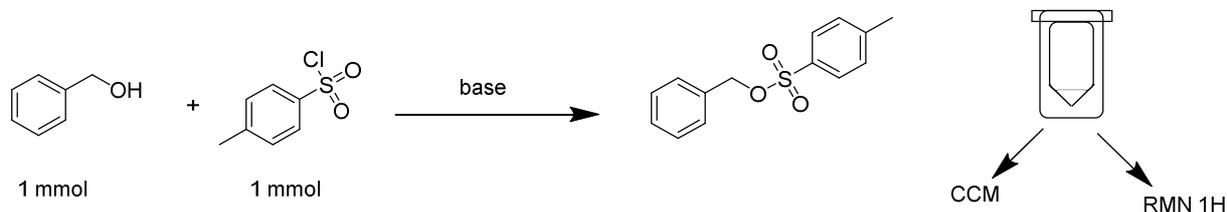


Figure 33. Schéma général pour la réaction de tosylation.

Les différentes conditions de réaction sont reportées sur le tableau ci-dessous (Tableau 4).

Tableau 4. Conditions utilisées pour la formation du tosylate de benzyle.

N°	Nom dans Lab Book	Base	Solvant	Température (°C)	Temps (heures)	Références
1	AP_IV_39	Et ₃ N + DMAP	CH ₂ Cl ₂ anhydre	0 → r.t.	72	[35, 36]
2	AP_IV_43	KOH	THF	-10	4	[37]
3	AP_IV_40	DBU	CH ₂ Cl ₂	0 → r.t.	72	[38] ^a
4	AP_IV_38	K ₂ CO ₃	X	r.t.	0,16	[39-42] ^b
5	AP_IV_42	KOH	Et ₂ O	r.t.	3	[43]
6	AP_IV_41	NaOH	Et ₂ O/H ₂ O	Et ₂ O, 0°C	1	[44, 45]

^aLa réaction produit le dérivé chlorure de benzyle. ^bLa réaction se produit sans solvant par broyage au mortier.

Le suivi de la réaction par CCM a donné les profils suivants, la plaque a été teinte à l'aide de vanilline (**Fig. 34**) :

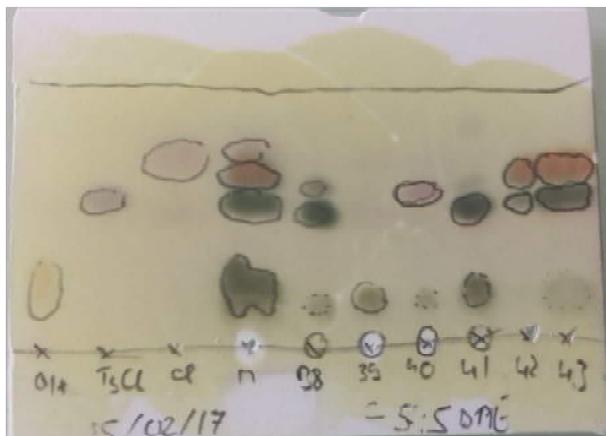


Figure 34. Migrations CCM de toutes les conditions de tosylation.

Le profil CCM permet de visualiser la formation d'un produit pour les réactions 38, 41, 42 et 43 dont le R_f=0,52 très proche du TsCl mais donne une couleur différente par coloration à la vanilline. Concernant les RMN, toutes ont été comparées aux RMN de l'alcool benzylique, du chlorure de tosylo et du chlorure de benzyle. On peut ainsi comparer les différents déplacements chimiques, en particulier celui du CH₂ benzylique qui est différent selon le substituant alcool (4,59 ppm) ou chlorure (4,65 ppm). Le CH₃ du chlorure de tosylo possède quant à lui un déplacement à 2,49 ppm (**Fig. 35**).

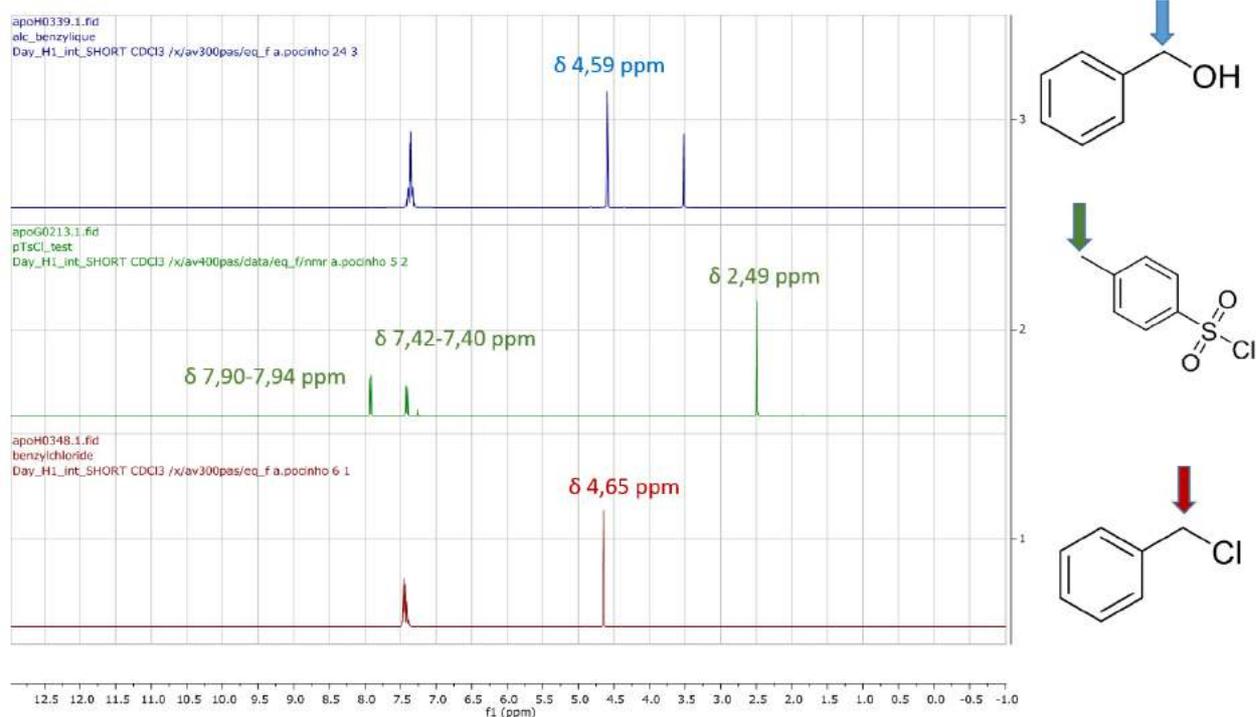


Figure 35. Spectre ^1H de l'alcool benzylique, du chlorure de tosylyle, et du chlorure de benzylyle.

Ici ne sera présenté que le spectre ^1H de la réaction AP_V_38 dont le spectre RMN fut le plus lisible. Il y apparait un pic notable à 5,06 ppm intégrant pour 2 protons, un pic à 2,44 ppm intégrant pour 3 protons. On note la présence du CH_2 de l'alcool benzylique (4,58 ppm) ainsi que la présence très faible du CH_3 du chlorure de tosylyle (2,48 ppm), ce qui suggère donc la formation du dérivé tosylate (**Fig. 36**).

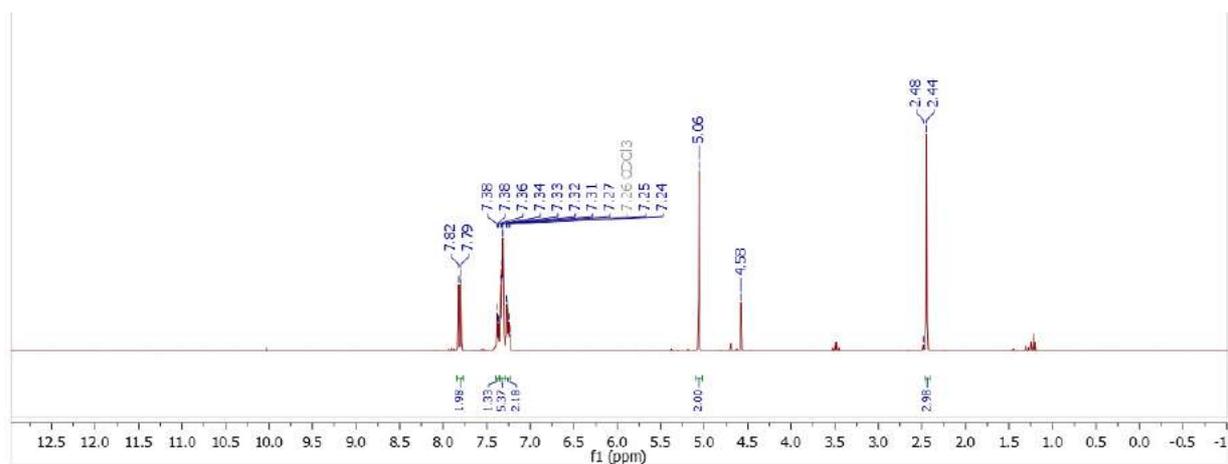


Figure 36. Spectre ^1H de l'expérience AP_V_38.

Il est à noter que les réactions 41, 42, et 43 produisent également le dérivé tosylé, mais la réaction 38 fut privilégiée en raison de la facilité et de la rapidité avec lesquelles elle se produit.

La réaction a ensuite été effectuée avec succès avec le composé **6a** pour donner le composé **17a** avec un rendement compris entre 60 et 90 % (**Fig. 37**).

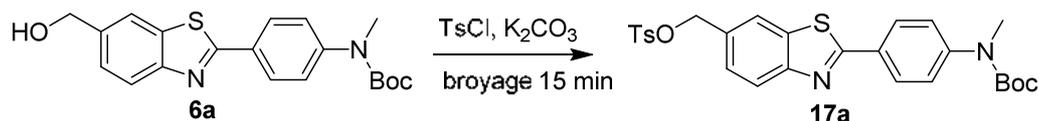


Figure 37. Schéma réactionnel de la tosylation du composé **6a**.

Cependant, les spectres RMN ^1H et spectres de masse sur plusieurs produits issus de la réaction **6a** en **17a** montrent la présence de l'alcool benzylique indiquant que la réaction n'est pas totale. Une purification a donc été faite ; malheureusement le produit s'est révélé extrêmement instable sur colonne donnant 2 fractions. Cette purification a conduit à la régénération du composé **6a**, mais également au produit de la réaction du composé **6a** sur le composé **17a** donnant un dimère du composé **6a** comportant un lien éther. Le pic $m/z = 745,17$ correspond à l'adduit Na^+ du dimère (**Fig. 38**).

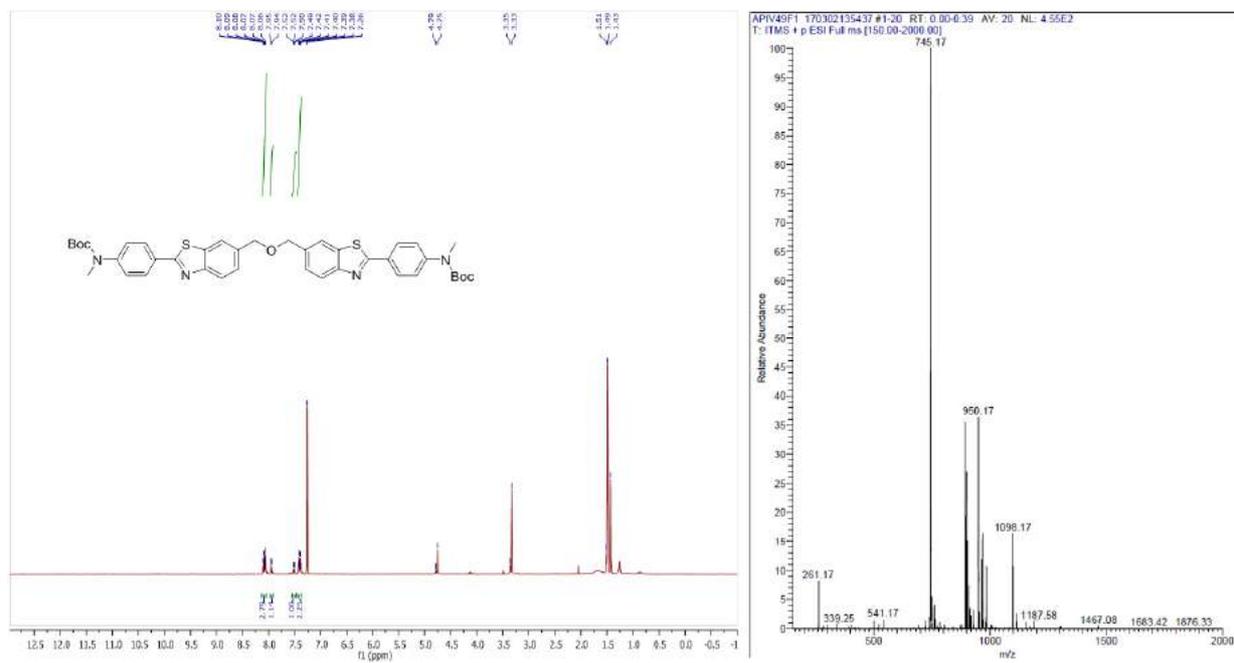


Figure 38. Spectre ^1H (à gauche) et spectre de masse (à droite) du dimère.

Cette instabilité nous a amené à poursuivre la réaction de formation de l'azoture sans purification préalable. La purification sera alors faite après la formation de l'azoture.

Introduction de l'azoture par SN

L'introduction du motif azoture est effectuée en mettant en solution dans le DMF le dérivé tosyloxy **17a** et le sel d'azoture de sodium (NaN_3) en chauffant à 70 °C sur la nuit (**Fig. 39**).[46-48]

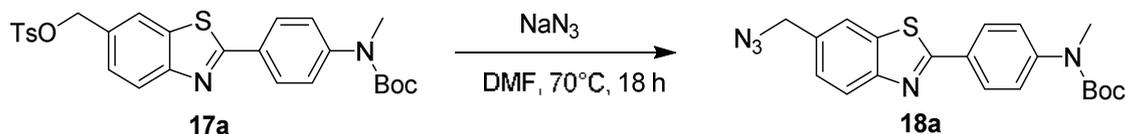


Figure 39. Schéma réactionnel de la formation du dérivé azoture **18a**.

La réaction peut être facilement suivie par CCM, le dérivé azoture possédant un R_f autour de 0,5 dans des conditions peu éluante (cyclohexane/acétate d'éthyle ; 8/2) et vire au orange très intense lors de la coloration par la vaniline. Cependant bien qu'il soit possible de purifier facilement le produit, les rendements de réactions après purification, compris entre 30 et 40 %, nous ont conduit à abandonner la voie **A** au profit de la voie **B**.

IV.5.b. Voie B directe à partir de l'alcool.

La fonction azoture peut être directement obtenue à partir de l'alcool. En effet, la fonction azoture peut être échangée avec une fonction alcool lors d'une réaction de type Mitsunobu par l'utilisation de l'azodicarboxylate de diéthyle (diethyl azodicarboxylate : DEAD), de Ph_3P et l'azoture de diphenylphosphoryle (Diphenylphosphoryle azide : DPPA) en tant qu'espèce donneuse d'azoture selon le protocole établi par Lal *et al.*[49] Cependant cette réaction n'a pas donné le produit attendu (**Fig. 40**).

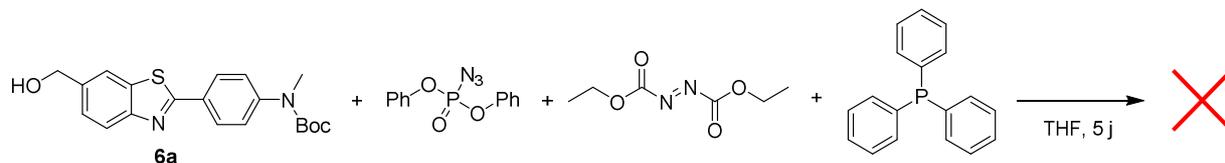


Figure 40. Schéma réactionnel de la réaction en présence du DPPA, DEAD et de la PPh_3 .

Une autre réaction utilisant le DPPA a été également effectuée avec l'utilisation du DBU dans le THF.[50] Etant donné que la réaction précédente a échoué dans le THF, celle-ci a été également testée en utilisant l'ACN et l'acétone, deux autres solvants polaires aprotiques. Pour limiter l'emploi du composé **6a**, l'alcool benzylique a été utilisé lors d'expériences préliminaires (**Fig. 41**).

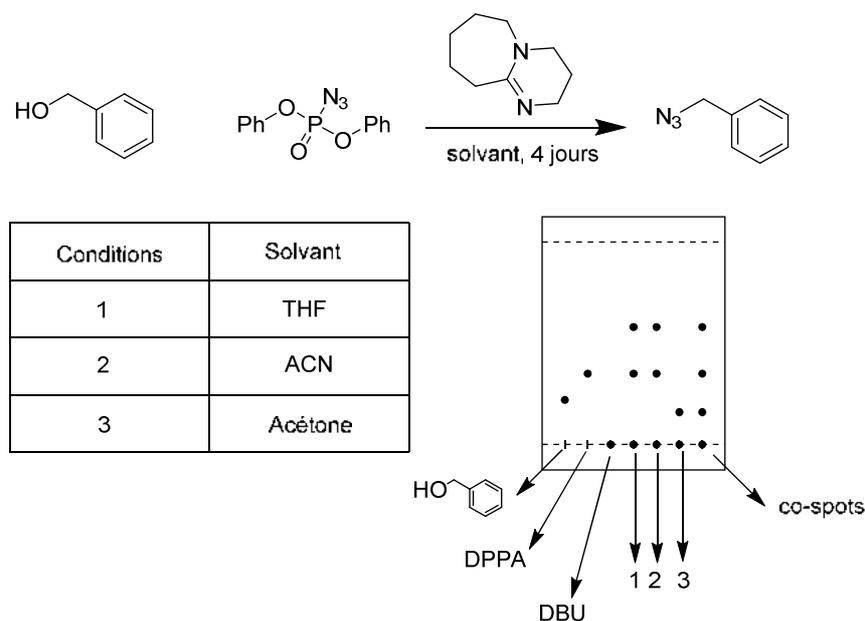


Figure 41. En haut : schéma de la réaction avec l'alcool benzylique. A gauche : Tableau répertoriant les 3 conditions de solvants. A droite : représentation des migrations CCM des réactifs et produits pour les 3 conditions.

Les résultats en CCM nous indiquent, pour les conditions 1 et 2, la formation d'un produit ayant un R_f = 0,58 et une coloration orangée lors de la révélation à la vanilline ce qui tend à confirmer la formation d'un dérivé azoture. Les milieux réactionnels des conditions 1 et 2 ont été récoltés sans traitement en vue d'être purifié par flash chromatographie. Le produit récolté est ensuite analysé par RMN ¹H et comparé avec l'alcool benzylique. Le déplacement chimique du CH₂ est de 4,59 ppm sur l'alcool benzylique et est de 4,35 ppm sur l'azoture conformément avec la valeur trouvée dans la littérature.[51] Ceci, avec le spectre GC-MS ([M+H]⁺ m/z = 133), a donc confirmé la formation de l'azoture par l'utilisation du DBU.

Cette réaction a donc été testée avec le composé **6a**. Celui-ci est entièrement converti en dérivé azoture en 2 à 4 heures avec un haut rendement de 90 % (Fig. 42).

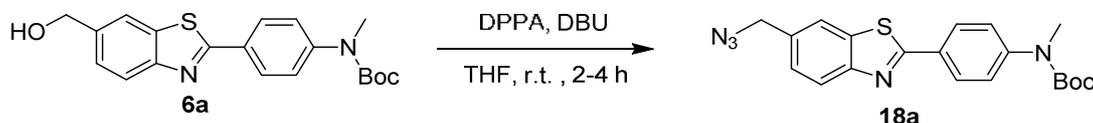


Figure 42. Schéma réactionnel de la formation du dérivé azoture **18a** à partir de l'alcool **6a**.

Le mécanisme de cette réaction est le suivant. L'alcool attaque le dérivé phosphoryle permettant la libération de l'anion azoture. Ceci permet la formation d'un dérivé d'acide phosphorique qui est un bon groupement partant. L'anion azoture attaque le carbone par S_N2 permettant la libération de l'acide diphénylphosphorique et la formation du produit désiré (Fig. 43).

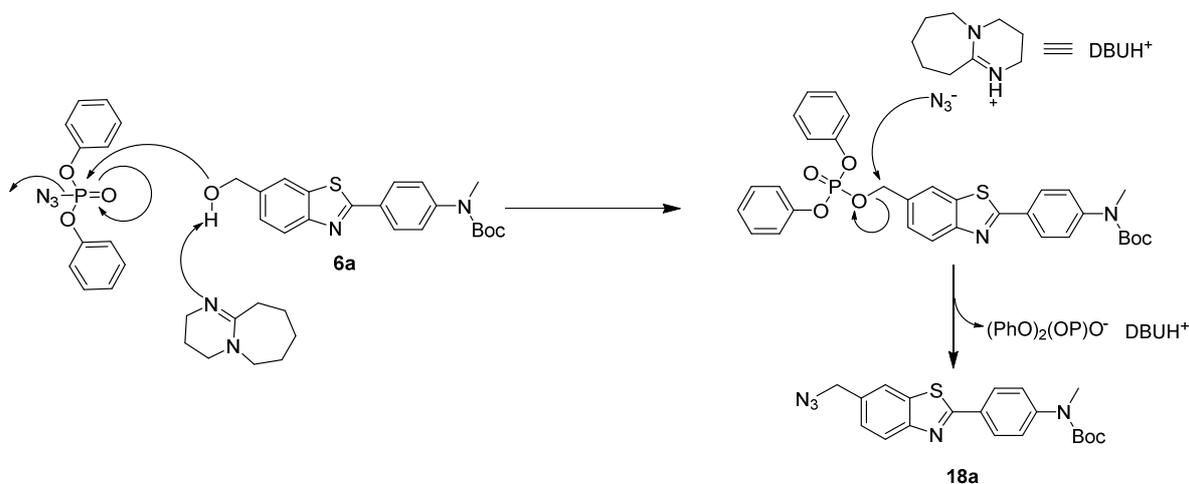


Figure 43. Mécanisme réactionnel de la formation de l'azoture à partir de l'alcool.

IV.6. Déprotection de la méthylaniline du composé 18a.

La déprotection de la méthylaniline s'effectue en solubilisant le composé **18a** dans un mélange DCM/TFA à 0°C pendant 2 heures. La réaction s'est faite avec un rendement de 80 % pour donner le composé **18b** (Fig. 44).

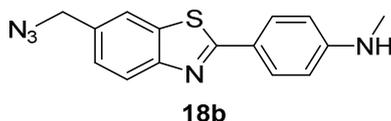


Figure 44. Structure du composé **18b**.

V. Réaction avec les composés 18a/18b.

V.1. Formation de l'amine

La fonction azoture peut être convertie en amine par 2 voies de synthèses différentes : l'hydrogénation catalytique avec l'utilisation du palladium sur charbon (Pd/C) et par la réaction de Staudinger.

V.1.a. Hydrogénation catalytique

L'hydrogénation catalytique est une technique très employée en chimie organique depuis les travaux de Paul Sabatier en 1897. Elle permet l'addition d'une molécule de dihydrogène (H_2) à une molécule possédant une ou plusieurs liaisons insaturées dans sa structure à l'aide d'un catalyseur. Cette réaction permet de nombreuses transformations : des alcènes en alcanes, d'aldéhyde ou cétone en alcool, d'amide en amine. L'azoture peut être réduit en amine par hydrogénation catalytique avec le Pd/C comme catalyseur.[52] La réaction se produit dans l'éthanol avec un rendement acceptable de 64 % (**Fig. 45**).

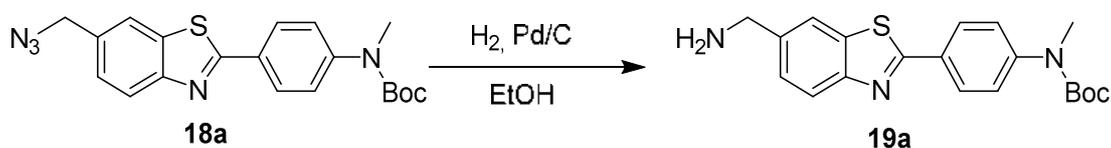


Figure 45. Schéma de réaction de la conversion de l'azoture en amine.

V.1.b. La réaction de Staudinger

Découverte en 1919 par Hermann Staudinger,[18] cette réaction met en jeu un dérivé azoture avec le triphénylphosphine qui permet la formation d'un phosphazène par élimination de N_2 . L'ajout d'eau permet de produire l'amine souhaitée et l'oxyde de triphénylphosphine (**Fig. 46**).

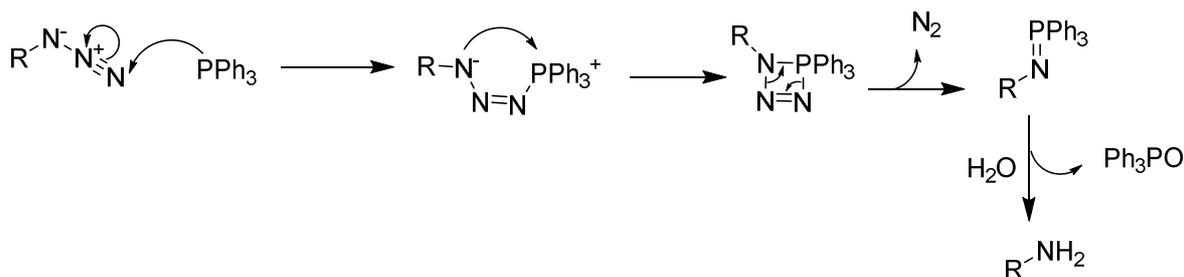


Figure 46. Mécanisme réactionnel de la réaction de Staudinger.

Cependant le produit de cette réaction avec le composé **18a** fut difficile à purifier en raison du caractère polaire de l'oxyde de triphénylphosphine qui est co-élué avec le dérivé amine lors de la purification sur colonne. Afin de contourner cette difficulté, du Boc_2O en présence de K_2CO_3 et d' H_2O ont été ajoutés après que l'azoture soit totalement consommé. Cela permet d'isoler un dérivé **19c** bien moins polaire que l'amine

facilitant sa purification. Une fois que le dérivé protégé au Boc est obtenu, il ne reste plus qu'à déprotéger de part et d'autre de la molécule pour obtenir le dérivé amine **19b** souhaité (Fig. 47).

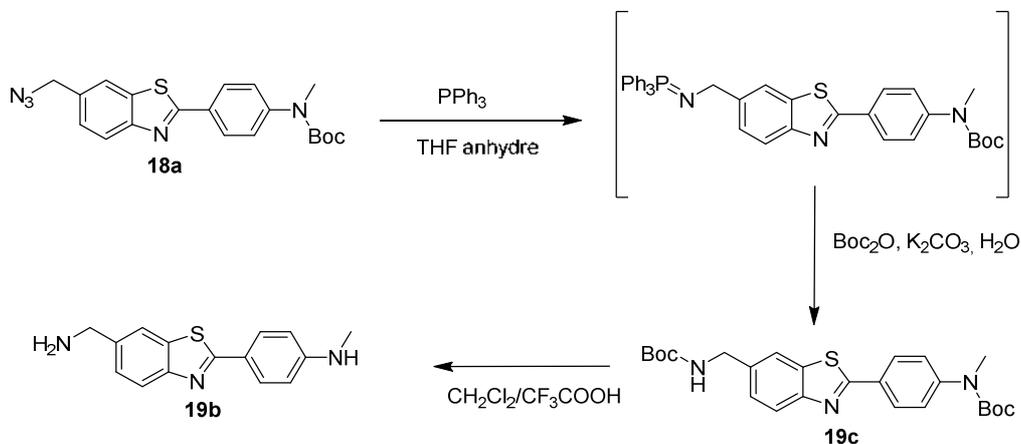


Figure 47. Enchaînement réactionnel pour l'obtention du dérivé amine **19b**.

Cependant la quantité limitée du composé **18a** ne nous a pas permis de continuer la production du composé **19b**. De plus, des travaux menés en parallèle au sein de l'équipe ont permis d'obtenir le dérivé amine souhaité par l'usage d'un dérivé bromé du 2-aryl-BzT en présence d'aminométhyltrifluoroborate et de palladium comme décrit par Molander et *al.* (Fig.48). [53, 54]

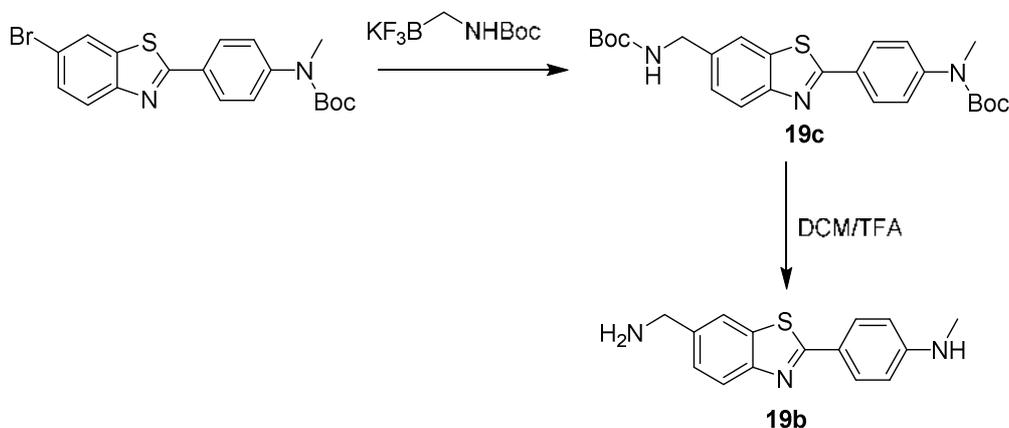


Figure 48. Accès au dérivé amine à partir du dérivé bromure.

V.2. La cycloaddition Azoture-Alcyne catalysée au cuivre (CuAAC).

L'intérêt majeur de produire les dérivés azotures reste lié à leur capacité à former des triazoles avec les alcynes en présence de Cu(I). Cette expérience se conduit en présence de CuSO₄ (5 %mol) et d'ascorbate afin de produire le Cu(I) *in situ*. Le système de solvant est adapté en fonction de la solubilité des composés utilisés. De manière générale la réaction se produit dans 50 % d'H₂O et 50 % d'un autre solvant polaire miscible dans lequel les composés alcynes et azotures sont tous les deux solubles. La réaction se produit avec de bons rendements autour de 65 %.

Les réactions ont été effectuées avec 2 dérivés alcynes pour conduire à la formation des composés d'intérêt (**Tableau 5**).

Tableau 5. Conditions permettant l'accès aux différents dérivés triazoles par CuACC.

Azoture	Alcyne	Solvant	Temps (h)	Rendement (%)	Produit obtenu	Références
18a		H ₂ O/iPrOH	6	64		[55, 56]
18b		H ₂ O/THF	72	65		[57, 58]

Storr *et al.*, ont mis en évidence que le motif pyridine-triazole est apte à chélater le Cu(II) et que ces composés ont un effet sur l'agrégation d'Aβ.[56] Par conséquent, nous avons envisagé la synthèse de **20a** qui combine la fonction chélateur à un vecteur 2-aryl-BzT. La structure cristallographique du complexe [Cu(Cl₂)(**20a**)_n] a pu être obtenue validant les propriétés chélatantes d'un tel composé, et montrant une structure de polymère de coordination à l'état solide (**Fig. 49**).

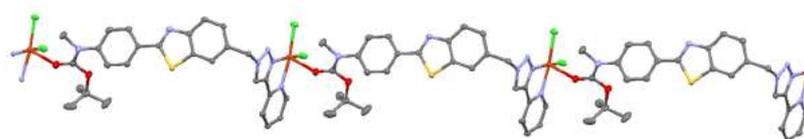


Figure 49. Structure cristallographique du complexe [Cu(Cl₂)(**20a**)_n].

Le ligand **21b** nommé Fc-BTA sera utilisé en électrochimie, la technique et les résultats obtenus seront décrit au cours du chapitre IV.

VI. Publication de la structure du complexe $[\text{Cu}(\text{Cl}_2)(\mathbf{20a})]_n$

La structure cristallographique du complexe $[\text{Cu}(\text{Cl}_2)(\mathbf{20a})]_n$ est l'objet d'une publication acceptée dans le journal *Acta Crystallographica Section E*.

research communications

1 Crystal structure of *catena*- $\{[tert\text{-butylmethyl}[4\text{-}(6\text{-}[\{4\text{-}(\text{pyridin-2-yl-}$
 2 $\kappa\text{N})1H\text{-}1,2,3\text{-triazol-1-yl-}\kappa\text{N}^3]\text{methyl}]\text{-}1,3\text{-benzothiazol-2-yl}]\text{phenyl}]\text{carbamate}\}$
 3 $(\text{dichlorido})\text{copper(II) acetonitrile monosolvate}$

4 Alexandre Pocinho, Carine Duhayon, Emmanuel Gras* and Christelle Hureau

5 CNRS LCC, Université de Toulouse, 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France

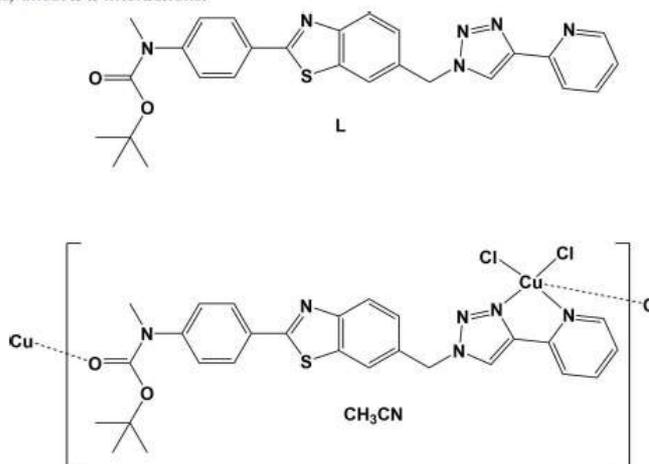
6 Correspondence email: emmanuel.gras@lcc-toulouse.fr

7 Abstract

8 In the title coordination polymer, $\{(\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_2\text{S})\text{CuCl}_2\cdot\text{CH}_3\text{CN}\}_n$, the copper(II) ion is fivefold coordinate with an almost
 9 perfect square-pyramidal coordination sphere. In the equatorial plane it is ligated to a pyridine N atom and an N atom of
 10 the triazole unit and to two Cl⁻ ions, while the apical position is occupied by the carbonyl O atom of the *tert*-butyl-
 11 carbamate group. In the crystal, the polymer chains propagate in the $[11\bar{1}]$ direction, with the acetonitrile solvent
 12 molecules linked to the chain by a C—H \cdots N hydrogen bond. The chains are linked by C—H \cdots Cl hydrogen bonds forming
 13 sheets parallel to plane (011). The crystal packing is further consolidated by C—H \cdots π interactions and offset π - π
 14 stacking interactions (intercentroid distance = 3.6805 (15) Å), forming a three-dimensional supramolecular structure.

15 **Keywords:** crystal structure; pyridine-triazole; Alzheimer's disease; copper(II) complex; hydrogen bonding; C—
 16 H \cdots π interactions; offset π - π interactions.

7scheme1.tif



17 1. Chemical context

18 Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by aggregation of amyloid peptide and extensive
 19 inflammation related to a strong oxidative stress (Cheignon *et al.*, 2018). Metals are known to play a key role in this
 20 oxidative stress and also to be associated with peptide aggregation, at the core of the pathology (Faller *et al.*, 2013; Viles,
 21 2012). More specifically, Cu^{II} has been found to form a complex with the amyloid peptide for which aggregation is one
 22 of the major hallmarks of AD (Eury *et al.*, 2011; Faller *et al.*, 2014). This has triggered a significant on-going interest in

23 the development of chelators able to interact with metals in the context of AD (Santos *et al.*, 2016; Conte-Daban *et al.*,
24 2017).

25 In the course of our studies on the development of bifunctional molecules able to target amyloid fibrils, for example,
26 *via.* a 2-arylbenzothiazole core (Noel *et al.*, 2013), and interact with copper ions found within the senile plaques, we have
27 designed and synthesized a benzothiazole moiety decorated with a triazole-pyridine subunit, *viz.* *tert*-butyl methyl-
28 (4-(6-((4-(pyridin-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl) benzo[*d*]thiazol-2-yl)phenyl)carbamate (**L**). Indeed integrating the
29 N-binding from the triazole moiety in the binding site of a chelator has been shown to be a successful approach (Jones *et*
30 *al.*, 2012,2017). Compared to these seminal works, the additional aryl-benzothiazole moiety in compound **L** is expected
31 to enhance the ability of the chelator to interact with amyloid aggregates and thus to retrieve deleterious Cu^{II} ions from
32 A β fibrils. Investigation of the ability to chelate Cu^{II} ions, by studying the reaction of **L** with CuCl₂, led to the formation
33 of the title coordination polymer whose synthesis and molecular and crystal structures are described herein.

34 2. Structural commentary

35 The molecular structure of the asymmetric unit of the title coordination polymer is shown in Fig. 1. Selected bond lengths
36 and bond angles are given in Table 1. The ligand is *L*-shaped with the benzothiazole ring system (S1/N3/C2/C4—C9;
37 r.m.s. deviation = 0.01 Å) being inclined to the triazole ring (N17-N19/C20/C21) by 79.54 (12)°. The benzene ring is
38 inclined to the benzothiazole ring system by 12.27 (11)°, while the pyridine ring is inclined to the triazole ring by
39 4.07 (14)°. The copper(II) ion is fivefold coordinate with an almost perfect square-pyramidal coordination sphere. In the
40 equatorial plane the copper(II) ion coordinates to the pyridine N atom N27 and atom N19 of the triazole unit and to two
41 Cl⁻ anions, while the apical position is occupied by the carbonyl O atom, O31, of the *tert*-butyloxycarbamate group. The
42 τ_5 descriptor for the fivefold coordination sphere is 0.08 ($\tau_5 = 0$ for an ideal square-pyramidal coordination sphere, and =
43 1 for an ideal trigonal-pyramidal coordination sphere; Addison *et al.*, 1984). The triazole ring (N17—N19/C20/C21)
44 exhibits a slightly shorter Cu1—N19 bond length (2.004 (2) Å) than the pyridine Cu1—N27 bond length (2.054 (2) Å).
45 Yet no *trans* effect is observed as both the Cu—Cl bond lengths are very close (2.2344 (7) and 2.2380 (7) Å). These bond
46 lengths are similar to those observed for a related complex, *viz.* dichloro-(4-(2-(4-(pyridin-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-
47 yl)ethyl)morpholine)-copper(II) (Jones *et al.*, 2012).

48 3. Supramolecular features

49 In the crystal, the polymer chains propagate in the [11 $\bar{1}$] direction (Fig. 2). They are linked by C—H \cdots Cl hydrogen bonds
50 forming sheets parallel to plane (011); see Fig. 3 and Table 2. The acetonitrile solvent molecules are linked to the polymer
51 chains within the network by C—H \cdots N hydrogen bonds (Figs. 2 and 3; Table 2). The crystal packing is further
52 consolidated by C—H \cdots π interactions (Table 2) and offset π - π stacking interactions, forming a three-dimensional supra-
53 molecular structure (Fig. 4). The offset π - π interactions involve inversion related triazole and pyridine rings with inter-
54 planar distances of 3.3848 (11) and 3.300 (1) Å [Cg3 \cdots Cg4ⁱ = 3.6805 (15) Å, $\alpha = 4.07$ (14)°, slippages are 1.63 and 1.45
55 Å; Cg3 and Cg4 are the centroids of rings N17—N19/C20/C21 and N27/C22—C26, respectively; symmetry code: (i) $-x$,
56 $-y - 1$, $-z + 2$].

57 4. Database survey

58 A search of the Cambridge Structural Database (CSD, Version 5.38, update May 2017; Groom *et al.*, 2016) for pyridine-
59 triazole copper(II) dichloride complexes gave 7 hits. Two of these compounds have a similar geometry involving the
60 copper(II) atom, *viz.* dichloro-(4-(2-(4-(pyridin-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)morpholine)-copper(II) (CSD refcode
61 MEHHEO; Jones *et al.*, 2012), and bis(μ -chloro)-dichloro-bis(2-((4-(pyridin-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl) methyl)benzo-
62 nitrile)-di-copper (UMIYEW; Bai *et al.*, 2016). As in the title compound (see Table 1), the Cu^{II} ions have fivefold

research communications

63 coordination spheres with square-pyramidal geometry. Also, the Cu—N_{pyridine} bond lengths (2.063 (3) and 2.075 (2) Å,
64 respectively) are slightly longer than the Cu—N_{thiazole} bond lengths (2.024 (3) and 2.005 (3) Å, respectively), while the Cu
65 —Cl bonds lengths are very similar in both complexes (2.265 (1) and 2.242 (1) Å in MEHHEO, and 2.246 (1) and
66 2.264 (1) Å in UMIYEW). However, both of these compounds are binuclear complexes, possessing inversion symmetry,
67 with bis(μ -chloro) Cl⁻ anions bridging the metal ions.

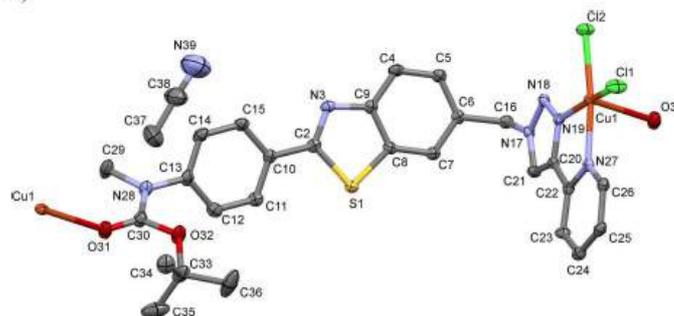
68 5. Synthesis and crystallization

69 The synthesis of the ligand, *tert*-butyl methyl(4-(6-((4-(pyridin-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)benzo[*d*]thiazol-2-
70 yl)phenyl)carbamate (L), has been described previously (Noel *et al.*, 2013). A mixture of 15 mg of L dissolved in 1 ml of
71 acetonitrile, and 1.1 equiv. of CuCl₂ dissolved in 10 ml of a mixture acetonitrile/H₂O (6/3) was heated to 353 K. The
72 mixture was cooled at room temperature allowing a precipitate to form. The supernatant was removed and the precipitate
73 was dissolved with a minimum volume of hot acetonitrile, filtered and left at room temperature in a closed vessel
74 producing overnight pale-green plate-like crystals.

75 6. Refinement

76 Crystal data, data collection and structure refinement details are summarized in Table 3. The H atoms were all located in
77 difference-Fourier maps, but those attached to carbon atoms were repositioned geometrically. The H atoms were initially
78 refined with soft restraints on the bond lengths and angles to regularize their geometry [C—H = 0.93–0.98 Å with $U_{iso}(H)$
79 = 1.5 $U_{eq}(C\text{-methyl})$ and 1.2 $U_{eq}(C)$ for other H atoms], after which the positions were refined with riding constraints
80 (Cooper *et al.*, 2010).

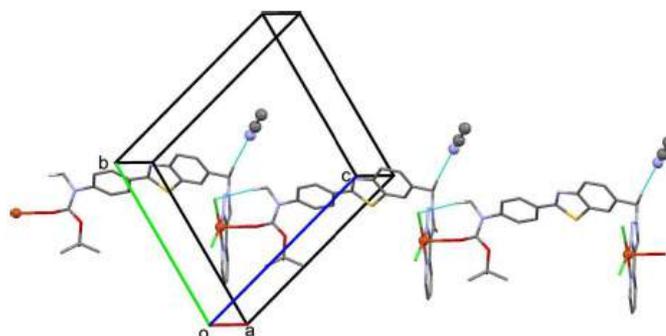
fig1.tif



81 Figure 1

82 The molecular structure of the asymmetric unit of the title coordination polymer, with atom labelling. Displacement
83 ellipsoids are drawn at the 50% probability level. The H atoms have been omitted for clarity. Symmetry codes: (i) $x - 1, y$
84 $- 1, z + 1$; (ii) $x + 1, y + 1, z - 1$.

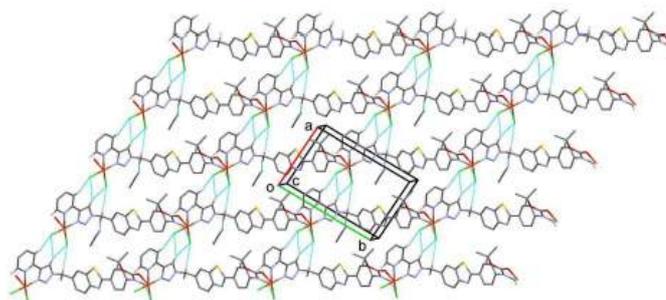
fig2.tif



85 Figure 2

86 A view along the a axis of the acetonitrile solvent molecules (ball and stick) linked to the polymer chains, that propagate
87 along direction $[1\bar{1}\bar{1}]$, via a C—H...N hydrogen bond (see Table 1 for details). Other H atoms have been omitted for
88 clarity.

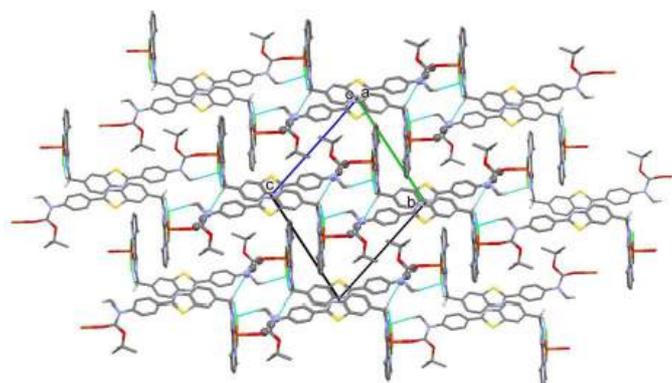
fig3.tif



89 Figure 3

90 A view along the c axis of the crystal packing of the title compound, showing the hydrogen bonds (dashed lines; see Table
91 1 for details) forming sheets parallel to plane (011). H atoms not involved in these interactions have been omitted.

fig4.tif



92 Figure 4

93 A view along the a axis of the crystal packing of the title compound, showing the hydrogen bonds as dashed lines (see
94 Table 1 for details). H atoms not involved in these interactions have been omitted.

95 Table 1

96 Experimental details

97	Crystal data	
98	Chemical formula	$C_{27}H_{26}Cl_2CuN_6O_2S \cdot CH_3CN$
99	M_r	674.11
100	Crystal system, space group	Triclinic, $P\bar{1}$
101	Temperature (K)	100
102	a, b, c (Å)	8.6374 (7), 13.1553 (10), 14.2243 (11)
103	α, β, γ (°)	73.755 (3), 73.863 (3), 84.226 (3)
104	V (Å ³)	1490.1 (2)
105	Z	2
106	Radiation type	Mo $K\alpha$
107	μ (mm ⁻¹)	1.02
108	Crystal size (mm)	0.12 × 0.09 × 0.02
109		
110	Data collection	
111	Diffractometer	Bruker Kappa APEXII
112	Absorption correction	Multi-scan SADABS (Bruker, 2006)
113	T_{min}, T_{max}	0.91, 0.98
114	No. of measured, independent and observed [$I > 2.0\sigma(I)$] reflections	26982, 5475, 4358
115	R_{int}	0.053
116	$(\sin \theta/\lambda)_{max}$ (Å ⁻¹)	0.603
117		
118	Refinement	
119	$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0.037, 0.036, 1.05

research communications

120	No. of reflections	4062
121	No. of parameters	379
122	H-atom treatment	H-atom parameters constrained
123	$\Delta\rho_{\max}, \Delta\rho_{\min}$ (e Å ⁻³)	0.45, -0.36

124 Computer programs: *APEX2* (Bruker, 2006), *SAINTE* (Bruker, 2006), *Superflip* (Palatinus & Chapuis, 2007), *Mercury* (Macrae *et al.*, 2008), *CRYSTALS*
 125 (Betteridge *et al.*, 2003) and *PLATON* (Spek, 2009).

126 Table 2

127 Selected geometric parameters (Å, °)

128	Cu1—O31 ⁱ	2.508 (2)	Cu1—C11	2.2344 (7)
129	Cu1—N19	2.004 (2)	Cu1—C12	2.2380 (7)
130	Cu1—N27	2.054 (2)		
131				
132	Cl1—Cu1—N19	168.01 (7)	Cl2—Cu1—N27	172.70 (6)

133 Symmetry code: (i) $x-1, y-1, z+1$.

134 Table 3

135 Hydrogen-bond geometry (Å, °)

136 Cg is the centroid of ring C4-C9.

137	$D-H\cdots A$	$D-H$	$H\cdots A$	$D\cdots A$	$D-H\cdots A$
138	C16—H162 ⁱⁱ ...N39 ⁱⁱ	0.97	2.52	3.451 (6)	161
139	C16—H161 ⁱⁱ ...C12 ⁱⁱⁱ	0.97	2.72	3.606 (3)	152
140	C21—H211 ⁱⁱⁱ ...C11 ⁱⁱⁱ	0.94	2.81	3.633 (3)	147
141	C23—H231 ⁱⁱⁱ ...C11 ⁱⁱⁱ	0.94	2.62	3.494 (3)	155
142	C26—H261 ⁱⁱⁱ ...C11	0.94	2.55	3.154 (3)	122
143	C29—H291 ^{iv} ...C12 ^{iv}	0.95	2.80	3.741 (3)	172
144	C25—H251 ^v ...Cg ^v	0.94	2.85	3.583 (3)	135

145 Symmetry codes: (ii) $-x, -y, -z+2$; (iii) $x+1, y, z$; (iv) $x+1, y+1, z-1$; (v) $-x, -y-1, -z+2$.

146 Acknowledgements

147 The French Alzheimer Association is gratefully acknowledged for its financial support.

148 Funding information

149 Funding for this research was provided by: Alzheimer Association of France .

150 References

- 151 Addison, A. W., Rao, T. N., Reedijk, J., Van Rijn, J. & Verschoor, G. C. (1984). *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 7, 1349–
 152 1356.
- 153 Bai, S.-Q., Jiang, L., Young, D. J. & Hor, T. S. A. (2016). *Aust. J. Chem.* 69, 372-378.
- 154 Betteridge, P. W., Carruthers, J. R., Cooper, R. I., Prout, K. & Watkin, D. J. (2003). *J. Appl. Cryst.* 36, 1487.
- 155 Bruker (2006). *APEX2, SAINT and SADABS*. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- 156 Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C. & Collin, F. (2018). *Redox Biology*, 10.1016/j.
 157 redox. 2017.10.014.

research communications

- 158 Conte-Daban, A., Boff, B., Candido Matias, A., Aparicio, C. N. M., Gateau, C., Lebrun, C., Cerchiaro, G., Kieffer, I.,
159 Sayen, S., Guillon, E., Delangle, P. & Hureau, C. (2017). *Chem. Eur. J.* **23**, 17078-17088.
- 160 Cooper, R. I., Thompson, A. L. & Watkin, D. J. (2010). *J. Appl. Cryst.* **43**, 1100-1107.
- 161 Eury, H., Bijani, C., Faller, P. & Hureau, C. (2011). *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 901-905.
- 162 Faller, P., Hureau, C. & Berthoumieu, O. (2013). *Inorg. Chem.* **52**, 12193-12206.
- 163 Faller, P., Hureau, C. & LaPenna, G. (2014). *Acc. Chem. Res.* **47**, 2252-2259.
- 164 Groom, C. R., Bruno, I. J., Lightfoot, M. P. & Ward, S. C. (2016). *Acta Cryst.* **B72**, 171-179.
- 165 Jones, M. R., Mathieu, E., Dyrager, C., Faissner, S., Vaillancourt, Z., Korshavn, K. J., Lim, M. H., Ramamoorthy, A., Wee
166 Yong, V., Tsutsui, S., Stys, P. K. & Storr, T. (2017). *Chem. Sci.* **8**, 5636-5643.
- 167 Jones, M. R., Service, E. L., Thompson, J. R., Wang, M. C., Kimsey, I. J., DeToma, A. S., Ramamoorthy, A., Lim, M. H.
168 & Storr, T. (2012). *Metallomics*, **4**, 910-920.
- 169 Macrae, C. F., Bruno, I. J., Chisholm, J. A., Edgington, P. R., McCabe, P., Pidcock, E., Rodriguez-Monge, L., Taylor, R.,
170 van de Streek, J. & Wood, P. A. (2008). *J. Appl. Cryst.* **41**, 466-470.
- 171 Noel, S., Cadet, S., Gras, E. & Hureau, C. (2013). *Chem. Soc. Rev.* **42**, 7747-7762.
- 172 Palatinus, L. & Chapuis, G. (2007). *J. Appl. Cryst.* **40**, 786-790.
- 173 Prince, E. (1982). *Mathematical Techniques in Crystallography and Materials Science*, pp. 96-106. New York: Springer-
174 Verlag.
- 175 Santos, M. A., Chand, K. & Chaves, S. (2016). *Coord. Chem. Rev.* **327-328**, 287-303.
- 176 Spek, A. L. (2009). *Acta Cryst.* **D65**, 148-155.
- 177 Viles, J. H. (2012). *Coord. Chem. Rev.* **256**, 2271-2284.
- 178 Watkin, D. (1994). *Acta Cryst.* **A50**, 411-437.

VII. Conclusion et perspectives.

L'étude de l'interaction du motif 2-aryl-BzT avec le peptide A β présentent un intérêt majeur dans le développement rationnel de structures permettant d'apporter de nouvelles molécules pouvant servir à la détection d'agrégats précoces du peptide A β dans le cadre du diagnostic clinique de la MA ou bien le développement de nouvelles molécules bifonctionnelles.

Les travaux présentés dans ce chapitre présentent l'accès à 4 nouvelles structures originales.

Les études de photoaffinité pourront être conduites avec le composé **9b**. Celui-ci dérive de la NMA et comporte un fragment diazirine. Il s'obtient avec un rendement global de 20% en 2 étapes depuis le composé **8a**. Une optimisation possible du couplage consiste à utiliser directement le composé **7'** avec l'EDC pour coupler directement avec le composé **8a**.

Les études RPE pourront être effectuées avec les composés **12b** et **16b** comportant un radical nitroxyl de type TEMPO. Le rendement global des réactions pour obtenir le dérivé **12b** depuis le composé **7a/7b** est extrêmement faible (<5%), ce qui est dû en partie aux difficultés de couplage par amination réductrice malgré des tentatives d'optimisation. Cependant, la réduction d'une partie du radical empêche son utilisation en RPE. Néanmoins, le composé **16b**, s'obtenant avec un rendement satisfaisant de 42 % en 4 étapes depuis le composé **5a**, a été choisi pour les études RPE et RMN au cours des chapitres IV et V.

Concernant la formation de l'azoture et les réactions de CuAAC, ces réactions n'ont à ce niveau pas besoin d'être davantage optimisées. Le ligand **21b** disposant d'un noyau ferrocène permettra des études d'agrégation par électrochimie qui seront présentées au chapitre suivant. On peut également proposer la formation d'un ligand comportant un rhénium lié au CO pour des études d'interactions entre le ligand et les structures d'A β par infrarouge (**Fig.50**).[59]

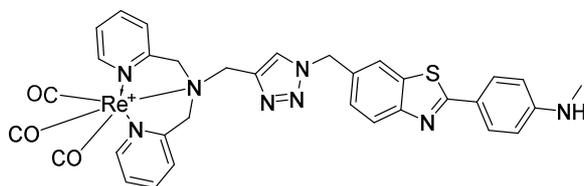


Figure 50. Structure du ligand $Re(CO)_3$ -BTA pour les études par infrarouge.

Les chapitres IV et V présenteront l'utilisation des composés synthétisés dans l'étude de l'agrégation du peptide A β ou bien dans la détermination du site d'interaction entre les ligands 2-aryl-BzT et le peptide.

Bibliographie du Chapitre III

1. Borch, R.F., M.D. Bernstein, and H.D. Durst, *Cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent*. Journal of the American Chemical Society, 1971. **93**(12): p. 2897-2904.
2. Borch, R.F. and A.I. Hassid, *New method for the methylation of amines*. The Journal of Organic Chemistry, 1972. **37**(10): p. 1673-1674.
3. Soma, N., et al., *4,4'-bipiperidylidene derivatives and their use as stabilizers*. 1977, Sankyo Company Limited: Japan.
4. Rosen, G.M., *Use of sodium cyanoborohydride in the preparation of biologically active nitroxides*. Journal of Medicinal Chemistry, 1974. **17**(3): p. 358-360.
5. Abdel-Magid, A.F., et al., *Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxycyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures*1. The Journal of Organic Chemistry, 1996. **61**(11): p. 3849-3862.
6. Tajbakhsh, M., et al., *Catalyst-Free One-Pot Reductive Alkylation of Primary and Secondary Amines and N,N-Dimethylation of Amino Acids Using Sodium Borohydride in 2,2,2-Trifluoroethanol*. Synthesis-Stuttgart, 2011. **2011**(3): p. 490-496.
7. Wang, L., et al., *Catalytic aza-Wittig Reaction of Acid Anhydride for the Synthesis of 4H-Benzo[d][1,3]oxazin-4-ones and 4-Benzylidene-2-aryloxazol-5(4H)-ones*. ACS Catalysis, 2016. **6**(6): p. 4010-4016.
8. Samanta, S., T.L. Lim, and Y. Lam, *Synthesis and in vitro Evaluation of West Nile Virus Protease Inhibitors Based on the 2-{6-[2-(5-Phenyl-4H-{1,2,4}triazol-3-ylsulfanyl)acetylamino]benzothiazol-2-ylsulfanyl}acetamide Scaffold*. ChemMedChem, 2013. **8**(6): p. 994-1001.
9. Carpino, L.A. and A. El-Faham, *Tetramethylfluoroformamidinium Hexafluorophosphate: A Rapid-Acting Peptide Coupling Reagent for Solution and Solid Phase Peptide Synthesis*. Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(19): p. 5401-5402.
10. Tulla-Puche, J., et al., *N,N,N',N'-Tetramethylchloroformamidinium Hexafluorophosphate (TCFH), a Powerful Coupling Reagent for Bioconjugation*. Bioconjugate Chemistry, 2008. **19**(10): p. 1968-1971.
11. Nakajima, N. and Y. Ikada, *Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media*. Bioconj Chem, 1995. **6**(1): p. 123-30.
12. Mujika, J.I., et al., *Resonance structures of the amide bond: the advantages of planarity*. Chemistry, 2006. **12**(27): p. 7215-24.
13. Kemnitz, C.R. and M.J. Loewen, *"Amide resonance" correlates with a breadth of C-N rotation barriers*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(9): p. 2521-8.
14. Gasparro, F.P. and N.H. Kolodny, *NMR determination of the rotational barrier in N, N-dimethylacetamide. A physical chemistry experiment*. J. Chem. Educ, 1977. **54**(4): p. 258.
15. Kolb, H.C., M.G. Finn, and K.B. Sharpless, *Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions*. Angew Chem Int Ed Engl, 2001. **40**(11): p. 2004-2021.
16. Huisgen, R., *1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future*. Angewandte Chemie International Edition in English, 1963. **2**(10): p. 565-598.
17. Cramer, S.A. and D.M. Jenkins, *Synthesis of aziridines from alkenes and aryl azides with a reusable macrocyclic tetracarbene iron catalyst*. J Am Chem Soc, 2011. **133**(48): p. 19342-5.
18. Staudinger, H. and J. Meyer, *Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylenderivate und Phosphinimine*. Helvetica Chimica Acta, 1919. **2**(1): p. 635-646.
19. Vaultier, M., N. Knouzi, and R. Carrié, *Reduction d'azides en amines primaires par une methode generale utilisant la reaction de staudinger*. Tetrahedron Letters, 1983. **24**(8): p. 763-764.

20. Nilsson, B.L., L.L. Kiessling, and R.T. Raines, *Staudinger Ligation: A Peptide from a Thioester and Azide*. *Organic Letters*, 2000. **2**(13): p. 1939-1941.
21. Palacios, F., et al., *The aza-Wittig reaction: an efficient tool for the construction of carbon–nitrogen double bonds*. *Tetrahedron*, 2007. **63**(3): p. 523-575.
22. Lao, Z. and P.H. Toy, *Catalytic Wittig and aza-Wittig reactions*. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2016. **12**: p. 2577-2587.
23. Ayesa, S., B. Samuelsson, and B. Classon, *A One-Pot, Solid-Phase Synthesis of Secondary Amines from Reactive Alkyl Halides and an Alkyl Azide*. *Synlett*, 2008. **2008**(01): p. 97-99.
24. Batesky, D.C., M.J. Goldfogel, and D.J. Weix, *Removal of Triphenylphosphine Oxide by Precipitation with Zinc Chloride in Polar Solvents*. *The Journal of Organic Chemistry*, 2017. **82**(19): p. 9931-9936.
25. Huisgen, R., *Proceedings of the Chemical Society. October 1961*. *Proceedings of the Chemical Society*, 1961(October): p. 357.
26. Huisgen, R., *1,3-Dipolar cycloadditions. 76. Concerted nature of 1,3-dipolar cycloadditions and the question of diradical intermediates*. *The Journal of Organic Chemistry*, 1976. **41**(3): p. 403-419.
27. Rostovtsev, V.V., et al., *A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2002. **41**(14): p. 2596-9.
28. Tornøe, C.W., C. Christensen, and M. Meldal, *Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides*. *The Journal of Organic Chemistry*, 2002. **67**(9): p. 3057-3064.
29. Boren, B.C., et al., *Ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition: scope and mechanism*. *J Am Chem Soc*, 2008. **130**(28): p. 8923-30.
30. Monceaux, C.J., et al., *Triazole-linked reduced amide isosteres: An approach for the fragment-based drug discovery of anti-Alzheimer's BACE1 inhibitors*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011. **21**(13): p. 3992-3996.
31. Valverde, I.E., et al., *1,2,3-Triazoles as Amide Bond Mimics: Triazole Scan Yields Protease-Resistant Peptidomimetics for Tumor Targeting*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013. **52**(34): p. 8957-8960.
32. Bachl, J., et al., *Amide-triazole isosteric substitution for tuning self-assembly and incorporating new functions into soft supramolecular materials*. *Chemical Communications*, 2015. **51**(25): p. 5294-5297.
33. Mohammed, I., et al., *1,2,3-Triazoles as Amide Bioisosteres: Discovery of a New Class of Potent HIV-1 Vif Antagonists*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016. **59**(16): p. 7677-7682.
34. Diner, I., et al., *Generation of Clickable Pittsburgh Compound B for the Detection and Capture of β -Amyloid in Alzheimer's Disease Brain*. *Bioconjugate Chemistry*, 2017. **28**(10): p. 2627-2637.
35. Wang, L., et al., *Ortho-Stabilized (18) F-Azido Click Agents and their Application in PET Imaging with Single-Stranded DNA Aptamers*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015. **54**(43): p. 12777-81.
36. Kumamoto, T., et al., *Selective Synthesis of Benzyl Enol Ethers of β -Dicarbonyl Compounds in Basic Condition and the Application towards Synthesis of Naphthoquinones*. *Heterocycles*, 2014. **88**(1): p. 817.
37. Molander, G.A. and S.K. Pack, *Determining the scope of the lanthanide mediated, sequential hydroamination/C–C cyclization reaction: formation of tricyclic and tetracyclic aromatic nitrogen heterocycles*. *Tetrahedron*, 2003. **59**(52): p. 10581-10591.

38. Kim, H.-W., et al., *Facile Chlorination of Benzyl Alcohols Using 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) and Sulfonyl Chlorides*. Bulletin of the Korean Chemical Society, 2010. **31**(11): p. 3434-3436.
39. Laha, J.K., et al., *Palladium-catalyzed regiocontrolled domino synthesis of N-sulfonyl dihydrophenanthridines and dihydrodibenzo[c,e]azepines: control over the formation of biaryl sultams in the intramolecular direct arylation*. J Org Chem, 2014. **79**(22): p. 10899-907.
40. Kazemi, F., A.R. Massah, and M. Javaherian, *Chemoselective and scalable preparation of alkyl tosylates under solvent-free conditions*. Tetrahedron, 2007. **63**(23): p. 5083-5087.
41. Bris, N.L., et al., *Synthesis of a New Linear-Cyclic Ditopic Polyazaligand with a Xylenyl Linker*. Synthetic Communications, 2009. **39**(11): p. 1992-2000.
42. Glenadel, Q., et al., *Metal-Free Direct Nucleophilic Perfluoroalkylthiolation with Perfluoroalkanesulfenamides*. Asian Journal of Organic Chemistry, 2016. **5**(3): p. 428-433.
43. Omar, M.A., J. Conrad, and U. Beifuss, *Assembly of 4H-chromenes, imidazobenzothiazines and quinazolines via copper-catalyzed domino reactions using 2-halobenzyl tosylates as substrates*. Tetrahedron, 2014. **70**(35): p. 5682-5695.
44. Shang, R., et al., *beta-Aryl Nitrile Construction via Palladium-Catalyzed Decarboxylative Benzoylation of alpha-Cyano Aliphatic Carboxylate Salts*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2012. **354**(13): p. 2465-2472.
45. Lee, C.-H., et al., *Products Analysis in the Reaction of Substituted 1-Phenylethyl Alcohols with p-Toluenesulfonyl Chloride*. Bull. Korean Chem. Soc., 2000. **21**(10): p. 1049.
46. Wang, L., et al., *Ortho-Stabilized 18F-Azido Click Agents and their Application in PET Imaging with Single-Stranded DNA Aptamers*. Angewandte Chemie International Edition, 2015. **54**(43): p. 12777-12781.
47. Murtezi, E., M. Ciftci, and Y. Yagci, *Synthesis of clickable hydrogels and linear polymers by type II photoinitiation*. Polymer International, 2015. **64**(5): p. 588-594.
48. Naka, H., et al., *Chiral Bisphosphazides as Dual Basic Enantioselective Catalysts*. Chemistry – A European Journal, 2008. **14**(17): p. 5267-5274.
49. Lal, B., et al., *Diphenylphosphoryl azide a novel reagent for the stereospecific synthesis of azides from alcohols*. Tetrahedron Letters, 1977. **18**(23): p. 1977-1980.
50. Mizuno, M., T. Shioiri, and M. Mizuno, *Efficient method for the one-pot azidation of alcohols using bis(p-nitrophenyl) phosphorazidate*. Chemical Communications, 1997(22): p. 2165-2166.
51. Pietruszka, J. and G. Solduga, *Enantiomerically Pure Cyclopropylamines from Cyclopropylboronic Esters*. European Journal of Organic Chemistry, 2009. **2009**(34): p. 5998-6008.
52. Corey, E.J. and J.O. Link, *A general, catalytic, and enantioselective synthesis of .alpha.-amino acids*. Journal of the American Chemical Society, 1992. **114**(5): p. 1906-1908.
53. Molander, G.A. and M.-A. Hiebel, *Synthesis of Amidomethyltrifluoroborates and Their Use in Cross-Coupling Reactions*. Organic Letters, 2010. **12**(21): p. 4876-4879.
54. Molander, G.A. and I. Shin, *Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reactions of Potassium Boc-Protected Aminomethyltrifluoroborate with Aryl and Hetaryl Mesylates*. Organic Letters, 2012. **14**(12): p. 3138-3141.
55. Jones, M.R., et al., *Multifunctional quinoline-triazole derivatives as potential modulators of amyloid-β peptide aggregation*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2016. **158**(Supplement C): p. 131-138.
56. Jones, M.R., et al., *Dual-function triazole-pyridine derivatives as inhibitors of metal-induced amyloid-[small beta] aggregation*. Metallomics, 2012. **4**(9): p. 910-920.
57. Jim, C.K.W., et al., *Synthesis of Ferrocene-containing Polyacetylenes by Click Chemistry*. Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials, 2007. **17**(1): p. 289-293.

58. Lim, J.Y.C. and P.D. Beer, *A Halogen Bonding 1,3-Disubstituted Ferrocene Receptor for Recognition and Redox Sensing of Azide*. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2017. **2017**(2): p. 220-224.
59. Ma, J., et al., *Site-Specific Infrared Probes of Proteins*. *Annual review of physical chemistry*, 2015. **66**: p. 357-377.

Chapitre IV

Table des matières

Chapitre IV : Techniques de suivi d'agrégation de l'amyloïde- β	119
I. Introduction.....	119
II. Mesures d'affinités des différentes sondes pour les fibres.....	120
II.1. Principe et protocole.....	120
II.2 Résultats et interprétations	121
II.2.a. Analyse des pourcentages d'insertion	121
II.2.b. Évaluation d'une constante de dissociation approximée K'_d	123
II.3. Conclusion et perspectives.....	125
III. Suivi de l'agrégation par la fluorescence de la NMA.....	125
III.1. Principe de fluorescence	125
III.2. Expérience et résultats.....	127
III.2.a. Suivi de l'agrégation du peptide A β 28 avec la ThT et la NMA.	127
III.2.b. Suivi de l'agrégation en présence simultanée de la ThT et de la NMA.....	130
III.3. Conclusion et perspectives.....	132
IV. Suivi de l'agrégation par voltampérométrie cyclique de la sonde Fc-BTA.....	134
IV.1. Principe de l'électrochimie pour l'étude de l'agrégation.....	134
IV.1.a. Voltampérométrie cyclique (CV : cyclic voltammetry)	134
IV.1.b. Voltampérométrie à vague carrée (SWV : Square wave voltametry)	135
IV.1.c. L'électrochimie pour suivre l'agrégation.	137
IV.2. Expériences et résultats.....	140
IV.2.a. Influence des fibres A β 28 sur le voltammogramme du Fc-BTA.....	140
IV.2.b. Résultats et interprétations.....	140
IV.2.c. Calcul du K'_d	143
IV.3. Conclusion et perspectives.	144
V. Suivi de l'agrégation de la sonde TEMPO-BTA.....	146
V.1. Principes des mesures RPE pour suivre l'agrégation.	146
V.2. Expériences et résultats.....	149
V.2.a. Influence du peptide A β 28 sous forme agrégée ou non sur le signal RPE du TEMPO-BTA.	149
V.2.b Suivi de l'agrégation par RPE.....	151
V.2.c. Calcul de la constante de dissociation K'_d	153
V.2.d. Calcul du temps de corrélation τ_c	154
V.3. Conclusion et perspectives sur le suivi d'agrégation par RPE.....	154
VI. Conclusion générale sur l'étude de l'agrégation.....	155
Bibliographie du chapitre IV	157

Chapitre IV : Techniques de suivi d'agrégation de l'amyloïde- β .

I. Introduction

Afin d'étudier l'agrégation du peptide A β *in vitro* les chercheurs utilisent principalement la fluorescence de la ThT qui est exaltée lors de l'intercalation dans les fibres. Cependant cette méthode ne permet pas d'évaluer précisément les formes du peptide avec laquelle le ligand interagit puisque comme énoncé au chapitre I au §III.3 et §IV.1.b l'exaltation de la fluorescence est médiée principalement par la présence de feuillets β , donc toutes les structures de A β formant les feuillets β peuvent être détectées par fluorescence de la ThT.[1, 2] Voilà pourquoi on propose dans ce chapitre de présenter d'autres techniques pour étudier l'agrégation : l'électrochimie (par voltampérométries cyclique et à vague carrée) avec l'utilisation du ligand Fc-BTA et la RPE avec l'utilisation du composé TEMPO-BTA. Le TEMPO-BTA est également utilisé dans l'étude de l'interaction par RMN au cours du chapitre V. Ces techniques seront à mettre en parallèle avec l'étude par fluorescence de la ThT et de la sonde NMA (Fig. 1).

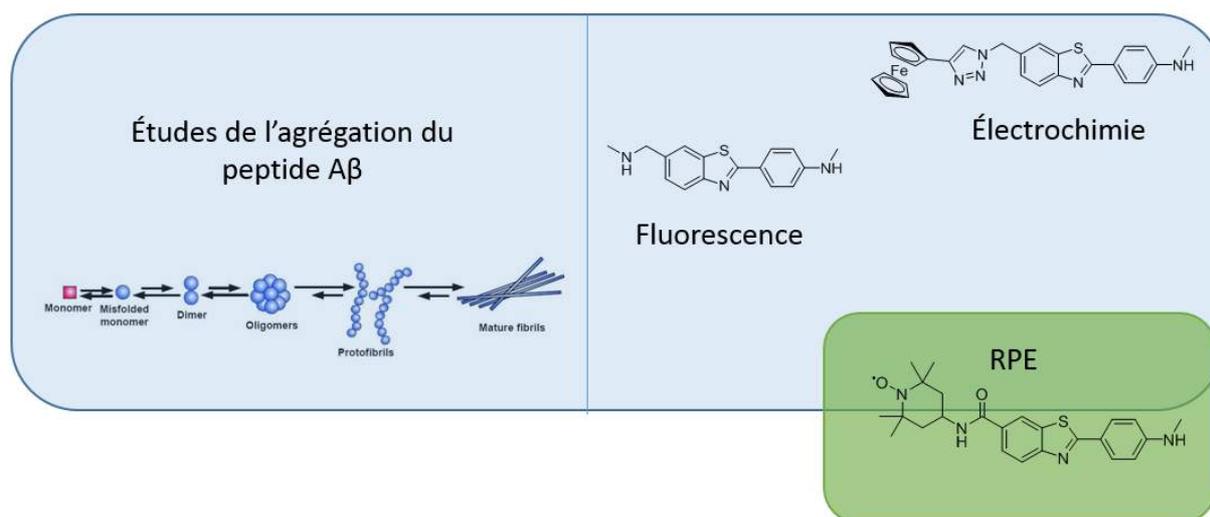


Figure 1. Molécules et techniques associées pour l'étude de l'agrégation.

En parallèle de ces études, on souhaite déterminer les affinités de différents dérivés du 2-aryl-BzT afin, éventuellement, de mettre en évidence une ou des relation(s) structure-affinité. Beaucoup de ligands reportés dans la littérature possèdent de très bonnes affinités avec des constantes de dissociations K_d de l'ordre du nM (cf. Chapitre 1§V). Cependant ces affinités ont été mesurées dans diverses conditions et par différentes méthodes (fluorescence, marquage radioactif,...) et également avec différents types de peptides A β 40 ou A β 42 qui peuvent se présenter sous différents états d'agrégation ; parfois même en évaluant l'affinité sur

des agrégats issus de cerveaux. En résumé, les études d'affinité reportées dans la littérature des différents ligands ne permettent pas de rationaliser facilement l'impact des variations de structures sur l'affinité avec les fibres d'A β . Pour cela, il est nécessaire de comparer différentes structures étudiées dans les mêmes conditions.

Les molécules synthétisées au cours de cette thèse sont des dérivés du 2-aryl-BzT sous forme neutre, cationique et anionique. Les travaux de Klunk ont déterminé que les formes neutres du motif 2-aryl-BzT avaient de bien meilleures affinités qu'une forme cationique comme la ThT : on passe d'un K_d en nM à un K_d en μ M.[3, 4] La haute affinité des formes neutres n'a plus été remise en cause depuis la synthèse du PiB, une forme neutre du 2-aryl-BzT par la même équipe dont le K_d a été évalué à 1 nM.[5-7]

Pour mettre en évidence cette différence d'affinité entre les formes neutres et cationiques, on va comparer différents ligands synthétisés pendant ces travaux de thèse : la NMA, le HO-CH₂-BTA, le Fc-BTA et la DA-BTA dont les structures sont rappelées ci-dessous (**Fig. 2**).

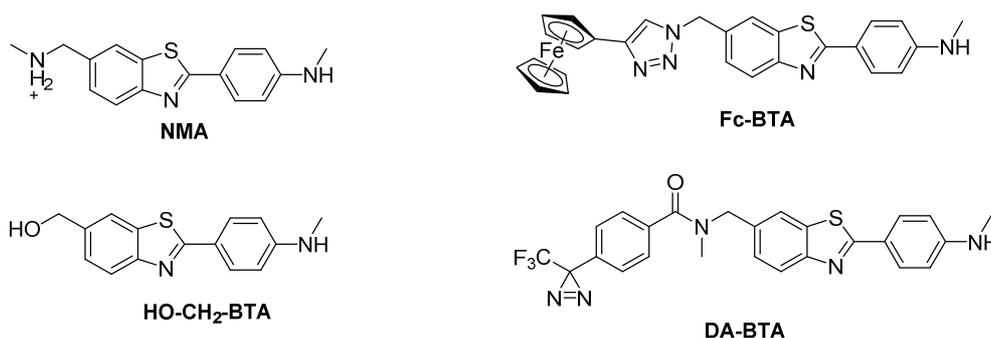


Figure 2. Structure des composés NMA, HO-CH₂-BTA, Fc-BTA et DA-BTA.

II. Mesures d'affinités des différentes sondes pour les fibres

II.1. Principe et protocole

Le principe est le suivant : on incube les molécules à une concentration de 0,5 μ M en présence de fibres de A β 28 à 0, 10, 50 et 100 μ M et de fibres de A β 40 à 0, 5 et 10 μ M pendant une nuit dans [HEPES] = 50 μ M pH 7,2 et ACN 5% (afin de garantir une solubilité dans les solutions aqueuses des ligands neutres). Les échantillons sont ensuite centrifugés et on dose le surnageant en notant l'AUC (Area Under Curve) du spectre d'émission. Le rapport de la valeur à 0 μ M de fibres et les autres concentrations est ensuite effectué (on considère que à 0 μ M on a 100 % du ligand qui est libre). Cela permet de déterminer un pourcentage d'insertion en solution par rapport à la quantité totale (**Fig. 3**).

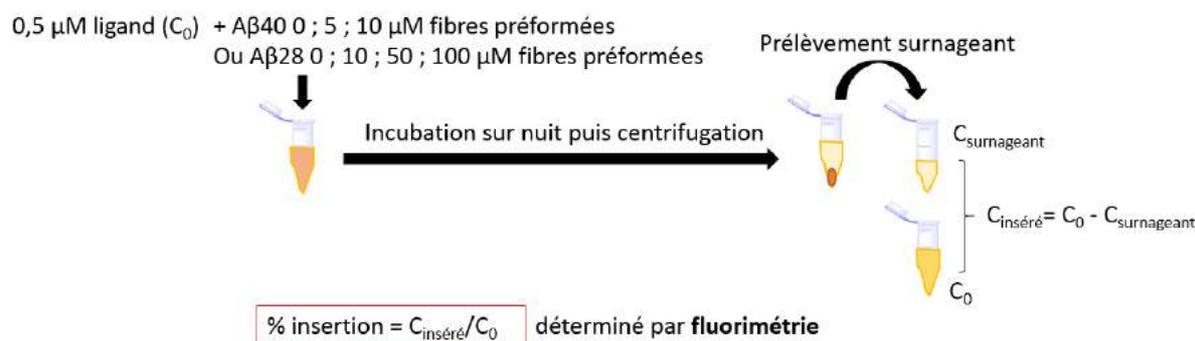


Figure 3. Protocole de dosage du surnageant.

On peut ainsi pour chacun des ligands comparer sa capacité à s'insérer dans les fibres déjà préformées. Ces expériences ont permis de déterminer certains paramètres photo-physiques des différents ligands ont également été déterminés et sont reportés dans le tableau ci-dessous (**Tableau. 1**). Ces mesures de fluorescence ont été effectuées sur le spectrofluoromètre Fluoromax-4 de Horiba Jobin Yvon dans une cuve en quartz SUPRASIL de 500 μL.

Tableau 1. Principaux paramètres photophysiques des ligands en solution dans [HEPES] = 50 mM pH 7,2.

Ligand	λ_{abs} (nm)	ϵ ($10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	λ_{exc} (nm)	$\lambda_{\text{ém}}$ (nm)
NMA	354	29,2	360	438
HO-CH ₂ -BTA	355	20,0	357	434
Fc-BTA	370	21,2	356	433
DA-BTA	370	86,9	356	428

II.2 Résultats et interprétations

II.2.a. Analyse des pourcentages d'insertion

On obtient les pourcentages de liaison ci-après (**Fig. 4**) :

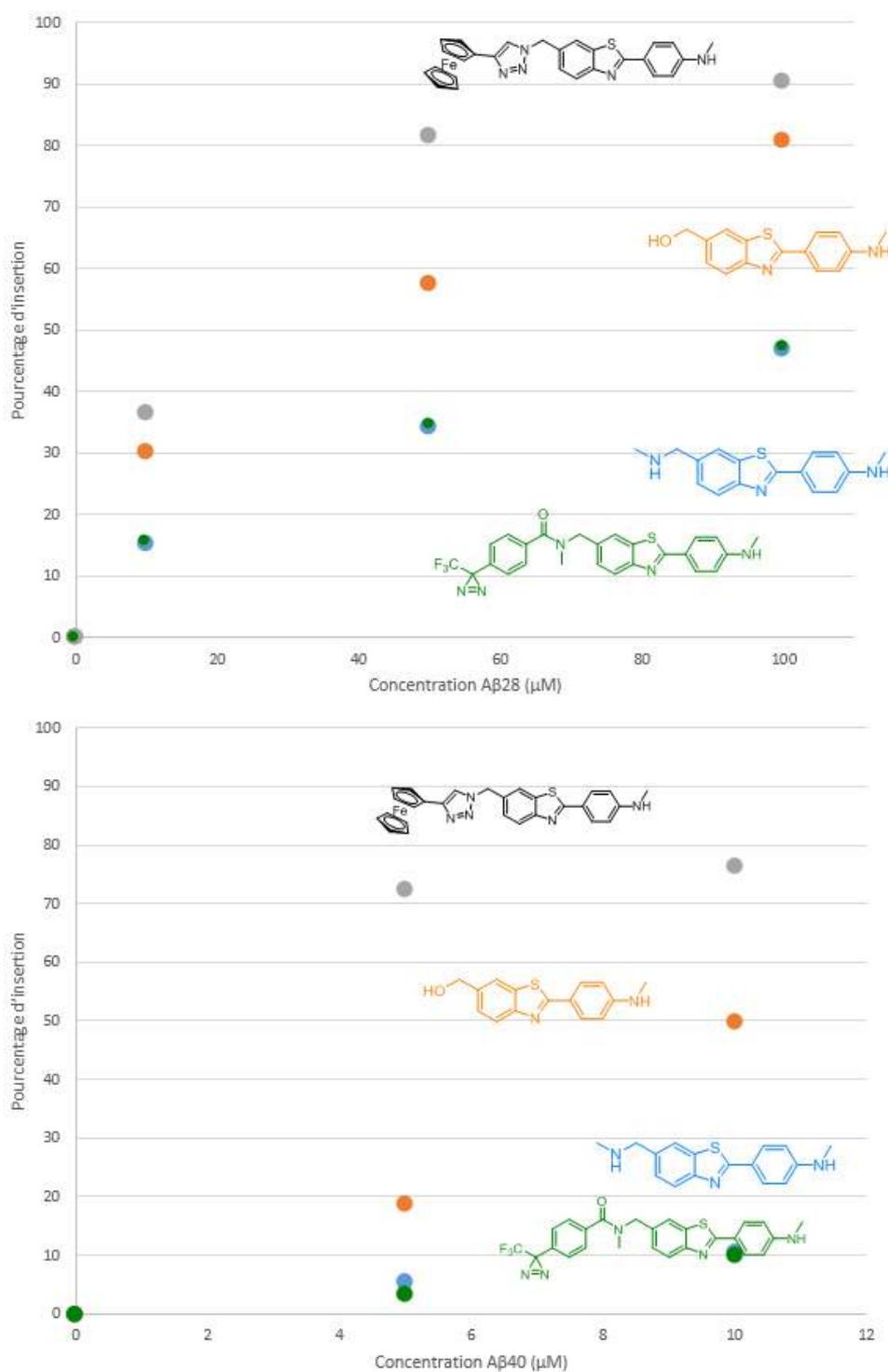


Figure 4. En haut : Pourcentage d'insertion en fonction du ligand et de la concentration en Aβ28. En bas : Pourcentage d'insertion en fonction du ligand et de la concentration en Aβ40. [NMA]=[HO-CH₂-BTA]=[Fc-BTA]=[DA-BTA] = 0,5 μM, [Aβ28] = 0 ; 10 ; 50 et 100 μM, [Aβ40] = 0 ; 5 et 10 μM, [HEPES] = 50 mM pH 7,2 et ACN 5%.

On peut faire plusieurs observations :

- (i) Parmi les ligands testés, le Fc-BTA semble posséder la meilleure affinité avec les peptides Aβ28 et Aβ40 où il sature à respectivement 90 % et 80 % de liaison.
- (ii) On remarque que le ligand HO-CH₂-BTA semble mieux se lier aux fibres que ne le fait la NMA, ce qui semble signifier que les ligands neutres possèdent une meilleure affinité que les ligands cationiques.
- (iii) Cependant la DA-BTA bien qu'il soit un ligand neutre ne semble pas avoir d'affinité avec le peptide (au même niveau que la NMA). Comme le DA-BTA présente 2 rotamères en solution à température ambiante (cf Chapitre III §III.3.b.) il est possible que cette propriété gêne dans l'interaction en plus de l'encombrement stérique.
- (iv) Les peptides Aβ28 et Aβ40 ne sont pas équivalents pour des expériences d'affinité, en effet il faut environ 5 fois plus d'Aβ28 que d'Aβ40 pour avoir le même taux de liaison pour le Fc-BTA, ce qui peut signifier que soit une partie des sites d'interactions soit formée dans la partie 29-40 du peptide, ou bien que les fibres Aβ40 et Aβ28 ne forment pas le même type de fibres.

II.2.b. Évaluation d'une constante de dissociation approximée K'_d

A partir des résultats obtenus pour [Aβ40] = 10 μM, on approche une valeur de K_d de la manière suivante :

- (i) la formule simple du K_d est donnée pour une interaction d'un ligand avec son récepteur pour un seul site d'interaction par récepteur en l'absence de phénomène de compétition.
- (ii) Ici nous ne pouvons pas connaître le nombre de sites d'interaction présents dans les fibres, et donc les concentrations en récepteur seront assimilées aux concentrations en peptide Aβ monomérique utilisées au départ de l'expérience (i.e. avant l'agrégation).
- (iii) Etant donné que la concentration totale en ligand est faible (0,5 μM) par rapport à la concentration totale en peptide Aβ monomérique (10 μM soit 20 équivalents), on peut en déduire (dans le cas où on a une interaction 1 ligand / 5 peptides Aβ monomérique)[3] que :

$$[A\beta]_{\text{libre}} = [A\beta]_{\text{total}} - 5*[ligand]_{\text{inséré}}$$

On en déduit ici donc un K_d apparent nommé ici K'_d des ligands envers le peptide (**Fig. 5**).

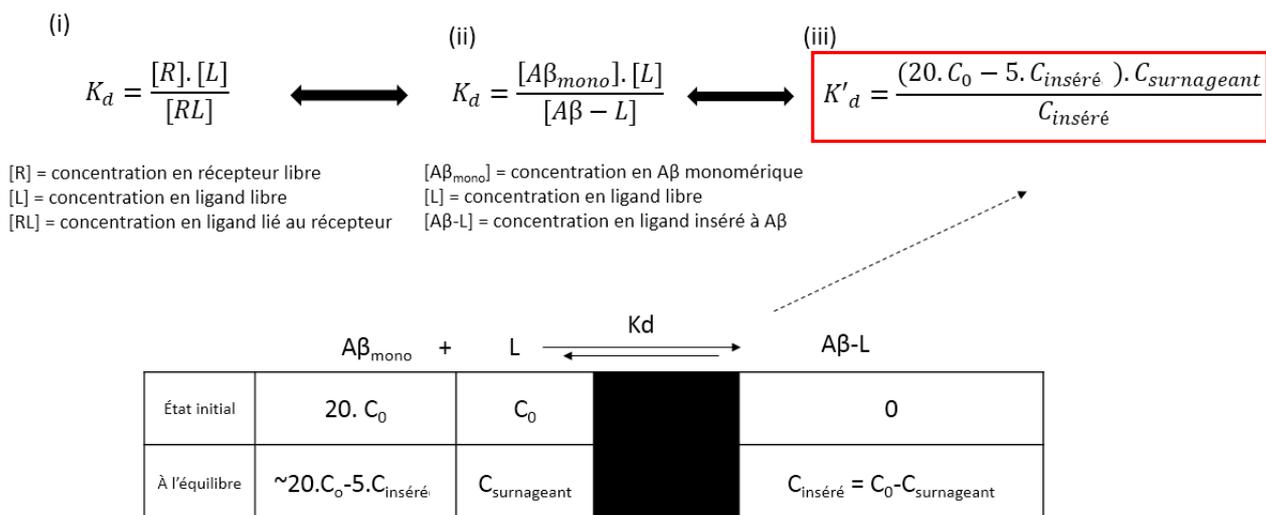


Figure 5. Equation du K_d simplifié et équation du K'_d; en dessous le tableau d'avancement de la réaction d'association (pour Aβ40 = 10 μM).

Le K'_d déterminé ainsi pour chacun de ces ligands seront comparables entre eux et les ligands pourront ainsi être classés les uns par rapport aux autres en fonction de leur constante de dissociation apparente et donc de leur affinité apparente. Les valeurs obtenues sont reportées sur la frise ci-dessous (**Fig. 6**) :

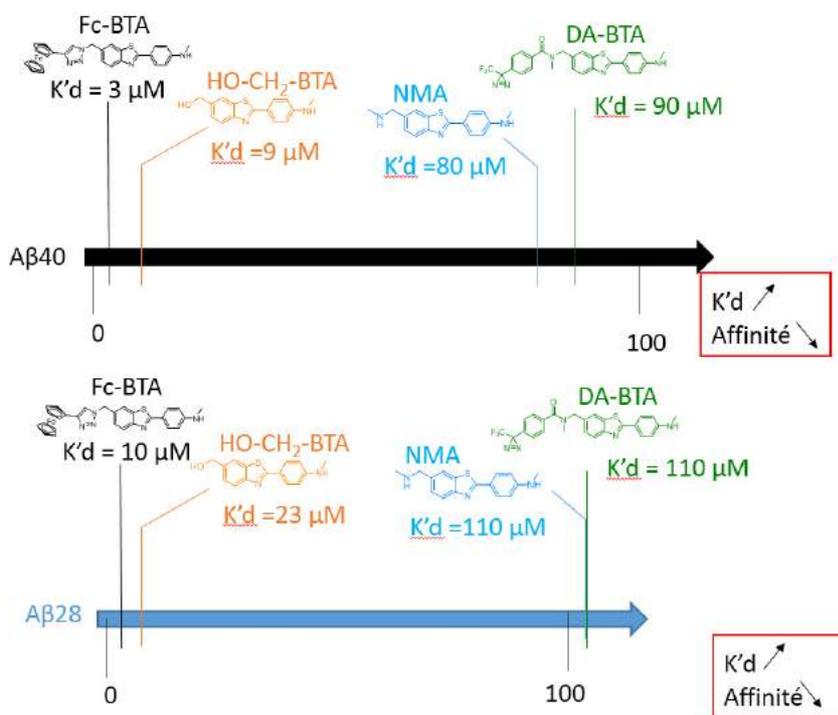


Figure 6. Frise classant les ligands par ordre croissant de leur K'_d pour Aβ40 = 10 μM (frise noire) et pour Aβ28 = 100 μM (frise bleue).

On peut ainsi dire que, quelque soit la taille du peptide, l'affinité du Fc-BTA est de loin la meilleure comparée à celle de la NMA et de la DA-BTA ($3 \mu\text{M} \ll 81$ et $88 \mu\text{M}$ pour A β 40). Le ligand HO-CH₂-BTA quant à lui a une affinité 10 fois plus importante que la NMA et le DA-BTA. Grâce aux approximations faites sur la détermination du K_d il devient possible de pouvoir comparer relativement les ligands entre eux au cours d'une même expérience. La valeur de K_d obtenues pour Fc-BTA avec le peptide A β 28 sera comparée à celle issue de l'expérience en électrochimie (cf. §IV.2.c).

II.3. Conclusion et perspectives.

Ces expériences de mesure d'évaluation d'affinité constituent une approche préliminaire pour comparer relativement les affinités entre différents ligands par fluorescence. Elles ont permis de montrer que les affinités des ligands diffèrent entre le peptide A β 28 et A β 40 où dans le cas du Fc-BTA on atteint la saturation pour $5 \mu\text{M}$ d'A β 40 contre $50 \mu\text{M}$ d'A β 28. Ces expériences ont permis de vérifier que les dérivés neutres semblent plus affins envers les fibres que ne le sont les dérivés cationiques, cela reste à confirmer à l'aide d'autres ligands issus de la même famille 2-aryl-BzT compte tenu du résultat de l'affinité limitée du DA-BTA. On pourrait comparer différents ligands avec différents états de charge à pH physiologique (positive, négative ou neutre) et observer l'impact sur l'insertion dans les fibres, ces études pourraient être effectuées en comparaison avec le PiB ainsi que la ThT (commerciallement disponibles) et serviraient de référence (neutre et cationique) pour l'affinité des fibres d'A β 40. Les expériences sont en principe également transposables à l'UV-Vis (en ajustant certaines conditions), et on comparerait ainsi les deux techniques (UV-Vis/Fluo) pour voir si elles produisent des résultats cohérents. Ces expériences sont actuellement en cours dans l'équipe.

III. Suivi de l'agrégation par la fluorescence de la NMA

III.1. Principe de fluorescence

Le principe de fluorescence a été énoncé lors du chapitre 1 en partie IV.1.b pour expliquer le phénomène d'exaltation de fluorescence lors de l'utilisation de la ThT. Cependant, il est remarqué que bien que « gold standard » dans l'étude d'agrégation cette technique comporte plusieurs défauts :

i) In vitro :

- L'exaltation de la fluorescence de la ThT est dépendante de la nature/ morphologie de fibres et donc n'est pas directement quantitative.

- Il est impossible de pouvoir évaluer correctement une affinité (K_d). En effet, lors de la phase de plateau, il n'est pas possible de savoir si l'intégralité de la ThT ou non a été incorporée lors du processus. Seul un dosage du surnageant par UV/Vis permet de déterminer la quantité de ThT insérée dans les fibres.

ii) *In vivo* :

- La charge permanente positive de la ThT l'empêche de bien traverser la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE).
- Ses longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont peu compatibles pour l'étude *in vivo*.

Voilà pourquoi lors de ces travaux, le composé NMA a été élaboré, son motif 2-aryl-BzT comporte une amine secondaire qui lui permet de posséder une charge positive plus labile (gouvernée par le pKa) par rapport au cycle benzothiazolium de la ThT qui elle est permanente (**Fig. 7**). On espère ainsi que la forme non chargée de la NMA (bien que très minoritaire à pH neutre ; pKa ~ 10) se lie avec une meilleure affinité aux agrégats de A β tirant ainsi l'équilibre vers la forme neutre liée aux agrégats A β . *In vivo*, cela pourrait favoriser le passage de la BHE. Cependant l'expérience présentée à la partie I de ce chapitre a invalidé cette hypothèse, suggérant que la charge positive a une influence défavorable sur l'affinité avec les fibres A β par rapport à un composé neutre.

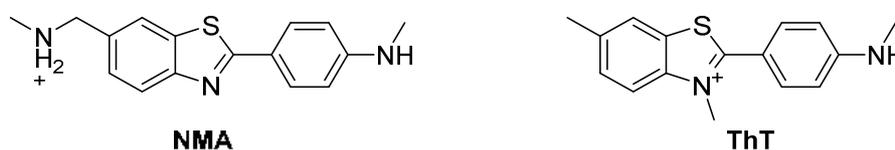


Figure 7. Structures de la NMA et de la ThT.

Les propriétés de fluorescences de la NMA sont présentées ici (**Tableau. 2**).

Tableau 2. Propriétés physico-chimique de la NMA libre ou insérée dans les fibres.

	Libre	Insérée dans les fibres
λ_{abs} (nm)	354	356
ϵ ($10^3 \cdot \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	29,2	X
λ_{exc} (nm)	355	360
$\lambda_{\text{ém}}$ (nm)	438	420
Φ	0,39	X

III.2. Expérience et résultats

 III.2.a. Suivi de l'agrégation du peptide A β 28 avec la ThT et la NMA.

L'expérience présentée cherche à comparer les propriétés de la ThT et la NMA pour le suivi de l'agrégation. On incube pour cela [A β 28] = 500 μ M avec 0,5 équivalent de Zn (sous forme de solution aqueuse de ZnSO₄) avec différentes concentration en ThT et NMA. On varie également les λ_{exc} et $\lambda_{ém}$. Ici l'utilisation de l'A β 28, un peptide tronqué, permet d'avoir une meilleure reproductibilité des expériences. L'ajout de Zn permet de déclencher l'agrégation puisque l'A β 28 contrairement à l'A β 40 n'agrège pas spontanément lorsqu'il est mis en solution à pH neutre. Les résultats sont présentés dans les figures ci-dessous (**Fig. 8**). Ces expériences ont été réalisées sur des plaques de 96 puits dont la fluorescence a été suivie avec le fluorimètre CLARIOstar de BMG LABTECH.

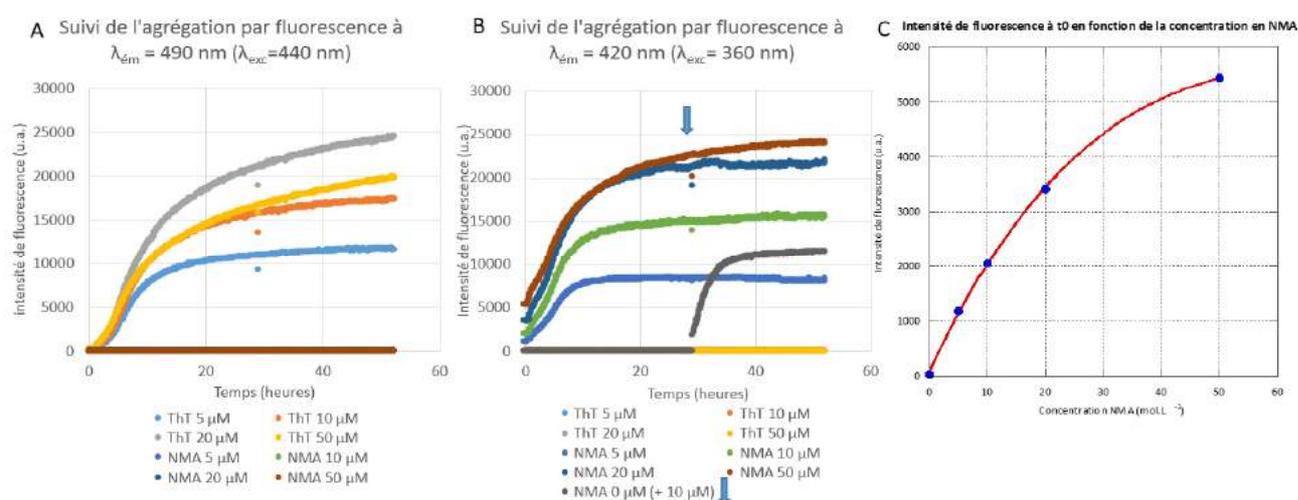


Figure 8. Suivi de l'agrégation de l'A β 28 pour différentes concentrations en ThT et NMA ; A : $\lambda_{ém}$ à 490 nm et λ_{exc} à 440 nm ; B : $\lambda_{ém}$ à 420 nm et λ_{exc} à 360 nm. C : intensité de fluorescence de la NMA à t0 en fonction de la c° en NMA. Conditions expérimentales : [Zn] = 250 μ M ; [A β 28] = 500 μ M ; [HEPES] = 100 mM ; pH 7,1. La courbe C représente les intensités de fluorescence de la NMA en fonction de la concentration à t0 (bleu) ; la baisse de fluorescence est dû à l'inner-filter effect (courbe rouge).

L'agrégation suit des étapes précises qui peuvent être suivie au cours du temps. Le monomère d'A β s'auto-assemble lors d'une phase nucléation lente pour former des structures oligomériques/protofibrillaires. Celles-ci constituent des noyaux permettant l'élongation pour former des fibres de manière très rapide qui vont s'agréger pour former les agrégats d'A β , on atteint alors la phase de plateau où la majorité du peptide s'est agrégé (**Fig. 9**).

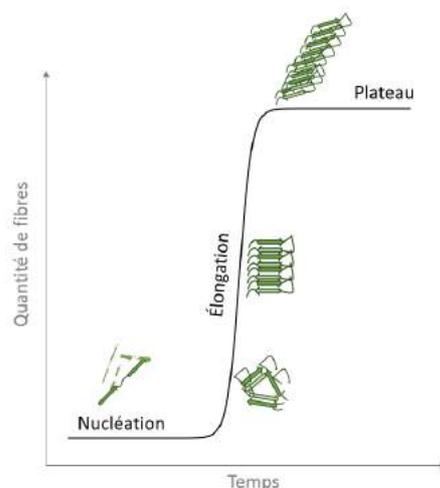


Figure 9. Les étapes d'agrégation du peptide Aβ.

D'après ces courbes, on peut observer plusieurs phénomènes :

- (i) La NMA n'émet aucune fluorescence à la longueur d'onde d'excitation de la ThT (440 nm). La ThT n'émet aucune fluorescence lorsqu'elle est excitée à la longueur d'onde de la NMA (360 nm).
- (ii) L'émission de la ThT (lorsqu'elle est excitée à 440 nm) est quasi-inexistante à t_0 de l'agrégation quelle que soit la concentration de la ThT au départ. On constate ici le caractère « on – off » de la fluorescence de la ThT lors du processus d'agrégation. Au contraire, la NMA possède une fluorescence en l'absence de formation de feuillettes-β qui augmente avec la concentration en suivant une relation tenant compte de l'« inner-filter effect » (IFE) où la molécule réabsorbe sa propre émission selon : $I = \alpha \cdot 10^{-(\beta \cdot [NMA])} [NMA]$ où α est un paramètre d'intensité de fluorescence de la NMA et β un paramètre d'absorbance contenant le trajet optique et ϵ . [4]
- (iii) Les courbes de fluorescences de la ThT et de la NMA à leur longueurs d'onde d'émission respectives présentent une augmentation de l'intensité de fluorescence lorsque la concentration augmente, puis une stagnation voire une diminution. En fait, il y a 2 effets antagonistes : i) d'une part, on observe l'augmentation de la quantité de fluorescence due à l'augmentation de la quantité de sonde fluorescente insérée ; ii) d'autre part, l'augmentation de la concentration en sonde dans le milieu augmente l'IFE ce qui diminue la fluorescence. Ces deux phénomènes s'équilibrent pour des concentrations différentes, dans le cas de la ThT ($\sim 20 \mu\text{M}$) et de la NMA ($\sim 35 \mu\text{M}$).

- (iv) Dans une condition expérimentale, la NMA a été ajoutée au bout de 29 heures lorsque les fibres étaient formées (courbe en gris de la **Fig. 8B**). On constate une progression rapide de la fluorescence à 420 nm, la NMA peut donc s'insérer rapidement dans les fibres après leur formation.
- (v) Les courbes présentées ci-dessus (**Fig. 8**) permettent d'évaluer deux paramètres : t_m qui correspond au point d'inflexion de la courbe sigmoïde et le t_{lag} qui correspond au temps qui s'écoule avant l'augmentation de la fluorescence. Ces paramètres sont donnés en utilisant un modèle de courbe adapté de la fonction de Richards :[5]

$$F(t) = F_0 + \frac{F_{max}}{(1 + v \cdot e^{-k(t-t_m)})^{1/v}} + a \cdot t \text{ où } t_{lag} = t_m - \frac{(1 + v)}{k}$$

En appliquant ces équations, on modélise les courbes de fluorescence précédentes, comme montré ci-dessous pour ThT et NMA à 5 et 10 μM (**Fig. 10**).

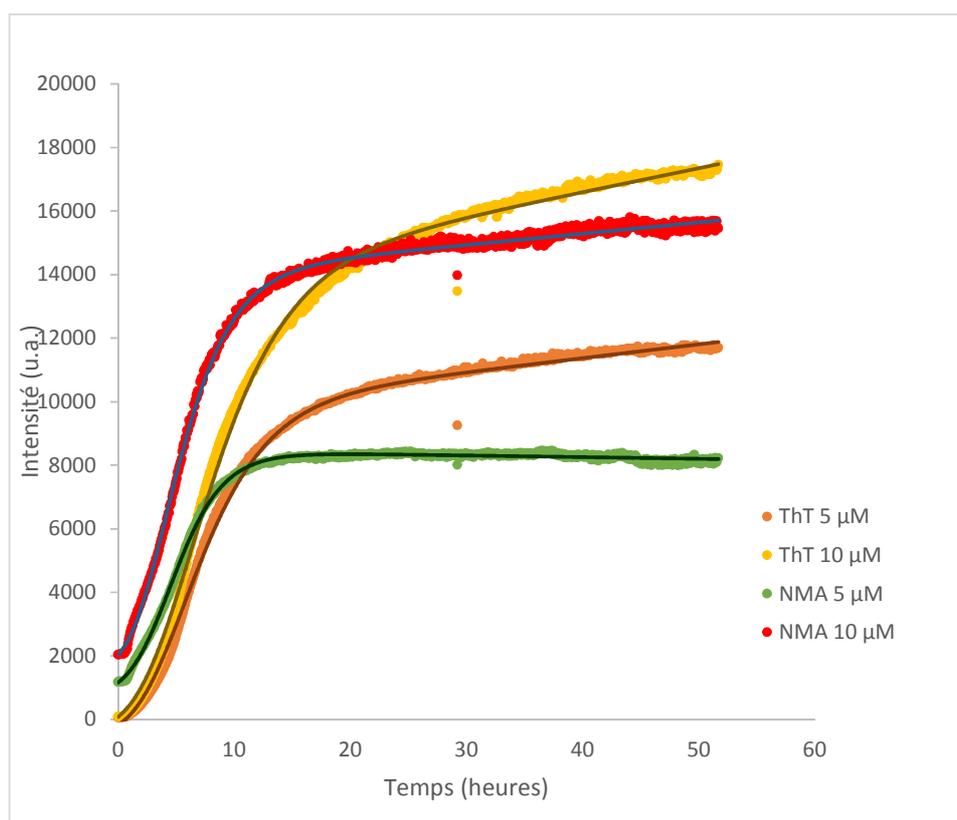


Figure 10. Points expérimentaux pour ThT et NMA à 5 et 10 μM et courbes modélisées par la fonction de Richards (ligne continue).

On obtient à partir de ces simulations les valeurs de t_m et t_{lag} suivante (**Tableau 3**) :

Tableau 3. Valeurs de t_m et t_{lag} calculées à partir des courbes modèles de ThT et NMA.

Ligand	ThT				NMA			
	5	10	20	50	5	10	20	50
t_m	5,73	6,41	6,62	6,32	4,46	4,20	3,48	2,87
t_{lag}	1,56	1,78	2,93	0,93	0,79	0,98	0,96	0,62

En comparant les valeurs de t_m et t_{lag} pour une concentration donnée entre la ThT et la NMA, on remarque de manière générale que l'augmentation de la fluorescence de la NMA se produit plus tôt que celle de la ThT puisque le t_{lag} et le t_m de la NMA sont plus courts que ceux de la ThT. Ceci peut signifier que la NMA arrive à détecter des espèces plus précoces (oligomères, protofibrilles,...) au cours de l'agrégation de l'A β 28 bien que l'on puisse ne pas exclure qu'il y ait une influence de la NMA et de la ThT sur l'agrégation avec un effet accélérateur de la NMA. On souhaite maintenant étudier l'agrégation dans le cas où les deux ligands sont présents simultanément.

III.2.b. Suivi de l'agrégation en présence simultanée de la ThT et de la NMA.

Le protocole expérimental est exactement le même que précédemment à ceci près que la NMA et la ThT sont incubées ensemble avec le peptide A β 28 lors de l'agrégation. Ces milieux seront alors excités $\lambda_{exc} = 440$ nm (ThT) ou excité $\lambda_{exc} = 360$ nm (NMA) et analysés aux longueurs d'onde d'émission correspondantes. Les résultats sont présentés ci-dessous (**Fig. 11**).

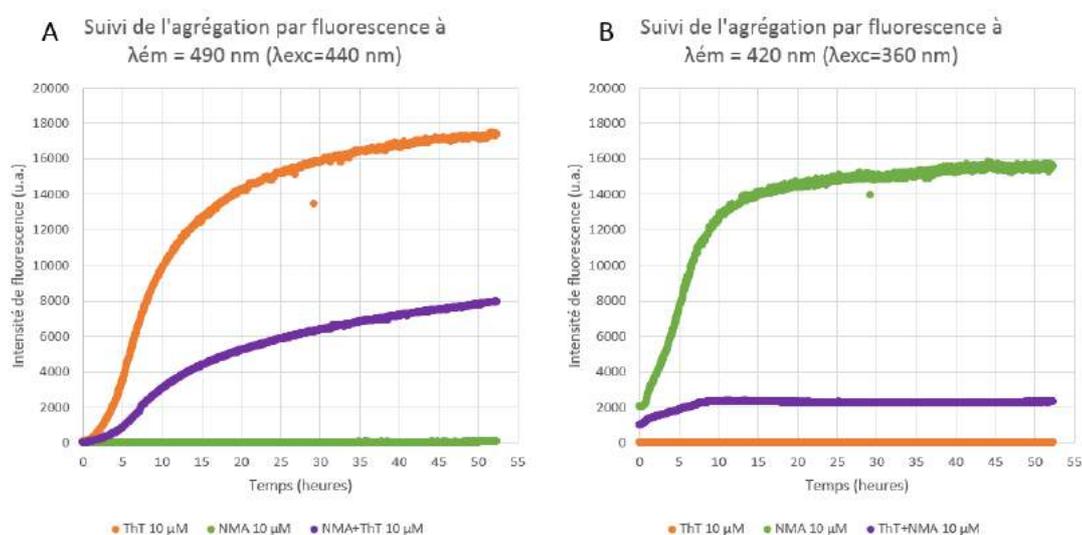


Figure 11. Suivi de l'agrégation d'A β 28 en fonction du ligand. A : $\lambda_{exc} = 440 \text{ nm}$ et $\lambda_{ém} = 490 \text{ nm}$. B : $\lambda_{exc} = 360 \text{ nm}$ et $\lambda_{ém} = 420 \text{ nm}$. Conditions expérimentales : [Zn] = 250 μM ; [A β 28] = 500 μM ; [HEPES] = 100 mM ; pH 7,1.

Au vu des courbes ci-dessus, on constate une diminution globale de la fluorescence des 2 ligands en présence de l'autre avec une division par 2,25 dans le cas de la ThT (**Fig. 11A**) et une division par 8 dans le cas de la NMA (**Fig. 11B**). Cette perte de fluorescence peut être expliquée par le fait que la NMA et la ThT sont toutes deux des dérivés 2-aryl-BzT et peuvent partager les mêmes sites d'interaction dans les feuillets- β permettant leur émission en fluorescence et donc qu'elles entrent toutes les 2 en compétition pour les mêmes sites. Cependant, cela n'explique pas pourquoi la perte est bien plus importante pour la NMA par rapport à la ThT. L'hypothèse est que, en plus d'une compétition pour les mêmes sites, l'émission de la NMA à 420 nm doit être annihilée par la ThT lors du phénomène de Transfert d'Énergie par Résonance de type Förster (FRET).

Le FRET peut se produire lorsque 2 fluorophores, un donneur et un accepteur sont très proches dans l'espace (distance comprise entre 1 à 10 nm) et lorsque le spectre d'émission du donneur recouvre une partie du spectre d'absorption de l'accepteur. Le donneur va ainsi être excité à sa longueur d'onde mais l'énergie, au lieu d'être émise sous forme de photon dans le milieu (phénomène radiatif) lors de la désexcitation, est transférée à l'accepteur par phénomène de résonance (non radiatif).

Ici le spectre d'émission de la NMA recouvre une grande partie du spectre d'excitation de la ThT (**Fig. 12A**). On suit donc l'agrégation de l'A β 28 en suivant l'émission à 490 nm (émission de la ThT) en excitant à 360 nm (excitation de la NMA) (**Fig. 12B**).

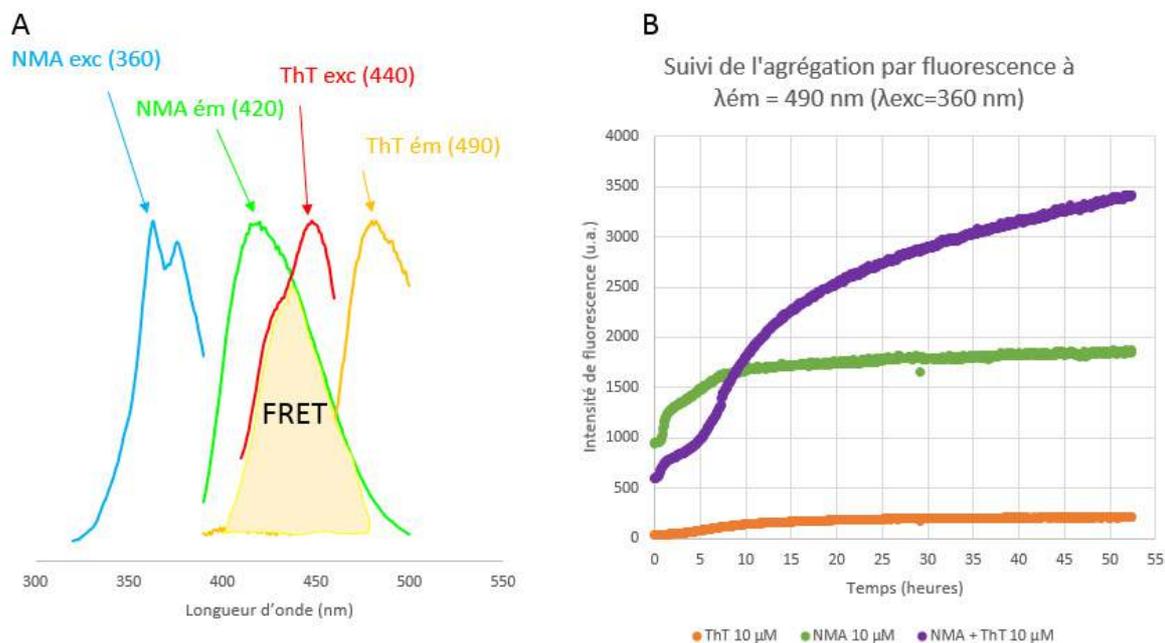


Figure 12. **A** : Spectres d'excitation et d'émission normalisés de NMA et de la ThT liés au peptide A β 28 fibrillaire. En beige le recouvrement spectral permettant le FRET. **B** : Suivi de l'agrégation de A β en fonction du ligand avec $\lambda_{exc} = 360$ nm et $\lambda_{ém} = 490$ nm. Conditions expérimentales : [Zn] = 250 μ M ; [A β 28] = 500 μ M ; [HEPES] = 100 mM ; pH 7,1.

On constate que l'ajout de la NMA améliore de manière très significative l'émission de la ThT au cours de l'agrégation par rapport à la ThT seule (à 50 heures on a respectivement 3360 contre 210 pour une excitation à 360 nm et une émission à 490 nm). Cette émission est également supérieure à celle de la NMA seule (à 50 heures on a respectivement 3360 contre 1850). Le phénomène de FRET étant montré on peut donc conclure de la proximité spatiale de la NMA et de la ThT au sein des fibres d'A β . On peut observer également que la courbe issue du FRET (en violet) peut se décomposer en 2 partie : une avant $t = 4$ h où la courbe possède le même comportement que la NMA (en vert) avec une détection supposée des espèces précoces. Puis à $t = 5$ h où l'intensité de fluorescence augmente significativement l'entrée de la ThT dans les fibres formées.

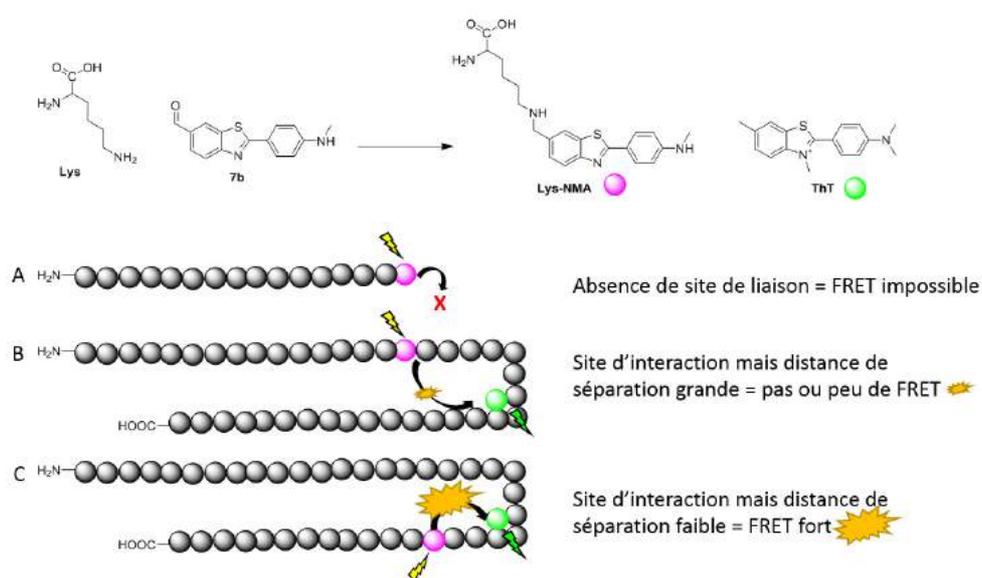
III.3. Conclusion et perspectives

Pour résumer, les expériences ci-dessus ont pu démontrer plusieurs points :

- i) La NMA permet de suivre l'agrégation tout comme la ThT et est capable de s'insérer dans des fibres préformées.
- ii) La NMA et la ThT entrent très probablement en compétition pour les mêmes sites et sont également un couple donneur/accepteur pour les phénomènes de FRET.

- iii) La NMA semble pouvoir détecter les espèces précoces au cours de l'agrégation (oligomères, protofibrilles,...).

Le fait que la NMA puisse permettre des expériences de FRET avec la ThT peut ouvrir certaines perspectives. En particulier, on pourrait imaginer des expériences de FRET interne pour des identifications de site(s) d'interaction. La NMA serait greffée à un acide aminé, par exemple une lysine, à partir du composé **7b** qui serait ensuite intégré dans un peptide A β synthétisé. On ferait ensuite varier la taille du peptide et la position de l'acide aminé marqué pour permettre l'identification du/des site(s) d'interaction(s) (**Fig. 13**). Il faudra s'assurer que ces modifications du peptide n'impacte pas l'agrégation.



Cependant les phénomènes de fluorescence observés ici n'indiquent pas l'état d'agrégation de l'A β , l'augmentation de l'intensité de fluorescence précoce de la NMA semble indiquer la détection d'espèces plus précoces sans pouvoir les différencier (si ce sont des formes oligomériques ou des formes protofibrillaires par exemple). On s'intéresse donc dans la suite de ces travaux à l'étude de l'agrégation par électrochimie et RPE, qui en théorie, pourraient donner des réponses différentes en fonction de l'état d'agrégation.

IV. Suivi de l'agrégation par voltampérométrie cyclique de la sonde Fc-BTA

IV.1. Principe de l'électrochimie pour l'étude de l'agrégation.

IV.1.a. Voltampérométrie cyclique (CV : cyclic voltammetry)

La voltampérométrie cyclique est une technique qui permet d'observer la variation d'intensité du courant I (en Ampère) d'une solution en fonction du potentiel électrique E (donné en Volt) variant de manière cyclique. Ces valeurs sont mesurées dans une cellule d'électrochimie, sans agitation, avec un jeu de 3 électrodes : une électrode de travail (WE : Working Electrode), une électrode de référence (RE : Reference Electrode) et une contre-électrode (CE : Counter electrode). La valeur du potentiel E est mesurée entre la WE et la RE et valeur de l'intensité I est mesurée entre WE et CE grâce au potentiostat qui trace le cyclovoltammogramme représentant I en fonction de E (**Fig. 14**).

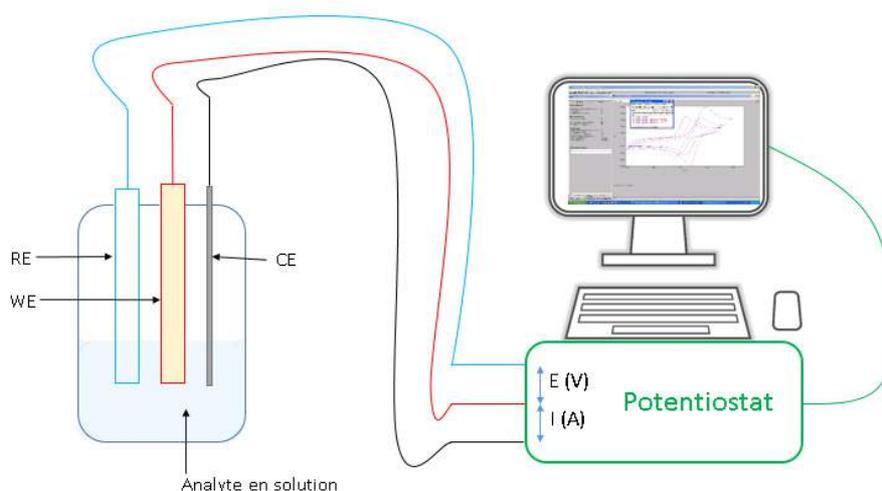


Figure 14. Schéma d'une cellule d'électrochimie avec les 3 électrodes WE, RE et CE plongées dans une solution de l'analyte permettant de mesurer les valeurs E et I grâce à un potentiostat entre la cellule électrochimique et l'ordinateur.

Lors de la CV, on balaie le potentiel de manière cyclique autour du potentiel standard du couple d'oxydo-réduction étudié à la vitesse de scan v depuis une valeur E_i jusqu'à une valeur E_j avant de revenir à la valeur E_f à la même vitesse (ici $E_i = E_f$) (**Fig. 15**). Cette technique permet d'étudier les propriétés électrochimiques d'un analyte en solution. Ainsi, dans le cas d'un couple redox comme le ferrocène dit « réversible » (un ion Fe^{2+} complexé avec 2 cyclopentadiényl (Cp)), celui peut être oxydé en ferrocénium $[Fe(Cp)_2]^+$ et ensuite à

nouveau réduit en ferrocène [Fe(Cp)₂] formant ainsi une boucle fermée sur le cyclovoltammogramme (**Fig. 15**).

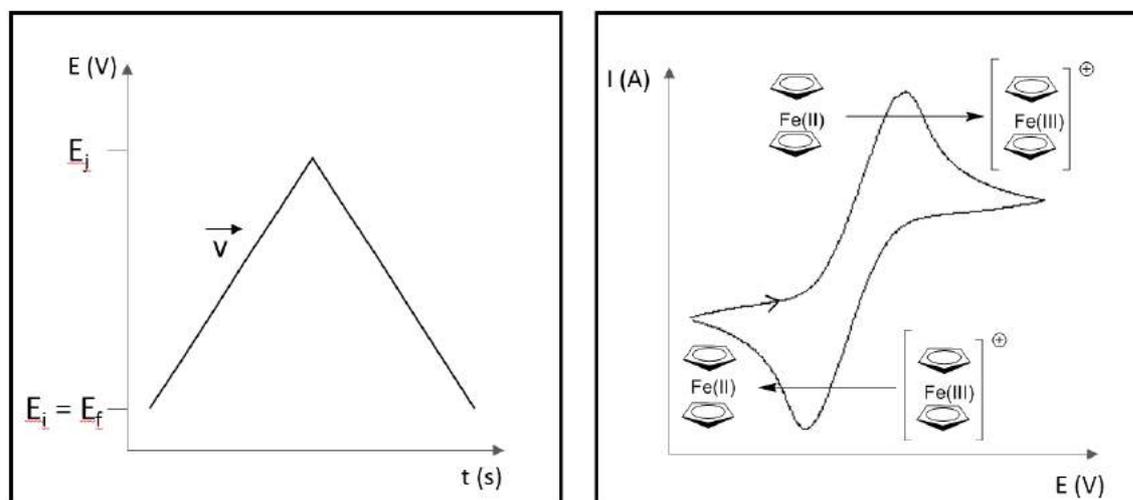


Figure 15. A gauche : Balayage du potentiel en fonction du temps. A droite : Cyclovoltammogramme du ferrocène. Les variations d'intensité correspondent aux réactions d'oxydo-réduction du ferrocène. Le profil des pics d'oxydo-réduction est gouverné par la diffusion des espèces à l'électrode.

La valeur d'intensité de courant i_p dans l'équation de Randles-Sevcik (1) dépend de :

n : le nombre d'électron transféré lors de la réaction d'oxydo-réduction ; F : la constante de Faraday ; A : l'aire d'électrode ; C : la concentration des espèces en solution ; v : la vitesse de balayage du potentiel ; D : le coefficient de diffusion de l'analyte ; R : la constante des gaz parfaits et T : la température.

$$i_p = 0,4463 \cdot nFAC \sqrt{\frac{nFvD}{RT}} \quad (1)$$

IV.1.b. Voltampérométrie à vague carrée (SWV : Square wave voltametry)

Cette technique fut développée par Baker *et al.* en 1952 afin de supprimer les effets d'un courant capacitif sur la sensibilité d'une mesure.[6] Lors d'une mesure en électrochimie, il existe 2 sortes de courants qui additionnés donne la valeur i_p mesurée : le courant faradique i_F et le courant capacitif i_C .

Le courant faradique i_F est celui qui est présent lors des transferts d'électrons entre l'électrode et le milieu réactionnel. Ce sont ces transferts d'électrons qui permettent les réactions d'oxydation et/ou de réduction et changent donc la composition chimique du milieu.

Le courant capacitif i_C , quant à lui, est celui qui est présent lorsque l'on modifie le potentiel à la surface de l'électrode comme c'est le cas avec la CV, il est assez dépendant de la nature des ions présents en solution

ainsi que de la nature des électrodes et du montage de la cellule électrochimique. Il peut être considéré comme un « blanc » électrochimique. Le courant capacitif i_C n'intervient pas dans les réactions d'oxydo-réductions et ne change donc pas la nature chimique du milieu.

Lors de mesures quantitatives en électrochimie on s'intéresse principalement à la valeur i_F . Dans le cas de certaines mesures, cette valeur peut se montrer assez faible par rapport à i_C , et donc la mesure sera peu sensible.

L'utilisation de la SWV permet grâce à une séquence spécifique de variations du potentiel de s'affranchir du courant capacitif i_C au profit du courant faradique i_F ce qui permet de gagner fortement en sensibilité. En SWV, le potentiel varie selon les séquences suivantes : (i) une variation du potentiel en escalier allant de E_i à E_f avec des pas de potentiels E_{pas} . Cette séquence (i) s'additionne à la séquence (ii) une variation du potentiel sous forme de vague carrée d'amplitude ΔE et de période de pulse τ_p ; donnant ainsi (iii) la séquence potentiel utilisé en SWV. Sur cette dernière, les intensités i_1 et i_2 sont mesurées à la fin de chaque pulse et $\Delta i_p = i_1 - i_2$ est calculée pour être représenté en fonction du potentiel V (**Fig. 16**).

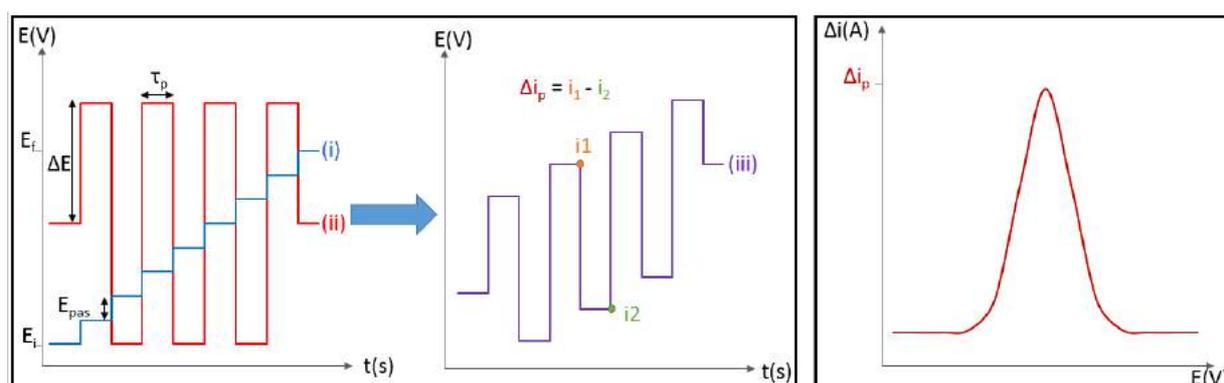


Figure 16. A gauche : représentation graphique des séquences de variations du potentiel en SWV avec les principaux paramètres. A droite : voltammogramme correspondant.

Dans le cas de la SWV, la valeur de Δi_p dépend de :

n , le nombre d'électrons transférés lors de la réaction d'oxydo-réduction ; F , la constante de Faraday ; A , l'aire à la surface de l'électrode ; C_0^* , la concentration des espèces en solution ; D_0 , la diffusion des espèces en solution ; τ_p , le temps du pulse et d'un paramètre $\Delta \Psi_p$ sans dimension mesurant la hauteur du pic en SWV par rapport au courant mesuré lors de la voltampérométrie à pulse normal.[7]

$$\Delta i_p = nFAC_0^* \sqrt{\frac{D_0}{\pi \cdot \tau_p}} \cdot \Delta \Psi_p \quad (2)$$

IV.1.c. L'électrochimie pour suivre l'agrégation.

Afin de subir ces réactions d'oxydo-réduction, la molécule doit rejoindre l'électrode pour subir soit une réduction ou une oxydation. Le déplacement de cette molécule, en l'absence d'agitation, se fait par diffusion. Voilà pourquoi ce phénomène est un paramètre affectant la valeur d'intensité de courant dans l'équation de Randles-Sevcik (1) dans le cas de la CV ou bien dans l'équation (2) dans le cas de la SWV.

Le coefficient de diffusion D est directement corrélé à la taille de l'analyte via son rayon hydrodynamique r , cette relation est donnée par la formule de Stokes-Einstein (3). Ici D est inversement proportionnel à r le rayon hydrodynamique de l'analyte et μ la viscosité dynamique du milieu ce qui signifie que plus la molécule est de grande taille et moins elle diffusera rapidement et donc plus l'intensité du courant sera faible.

$$D = \frac{kT}{6\pi r\mu} \quad (3)$$

Dans le cas du suivi de l'agrégation, le composé **21b**, la sonde Fc-BTA synthétisée au chapitre 3 (Fig. 17) sera utilisée. Elle permet d'avoir d'une part une structure d'affinité pour les fibres d'A β et d'autre part le motif ferrocène ayant une signature en électrochimie.

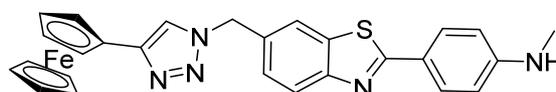


Figure 17. Structure du composé **21b** : la sonde Fc-BTA.

Comme expliqué précédemment, la diffusion du ligand est un paramètre affectant directement l'intensité du courant mesuré, si l'on ajoute le peptide A β et qu'il commence à s'agréger alors le ligand Fc-BTA sera incorporé au fur et à mesure dans les fibres pendant leur formation. Un équilibre s'installe entre le ligand et les agrégats gouverné par le K_d . Ainsi, le coefficient de diffusion du Fc-BTA diminuera lors de l'agrégation puisque il sera lié à une structure peptidique de plus en plus grosse (et donc diffusant avec une vitesse de moins en moins grande) et donc on aura une intensité de courant plus faible mesurée au cours de l'agrégation (Fig. 18).

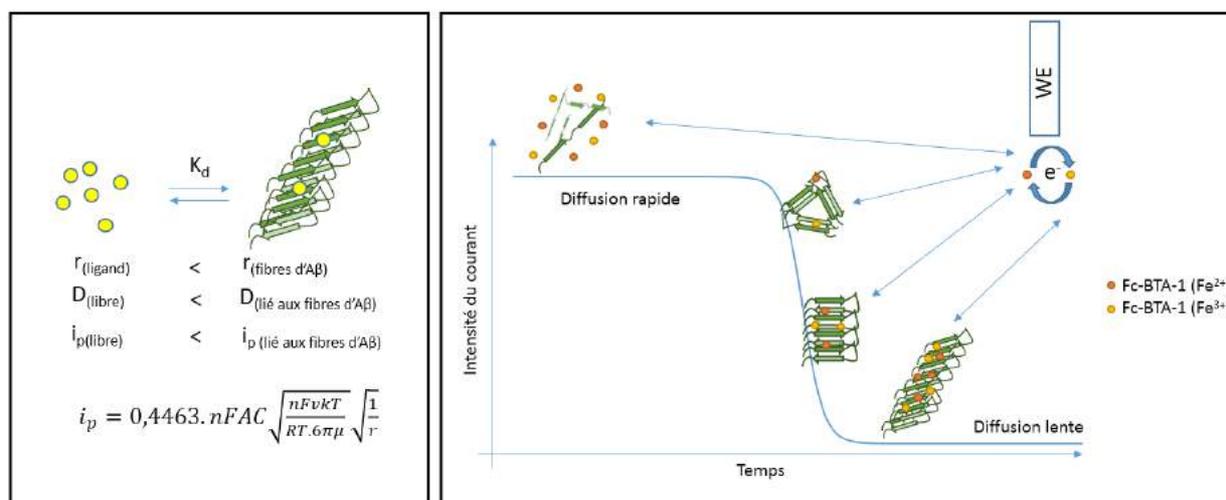


Figure 18. A gauche : Schéma représentant l'équilibre dynamique entre les formes libres et liées du ligand ainsi que l'impact sur les valeurs mesurées en électrochimie. A droite : Schéma représentatif de la variation de l'intensité de courant au cours de l'agrégation médiée par l'augmentation du coefficient de diffusion pendant la formation de fibres.

Ainsi en théorie, on pourrait suivre l'agrégation en temps réel par électrochimie à l'instar du suivi par fluorescence.

Cette technique a déjà été mise au point afin de suivre une technique d'amplification de l'ADN à température constante (LAMP : Loop mediated isothermal amplification) par l'équipe de Marchal ;[8, 9] grâce à l'utilisation de sondes intercalantes de l'ADN ayant un signal en électrochimie. Dans cet exemple, la sonde s'intercale au fur et à mesure que l'ADN est synthétisé ce qui augmente alors son coefficient de diffusion et fait donc chuter l'intensité du courant électrique (Fig. 19).

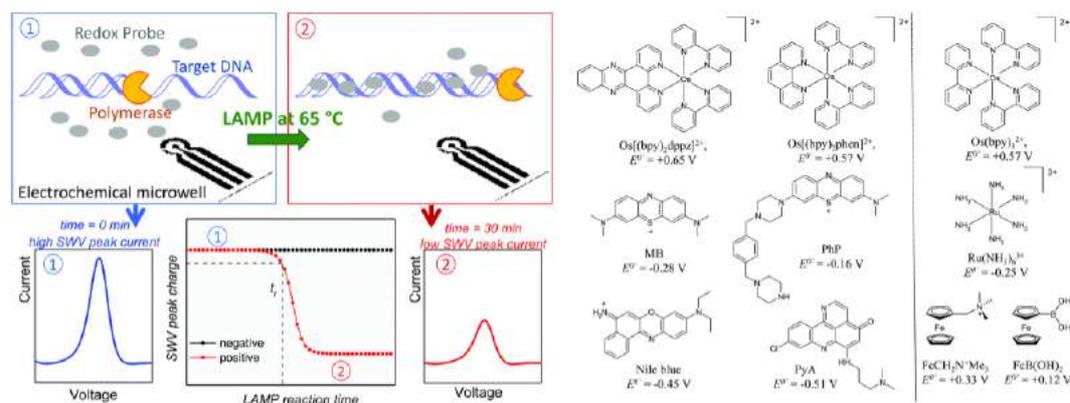


Figure 19. À gauche : schéma explicatif du suivi de LAMP par électrochimie. À droite : Sondes intercalantes de l'ADN utilisées.[8]

On évaluera ici si ce phénomène est également visible avec la sonde Fc-BTA et le peptide Aβ fibrillaire (et éventuellement en cours d'agrégation). Le gain attendu par rapport à une expérience en fluorescence est que

la signature en électrochimie de la sonde n'est pas affectée par l'environnement et que l'on peut accéder à la valeur d'affinité K_d , le courant à la fin de l'agrégation renseignant directement sur la concentration en sonde libre.

Les mesures d'électrochimie sont faites sur des électrodes sérigraphiées sur un film plastique fournies par l'équipe de Damien Marchal (Laboratoire d'Électrochimie Moléculaire, Université Paris 7). Cette feuille est connectée à un commutateur pouvant sélectionner de manière séquentielle chaque cellule électrochimique. Chaque cellule est composée d'une électrode de travail (WE) en carbone avec une électrode auxiliaire (CE) en carbone également et d'une électrode pseudo-référence (RE) en argent (**Fig. 20**). Ce type de système permet de travailler sur des volumes de 40 μ L par dépôt de goutte sur la cellule électrochimique.

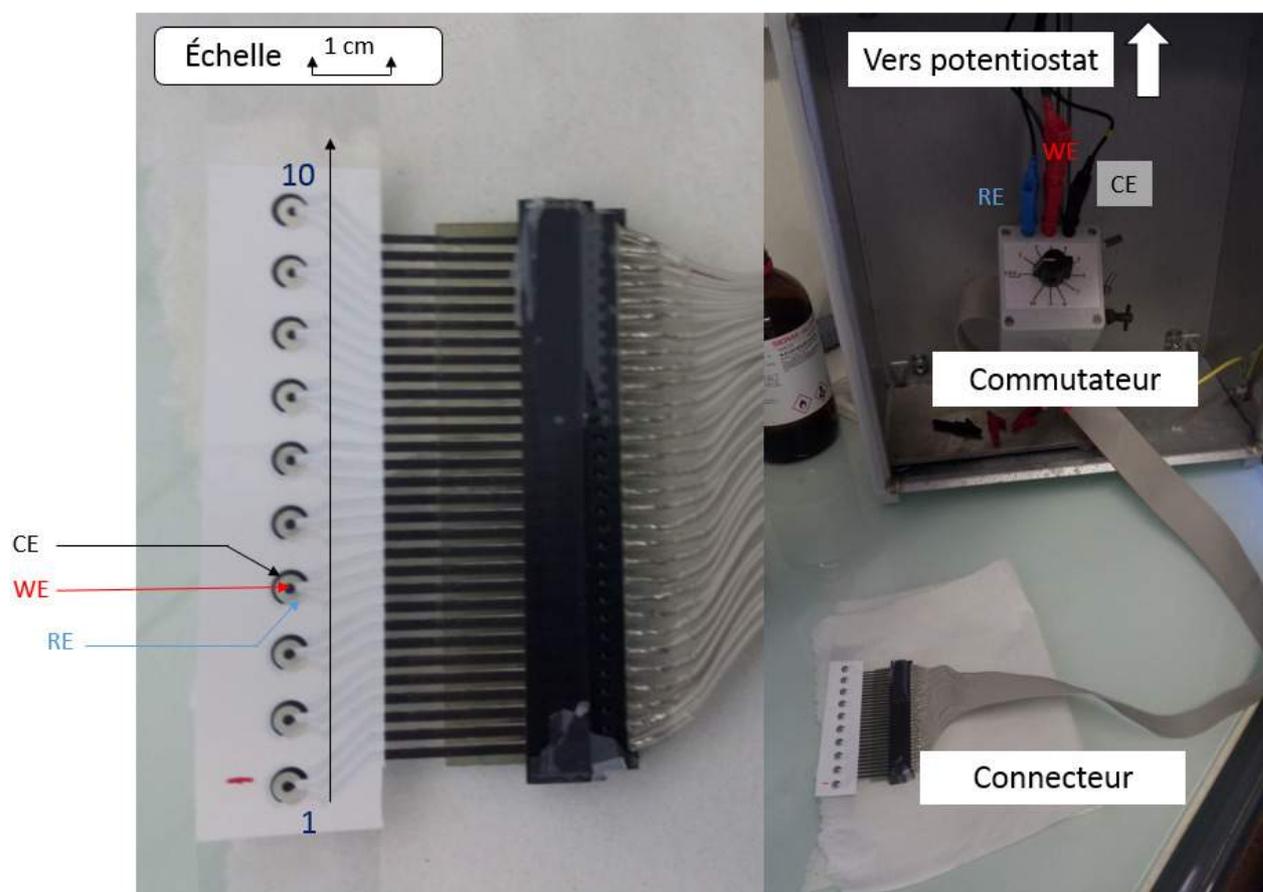


Figure 20. Photographies du dispositif utilisé pour les mesures sur électrodes sérigraphiées. Chaque cellule électrochimie, numéroté de 1 à 10, comporte une électrode de travail (WE) centrale en carbone, une électrode auxiliaire (CE) en carbone et une électrode pseudo-référence (RE) en argent.

IV.2. Expériences et résultats.

IV.2.a. Influence des fibres A β 28 sur le voltammogramme du Fc-BTA.

Nous souhaitons ici mettre en évidence l'affinité du ligand Fc-BTA envers les fibres d'A β 28 à 500 μ M comparée à un ligand témoin un dérivé ferrocène hydrosoluble appelé Fc-hydro (**Fig. 21**), ceci afin de valider ce qui a été expliqué précédemment à savoir qu'en cas de liaison avec les fibres d'A β 28, l'intensité du courant pour le ligand Fc-BTA devrait diminuer fortement à cause de la diminution de la vitesse de diffusion.



Figure 21. Structure du ligand Fc-hydro.

On produit 4 conditions initiales expérimentales :

- 1) [Fc-BTA] = 20 μ M dans [HEPES] = 50 mM pH 7,1 et 5 % DMSO
- 2) [Fc-hydro] = 20 μ M dans [HEPES] = 50 mM pH 7,1 et 5 % DMSO
- 3) [Fc-BTA] = 20 μ M et [A β 28] = 400 μ M dans [HEPES] = 50 mM pH 7,1 et 5 % DMSO
- 4) [Fc-hydro] = 20 μ M et [A β 28] = 400 μ M dans [HEPES] = 50 mM pH 7,1 et 5 % DMSO

On dépose une goutte de 40 μ L sur une cellule électrochimique de la feuille sérigraphiée par condition et l'on fera successivement l'acquisition du voltammogramme en CV et en SWV avec l'Autolab PGSTAT302N à 25°C. Les ligands ont été incubés avec les fibres environ 10 minutes avant l'acquisition.

IV.2.b. Résultats et interprétations

Les voltammogrammes en CV et SWV pour les conditions 1 et 2 ; respectivement [Fc-BTA] = 20 μ M et [Fc-hydro] = 20 μ M tous les deux dans [HEPES] = 50 mM et 5 % de DMSO ; présentent des différences notables en terme d'intensité de courant (**Fig. 22**). Le Fc-BTA possède une intensité de courant plus faible que le ligand Fc-Hydro libre. Les valeurs déterminées de Δi_p en SWV sont pour Fc-hydro de $1,62 \times 10^{-6}$ A et de $0,9 \times 10^{-6}$ A pour le Fc-BTA alors que les valeurs de i_p déterminée par CV sont respectivement de $1,28 \times 10^{-7}$ A et $3,40 \times 10^{-8}$ A (en oxydation). Cette différence s'explique par la différence de taille entre les deux molécules. Fc-BTA étant plus grande, son rayon hydrodynamique augmente et donc diffuse moins que la Fc-hydro selon les relations (1), (2) et (3).

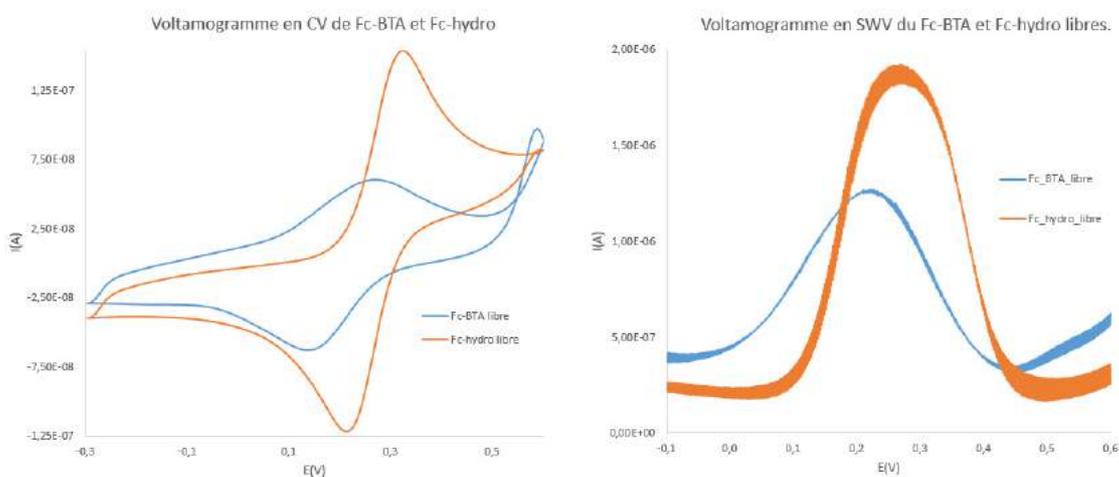


Figure 22. A gauche : Cyclovoltammogramme en CV de Fc-BTA et Fc-hydro, vitesse de balayage = 0,1 V/s. A droite : voltammogramme en CV de Fc-BTA et Fc-hydro libres. $E_{pas} = 1 \text{ mV}$, $\Delta E = 0,1 \text{ V}$ et $t_s = 0,01 \text{ s}$. $[Fc-BTA] = [Fc-hydro] = 20 \mu\text{M}$, $[HEPES] = 50 \text{ mM}$, $DMSO \text{ 5\%}$.

On compare maintenant ces cyclovoltammogrammes où les ligands sont en présence de fibres d'A β 28 = 400 μM (Fig. 23 et 24).

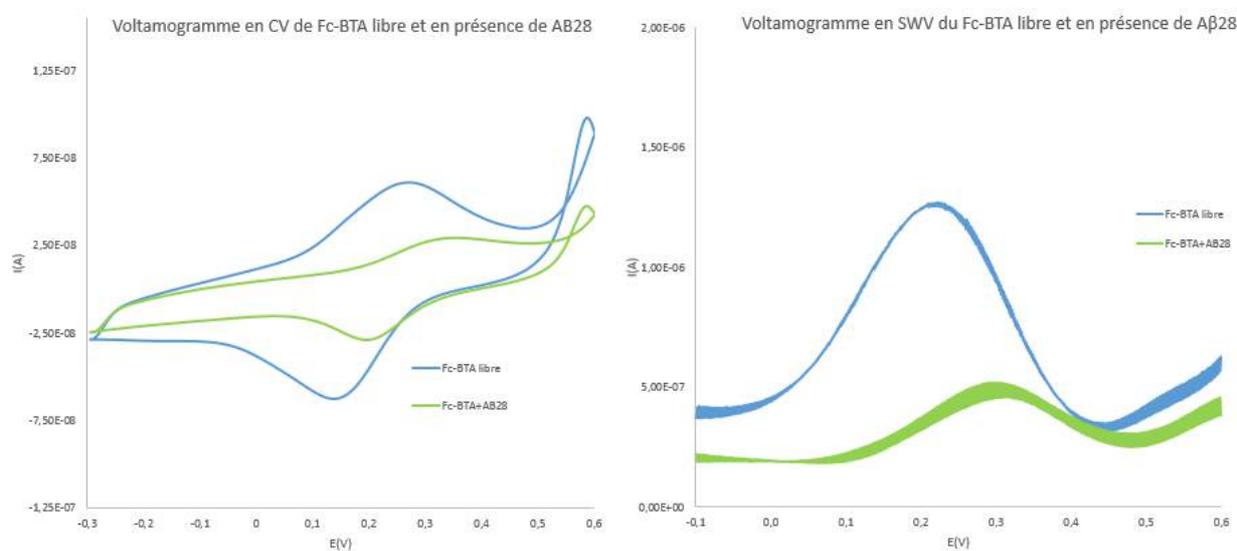


Figure 23. A gauche : Cyclovoltammogramme du Fc-BTA (bleu) et en présence de fibres AB28 (vert). Vitesse balayage $v = 0,1 \text{ V/s}$. A droite : Voltammogramme en SWV du Fc-BTA libre et en présence des fibres de AB28. $[Fc-BTA] = 20 \mu\text{M}$, $[HEPES] = 50 \text{ mM}$, $[AB28] = 400 \mu\text{M}$, $DMSO \text{ 5\%}$, temps d'incubation d'environ 10 minutes.

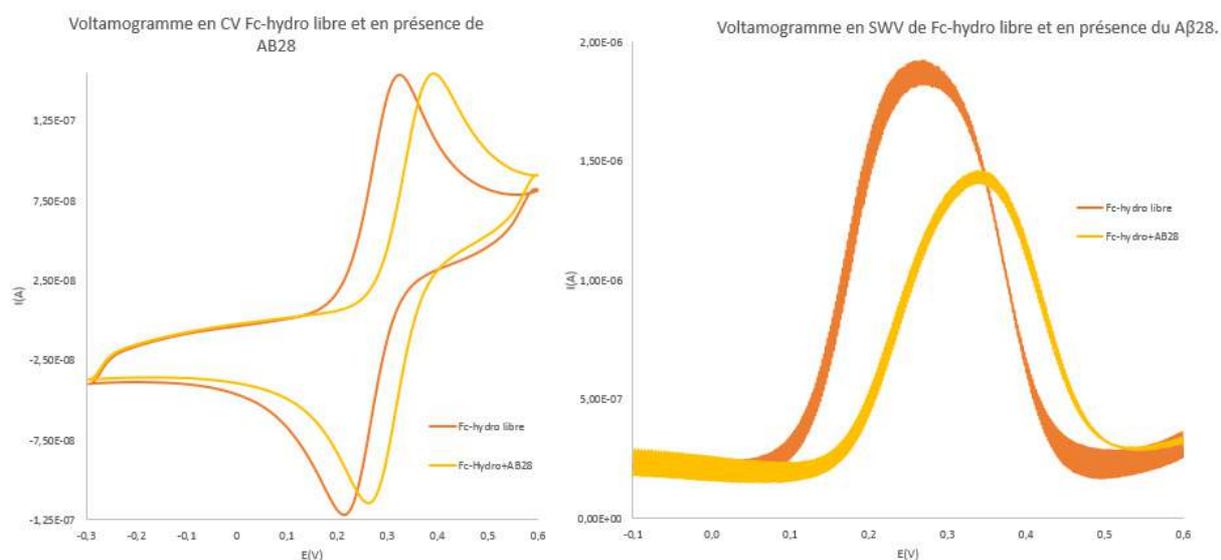


Figure 24. Cyclovoltammogramme du Fc-BTA libre (orange) et en présence de fibres A β 28 (jaune). Vitesse balayage $v = 0,1$ V/s. A droite : Voltammogramme en SWV du Fc-hydro libre et en présence des fibres de A β 28. [Fc-hydro] = 20 μ M, [HEPES] = 50 mM, [A β 28] = 400 μ M, DMSO 5%, temps d'incubation d'environ 10 minutes.

Les valeurs des intensités i_F , i_c , i_p en CV et Δi_p en SWV des différentes conditions sont reportées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 4**). Les calculs, permettant de déterminer le pourcentage de ligand libre, supposent que les valeurs de i_p (et de Δi_p) devraient tendre vers 0 pour Fc-BTA inséré ($i_{\text{inséré}}$). En effet, d'après les relations (1), (2) et (3), i_p et Δi_p sont proportionnels à $\sqrt{1/r}$. Si, on part de l'hypothèse que Fc-BTA ~ 3 nm et les fibres $\sim \mu$ m, soit $r_{\text{inséré}} \sim 100 \cdot r_{\text{libre}}$ alors $i_{\text{inséré}} \sim 0,1 \cdot i_{\text{libre}}$. En conséquence, la contribution de l'intensité de courant du Fc-BTA inséré peut être considérée comme négligeable par rapport à l'intensité de courant du ligand libre ($<10\%$ i_{libre}).

Tableau 4. Valeurs de i_F , i_c , i_p et Δi_p des voltammogrammes en CV et SWV pour les 4 conditions

			libre	+ A β 28	Ratio ligand libre (%)	Moyenne (%)	
Fc-BTA	CV	oxydation	i_F	6,10E-08	2,90E-08	X	32
			i_c	2,70E-08	1,70E-08	X	
			i_p	3,40E-08	1,20E-08	35	
		réduction	i_F	-6,30E-08	-2,57E-08	X	
			i_c	-1,50E-08	-7,00E-09	X	
			i_p	-4,80E-08	-1,87E-08	39	
	SWV	Δi_p	9,00E-07	2,00E-07	22		
Fc-hydro	CV	oxydation	i_F	1,55E-07	1,55E-07	X	87
			i_c	2,70E-08	4,30E-08	X	
			i_p	1,28E-07	1,12E-07	88	
		réduction	i_F	-1,21E-07	-1,15E-07	X	
			i_c	-1,50E-08	-9,00E-09	X	
			i_p	-1,06E-07	-1,06E-07	100	
	SWV	Δi_p	1,62E-06	1,16E-06	72		

On remarque que dans le cas de Fc-hydro comme dans celui du Fc-BTA il y a une chute de l'intensité à en présence de fibres (différentes selon que l'on regarde en CV ou en SWV). Par contre la chute d'intensité est bien plus importante dans le cas du Fc-BTA par rapport au Fc-hydro. On explique alors cette chute bien plus importante par le fait que le Fc-BTA interagit beaucoup mieux avec les fibres en solution grâce à son motif 2-aryl-BzT. Par conséquent son rayon hydrodynamique est augmenté d'où la diminution du coefficient de diffusion du ferrocène porté par le ligand et donc la chute d'intensité. On observe également ici que les valeurs en CV et SWV sont différentes, on suppose ici que la sensibilité plus grande de la SWV permet de mieux observer la chute d'intensité dû à l'interaction comparé à la CV.

IV.2.c. Calcul du K'_d .

Le pourcentage de Fc-BTA libre dans le milieu peut être estimé à 37 % (32 % corrigée par la valeur de 87 % pour Fc-hydro). On peut donc supposer la concentration en ligand inséré dans les fibres et donc estimer le K'_d (cf.II.2.b) pour $[A\beta 28] = 20*[Fc-BTA] = 400 \mu M$ en supposant que l'ensemble des monomères ait formé des fibres. On détermine qu'il y a 7,4 μM de ligand libre (37 % de 20 μM) et donc 12,6 μM de ligand

Fc-BTA inséré dans les fibres. On obtient donc la relation et le K'_d suivants avec $[A\beta 28] = 400 \mu\text{M}$ et $[\text{TEMPO-BTA}] = 20 \mu\text{M}$ (**Fig. 25**) :

$$K'_d = \frac{(20 \cdot C_0 - 5 \cdot C_{\text{inséré}}) \cdot C_{\text{libre}}}{C_{\text{inséré}}}$$

$C_{\text{inséré}}$	12,6 μM
C_{libre}	7,4 μM
K'_d	$\sim 200 \mu\text{M}$

Figure 25. Formule du K'_d utilisée pour $[A\beta 28]=400 \mu\text{M}$, $[\text{Fc-BTA}] (C_0) = 20 \mu\text{M}$ et $[\text{HEPES}] = 50 \text{mM}$ dans 5% DMSO avec un temps d'incubation de 10 minutes.

On a donc ici une valeur de $K'_d \sim 200 \mu\text{M}$ déterminée par électrochimie. Cette valeur est très supérieure comparée à celle trouvée par fluorescence où $K'_d \sim 10 \mu\text{M}$ (cf. §II.2.b). De tels écarts peuvent être expliqués par les différences suivantes entre les deux expériences : i) le ratio $A\beta 28/\text{Fc-BTA}$ est de 200 en fluorescence et de 20 en électrochimie ; ii) les cosolvants ne sont pas les mêmes (5 % ACN en fluorescence / 5 % DMSO en électrochimie), iii) les approximations ne sont pas exactement les mêmes (les calculs en électrochimie sont basés sur le fait qu'on néglige la contribution au courant de $i_{\text{inséré}}$) ; iv) Les temps d'incubation sont également différents, seulement 10 minutes pour l'expérience en électrochimie contre une nuit entière pour la fluorescence, ne laissant donc pas suffisamment temps au Fc-BTA de s'insérer davantage.

Cette valeur $K'_d \sim 200 \mu\text{M}$ déterminée par électrochimie sera comparée plus loin à celle trouvée pour les expériences en RPE (cf. V.2.c).

IV.3. Conclusion et perspectives.

Ces résultats préliminaires ont permis de mettre en évidence l'affinité que possède le ligand Fc-BTA envers les fibres du peptide $A\beta 28$ ce qui est très encourageant quant à l'utilisation de l'électrochimie pour suivre l'agrégation du peptide $A\beta$. Cependant le système utilisé ici ne permet de faire le suivi de l'agrégation dans de bonnes conditions. En effet, l'agrégation durant plusieurs heures, la goutte déposée sur le film finira par s'évaporer au cours de l'expérience. Il faudrait pouvoir utiliser un système de plaque de puits où chaque puit constituerait une cellule électrochimique permettant de suivre l'agrégation en temps réel à l'instar des travaux de l'équipe de Damien Marchal sur le suivi de la duplication d'ADN (**Fig. 26**).[10]

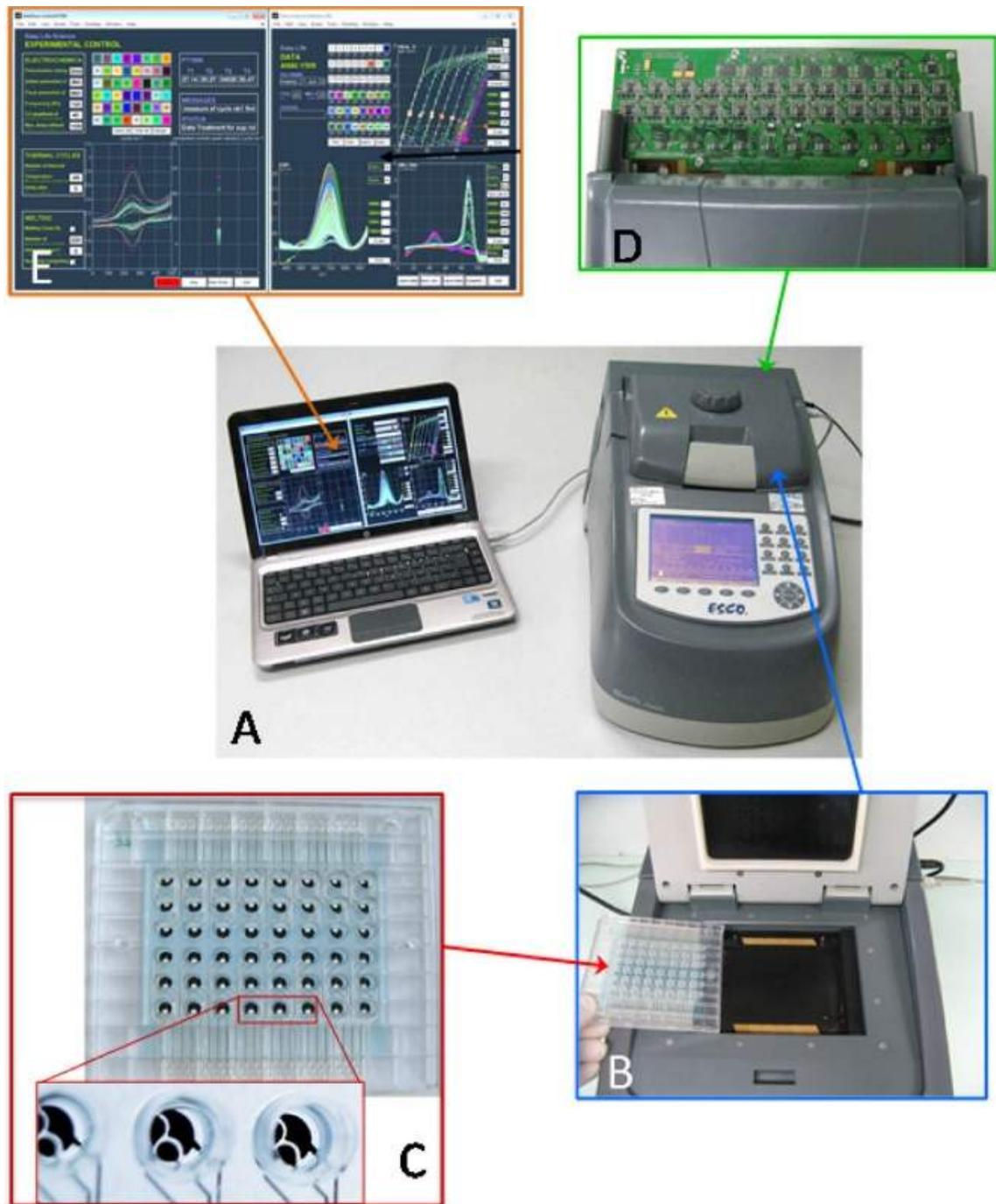


Figure 26. Photographies du montage utilisé pour le suivi de la duplication d'ADN. Issue de Martin et al., 2016.

V. Suivi de l'agrégation de la sonde TEMPO-BTA.

V.1. Principes des mesures RPE pour suivre l'agrégation.

La RPE est une technique basée sur la capacité à détecter les espèces paramagnétiques (spin électronique non nul). Lors de l'introduction de cette thèse, nous avons évoqué les travaux de Yamada et *al.* qui ont utilisé des motifs 2-aryl-BzT auxquels ont été ajoutés des motifs comportant un radical nitroxyle.[11] Il est possible à partir de mesure du temps de corrélation rotationnel τ_c d'évaluer la taille des objets dans lequel une sonde radicalaire est insérée. En effet, le temps de corrélation rotationnel est le temps durant lequel la particule tourne d'un radian. Il est donné par l'équation de Stokes-Einstein modifiée (4). D'après celle-ci, τ_c est dépendante de μ la viscosité du milieu dans lequel évolue la molécule, V le volume de la molécule, k_B la constante de Boltzmann et T la température. On peut approximer la forme globale des molécules à une sphère de rayon hydrodynamique r et donc donner la formule du volume V d'un globe.

$$\tau_c = \frac{V \cdot \mu}{k_B T} = \frac{4\pi\mu r^3}{3 \cdot k_B T} \quad (4)$$

La formule qui lie quant à elle, le τ_c aux paramètres enregistré en RPE est donné par l'équation (5) :[12]

$$\tau_c = 6,5 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta B_0 \left[(h_0/h_{-1})^{\frac{1}{2}} - 1 \right] \quad (5)$$

Où ΔB_0 est la largeur (en Gauss) entre le minima et le maxima de la raie centrale ; h_0 et h_{-1} respectivement l'amplitude de la raie centrale et de la raie en champ fort (Fig. 27). Cette équation (5) peut être arrangée pour exprimer ΔB_0 en fonction de τ_c . En intégrant les termes de l'équation (4) on obtient l'équation suivante (6) exprimant ΔB_0 en fonction du rayon hydrodynamique r :

$$\Delta B_0 = \frac{4\pi\mu r^3}{3 \cdot k_B T \cdot 6,5 \cdot 10^{-10} \left[(h_0/h_{-1})^{\frac{1}{2}} - 1 \right]} \quad (6)$$

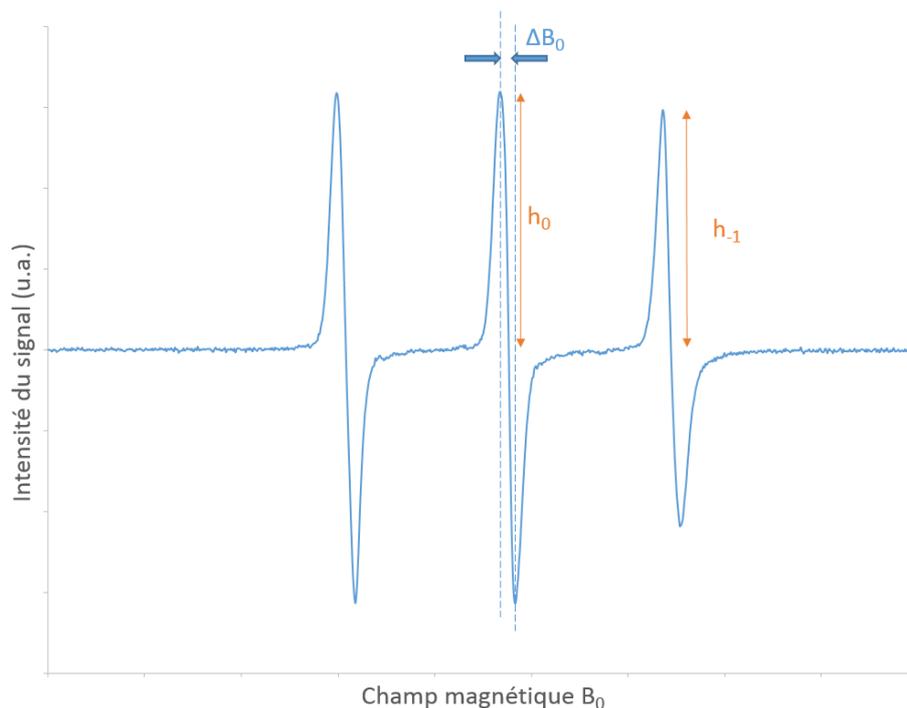
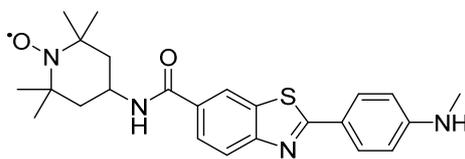


Figure 27. Spectre RPE d'un radical nitroxy avec l'illustration des paramètres RPE ΔB_0 , h_0 et h_{-1} utilisé dans l'équation (5).

D'après l'équation (6), le paramètre ΔB_0 est directement corrélé à la valeur de r^3 ce qui signifie que lorsque r augmente, la largeur de la raie va augmenter très fortement ce qui aura pour conséquence une diminution de l'intensité du signal RPE. On s'attend donc pour cette expérience que : (i) la signature du ligand TEMPO-BTA soit différente de celle du ligand libre ; (ii) que les proportions entre ligand inséré et ligand libre permettent l'évaluation d'un K_d .

Dans le cas du suivi d'agrégation nous utiliserons la sonde **16b**, TEMPO-BTA, dont la synthèse a été écrite dans le chapitre III. Elle comporte d'une part un motif TEMPO permettant d'être actif en RPE et d'autre part une structure de reconnaissance des fibres d'A β (**Fig. 28**).



16b

Figure 28. Structure du composé 16b, les ligands TEMPO-BTA.

Lorsque le ligand est mis en présence d'un type d'agrégat d'A β par exemple les fibres, un équilibre s'installe entre le ligand et les fibres gouverné par le K_d du ligand envers les fibres de la même manière que présenté

en partie IV.1.c. Lorsque le ligand est lié aux fibres le rayon hydrodynamique qui affectera la valeur de τ_c sera celui de la fibre et non plus celui du ligand. Le τ_c observé sera donc plus grand que pour le ligand seul selon l'équation (6) ; ce qui aura pour conséquence une diminution de l'intensité du signal et l'élargissement des raies en RPE. Le phénomène que l'on souhaite observer en RPE est assez comparable à ce que l'on souhaite voir en électrochimie (**Fig. 29**), et repose sur les mêmes phénomènes physiques. On remarque qu'en électrochimie la valeur de i_p est dépendante de $\sqrt{1/r}$ alors qu'en RPE la valeur ΔB_0 est dépendante de r^3 , on a donc à priori une bien meilleure sensibilité en RPE qu'en électrochimie.

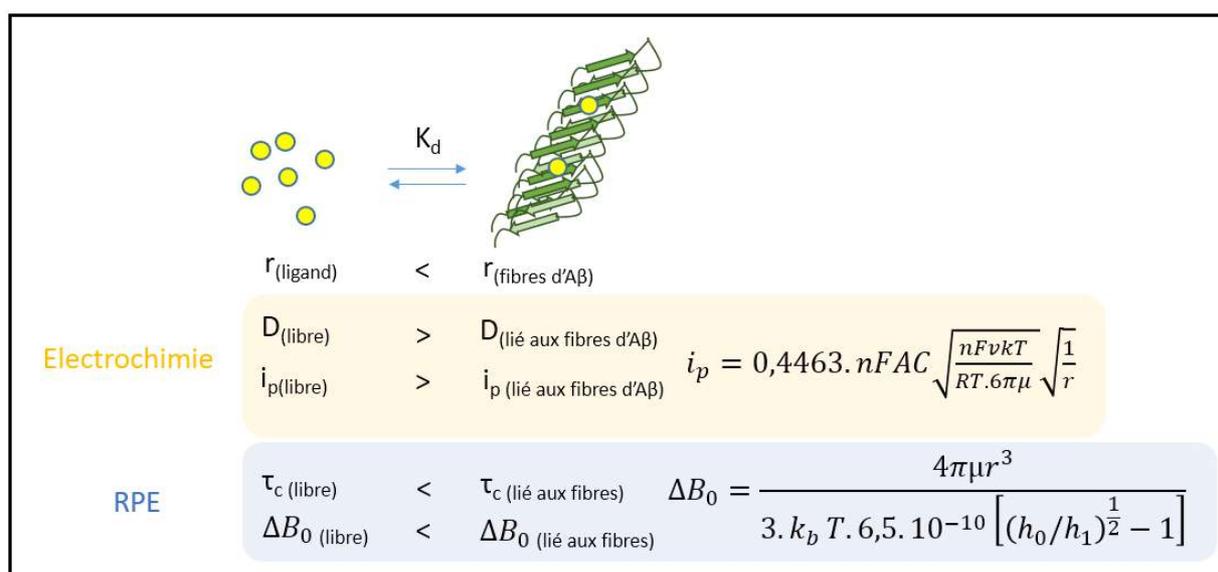


Figure 29. Schéma de l'équilibre entre les formes libre et lié du ligand gouvernées par le K_d . Paramètres impliqués dans les équations d'électrochimie et de RPE.

Dans le cas de ces travaux, nous souhaitons observer le processus d'agrégation par RPE, plus précisément nous souhaitons pouvoir indirectement observer les différents d'agrégats. En effet lors de l'agrégation, le peptide Aβ formera des structures ayant un PM (i.e. un rayon hydrodynamique) de plus en plus grand au fur et à mesure du processus. Le ligand est quant à lui de plus en plus incorporé au sein des agrégats il adoptera donc un rayon hydrodynamique de plus en plus grand et donc un τ_c de plus en plus grand au cours du temps (**Fig. 30**).

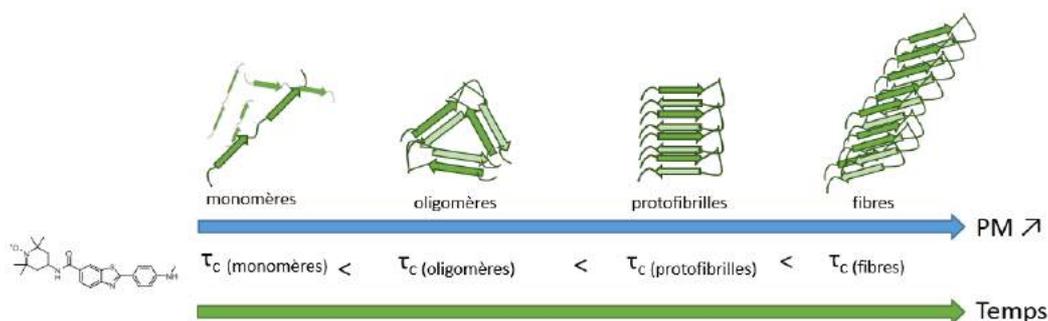


Figure 30. Chronologie de la valeur du τ_c du dérivé TEMPO du 2-aryl-BzT, PM et de la formation des agrégations.

En faisant l'acquisition des spectres RPE à différents temps d'agrégation il est possible d'établir une corrélation entre la valeur du τ_c et la forme d'agrégats du peptide, ce qui permet à la fin de pouvoir identifier le type d'agrégats. De la même manière que pour l'électrochimie, la sonde ne sera pas affectée par l'environnement (tant que celui-ci n'est pas réducteur pour le radical ce qui n'est pas le cas ici).

V.2. Expériences et résultats.

V.2.a. Influence du peptide A β 28 sous forme agrégée ou non sur le signal RPE du TEMPO-BTA.

Ici on souhaite comparer l'effet des formes monomériques et agrégée en fibres du peptide A β 28 sur le signal RPE du ligand TEMPO-BTA. Ces mêmes comparaisons seront faites avec un témoin le 4-oxo-TEMPO (**Fig. 31**).

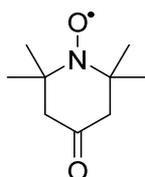


Figure 31. Structure du 4-oxo-TEMPO

Les ligands TEMPO-BTA et 4-oxo-TEMPO sont donc dans 3 conditions : seuls en solution dans [HEPES] = 50 mM et DMSO 5 % ; avec [A β 28 mono] = 500 μ M ; ou [A β 28 fibres] = 500 μ M. Les spectres ont été acquis à l'aide du spectromètre Eleksys E 500 de Bruker opérant à une fréquence micro-onde d'environ 9.76 GHz. Tous ont été enregistrés à l'aide d'une puissance micro-ondes de 5 mW sur une largeur de balayage de 12 mT (centré à 348 mT) avec une amplitude de modulation de 0,1 mT (**Fig. 32**).

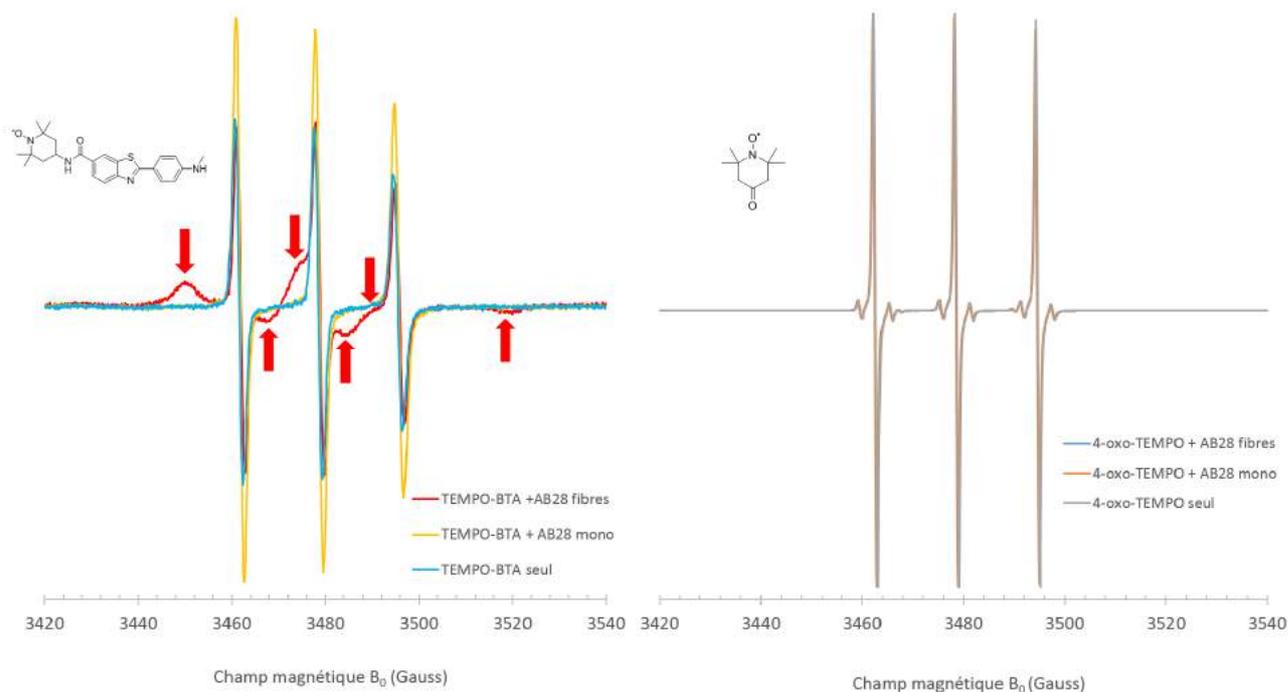


Figure 32. A gauche : Spectres RPE du TEMPO-BTA libre (bleu), en présence du monomère (jaune) et en présence de fibres (rouge) d'Aβ28. Les flèches rouges indiquent les raies du ligand interagissant avec le peptide. A droite : Spectres RPE du 4-oxo-TEMPO libre (gris), en présence du monomère (orange) et des fibres (bleu) d'Aβ28. Conditions [TEMPO-BTA] = [4-oxo-TEMPO] = 20 μM ; [Aβ28]=500 μM ; [HEPES]=50 mM et 5% DMSO.

Le signal RPE du radical nitroxy possède 3 raies provenant du couplage hyperfin entre l'électron de spin $S = \frac{1}{2}$ et le spin nucléaire de l'azote $I = 1$. La formule prédisant la multiplicité des raies est $2nI+1$ où n est le nombre de noyau voisin de l'électron et I est le spin nucléaire ; la multiplicité est donc de 3. On remarque tout d'abord que la présence ou non du peptide n'influe pas sur le signal RPE du 4-oxo-TEMPO, signifiant qu'il n'y a à priori pas d'interaction visible en RPE. Concernant le TEMPO-BTA les différences suivantes peuvent être distinguées : i) Le signal RPE du ligand TEMPO-BTA libre est moins intense que celui où il est en présence de Aβ monomérique. Ceci peut être expliqué par le fait que le ligand TEMPO-BTA présente une solubilité limitée et donc peut s'auto-assembler en solution ; ce qui rapproche les électrons célibataires annihilant mutuellement leur effet paramagnétique et diminue ainsi le signal RPE. La présence d'Aβ28 permet d'améliorer la solubilité du TEMPO-BTA dans l'eau offrant un environnement hydrophobe et donc prévient ce phénomène d'auto-assemblage du TEMPO-BTA. ii) Le signal RPE pour le ligand en présence des fibres présente de nouvelles raies. Ce changement de signal est dû à un changement d'environnement du radical. Ce qui signifie qu'on a bien interaction entre le peptide Aβ sous forme de fibres et le ligand TEMPO-BTA. Le TEMPO-BTA inséré dans les fibres possède un rayon hydrodynamique bien plus important que celui du ligand, d'où l'élargissement du signal prévu par l'équation (6) (cf. §V.1). Ce résultat confirme ce qui a été illustré par l'équipe de Yamada.[11]

Nous avons ici prouvé que le ligand TEMPO-BTA permet de discriminer les formes agrégées des formes monomériques du peptide A β . Nous souhaitons maintenant savoir s'il est possible de pouvoir suivre une agrégation du peptide au cours du temps.

V.2.b Suivi de l'agrégation par RPE

Une solution de 500 μ L contenant [TEMPO-BTA] = 20 μ M ; [A β 28 mono] = 500 μ M ; [HEPES] = 50 mM et DMSO 5% a été préparée. L'acquisition du spectre RPE est effectuée et correspond à t_0 avant de déclencher l'agrégation. Puis 0,5 équivalent de Zn par rapport au peptide est ajouté et chaque spectre est acquis toutes les 10 minutes pendant 20 h. Un dernier spectre est acquis ensuite au bout de 72 h. Les courbes présentées correspondent aux spectres acquis à $t = 0 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20$ et 72 h (**Fig. 33**).

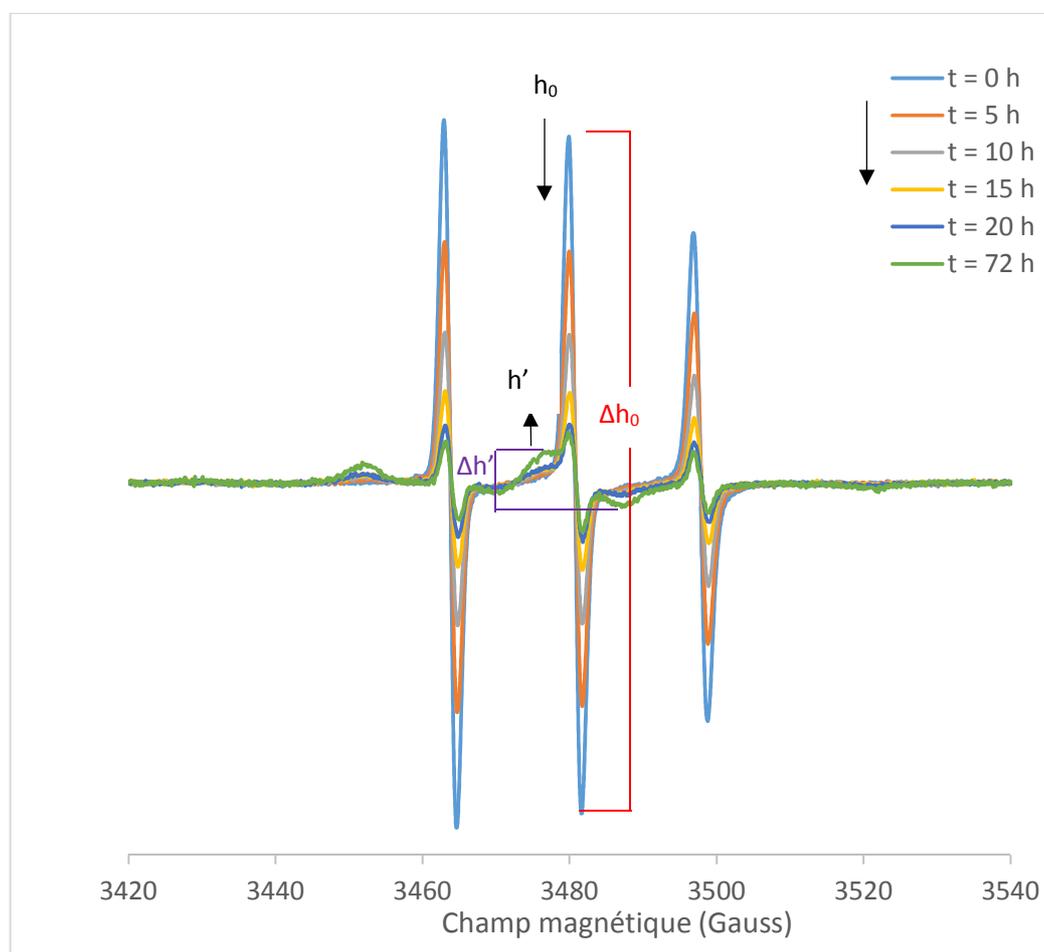


Figure 33. Spectre RPE acquis à $t = 0 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20$ et 72 h. Conditions : [TEMPO-BTA] = 20 μ M, [A β 28] = 500 μ M, [HEPES] = 50 mM, [Zn] = 250 μ M et DMSO 5%.

Nous observons ici une diminution de la hauteur h_0 de la raie centrée sur 3481 G au cours du temps jusqu'à 72 h. On observe également l'apparition de nouveaux pics correspondant au TEMPO-BTA inséré dans les fibres provoquant le changement d'environnement du radical comme observé lors des précédentes expériences (cf § V.2.a). Ce qui signifie qu'il est possible de pouvoir suivre l'agrégation du peptide par RPE. On peut également noter l'apparition de points isobestiques, les plus visibles sont à 3464, 3481 et 3498, au niveau des centres des raies pour le TEMPO-BTA libre. Ceci indique que l'on ne voit que les espèces libres ou insérées dans les fibres d'A β . On n'arrive donc pas à distinguer des interactions avec des espèces plus précoces comme les oligomères par exemple, ce qui montre que la proportion de ces espèces est très faible.

Ici nous reportons la différence entre les valeurs maximales et minimales des raies centrales au cours du temps (appelés Δh_0 pour la raie du TEMPO-BTA libre et $\Delta h'$ pour la raie du TEMPO-BTA insérée (**Fig. 33**)). Nous obtenons deux courbes qui peuvent être modélisées sous forme de sigmoïde en utilisant la fonction de Richard (cf III.2.a). Ces deux courbes sont ensuite normalisées pour être représentée sur le même graphique (**Fig. 34**).

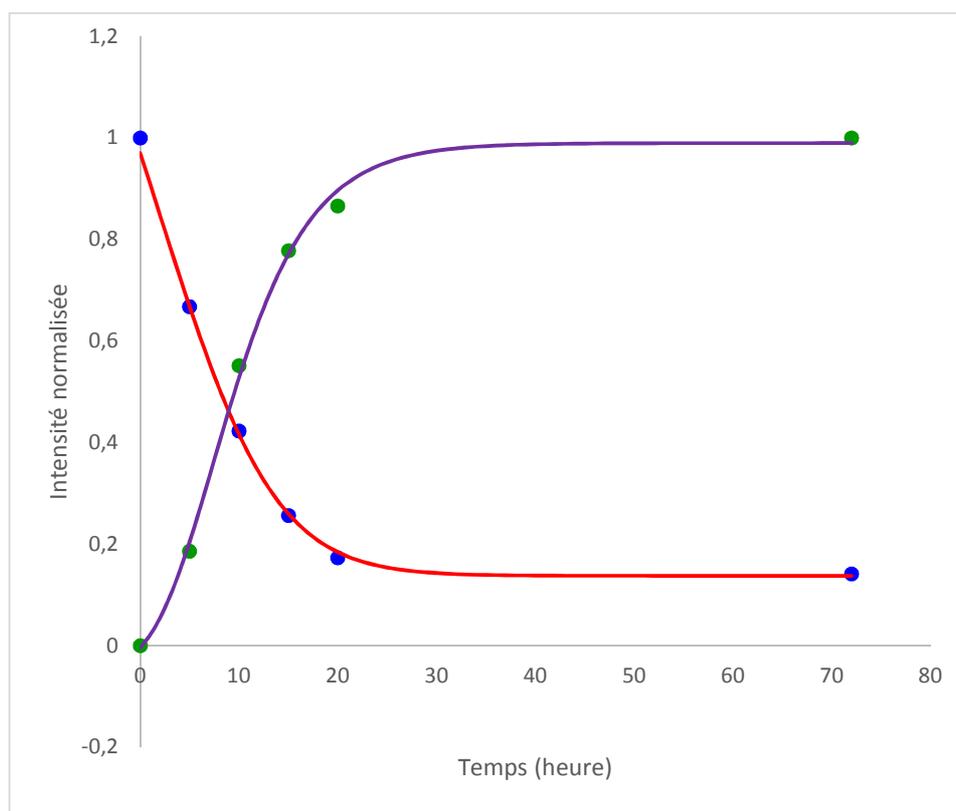


Figure 34. Courbe modélisée (rouge) et point expérimentaux (bleu) de Δh_0 correspondant du signal TEMPO-BTA libre. Courbe modélisée (violet) et point expérimentaux (vert) de $\Delta h'$ correspondant au signal TEMPO-BTA inséré.

Nous obtenons ici deux courbes d'aspect sigmoïde qui sont globalement symétriques. On observe la diminution de Δh_0 du TEMPO-BTA libre au cours du temps alors qu'il s'insère dans les fibres d'où l'augmentation de $\Delta h'$ correspondant au TEMPO-BTA inséré. On obtient ainsi un t_m d'environ 7,4 h pour Δh_0 , une valeur proche de celle trouvée pour les expériences d'agrégation avec la ThT (cf III.2.a).

V.2.c. Calcul de la constante de dissociation K'_d

On peut estimer la concentration du TEMPO-BTA libre après agrégation à partir du signal résiduel au bout de 72 h et donc estimer le K'_d (cf.II.2.b) envers les fibres $[A\beta 28] = 25 \cdot [TEMPO-BTA] = 500 \mu M$ en supposant que l'ensemble des monomères ait formé des fibres. Par déconvolution, on détermine qu'il reste environ 13 % de TEMPO-BTA libre en solution soit 2,6 μM . On obtient donc la relation et le K'_d suivants avec $[A\beta 28] = 500 \mu M$ et $[TEMPO-BTA] = 20 \mu M$ (**Fig. 35**) :

$$K'_d = \frac{(25 \cdot C_0 - 5 \cdot C_{inséré}) \cdot C_{libre}}{C_{inséré}}$$

$C_{inséré}$	17,4 μM
C_{libre}	2,6 μM
K'_d	~60 μM

Figure 35. Formule du K'_d utilisée pour $[A\beta 28]=500 \mu M$, $[TEMPO-BTA] (C_0) = 20 \mu M$, $[HEPES] = 50 mM$ et $[Zn] = 250 \mu M$ dans 5% ACN au bout de 72 h d'agrégation.

On pourra dès lors faire ce même calcul lors de l'agrégation avec le peptide Aβ40 (avec par exemple $[TEMPO-BTA] = 4 \mu M$ et $[A\beta 40] = 100 \mu M$). Et comparer les valeurs pour démontrer si on a une différence d'affinité comme lors des expériences en fluorescence (cf. II.2).

Si l'on compare cette valeur à celle mesurée pour le ligand Fc-BTA (cf. IV.2.c.), on a ici une affinité de même ordre de grandeur (60 μM contre 200 μM). Cependant compte tenu du temps d'incubation pour le ligand Fc-BTA avec les fibres (~10 min), on peut s'attendre à ce que la majorité du Fc-BTA n'a pas pu s'insérer dans les fibres, et donc qu'avec un temps d'incubation plus long on puisse en insérer davantage.

V.2.d. Calcul du temps de corrélation τ_c

À partir des résultats ci-dessus nous pouvons déterminer un temps de corrélation τ_c pour TEMPO-BTA libre et inséré à partir de la formule (5) rappelée ci-dessous :

$$\tau_c = 6,5 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta B_0 \left[\left(\frac{h_0}{h_1} \right)^{\frac{1}{2}} - 1 \right] \quad (5)$$

On obtient ainsi les valeurs τ_c suivante (**Tableau 5**) :

Tableau 5. Valeurs de ΔB_0 , h_0 , et h_1 et τ_c pour TEMPO-BTA libre et inséré.

	TEMPO-BTA libre	TEMPO-BTA inséré
ΔB_0 (G)	1,8	9,9
h_0	217764	29737
h_1	158116	2666
τ_c (s)	2,03E-10	1,51E-08

On a donc comme supposé au départ un temps de corrélation plus grand pour le TEMPO-BTA inséré que le TEMPO-BTA libre. Il faut cependant rester prudent à propos de ce résultat, en effet si le ligand est inséré dans des fibres, on s'attend à un rayon dynamique bien plus important par rapport au ligand TEMPO-BTA libre. Ici on a un ratio d'environ 80 entre les temps de corrélation de TEMPO-BTA inséré et libre en supposant que la viscosité du milieu μ est la même, on a donc d'après l'équation (4) un rayon hydrodynamique pour TEMPO-BTA inséré seulement environ 4 fois plus important que pour le TEMPO-BTA libre ce qui n'est pas cohérent avec une insertion dans les fibres d'Aβ (**Fig. 36**).

$$\begin{aligned} \tau_c(\text{inséré}) &= \frac{V \cdot \mu}{k_B T} = \frac{4\pi\mu r^3(\text{inséré})}{3 \cdot k_B T} \\ \tau_c(\text{libre}) &= \frac{V \cdot \mu}{k_B T} = \frac{4\pi\mu r^3(\text{libre})}{3 \cdot k_B T} \end{aligned} \quad \Rightarrow \quad \frac{\tau_c(\text{inséré})}{\tau_c(\text{libre})} = \frac{r^3(\text{inséré})}{r^3(\text{libre})} \quad \Rightarrow \quad \sqrt[3]{\frac{\tau_c(\text{inséré})}{\tau_c(\text{libre})}} = \frac{r(\text{inséré})}{r(\text{libre})}$$

Figure 36. Relations entre le temps de corrélation τ_c et le rayon hydrodynamique r .

On suppose donc que le ligand est effectivement inséré dans les fibres mais que ces dernières ne peuvent être assimilées à des sphères pour le calcul de temps de corrélation. Par ailleurs, il est important de noter que la valeur de τ_c observée provient de 2 composantes : (i) une composante globale correspondant au rayon

hydrodynamique de la fibre ; (ii) une composante locale où le motif TEMPO est partiellement libre de mouvement au sein de la fibre. On ne peut donc à partir du τ_c (inséré) remonter au $\tau_{\text{inséré}}$.

V.3. Conclusion et perspectives sur le suivi d'agrégation par RPE.

Les résultats présentés dans cette partie confirment que l'utilisation du ligand TEMPO-BTA en présence du peptide sous forme monomère ou fibre en RPE permet d'observer l'insertion du ligand dans les fibres qui se caractérise par une signature beaucoup moins résolue et de plus faible intensité, ce résultat est cohérent avec ce que prédit l'équation (6). De plus, il a été démontré ici que la RPE permet de suivre l'agrégation du peptide A β 28 où l'on observe la disparition de l'espèce TEMPO-BTA libre au profit de l'apparition progressive des espèces TEMPO-BTA insérée dans les fibres. À court terme, il faudra reproduire ces expériences sur des cinétiques plus longues afin de parfaire les courbes modèles et de pouvoir en extraire des paramètres cinétiques. On pourra par la suite, reproduire ces expériences avec le peptide A β 40 et comparer également les affinités du ligand envers les différentes formes du peptide A β 28 et A β 40.

VI. Conclusion générale sur l'étude de l'agrégation.

Nous avons ici souhaité répondre à plusieurs problématiques présentes dans la littérature concernant le suivi d'agrégation du peptide A β par fluorescence. Celle-ci se fait principalement avec la ThT dont l'exaltation de sa fluorescence, ne permet de détecter que les feuillets β formés.

Nous avons pu, dans le cadre de ces travaux : (i) élaborer un outil décrivant de manière relative l'affinité de différents ligands le K'_d basé sur l'hypothèse d'une formation d'un site d'insertion formé par 5 peptides de A β par technique de fluorescence ; (ii) proposer que la sonde NMA permet une détection des espèces précoces au cours de l'agrégation et que ses propriétés photo-physiques permettent des expériences de FRET avec la ThT, ouvrant des perspectives sur la détection du site d'insertion de la ThT ; (iii) prouver la pertinence de l'électrochimie dans le suivi de l'agrégation par des expériences préliminaires où le signal en SWV de la sonde Fc-BTA diminue drastiquement lorsqu'il est mis en présence de fibres d'A β 28 comparé à un témoin ; (iv) observer le suivi d'agrégation par RPE avec l'utilisation de la sonde TEMPO-BTA par diminution du son signal et l'apparition d'un signal correspondant au ligand inséré dans les fibres.

Ces expériences ont été conduites avec le peptide A β 28 pour des raisons de reproductibilité et de facilité de manipulation. Il faudra reproduire ces expériences avec le peptide A β 40 pour la suite des travaux. On pourra également produire ces mêmes expériences avec des dérivés protégés par le Boc afin de vérifier si la

présence de ce dernier n'induit pas une gêne stérique influant de manière défavorable sur l'affinité du ligand envers les agrégats du peptide A β (en tant que contrôle).

On a donc au final accès à 2 nouvelles techniques de suivi d'agrégation basées sur le coefficient de diffusion des espèces présentes en solution et qui permettent donc de s'affranchir de l'unique détection des feuillets- β par exaltation de la fluorescence de la ThT. Nous espérons ainsi pouvoir identifier différentes morphologies d'A β grâce à ces techniques en particulier par RPE où une signature correspond à une taille de fibre.

Bibliographie du chapitre IV

1. Groenning, M., *Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status*. J Chem Biol, 2010. **3**(1): p. 1-18.
2. LeVine, H., [18] *Quantification of β-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T*. Methods in Enzymology, 1999. **309**: p. 274-284.
3. Kuznetsova, I.M., et al., *A new trend in the experimental methodology for the analysis of the thioflavin T binding to amyloid fibrils*. Mol Neurobiol, 2012. **45**(3): p. 488-98.
4. Alies, B., et al., *Cu(II) Affinity for the Alzheimer's Peptide: Tyrosine Fluorescence Studies Revisited*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(3): p. 1501-1508.
5. Shoffner, S.K. and S. Schnell, *Estimation of the lag time in a subsequent monomer addition model for fibril elongation*. Phys Chem Chem Phys, 2016. **18**(31): p. 21259-68.
6. Barker, G.C. and I.L. Jenkins, *Square-wave polarography*. The Analyst, 1952. **77**(920): p. 685.
7. Bard, A.J. and L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2001.
8. Martin, A., et al., *Real-time electrochemical LAMP: a rational comparative study of different DNA intercalating and non-intercalating redox probes*. Analyst, 2016. **141**(13): p. 4196-4203.
9. Kivlehan, F., et al., *Real-time electrochemical monitoring of isothermal helicase-dependent amplification of nucleic acids*. Analyst, 2011. **136**(18): p. 3635-3642.
10. Martin, A., et al., *Ultimate Single-Copy DNA Detection Using Real-Time Electrochemical LAMP*. ACS Sensors, 2016. **1**(7): p. 904-912.
11. Mito, F., et al., *Monitoring the aggregation processes of amyloid-beta using a spin-labeled, fluorescent nitroxyl radical*. Chem Commun (Camb), 2011. **47**(17): p. 5070-2.
12. Milton Franklin Benial, A., M. Kumara Dhas, and A. Jawahar, *Rotational Correlation Time Studies on Nitroxyl Radicals Using 300 MHz ESR Spectrometer in High Viscous Liquid*. Applied Magnetic Resonance, 2011. **40**(3): p. 311.

Chapitre V

Table des matières

Chapitre V : Vers une caractérisation du site d'interaction entre le peptide A β agrégé et le motif 2-aryl-BzT.....	159
I. Investigation de l'interaction ligand/protéine par cristallographie aux RX et criblage <i>in silico</i>	160
I.1. Cristallographie aux RX.....	160
I.2. Cryomicroscopie électronique (Cryo-ME).....	160
I.3. Criblage <i>in silico</i>	161
II. Investigation de l'interaction TEMPO-BTA et du peptide A β par RMN.....	162
II.1. Utilisation de la RMN pour détecter les sites d'intérêts.....	162
II.2. Expériences et résultats.....	164
II.3. Conclusion et perspectives.....	167
III. Investigation de l'interaction DA-BTA et le peptide A β par SM.	168
III.1. Principe et choix de la fonction de photomarquage.....	168
III.1.a. Nitrène via le motif azoture de phényle.....	170
III.1.b. Radical carbocentré via le motif benzophénone.....	171
III.1.c. Carbène via le motif diazirine.....	172
III.1.d. Résumés des caractéristiques des fonctions chimiques de photomarquage.	173
III.2. Expériences et résultats.....	175
III.2.a. Protocole.....	175
III.2.b. Résultats préliminaires et interprétations.....	175
III.3. Conclusion et perspectives.....	178
IV. Conclusion générale sur la caractérisation du site d'interaction.....	178
Bibliographie du Chapitre V.....	179

Chapitre V : Vers une caractérisation du site d'interaction entre le peptide A β agrégé et le motif 2-aryl-BzT.

Comme énoncé dans l'introduction, bien que l'utilisation du motif 2-aryl-BzT soit assez répandue, le mode d'interaction de ce motif envers le peptide A β agrégé reste peu clair. Les travaux de Lockhart *et al.* [1] en 2005 ont déterminé 3 sites d'interaction en supposant 2 sites hydrophobes (formés par les acides aminés 17–21 et 30–40). Biancalana *et al.*, [2] ont tenté d'élucider la voie d'interaction entre la ThT et les fibres d'A β par l'utilisation d'un modèle obtenu d'un cristal d'un complexe entre la ThT et l'acétylcholinestérase, en concluant que l'interaction se faisait avec les résidus aromatiques des chaînes latérales. Cependant le manque de structures à haute résolution des différentes morphologies de l'A β ne permettent pas de développer davantage les études d'interaction et de déterminer de manière précise les modes d'interaction. Voilà pourquoi, dans le cadre de ces travaux, 2 dérivés des 2-aryl-BzT ont été ciblés afin d'obtenir de nouvelles informations sur les sites d'interaction des 2-aryl-BzT avec le peptide. L'un servira à faire des études par spectroscopie RMN par l'utilisation du ligand **16b** TEMPO-BTA, ayant également servi dans les études d'agrégation par RPE (cf. Chapitre IV §V). L'autre, le ligand **9b** qui sera nommé ici DA-BTA servira à faire des études par spectrométrie de masse par l'utilisation d'une fonction diazirine. Convertie en carbène sous irradiation UV, elle permet des couplages covalents aux acides aminés, le mécanisme de marquage de photaffinité sera détaillé au § 1.4. (**Fig. 1**).

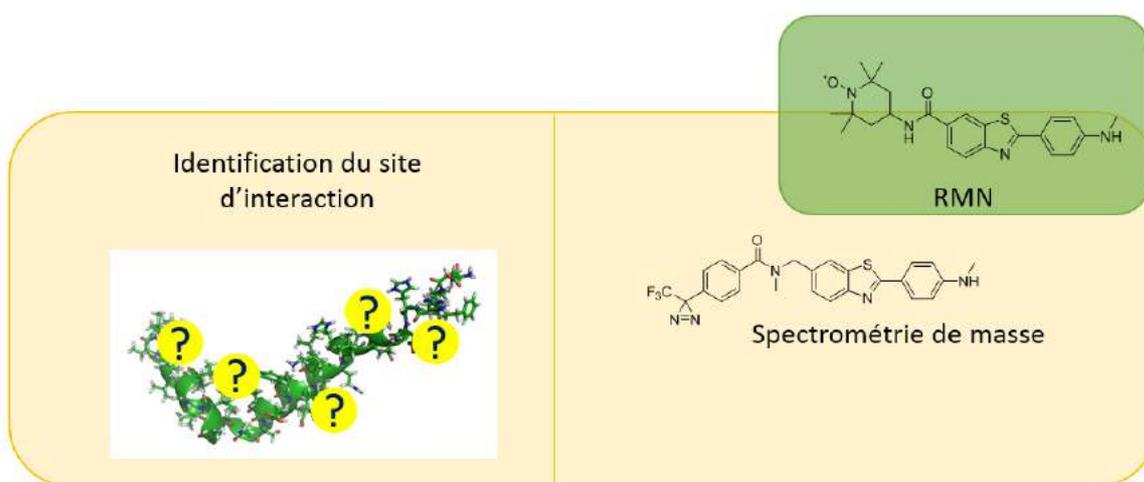


Figure 1. Sondes DA-BTA et TEMPO-BTA utilisées pour l'identification des sites d'interaction.

Ce chapitre comportera une courte partie bibliographique sur l'étude du site d'interaction ligand/protéine par cristallographie aux RX et criblage *in silico*, puis une partie sur l'étude par RMN et la présentation de résultats préliminaires avec l'utilisation du ligand TEMPO-BTA. Enfin une dernière partie comportera une partie bibliographique justifiant le choix du motif diazirine pour l'élaboration du DA-BTA puis les résultats préliminaires sur les expériences menées par spectrométrie de masse.

I. Investigation de l'interaction ligand/protéine par cristallographie aux RX et criblage *in silico*.

I.1. Cristallographie aux RX

La cristallographie aux RX est la technique permettant de caractériser finement, avec une résolution proche de l'ångström, la structure d'une molécule ($\sim 0,1$ Å) ou d'une protéine (~ 1 Å) agencée sous forme de cristal. L'échantillon, placé dans un faisceau de RX, promeut la diffraction de ces photons induits. Le motif de diffraction produit permet de retrouver la structure du cristal à l'origine. La structure cristallographique d'une protéine peut servir de point de départ à l'investigation d'un site d'affinité par technique *in silico* (cf. §I.2). Il arrive parfois que le ligand co-cristallise directement avec la protéine sur son site de plus haute affinité permettant l'élucidation immédiate du site d'interaction. Cependant, les cristallisations du peptide A β restent rares puisque les formes agrégées du peptide sont non mono-cristallines probablement en raison de la nature très hétérogène et polymorphes des agrégats d'A β . Pourtant quelques structures de dérivés d'A β ont pu être résolues : des cristaux d'oligomères co-cristallisés à l'aide d'un macrocycle peptidique,[3] de peptides tronqués A β_{1-7} co-cristallisés avec un anticorps,[4] des oligopeptides de structure proche des fibres amyloïdes,[5] et également des oligomères cycliques de peptides issus d'A β . [6]

I.2. Cryomicroscopie électronique (Cryo-ME)

La cryo-ME permet, tout comme la cristallographie par diffraction aux RX, de caractériser les positions dans l'espace des atomes avec une résolution proche de l'ångström pour des peptides ou protéine. Lors de cette technique, le peptide ou la protéine est déposé sur une grille et sera plongé très rapidement dans l'éthane liquide pour y être emprisonné dans de la glace amorphe. On peut ainsi observer l'échantillon par transmission où les électrons sont absorbés ou diffractés par la structure protéique. Différents angles de faisceau sont alors utilisés pour obtenir des images de la structure protéique sous différents angles et ainsi

reconstruire la structure tridimensionnelle de la protéine. Cette technique présente l'avantage de conserver l'échantillon dans des conditions proches du milieu tampon (ou physiologique) et donc d'avoir une structure proche des conditions « réelles ». Développée dans les années 80, cette technique connaît un essor très important dans la résolution de structure de biomolécules, puisqu'elle permet d'avoir des structures avec de très hautes résolutions comme la cristallographie aux RX sans nécessiter d'obtenir des cristaux ; elle permet dans certains cas de déterminer très précisément des sites d'interaction avec de petites molécules. C'est ce qui a valu, en 2017, la récompense du prix Nobel de Chimie à Jacques Dubochet, Joachim Frank, et Richard Henderson pour leur travaux sur le développement de la cryomicroscopie électronique pour la détermination de structure à haute résolution de biomolécules en solution.[7] Cette technique a permis de caractériser la structure de dimères d'A β 42,[8] et également très récemment de fibres d'A β 42.[9]

1.3. Criblage *in silico*

Le criblage *in silico* permet à partir d'un modèle structural de protéine, issue de données de cristallographie aux RX, RMN, ou cryoEM d'évaluer des scores d'affinités (donnés généralement en kcal/mol) au regard de certains ligands pour différents sites présents sur la structure protéique grâce à des calculs par mécanique moléculaire (MM). Il permet également des calculs de stabilité de complexe ligand-protéine au cours du temps (de 10^{-12} à 10^{-8} s). Deux techniques principales sont utilisées, l'amarrage moléculaire (docking en anglais) et la dynamique moléculaire (MD : molecular dynamic). Le docking permet d'évaluer un score d'affinité entre une molécule et la protéine.[10] L'énergie interne de chacun des deux partenaires est calculée puis une pose du ligand est effectuée sur la protéine, l'énergie du système ligand-protéine est alors calculée. La différence d'énergie interne entre le ligand et la protéine liés ou séparés est alors calculée. Si le score est négatif cela démontre alors une relative stabilité du complexe à partir duquel on prédit une affinité probable du ligand. L'ordinateur effectuera alors une pose sur un autre site de la protéine puis comparera le score obtenu par rapport au site précédent afin de vérifier s'il est de meilleure affinité ou non et ainsi de suite. On pourra alors distinguer un site préférentiel d'affinité très probable entre une molécule et la protéine. Ces complexes ligand-protéine peuvent être ensuite évalués par dynamique moléculaire afin d'estimer la stabilité dans le temps de cette interaction pour discriminer les meilleurs ligands.[11, 12] Le criblage *in silico* est une méthode relativement rapide, cependant elle ne peut pas évaluer une véritable constante d'affinité et échoue si jamais le site d'affinité est induit par la présence du ligand comme cela peut être le cas des sites dits allostériques. Ceci peut être compensé par des études dynamiques mais les temps de calculs augmentent alors exponentiellement avec la durée de l'expérience de dynamique moléculaire. La MD permet cependant d'avoir une idée probable du lieu d'interaction entre un ligand et une protéine. Ces

expériences ont été utilisées pour vérifier des affinités pour des molécules à visée d'études d'A β ,[13, 14] mais aussi des molécules à visée thérapeutique dans le but d'inhiber l'agrégation d'A β . [15-17]

II. Investigation de l'interaction TEMPO-BTA et du peptide A β par RMN.

II.1. Utilisation de la RMN pour détecter les sites d'intérêts

La RMN est bien connue pour révéler l'influence d'un environnement sur la résonance d'un spin (cf. Chapitre I §IV.2.c.). Son utilisation pour élucider le site d'interaction entre le ligand et sa cible apparaît dès lors naturelle et diverses techniques permettent d'accéder à des informations fines sur cette interaction.

L'interaction peut être vérifiée en regardant si la présence du ligand induit un changement de déplacement chimique des protons de certains résidus d'acides aminés de la cible biologique témoignant d'un changement d'environnement chimique par la présence du ligand.

La technique principale de la caractérisation de la liaison entre un ligand et sa cible biologique est la spectroscopie par STD.[18] Cette technique repose sur l'effet Overhauser où les signaux de protons de la protéine sont saturés, cette saturation se propage par diffusion de spin sur les autres protons de la structure jusqu'à atteindre les protons du ligand lié ce qui induit une diminution de son signal RMN. Il est possible de quantifier la perte de signal par différence d'intensité entre les spectres avec et sans la saturation sélective (**Fig. 2**). Elle permet de déterminer de manière qualitative la façon dont le ligand interagit avec la cible,[19-21] de vérifier les parties du ligand qui interagissent avec la cible [22, 23] et aussi d'évaluer la constante de dissociation K_d entre le ligand et sa cible pour peu que celle-ci soit comprise entre 10^{-3} et 10^{-8} M. En effet, une affinité trop forte se traduit par un signal du ligand absent lors de la saturation ce qui empêcherait de déterminer précisément le K_d . On retrouve alors le spectre du ligand avant la saturation après avoir fait la différence des 2 spectres. Des études d'affinités ont été effectuées par STD avec le peptide A β pour diverses sortes de ligands comme des peptides,[24] ou bien encore des polyphénols.[25, 26]

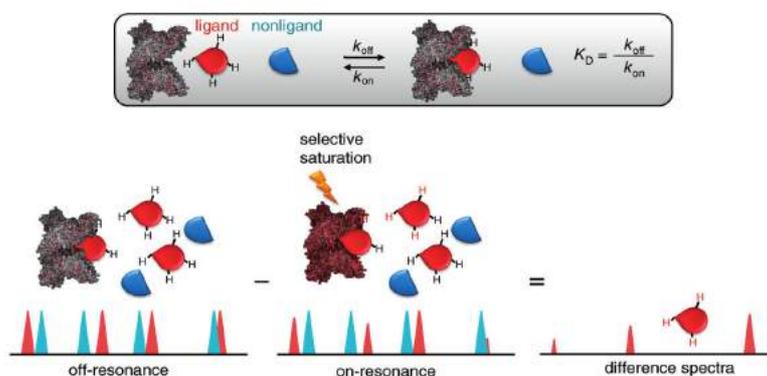


Figure 2. Schémas explicatifs de la STD-RMN. En haut l'évaluation du K_D , en bas le schéma explicatif de l'obtention du spectre par différence entre le spectre en absence (off) et en présence (on) de la résonance de saturation.[18]

Toutefois l'un des défauts de la RMN est le manque de sensibilité qui oblige à travailler à des concentrations comprises entre 100-1000 μM . Or, dans le cas de l'A β 40, celui-ci peut commencer à s'agréger à pH neutre dès 20 μM et donc devenir insoluble, ce qui rend les expériences en RMN liquide plus difficile à faire. Par ailleurs l'étude de l'interaction avec les fibres d'A β ne peut se faire qu'en RMN du solide.

Dans le cas de nos travaux, avant de pouvoir étudier l'interaction entre la sonde et les fibres d'A β par RMN du solide, nous souhaitons utiliser la sonde radicalaire TEMPO-BTA pour évaluer les résidus participant à l'interaction avec le peptide A β 28 sous forme monomérique à pH physiologique par RMN liquide. Dans ces conditions, le peptide devrait rester soluble même à haute concentration ($\sim 200 \mu\text{M}$) durant les quelques heures nécessaire aux acquisitions. Lors de l'expérience, l'intensité des signaux RMN ^1H de certains résidus du peptide doivent s'élargir avec l'ajout du ligand. L'effet paramagnétique du radical influe sur les signaux RMN des protons se trouvant à proximité de celui-ci, si la sonde TEMPO-BTA interagit spécifiquement avec certaines zones du peptide avec le peptide, les acides aminés se trouvant dans l'environnement proche de radical verront leur signal s'élargir davantage que ceux qui en sont plus éloignés (**Fig. 3**).

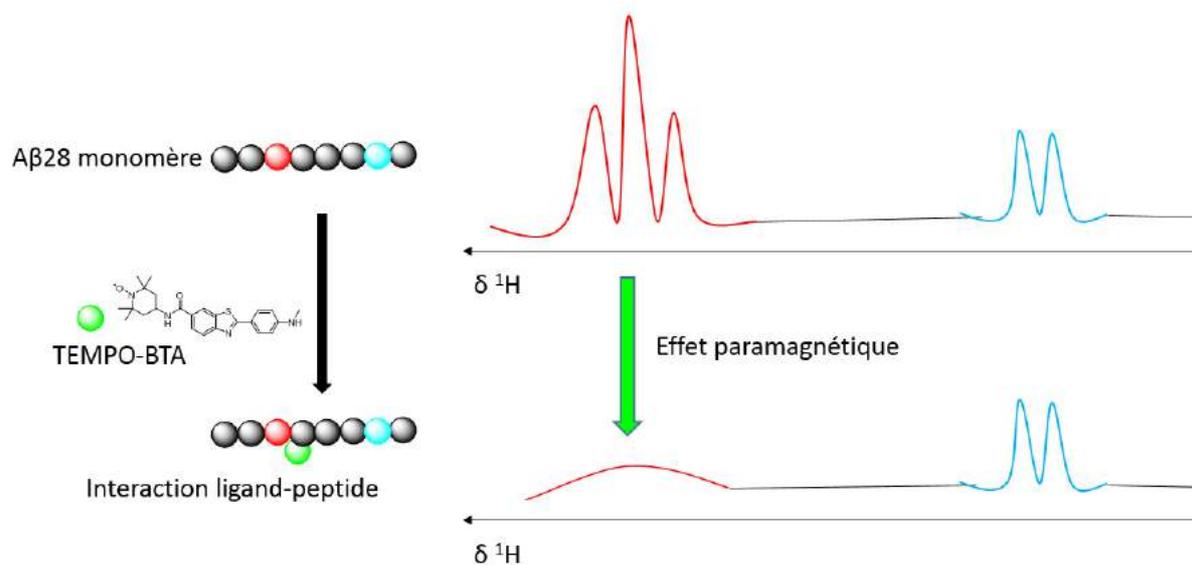


Figure 3. Schéma de l'effet de l'interaction entre le peptide A β 28 et la sonde TEMPO-BTA avec les effets sur les signaux RMN des acides aminés.

II.2. Expériences et résultats.

Dans cette expérience nous avons fait une première acquisition du spectre ^1H du peptide [A β 28] = 200 μM dans le D_2O tamponné [Phosphate] = 100 mM à pD 7,3. On ajoute ensuite 0,5 ; 1 et 2 équivalents de TEMPO-BTA (solution stock = 10 mM dans DMSO-d_6), chaque spectre ^1H ayant été enregistré entre chaque ajout de ligand. On obtient les spectres suivants, pour lesquels ne sont représentés ici que les signaux compris dans la zone 0,30-2,40 ppm et 6,60-8,20 ppm du spectre (**Fig. 4**) :

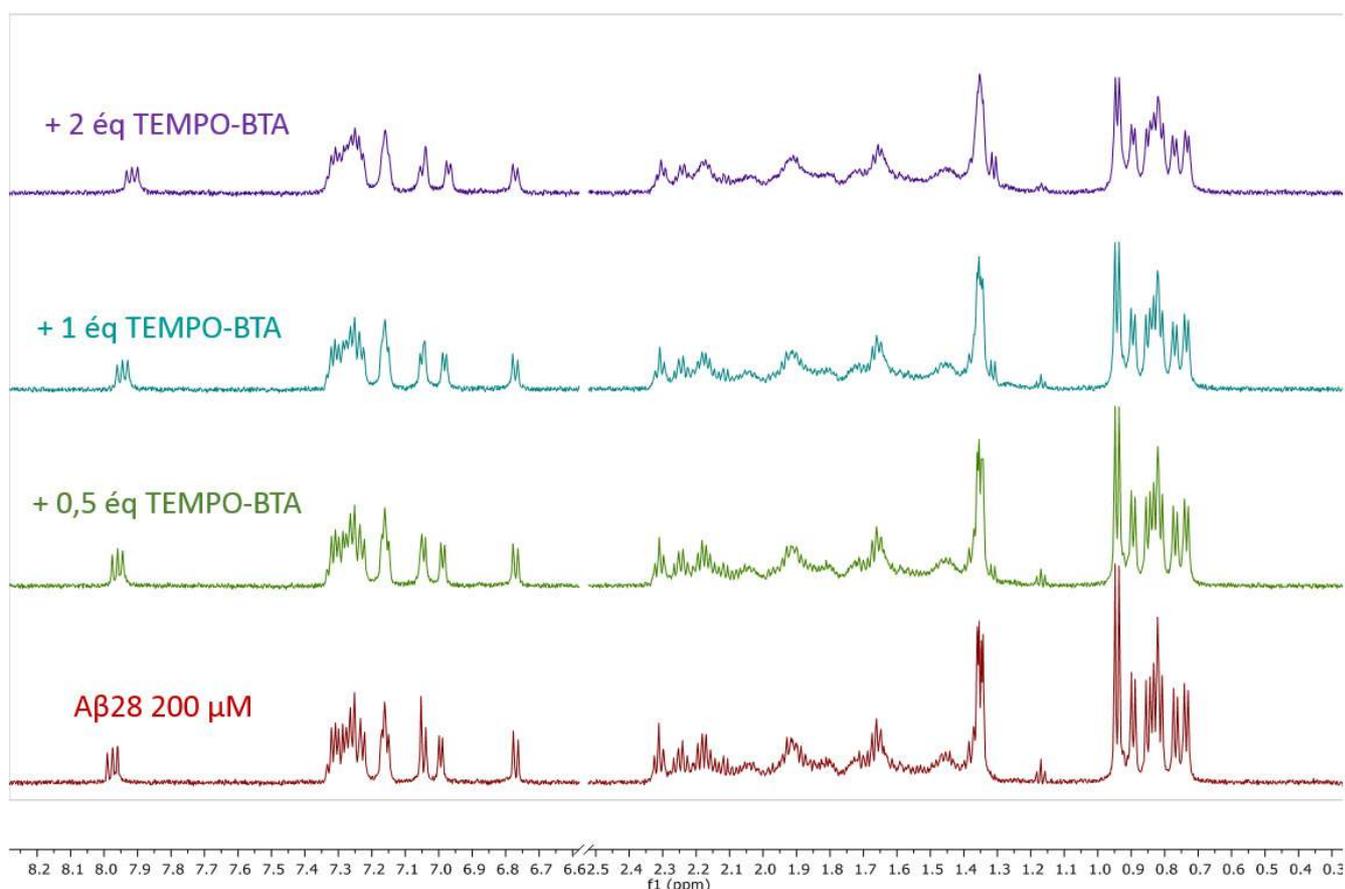
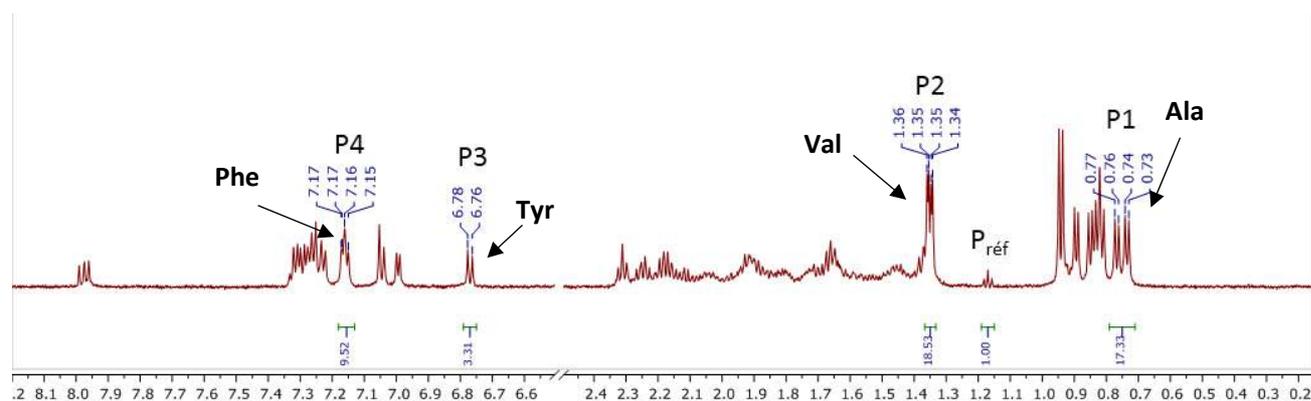


Figure 4. Spectres RMN ^1H du peptide A β 28 avec 0 ; 0,5 ; 1 et 2 équivalents en TEMPO-BTA (10 mM in DMSO- d_6). [A β 28] = 200 μM ; [Phosphate] = 100 mM ; pD = 7,3. La partie de 2,5 ppm à 6,6 ppm a été volontairement tronquée pour une meilleure visibilité des zones d'intérêts.

On constate que les signaux RMN ^1H de manière globale deviennent de moins en moins résolus lorsque l'on augmente la quantité de TEMPO-BTA à cause de son effet paramagnétique. En fait on cherche si certains signaux se retrouvent plus affectés que d'autres par l'effet paramagnétique du TEMPO-BTA. Pour ce faire nous avons choisi pour référence l'intégrale du pic d'éthanol entre 1,15-1,19 (P_{ref}) fixée à une valeur de 1. Cela permet de comparer entre elles les valeurs d'intégrale des pics suivants : 0,71-0,80 (P1) ; 1,33-1,366 (P2) ; 6,755-7,75 (P3) et 7,13-7,19 ppm (P4) au fur et à mesure que l'on ajoute du TEMPO-BTA dans le milieu (**Fig. 5**). D'après les travaux de thèse d'Hélène Eury,[27] (Annexe III et IV) les pics P1 et P2 peuvent être attribués respectivement aux Ala2/21 et aux Val12/17. P3 serait attribué à la Tyr10 et P4 aux résidus Phe4/19/20. On fait l'hypothèse que si le résidu d'acide aminé est proche du radical, sa valeur d'intégrale devrait s'en retrouver plus affectée et donc diminuer plus rapidement par rapport à d'autres résidus qui seraient plus éloignées de celui-ci quand la quantité de TEMPO-BTA augmente.


 Figure 5. Spectre ^1H d'A β 28 avec les zones d'intégrations représentées à 0 équivalent.

Les valeurs sont reportées dans le tableau suivant (**Tableau 1**) :

 Tableau 1. Variation des intégrales P1, P2, P3 et P4 en fonction de l'intégrale du pic éthanol ($P_{\text{réf}}$).

Nombre d'équivalent / résidus des zones intégrées	Zones d'intégration				
	1,15-1,19 ($P_{\text{réf}}$)	0,71-0,80 (P1) Ala	1,33-1,366 (P2) Val	6,755-7,75 (P3) Tyr	7,13-7,19 (P4) Phe
0	1	17,33	18,53	3,31	9,52
0,5	1	16,47	17,24	3,28	9,43
1	1	14,63	14,92	2,88	8,28
2	1	15,60	15,58	3,18	9,10
% variation de l'intégrale de 0 à 2 éq	X	-10 %	-16 %	-4 %	-4,4 %

On constate donc d'après le tableau que les valeurs d'intégrales de P1 et P2 semblent diminuer plus rapidement que les intégrations de P3 et P4 (avec des diminutions >10 % pour P1 et P2 contre des diminutions <5 % pour P3 et P4) entre 0 et 2 équivalents. On notera que les valeurs d'intégrales pour l'ensemble des pics diminuent de 0 à 1 équivalent mais augmentent à 2 équivalents, ceci est dû au signal de l'éthanol qui diminue à 2 équivalents de TEMPO-BTA où cette dernière présente en plus grande quantité

en solution impacte sur la valeur d'intégrale de l'éthanol. On pourrait donc supposer que les résidus Val et Ala seraient à proximité du radical par rapport aux noyaux aromatiques. Pour expliquer ce phénomène, on suggérerait une interaction du motif 2-aryl-BzT avec les résidus aromatiques, ce qui placerait possiblement le motif TEMPO à proximité des résidus des acides aminés voisins. Dans le cas présent, on supposerait une interaction avec les résidus Phe4, Tyr 10, Phe19/20 plaçant ainsi le résidu TEMPO près des résidus Ala2-21 et Val12/18 (**Fig. 6**).

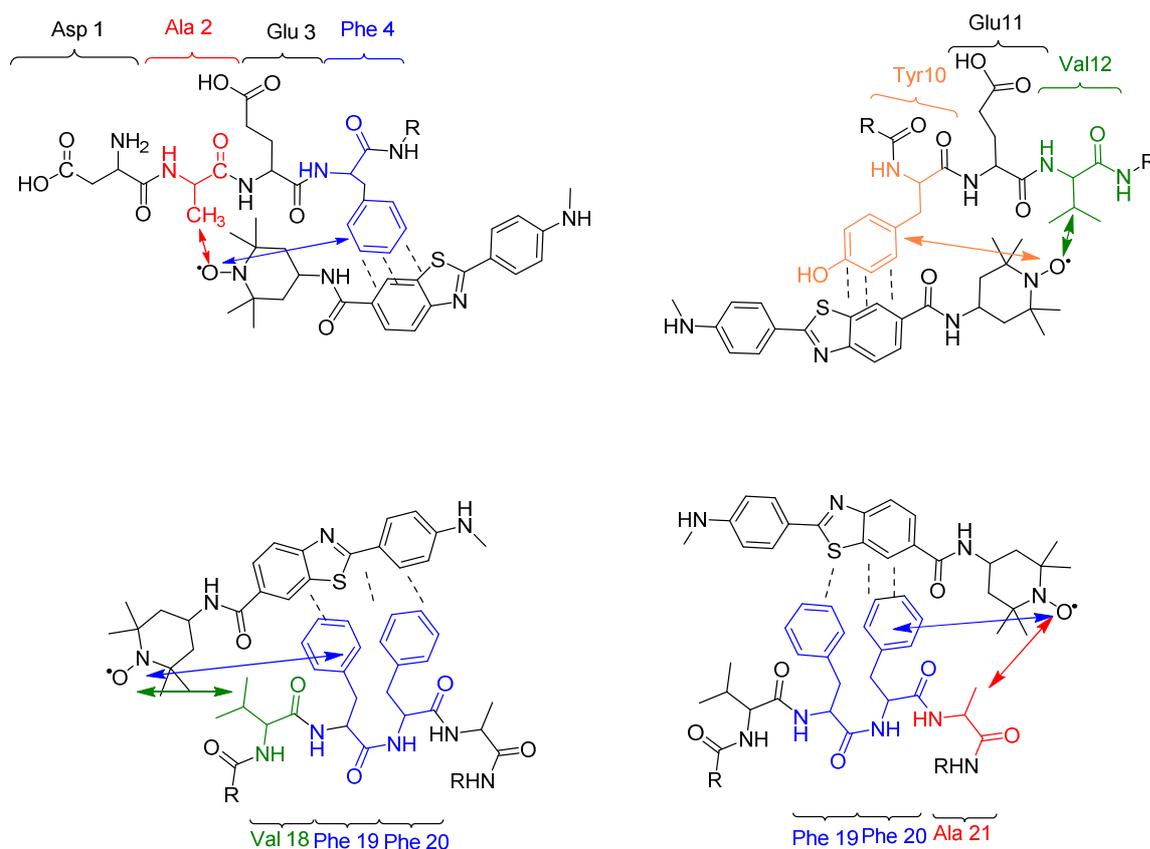


Figure 6. Les différents modes d'interactions du TEMPO-BTA avec les résidus de A β 28. Les doubles flèches indiquent les distances entre le radical et les résidus des chaînes latérales.

II.3. Conclusion et perspectives

Cette expérience par RMN semble indiquer qu'il est possible de localiser certains lieux d'interactions entre le TEMPO-BTA et le peptide A β 28 monomérique. On suppose une interaction avec les résidus aromatiques Phe et Tyr du peptide plaçant le radical TEMPO à proximité des résidus voisins. Ces expériences devront être effectuées sur le peptide A β 40 également sous forme de fibres par RMN du solide.

On pourrait également utiliser la TEMPO-BTA en RPE impulsionnelle (DEER ou PELDOR) afin d'évaluer des distances interspin.[28] On pourrait accéder, par des expériences pulsées aux distances, entre 2 sites d'interactions entre 2 sondes TEMPO-BTA au sein des agrégats d'A β à la condition que ceux-ci ne soient pas trop éloignés (jusqu'à 8 nm). Le peptide A β ayant également des capacités à capturer le Cu(II), il est envisageable d'évaluer la position du site d'interaction de la NMA avec le Cu(II) paramagnétique par exemple dont on connaît le site de chélation au sein du peptide (**Fig. 7**) ; à l'instar des travaux de l'équipe de Smith qui ont pu déterminer les distances entre les radicaux nitroxyles et le Fer(III) au sein de l'hème.[29]

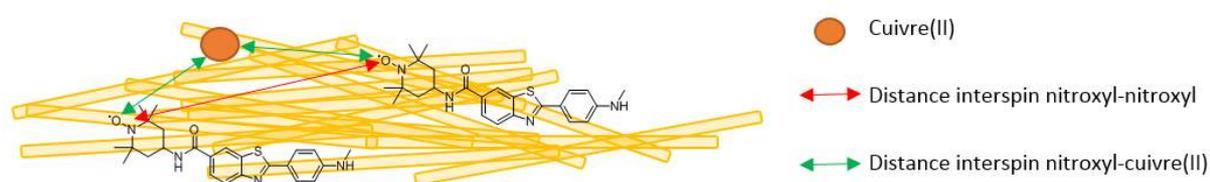


Figure 7. Schéma représentatif des distances interspins au sein des fibres d'A β .

III. Investigation de l'interaction DA-BTA et le peptide A β par SM.

III.1. Principe et choix de la fonction de photomarquage.

Le marquage de photoaffinité est une technique de marquage qui permet de créer une liaison covalente entre un ligand et une cible, lorsque ceux-ci sont normalement en échange dynamique. Cette liaison se fait par la production d'une espèce hautement réactive, grâce à une irradiation UV.

L'identification du site d'interaction ligand-cible repose sur le principe suivant : un ligand possédant une fonction chimique permettant le photomarquage et sa cible biologique (protéine, peptide, récepteur, enzyme, etc.) sont mises en solution. a) Le ligand rejoint alors son site d'affinité, une irradiation en UV est dès lors effectuée pour photomarquer la cible selon des mécanismes détaillés dans les sous-chapitres suivants. b) Une première séparation et caractérisation est alors faite pour discriminer les cibles photomarkées des autres par HPLC et SM. c) Une fois l'adduit ligand-cible sélectionné, il subit une digestion par la trypsine, une enzyme clivant les protéines ou peptides après les lysines ou arginines. Ceci permet de découper la cible en petits fragments peptidiques. Chacun de ces fragments est identifié par technique de SM, permettant de localiser précisément le site d'affinité au sein de la séquence peptidique (**Fig. 8**).[30]

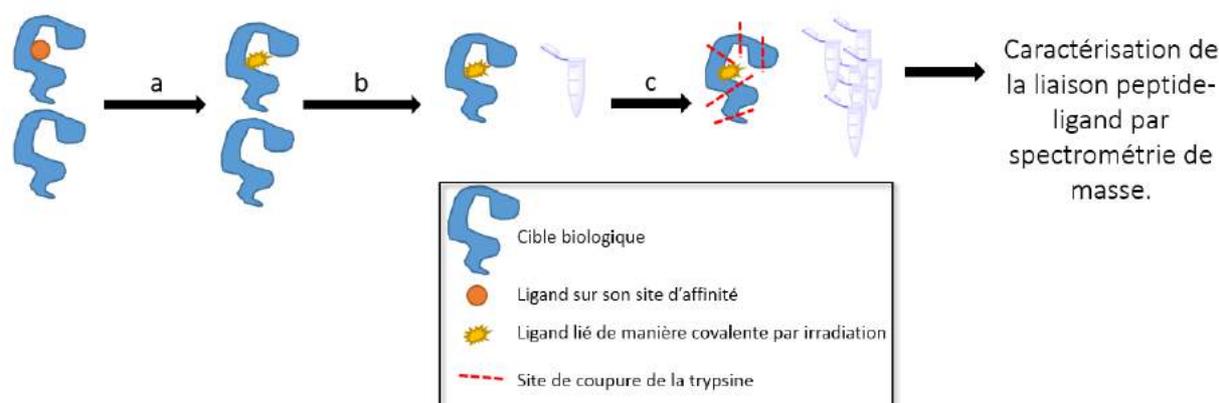


Figure 8. Schéma des étapes des études par photoaffinité. a) Photomarquage du ligand sur la cible biologique. b) Séparations entre les cibles marquées et non marquées. c) Digestion de l'adduit par la trypsine.

Différentes fonctions chimiques sont utilisées pour effectuer le photomarquage. Elles doivent cependant avoir plusieurs qualités [31-34] : i) La fonction photoréactive doit être stable dans de nombreuses conditions biologique. Seule l'irradiation doit produire l'espèce réactive pour former l'adduit. ii) L'énergie d'irradiation utilisée pour produire l'espèce réactive ne doit pas dégrader la cible biologique ; c'est-à-dire que la longueur d'onde d'irradiation dépasse les 300 nm. iii) L'espèce réactive doit avoir un temps de vie plus court que la cinétique de dissociation entre le ligand et la cible biologique de manière à limiter le marquage non spécifique. iv) La réaction de photomarquage doit se faire avec n'importe quelle fonction chimique à proximité immédiate, indépendamment de la nature de celle-ci, y compris les liaisons C-H non réactives. v) L'adduit formé à l'issue de la réaction doit être stable. vi) Le motif portant la fonction réactive se doit d'être suffisamment petit par rapport au ligand pour limiter toute gêne d'interaction avec sa cible.

L'utilisation des agents de photomarquage a été décrite pour la première fois par l'équipe de Westheimer en 1962, par l'utilisation de fonction diazoacétyl (**Fig. 9**) ; conduisant à la désactivation des propriétés enzymatiques de la chymotrypsine.[35]

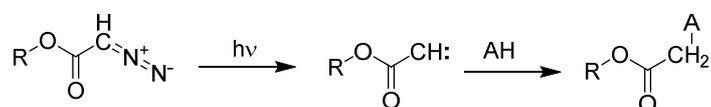


Figure 9. Enchaînement réactionnel de la diazoacétyl sous l'effet de la lumière.

Dès lors un grand nombre de travaux ont été effectués autour du développement d'agent de photomarquage. Cependant 3 fonctions chimiques sont exploitées de manière assez récurrente afin de produire des espèces photoréactives. Ce sont les fonctions azoture d'aryle, benzophénone et diazirine dont les espèces réactives produites sont respectivement un nitrene, un radical carboné et un carbène.[36]

III.1.a. Nitrène via le motif azoture de phényle

L'azoture de phényle sous irradiation UV ($\lambda \leq 300$ nm) produit un nitrène singulet avec un dégagement de diazote. Le nitrène singulet possède une durée de vie inférieure à la milliseconde. Il est converti en nitrène triplet, intermédiaire moins énergétique, par conversion intersystème (CIS).

Les deux états quantiques du nitrène ont des propriétés différentes.[37] Le nitrène singulet peut effectuer l'insertion directe de la liaison C-H pour former l'adduit désiré. Il est aussi capable de produire une cyclisation intramoléculaire donnant un dérivé benzazirine pouvant subir l'attaque d'un nucléophile pour former un adduit. Le benzazirine peut se réarranger également en déhydroazépine qui a son tour peut subir également une attaque nucléophile.

Le nitrène triplet réagit avec la liaison C-H pour former un adduit covalent. Il est aussi capable de réagir avec l'oxygène pour former un groupement nitro [38] annihilant ses capacités de photomarquage (**Fig. 10**).

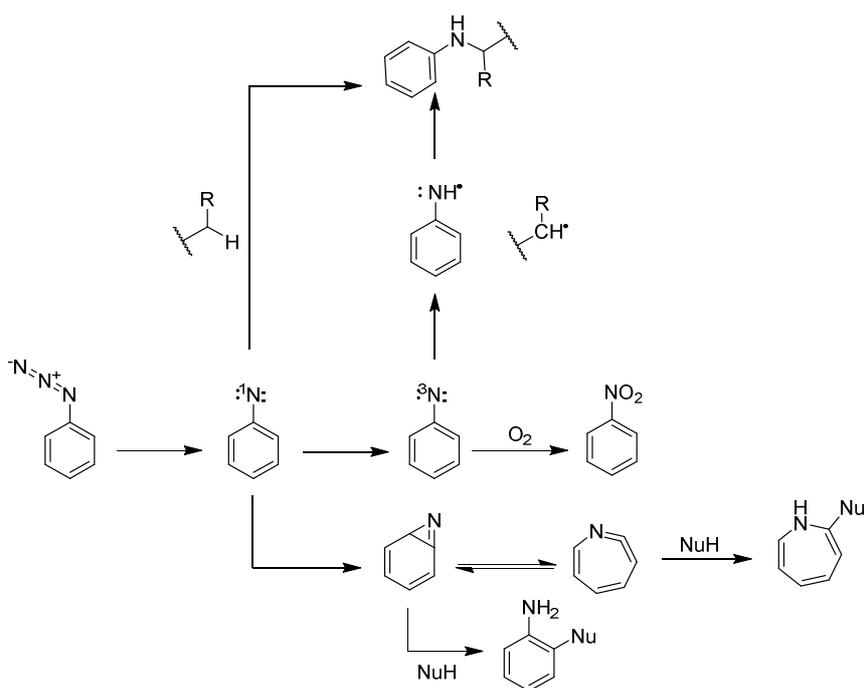


Figure 10. Cascade de réactions des composés nitrènes.

L'ajout d'une fonction azoture sur un phényle de manière générale se fait par une réaction de type Sandmeyer où l'on ajoute de l'azoture de sodium (NaN_3) sur le diazonium formé pour produire l'azoture de phényle (**Fig. 11**).[39, 40]

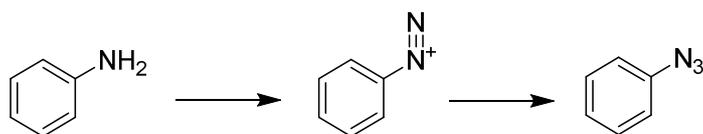


Figure 11. Synthèse du dérivé azoture depuis l'amine par le passage du dizonium intermédiaire.

L'avantage de l'utilisation des dérivés d'azoture de phényle est la relative facilité d'accès et le faible encombrement de la fonction azoture. En revanche, ses longueurs d'onde d'irradiation sont inférieures à 300 nm ce qui peut dégrader l'échantillon biologique, de plus sa réactivité multiple décroît le rendement de la réaction de photomarquage (< 30%).

III.1.b.Radical carbocentré via le motif benzophénone

La benzophénone est excitée à 350-360 nm pour produire une espèce diradicalaire dont la durée de vie est d'environ 2 μ s dans l'eau.[41] Le diradical réagit avec le résidu d'acide aminé le plus proche par transfert d'atome d'hydrogène pour donner 2 espèces radicalaires qui rapidement se recombinent pour former l'adduit désiré. Il est à noter que le diradical peut réagir avec de l'eau pour former le diol géminale correspondant qui rapidement se déshydrate pour recycler à nouveau la benzophénone initiale qui peut de nouveau être irradiée pour former le diradical (**Fig. 12**). L'espèce diradicalaire est plus réactive envers les liaisons C-H qu'envers les liaisons O-H, avec une préférence pour les groupements méthionines au sein de protéines.[42, 43] Cela signifie que si le temps d'irradiation est suffisamment long et que le ligand est peu affiné pour son site d'interaction, la benzophénone pourra alors réagir ailleurs multipliant les risques de marquage non spécifiques du site actif.

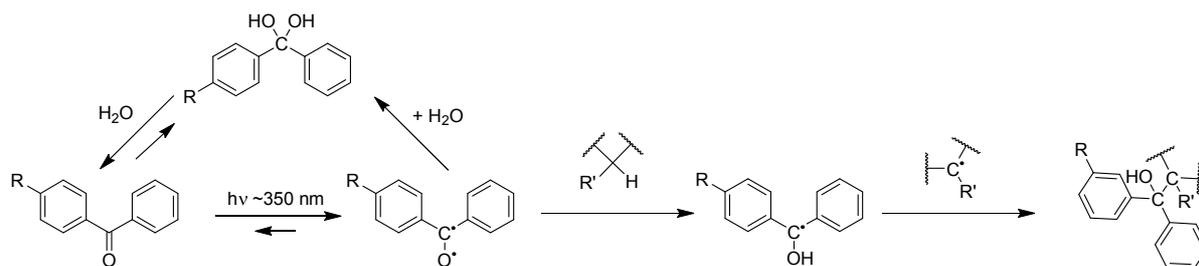


Figure 12. Réactivité de la benzophénone après irradiation.

Si le ligand possède une affinité très forte pour son site actif et que celui-ci est facilement accessible alors la benzophénone est un motif de choix pour le photomarquage. Son principal défaut est l'encombrement stérique généré pouvant influencer sur les affinités pour les sites peu accessibles. Cet encombrement peut néanmoins être réduit si la benzophénone est intégrée dans la structure du ligand au lieu d'être ajoutée à côté

de celui-ci. Par ailleurs la faible durée de vie de l'espèce diradicalaire formée oblige à l'irradiation de longue durée (>30 min) pour avoir un bon rendement de photomarquage.

III.1.c. Carbène via le motif diazirine

Le motif diazirine sous irradiation UV à 350 nm peut donner 2 espèces : i) un carbène singulet par élimination d'une molécule de diazote mais également ii) une espèce diazo plutôt stable dans le temps mais qui a le défaut de réagir avec d'autres espèces dans le milieu au lieu d'être converti en carbène. C'est pour cette raison que les espèces 3-aryl-3-H-diazirine ont été supplanté par les espèces 3-aryl-3-trifluorométhyl-diazirine découvertes par l'équipe de Brunner.[44] Grâce à l'effet inductif électro-attracteur puissant du groupement trifluorométhyle, l'espèce diazo réagit moins bien, laissant le temps à la conversion en carbène de se produire. Ils peuvent également subir une CIS pour former des carbènes triplets. Cependant, cette conversion est défavorable dans le cas du substituant trifluorométhyle, celui abaissant l'énergie de l'état singulet du carbène (**Fig. 13**).[45, 46]

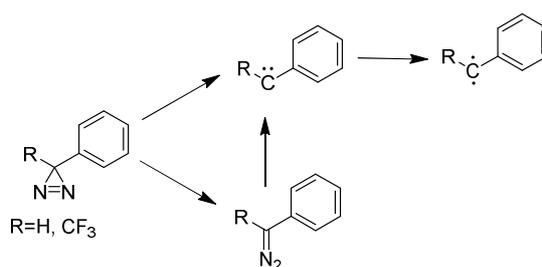


Figure 13. Formation des carbènes singulet et triplet à partir de la diazirine sous UV.

Le carbène singulet possède une large réactivité envers les liaisons R₂N-H ; RO-H ; R₃C-H par insertion directe du fait de sa nature ambiphile (à la fois électrophile et nucléophile). L'insertion directe d'une fonction amine peut mener à un échec du photomarquage. En effet l'adduit avec l'amine se réarrange pour former une espèce énamine/imine pouvant s'hydrolyser pour donner l'espèce difluoroacétylène correspondante (**Fig. 14**).

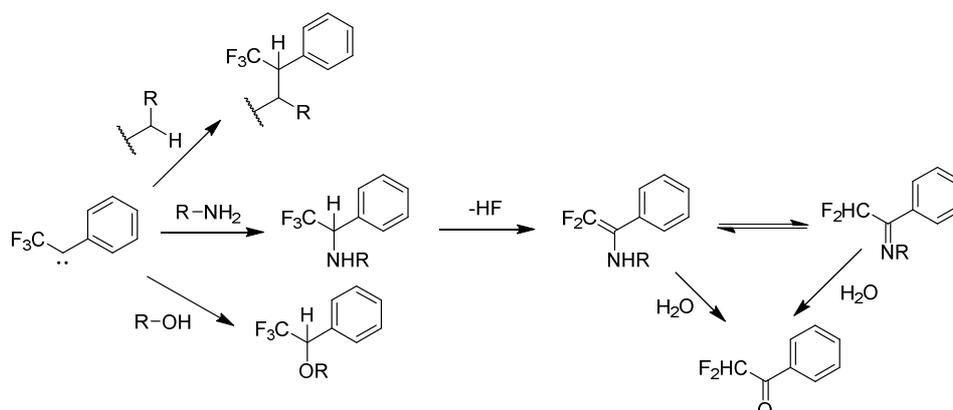


Figure 14. Réactivité du carbène singulet pour les groupements amines, alcool et alcanes.

Le carbène triplet quant à lui peut réagir de 2 manières : soit par transfert d'hydrogène à l'instar du nitrène, soit avec l'oxygène pour former la cétone correspondante (**Fig. 15**).

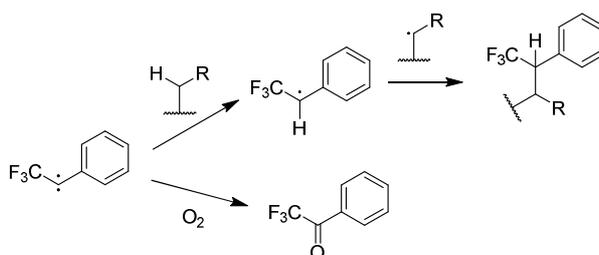


Figure 15. Réactivité du carbène triplet pour l'oxygène et la liaison C-H.

La fonction 3-aryl-3-trifluorométhyl-diazirine possède en résumé des caractéristiques à la frontière entre la benzophénone et les azotures de phényles. Sa longueur d'onde d'irradiation comprise entre 350 et 360 nm permet le photomarquage de cibles protéiques sans dégradation. De plus la rapidité de la réaction du carbène singulet limite les adduits issus d'une affinité non spécifique, en revanche le fait qu'il puisse interagir rapidement avec les liaisons O-H conduit à la neutralisation du composé par l'eau. Par contre, la fonction diazirine est stable dans des conditions acide, basique, oxydante et réductrice contrairement aux azotures de phényles.

III.1.d. Résumés des caractéristiques des fonctions chimiques de photomarquage.

Les différentes caractéristiques des 3 motifs de radiomarquage sont résumées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 2**).

Tableau 2. Résumé des principales caractéristiques des groupements pour le photomarquage.

Motif	Azoture de phényle	Benzophénone	3-aryl-3-trifluorométhyl-diazirine
λ exc	< 300 nm	350-360 nm	350-360 nm
Durée d'irradiation	Courte	Longue	Courte-Moyenne
Rendement de photomarquage	Faible	Bon à très bon (mais non spécifique)	Faible-Bon
Réactivité/sélectivité	RH + Nucléophiles	R-H des méthionines préférentiellement	ROH, RNH ₂ , RH
Encombrement	Faible à moyen	Fort	Moyen-Fort
Espèces réagissant sur les radicaux	H ₂ O, O ₂	Aucun	H ₂ O, O ₂
Stabilité chimique	Instable en condition acide, basique, oxydante et réductrice.	Instable sous condition oxydante forte.	Stable sous condition acide, basique, oxydante et réductrice.

Voilà pourquoi, dans le cadre de ces travaux nous avons choisi de travailler avec un motif de radiomarquage qui puisse être ajouté à la structure de la NMA. Nous avons donc choisi de travailler le motif diazirine qui possède le meilleur compromis par rapport aux critères du tableau ci-dessus pour donner le composé DA-BTA (Fig. 16).

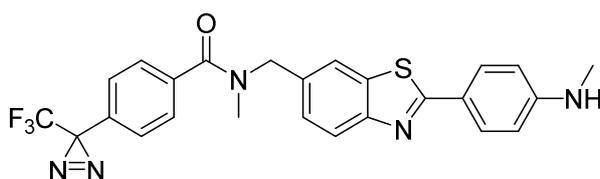


Figure 16. Structure du ligand DA-BTA.

III.2. Expériences et résultats.

III.2.a. Protocole

Le DA-BTA 20 μ M a été incubé pendant 3 jours avec A β 28 à 500 μ M dans HCO₃NH₄ à 100 mM, pH 8 et du Zn à 250 μ M et 5 % DMSO. Au bout de 3 jours, lorsque le DA-BTA a été incorporé dans les fibres, les échantillons sont récupérés dans un eppendorf pour y être irradié à 360 nm pendant 40 minutes avec 4 ampoules de 9 W dans un bain de glace sous agitation à 100 tours/min. Les échantillons (composé d'A β 28 sous forme de fibres) sont ensuite rincés 2 fois avec 200 μ L d'eau milliQ puis directement injectés par infusion dans le spectromètre de masse. Le modèle de l'appareil utilisé pour faire l'acquisition de ces spectres est LCQFleet à trappe ionique et source d'ionisation par électronébulisation (ESI) de chez ThermoScientific. Après dilution dans un mélange ACN/H₂O 0,1% HCOOH, l'échantillon a été diffusé avec un débit de 10 μ L/min. Le spectre est acquis entre 150-2000 m/z en mode positif « Full Scan ».

III.2.b. Résultats préliminaires et interprétations

On obtient le spectre total suivant (**Fig. 17**) :

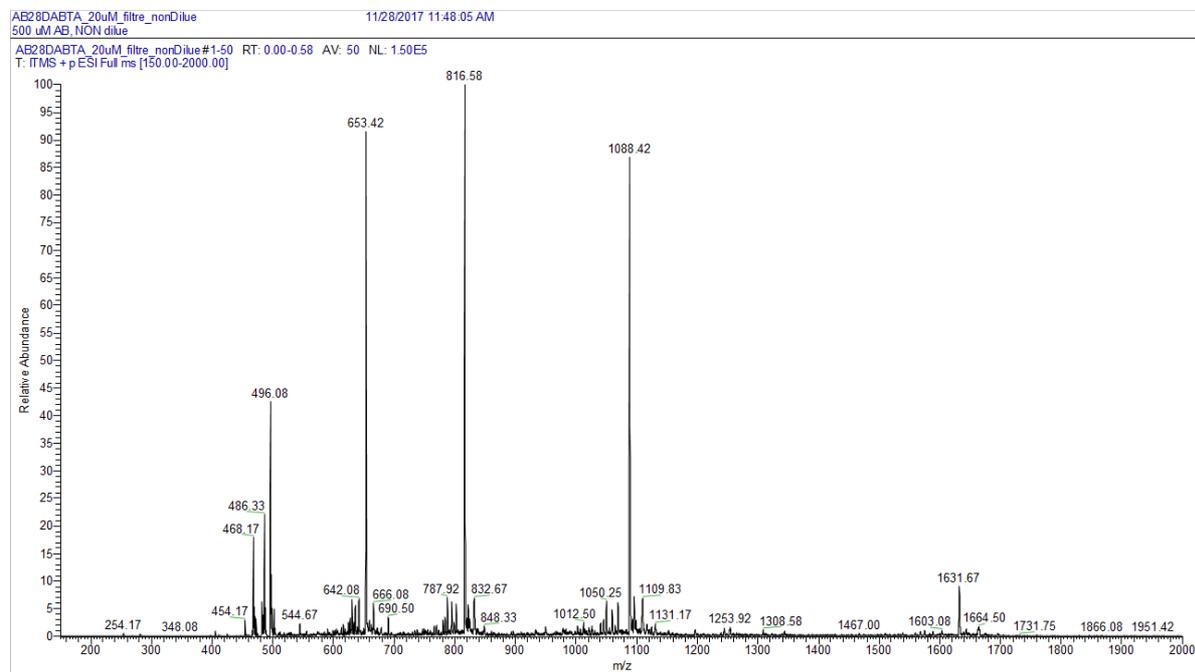
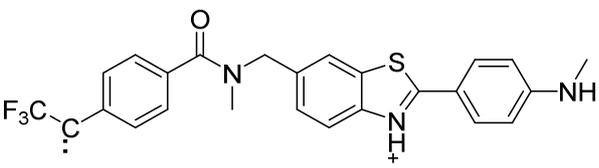
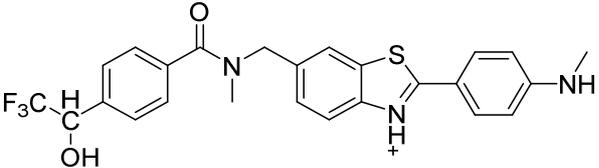
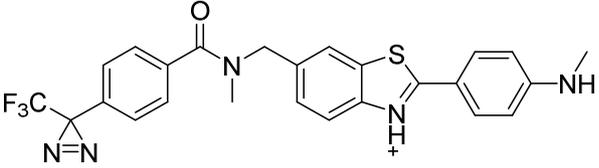


Figure 17. Spectre de masse full scan du mélange A β 28 fibres 500 μ M, Zn 250 μ M et DA-BTA 20 μ M irradié à 360 nm pendant 40 min.

Les pics m/z d'intensité >10 % sont attribués aux espèces suivantes (**Tableau 3**) :

Tableau 3. Liste des pics d'intensité supérieure à 10 % et les espèces attribuées.

Pic m/z	Espèces observées	Remarques
468,17		Cb-BTA : Forme carbène du DA-BTA. Probablement formé dans le spectromètre de masse.
486,33		DA-BTA ayant réagi avec H ₂ O
496,08		DA-BTA
653,42	A β 28 [M+5H] ⁵⁺	X
816,58	A β 28 [M+4H] ⁴⁺	X
1088,42	A β 28 [M+3H] ³⁺	X
1631,67	A β 28 [M+2H] ²⁺	X

On observe ici que le DA-BTA, en dépit d'un temps d'irradiation long de 40 min, n'a pas entièrement été converti en carbène pour réagir avec le peptide ou avec l'eau.

Les produits issus du photomarquage peuvent être observés mais à des intensités extrêmement faibles (<10 %) (**Fig. 18 et 19**). Les pics d'intérêts sont reportés sur le tableau suivant (**Tableau 4**) :

Tableau 4. Liste des pics correspondant aux adduits DA-BTA-A β 28.

Pic m/z	Espèces observées
933,05	[A β 28+2.Cb-BTA+4H] ⁴⁺
1050,25	[A β 28+2.Cb-BTA+4H] ⁴⁺
1244,08	[A β 28+Cb-BTA+3H] ³⁺

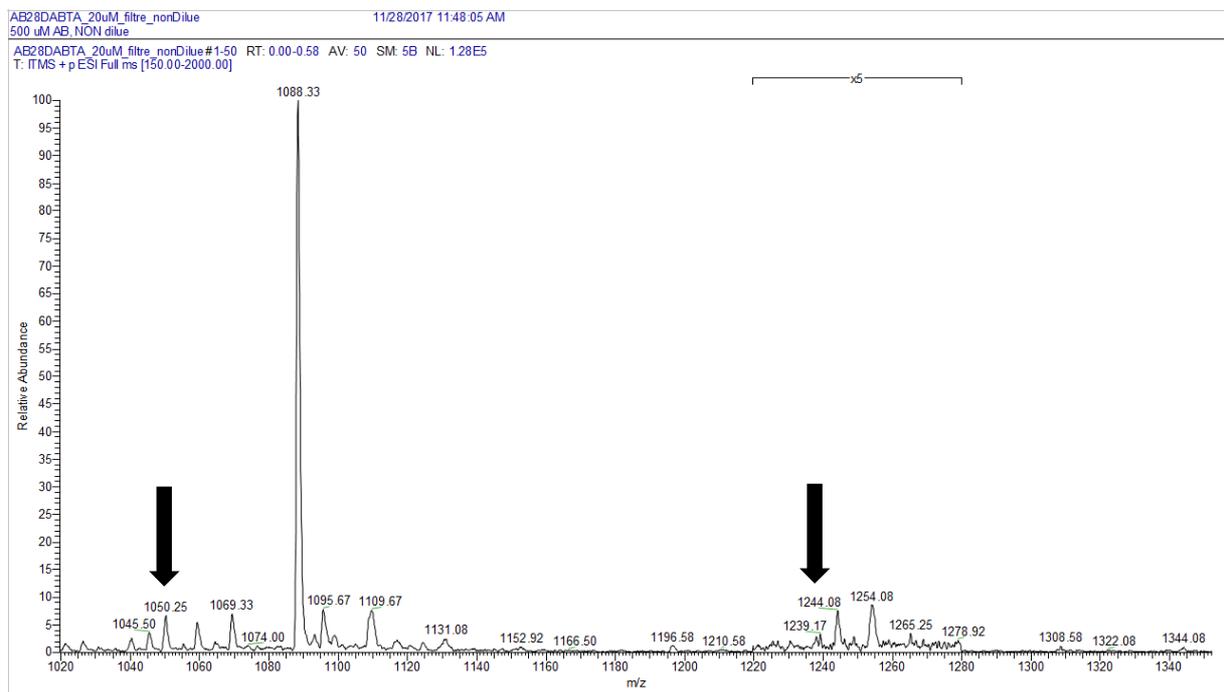


Figure 18. Spectre de masse full scan du mélange A β 28 fibres 500 μ M, Zn 250 μ M, DA-BTA 20 μ M irradié à 360 nm pendant 40 min ; zoom de la figure 17 entre m/z 1020 et m/z 1340.

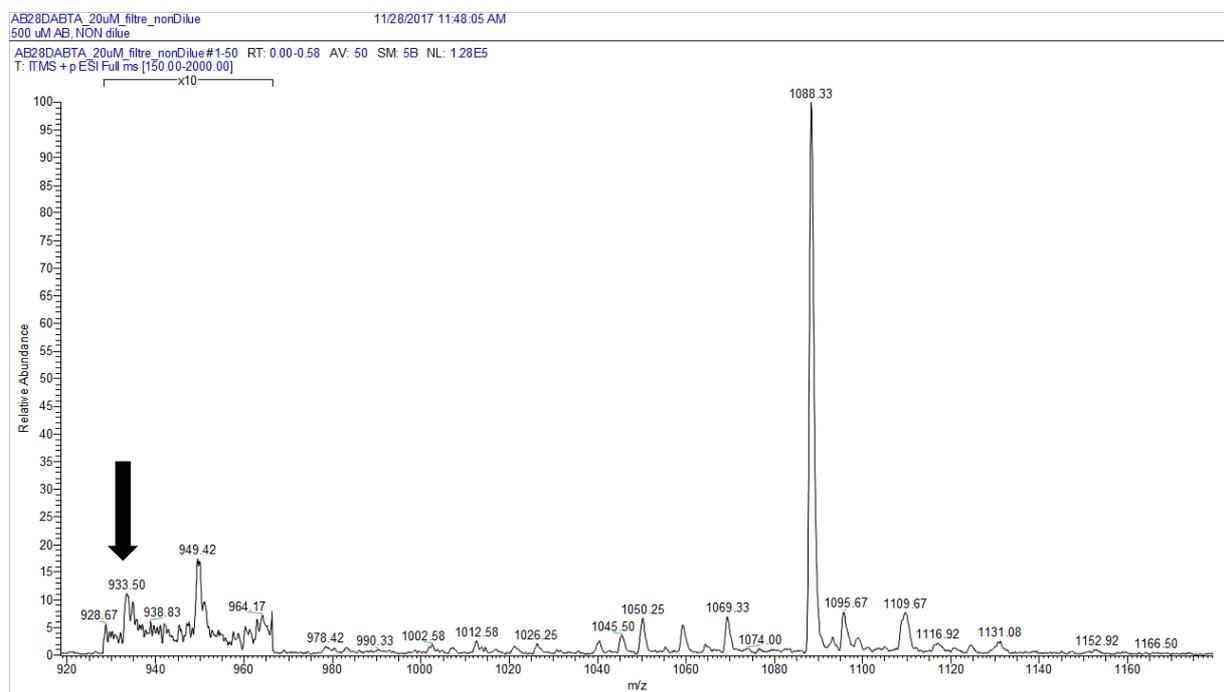


Figure 19. Spectre de masse full scan du mélange A β 28 fibres 500 μ M, Zn 250 μ M, DA-BTA 20 μ M irradié à 360 nm pendant 40 min ; zoom de la figure 17 entre m/z 920 et m/z 1180.

On suppose que la faible intensité des pics vient de l'injection de fibres non monomérisées. On ne peut pas non plus exclure un faible rendement de photomarquage. On propose, pour expliquer cette faible conversion de la diazirine en carbène, que le motif 2-aryl-BzT absorbe à la même longueur d'onde où la diazirine se converti en carbène ($\lambda \sim 360$ nm) ce qui peut nuire potentiellement au photomarquage. Il convient également de rappeler que le DA-BTA possède une faible affinité envers fibres (cf. Chapitre IV §II). Malgré tout, on observe des adduits correspondant à 2 molécules de DA-BTA qui sont liés de manière covalente au peptide A β 28, indiquant au minimum 2 sites différents d'interaction.

III.3. Conclusion et perspectives

Ces résultats préliminaires permettent de constater qu'il est possible de procéder au marquage de photoaffinité d'A β 28 par le DA-BTA et qu'il y a vraisemblablement 2 sites d'interactions entre le DA-BTA et le peptide A β 28. Ces résultats restent à confirmer au regard du faible taux de marquage.

Ces résultats très préliminaires permettent de confirmer le marquage mais ils n'indiquent pas la localisation précise du site d'interaction. En utilisant les outils de l'analyse protéomique par spectrométrie de masse, le peptide A β 28 marqué pourrait être digéré par la trypsine puis séquencé de manière à déterminer avec précision le site d'interaction avec DA-BTA. Cela permettrait de préciser le lieu d'interaction avec le peptide. On propose ensuite de faire cette réaction de photomarquage avec le peptide A β 40 puis de le digérer avec la trypsine pour observer les fragments de peptides photomarkés. Ces fragments pourront être à leur tour fragmenté pour identifier précisément l'acide aminé sur lequel le DA-BTA est fixé.

IV. Conclusion générale sur la caractérisation du site d'interaction.

Ces expériences RMN et SM ont permis de valider l'interaction des motifs 2-aryl-BzT avec le peptide A β 28 monomérique et fibrillaire, respectivement. Les expériences RMN avec le TEMPO-BTA ont permis d'observer l'effet paramagnétique du radical nitroxy sur les résidus Ala et Val du peptide voisins de résidus aromatiques Phe et Tyr et donc ont permis de supposer au minimum 3 sites d'interactions pour le peptide A β 28 sous forme monomérique. Les études en SM semble indiquer au minimum 2 sites d'interactions entre la molécule DA-BTA et le peptide A β 28 sous forme agrégée. Ces résultats restent très préliminaires, les études doivent donc être approfondies avec le peptide A β 28. Cependant ils permettent de valider ces preuves de concepts qui pourront être appliquées plus tard pour des études avec le peptide A β 40.

Bibliographie du Chapitre V

1. Lockhart, A., et al., *Evidence for the presence of three distinct binding sites for the thioflavin T class of Alzheimer's disease PET imaging agents on beta-amyloid peptide fibrils*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 7677-84.
2. Biancalana, M. and S. Koide, *Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(7): p. 1405-12.
3. Pham, J.D., et al., *Structures of oligomers of a peptide from beta-amyloid*. J Am Chem Soc, 2013. **135**(33): p. 12460-7.
4. Feinberg, H., et al., *Crystal structure reveals conservation of amyloid-beta conformation recognized by 3D6 following humanization to bapineuzumab*. Alzheimers Res Ther, 2014. **6**(3): p. 31.
5. Nelson, R., et al., *Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 773-8.
6. Pham, J.D., et al., *Structures of Oligomers of a Peptide from β -Amyloid*. Journal of the American Chemical Society, 2013. **135**(33): p. 12460-12467.
7. Raunser, S., *Cryo-EM Revolutionizes the Structure Determination of Biomolecules*. Angewandte Chemie International Edition, 2017. **56**(52): p. 16450-16452.
8. Schmidt, M., et al., *Peptide dimer structure in an A β (1-42) fibril visualized with cryo-EM*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015. **112**(38): p. 11858-11863.
9. Gremer, L., et al., *Fibril structure of amyloid- β (1-42) by cryo-electron microscopy*. Science, 2017. **358**(6359): p. 116-119.
10. Halperin, I., et al., *Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions*. Proteins, 2002. **47**(4): p. 409-43.
11. M.P., A., *Introduction to molecular dynamics simulation*. Computational Soft Matter—From Synthetic Polymers to Proteins, ed. N. Series. Vol. 23. 2004. 1-28.
12. Sutmann, G., *Classical Molecular Dynamics*. Quantum Simulations of Complex Many-Body Systems: From Theory to Algorithms, ed. N. Series. Vol. 10. 2002.
13. Ali-Torres, J., et al., *Insights on the binding of Thioflavin derivative markers to amyloid-like fibril models from quantum chemical calculations*. J Phys Chem B, 2013. **117**(22): p. 6674-80.
14. Jones, M.R., et al., *Dual-function triazole-pyridine derivatives as inhibitors of metal-induced amyloid-[small beta] aggregation*. Metallomics, 2012. **4**(9): p. 910-920.
15. Awasthi, M., et al., *Alzheimer's disease: An overview of amyloid beta dependent pathogenesis and its therapeutic implications along with in silico approaches emphasizing the role of natural products*. J Neurol Sci, 2016. **361**: p. 256-71.
16. Hyung, S.J., et al., *Insights into anti-amyloidogenic properties of the green tea extract (-)-epigallocatechin-3-gallate toward metal-associated amyloid-beta species*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(10): p. 3743-8.
17. Raman, E.P., T. Takeda, and D.K. Klimov, *Molecular dynamics simulations of Ibuprofen binding to Abeta peptides*. Biophys J, 2009. **97**(7): p. 2070-9.
18. Viegas, A., et al., *Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding*. Journal of Chemical Education, 2011. **88**(7): p. 990-994.

19. Klages, J., M. Coles, and H. Kessler, *NMR-based screening: a powerful tool in fragment-based drug discovery*. *Molecular Biosystems*, 2006. **2**(6-7): p. 319-331.
20. Begley, D.W., et al., *Saturation transfer difference NMR for fragment screening*. *Curr Protoc Chem Biol*, 2013. **5**(4): p. 251-68.
21. Cala, O. and I. Krimm, *Ligand-Orientation Based Fragment Selection in STD NMR Screening*. *J Med Chem*, 2015. **58**(21): p. 8739-42.
22. Venkitakrishnan, R.P., et al., *Use of NMR saturation transfer difference spectroscopy to study ligand binding to membrane proteins*. *Methods Mol Biol*, 2012. **914**: p. 47-63.
23. Cruz, C., et al., *NMR screening of new carbocyanine dyes as ligands for affinity chromatography*. *J Mol Recognit*, 2014. **27**(4): p. 197-204.
24. Ghosh, A., et al., *Inhibition and Degradation of Amyloid Beta (A β 40) Fibrillation by Designed Small Peptide: A Combined Spectroscopy, Microscopy, and Cell Toxicity Study*. *ACS Chem Neurosci*, 2017. **8**(4): p. 718-722.
25. Ono, K., et al., *Phenolic compounds prevent amyloid beta-protein oligomerization and synaptic dysfunction by site-specific binding*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(18): p. 14631-43.
26. Korshavn, K.J., et al., *Reactivity of Metal-Free and Metal-Associated Amyloid-beta with Glycosylated Polyphenols and Their Esterified Derivatives*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 17842.
27. Eury, H., *Etude de l'interaction de la thioflavine T et de complexes de Ru(II) avec le peptide amyloïde bêta dans le cadre de la maladie d'Alzheimer*. 2013.
28. Reginsson, G.W. and O. Schiemann, *Pulsed electron-electron double resonance: beyond nanometre distance measurements on biomacromolecules*. *Biochem J*, 2011. **434**(3): p. 353-63.
29. Motion, C.L., et al., *DEER Sensitivity between Iron Centers and Nitroxides in Heme-Containing Proteins Improves Dramatically Using Broadband, High-Field EPR*. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 2016. **7**(8): p. 1411-1415.
30. Robinette, D., et al., *Photoaffinity labeling combined with mass spectrometric approaches as a tool for structural proteomics*. *Expert Rev Proteomics*, 2006. **3**(4): p. 399-408.
31. Geurink, P.P., et al., *Photoaffinity Labeling in Activity-Based Protein Profiling*, in *Activity-Based Protein Profiling*, S.A. Sieber, Editor. 2012, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 85-113.
32. Tanaka, Y., M.R. Bond, and J.J. Kohler, *Photocrosslinkers illuminate interactions in living cells*. *Mol Biosyst*, 2008. **4**(6): p. 473-80.
33. Vodovozova, E.L., *Photoaffinity labeling and its application in structural biology*. *Biochemistry (Mosc)*, 2007. **72**(1): p. 1-20.
34. Dormán, G., *Photoaffinity Labeling in Biological Signal Transduction*, in *Bioorganic Chemistry of Biological Signal Transduction*, H. Waldmann, Editor. 2001, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 169-225.
35. Singh, A., E.R. Thornton, and F.H. Westheimer, *The photolysis of diazoacetylchymotrypsin*. *J Biol Chem*, 1962. **237**: p. 3006-8.
36. Murale, D.P., et al., *Photo-affinity labeling (PAL) in chemical proteomics: a handy tool to investigate protein-protein interactions (PPIs)*. *Proteome Sci*, 2016. **15**(1): p. 14.
37. Inui, H., et al., *Aryl nitrene rearrangements: spectroscopic observation of a benzazirine and its ring expansion to a ketenimine by heavy-atom tunneling*. *J Am Chem Soc*, 2013. **135**(28): p. 10246-9.
38. Abramovitch, R.A. and S.R. Challand, *Reaction of triplet aryl nitrenes and azides with molecular oxygen*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1972(16): p. 964-966.
39. Barral, K., A.D. Moorhouse, and J.E. Moses, *Efficient Conversion of Aromatic Amines into Azides: A One-Pot Synthesis of Triazole Linkages*. *Organic Letters*, 2007. **9**(9): p. 1809-1811.

40. Das, J., et al., *An easy access to aryl azides from aryl amines under neutral conditions*. Synthesis-Stuttgart, 2005. **2005**(11): p. 1801-1806.
41. Simoncelli, S., et al., *Photochemical reaction mechanisms and kinetics with molecular nanocrystals: surface quenching of triplet benzophenone nanocrystals*. Journal of Physical Organic Chemistry, 2010. **23**(4): p. 376-381.
42. Wittelsberger, A., et al., *Methionine acts as a "magnet" in photoaffinity crosslinking experiments*. FEBS Lett, 2006. **580**(7): p. 1872-6.
43. Belsom, A., et al., *Complementary Benzophenone Cross-Linking/Mass Spectrometry Photochemistry*. Anal Chem, 2017. **89**(10): p. 5319-5324.
44. Brunner, J., H. Senn, and F.M. Richards, *3-Trifluoromethyl-3-phenyldiazirine. A new carbene generating group for photolabeling reagents*. J Biol Chem, 1980. **255**(8): p. 3313-8.
45. Bourissou, D., et al., *Stable Carbenes*. Chemical Reviews, 2000. **100**(1): p. 39-92.
46. Song, M.-G. and R.S. Sheridan, *Effects of CF₃ groups and charged substituents on singlet carbene stabilities—a density functional theory study*. Journal of Physical Organic Chemistry, 2011. **24**(10): p. 889-893.

Conclusion générale

Conclusion générale

La maladie d'Alzheimer est la forme de démence la plus répandue à travers le monde. Elle ne présente actuellement aucun traitement curatif et reste diagnostiquée tardivement par rapport à l'évolution de la maladie. Les personnes qui en sont atteintes voient ainsi leurs facultés cognitives décliner progressivement jusqu'à une perte totale d'autonomie. Elle a donc un coût financier et humain important pour la santé publique.

Une compréhension précise du mécanisme d'agrégation du peptide A β sous forme de plaques séniles permet l'élaboration de stratégies permettant le diagnostic précoce et donc une meilleure prise en charge des patients. La détection d'espèces précoces, comme les oligomères par exemple, est un axe de recherche scientifique important. Cependant la majorité des structures de la littérature détectent uniquement les plaques *in vivo*. De plus la variabilité des structures présentant une affinité pour les agrégats du peptide A β ne permet pas de facilement rationaliser le site d'interaction entre les ligands et les différentes formes du peptide. Les techniques actuelles ne permettent donc pas d'imager les formes du peptide A β autres que les plaques. Il a donc été proposé au cours de cette thèse l'élaboration d'outils permettant d'une part un suivi de l'agrégation *in vitro* en fonction de la taille des agrégats et d'autre part l'identification des sites d'interaction des ligands envers le peptide A β .

Pour ce faire, une voie de synthèse d'une plateforme moléculaire à base du motif 2-aryl-BzT a été élaborée. Celle-ci permet la synthèse de plusieurs dérivés, chacun permettant une fonctionnalisation spécifique de la plateforme pour une utilisation dans une étude physico-chimique particulière. Quatre molécules furent ainsi développées au cours de ces travaux de thèse et testées avec le peptide A β 28. La NMA pour des études par fluorescence dont les travaux ont pu mettre en évidence ses capacités à produire du FRET avec la ThT au sein des fibres et également des capacités à détecter potentiellement des espèces plus précoces ; le Fc-BTA permettant des études d'agrégation par électrochimie dont les résultats préliminaires ont mis en évidence son affinité avec les fibres et permet de discriminer les espèces monomériques des fibres ; le TEMPO-BTA a su démontrer des capacités à suivre l'agrégation du peptide A β par RPE basé sur le coefficient de diffusion (et donc directement du poids moléculaire) mais également à présenter une signature spectrale différente lorsqu'elle est en contact avec les fibres. Cette molécule a aussi permis l'étude du site d'interaction par RMN. Les résultats très préliminaires supposent une interaction par les motifs aromatiques Phe4, Tyr12 ou Phe19/20. Enfin le motif DA-BTA dont le photomarquage avec le peptide suppose la formation d'adduit covalent de 2 molécules par peptide.

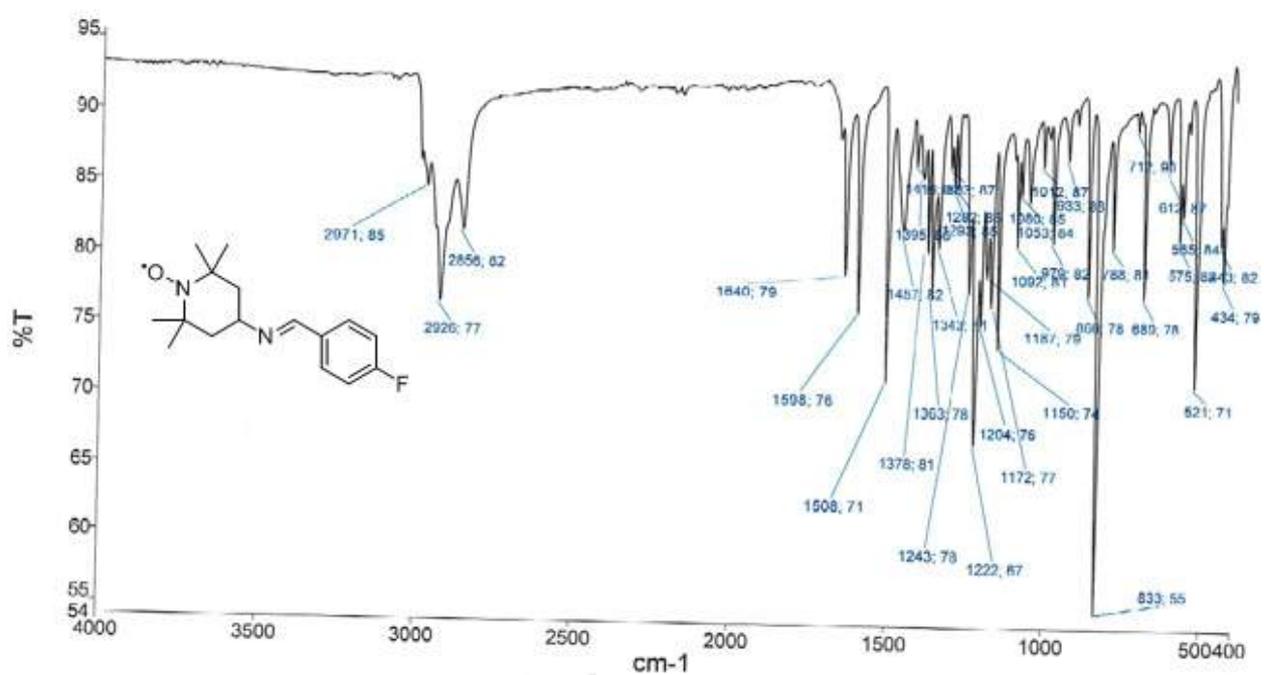
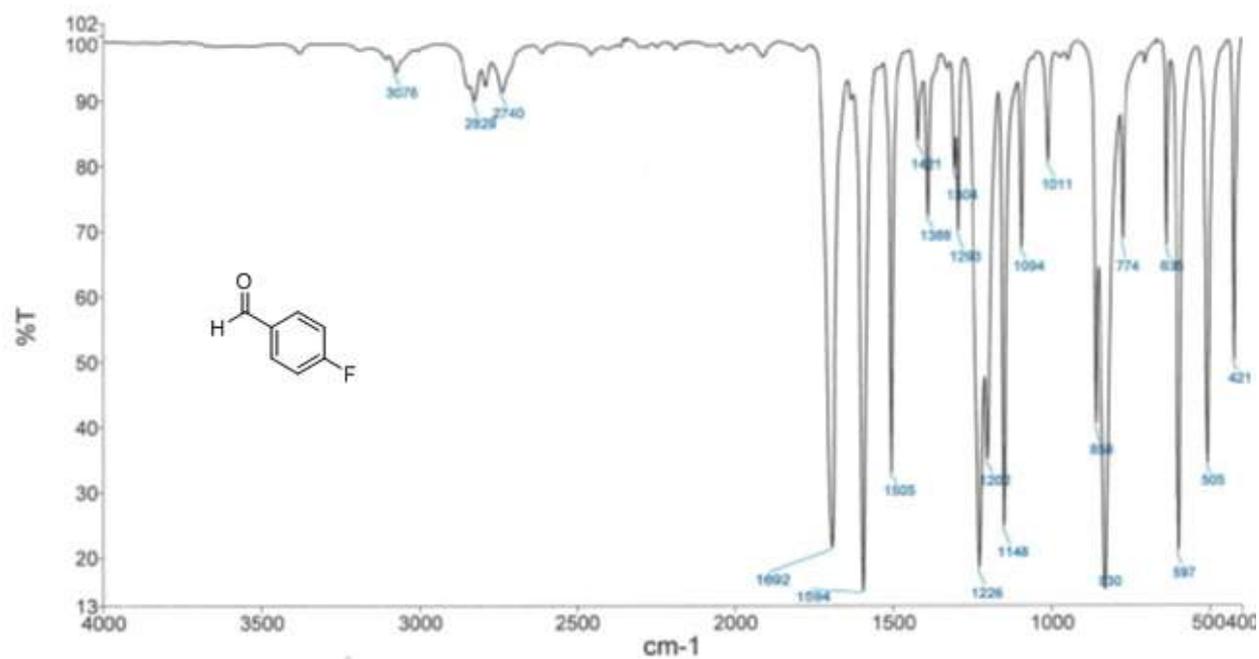
En bref, les travaux de cette thèse, s'inscrivant dans un contexte d'élaboration d'outils permettant la reconnaissance de diverses formes du peptide A β , ont produit des résultats préliminaires suggérant de nouvelles méthodes de suivi de l'agrégation basées sur la taille des espèces formées au cours de l'agrégation. Par ailleurs, les expériences préliminaires de caractérisation du site d'interaction suggèrent plusieurs sites d'interaction avec le peptide A β sous forme monomérique.

Les voies de synthèse ont permis d'obtenir un dérivé 2-aryl-BzT possédant un motif azoture qui est à la fois un centre électrophile et nucléophile, mais qui permet également les réactions type CuAAC. Cette réactivité a été mise à profit pour la synthèse du Fc-BTA mais également pour y accoler un chélateur du Cu(II) suggérant l'utilisation en tant que molécule diagnostic avec le ⁶⁴Cu. La CuAAC permettra également d'accoler des structures comme la biotine ou bien des billes magnétiques pour la fixation du motif 2-aryl-BzT sur support solide ce qui permettra son utilisation dans des techniques basées sur la reconnaissance de motifs d'interaction comme la résonance plasmonique de surface. L'azoture étant assez proche du motif 2-aryl-BzT il pourra être par la suite être éloigné afin de limiter la gêne stérique.

Ces molécules pourront également être testées avec d'autres peptides amyloïdes dans d'autres maladies comme l'amyline dans le cas du diabète de type II ou bien encore des peptides présents dans le liquide séminal formant des agrégats provoquant potentiellement des problèmes d'infertilité. Cela permet d'ouvrir ainsi des voies d'études au-delà de la maladie d'Alzheimer et permettant l'étude de maladies amyloïdes de manière générale.

Annexes

Annexe II : Comparaison des spectres IR du dérivé aldéhyde et TEMPO de la 4-fluorobenzaldéhyde



Annexe III : Déplacement RMN ^1H de A β 28 à pH 7,4.

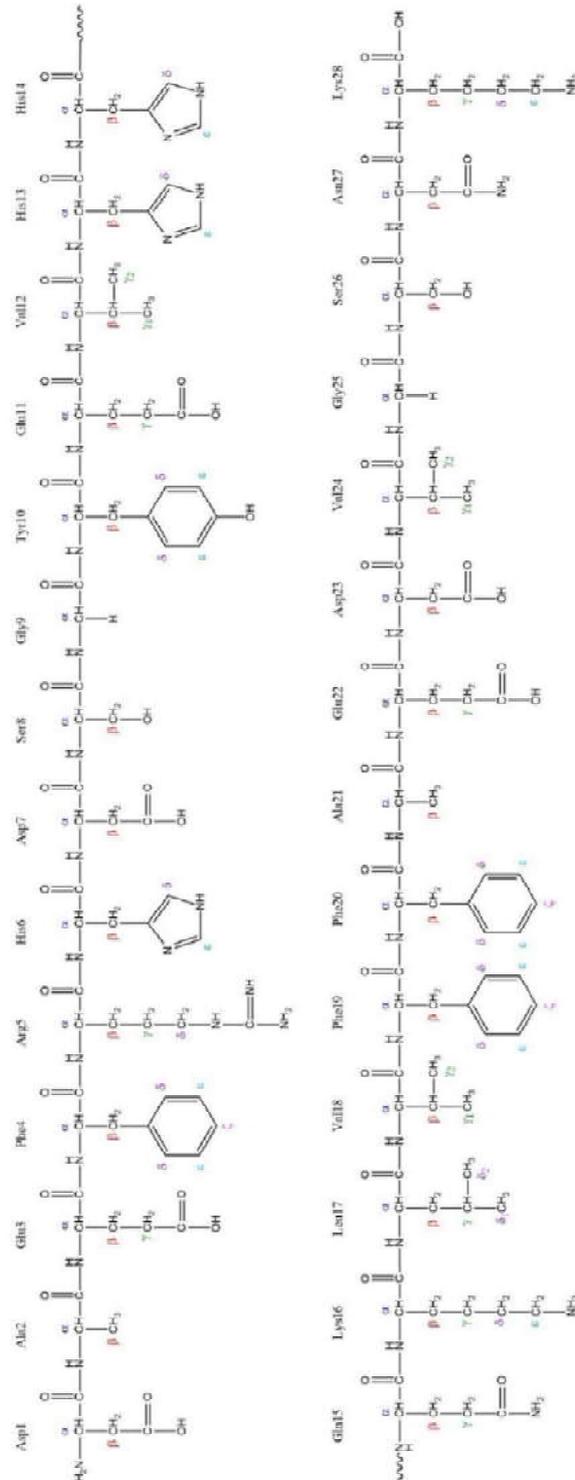
All the ^1H signals were assigned on the basis of chemical shifts by using ^1H - ^1H TOCSY and ^1H - ^1H NOESY experiments for A β 28 (500 μM) in 10 mM phosphate buffer pH 7.4, 90/10 $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ at 10°C.

All chemical shifts were referenced at 0.00 ppm relative to internal TSP.

Résidu	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ
Asp1		4.13	2.68-2.80			
Ala2		4.29	1.36-1.37			
Glu3	8.52	4.20	1.83-1.92	2.17-2.19		
Phe4	8.35	4.56	3.01		7.16	7.25
Arg5	8.19	4.27	1.62-1.74	1.49	3.12	
His6		4.54	3.05-3.10		7.88	7.03
Asp7	8.40	4.62	2.66			
Ser8	8.46	4.37	3.87-3.91			
Gly9	8.59	3.88-3.94				
Tyr10	8.01	4.52	2.94-3.03		7.06	6.78
Glu11	8.44	4.18	1.89-1.92	2.12-2.21		
Val12	8.13	3.94	1.95	0.78-0.87		
His13		4.53	3.04		7.83	6.94
His14		4.59	3.01-3.08		7.85	6.96
Gln15	8.44	4.26	1.97-2.06	2.32		
Lys16	8.44	4.27	1.67-1.74	1.37	1.44	2.97
Leu17	8.31	4.32	1.57-1.61	1.45	0.85-0.91	
Val18	8.04	4.02	1.90	0.75-0.83		
Phe19	8.31	4.58	2.91-2.99		7.30	7.17
Phe20	8.27	4.57	2.94-3.09		7.32	7.24
Ala21	8.29	4.22	1.36-1.37			
Glu22	8.42	4.21	1.92-2.04	2.27		
Asp23	8.48	4.65	2.63-2.74			
Val24	8.20	4.15	2.19	0.96		
Gly25	8.59	3.98				
Ser26	8.22	4.46	3.88			
Asn27	8.54	4.74	2.77-2.85			
Lys28	7.96	4.16	1.71-1.83	1.39	1.66	2.99

Issu de la thèse de H. Eury sur l'Étude de l'interaction de la Thioflavine T et de complexes de Ru(II) avec le peptide amyloïde bêta dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, 2013.

Annexe IV : Structure chimique de la sequence d'Aβ28 ainsi que les identifiants de chaque atome de caque acide aminés



Parties expérimentales

Table des matières

Partie expérimentale des chapitres II et III.	189
Instrumentation.	189
Caractérisation des dérivés 2-aryl-BzT.	189
Synthesis of 2 : 2-amino-1,3-benzothiazole-6-carboxylic acid.	189
Synthesis of 3 : ethyl 2-amino-1,3-benzothiazole-6-carboxylate.	190
Synthesis of 4 : ethyl 2-iodo-1,3-benzothiazole-6-carboxylate.	191
Synthesis of 2' : <i>tert</i> -butyl (4-bromophenyl)carbamate.	191
Synthesis of 3' : <i>tert</i> -butyl (4-bromophenyl)methylcarbamate.	192
Synthesis of 4' : <i>tert</i> -butyl [4-(1,3,6,2-dioxazaborocan-2-yl)phenyl]methylcarbamate.	193
Synthesis of 5a : ethyl 2-(4-[(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)(methyl)amino]phenyl)-1,3-benzothiazole-6-carboxylate.	194
Synthesis of 5b : ethyl 2-(4-(methylamino)phenyl)benzo[d]thiazole-6-carboxylate.	194
Synthesis of 6a : <i>tert</i> -butyl (4-[6-(hydroxymethyl)-1,3-benzothiazol-2-yl]phenyl)methylcarbamate.	195
Synthesis of 6b : 4-(6-(hydroxymethyl)-1,3-benzothiazol-2-yl)- <i>N</i> -methylaniline.	196
Synthesis of 7a : <i>tert</i> -butyl [4-(6-formyl-1,3-benzothiazol-2-yl)phenyl]methylcarbamate.	196
Synthesis of 7b : 4-(6-(formyl)-1,3-benzothiazol-2-yl)- <i>N</i> -methylaniline.	197
Synthesis of 8a : <i>tert</i> -butyl methyl(4-(6-[(methylamino)methyl]-1,3-benzothiazol-2-yl)phenyl)carbamate.	198
Synthesis of 8b : <i>N</i> -methyl-4-(6-[(methylamino)methyl]benzothiazol-2-yl)aniline.	199
Caractérisation des dérivés autour de la synthèse de l'azoture et 1,2,3 triazole.	200
Synthesis of 17a : (2-(4-[(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)(methyl)amino]phenyl)benzo[d]thiazol-6-yl)methyl 4-methylbenzenesulfonate.	200
Synthesis of 18a : <i>tert</i> -butyl (4-(6-(azidomethyl)-1,3-benzothiazol-2-yl)phenyl)(methyl)carbamate.	201
Synthesis of 18b : 4-(6-(azidomethyl)-1,3-benzothiazol-2-yl)- <i>N</i> -methylaniline.	201
Synthesis of 19a : <i>tert</i> -butyl (4-(6-(aminomethyl)benzothiazol-2-yl)phenyl)(methyl)carbamate.	202
Synthesis of 19b : 4-(6-(aminomethyl)benzo[d]thiazol-2-yl)- <i>N</i> -methylaniline.	203
Synthesis of 19c : <i>tert</i> -butyl (4-(6-(((<i>tert</i> -butoxycarbonyl)amino)methyl)benzothiazol-2-yl)phenyl)(methyl)carbamate.	203
Synthesis of 20a : <i>tert</i> -butyl methyl[4-(6-[[4-(pyridin-2-yl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-yl]methyl]-1,3-benzothiazol-2-yl)phenyl]carbamate.	204
Synthèse du 21b : 4-(6-(Ferrocene-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-1,3-benzothiazol-2-yl) <i>N</i> -methylaniline.	205
Caractérisation des dérivés de la diazirine: composés X1 à 5' et des composés 9a/b.	206
Synthesis of X2 : methyl 4-(trifluoroacetyl)benzoate.	206
Synthesis of X3 : methyl 4-[2,2,2-trifluoro- <i>N</i> -hydroxyethanimidoyl]benzoate.	206
Synthesis of X4 : methyl 4-(2,2,2-trifluoro- <i>N</i> -[(4-methylbenzene-1-sulfonyl)oxy]ethanimidoyl)benzoate.	207
Synthesis of 5' : 4-[3-(trifluoromethyl)-3 <i>H</i> -diaziridin-3-yl]benzoate.	207
Synthesis of 6' : methyl 4-[3-(trifluoromethyl)-3 <i>H</i> -diaziren-3-yl]benzoate.	208

Synthesis of 7' : 4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diaziren-3-yl]benzoic acid	208
Synthesis of 8' : 1-((4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diaziren-3-yl]benzoyl)oxy)pyrrolidine-2,5-dione.....	209
Synthesis of 9a : tert-butyl methyl (4-{6-[(methyl{4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diaziren-3-yl]benzoyl}amino)methyl]-1,3-benzothiazol-2-yl}phenyl)carbamate	210
Synthesis of 9b : N-methyl-N-((2-[4-(methylamino)phenyl]-1,3-benzothiazol-6-yl)methyl)-4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diaziren-3-yl]benzamide.	211
Caractérisation des composés autour de la synthèse des dérivés du TEMPO.....	212
Synthesis of 10a : tert-butyl methyl(4-(6-(((2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)imino)methyl)benzo[d]thiazol-2-yl)phenyl)carbamate.....	212
Synthesis of 11a : tert-butyl methyl(4-(6-(((2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)amino)methyl)benzothiazol-2-yl)phenyl)carbamate.....	213
Synthesis of 12b : 4-(6-((2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)oxylaminomethyl)benzothiazol-2-yl)-N-methylaniline	214
Synthesis of 13a : 2-(4-((tert-butoxycarbonyl)(methyl)amino)phenyl)benzo[d]thiazole-6-carboxylic acid	214
Synthesis of 13b : 2-(4-(methylamino)phenyl)benzothiazole-6-carboxylic acid	215
Synthesis of 15a : 2,5-dioxocyclopentyl 2-(4-((tert-butoxycarbonyl)(methyl)amino)phenyl)benzo[d]thiazole-6-carboxylate	216
Synthesis of 14a : tert-butyl methyl(4-(6-((2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)carbamoyle)benzo[d]thiazol-2-yl)phenyl)carbamate.....	217
Synthesis of 16a : tert-butyl (4-(6-((1-oxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)carbamoyle)benzo[d]thiazol-2-yl)phenyl)(methyl)carbamate	218
Synthesis of 16b : N-(1-oxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)-2-(4-(methylamino)phenyl)benzo[d]thiazole-6-carboxamide	219
Parties expérimentales des chapitres IV et V.....	220
Bibliographie des parties expérimentales.....	224

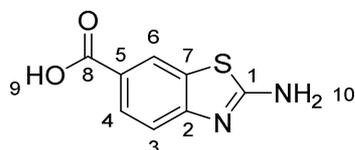
Partie expérimentale des chapitres II et III.

Instrumentation.

Automated flash chromatography was performed with an Interchim Puriflash medium-pressure liquid chromatograph with silica gel (47-60 μm) columns. ^1H , ^{11}B , ^{13}C and ^{19}F NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 300 (300 MHz) spectrometer, and a Bruker Avance 400 (400 MHz) spectrometer. All spectra were recorded at ambient temperature (298 K) unless otherwise stated. and coupling constants are reported in Hz. The multiplicity of signals is indicated using the following abbreviations: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, bs = broad singlet, m = multiplet. Infrared (IR) spectra were recorded on a Perkin Elmer Spectrum One FT-IR spectrometer. Vibration frequencies are expressed in cm^{-1} . High-resolution mass spectrometry (HR-MS) were measured at the Mass Spectrometry Service at the University Paul Sabatier. X-ray crystallography was performed on single crystal diffractometers: Agilent Gemini, Bruker Nonius and Bruker Kappa Apex II. Elemental Analysis were performed with analyzer PERKIN ELMER 2400 serie II.

Caractérisation des dérivés 2-aryl-BzT.

Synthesis of **2**: 2-amino-1,3-benzothiazole-6-carboxylic acid.



Compound **2**

Chemical Formula: $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$
Molecular Weight: 194,21

p-aminobenzoic acid (5.48 g, 40 mmol) and NH_4SCN (12.2 g, 160 mmol) were dissolved in acetic acid (30 mL). Bromine (2.1 mL, 40 mmol) was then added dropwise and the mixture was stirred overnight. The mixture was neutralized by adding carefully solid NaOH to reach pH 7 or 8. The mixture was then filtrated and washed with water. The precipitate was recovered and dried under vacuum in a dessicator to obtain a slightly yellow powder (6.21 g, 80%).

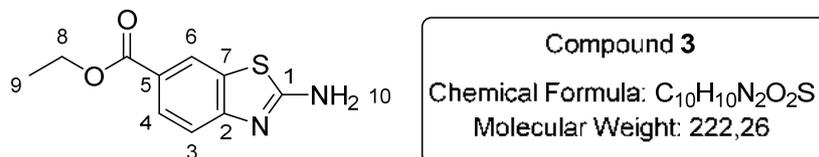
^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.20 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, *H*6), 7.79 (dd, $J = 8.4, 1.7$ Hz, 1H, *H*4), 7.72 (s, 2H, *H*10), 7.30 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, *H*3).

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 168.67 (Cq), 167.76 (Cq), 155.56 (Cq), 130.56 (Cq), 127.13 (CH), 126.33 (Cq), 122.33 (CH), 116.67 (CH).

MS-DCI (NH_3) positive (m/z) : 195.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 151.0 $[\text{M}+\text{H}-\text{COOH}]^+$

IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3395-3059 (NH stretch), 2721, 2061-1890 (CH aromatic bending) 1638-1573 (C=O stretch), 1535, 1521, 1450, 1400-1237 (O-H bending).

Synthesis of 3: ethyl 2-amino-1,3-benzothiazole-6-carboxylate.



2-amino-1,3-benzothiazole-6-carboxylic acid (23 g, 0.117 mol) was dissolved in ethanol (300 mL) in a 1L round-bottom flask. Sulfuric acid (16 mL, 96%, 0.288 mol) in ethanol (40 mL) was added slowly to the reaction mixture at 0°C. After the addition, the system was put under reflux at 95°C for 3,5 days. After that, the solution was filtered and the filtrate was poured directly onto an ice bath producing a white precipitate; the aqueous phase is adjusted to pH 8 using potassium hydroxide. The precipitate is collected by filtration and washed with water, then azeotropically dried with ethanol (3 times) to furnish the product as a white powder (22 g, 70%).

Alternative procedure: 2-amino-1,3-benzothiazole-6-carboxylic acid (6.2 g, 32 mmol) was dissolved in ethanol (50 mL). Sulfuric acid (7.8 mL, 96%, 0.140 mmol) in ethanol (20 mL) was added slowly to the reaction mixture at 0°C, a yellow precipitate was formed during the addition. After the addition, the mixture was heated to reflux for 3 hours, after which the mixture was an opaque yellow ocher. After 3 hours, the solution was neutralized with a saturated solution of NaHCO₃ to reach pH 7. The mixture was divided in two equal volume parts to be extracted. The aqueous phases were extracted with diethyl ether (1x300 mL) and the organic solvent were directly removed under vacuum to obtain a yellow solid. Additionally, the remaining aqueous phase was filtered and the precipitate was washed with ethanol and dried overnight in air. The different yellow solids from extraction and filtration are the desired product (5.56 g, 63%).

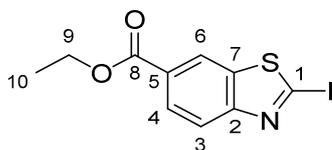
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.27 (dd, $J = 1.8$ Hz, 0.37 Hz, 1H, *H*₆), 7.88 (s, 2H, *H*₁₀), 7.81 (dd, $J = 8.4$, 1.8 Hz, 1H, *H*₄), 7.37 (dd, $J = 8.4$ Hz, 0.37 Hz, 1H, *H*₃), 4.29 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, *H*₈), 1.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, *H*₉).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.70 (C_q), 165.61 (C_q), 156.86 (C_q), 131.12 (C_q), 127.02 (CH), 122.47 (CH), 121.95 (C_q), 117.05 (CH), 60.33 (CH₂), 14.26 (CH₃).

MS-ESI (m/z) : 223.00 [M+H]⁺, 194.92 [M+H-C₂H₅]⁺.

IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3344-3311 (NH stretch), 3072-2972 (CH stretch), 1685-1658 (C=O stretch), 1622-1523 (CH ring), 1440 (C=C ring), 1330, 1275, 1252, 1237, 1138, 1111, 1026, 948-860, 825, 765-702, 616.

Synthesis of **4**: ethyl 2-iodo-1,3-benzothiazole-6-carboxylate.



Compound 4
 Chemical Formula: C₁₀H₈INO₂S
 Molecular Weight: 333,14

Ethyl 2-amino-1,3-benzothiazole-6-carboxylate (2.00 g, 9 mmol), *p*-toluenesulfonic acid (5.14 g, 27 mmol), potassium iodide (2.98 g, 18 mmol) were dissolved in acetonitrile (120 mL) and the mixture was stirred for 5 minutes. Copper(I) iodide (17 mg, 0.09 mmol) was then added to the mixture. *tert*-butyl nitrite (2.15 mL, 18 mmol) was then added dropwise and the mixture was stirred overnight. The mixture was then treated with a saturated solution of NaHCO₃ to form a precipitate. The mixture was filtered, the recovered precipitate was dissolved in dichloromethane (30 mL). The resulting solution was washed with a 50:50 solution of brine and a 5% aqueous sodium thiosulfate solution. The organic phase was filtered with celite (2 g) and then the solvent was removed under vacuum to recover a slightly orange powder (1.85 g, 60%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.58 (dd, *J* = 1.6, 0.6 Hz, 1H, *H*₆), 8.13 (dd, *J* = 8.6, 1.6 Hz, 1H, *H*₄), 8.06 (dd, *J* = 8.6, 0.6 Hz, 1H, *H*₃), 4.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, *H*₉), 1.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, *H*₁₀).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.97 (C_q), 156.93 (C_q), 139.29 (C_q), 135.48 (C_q), 127.74 (CH), 122.58 (CH), 122.39 (CH), 109.65 (C_q), 61.64 (CH₂), 14.49 (CH₃).

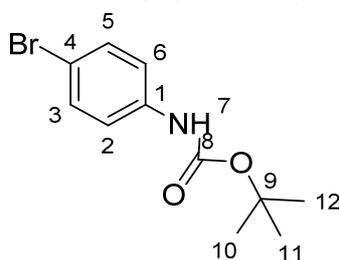
MS-APCI positive (*m/z*): 334.20 [M+H]⁺

HR-MS (CI⁺) (*m/z*): [M+H]⁺ Calcd for C₁₀H₈INO₂S 333.9399μ. Found 333.9388.

IR ν_{max}/cm⁻¹: 1713 (C=O, stretch), 1478-1457 (C-H bending), 1393, 1278, 1253.

EA : Anal. Calcd for C₁₀H₈INO₂S: C, 36.05; H, 2.42; N, 4.20. Found C, 35.74; H, 1.96; N, 4.34.

Synthesis of **2'**: *tert*-butyl (4-bromophenyl)carbamate.



Compound 2'
 Chemical Formula: C₁₁H₁₄BrNO₂
 Molecular Weight: 272,14

Protocol 1: 4-bromoaniline (4.170 g, 23.8 mmol) was dissolved in anhydrous THF (70 mL) under argon. NaH 60% (1.030 g, 26.2 mmol) was added then to the solution under argon and left for 3 hours. Then di-*tert*-butyl dicarbonate (5.670 g, 26.2 mmol) was added, and the mixture heated to reflux overnight. The mixture then was treated by a saturated solution of NH₄Cl (30 mL) and extracted with diethyl ether (2 x 70 mL). The organic phase is washed with brine and dried over

MgSO₄. After filtration, the solvent was evaporated under vacuum. The product is finally purified by flash chromatography to obtain a white solid (6.266 g, 96%).

Protocol 2: In 100 mL of CF₃CH₂OH, add 4-bromoaniline (10 g, 58 mmol) and di-*tert*-butyl dicarbonate (16.49 g, 75 mmol), leave the reaction for 3 days at room temperature. When a white precipitate is formed, filter the mixture and wash the precipitate with CF₃CH₂OH to obtain a white solid (15.2 g, 96 %)

Protocol 3: 4-bromoaniline (5.0 g, 29 mmol) and di-*tert*-butyl dicarbonate (6.33 g, 29 mmol) were added in 250-mL round bottom flask and put under vacuum in a hot bath at 45 °C for 1 hour to obtain a white powder (7.98 g, 100 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.41 – 7.33 (m, 2H, *H*₂-*H*₆), 7.30 – 7.18 (m, 2H, *H*₃-*H*₅), 6.55 (s, 1H, *H*₇), 1.51 (s, 9H, *H*₁₀-*H*₁₁-*H*₁₂).

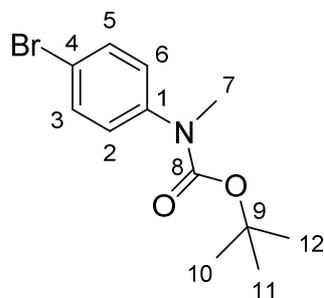
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 152.66 (C_q), 137.60 (C_q), 131.97 (CH), 120.20 (CH), 115.53 (C_q), 81.01 (C_q), 28.43 (CH₃).

MS-DCI (NH₃)(m/z) : 289.1 [M⁷⁹Br+NH₄]⁺, 291.1 [M⁸¹Br+NH₄]⁺.

IR (cm⁻¹): 3369 (CONH), 2983-2932 (CH stretch), 1694-1500, 1490 (COOCH₃), 1395, 1235, 814, 498.

EA : Anal. Calcd for C₁₁H₁₄BrNO₂: C, 48.55; H, 5.19; N, 5.15 Found: C, 48.51; H, 5.11; N, 5.24.

Synthesis of 3': *tert*-butyl (4-bromophenyl)methylcarbamate.



Compound 3'
Chemical Formula: C₁₂H₁₆BrNO₂
Molecular Weight: 286,17

tert-butyl (4-bromophenyl)carbamate (5.68 g, 21 mmol) was dissolved in anhydrous THF (70 mL) under argon. NaH 60% (0.930 g, 23.1 mmol) was then added to the solution under argon and left for 1 hour under reflux. The mixture was cooled down to room temperature and then dimethyl sulfate (2.19 mL, 23.1 mmol) was added, the reaction mixture was then heated to reflux overnight. The mixture was treated by saturated solution of NH₄Cl (30 mL) and extracted with ethyl acetate (2 x 70 mL). The organic phase is washed with brine and dried over by MgSO₄. After filtration, the solvent was evaporated under vacuum to obtain a brown-yellow oil. The product is finally purified by flash chromatography to obtain a yellow oil (4.047 g, 67%).

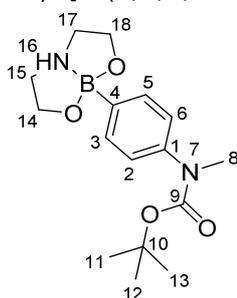
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45 – 7.40 (m, 2H, *H2-H6*), 7.14 – 7.09 (m, 2H, *H3-H5*), 3.23 (s, 3H, *H7*), 1.44 (s, 9H, *H10-H11-H12*).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 154.24 (C_q), 142.84 (C_q), 131.50 (CH), 126.95 (CH), 118.38 (C_q), 80.49 (C_q), 37.05 (CH₃), 28.25 (CH₃).

MS-APCI (m/z): 186.00 [M⁷⁹Br+2H-C₅H₉O₂]⁺, 188.00 [M⁸¹Br+2H-C₅H₉O₂]⁺, 230.20 [M⁷⁹Br+2H-C₄H₉]⁺, 232.20 [M⁸¹Br+2H-C₄H₉]⁺.

IR: 2975,2928 (CH stretch), 1698, 1590, 1489 (COOCH₃), 1350, 1146-1104.

Synthesis of **4'**: *tert*-butyl [4-(1,3,6,2-dioxazaborocan-2-yl)phenyl]methylcarbamate.



Compound 4'
 Chemical Formula: C₁₆H₂₅BN₂O₄
 Molecular Weight: 320,20

tert-butyl (4-bromophenyl)methylcarbamate (7.08 g, 24.7 mmol) is dissolved in anhydrous THF (160 mL) in a Schlenk flask under argon. The mixture is cooled to -78°C after which, *n*-butyllithium (10.88 mL, 2.5 M in hexane, 27.2 mmol) was added under argon and stirred for 15 min at -78°C. Triisopropyl borate (7.4 mL, 27.2 mmol) was then added and the resulting mixture was stirred at -78°C and allowed to warm to room temperature overnight. The mixture was neutralized with a saturated solution of NH₄Cl and extracted with diethyl ether (2x100 mL). The organic phase was washed with brine and dried over MgSO₄, the solvent was then removed under vacuum. The resulting mixture is finally dissolved in 100 mL diethylether and diethanolamine (2.859 g, 27.2 mmol) was added. After few minutes of stirring, a precipitate develops. The precipitate was then filtrated and washed with diethylether and dried with a dessicator under vacuum to obtain a white powder (6.646 g, 84%).

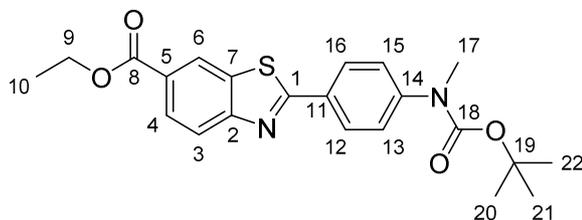
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.46 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.12 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 5.31 (s, 1H, *H16*), 3.95 (s, 2H), 3.85 (s, 2H), 3.22 (s, 3H, *H8*), 3.11 (s, 2H), 2.68 (s, 2H), 1.44 (s, 9H, *H11-H12-H13*).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 155.27 (C_q), 143.15 (C_q), 132.95 (CH), 124.74 (CH), 80.17 (C_q), 63.56 (CH₂), 51.57 (CH₂), 37.70 (CH₃), 28.56 (CH₃).

¹¹B NMR (128 MHz, CDCl₃) δ 11.51.

IR: 3076-2978-2872 (CH), 1683-1602-1506 (C=O), 1457, 1422, 1367, 1347, 1280, 1215, 1143, 1069.

EA: Calculated: C, 60.02; H, 7.87; N, 8.75. Found: C, 59.64; H, 8.10; N, 8.57

Synthesis of **5a**: ethyl2-(4-[(*tert*-butoxycarbonyl)(methyl)amino]phenyl)-1,3-benzothiazole-6-carboxylate.

Compound 5a
 Chemical Formula: C₂₂H₂₄N₂O₄S
 Molecular Weight: 412,50

Ethyl 2-iodo-1,3-benzothiazole-6-carboxylate (0.930 g, 3.4 mmol), *tert*-butyl [4-(1,3,6,2-dioxaborocan-2-yl)phenyl]methylcarbamate (1.21 g, 3.74 mmol), potassium fluoride (0.494 g, 8.5 mmol), copper(I) iodide (0.065 g, 0.34 mmol), triphenylphosphine (0.089 g, 0.34 mmol) were dissolved in a 5:1 solution of DMF (100 mL) and water (20 mL) while purging with argon. The mixture was then placed on a pre-heated heating block at 115°C and the bis(triphenylphosphine)palladium(II) dichloride (0.119 g, 0.17 mmol) was rapidly added. The mixture was stirred at 115°C for 1.5h and then was neutralized with a saturated solution of NH₄Cl (60 mL). The mixture was extracted with diethylether (2 x 250 mL). The organic phase were washed with brine and dried over MgSO₄, then filtered through celite and silica. The solvent was removed under vacuum and the crude powder was purified by flash chromatography to obtain a white powder (0,468 g, 71%).

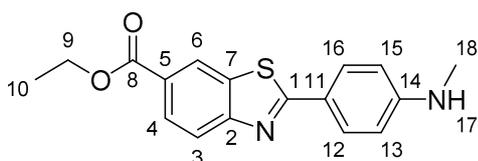
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.62 (dd, J = 1.6, 0.5 Hz, 1H, H₆), 8.17 (dd, J = 8.6, 1.7 Hz, 1H, H₄), 8.11 – 8.02 (m, 3H, H₃-H₁₂-H₁₆), 7.48 – 7.36 (m, 2H, H₁₂-H₁₆), 4.43 (q, J = 7.1 Hz, 2H, H₉), 3.33 (s, 3H, H₁₇), 1.49 (s, 9H, H₂₀-H₂₁-H₂₂), 1.44 (t, J = 7.1 Hz, 3H, H₁₀).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 170.91 (C_q), 166.30 (C_q), 157.19 (C_q), 154.36 (C_q), 146.93 (C_q), 135.06 (C_q), 129.78 (C_q), 128.11 (CH), 127.74 (CH), 127.32 (C_q), 125.37 (CH), 123.89 (CH), 122.84 (CH), 81.24 (C_q), 61.43 (CH₂), 37.10 (CH₂), 28.47 (CH₃), 14.54 (CH₃).

MS-APCI positive (m/z): 413.40 [M+H]⁺, 357.40 [M+H-C₄H₉]⁺, 313.40 [M+2H-C₅H₁₀O₂]⁺.

IR v_{max}/cm⁻¹: 2981(CH stretch), 1703-1596 (C=O), 1568, 1520, 1474-1367 (CH bending), 1342, 1322, 1303, 1273, 1232, 1176, 1157-1105, 1016.

EA : Anal. Calcd for C₂₂H₂₄N₂O₄S: C, 64.06; H, 5.86; N, 6.79. Found: C, 63.88; H, 5.84; N, 6.22.

Synthesis of **5b**: ethyl 2-(4-(methylamino)phenyl)benzo[d]thiazole-6-carboxylate

Compound 5b
 Chemical Formula: C₁₇H₁₆N₂O₂S
 Molecular Weight: 312,39

Boc derivative **5a** (0.100 g, 0.243 mmol) is dissolved in 1 mL CH₂Cl₂. The flask is placed on an ice bath at 0 °C and CF₃COOH (1 mL) is added dropwise. The reaction is stirred for 2h after which the mixture is neutralized with NH₄OH until pH 7 and then extracted 3 times with CH₂Cl₂. The organic phase is dried over Na₂SO₄, then filtered. The solvent was removed under pressure to obtain a yellow powder (0.040 g, 52%).

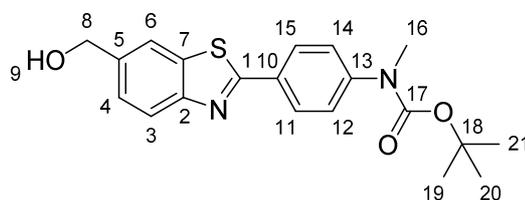
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.55 (dd, *J* = 1.7, 0.6 Hz, 1H, *H6*), 8.14 (dd, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 1H, *H4*), 8.04 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, *H3*), 8.03 – 7.97 (m, 2H, *H12-H16*), 6.72 – 6.64 (m, 2H, *H13-H15*), 4.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, *H9*), 2.94 (s, 3H, *H18*), 1.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, *H10*).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 172.36 (Cq), 166.34 (Cq), 154.66 (Cq), 152.36 (Cq), 145.52 (Cq), 136.87 (Cq), 130.39 (Cq), 129.93 (CH), 127.85 (CH), 123.64 (CH), 121.61 (CH), 112.47 (CH), 61.36 (CH₂), 30.55 (CH₃), 14.55 (CH₃).

HR-MS (ESI-TOF) (*m/z*): Calcd for C₁₇H₁₇N₂O₂S⁺: 313.1011. Found: 313.1010.

IR (cm⁻¹): 3293 (N-H stretch), 3153-3031 (CH ring stretch), 2904-2818 (CH stretch), 1707 (C=O stretch), 1604-1595 (C=C ring stretch), 1473-1318 (C=C ring stretch), 1184-1107 (C-O stretch).

Synthesis of **6a**: *tert*-butyl (4-[6-(hydroxymethyl)-1,3-benzothiazol-2-yl]phenyl)methylcarbamate.



Compound 6a
Chemical Formula: C₂₀H₂₂N₂O₃S
Molecular Weight: 370,47

Ethyl 2-(4-[(*tert*-butoxycarbonyl)(methyl)amino]phenyl)-1,3-benzothiazole-6-carboxylate (0.379 g, 0.92 mmol) is dissolved in anhydrous THF (20 mL). Then the mixture is placed in an ice bath at 0°C, and lithium aluminium hydride (0.24 mL, 4 M in hexanes, 0.920 mmol) is then added dropwise. The mixture is removed from the ice bath and stirred for less than 1h. The reaction is considered as over when the mixture turned from emerald green to amber. The mixture is neutralized with a saturated solution of NH₄Cl then extracted with diethylether (2 x 50 mL). The organic phase is dried over MgSO₄ then filtered with celite. The solvent is removed under vacuum to obtain a brown powder (0.335 g, 98%)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.04 (m, 3H), 7.93 (t, *J* = 1.6, 0.9 Hz, 1H, *H6*), 7.47 (dd, *J* = 8.4, 1.6 Hz, 1H, *H3*), 7.43 – 7.35 (m, 2H, *H12-H13*), 4.85 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, *H8*), 3.32 (s, 3H, *H16*), 1.81 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, *H9*), 1.49 (s, 9H, *H19-H20-H21*).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 167.66 (Cq), 154.28 (Cq), 153.54 (Cq), 146.31 (Cq), 138.21 (Cq), 135.24 (Cq), 129.96 (Cq), 127.73 (CH), 125.60 (CH), 125.26 (CH), 123.00 (CH), 119.82 (CH), 80.99 (Cq), 65.14 (CH₂), 36.99 (CH₃), 28.33 (CH₃).

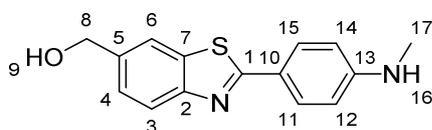
MS-APCI positive (m/z): 371.40 [M+H]⁺, 315.30 [M+H-C₄H₉]⁺, 271.30 [M+2H-C₅H₁₀O₂]⁺.

HRMS (ESI-TOF) m/z: [M+H]⁺ Calcd for C₂₀H₂₃N₂O₃S 371.1432 Found 369.1429

IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (neat film) : 3838 (OH), 2976-2929 (CH stretch), 1698-1606 (C=O), 1571, 1523, 1485-1416 (CH bending), 1391, 1365, 1350, 1315, 1302, 1279, 1252, 1152, 1108-1038 (C-O alcool), 1017.

EA : Anal. Calcd for C₂₀H₂₂N₂O₃S: C, 64.84; H, 5.99; N, 7.56. Found: C, 64.49; H, 5.91; N, 7.36

Synthesis of **6b**: 4-(6-(hydroxymethyl)-1,3-benzothiazol-2-yl)-N-methylaniline



Compound 6b
Chemical Formula: C₁₅H₁₄N₂OS
Molecular Weight: 270,35

Boc derivative compound **6a** (0.100g, 0.27 mmol), was dissolved in 500 μL of CH₂Cl₂. The solution was placed in an ice-bath at 0 °C and CF₃COOH (500 μL) was added dropwise. The reaction is stirred for 2 hours. The mixture is neutralized with NH₄OH solution, a precipitate is formed and collected by filtration. The crude product was purified by Flash Chromatography with a mixture of cyclohexane/ethyl acetate to obtain a brown product (0.045 g, 60%).

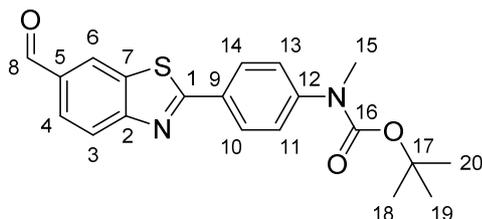
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.93 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, *H*₆), 7.84 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, *H*₃), 7.82 – 7.78 (m, 2H, *H*₁₁-*H*₁₅), 7.39 (dd, *J* = 8.4, 1.7 Hz, 1H, *H*₄), 6.69 – 6.61 (m, 2H, *H*₁₂-*H*₁₄), 6.45 (q, *J* = 5.0 Hz, 1H, *H*₁₆), 5.29 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, *H*₉), 4.61 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, *H*₈), 2.76 (d, *J* = 5.0 Hz, 3H, *H*₁₇).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.58 (Cq), 152.91 (Cq), 152.41 (Cq), 139.07 (Cq), 133.62 (Cq), 128.54 (CH), 125.09 (CH), 121.27 (CH), 120.05 (Cq), 119.38 (CH), 111.46 (CH), 62.80 (CH₂), 29.30 (CH₃).

HRMS (ESI-TOF) m/z: [M+H]⁺ Calcd for C₁₅H₂₅N₂O₃S 271.0905 Found 271.0911

IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (neat film): 3222 (OH), 2925-2872 (CH stretch), 1607-1600 (C=O), 1508, 1460-1412 (CH bending), 1183-1000 (C-O alcool).

Synthesis of **7a**: tert-butyl [4-(6-formyl-1,3-benzothiazol-2-yl)phenyl]methylcarbamate.



Compound 7a
Chemical Formula: C₂₀H₂₀N₂O₃S
Molecular Weight: 368,45

tert-butyl [4-(6-hydroxymethyl-1,3-benzothiazol-2-yl)phenyl]methylcarbamate (1.19 g, 3.2 mmol), TEMPO (0.005 g, 0.32 mmol), and sodium bromide (0.329g, 3.2 mmol) were dissolved into a 40 mL mixture of CH₂Cl₂/water (1:1). An aqueous solution of NaOCl (1.98 mL, 13.5%, 4 mmol) and NaHCO₃ (2.957g, 3.52 mmol) in water (3 mL) was added dropwise to the reaction mixture at 0°C and the mixture is allowed to warm to room temperature. After 1 h, a large excess of NaOCl was added (15 mL, 30 mmol) to push the reaction to full conversion. After an additional hour, the mixture was extracted with DCM (2x40 mL). The organic phase was washed with brine and dried over with MgSO₄. The solution is then filtered and the solvent was removed under vacuum to recover an ocher powder (0.946 g, 78%).

Comments: Depending on the quality of the aqueous solution of NaOCl the reaction can be carried out with 1.25 eq in excess, the excess of NaOCl did not seem to not lead to over-oxidation of the aldehyde to carboxylic acid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.12 (s, 1H, H8), 8.44 (dd, J = 1.7, 0.6 Hz, 1H, H6), 8.16 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H3), 8.11 – 8.06 (m, 2H, H10-H14), 8.01 (dd, J = 8.4, 1.6 Hz, 1H, H4), 7.46 – 7.41 (m, 2H, H11-H13), 3.34 (s, 3H, H15), 1.50 (s, 9H, H18-H19-H20).

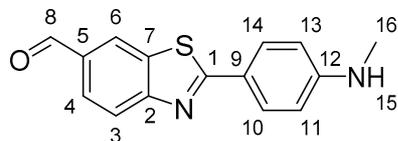
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 191.23 (CHO), 171.05 (C_q), 158.29 (C_q), 154.32 (C_q), 147.20 (C_q), 135.77 (C_q), 133.36 (C_q), 129.55 (C_q), 128.22 (CH), 127.58 (CH), 125.35 (CH), 124.45 (CH), 123.68 (CH), 81.33 (C_q), 37.07 (CH₃), 28.47 (CH₃).

MS-ESI (m/z): 369.00 [M+H]⁺

HR-MS (ESI-TOF) m/z: [M+H]⁺ Calcd for C₂₀H₂₁N₂O₃S 369.1273 Found 369.1263

IR ν_{max}/cm⁻¹: 2980, 1693 (C=O aldehyde), 1593, 1551, 1522, 1477, 1435, 1345, 1251, 1196, 1151, 1104, 972, 835.

Synthesis of **7b**: 4-(6-(formyl)-1,3-benzothiazol-2-yl)-N-methylaniline



Compound **7b**
Chemical Formula: C₁₅H₁₂N₂OS
Molecular Weight: 268

Boc derivative compound **7a** (0.185 g, 0.5 mmol), was dissolved in 10 mL of CH₂Cl₂. The solution was placed in an ice-bath at 0 °C and 10 mL of CF₃COOH was added dropwise. The reaction is stirred for 2 hours. The mixture is basified with NaOH solution, a precipitate is formed and collected by filtration. The crude product was then purified by Flash Chromatography with a mixture of cyclohexane/ethyl acetate to obtain a yellow product (0.114 g, 85%).

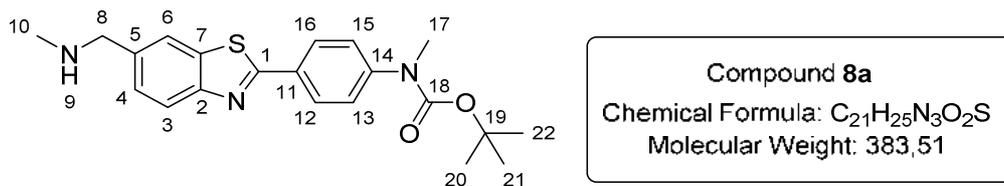
¹**H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.05 (s, 1H, *H8*), 8.62 (dd, *J* = 1.7, 0.6 Hz, 1H, *H6*), 8.03 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, *H3*), 7.96 (dd, *J* = 8.4, 1.6 Hz, 1H, *H4*), 7.91 – 7.85 (m, 2H, *H10-H14*), 6.71 – 6.60 (m, 3H, *H11-H13-H15*), 2.77 (d, *J* = 5.0 Hz, 3H, *H16*).

¹³**C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 191.91 (*Cq*, *C8*), 172.76 (*Cq*, *C1*), 157.99 (*Cq*), 153.22 (*Cq*), 134.35 (*Cq*), 132.23 (*Cq*), 129.28 (*CH*), 127.03 (*CH*), 124.87 (*CH*), 121.95 (*CH*), 119.40 (*Cq*), 111.56 (*CH*), 29.25 (*CH*₃, *C16*).

HR-MS (ESI-TOF): [M+H]⁺ Calcd for C₁₅H₁₃N₂OS 269.0749. Found 269.0754.

IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3395-3364 (NH stretch), 2993-2821 (CHO out of bend), 1675 (C=O aldehyde), 1605-1550, 1472-1331 (CH ring stretch), 1180 (C-N ring stretch).

Synthesis of **8a** tert-butyl methyl(4-(6-[(methylamino)methyl]-1,3-benzothiazol-2-yl)phenyl)carbamate.



tert-butyl methyl(4-(6-[(formyl)methyl]-1,3-benzothiazol-2-yl)phenyl)carbamate (0.110 g, 0.298 mmol) and methylamine (0.8 mL, 2M, 1.49 mmol) were dissolved in distilled MeOH under inert atmosphere and stirred for 1 hour. NaBH₄ (0.068 g, 1.79 mmol) was then added to the mixture, the reaction was deemed complete after 0.5 hours. The crude product was then solubilized in a 1M solution of NaOH (10 mL) and extracted with dichloromethane (2x10 mL). The organic phase was washed with brine, then dried over MgSO₄, and finally filtered with celite. The solvent was removed under vacuum to obtain a taupe color solid (0.041 g, 34%).

Alternative protocol: tert-butyl methyl(4-(6-[(formyl)methyl]-1,3-benzothiazol-2-yl)phenyl)carbamate (0.440 g, 1.19 mmol) was dissolved, with heating, in 10 mL of trifluoroethanol (TFE). The reaction mixture was warmed in a water bath at 40 °C and methylamine (1.2 mL, 2M, 2.38 mmol) was added dropwise. After 0.5h NaBH₄ (0.136 g, 3.57 mmol) is added and the reaction mixture stirred for 2 hours. When the reaction is complete the reaction mixture is filtered to remove solids washing with TFE. The filtrate is concentrated to obtain a brown powder (0.282 g, 62%).

¹**H NMR** (300 MHz, CDCl₃) δ 8.08 – 8.02 (m, 2H, *H12-H16*), 8.00 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, *H3*), 7.87 (s, 1H, *H6*), 7.43 (dd, *J* = 8.4, 1.6 Hz, 1H, *H4*), 7.41 – 7.34 (m, 2H, *H13-H15*), 3.89 (s, 2H, *H8*), 3.32 (s, 3H, *H17*), 2.50 (s, 3H, *H10*), 1.48 (s, 9H, *H20-H21-H22*).

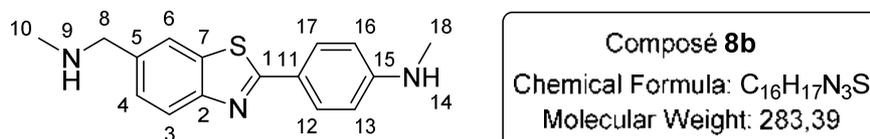
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 167.33 (C_q), 154.46 (C_q), 153.51 (C_q), 146.30 (C_q), 137.77 (C_q), 135.40 (C_q), 130.37 (C_q), 127.82 (CH), 127.02 (CH), 125.43 (CH), 122.99 (CH), 121.00 (CH), 81.09 (C_q), 56.08 (CH_2), 37.15 (CH_3), 36.21 (CH_3), 28.48 (CH_3).

MS-ESI positive (m/z): 384.40 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 353.40 $[\text{M}-\text{CH}_4\text{N}]^+$, 328.40 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_4\text{H}_9]^+$, 284.30 $[\text{M}+2\text{H}-\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_2]^+$, 253.40 $[\text{M}+3\text{H}-\text{C}_9\text{H}_{19}\text{O}_2]^+$.

HRMS (ESI-TOF) m/z: $[\text{M}+\text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ 384.1746 Found 384.1740

IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 2975 (CH stretch), 1698-1605 (C=O stretch), 1571, 1523, 1485-1453-1435-1348 (CH bending), 1315, 1280, 1252, 1151, 1107.

Synthesis of **8b**: N-methyl-4-(6-((methylamino)methyl)benzothiazol-2-yl)aniline



tert-butyl methyl(4-{6-[(methylamino)methyl]-1,3-benzothiazol-2-yl}phenyl)carbamate (0.03 g, 7.82×10^{-5} mole) was added in 5 mL of CH_2Cl_2 and left under stirred agitation to complete dissolution. Then, the mixture is left at 0°C in cold bath in the aim of adding TFA (5 mL) dropwise during half an hour. Then the mixture is left under stirred agitation for 2 hours. At the end, CH_2Cl_2 was removed under vacuo and the mixture is poured in ice and basified with aqueous NaOH to reach pH 12. At this pH, a precipitate is formed in the solution. The solution is then extracted 3 x 40 mL of ethyl acetate. The organic phase is washed by brine and dried over with MgSO_4 and filtrated. The organic phase was then removed under vacuo.

Salt formation: The crude solid (32 mg) was dissolved in MeOH (500 μL), followed by 10 μL of aqueous HCl (titrated 11.37 M). The solution becomes yellow and some precipitate is formed. The whole mixture is centrifuged at 14.000 rpm for 5 minutes. The supernatant is recovered and 10 μL of HCl is added again and the process is repeated until no more precipitate can be formed by adding HCl.

Alternative salt formation: The crude product is dissolved in Et_2O and followed by 2 equivalents of HCl (4M in dioxane) to produce the precipitate. After decantation, the supernatant is removed and the precipitate is washed with Et_2O . This cycle is repeated 5 times to obtain a yellow powder.

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.92 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H_6), 7.86 – 7.77 (m, 3H, $H_3-H_{12}-H_{17}$), 7.46 (dd, $J = 8.6, 1.7$ Hz, 1H, H_4), 7.13 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H_3), 4.19 (s, 2H, H_8), 2.90 (s, 3H, H_{16}), 2.66 (s, 3H, H_{10}).

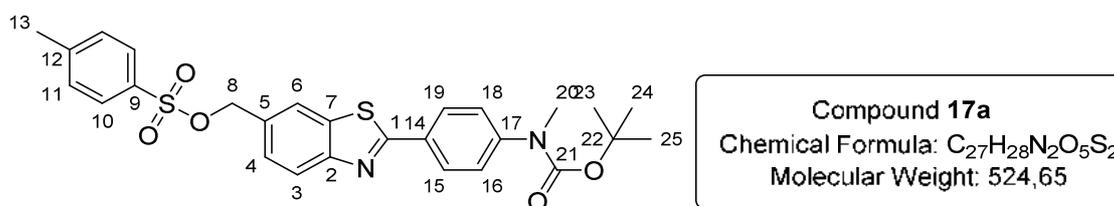
^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ 170.79 (Cq, C1), 151.82 (Cq, C2), 145.33 (Cq, C15), 134.15 (Cq, C5), 129.39 (CH, C12-C17), 128.48 (CH, C4), 128.05 (Cq, C7), 126.72 (Cq, C11), 123.85 (CH, C6), 121.63 (CH, C3), 118.40 (CH, C13-C16), 51.98 (CH_2 , C8), 33.38 (CH_3 , C18), 32.03 (CH_3 , C10).

IR (cm^{-1}) : 3376 (NH stretch), 2923 (CH stretch), 2800-2319 (NH ammonium), 1485-1435 (CH bending), 1407.

EA: Anal. Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{S}_2\cdot 2\text{HCl}$: C, 53.94; H, 5.38; N, 11.79. Found C, 54.09; H, 5.22; N, 11.66

Caractérisation des dérivés autour de la synthèse de l'azoture et 1,2,3 triazole.

Synthesis of **17a**: (2-(4-((tert-butoxycarbonyl)(methyl)amino)phenyl)benzo[d]thiazol-6-yl)methyl 4-methylbenzenesulfonate

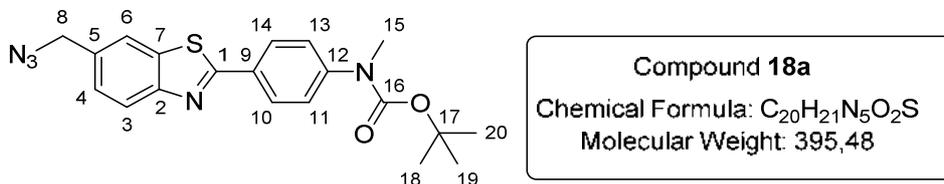


Compound **6a** (0.1 g, 0.27 mmol), K_2CO_3 (0.115 g, 0.82 mmol) and tosyl chloride (0.08 g, 0.41 mmol) with 5 drops of CH_2Cl_2 were mixed in a mortar and were ground together for 20 minutes. Small volumes of CH_2Cl_2 were added during the process to produce a grindable paste. After 20 minutes, an excess of KOH and a few drops of *tert*-butanol were added and ground for 2-5 minutes to neutralize remaining tosyl chloride. The remaining solid is washed with diethyl ether and the filtrate is recovered. The solvent was then removed under vacuo to recover a white powder (0,094 g, 66 %)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.07 – 8.02 (m, 2H, H10), 7.99 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H3), 7.83 – 7.77 (m, 3H), 7.41 (dd, $J = 8.8, 2.3$ Hz, 3H), 7.35 (dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, 1H, H4), 7.31 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 5.20 (s, 2H), 3.33 (s, 3H, H20), 2.42 (s, 3H, H13), 1.49 (s, 9H, H23-H24-H25).

MS (ESI-TOF) $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$ 524.65. Found: 525.33.

Synthesis of **18a**: tert-butyl (4-(6-(azidomethyl)-1,3-benzothiazol-2-yl)phenyl)(methyl)carbamate



Alcohol derivative **6a** (0.200 g, 0.54 mmol) is dissolved in 1 mL of THF with DBU (0.139 mL, 1.2 eq). Diphenylphosphoryl azide DPPA (0.096 mL, 1.2 eq) was then added and the formation of product is checked by TLC (8 Cyclohexane/ 2 Ethyl Acetate) with Vanillin as TLC stain. When the alcohol is consumed, the crude is directly purified by Flash Chromatography to obtain the desired product (0.186 g, 87%).

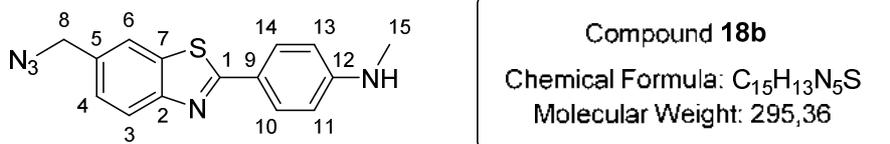
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.15 – 7.95 (m, 3H, *H*₃, *H*₁₀, *H*₁₄), 7.87 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, *H*₆), 7.47 – 7.42 (dd, *J* = 8.46 Hz; *J* = 1.5 Hz, 1H, *H*₄), 7.40 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, *H*₁₁, *H*₁₃), 4.49 (s, 2H, *H*₈), 3.33 (s, 3H, *H*₁₅), 1.49 (s, 9H, *H*₁₈, *H*₁₉, *H*₂₀).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168.32 (*C*_q), 154.39 (*C*_q), 154.17 (*C*_q), 146.53 (*C*_q), 135.62 (*C*_q), 132.71 (*C*_q), 130.00 (*C*_q), 127.90 (*CH*), 126.80 (*CH*), 125.39 (*CH*), 123.48 (*CH*), 121.31 (*CH*), 81.14 (*C*_q), 54.86 (*CH*₂), 37.11 (*CH*₃), 28.46 (*CH*₃).

HR-MS (ESI-TOF) : *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₂₀H₂₁N₅O₂S 396.1494 ; Found 396.1486.

IR (cm⁻¹): 2981 (CH stretch), 2109-2065 (asymmetric stretch N₃), 1694 (C=O stretch), 1602-1339 (stretch C=C aromatic ring), 1266-1231 (symmetric stretch N₃), 1150 (stretch N-C-O).

Synthesis of **18b**: 4-(6-(azidomethyl)-1,3-benzothiazol-2-yl)-N-methylaniline



18b (0.05 g; 0.126 mmol) is dissolved in CH₂Cl₂ (0.5 mL) and cooled in an ice bath at 0°C, CF₃COOH (0.5 mL) is added dropwise and the reaction is stirred for 2 hours. At the end of the reaction, the mixture is neutralized with a solution of NH₄OH (aq) and then extracted with CH₂Cl₂. The organic phase is dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. The solid is then purified by Flash Chromatography to obtain a yellow powder (0.046 g; 80%)

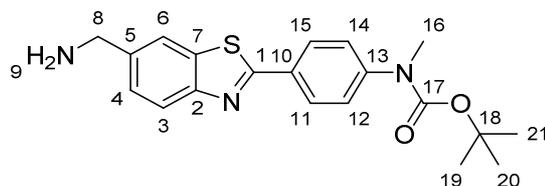
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.95 (m, 3H, *H*₃-*H*₁₀-*H*₁₄), 7.80 (s, 1H, *H*₆), 7.38 (dd, *J* = 8.3, 1.1 Hz, 1H, *H*₄), 6.65 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, *H*₁₁-*H*₁₃), 4.46 (s, 2H, *H*₈), 2.92 (s, 3H, *H*₁₅).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 169.71 (Cq), 151.86 (Cq), 135.12 (Cq), 131.73 (Cq), 130.00 (Cq), 129.33 (CH), 126.54 (CH), 122.63 (CH), 122.43 (CH), 121.19 (CH), 112.19 (CH), 54.98 (CH_2), 30.47 (CH_3).

HR-MS (ESI-TOF) : m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{S}$ 296.0970 ; Found 296.0970.

IR (cm^{-1}) : 3299 (N-H stretch), 3038 (C-H ring stretch) , 2904 (CH_3 stretch), 2094 (N=N=N, stretch), 1602-1480-1414 (C=C ring stretch), 1334-1170 (C-N ring stretch).

Synthesis of **19a**: tert-butyl (4-(6-(aminomethyl)benzothiazol-2-yl)phenyl)(methyl)carbamate



Compound 19a
Chemical Formula: $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$
Molecular Weight: 369,48

The azide derivative **18a** (0.05 g ; 0.126 mmol) and Pd/C (0.005 g) were added in a 20 mL round bottom flask followed by EtOH (1 mL). The system is then purged with Argon, followed by a H_2 purge, the reaction mixture is then left under a H_2 balloon. The reaction mixture was stirred for 5h after which, the mixture was then filtrated and washed with EtOH, and the solvent was removed under vacuo. The product was then purified by Flash Chromatography to obtain a grey product (0.03 g, 64 %).

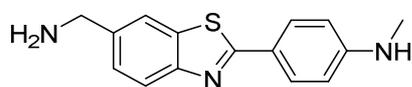
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.02 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H_{11-H15}), 7.99 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_3), 7.86 (s, 1H, H_6), 7.43 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H_4), 7.37 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H_{12-H14}), 4.01 (s, 2H, H_8), 3.32 (s, 3H, H_{16}), 2.20 (s (broad), 2H, H_9), 1.48 (s, 9H; $H_{19-H20-H21}$).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 167.47 (Cq), 154.44 (Cq), 153.50 (Cq), 146.34 (Cq), 135.53 (Cq), 130.28 (Cq), 127.82 (CH), 126.27 (CH), 125.41 (CH), 123.19 (CH), 120.20 (CH), 81.10 (Cq), 46.17 (CH_2), 37.15 (CH_3), 28.48 (CH_3).

HR-MS (ESI-TOF) $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$: 370.1589. Found 370.1593.

IR (cm^{-1}): 3357 (broad), 2975-2927 (CH stretch), 1697 (C=O stretch), 1605, 1485-1417 (C=C ring), 1345, 1149 (C-O), 1106 (C-N).

Synthesis of **19b**: 4-(6-(aminomethyl)benzo[d]thiazol-2-yl)-N-methylaniline



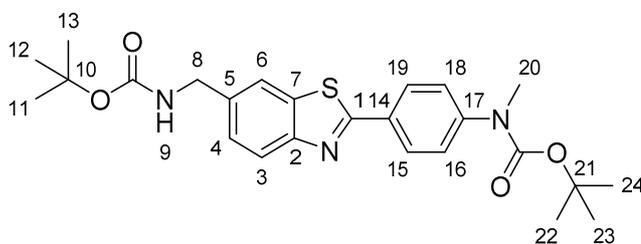
Compound 19b
 Chemical Formula: C₁₅H₁₅N₃S
 Molecular Weight: 269,37

Boc protected compound **19c** (0.05 g, 0.0426 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (1 mL). CF₃COOH (1 mL) was then added dropwise at 0 °C and the reaction was left for 2 hours. At the end, the reaction was basified with solution of NH₄OH and the product was purified by Flash Chromatography to obtain a yellow product (0.023 g, 80 %).

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ 7.92 – 7.89 (m, 1H), 7.89 – 7.86 (m, 2H), 7.84 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.68 (s, 2H), 2.83 (s, 3H)

HR-MS (ESI-TOF) : Calcd for C₁₅H₁₅N₃S : 270.1065. Found: 270.1067

Synthesis of **19c**: tert-butyl (4-(6-(((tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)benzothiazol-2-yl)phenyl)(methyl)carbamate



Compound 19c
 Chemical Formula: C₂₅H₃₁N₃O₄S
 Molecular Weight: 469,60

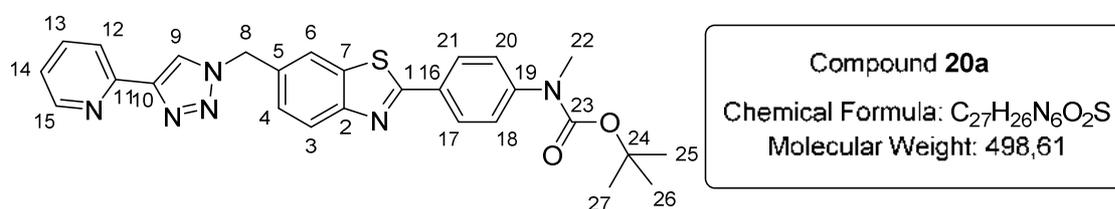
Azide compound **18a** (0.2 g; 0.51 mmol) and PPh₃ (0.561 mmol) were dissolved in dry THF and the reaction was followed by TLC with a mixture of Cyclohexane/ethyl acetate (8/2). When complete conversion of the azide was confirmed water was added and the reaction stirred for 10 min. Boc₂O (0.223 g; 1.02 mmol) and K₂CO₃ (0.140 g; 1.02 mmol) were then added and the reaction followed by TLC with a mixture of cyclohexane/ethyl acetate (6/4) until complete conversion of amine. The raw product is then purified by Flash Chromatography to obtain a white product (0.12 g, 50 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.04 – 7.99 (m, 2H, H₁₅-H₁₉), 7.97 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₃), 7.81 – 7.74 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, H₆), 7.37 (m, 3H, H₄-H₁₆-H₁₈), 5.08 (s, 1H, H₉), 4.41 (s, 2H, H₈), 3.30 (s, 3H, H₂₀), 1.47 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.46 (s, 9H, CH₃ Boc).

HR-MS (CI-TOF) $[M+H]^+$: Calcd for $C_{25}H_{32}N_3O_4S$: 470.2114. Found 470.2096.

IR (cm^{-1}): 3348, 2976, 2929, 1688, 1606, 1522-1471, 1364-1349, 1150, 1107.

Synthesis of **20a**: tert-butyl methyl[4-(6-{[4-(pyridin-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-1,3-benzothiazol-2-yl)phenyl]carbamate



Azide derivative **18a** (0.05 g, 0.126 mmol) and ethynylpyridine (0.015 g, 0.138 mmol) were dissolved in iPrOH (1 mL). $CuSO_4$ pentahydrate (0.002 g, 0.063 mmol) and sodium ascorbate (0.012 g, 0.63 mmol) were dissolved in distilled water (1 mL). Add dropwise the aqueous solution into the iPrOH mixture and the reaction is stirred for 6 hours, followed by TLC with a mixture of Cyclohexane/Ethyl Acetate (8/2). At the end of the reaction, the mixture is washed with an aqueous solution of EDTA (2%) and then extracted with ethyl acetate (3x10 mL). The organic phase is washed with brine, then dried over Na_2SO_4 and filtered. The solvent was then removed under vacuo to obtain a white-brown product (0.04 g, 64%).

Protocol for producing crystal (compound alone): 10 mg of product was dissolved, with heating, in acetonitrile (2 mL). The hot solution was filtered through a 0.2 μm PTFE filter into a test-tube, the test-tube is capped and placed in a water bath at 90 °C after which it was cooled down to room temperature to produce brown crystals.

Protocol for producing crystal (complex with $Cu(II)Cl_2$): 15 mg of product was dissolved in acetonitrile (1 mL). $CuCl_2$ (1.1 eq.) was dissolved in a mixture of ACN/ H_2O (6/3). The solutions were mixed and heated at 80°C, additional acetonitrile was added to dissolve all solids (total volume ~10 mL). The mixture was cooled to room temperature to precipitate the crude complex. The supernatant was removed and the precipitate was dissolved in a minimum volume of acetonitrile, then heated until complete dissolution before being filtered through a 0.2 μm PTFE filter into a 2 mL vial. The 2 mL vial was placed in a larger chamber to grow crystals by slow evaporation overnight to producing pale green crystals.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.54 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H, *H15*), 8.24 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H, *H12*), 8.22 (s, 1H), 8.07 – 7.99 (m, 4H, H), 7.86 (s, 1H, *H6*), 7.82 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, *H13*), 7.46 (dd, $J = 8.4$,

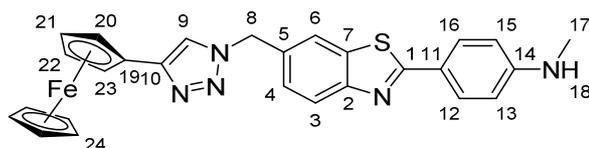
1.8 Hz, 1H, *H4*), 7.24 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, *H14*), 5.73 (s, 2H, *H8*), 3.32 (s, 3H, *H22*), 1.48 (s, 9H, *H25-H26-H27*).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 168.85 (Cq, *C1*), 154.55 (Cq, *C2*), 154.39 (Cq, *C23*), 149.81 (Cq, *C11*), 148.80 (CH, *C15*), 148.25 (Cq, *C10*), 146.67 (Cq, *C19*), 137.79 (CH, *C13*), 135.97 (Cq, *C7*), 131.48 (Cq, *C5*), 129.89 (Cq, *C16*), 127.98 (CH, *C17,C21*), 126.73 (CH, *C4*), 125.40 (CH, *C18, C20*), 123.83 (CH, *C3*), 123.21 (CH, *C14*), 122.60 (CH, *C12*), 121.65 (CH, *C6*), 120.70 (CH, *C9*), 81.18 (Cq, *C24*), 54.42 (CH₂, *C8*), 37.12 (CH₃, *C22*), 28.47 (CH₃, *C25-C27*).

HR-MS (ESI-TOF) [M+H]⁺ : Calcd for C₂₇H₂₇N₆O₂S : 499,1916. Found : 499.1912.

IR (cm⁻¹): 3128, 3000-2967 (CH stretch), 1684 (C=O), 1605, 1487-1421 (C=C ring), 1150 (C-O), 1106 (C-N).

Synthèse du **21b** : 4-(6-(Ferrocene-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-1,3-benzothiazol-2-yl)N-methylaniline



Compound 21b
Chemical Formula: C₂₇H₂₃FeN₅S
Molecular Weight: 505.42

Azide derivative **18a** (0.027 g, 0.0914 mmol) and ethynyl-ferrocene (0.021 g, 0.11 mmol) are dissolved in THF (1 mL). CuSO₄ (0.0011 g, 0.0045 mmol) and sodium ascorbate (0.009 g, 0.045 mmol) are dissolved in water (1 mL), with sonication. The aqueous solution is dropwise added to the reaction mixture and left stirring overnight. The formation of the product can be followed by TLC (cyclohexane/Ethyl acetate; 8/2). After complete conversion, the reaction mixture is extracted with ethyl acetate 3 times. The organic phases were washed with brine and then dried over Na₂SO₄. The mixture was then filtered and the solvent was removed under vacuum to obtain a brown powder (0.03 g, 65 %)

¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆) δ 8.05 (s, 1H, *H9*), 7.96 (dd, *J* = 1.8, 0.7 Hz, 1H, *H6*), 7.92 – 7.86 (m, 3H, *H3-H12-H16*), 7.47 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, 1H, *H4*), 6.75 – 6.68 (m, 2H, *H13-H15*), 5.75 (s, 2H, *H8*), 4.72 (t, *J* = 1.9 Hz, 2H, *H20-H23*), 4.26 (t, *J* = 1.9 Hz, 2H, *H21-H22*), 4.01 (s, 5H, *H24*), 2.88 (d, *J* = 5.1 Hz, 3H, *H17*).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone-*d*₆) δ 170.03 (Cq, *C1*), 155.35 (Cq, *C2*), 153.73 (Cq, *C14*), 147.30 (Cq, *C10*), 135.70 (Cq, *C7*), 133.47 (Cq, *C5*), 129.76 (*C12-C16*), 127.04 (CH, *C4*), 123.09 (CH, *C3*), 122.01 (Cq, *C11*), 121.97 (CH, *C6*), 120.70 (CH, *C9*), 112.52 (CH, *C13-C15*), 77.32 (Cq, *C19*), 70.16 (CH, *C24*), 69.10 (CH, *C21-C22*), 67.34 (CH, *C20-C23*), 54.04 (CH₂, *C8*), 29.84 (CH₃, *C17*)

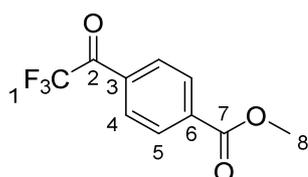
HR-MS (ESI-TOF) m/z: [M+H]⁺ Calcd for C₂₇H₂₃FeN₅S 505.1024 Found 505.1039

IR (cm⁻¹): 3299 (NH stretch), 3081 (CH ring stretch), 2922 (CH stretch), 1607-1482(C=C stretch), 1413 (ring deformation), 1181 (C-N ring stretch), 1106 (CH deformation), 817 (CH out-of-bend), 484 (ring tilt), 476 (Fe-ring stretch).

Caractérisation des dérivés de la diazirine: composés X1 à 5'et des composés 9a/b.

This part will present all procedures to obtain compound **5'**. The procedures to obtain all products up to **5'** below are based on Jean-Luc Beunard's thesis.[1] ¹H NMR spectra of compounds are presented here, and are similar to literature.[1, 2]

Synthesis of **X2**: methyl 4-(trifluoroacetyl)benzoate

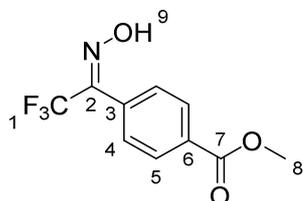


Compound X2
 Chemical Formula: C₁₀H₇F₃O₃
 Molecular Weight: 232,16

At 0 °C, acetyl chloride (8.4 mL, 118 mmol) was dropwise added into methanol, and stirred at 0°C for 15 min. 4-(Trifluoroacetyl)benzoic acid **X1** (1 g, 4.6 mmol) was then added and the mixture stirred overnight. Methanol was removed under reduced pressure and the crude dissolved in CH₂Cl₂ then the organic phase is washed with 1M HCl and dried over MgSO₄. The mixture is filtrated and the solvent was removed under reduced pressure to obtain a white solid (0.98 g ; 91 %)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.20 (d, J=8.3 Hz, 2H, H4), 8.13 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H5), 3.98 (s, 3H, H8).

Synthesis of **X3**: methyl 4-[2,2,2-trifluoro-N-hydroxyethanimidoyl]benzoate



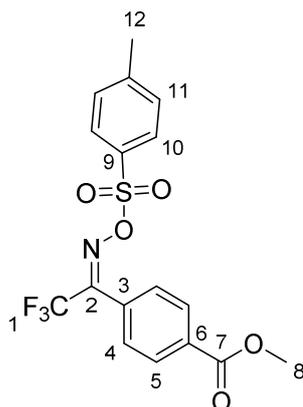
Compound X3
 Chemical Formula: C₁₀H₈F₃NO₃
 Molecular Weight: 247,17

Methyl 4-(trifluoroacetyl)benzoate **X2** (0.980 g, 4.2 mmol) and hydroxylamine (0.882 g, 12.6 mmol) were dissolved in pyridine (30 mL). The mixture was stirred at reflux overnight. The mixture was then treated with concentrated HCl to pH 1. The mixture was extracted with

dichloromethane. The organic phase was washed with brine, dried over MgSO_4 to obtain a colourless oil (1.14 g, 83%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.96 (s (broad), 1H, *H9*), 8.14 (d, $J = 8.3$, 2H, *H4*), 7.58 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, *H5*), 3.98 (s, 3H, *H8*).

Synthesis of **X4**: methyl 4-(2,2,2-trifluoro-N-[(4-methylbenzene-1-sulfonyl)oxy]ethanimidoyl)benzoate

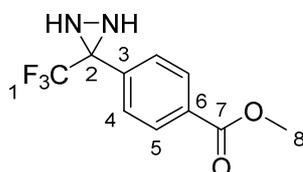
Compound **X4**

Chemical Formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{NO}_5\text{S}$
Molecular Weight: 401,36

Methyl 4-[2,2,2-trifluoro-N-hydroxyethanimidoyl]benzoate **X3** (0.570 g, 2,3 mmol), DMAP (0.200 g, 16.1 mmol), and the triethylamine (0.354 mL, $d = 0.729$, 2.53 mmol) were dissolved in dichloromethane. The mixture was cooled in an ice bath at 0°C and 4-Toluenesulfonyl chloride (0.490 g, 2.53 mmol) was added. The mixture was stirred at 0°C for the first 30 minutes and then 30 min at RT. The mixture was then treated with water and extracted with CH_2Cl_2 . The product was purified with silica column to obtain a yellow paste (0.690 g, 90%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.18 – 8.11 (m, 2H, *H4*), 7.92 – 7.83 (m, 2H, *H5*), 7.45 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, *H10*), 7.39 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, *H11*), 3.95 (s, 3H, *H8*), 2.48 (s, 3H, *H12*).

Synthesis of **5'**: 4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diaziridin-3-yl]benzoate.

Compound **5'**

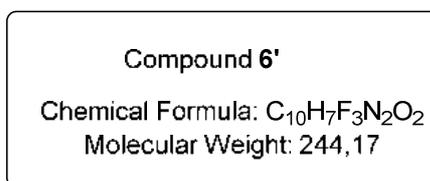
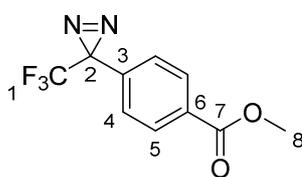
Chemical Formula: $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$
Molecular Weight: 246,19

Methyl 4-((1Z)-2,2,2-trifluoro-N-[(4-methylbenzene-1-sulfonyl)oxy]ethanimidoyl)benzoate **X4** (0.690 g, 1.7 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (12 mL) and the mixture was cooled to -50°C . Ammonia gas was condensed on a cold finger to obtain ~ 20 mL which was then added to the reaction mixture which was stirred for 3 hours at -50°C . After the reaction was complete excess

ammonia was released by opening the flask. The solvent was then removed under reduced pressure and the product was purified by flash chromatography to obtain a white solid (0.412 g, 97%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform- d) δ 8.10 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H_4), 7.71 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H_5), 3.94 (s, 3H, H_8). 2.86 (d, J = 8.9 Hz, 1H, NH), 2.26 (d, J = 8.9 Hz, 1H, NH).

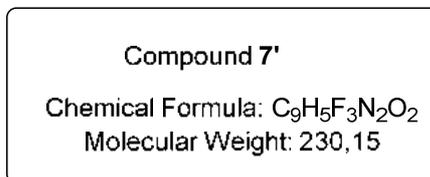
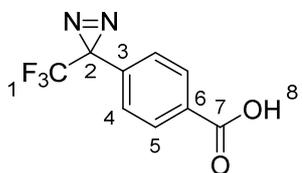
Synthesis of **6'**: methyl 4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diaziren-3-yl]benzoate.



Methyl 4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diaziridin-3-yl]benzoate **5'** (0.518 g, 2.1 mmol) and trimethylamine (1.67 mL, $d=0.726$, 12.6 mmol) were dissolved in MeOH (50 mL). The mixture was placed in an ice bath at 0°C and iodine (0.609 g, 2.52 mmol) was added portionwise to the solution at 0°C . After the addition, the mixture was allowed to warm to RT during 20 to 30 min protected from light. After the reaction was complete, the mixture was washed with aqueous solution of sodium thiosulfate (5%, 40 mL). The solution was extracted with DCM (2x50 mL). The organic phase was washed with brine, dried over with MgSO_4 , filtered, and the solvent was removed under vacuum to obtain a white powder (0.379 g, 78%).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.14 – 7.86 (m, 2H, H_4), 7.27 – 7.07 (m, 2H, H_5), 3.90 (s, 3H, H_8).

Synthesis of **7'**: 4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diaziren-3-yl]benzoic acid.

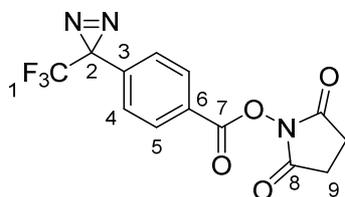


The following protocol must be done under protection from light. Methyl 4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diaziren-3-yl]benzoate **6'** (0.379 g, 1.6 mmol) was dissolved in methanol (20 mL) and the solution was poured in an 1M aqueous solution of NaOH (20 mL). The mixture was stirred for 5 hours at RT. The mixture was then extracted with dichloromethane (2x20 mL). The aqueous phase was then acidified with an 1M-aqueous solution of HCl to reach pH 3. The mixture

was then extracted with dichloromethane (2x40 mL). The organic phase was washed with brine (the solution turned into red/orange) and dried over with MgSO₄, filtered and the solvent was removed under reduced pressure to obtain a white solid (0.294 g, 80%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.31 – 7.96 (m, 2H, *H*4), 7.29 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, *H*5).

Synthesis of **8'**: 1-((4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diaziren-3-yl]benzoyl)oxy)pyrrolidine-2,5-dione.



Compound **8'**

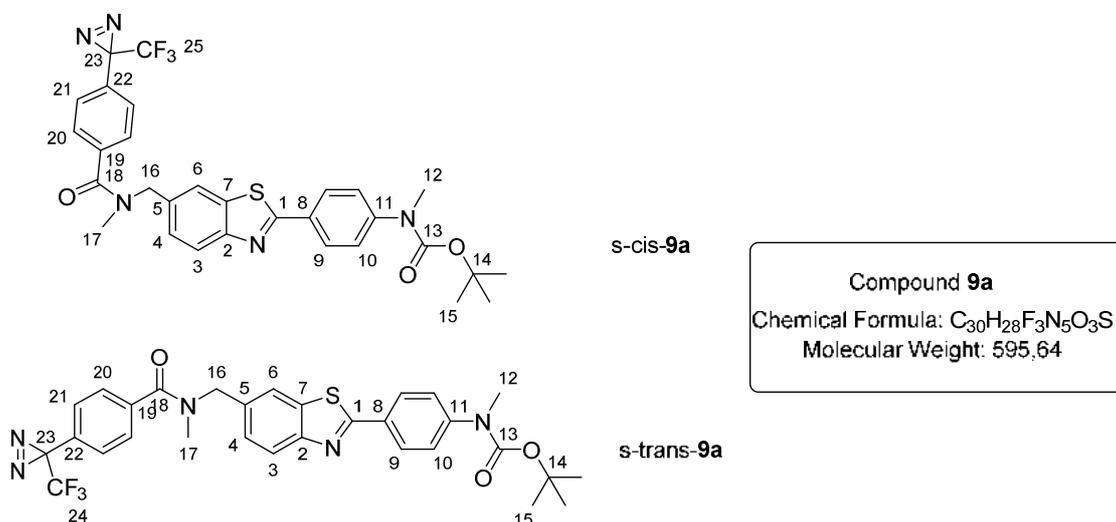
Chemical Formula: C₁₃H₈F₃N₃O₄
Molecular Weight: 327,22

The following protocol must be done under protection from light. 4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diaziren-3-yl]benzoic acid **7'** (0.268 g, 1.1 mmol) was dissolved in anhydrous THF (50 mL). The solution was placed in an ice bath at 0°C and EDC (0.253 mL, d = 0.877, 1.43 mmol), DMAP (0.027 g, 0.22 mmol) and N-hydroxysuccinimide (0.165 g, 1.43 mmol) were sequentially added to the solution. The reaction was allowed to warm to room temperature and stirred overnight. THF was then removed under reduced pressure and a 40 mL-mixture of DCM/H₂O (1:1) was added to the crude product. The mixture was then extracted with DCM (1x20 mL). The organic phase was washed with brine then dried over with MgSO₄, the solvent was finally removed under reduced pressure. The product was then purified by Flash Chromatography to obtain a white powder (0.200 g, 56%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.19 – 8.09 (m, 2H, *H*4), 7.31 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, *H*5), 2.89 (s, 4H, *H*9).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ -64.84.

Synthesis of **9a**: tert-butyl methyl (4-{6-[(methyl{4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diaziren-3-yl]benzoyl}amino)methyl]-1,3-benzothiazol-2-yl}phenyl)carbamate



Diazirine derivative **8'** (0.524 g, 1.6 mmol) the BTA derivative **8a** (0.630 g, 1.6 mmol) were dissolved in anhydrous DCM (25 mL) and the mixture was stirred overnight at RT. The mixture was then washed with water and the aqueous and organic phase were separated, the organic phase was then washed with a 2M aqueous solution of HCl then with an aqueous saturated solution of NaHCO₃. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The product was purified by column chromatography to obtain a yellow powder (0.338 g, 36 %).

¹H and ¹³C spectra were recorded at 253 K with Bruker Avance 500 equipped with a 5 mm triple resonance inverse Z-gradient probe (TBI, 1H, 31P, BB).

Assignment for NMR s-trans-9a:

¹H NMR (500 MHz, Acetonitrile-*d*₃) δ 8.07 – 8.03 (m, 2H, *H*₉), 7.99 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, *H*₃), 7.98 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, *H*₆), 7.60 – 7.55 (m, 2H, *H*₂₀), 7.50 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H, *H*₄), 7.44 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, *H*₁₀), 7.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, *H*₂₁), 4.81 (s, 2H, *H*₁₆), 3.26 (s, 3H, *H*₁₂), 2.83 (s, 3H, *H*₁₇); 1.44 (s, 9H, *H*₁₅).

¹³C NMR (126 MHz, Acetonitrile-*d*₃) δ 170.57 (Cq, C₁₈), 168.21 (Cq, C₁), 154.56 (Cq, C₁₃), 154.10 (Cq, C₂), 147.21 (Cq, C₁₁), 138.77 (Cq, C₁₉), 135.97 (Cq, C₅), 135.67 (Cq, C₇), 130.28 (Cq, C₂₂), 130.26 (Cq, C₈), 128.48 (CH, C₂₀), 127.38 (CH, C₄), 127.15 (CH, C₂₁), 126.22 (CH, C₉-C₁₀), 123.60, 123.52 (CH, C₃), 121.64 (CH, C₆), 120.68, 118.43, 81.12 (Cq, C₁₄), 50.73 (CH₂, C₁₆), 37.37 (CH₃, C₁₇), 37.08 (CH₃, C₁₂), 29.16 (Cq, C₂₃), 28.08 (CH₃, C₁₅). CF₃ is not assigned.

Assignment for NMR s-cis-9a:

¹H NMR (500 MHz, Acetonitrile-*d*₃) δ 8.07 – 8.02 (m, 2H, *H*9), 7.99 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, *H*3), 7.88 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, *H*6), 7.55 – 7.51 (m, 2H, *H*20), 7.44 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, *H*10), 7.27 (dd, *J* = 8.3, 1.7 Hz, 1H, *H*4), 7.24 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, *H*21), 4.54 (s, 2H, *H*16), 3.26 (s, 3H, *H*12), 2.96 (s, 3H, *H*17), 1.44 (s, 9H, *H*15).

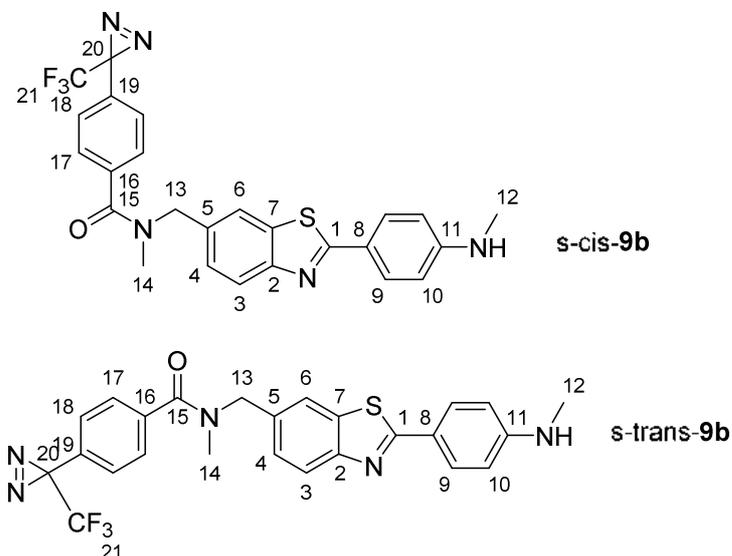
¹³C NMR (126 MHz, Acetonitrile-*d*₃) δ 171.10 (Cq, C18), 168.04 (Cq, C1), 154.15 (Cq, C2), 147.17 (Cq, C11), 138.88 (Cq, C19), 135.21 (Cq, C7), 130.26 (Cq, C22), 128.07 (CH, C9), 127.99 (CH, C20), 127.30 (CH, C21), 126.30 (CH, C4), 126.14 (CH, H10), 123.60 (CH, C3), 123.52, 121.64, 120.68 (CH, C6), 118.43, 81.12 (Cq, C14), 55.01 (CH₂, C16), 37.08 (CH₃, C12), 33.20 (CH₃, C17), 28.84 (Cq, C24), (CH₃, C15). CF₃ was not assigned.

HR-MS-ESI (m/z): m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₃₀H₂₉N₅O₃F₃ 596.1943; Found 596.1957.

¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -65.09.

IR: 2985-2923 (C-H stretch), 1699 (C=O stretch), 1627 (C=O stretch), 1476-1435 (C=C ring), 1356, 1150 (C-O), 1108 (C-N).

Synthesis of **9b**: N-methyl-N-({2-[4-(methylamino)phenyl]-1,3-benzothiazol-6-yl}methyl)-4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diaziren-3-yl]benzamide.



Compound 9b
Chemical Formula: C₂₅H₂₀F₃N₅OS
Molecular Weight: 495,52

Protocol: The diazirine-BTA-Boc **9a** (0.118 g, 0.198 mmol) was dissolved in a mixture of DCM/TFA (1:1) (40 mL) at 0°C and the solution was vigorously stirred for 2 hours at 0°C. The mixture was then neutralized with solid NaOH then with a saturated aqueous NaHCO₃ solution to reach pH 8. Then the mixture was extracted with DCM (2x20 mL), dried over MgSO₄, then filtered

and finally the solvent was removed under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography to recover a yellow solid (0.050 g, 51%).

Assignement for s-trans-**9b**

¹H NMR (500 MHz, Acetonitrile-*d*₃) δ 7.91 – 7.85 (m, 4H, *H*3-*H*6-*H*9), 7.59 – 7.55 (m, 2H, *H*17), 7.44 (dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz, 1H, *H*4), 7.30 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, *H*18), 6.65 (dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, 2H, *H*10), 4.78 (s, 2H, *H*13), 2.81 (s, 3H, *H*14), 2.80 (s, 3H, *H*12).

Assignement for s-cis-**9b**

¹H NMR (500 MHz, Acetonitrile-*d*₃) δ 7.91 – 7.85 (m, 2H, *H*9), 7.78 (s, 1H, *H*6), 7.55 – 7.51 (m, 2H, *H*17), 7.23 (d, *J* = 8.4 Hz, *H*3, *H*18), 7.21, dd, *J* = 8.4, 1.7 Hz, *H*4), 6.65 (dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, 2H, *H*10), 4.51 (s, 2H, *H*13), 2.95 (s, 3H, *H*14), 2.80 (s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, Acetonitrile-*d*₃) δ 170.89 (Cq), 170.37 (Cq), 153.10 (Cq), 138.72 (Cq), 138.61 (Cq), 134.51 (Cq), 133.98 (Cq), 130.09 (Cq), 130.06 (CH), 129.45 (CH), 128.29 (CH), 127.82 (CH), 127.11 (CH), 126.97 (CH), 125.84 (CH), 122.29 (CH), 122.15 (CH), 121.32 (CH), 120.32 (CH), 112.18 (CH), 54.82 (CH₂), 50.52 (CH₂), 37.14 (CH₃), 32.97 (CH₃), 29.72 (CH₃)

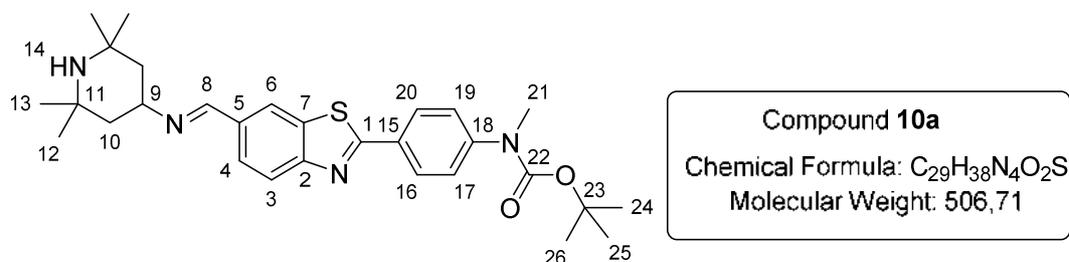
¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ -65.10.

HRMS-ESI (m/z) : [M+H]⁺ Calcd for C₂₅H₂₁N₅O₂F₃S 496.1419. Found 496.1420.

IR: 3340 (N-H stretch), 2925-2853 (C-H stretch), 1603 (C=O stretch), 1485-1455 (C=C ring), 1398, 1178 (C-N), 1150 (C-N).

Caractérisation des composés autour de la synthèse des dérivés du TEMPO

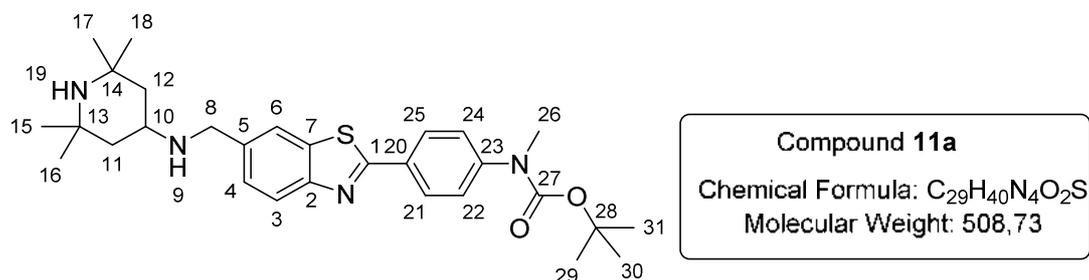
Synthesis of **10a** : tert-butyl methyl(4-(6-(((2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)imino)methyl)benzo[d]thiazol-2-yl)phenyl)carbamate



In 50-mL flask aldehyde **7a** (0.100g, 0.27 mmol) and 4-amino-TMP (0.085 g, 0.54 mmol) were dissolved in distilled MeOH under inert atmosphere. The reaction mixture is heated to 80 °C and the mixture is stirred for ~1 hour to form the imine. The mixture is then cooled down and NaBH₃CN (0.034 g, 0.54 mmol) is added under inert atmosphere and the mixture stirred for 3 days. The mixture is neutralized with an aqueous saturated NH₄Cl solution (carefully cause of the risk of producing HCN). Then the organic phase was extracted with of CH₂Cl₂ (2x250 mL). Organic phases are washed with brine, and dried over MgSO₄. The mixture is filtered and the solvent is removed under reduced pressure to obtain a slightly brown powder (0.112 g, 83%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.50 (s, 1H, *H8*), 8.31 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, *H6*), 8.09 – 8.03 (m, 3H, *H3*, *H16*-*H20*), 7.83 (dd, *J* = 8.5, 1.6 Hz, 1H, *H4*), 7.43 – 7.37 (m, 2H, *H17*-*H19*), 3.84 – 3.66 (tt, *J* = 11.4 Hz, *J* = 4.5 Hz, 1H, *H9*), 3.33 (s, 3H, *H21*), 1.75 (dd, *J* = 13.0, 4.0 Hz, 2H, *H10_{ax}*), 1.49 (s, 9H, *H24*-*H25*-*H26*), 1.37 – 1.27 (m, 14H, *H12*-*H13*, *H10_{eq}*).

Synthesis of **11a**: tert-butyl methyl(4-(6-(((2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)amino)methyl)benzothiazol-2-yl)phenyl)carbamate



Compound **10a** (0.100 g, 0.197 mmol) and NaBH₄ (0.022 g, 0.591 mmol) are dissolved in MeOH and stirred for 1h. The mixture is extracted 2 times with CH₂Cl₂, the organic phase is dried over MgSO₄. The solution is filtered and the solvent was removed under reduced pressure to obtain a beige product (0.085 g, 85%).

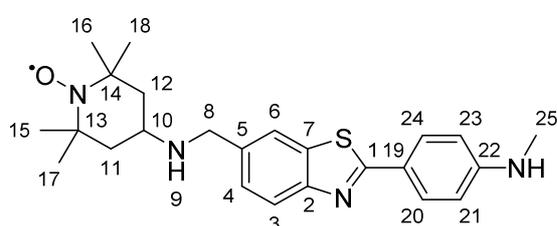
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.07 – 8.01 (m, 2H, *H21*-*H25*), 7.99 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, *H3*), 7.89 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, *H6*), 7.44 (dd, *J* = 8.4, 1.6 Hz, 1H, *H4*), 7.41 – 7.34 (m, 2H, *H22*-*H24*), 3.98 (s, 2H, *H8*), 3.32 (s, 3H, *H26*), 3.03 (tt, *J* = 11.5, 3.7 Hz, 1H, *H10_{ax}*), 1.94 (dd, *J* = 12.9, 3.5 Hz, 2H, *H11*-*H12 equatorial*), 1.48 (s, 9H, *H29*-*H30*-*H31*), 1.23 (s, 12H, *H15*-*H16*-*H17*-*H18*), 1.04 (t (broad), *J* = 12.5 Hz, 2H, *H11*-*H12 axial*).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.33 (Cq), 154.42 (Cq), 153.46 (Cq), 146.29 (Cq), 138.15 (Cq), 135.43 (Cq), 130.31 (Cq), 127.78 (CH), 126.94 (CH), 125.39 (CH), 123.00 (CH), 120.91 (CH), 81.06 (Cq), 50.80 (CH₂), 49.42 (CH), 45.84 (CH₂), 37.12 (CH₃), 34.56 (CH₃), 28.46 (CH₃).

HR-MS (ESI-TOF) (m/z): $[M+H]^+$ Calcd for $C_{29}H_{41}N_4O_2S$ 509.2950. Found 509.2933.

IR (cm^{-1}): 3300 (N-H stretch), 2970-2925 (C-H stretch), 1688 (C=O stretch), 1608-1575-1485-1455 (C=C ring), 1365-1350, 1282, 1149-1105 (C-O ester stretch), 975.

Synthesis of **12b**: 4-(6-((2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)oxylaminométhyl)benzothiazol-2-yl)-N-méthylaniline



Composé 12b
Chemical Formula: $C_{24}H_{31}N_4OS^*$
Molecular Weight: 423,60

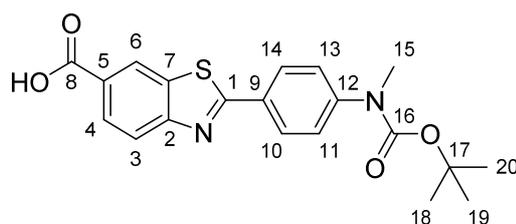
Aldehyde compound **7b** (0.055 g; 0.205 mmol) was dissolved in CF_3CH_2OH (1 mL) and stirred until complete dissolution (~5 minutes). 4-amino-TEMPO (0.039 g; 2.26 mmol) was added and the reaction is stirred for ~1h. $NaBH_4$ (0.009 g; 2.46 mmol) is then added and reaction progress was followed by TLC. After conversion of the starting material, the crude product was purified by flash chromatography to obtain a red powder (0.009 g, 10%).

1H NMR was recorded for the free radical derivative, missing signals are a result of the paramagnetic effect.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.06 – 7.81 (m, 4H, H), 7.44 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, H3), 6.67 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 4.86 (s, 1H), 4.11 (s, 2H), 3.77 – 3.71 (m, 1H), 3.61 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 2.94 (s, 3H), 2.31 – 1.10 (m, 12H).

HR-MS (ESI-TOF) (m/z): $[M+H]^+$ Calcd for $C_{24}H_{32}N_4OS^*$ 424.2297. Found 424.2294.

Synthesis of **13a**: 2-(4-((tert-butoxycarbonyl)(methyl)amino)phenyl)benzo[d]thiazole-6-carboxylic acid



Compound 13a
Chemical Formula: $C_{20}H_{20}N_2O_4S$
Molecular Weight: 384,45

Ester compound **5a** (0.512 g, 1.2 mmol) is dissolved, with heating, in a mixture of CH₃CN/MeOH. A large excess of KOH (over 12 mmol) is then added and the reaction mixture is stirred overnight. When the reaction is complete, HCl is added to induce the formation of a precipitate, which is quickly filtered to prevent deprotection of the carbamate. The precipitate is then washed with water and azeotropically dried with CH₃CN to obtain a slightly yellow powder (0.482 g, 99%).

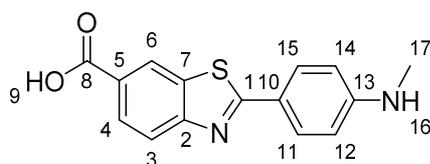
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.71 (s, 1H, *H*6), 8.08 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H, *H*3-*H*4-*H*10-*H*14), 7.54 – 7.50 (m, 2H, *H*11-*H*13), 3.26 (s, 3H, *H*15), 1.44 (s, 9H, *H*18-*H*19-*H*20).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.58 (*C*_q), 155.85 (*C*_q), 153.34 (*C*_q), 146.40 (*C*_q), 128.88 (*C*_q), 127.57 (*CH*), 125.34 (*CH*), 122.26 (*CH*), 80.38 (*C*_q), 36.59(*CH*₃), 27.90 (*CH*₃).

HR-MS (ESI-TOF): Calcd for C₂₀H₂₁N₂O₄S 385.1222. Found 385.1218.

IR (cm⁻¹): 2979 (CH stretch), 1700-1695 (C=O stretch), 1608-1599 (C=C stretch), 1486-1417, 1151-1106 (C-N ring stretch).

Synthesis of **13b**: 2-(4-(methylamino)phenyl)benzothiazole-6-carboxylic acid



Compound 13b
 Chemical Formula: C₁₅H₁₂N₂O₂S
 Molecular Weight: 284,33

Compound **13a** (0.08 g, 0.208 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (0.5 mL). The flask was placed at 0°C and CF₃COOH was then added dropwise to the solution and the mixture was stirred for 2 hours at 0 °C. The mixture is then basified with NH₄OH and then neutralized with NH₄Cl. The solution is then extracted with CH₂Cl₂, dried over MgSO₄, filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was then purified by Flash Chromatography with Cyclohexane/Ethyl Acetate.

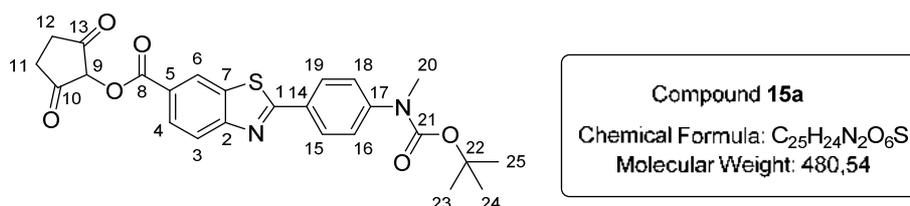
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.62 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, *H*6), 8.00 (dd, *J* = 8.5, 1.7 Hz, 1H, *H*4), 7.94 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, *H*3), 7.89 – 7.82 (m, 2H, *H*11-*H*15), 6.70 – 6.63 (m, 2H, *H*12-*H*14), 6.60 (q, *J* = 4.9 Hz, 1H, *H*16), 2.77 (d, *J* = 4.9 Hz, 3H, *H*17).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.57 (*C*_q), 167.03 (*C*_q), 156.83 (*C*_q), 152.98 (*C*_q), 133.79 (*C*_q), 129.05 (*CH*), 127.34 (*CH*), 126.52 (*C*_q), 123.76 (*CH*), 121.27 (*CH*), 119.54 (*C*_q), 111.51 (*CH*), 29.25 (*CH*₃).

HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₁₅H₁₃N₂O₂S 285.0698 Found 285.0697.

IR (cm⁻¹): 3308 (N-H stretch), 2918-2850 (C-H stretch), 1678-1604-1593 (C=O stretch), 1472, 1457-1415 (C=C ring stretch), 1286, 1181 (C-N ring stretch).

Synthesis of **15a**: 2,5-dioxocyclopentyl 2-(4-((tert-butoxycarbonyl)(methyl)amino)phenyl)benzo[d]thiazole-6-carboxylate



Anhydrous THF is cannulated to a round bottom flask containing the acid derivative **13a** (0.05 g, 0.13 mmol). The flask is cooled to 0°C in an ice-bath and then EDC (30 μL, 1.69 mmol), DMAP (0.003 g, 0.26 mmol) and finally N-hydroxysuccinimide (0.02 g, 1.69 mmol) are added and the reaction mixture is allowed to warm to room temperature overnight. THF is evaporated and CH₂Cl₂ is added to solubilize the crude product. The organic phase is washed with brine and then NaHCO₃. Finally the organic phase is dried over Na₂SO₄, filtrated and the solvent is removed under reduced to obtain a yellow powder (0.036 g, 57 %)

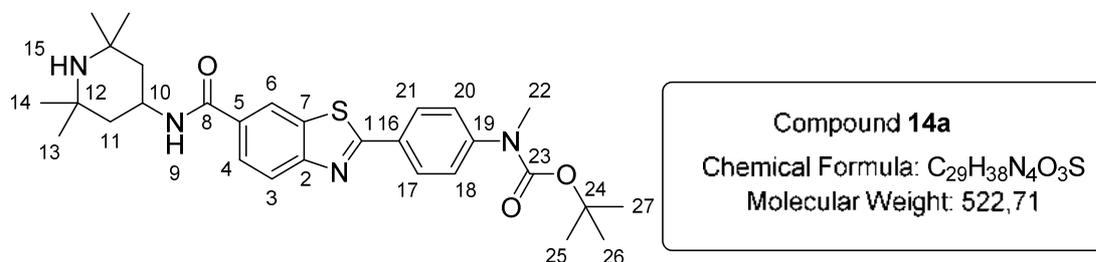
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.74 (dd, *J* = 1.7, 0.6 Hz, 1H, *H*6), 8.24 (dd, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 1H, *H*4), 8.13 (dd, *J* = 8.6, 0.5 Hz, 1H, *H*3), 8.12 – 8.06 (m, 2H, *H*15-*H*19), 7.46 – 7.40 (m, 2H, *H*16-*H*18), 3.34 (s, 3H, *H*20), 2.94 (s, 4H, *H*11-*H*12), 1.50 (s, 9H, *H*23-*H*24-*H*25).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 172.47 (Cq), 169.33 (Cq), 161.69 (Cq), 158.41 (Cq), 154.30 (Cq), 147.33 (Cq), 135.41 (Cq), 129.37 (Cq), 128.47 (CH), 128.30 (CH), 125.35 (CH), 125.23 (CH), 123.41 (CH), 121.55 (Cq), 81.34 (Cq), 37.07 (CH₃), 28.48 (CH₃), 25.86 (CH₂).

HR-MS Calcd for C₂₅H₂₄N₂O₆S : 482.1386 Found : 482.1376

IR : 2975 (C-H stretch), 1765 (C=O stretch), 1735-1728 (C=O stretch), 1701-1697 (C=O stretch), 1597, 1477, 1345.

Synthesis of **14a**: tert-butyl methyl(4-(6-((2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)carbamoyl)benzo[d]thiazol-2-yl)phenyl)carbamate



Carboxylic derivative **13a** (0.05 g, 0.135 mmol) was firstly azeotropically dried with toluene in a Schlenk flask and then dissolved in dry CH₂Cl₂ (~10mL). TCFH (0.042 g; 0.149 mmol) was dissolved in dry CH₂Cl₂ and cannulated into the reaction mixture, DIPEA (0.051 mL, 0.398 mmol) is finally added and the reaction was stirred for 9 hours. 4-amino-TMP (0.046 μL, 0.270 mmol) was then added to the mixture and left stirring overnight. The crude product was purified successively by Flash Chromatography and then by preparative TLC to obtain a white powder (0.003 g, 4%).

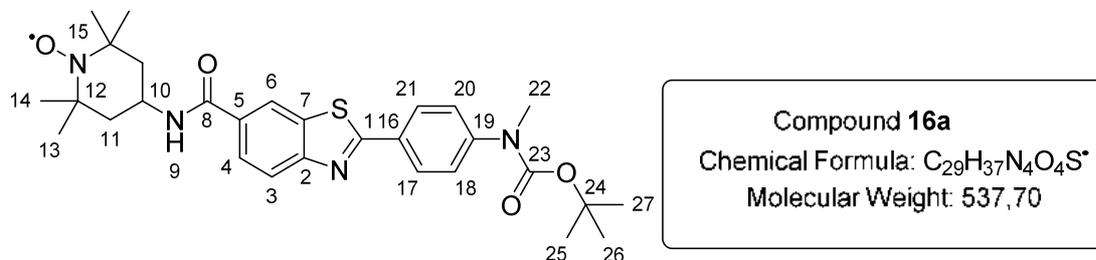
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.39 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, *H*₆), 8.08 – 8.03 (m, 3H, *H*₃; *H*₁₇-*H*₂₁), 7.84 (dd, *J* = 8.6, 1.8 Hz, 1H, *H*₄), 7.43 – 7.39 (m, 2H, *H*₁₈-*H*₂₀), 6.24 (s, 1H, *H*₉), 4.65 – 4.48 (m, 1H, *H*₁₀), 3.33 (s, 3H, *H*₂₂), 2.06 (dd, *J* = 12.7, 3.8 Hz, 2H, *H*₁₁), 1.49 (s, 9H, *H*₂₅-*H*₂₆-*H*₂₇), 1.44 (s, 6H, *H*₁₃*eq*), 1.37 (s, 6H, *H*₁₄*ax*).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 170.27 (Cq), 166.29 (Cq), 156.28 (Cq), 154.37 (Cq), 146.87 (Cq), 135.51 (Cq), 131.36 (Cq), 129.78 (Cq), 128.07 (CH), 125.38 (CH), 124.90 (CH), 123.02 (CH), 121.42 (CH), 81.24 (Cq), 81.19 (Cq), 42.69 (CH), 37.10 (CH₃), 33.57 (CH₃), 29.85 (CH₂), 28.47 (CH₃), 27,49 (CH₃).

MS (ESI-TOF) [M+H]⁺: Calcd for C₂₉H₃₉N₄O₃S 522.71. Found 523.33.

IR (cm⁻¹): 3365 (N-H stretch), 2958-2851(C-H stretch), 1700 (C=O stretch), 1632-1602 (C=O stretch), 1543, 1477 (C-H methylene bend), 1453-1347 (C-H methyl bend), 1151 (C-O stretch), 1106 (C-N ring stretch).

Synthesis of **16a** : tert-butyl (4-(6-((1-oxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)carbamoyl)benzo[d]thiazol-2-yl)phenyl)(methyl)carbamate



Carboxylic acid derivative **13a** (0.05 g, 0.130 mmol) was dissolved in dry CH_2Cl_2 in a Schlenk flask. TCFH (0.042 g, 0.143 mmol) and DIPEA (0.051 mL, 0.286 mmol) were then added and the reaction was stirred for 2 h. 4-amino-TEMPO (0.045 g, 0.26 mmol) was then added and the reaction was left overnight. The crude product was then directly purified by Flash Chromatography with a mixture of $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}/\text{NET}_3$ to obtain a white/red product (0.01 g, 14 %).

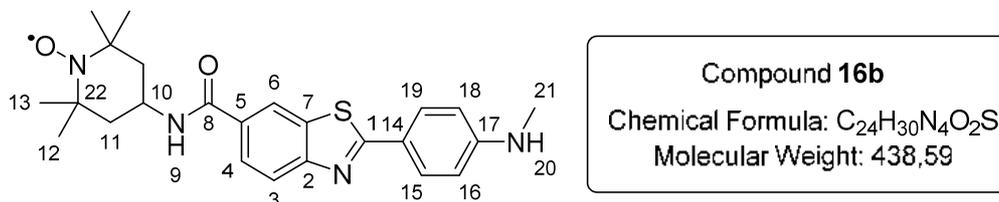
^1H NMR was recorded for the free radical derivative, missing signals are a result of the paramagnetic effect.

^1H NMR (300 MHz, CD_3CN) δ 8.52 (s, 1H, *H*6), 8.10 (d, $J = 8.5$ Hz, 3H, *H*3-*H*17-*H*21), 7.95 (s, 1H, *H*4), 7.48 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, *H*18-*H*20), 3.29 (s, 3H, *H*22), 2.11 – 2.08 (m, 2H, *H*11), 1.47 (s, 9H).

HR-MS (ESI-TOF) $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ 538.2614. Found 538.2610.

IR (cm^{-1}): 3398-3356 (O-H stretch), 2970-2927 (C-H stretch), 1701-1697 (C=O carbamate), 1654-1650 (C=O amide), 1598 (N-O stretch), 1364-1314 (C-H bend), 1152 (C-O ester), 1107 (C-N ring).

Synthesis of **16b**: N-(1-oxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)-2-(4-(methylamino)phenyl)benzo[d]thiazole-6-carboxamide



Succinimide ester derivative **15b** (0.02 g, 0.053 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂, then TEA (8.4 μL, 0.064 mmol) is added and the reaction mixture stirred overnight. The reaction is followed by TLC using ethyl acetate. When all the starting material is consumed, the reaction mixture is concentrated onto Celite and purified by Flash Chromatography in cyclohexane/ethyl acetate solvent system to obtain a yellow product (0.020 g, 87 %).

Protocol for radical neutralization: The reduction was done according to the procedure described by Oaprina *et al.*: [**3**] a small amount of compound (2 mg) was dissolved in MeOD (~500 μL) with one drop of NH₂NH₂ for 2 hours at 40 °C.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8.38 (s, 1H, *H*3), 7.90 (d, *J* = 1.2 Hz, 2H, *H*4-*H*6), 7.90 – 7.86 (m, 2H, *H*15-*H*19), 6.69 (dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, 2H, *H*16-*H*18), 4.44 – 4.32 (m, 1H, *H*10), 2.86 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H, *H*21), 1.88 (dd, *J* = 13.1, 3.5 Hz, 2H, *H*11eq), 1.61 (t, *J* = 12.3 Hz, 3H, *H*11ax), 1.25 (s, 6H, *H*13), 1.21 (s, 6H, *H*12).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 169.00 (Cq, *C*1), 163.43 (Cq, *C*8), 154.76 (Cq, *C*2), 135.38 (Cq, *C*7) 130.33 (Cq), 130.30 (CH, *C*15-*C*19), 127.00 (Cq), 126.63 (CH, *C*4), 122.88 (CH, *C*3), 122.26 (CH, *C*6), 112.76 (CH, *C*16-*C*18), 122.13 (Cq), 60.08 (Cq, *C*22), 45.90 (CH₂, *C*11), 43.10 (CH, *C*10), 32.82 (CH₃, *C*12), 29.95 (CH₃, *C*21), 20.35 (CH₃, *C*13).

HR-MS (ESI-TOF) (*m/z*): Calcd for C₂₄H₃₀N₄O₂S⁺ 438.2089. Found 438.2081.

IR: 3329 (O-H stretch), 2970-2929 (C-H stretch), 1635 (C=O amide stretch), 1606-1597 (N-O stretch), 1532-1430 (C-H bend), 1326-1312, 1273, 1177 (C-N ring stretch).

Parties expérimentales des chapitres IV et V.

Determination of ε for NMA

Two solutions of NMA.2HCl at 10 mM in ultrapure water are prepared. Each of this solution is diluted down to make three solutions of 1 mM in ultrapure water. And each of 1 mM-solution is diluted down to make three solutions of 20 μ M of NMA in 50 mM HEPES at pH 7.2. All of these 18 solutions are titrated by UV-Vis using Agilent 8453 UV-Visible Spectroscopy system, each absorbance are reported and a mean is calculated to determine ε with the Beer-Lambert law.

Determination of quantum yield (QY) Φ for NMA

Φ for NMA is calculated using the following formula from Pure Appl. Chem., Vol. 83, No. 12, pp. 2213–2228, 2011.

$$\Phi_f^i = \frac{F^i f_s n_i^2}{F^s f_i n_s^2} \Phi_f^s$$

Where Φ_f^i and Φ_f^s are the QY photoluminescence of respectively the compound and the standard. F^i and F^s are the integrated intensities (areas under curves: AUC) of sample and standard spectra, respectively (in units of photons); f_s and f_i are the absorption factor, the fraction of the light impinging on the sample that is absorbed ($f = 1 - 10^{-A}$, where A = absorbance); the refractive indices of the sample and reference solution are n_i and n_s , respectively.

The standard used here is quinine sulfate in H_2SO_4 at 0,5 M with $\lambda_{exc} = 350$ nm, $\lambda_{em} = 450$ nm and $\Phi_f^s = 0,545$.

The formula above is used for only one concentration of compound. In the aim to have a better accuracy, we calculated F^x and f_x for several concentrations of each compound. The value of F^x and f_x were plotted for each concentration and the slopes respectively $grad(F^x)$ $grad(f_x)$ were obtained and were inserted in the equation to obtain this new equation :

$$\Phi_f^i = \frac{grad(F^i) * grad(f_s) * n_i^2}{grad(F^s) * grad(f_i) * n_s^2} \Phi_f^s$$

Calculation of $\text{grad}(F^i)$ $\text{grad}(f_i)$ for NMA

13 solutions of NMA: 0, 5, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 200, 500, 800 and 1500 nM were prepared in HEPES 50 mM. Their emission spectra were recording with Fluoromax-4 from Horiba Jobin Yvon. Each AUC were calculated using the software provided. All AUC were plotted in function of concentration to obtain $\text{grad}(F^i)$.

$\text{grad}(f_i)$ is obtained by plotted $1 - 10^{-A}$ for each concentration using $A = \epsilon.c.l$ from Beer-Lambert law.

Calculation of $\text{grad}(F^s)$ $\text{grad}(f_s)$ for quinine sulfate

10 solutions of Quinine Sulfate : 0, 20, 40, 40, 60, 80, 100, 200, 500, 800 and 1000 nM were prepared in H_2SO_4 500 mM. Their emission spectra were recording with Fluoromax-4 from Horiba Jobin Yvon. Each AUC were calculated using the software provided. All AUC were plotted in function of concentration to obtain $\text{grad}(F^s)$.

$\text{grad}(f_s)$ is obtained by plotted $1 - 10^{-A}$ for each concentration using $A = \epsilon.c.l$ from Beer-Lambert law.

All the results are given in the table below:

	NMA	QS
ϵ ($10^3.M^{-1}.cm^{-1}$)	29,2	5,7
n	1,338	1,339
$\text{grad}(F^i)$	987376	272128
$\text{grad}(f_i)$	6,55E+04	1,31E+04
Φ	0,394	0,545

Fluorescence measurements

- **ThT and NMA aggregation assay**

Amyloid beta peptides were bought from GeneCust (Dudelange, Luxembourg), with purity grade > 95%. Stock solution $A\beta_{28}$ (sequence DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK) peptide is prepared by dissolving the powder in NaOH 50 mM. and titrated by UV-Vis at pH 12 ($\lambda = 294$ nm, $\epsilon = 2400$ L.mol⁻¹.cm⁻¹).

In a 96-wells microplate (Greiner) were added HEPES buffer (50 mM), ThT (5, 10, 20, 50 μ M), NMA (5, 10, 20, 50 μ M), NMA+ThT (10 μ M), $A\beta_{28}$ (500 μ M) and ZnSO_4 (250 μ M). Fluorescence intensity was recorded every 5 min for a total duration of 52 hours using a ClarioStar plate reader (BMG Labtech) set at 27 °C. Three different fluorescence parameters were set as follows: λ exc = 440 nm, λ em = 490 nm ; λ exc

= 360 nm, $\lambda_{em} = 420$ nm and $\lambda_{exc} = 360$ nm, $\lambda_{em} = 490$ nm ; gain = 900, shaking at 200 rpm for 15 s before each measurement. Modelled curves were produced using Kaleida Graph V4.5 software.

- **K'_d determination of NMA, Fc-BTA, HO-CH₂-BTA and DA-BTA.**

Solution of NMA, Fc-BTA, HO-CH₂-BTA and DA-BTA ($C_0 = 0.5 \mu\text{M}$) were prepared in aqueous solution with HEPES buffer (50 mM) with 5 % ACN in the presence or absence of A β 28 fibres (10, 50, 100 μM) or A β 40 fibres (5, 10 μM). Each solution were incubated overnight at room temperature and then centrifuged (14,000 rpm, 30 min) to recover supernatant. Each emission spectra is then recorded using Fluoromax-4 from Horiba Jobin Yvon and AUC were calculated with the software provided. AUC values in supernatant can be rely to the concentration of free ligand ($C_{supernatant}$) and ligand inserted in fibres ($C_{inserted}$) by comparing it with AUC value for C_0 . K'_d is then determined assuming that 5 A $\beta = 1$ binding site for probes and concentration of free A β peptide is $C(A\beta)_{total} - 5.C_{inserted}$ to obtain the following equation:

$$K'_d = \frac{(C(A\beta)_{total} - 5.C_{inserted}) \cdot C_{supernatant}}{C_{inserted}}$$

Electrochemistry

Cyclic voltamograms and Square wave voltamograms were recorded on a Autolab PGSTAT302N at 25°C. A homemade system, provided by Damien Lemarchal team in Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire, Paris, consisted of 10 electrochemical cells silkscreened on a plastic foil. This foil is electrically connected to a 30-pin connector connected to a 10-position switch itself connected to AutoLab. The scanning speed was 0.1 V.s⁻¹ for CV voltamograms. For SWV voltamograms, the potential step was 1 mV, amplitude was 0.1 V and pulse time was 0.01 s. Samples were prepared using a stock solution of Fc-BTA diluted down to 20 mM in HEPES 50 mM in 5 % DMSO in the presence of absence of A β 28 400 μM . Same procedure was done for Fc-hydro ligand.

EPR

Electron Paramagnetic Resonance (EPR) data were recorded using an Elexsys E 500 Bruker spectrometer, operating at a microwave frequency of approximately 9.76 GHz. Spectra were recorded using a microwave power of 5 mW across a sweep width of 12 mT (centred at 348 mT) with modulation amplitude of 0,1 mT. Experiments were carried out at 298 K. EPR samples were prepared from stock solution of TEMPO-BTA diluted down to 20 mM in HEPES 50 mM in 5 % DMSO with A β 28 500 μM . 500 μL of this solution was put in flat cell for recording spectra. To trigger the aggregation 12,5 μL of a 10-mM solution of ZnSO₄ was

then add to the solution and spectra were then recorded each 10 minutes for 20 h. Last spectra was then recorded at 72h.

NMR

1D ^1H experiments were recorded on a Bruker Avance600 NEO spectrometer equipped with a 5 mm triple resonance inverse Z-gradient probe (TBI ^1H , ^{31}P , BB). Spectra were collected at 298 K in D_2O . Samples were prepared as follow: a 200 μM -solution of A β 28 peptide was prepared in phosphate buffer in D_2O at pD 7.3 and TEMPO-BTA (10 mM) in DMSO-d_6 was added (0,5 ; 1 and 2 equivalents).

Mass spectrometry experiment

- Photolabelling procedure

In a 96-wells microplate (Greiner) were added DA-BTA (20 μM), HCO_3NH_4 buffer (100 mM; pH 8), A β 28 (500 μM) and ZnSO_4 (250 μM). Fluorescence intensity was recorded every 5 min for a total duration of 72 hours using a ClarioStar plate reader (BMG Labtech) set at 27 °C. Fluorescence parameters were set as follows: $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$, gain = 900, shaking at 200 rpm for 15 s before each measurement. When DA-BTA is fully inserted (plateau phase), wells were recovered into an 1mL-tube and were irradiated at 360 nm for 40 min using 4x9 W bulbs from NailStar professional device under soft agitation (100 rpm) in an iced-bath. Samples were then rinsed with ultrapure water (2x200 μL).

- Mass spectrometry experiment

Spectra were recorded with LCQFleet mass spectrometer (ThermoFisher Scientific) with ion traps and Electrospray ionization as a source of ions. Samples (200 μL) after dilution in a mixture ACN/ H_2O 0,1 % HCOOH were directly injected in the device, at room temperature at a flow-rate of 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. The mass spectrometer was used as a detector, working in the full scan positive mode between 150 and 2 000 Da.

Bibliographie des parties expérimentales

1. Beunard, J.-L., *Synthèse de marqueurs d'affinité de l'acétylcholinestérase. Synthèse totale de la galanthamine.*, in *U.F.R Scientifique d'Orsay*. 2001, Université Paris XI Orsay.
2. Brunner, J., H. Senn, and F.M. Richards, *3-Trifluoromethyl-3-phenyldiazirine. A new carbene generating group for photolabeling reagents.* *J Biol Chem*, 1980. **255**(8): p. 3313-8.
3. Oparina, L.A., et al., *Hydroalkoxylation of alkynes by a nitroxyl containing alcohol, 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl: synthesis of spin-labeled enol ethers.* *Arkivoc*, 2015. **2015**(7): p. 330.

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative qui est la cause la plus fréquente de démence chez les personnes âgées. Il est proposé que celle-ci ait pour origine l'agrégation du peptide l'amyloïde- β ($A\beta$) qui, produit à l'état monomérique, est retrouvé sous formes de plaques séniles dans le cerveau des patients. Lors de l'agrégation, le peptide se retrouve sous plusieurs formes, dont les formes oligomériques qui présentent la plus grande toxicité envers les neurones. Bien qu'il existe une grande diversité de structures chimiques utilisées comme sondes des plaques séniles, le développement d'outils de détection des formes précoces du processus d'agrégation reste un défi scientifique majeur. Pour cela, il est nécessaire de connaître à l'échelle moléculaire la nature du(des) site(s) d'interaction entre la sonde et le peptide. Ceci permettrait l'élaboration rationnelle de ligands plus spécifiques pour chaque forme du peptide $A\beta$ (monomère, oligomère,...).

Dans le cadre de ces travaux de thèse, la mise au point de synthèses modulaires de différents dérivés du motif 2-aryl-benzothiazole connu pour son interaction avec les agrégats a été effectuée. Ces dérivés permettent l'étude de l'agrégation et de l'identification du(des) site(s) d'interaction par différentes techniques.

Au cours de ces travaux, la synthèse et l'étude de quatre principaux dérivés du 2-aryl-benzothiazole ont été réalisées ; (i) un dérivé comportant une amine secondaire présentant des propriétés photophysiques intéressantes, obtenu en 11 étapes avec un rendement global de 23 % ; (ii) un dérivé avec un motif ferrocène pour des études en électrochimie, obtenu avec 13 % de rendement en 11 étapes ; (iii) un dérivé comportant un motif TEMPO radicalaire pour des études par RPE et RMN, obtenu avec un rendement 16 % en 10 étapes ; et (iv) un dérivé comportant un motif diazirine obtenu avec un rendement global de 8 % en 19 étapes pour une étude de marquage par photo-affinité (création d'un lien covalent après irradiation) suivi d'une étude par spectrométrie de masse. Outre les synthèses de ces sondes, des résultats préliminaires des études menées par études photophysiques, électrochimie, RPE, RMN et spectrométrie de masse seront présentées dans ce manuscrit.

Summary

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease which is the most common cause of dementia in elderly people. It is proposed that it originates from the aggregation of amyloid- β peptide ($A\beta$), produced in the monomeric state, which is found as senile plaques in the brain of patients. During aggregation, the peptide is found in several forms, including oligomeric forms that are the most toxic to neurons. Although there is a wide variety of chemical structures used as probes for senile plaques, the development of tools to detect early forms of the aggregation process remains a major scientific challenge. To accomplish this, it is necessary to know, at the molecular level, the nature of the interaction site(s) between the probe and the peptide. This would allow the rational design of more specific ligands for each form of the $A\beta$ peptide (monomer, oligomer,...).

As part of this thesis work, the development of modular syntheses of various derivatives of the 2-aryl-benzothiazole scaffold, known for its interaction with aggregates, was carried out. These derivatives allow the study of the aggregation and identification of the interaction site(s) by different techniques.

During this work, the synthesis and study of four main 2-aryl-benzothiazole derivatives were carried out; (i) a derivative containing a secondary amine with interesting photophysical properties, obtained in 11 steps with an overall yield of 23%; (ii) a derivative with a ferrocene unit for electrochemistry studies, obtained with 13% yield in 11 steps; (iii) a derivative with a radical TEMPO moiety for EPR and NMR studies, obtained with a 16% yield in 10 steps; and (iv) a derivative with a diazirine unit obtained with an overall yield of 8% in 19 steps for photoaffinity labelling study (creation of a covalent bond after irradiation) followed by mass spectrometry analysis. In addition to the syntheses of these probes, preliminary results of studies conducted by fluorescence, electrochemistry, EPR, NMR and mass spectrometry will be presented in this manuscript.