



**HAL**  
open science

# Développements en chimie bioorthogonale pour des applications en protéomique chimique et en pharmacocinétique

Marion Recher

► **To cite this version:**

Marion Recher. Développements en chimie bioorthogonale pour des applications en protéomique chimique et en pharmacocinétique. Sciences pharmaceutiques. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAF025 . tel-02872895

**HAL Id: tel-02872895**

**<https://theses.hal.science/tel-02872895>**

Submitted on 18 Jun 2020

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

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



UNIVERSITÉ DE  
STRASBOURG

**EDSC**  
Ecole Doctorale des  
Sciences Chimiques

ECOLE DOCTORALE des Sciences Chimiques

UMR 7199 - Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives

# THÈSE

présentée par :

**Marion RECHER**

soutenue le : **10 Octobre 2014**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : Chimie / Chimie Biologique

**Développements en chimie bioorthogonale pour des  
applications en protéomique chimique et en  
pharmacocinétique**

THÈSE dirigée par :

WAGNER Alain

Docteur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

SMIETANA Michael

Professeur, Université de Montpellier

VAUZEILLES Boris

Docteur, Université Paris Sud

---

AUTRES MEMBRES DU JURY :

LAVERGNE Olivier

Docteur, IPSEN Innovation

SCHALK Isabelle

Docteur, Université de Strasbourg



*On ne fait jamais attention à ce qui a été fait,  
on ne voit que ce qui reste à faire*

Marie Curie



# Remerciements

*Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein du Laboratoire des Systèmes Chimiques Fonctionnels (LFCS) de la faculté de Pharmacie de Strasbourg sous la direction du Docteur Alain Wagner.*

*Je tiens tout d'abord à remercier Alain pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Merci pour tes idées, tes discussions, et ton soutien tout au long de cette thèse. Merci de m'avoir permis de mettre définitivement un pied en biologie, ainsi que pour la confiance que tu m'as donné, et qui m'a permis de mener ces trois beaux projets.*

*Merci aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse, ainsi que de se déplacer à Strasbourg pour ma soutenance : Pr. Michael Smietana de Montpellier, Dr. Boris Vauzeilles de Paris, Dr. Olivier Lavergne de Paris et Dr. Isabelle Schalk de Strasbourg.*

*Ayant travaillé à l'interface avec la biologie, je souhaite remercier toutes les équipes qui m'ont accueillie, enseignée leur biologie et permise de réaliser mes expériences au sein de leur laboratoires. Merci pour toutes nos discussions, pour vos idées, et votre investissement dans nos projets communs.*

*Merci à Valérie Lamour, Claire Batisse et Claire Bedez pour notre travail commun sur les topoisomérases. Un merci tout particulier à Claire Be, avec qui j'ai partagé ces trois années de thèse et leur lots de joie et déception. Courage, c'est bientôt la fin!*

*Merci à Valérie Schreiber et Jean-Christophe Amé pour le travail sur la PARP1. Merci Jean-Christophe pour m'avoir guidée et jamais découragée tout au long de ce travail. Merci également aux filles' du couloir, pour m'avoir fait une petite place et aidée quand j'en ai eu besoin.*

*Merci à Wojceich Krezel pour les manipulations sur les animaux pour le travail de click in vivo. Merci d'avoir accepté ce projet plutôt fou.*

*Je souhaite remercier également Mourad Elhabiri pour m'avoir permis de réaliser mes expériences de cinétique en flux stoppé.*

*Merci à Nelly Frossard et François Daubeuf pour les travaux sur la formulation du BCN.*

*Comment ne pas remercier notre service commun d'analyse ? Merci Cyril pour ton aide précieuse pour la RMN de mes composés toujours compliqués. Merci Patrick pour ton aide lors de mes premiers essais de pharmacocinétique. Merci à Barbara et Justine d'être là pour la relève. Et merci Pascale pour ta patience avec mes composés de poids toujours trop élevés.*

*Je remercie l'ENS Cachan et le ministère pour leur confiance dans l'attribution de la bourse.*

*Merci à tous mes collègues du LFCS - la liste est longue. Merci Michel pour ta participation à mes projets et tes petits conseils pratiques. Merci à Geoffray pour m'avoir appris le fonctionnement du laboratoire, ainsi que les bases de la protéomique - même à l'autre bout du monde tu continues de m'aider. Merci Hélène pour ton soutien pendant ces trois années, tes conseils et nos discussions - devant une paillasse ou un sushi - m'ont toujours reconfortée . Merci Mathias pour ne pas avoir laissé le labo tomber dans le chaos. Merci Sasha pour avoir partagé plus qu'une paillasse pendant trois ans : de l'opération à coeur ouvert (d'un disque dur !) à la définition de mignon en passant par le meurtre du taxi. Merci à Hélène et Isabelle pour leur conseils et discussions autour de la biologie. Merci à l'actuelle équipe LFCS - Zolo, les Sylvains, les Ukrainiens et Corinne pour avoir supporté ma période de rédaction. Merci à tous ceux qui ont un jour travaillé au labo, en particulier mon stagiaire Ricardo pour son travail de criblage de nouvelles structures clivables.*

*Merci à l'ensemble de l'UMR 7199 et en particulier Jean-Serge pour les A/R jusqu'à l'esplanade, et Alexandre pour nos discussions sur les composés azo. Merci aux biologistes du 3F - Neila, Zahra et Marc - toujours prêts à répondre à mes questions de bio. Merci à Nathalie et Marianne pour leur aide avec les commandes et paperasses diverses. Merci à Christophe et Maria avec qui j'ai partagé un peu plus que des TPIs. Merci Julien pour ta présence et ta bonne humeur.*

*Merci aux copains de l'UMR 7200, en particulier Emilie. Merci pour ces trois années partagées, cette aventure menée ensemble, on y est presque !*

*Pas d'inquiétude, j'arrive à la fin. Merci aux copains de tous bords, les strasbourgeois - du monday beer, du quizz ou d'ailleurs, les cachanais - merci notamment à Julien et Renaud pour leur aide avec LaTeX, les walloniens et les SECOistes 50 et 51 - surtout Gaele, Hui, MA et Max pour cette année intense passée sur skype. Un merci tout particulier à Ghislaine, qui aura toujours été là pour moi pendant ces 3 années.*

*Un grand merci à la famille Lucas-Blouin pour les moments détentes pendant cet été de rédaction. Merci évidemment à toute la famille Recher-Perwuelz pour continuer de tenter de comprendre ce que je fais.*

*Merci à mes parents et mes petites soeurs pour leur soutien inconditionnel au cours de ces 10 longues années d'étude. Ca y est, c'est enfin la fin !*

*Et bien sur merci à Romain d'avoir partagé les bons comme les mauvais moments de cette thèse. Merci d'être là pour moi.*

*Merci !*





# Table des matières

<b>Introduction Générale</b>	<b>1</b>
1. La Chimie Bioorthogonale . . . . .	1
2. Les réactions de Ligation . . . . .	3
2.1 Ligation de Staudinger . . . . .	4
2.2 CuAAC : Copper catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition . . . . .	5
2.3 SPAAC : Strained Promoted Azide Alkyne Cycloaddition . . . . .	6
2.4 Réaction de Diels-Alder à demande inverse . . . . .	7
2.5 Analyse comparée . . . . .	7
3. Les réactions de clivage . . . . .	8
3.1 Application en protéomique chimique . . . . .	9
3.2 Application <i>in vivo</i> . . . . .	10
4. Conclusion . . . . .	12
Références Bibliographiques . . . . .	13
<b>Synthèse de sondes d'affinité pour l'étude en protéomique chimique de topoisomérase II</b>	<b>19</b>
1. Topoisomérase IIA et ses inhibiteurs . . . . .	19
1.1 Topoisomérase IIA . . . . .	19
1.2 Les inhibiteurs d'activité de la Top2 . . . . .	22
1.3 Protéomique chimique . . . . .	23
2. Sondes d'affinité dérivées de Doxorubicine . . . . .	24
2.1 Première génération : Dérivatisation par formation d'amide . . . . .	24
2.2 Seconde génération : Dérivatisation par amination réductrice . . . . .	25
2.3 Purification par affinité . . . . .	27
3. Sondes d'affinité dérivées de l'Etoposide . . . . .	32
3.1 Première génération : Dérivatisation par acétalisation . . . . .	32
3.2 Seconde génération : Arylation de l'épipodophyllotoxine . . . . .	32
3.3 Purification par affinité . . . . .	34
3.4 Troisième génération : Ajout d'une sonde de photoaffinité . . . . .	37

4.	Sondes d'affinité dérivées de Dexrazoxane . . . . .	40
4.1	Synthèse par substitution nucléophile . . . . .	41
4.2	Synthèse par amination réductrice . . . . .	43
4.3	Synthèse par alkylation puis cyclisation . . . . .	44
5.	Conclusion . . . . .	46
	Références Bibliographiques . . . . .	48

**Développement d'un nouveau lien clivable pour des applications en protéomique chimique** **53**

1.	PARP et protéomique chimique . . . . .	53
1.1	PARP1 . . . . .	53
1.2	Sonde d'affinité Parpi-HAZA-Biotine . . . . .	54
2.	Criblage HPLC . . . . .	55
2.1	Mise au point du criblage . . . . .	55
2.2	Synthèse et caractérisation des composés . . . . .	57
2.3	Résultats . . . . .	59
3.	Etude du motif PHID . . . . .	62
3.1	Optimisation de la réactivité . . . . .	62
3.2	Cinétique en flux stoppé . . . . .	63
4.	Synthèse et évaluation biologique d'une sonde d'affinité Parpi-PHID-Biotine	67
4.1	Synthèse de la sonde . . . . .	67
4.2	Evaluation Biologique . . . . .	68
5.	Conclusion . . . . .	77
	Références Bibliographiques . . . . .	78

**Elimination d'une drogue circulante dans le sang par réaction de click** **81**

1.	Click and Clear . . . . .	81
1.1	La coagulation . . . . .	81
1.2	Les anticoagulants . . . . .	82
1.3	Pharmacocinétique . . . . .	84
1.4	Le projet Click and Clear . . . . .	85
2.	Synthèse et cinétique de réaction . . . . .	87
2.1	Synthèse des dérivés de Warfarine . . . . .	87
2.2	Etude HPLC de la cinétique de la réaction . . . . .	88
2.3	Evaluation <i>in vivo</i> de l'activité anticoagulante . . . . .	93
3.	Réaction <i>in vivo</i> . . . . .	95
3.1	Optimisation des conditions . . . . .	95
3.2	Premier essai de click chez l'animal . . . . .	96

3.3	Etude pharmacocinétique des différents composés . . . . .	97
4.	Formulation de BCN . . . . .	99
4.1	Formulation . . . . .	99
5.	Conclusion . . . . .	100
	Références Bibliographiques . . . . .	102
	<b>Conclusion Générale</b>	<b>107</b>
	<b>Partie Expérimentale</b>	<b>111</b>
	Partie expérimentale chimique . . . . .	111
	Partie expérimentale biologique . . . . .	155
	Références Bibliographiques . . . . .	159



# Abréviations

<b>Abréviation</b>	<b>Nom Complet</b>
Ac	acétique
ACN	acétonitrile
ADME	absorption distribution métabolisme excrétion
ADN	acide déoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
APN	arylpropionitrile
ARN	acide ribonucléique
AVK	anti-vitamine K
BCN	bicyclononyne
Boc <sub>2</sub> O	di-tert-butyl dicarbonate
BSA	albumine de sérum bovin
Cbz-OSu	benzyloxycarbonyl-N-hydroxysuccinimide
CDX	2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine
CuAAC	cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCM	dichlorométhane
DiBalH	diisobutylaluminium hydrure
DIPEA	N,N-diisopropyléthylamine
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DPPA	azoture de diphénylphosphoryle
DTT	dithiothréitol
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EFS	établissement français du sang
ESI	ionisation par électronébuliseur
EtOAc	acétate d'éthyle

EtOH	éthanol
eq.	équivalent
Fmoc	fluorénylméthylloxycarbone
FT	facteur tissulaire
GSH	glutathion
HATU	2-(1H-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyl-uronium-hexafluorophosphate-méthanaminium
HAZA	acide 2-(2'-alkoxy-4'-hydroxypénylazo)benzoïque
HBTU	O-benzotriazole-N,N,N',N'-tétraméthyl-uronium-hexafluoro-phosphate
HPLC	chromatographie en phase liquide à haute performance
IED-DA	réaction de Diels-Alder à demande inverse
LC-MS	chromatographie en phase liquide - spectrométrie de masse
MeOH	méthanol
mpk	milligramme par kilogramme
MS	spectrométrie de masse
MTT	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
Mw	poids moléculaire
NACO	nouveau anticoagulant oral
NaOMe	méthanolate de sodium
NCL	ligation chimique native
NHS	N-hydroxysuccinimide
NMR	résonance magnétique nucléaire
OEG	oligo éthylèneglycol
PAR	poly(ADP-ribose)
PARP	poly(ADP-ribose)polymérase
PB	tampon phosphate
PBS	tampon phosphate salin
Pd/C	palladium sur charbon
PHID	phénylhydrazonoindanedione
pUC	plasmide de l'Université de Californie
PyBOP	benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
qtt	quantitative
RMN	résonance magnétique nucléaire
rt	room temperature
SDS	dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

$t_{1/2}$	temps de demi-réaction
ta	température ambiante
TCA	temps de céphaline activée
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEA	triéthylamine
TFA	acide trifluoroacétique
TFPI	inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
THF	tétrahydrofurane
TMSCN	cyanure de triméthylsilyle
TOC	<i>trans</i> -cyclooctène
Top2	topoisomérase II A humaine
TP	temps de prothrombine
TsOH	acide para-toluène sulfonique
SPAAC	cycloaddition azoture-alcyne promue par la tension de cycle
UV	ultra-violet
$\mu W$	micro-ondes
XT	extrait cellulaire





# Introduction Générale

## 1. La Chimie Bioorthogonale

Pour comprendre précisément les processus biologiques complexes, il est nécessaire de pouvoir les étudier dans leur environnement natif, de la cellule à l'organisme vivant. Pour cela, une nouvelle classe de réaction est apparue il y a une dizaine d'années, la chimie bioorthogonale. Une réaction bioorthogonale est une réaction pouvant avoir lieu dans le milieu biologique sans interagir avec les constituants de celui-ci. Il s'agit donc d'une réaction entre deux fonctions exogènes qui réagissent ensemble de manière sélective.

Deux grandes classes se distinguent parmi ces réactions bioorthogonales, les ligations et les clivages. Dans le cas d'une réaction de ligation, une fonction exogène est introduite au sein d'une biomolécule (Fig 1-A), qui sera ensuite mise en évidence par formation d'une liaison bioorthogonale avec une entité révélabile (fluorophore, biotine,...)(Fig 1-B).

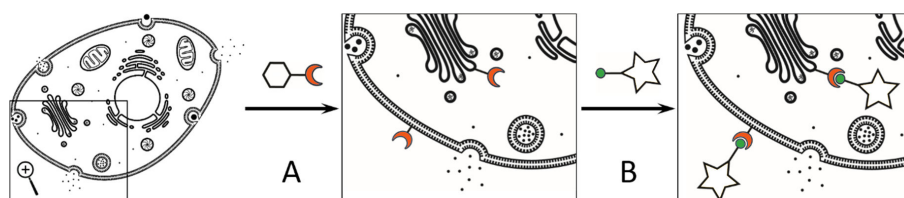


FIGURE 1 – La Ligation Bioorthogonale<sup>1</sup>

Les réactions de clivage quant à elles impliquent une liaison entre deux têtes fonctionnelles qui va se rompre en présence d'un stimuli exogène, permettant la libération de chacune des parties de la sonde (Fig 2).

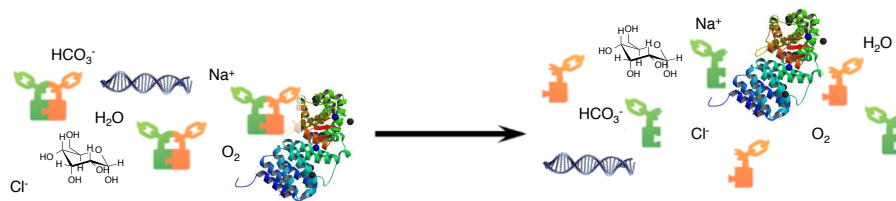


FIGURE 2 – Le Clivage Bioorthogonal

Dans la suite du chapitre, les réactions bioorthogonales seront alors représentées selon la figure 3.



FIGURE 3 – Représentation des réactions bioorthogonales

Dans la pratique, pour être applicable en tant que réaction bioorthogonale, une réaction doit satisfaire un grand nombre de critères. En plus d'être sélective, les réactifs et produits de la réaction doivent être inertes chimiquement et biologiquement. La cinétique de la réaction doit être rapide pour que la réaction puisse avoir lieu avant l'élimination des réactifs par le milieu biologique. De plus, une cinétique rapide permet de contrebalancer les hautes dilutions auxquelles les réactions ont généralement lieu. La réaction doit être biocompatible, c'est-à-dire qu'elle doit fonctionner dans les conditions physiologiques (eau, 37 °C, pH physiologique) et aucun composant de la réaction ne doit être toxique. Enfin, les fonctions participant à la réaction doivent être aussi petites que possible et faciles à intégrer dans les biomolécules.

Au cours de leur développement, les réactions vont être testées sur des milieux réactionnels de plus en plus complexes. Tout d'abord dans le tampon, ensuite sur des biopolymères isolés, puis des mélanges plus complexes comme un lysat cellulaire, avant d'être testées sur cellules et enfin *in vivo*. Les différents critères énoncés ci-dessus apparaissent alors modulables. En effet, les contraintes ne sont pas tout à fait les mêmes si la réaction est réalisée dans un milieu protéique, sur cellules ou encore chez l'animal. Par exemple, si dans l'ensemble des cas le solvant est l'eau, la métabolisation des composés n'entre en jeu que lorsque la réaction est appliquée à un milieu vivant.

Différents degrés de bioorthogonalité peuvent alors être définis, dépendant de quatre critères : la sélectivité et la cinétique de la réaction, la toxicité et la métabolisation des

composés. En fonction des différentes caractéristiques des réactions, elles seront donc applicables sur protéines, sur cellules et finalement *in vivo* chez l'animal.

## 2. Les réactions de Ligation

En 1998, Tsien et collaborateurs proposent l'incorporation, au sein d'une protéine d'intérêt, d'un petit récepteur hélicoïdal composé de seulement 6 acides aminés dont 4 cystéines CCXXCC (Fig 4). Celui-ci se condense alors sur un ligand bis-dithioarsolane, provoquant la fluorescence du ligand. Cette condensation est réversible par ajout d'un excès d'EDT (1,2-éthanedithiol)<sup>2</sup>.

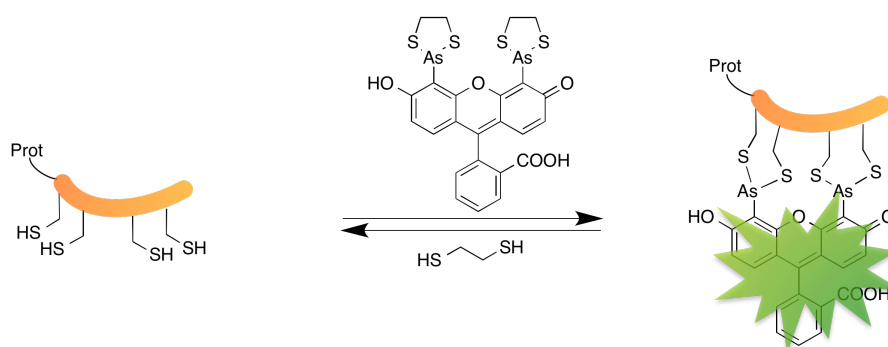


FIGURE 4 – Principe du récepteur à l'arsenic de Tsien et collaborateurs

Ce principe est souvent considéré comme l'un des premiers exemples de chimie bioorthogonale. Cependant, l'éthanedithiol présente une certaine toxicité. De plus, cette technique pourrait être plutôt considérée comme étant biospécifique. Néanmoins, le motif CCXXCC n'est présent qu'au sein de 300 protéines. Cette technique a tout de même été appliquée sur cellule pour la révélation de protéines.

L'essor de la ligation bioorthogonale débute réellement en Californie dans les années 2000. En effet, les données bibliographiques montrent l'intérêt croissant pour celle-ci au cours des 10 dernières années (Fig 5-A). Elle est régulièrement confondue avec la notion de "click chemistry", dont l'expansion a lieu concomitamment à celle de la chimie bioorthogonale, de manière bien plus fulgurante puisqu'il s'agit d'un domaine bien plus élargi (Fig 5-B).

On peut dénombrer pléthore de ligations bioorthogonales. Il y a celles qui, après avoir été optimisées pour pouvoir avoir lieu en milieu biologique, sont maintenant utilisées par tous, comme les réactions de chimie "click". Il y a celles qui ont été testées en tant que réactions bioorthogonales, mais dont l'utilisation est encore assez limitée (réaction de

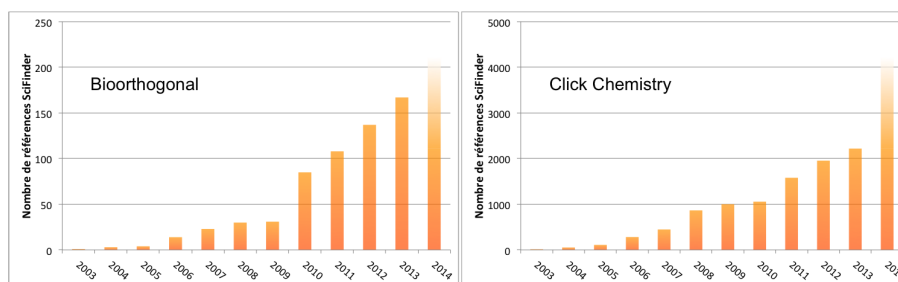


FIGURE 5 – Évolution du nombre de références SciFinder au cours des 10 dernières années pour les mots-clés “Bioorthogonal” et “Click Chemistry”

Suzuki, de Sonogashira, . . . )<sup>3</sup>. Enfin, il y a celles qui ont été testées en milieu biologique mais qui n’ont jamais été recensées comme bioorthogonale. Nous nous concentrerons donc ici sur les réactions particulièrement étudiées, la réaction de Staudinger, les réactions de cycloaddition entre un azoture et un alkyne et la réaction de Diels-Alder.

## 2.1 Ligation de Staudinger

En 2000, Bertozzi et collaborateurs proposent une modification de la réaction de Staudinger qui permet de réduire un azoture en amine. A l’époque, la fonction azoture est encore crainte par les chimistes pour son coté explosif. Cependant, elle se révèle être un très bon substrat pour des réactions *in vivo* puisqu’elle est absente du milieu naturel et ne présente pas de toxicité . Elle possède comme propriété d’être invisible aux yeux d’un grand nombre de fonctions endogènes et elle est, de plus, petite et intégrable au sein de biomolécules.

Pour transformer cette réaction de réduction en ligation, ils présentent alors une optimisation de la structure de la phosphine, pour que même en milieu aqueux, l’intermédiaire aza-ylide ne soit plus hydrolysé mais conduise à la formation d’une fonction amide (Fig 6)<sup>4</sup>.

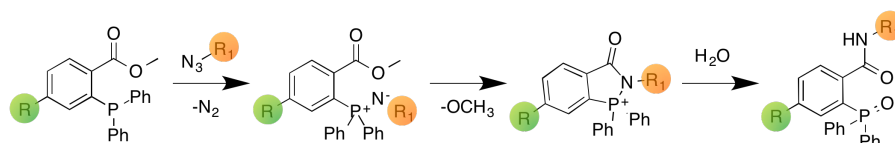


FIGURE 6 – Ligation de Staudinger classique

Cette nouvelle technique est très rapidement de nouveau optimisée pour obtenir une amine native (Fig 7)<sup>5</sup>. Cela devient ainsi une bonne alternative à la Native Chemical Ligation (NCL) développée par Kent en 1994<sup>6</sup>.

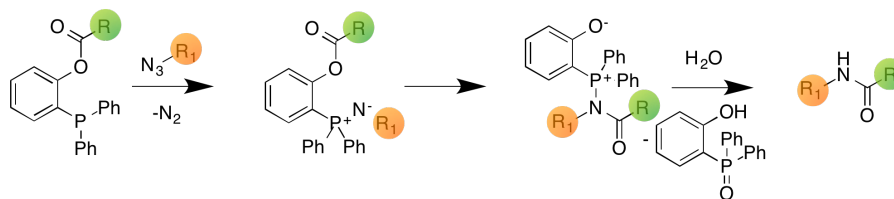


FIGURE 7 – Ligation de Staudinger “traceless”

Les ligations de Staudinger sont des réactions sélectives dont les deux réactifs ne présentent pas de toxicité. La taille de la fonction azoture permet une introduction facile au sein des biomolécules, la phosphine ayant alors le rôle de révélateur. Cependant, la phosphine est lentement oxydée par l’air ou par métabolisation par des enzymes. La cinétique de réaction est assez lente, avec une constante de  $0,003 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  dans le PBS<sup>3</sup>. Une tentative de modification de la structure pour augmenter cette cinétique a résulté dans une plus rapide dégradation de la phosphine.

Pour autant, après avoir été décrite pour le marquage de la membrane de cellules en culture<sup>4</sup>, la réaction de Staudinger a été la première réaction bioorthogonale appliquée *in vivo*, pour le marquage des membranes cellulaires chez la souris<sup>7</sup>.

## 2.2 CuAAC : Copper catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition

Au même moment, Sharpless définit en 2001 les réactions dites de “Click Chemistry” qui sont sélectives, extrêmement efficaces et économes en atome<sup>8</sup>. Parmi celles-ci figure la réaction de cycloaddition de Huisgen, découverte en 1963<sup>9</sup>, entre un alcyne et un azoture. Cependant, c’est lorsqu’en 2002, les groupes de Sharpless et Meldal décrivent en même temps l’optimisation de cette réaction par une catalyse au cuivre que la click chemistry connaît l’expansion qu’on lui connaît (Fig 8)<sup>10,11</sup>. Contrairement à la réaction thermique, dans ce cas seul un isomère du triazole est obtenu.

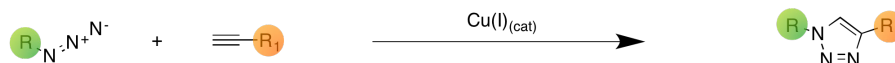


FIGURE 8 – Cycloaddition entre un alcyne et un azoture catalysée au cuivre

Appelé CuAAC pour Copper catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition, cette réaction est sélective et largement utilisée pour des applications sur protéines<sup>12</sup>, l’introduction de l’azoture et l’alcyne au sein des biomolécules n’entraînant pas de modifications majeures. Il s’agit d’une réaction rapide, avec une constante de vitesse de l’ordre de  $10\text{-}100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Elle souffre de la toxicité du cuivre pour pouvoir être appliquée *in vivo*<sup>13</sup>.

Pour contourner cette difficulté, des ligands du cuivre ont été développés, pour protéger à la fois la cellule et le cuivre (I) de l'oxydation (Fig 9-A)<sup>14</sup>. Un des récents développements concerne la synthèse d'un azoture chélatant du cuivre (Fig 9-B), proposé par l'équipe de Taran<sup>15</sup>.

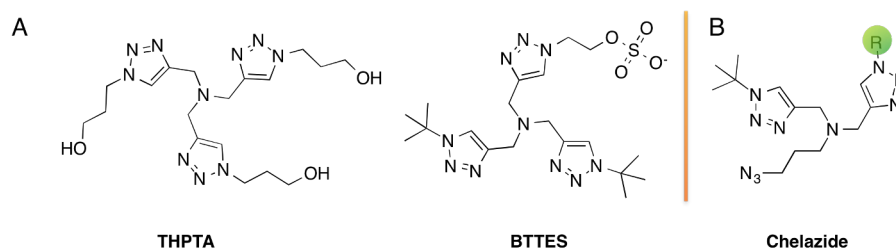


FIGURE 9 – Ligands N-donneur pour la CuAAC et l'azoture chélatant

Grâce aux développements de ces ligands, la CuAAC a pu être appliquée à la détection de la membrane cellulaire, sur cellules<sup>13</sup> mais aussi *in vivo*, notamment chez le zebrafish<sup>14</sup>.

### 2.3 SPAAC : Strained Promoted Azide Alkyne Cycloaddition

Pour éviter l'utilisation du cuivre, Bertozzi et collaborateurs proposent en 2004 une alternative pour l'activation de la fonction alcyne : l'intégrer dans un cycle pour déformer l'acétylène et ainsi le rendre plus réactif. En effet, en 1961, Wittig et Krebs remarque que le cyclooctyne réagit violemment avec le benzyl azoture pour former le triazole<sup>16</sup>. Bertozzi et coll. vont alors développer un premier cyclooctyne au sein duquel les angles autour de la fonction acétylène sont modifiés de 17° par rapport à la géométrie préférentielle de 180°<sup>17</sup>. Ce cyclooctyne réagit en milieu aqueux avec un azoture pour former le triazole correspondant (Fig 10). Contrairement à la version catalysée au cuivre, les deux isomères du triazole sont obtenus au cours de cette réaction.



FIGURE 10 – Cycloaddition entre un cyclooctyne et un azoture

Cette première tentative permet la modification de la surface d'une cellule<sup>17</sup> mais la vitesse de réaction reste assez faible. De nombreux groupes vont alors proposer leur cyclooctyne en introduisant de la variété chimique pour contraindre un peu plus l'alcyne

et donc augmenter sa réactivité : hétéroatome, cycle phénylique accolé, encombrement stérique, taille du cycle, etc (Fig 11)<sup>18-27</sup>.

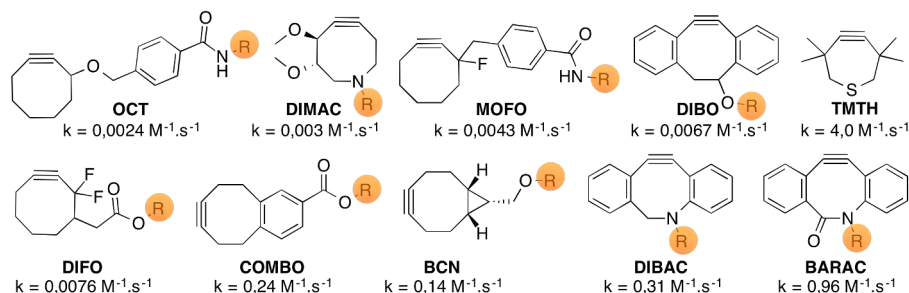


FIGURE 11 – Différents cyclooctynes développés et leur constante de réaction de SPAAC

Cependant, une perte de selectivité dans la réaction est également observée. En effet, de nombreux cyclooctynes ont été reconnus comme n'étant pas totalement inertes en milieu biologique, réagissant notamment avec les thiols<sup>28</sup>.

Ces composés ne présentant pas de toxicité avérée, ils ont été largement utilisés pour des applications sur cellules et *in vivo* chez la souris pour le marquage des membranes cellulaires<sup>29</sup>.

## 2.4 Réaction de Diels-Alder à demande inverse

La deuxième grande classe de réaction de cycloadditions bioorthogonales est celle des réactions de Diels-Alder à demande inverse. Si la version classique de la réaction de Diels-Alder a été rapidement abandonnée due à sa faible sélectivité et à des vitesses de réactions très lentes, la version IED-DA pour "Inverse Electron Demand Diels Alder", réaction de Diels-Alder à demande inverse, est appliquée au milieu biologique par l'équipe de Fox, en 2008<sup>30</sup>, entre une tétrazine et un *trans*-cyclooctène (TCO) (Fig 12).



FIGURE 12 – Réaction de Diels-Alder entre une tétrazine et un *trans*-cyclooctène

Il s'agit de la réaction bioorthogonale la plus rapide actuellement, avec une constante de 2000  $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  dans le PBS. Cependant, dans le sang, le TCO est rapidement isomérisé en *cis*-cyclooctène, beaucoup moins réactif, par interaction avec les albumines portant du

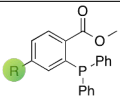
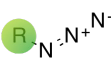






cuivre. Une solution proposée est de le lier covalamment à un anticorps, diminuant son interaction avec les protéines sans modifier la réaction avec la tétrazine<sup>31</sup>.

Malgré l'encombrement des deux fonctions réactives, leur selectivité et la rapidité de la réaction ont permis des applications sur cellules<sup>32</sup> pour le marquage de la membrane cellulaire et *in vivo* chez la souris pour le marquage de tumeurs<sup>31,33</sup>.

## 2.5 Analyse comparée

Parmis ces quatre réactions, aucune n'est pour le moment parfaite pour des applications en biologie. A part une brève étude sur la métabolisation de l'azoture en amine<sup>34,35</sup>, qui ne semble pas être un phénomène important, la métabolisation des autres composés impliqués dans ces réactions n'a que peu été étudiée. Cependant, toutes ces réactions ont été appliquées au milieu *in vivo*.

réaction	réactif 1	réactif 2	constante de vitesse (M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	défauts	cout du réactif 2 (€)
Staudinger			0,003	métabolisation de la phosphine	300 €/ 10 mg
CuAAC			10-100	toxicité du cuivre	25 €/ 100 mL
SPAAC			0,003-4	non selectivité du cyclooctyne	160 €/ 100 mg
IED-DA			2000	isomérisation du TCO	260 €/ 50 mg

Lors de la conception d'une expérience, il s'agit alors de choisir la technique qui s'adaptera le mieux à l'étude réalisée.

## 3. Les réactions de clivage

Les liens clivables présentaient déjà un grand intérêt avant le récent développement de la chimie-biologie. Notamment, dans les années 1990, avec les progrès de la chimie combinatoire et de la synthèse sur support solide, le besoin de liens clivables stables aux conditions de synthèse était important, afin de lier la molécule organique et le support solide. En conséquence, leur conditions de clivage sont généralement non compatibles avec le milieu biologique.

Ainsi, l'obtention de liens clivables utilisables de manière bioorthogonale présente un nouveau challenge pour les chimistes organiciens, afin de pouvoir cliver la liaison dans des conditions douces. Ce lien clivable est alors introduit entre deux têtes fonctionnelles, qui interagissent avec le milieu biologique. Il peut s'agir d'un fluorophore ou d'un quencher pour faire de l'imagerie, d'un médicament ou d'un ligand pour cibler une protéine spécifique, d'un outil de ligation, etc... Les grandes possibilités de fonctionnalisation permettent leur utilisation dans de nombreux domaines comme l'imagerie, la protéomique ou encore le développement de nouveaux médicaments.

Parmi les liens clivables classiquement utilisés, il en existe deux grandes classes, ceux dont l'application est principalement en protéomique chimique, et ceux qui peuvent être utilisés *in vivo*.

### 3.1 Application en protéomique chimique

La protéomique chimique permet l'isolation et l'identification de protéines par l'utilisation d'une sonde chimique. Ces sondes sont généralement composées de trois parties :

- une drogue, servant de tête affine pour les protéines
- un lien
- un rapporteur (tag), généralement une biotine, permettant la fixation sur support solide pour l'extraction

Les protéines présentant une affinité pour la drogue vont donc se fixer sur la sonde, et l'utilisation de billes de streptavidine permet alors leur extraction. Cependant, l'analyse par spectrométrie de masse permettant l'identification de ces protéines nécessite leur élution du support solide.

L'affinité biotine-streptavidine est très forte, et la rupture demande des conditions très stringentes pour les protéines. De plus, cela provoque la libération de l'ensemble des protéines fixées sur le support solide, même de manière non spécifique<sup>36</sup>. Pour palier à cela, des liens clivables ont été développés, introduit entre la drogue et le tag, et permettant l'élution des protéines en conditions plus douces.

D'un point de vue bioorthogonal, travailler sur un lysat cellulaire est bien moins complexe que de travailler sur cellule voir même *in vivo*. Ainsi, sur lysat, les questions de toxicité et de métabolisme ne sont plus pertinentes. Il est important que le clivage soit sélectif. De plus, une cinétique rapide permet une exposition moins longue, ce qui est un gain de temps d'expérimentation, mais limite également la possibilité de réaction secondaire.

Une approche pour provoquer le clivage d'une liaison est l'utilisation d'un nucléophile. Parmi ceux-ci, l'hydrazine est intéressante car il s'agit d'un composé exogène. Dans ce

système, le phénol est libéré suite à la condensation d'hydrazine sur l'acide lévulinique (Fig 13)<sup>37</sup>.

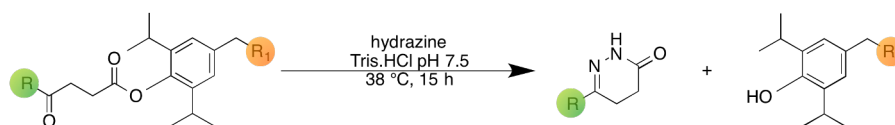


FIGURE 13 – Clivage nucléophile par l'hydrazine

Ce premier exemple, sélectif, demande cependant une incubation de 15 h.

Une autre stratégie est d'utiliser des conditions réductrices. Seulement deux groupements chimiques se clivent dans ces conditions, les ponts disulfures et les azobenzènes.

Les ponts disulfures sont connus pour se réduire rapidement dans des conditions douces, en présence de DTT ou de TCEP par exemple. Cependant, leur principal inconvénient pour une application bioorthogonale est leur sensibilité envers les nucléophiles, et notamment les autres thiols. Une solution proposée par Gartner est d'encombrer stériquement le pont disulfure pour diminuer sa sensibilité aux thiols libres, tout en conservant la possibilité de le cliver en présence de TCEP (Fig 14)<sup>38</sup>.

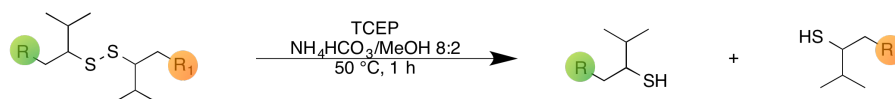


FIGURE 14 – Pont disulfure stable face aux thiols libres, clivable au TCEP

L'utilisation de TCEP en présence de protéines provoque cependant la dénaturation de celles-ci. De plus, si ce protocole est plus rapide que le précédent, il est également réalisé à 50 °C.

L'utilisation des azobenzènes est décrite comme étant à ce jour la technique la plus douce pour un clivage en conditions non dénaturantes. En effet, les azobenzènes se clivent en conditions douces en présence de dithionite de sodium, et ne sont pas réduits par les réducteurs classiquement utilisés en chimie-biologie comme le DTT ou le TCEP. De plus, ils ne sont généralement pas sensibles aux électrophiles et nucléophiles. Utilisés depuis les années 1970, leurs conditions de clivage ont été optimisées, jusqu'au travail réalisé au sein de notre laboratoire qui a conduit au clivage en seulement 5 min du motif HAZA - acide 2-(2'-alkoxy-4'-hydroxypénylazo)benzoïque - en conditions non dénaturantes pour les protéines (Fig 15)<sup>39</sup>.

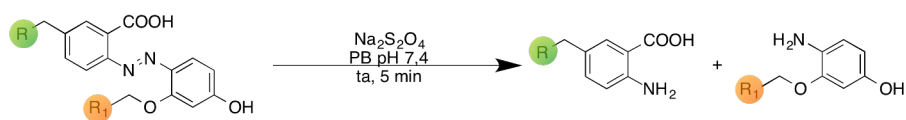


FIGURE 15 – Clivage d'un azobenzene optimisé par le dithionite de sodium

Ces conditions non dénaturantes pour les protéines permettent un clivage en seulement 5 min.

### 3.2 Application *in vivo*

Pour réaliser de l'imagerie sur cellule, ou encore pour le développement de prodrogues, la nécessité de trouver des liens clivables qui seraient applicables sur cellules et *in vivo* est croissante.

Une technique très populaire est l'utilisation de lien photoclivable. Les récents développements de l'utilisation d'une irradiation à 2 photons a permis la mise au point de structures photoclivables basées sur une coumarine (Fig 16).

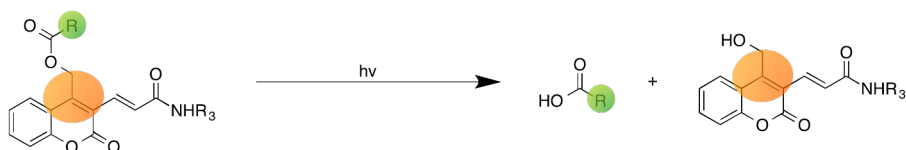


FIGURE 16 – Photoclivage de la 7-diétyl-aminocoumarine permettant la libération de l'acide correspondant.

L'utilisation d'une irradiation à deux photons permet de travailler à des longueurs d'onde aussi élevées que 900 nm, évitant toute interaction avec le milieu biologique. De plus, l'utilisation de deux photons permet une précision plus importante de la position d'irradiation. Enfin, la durée d'irradiation est de seulement 0,5 ms. Ce système a été notamment appliqué à la libération contrôlée de neurotransmetteurs, testée sur des neurones<sup>40,41</sup>.

En utilisant les récents développements de la ligation bioorthogonale, de nouvelles réactions de clivage ont été mises au point. Ainsi, en 2006, Florent propose une méthode basée sur la ligation de Staudinger<sup>42</sup>. L'idée est alors de provoquer la libération d'une drogue en utilisant la ligation de Staudinger sans trace (Fig 17). L'étape clé est l'obtention d'un intermédiaire quinone méthide qui va se réarranger en éliminant la drogue.

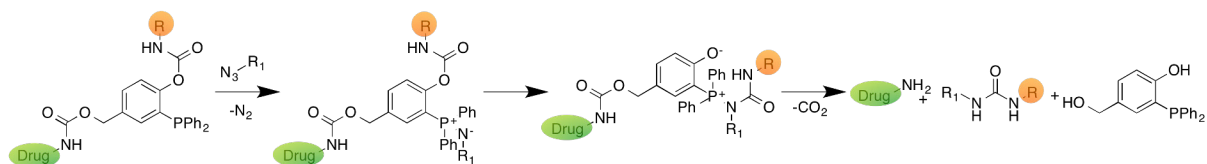


FIGURE 17 – Clivage bioorthogonal utilisant la ligation de Staudinger

Cette technique, basée sur la ligation de Staudinger décrite plus haut, n'a cependant jamais été appliquée en milieu biologique.

Plus récemment, Robillard propose en 2013 l'utilisation de la ligation par la tétrazine pour libérer la drogue de son anticorps (Fig 18)<sup>43</sup>. En attachant sa drogue en alpha de la double liaison du trans-cyclooctène par une liaison carbamate, celle-ci est relarguée après la réaction de click, suite à un réarrangement.

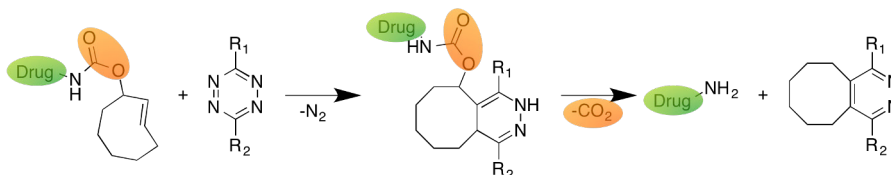


FIGURE 18 – Clivage bioorthogonal utilisant la ligation par la tétrazine

Cette nouvelle application de la réaction entre la tétrazine et le TCO présente les mêmes caractéristiques discutées plus haut, et a été, à ce jour, seulement appliqué sur cellules<sup>43</sup>.

## 4. Conclusion

Depuis sa définition en 2003, la ligation bioorthogonale a connu un essor important. Des réactions connues de longue date ont été optimisées pour être réalisées dans l'eau, à 37 °C, à pH physiologique et à forte dilution. Intrinsèquement mêlée à la notion de "Click Chemistry" définie par Sharpless en 2001, la ligation possède dans sa boîte à outils d'autres réactions, principalement la ligation de Staudinger ou encore la réaction de Diels-Alder. Les principaux efforts se sont pour le moment concentrés sur l'optimisation de la vitesse de la réaction, étape clé du passage du *in vitro* au *in vivo*.

Dans le même temps, de nombreux types de clivage ont été développés, pour des applications en protéomique chimique mais également à la chimie *in vivo*. Notamment, un lien clivable azobenzène, précédemment développé au sein de notre laboratoire, permet un clivage en conditions non dénaturantes.

Au cours de ce travail de thèse, une première partie a été consacrée à la protéomique chimique. Tout d'abord, l'utilisation du lien HAZA développé au laboratoire a été appliqué à l'étude des ADN topoisomérases II humaines. Concomitamment, un nouveau lien clivable pour une utilisation en protéomique chimique a été développé.

Dans un second temps, les développements en ligation bioorthogonale, notamment la SPAAC, ont été appliqués à l'élimination d'une drogue circulante dans le sang.

## Références Bibliographiques

1. King, M. ; Wagner, A.  
Developments in the field of bioorthogonal bond forming reactions-past and present trends.  
*Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 825–839.
2. Griffin, B.A.  
Specific Covalent Labeling of Recombinant Protein Molecules Inside Live Cells.  
*Science* **1998**, *281*, 269–272.
3. Patterson, D.M. ; Nazarova, L.A. ; Prescher, J.A.  
Finding the right (bioorthogonal) chemistry.  
*ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 592–605.
4. Saxon, E. ; Bertozzi, C.R.  
Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction.  
*Science* **2000**, *287*, 2007–2010.
5. Saxon, E. ; Armstrong, J.I. ; Bertozzi, C.R.  
A “Traceless” Staudinger Ligation for the Chemoselective Synthesis of Amide Bonds.  
*Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141–2143.
6. Dawson, P.E. ; Muir, T.W. ; Clark-Lewis, I. ; Kent, S.B.  
Synthesis of proteins by native chemical ligation.  
*Science* **1994**, *266*, 776–779.
7. Prescher, J. ; Dube, D. ; Bertozzi, C.  
Chemical remodelling of cell surfaces in living animals.  
*Nature* **2004**, *430*, 873–877.
8. Kolb, H.C. ; Finn, M.G. ; Sharpless, K.B.  
Click Chemistry : Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions.  
*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 2004–2021.
9. Huisgen, R.  
1,3-dipolar cycloadditions. Past and future.  
*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565–632.
10. Rostovtsev, V.V. ; Green, L.G. ; Fokin, V.V. ; Sharpless, K.B.

- A stepwise Huisgen cycloaddition process : copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes.  
*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2596–2599.
11. Tornøe, C.W. ; Christensen, C. ; Meldal, M.  
Peptidotriazoles on solid phase : [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides.  
*J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
12. Lee, L.V. ; Mitchell, M.L. ; Huang, S.J. ; Fokin, V.V. ; Sharpless, K.B. ; Wong, C.H.  
A potent and highly selective inhibitor of human  $\alpha$ -1,3-fucosyltransferase via click chemistry.  
*J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9588–9589.
13. Hong, V. ; Steinmetz, N.F. ; Manchester, M. ; Finn, M.G.  
Labeling live cells by copper-catalyzed alkyne–azide click chemistry.  
*Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 1912–1916.
14. Soriano Del Amo, D. ; Wang, W. ; Jiang, H. ; Besanceney, C. ; Yan, A.C. ; Levy, M. ; Liu, Y. ; Marlow, F.L. ; Wu, P.  
Biocompatible copper(I) catalysts for in vivo imaging of glycans.  
*J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16893–16899.
15. Bevilacqua, V. ; King, M. ; Chaumontet, M. ; Nothisen, M. ; Gabillet, S. ; Buisson, D. ; Puente, C. ; Wagner, A. ; Taran, F.  
Copper-Chelating Azides for Efficient Click Conjugation Reactions in Complex Media.  
*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 5872–5876.
16. Wittig, G. ; Krebs, A.  
Zur existenz niedergliedriger cycloalkine, I.  
*Chem. Ber.* **1961**, *1*, 3260–3275.
17. Agard, N.J. ; Prescher, J.A. ; Bertozzi, C.R.  
A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems.  
*J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
18. Varga, B.R. ; Kállay, M. ; Hegyi, K. ; Béni, S. ; Kele, P.  
A non-fluorinated monobenzocyclooctyne for rapid copper-free click reactions.  
*Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 822–828.



19. Dommerholt, J. ; Schmidt, S. ; Temming, R. ; Hendriks, L.J.A. ; Rutjes, F.P. ; van Hest, J.C. ; Lefeber, D.J. ; Friedl, P. ; van Delft, F.L.  
Readily accessible bicyclononynes for bioorthogonal labeling and three-dimensional imaging of living cells.  
*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 9422–9425.
20. Jewett, J. ; Sletten, E. ; Bertozzi, C.  
Rapid Cu-free click chemistry with readily synthesized biarylazacyclooctynones.  
*J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688–3690.
21. Debets, M.F. ; van Berkel, S.S. ; Schoffelen, S. ; Rutjes, F.P. ; van Hest, J.C. ; van Delft, F.L.  
Aza-dibenzocyclooctynes for fast and efficient enzyme PEGylation via copper-free (3+2) cycloaddition.  
*Chem. Commun. (Camb).* **2010**, *46*, 97–99.
22. Kuzmin, A. ; Poloukhine, A.  
Surface functionalization using catalyst-free azide–alkyne cycloaddition.  
*Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 2076–2085.
23. Sletten, E. ; Bertozzi, C.  
A hydrophilic azacyclooctyne for Cu-free click chemistry.  
*Org. Lett.* **2008**, *10*, 3097–3099.
24. Ning, X. ; Guo, J. ; Wolfert, M.A. ; Boons, G.J.  
Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast Huisgen cycloadditions.  
*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 2253–2255.
25. Codelli, J. ; Baskin, J.  
Second-generation difluorinated cyclooctynes for copper-free click chemistry.  
*J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486–11493.
26. Agard, N. ; Baskin, J.M. ; Prescher, J.  
A comparative study of bioorthogonal reactions with azides.  
*ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644–648.
27. de Almeida, G. ; Sletten, E.M. ; Nakamura, H. ; Palaniappan, K.K. ; Bertozzi, C.R.  
Thiacycloalkynes for copper-free click chemistry.  
*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 2443–2447.

28. van Geel, R. ; Pruijn, G.J.M. ; van Delft, F.L. ; Boelens, W.C.  
Preventing thiol-yne addition improves the specificity of strain-promoted azide-alkyne cycloaddition.  
*Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 392–398.
29. Chang, P.V. ; Prescher, J.A. ; Sletten, E.M. ; Baskin, J.M. ; Miller, I.A. ; Agard, N.J. ; Lo, A. ; Bertozzi, C.R.  
Copper-free click chemistry in living animals.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 1821–1826.
30. Blackman, M.L. ; Royzen, M. ; Fox, J.M.  
Tetrazine ligation : fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels-Alder reactivity.  
*J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518–13519.
31. Rossin, R. ; van den Bosch, S.M. ; Ten Hoeve, W. ; Carvelli, M. ; Versteegen, R.M. ; Lub, J. ; Robillard, M.S.  
Highly reactive trans-cyclooctene tags with improved stability for Diels-Alder chemistry in living systems.  
*Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 1210–1217.
32. Devaraj, N.K. ; Upadhyay, R. ; Haun, J.B. ; Hilderbrand, S.A. ; Weissleder, R.  
Fast and sensitive pretargeted labeling of cancer cells through a tetrazine/trans-cyclooctene cycloaddition.  
*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 7013–7016.
33. Rossin, R. ; Renart Verkerk, P. ; van den Bosch, S. ; Vulders, R. ; Verel, I. ; Lub, J. ; Robillard, M.  
In Vivo Chemistry for Pretargeted Tumor Imaging in Live Mice.  
*Angewandte Chemie* **2010**, *122*, 3447–3450.
34. Kiick, K.L. ; Saxon, E. ; Tirrell, D.A. ; Bertozzi, C.R.  
Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 19–24.
35. Saxon, E. ; Luchansky, S.J. ; Hang, H.C. ; Yu, C. ; Lee, S.C. ; Bertozzi, C.R.  
Investigating cellular metabolism of synthetic azidosugars with the Staudinger ligation.  
*J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14893–14902.

36. Rudolf, G.C. ; Heydenreuter, W. ; Sieber, S.A.  
Chemical proteomics : ligation and cleavage of protein modifications.  
*Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 110–117.
37. Geurink, P.P. ; Florea, B.I. ; Li, N. ; Witte, M.D. ; Verasdonck, J. ; Kuo, C.L. ;  
van der Marel, G.A. ; Overkleeft, H.S.  
A cleavable linker based on the levulinoyl ester for activity-based protein profiling.  
*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 6802–6805.
38. Gartner, C.A. ; Elias, J.E. ; Balamarski, C.E. ; Gygi, S.P.  
Catch-and-release reagents for broadscale quantitative proteomics analyses.  
*J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 1482–1491.
39. Budin, G. ; Moune-Dimala, M. ; Leriche, G. ; Saliou, J.M. ; Papillon, J. ; Sanglier-  
Cianféroni, S. ; Van Dorsselaer, A. ; Lamour, V. ; Brino, L. ; Wagner, A.  
Nondenaturing chemical proteomics for protein complex isolation and identifica-  
tion.  
*Chembiochem* **2010**, *11*, 2359–2361.
40. Olson, J.P. ; Kwon, H.B. ; Takasaki, K.T. ; Chiu, C.Q. ; Higley, M.J. ; Sabatini,  
B.L. ; Ellis-Davies, G.C.  
Optically selective two-photon uncaging of glutamate at 900 nm.  
*J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5954–5957.
41. Amatrudo, J.M. ; Olson, J.P. ; Lur, G. ; Chiu, C.Q. ; Higley, M.J. ; Ellis-Davies,  
G.C.  
Wavelength-selective one- and two-photon uncaging of GABA.  
*ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5*, 64–70.
42. Azoulay, M. ; Tuffin, G. ; Sallem, W. ; Florent, J.C.  
A new drug-release method using the Staudinger ligation.  
*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3147–3149.
43. Versteegen, R.M. ; Rossin, R. ; ten Hoeve, W. ; Janssen, H.M. ; Robillard, M.S.  
Click to release : instantaneous doxorubicin elimination upon tetrazine ligation.  
*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 14112–14116.

# Synthèse de sondes d'affinité pour l'étude en protéomique chimique de topoisomérase IIA

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Dr. Valérie Lamour, Claire Batisse et Claire Bedez, financées par la Fondation Recherche Médicale et la fondation ARC. Elles ont réalisé les tests de relaxations et les expériences de pulldown présentés au cours de ce chapitre.

## 1. Topoisomérase IIA et ses inhibiteurs

### 1.1 Topoisomérase IIA

Les ADN topoisomérases sont des enzymes qui permettent de modifier la structure topologique de l'ADN. En effet, si l'ADN est souvent représenté sous la forme de deux brins formant une double hélice linéaire, il est en réalité surenroulé (Fig 19) lorsqu'il se trouve sous forme de chromosome. Ce surenroulement, similaire à celui que l'on observait avec le fil du téléphone, empêche notamment la réplication.

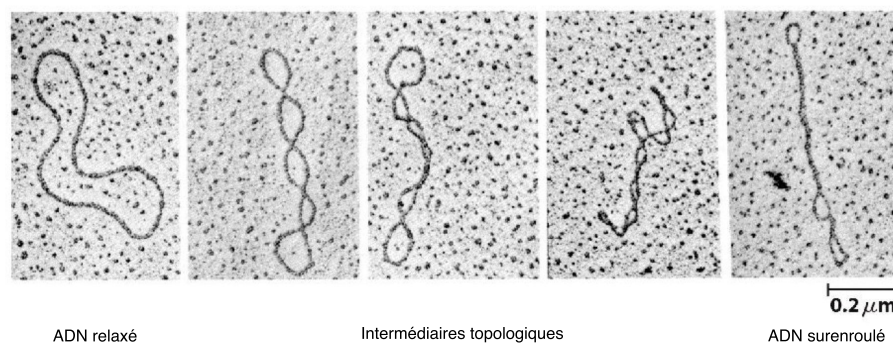


FIGURE 19 – Différentes formes topologiques de l'ADN, de sa forme relaxée (désenroulée) à sa forme surenroulée<sup>1</sup>

Pour palier à ce phénomène, les ADN topoisomérases, à l'image d'un ciseau, créent une coupure dans l'ADN qui permet le passage d'un autre segment d'ADN, avant de le refermer (Fig 20). Noeud après noeud, elles permettent donc de retrouver un ADN relaxé, prêt pour la réplication. Grâce à ce rôle clé dans la vie cellulaire, les ADN topoisomérases sont des cibles thérapeutiques en tant qu'anticancéreux mais aussi antibactériens.

Les ADN topoisomérases sont une grande famille de protéines. Chez l'homme, il existe trois sortes d'ADN topoisomérases : IA, IB et IIA. Les ADN topoisomérases I sont des protéines monomériques, alors que les ADN topoisomérase II sont des protéines homodimériques. Une autre distinction entre les ADN topoisomérases de type I et II existe en fonction du nombre de brins qu'elles coupent lors d'un cycle. Les ADN topoisomérases de type I ne coupent qu'un seul des deux brins de la double hélice, alors que les ADN topoisomérases de type II coupent les deux brins. La distinction entre les types IA et IB se fait par le mécanisme de coupure et de désenroulement. Ainsi, les ADN topoisomérases de type A provoquent la coupure en position 5' sur le sucre (Fig 21), et elles procèdent au désenroulement par passage du simple ou double brin à travers cette coupure. Les ADN topoisomérases de type B quant à elles réalisent la coupure en position 3' et procèdent au désenroulement par rotation. Au cours de ce travail, seules les ADN topoisomérases IIA humaines ont été étudiées.

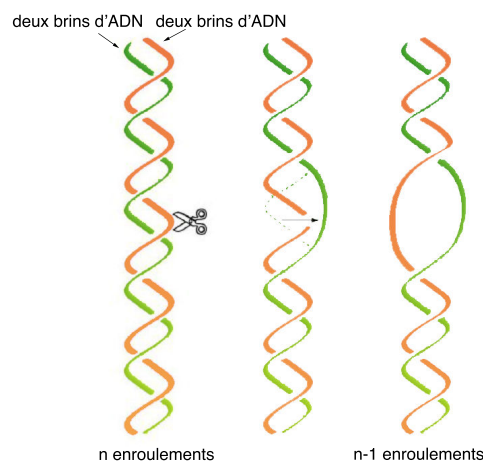


FIGURE 20 – Désenroulement de l'ADN par intervention de l'ADN topoisomérase IIA, représentée par la paire de ciseau<sup>2</sup>

Topoisomérase IIA humaine (Top2) est une protéine homodimérique. Elle possède deux isoformes,  $\alpha$  et  $\beta$ , dont les monomères possèdent un poids moléculaire de 170 kDa et 180 kDa respectivement. Elle présente quatre domaines importants :

- en N terminal, le domaine ATP

- un domaine de liaison à l'ADN
- un domaine de libération de l'ADN, appelé C-gate
- en C terminal, un domaine dont la structure et la fonction sont encore peu décrites

Au coeur du domaine de liaison à l'ADN se situe une tyrosine, qui, par une réaction de transestérification sur le groupement phosphodiester, provoque la coupure dans l'ADN en position 5'. Une seconde transestérification permet la religation de l'ADN après le passage de l'autre double brin.

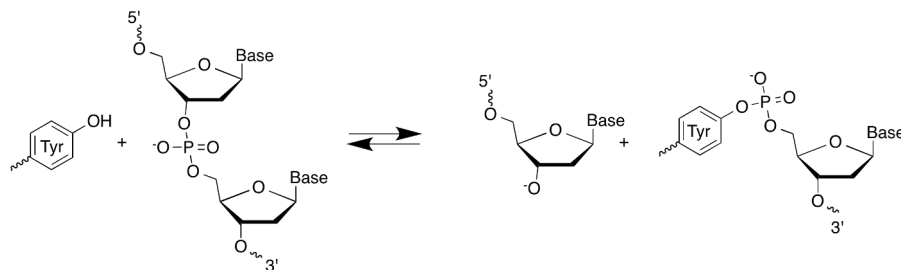


FIGURE 21 – Une transestérification au niveau d'un groupement phosphodiester en position 5' provoque la coupure/refermeture de l'ADN en présence d'une tyrosine du site actif de Top2

Le cycle catalytique de la protéine commence par la liaison entre Top2 et un premier segment d'ADN, appelé segment G pour gate (porte) (Fig 22-A). La dimérisation du site ATP par la liaison avec deux molécules d'ATP permet la capture du second segment d'ADN, appelé segment T pour transport (Fig 22-B,C). La consommation d'une molécule d'ATP permet le clivage du segment G (Fig 22-D), et le passage du segment T au travers (Fig 22-E). La refermeture du segment G provoque alors l'ouverture de la C-gate, qui libère le segment T (Fig 22-F) puis la libération d'une molécule d'ADP permet au système de retrouver sa configuration initiale (Fig 22-G). Un nouveau fragment T peut alors de nouveau être capturé (Fig 22-C) et le désenroulement peut ainsi continuer.

Ainsi, la Top2 est une enzyme essentielle pour diminuer les contraintes apparues dans l'ADN et le préserver lors de la réplication. Les cellules cancéreuses se multipliant rapidement de façon anarchique, elles ont donc besoin des topoisomérases pour préserver l'ADN qui, sans elles, se dégraderait et déclencherait l'apoptose cellulaire.

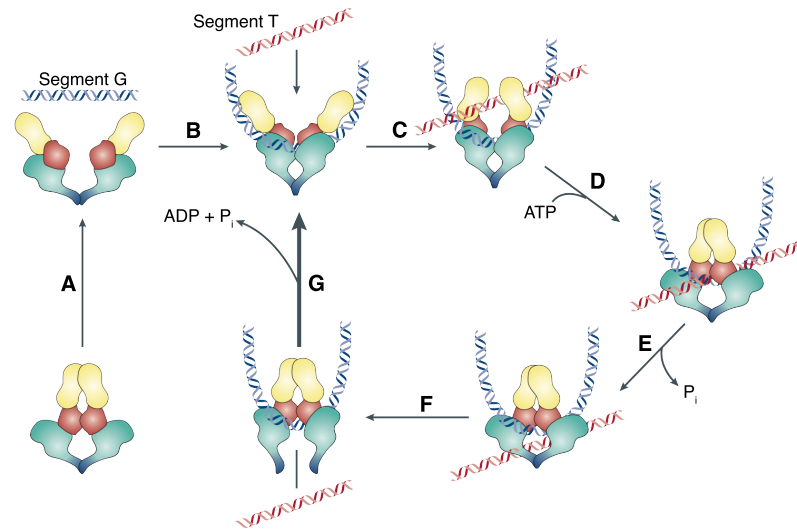


FIGURE 22 – Cycle catalytique de Top2<sup>3</sup>

## 1.2 Les inhibiteurs d'activité de la Top2

L'importance des topoisomérases au sein de la réplication des cellules en fait des protéines qui présentent un grand intérêt thérapeutique pour le traitement du cancer. Il existe deux grandes classes de drogues agissant sur Top2, les poisons et les inhibiteurs.

Les poisons de Top2 sont parmi les anticancéreux les plus utilisés en chimiothérapie. Ce sont des agents qui vont contribuer à la formation de complexes Top2-ADN coupé stables. Deux modes d'action principaux ont été déterminés<sup>4</sup>. Ainsi, certains poisons comme les ellipticines (Fig 23) promeuvent le clivage de l'ADN par la protéine, étape D du cycle catalytique. D'autres, comme l'étoposide ou les anthracyclines, empêchent la religation de l'ADN, étape F du cycle catalytique. Dans les deux cas, l'augmentation du nombre de complexe ADN-Top2-drogue provoque d'importants changements au niveau cellulaire, qui conduisent à l'activation du mécanisme d'apoptose de la cellule.

De plus, les anthracyclines, dont la doxorubicine, sont également des intercalants de l'ADN<sup>5</sup>. Leur présence au sein de l'ADN empêche alors la Top2 de se fixer sur l'ADN. Elles présentent ainsi une capacité d'inhibition au niveau de l'étape B du cycle catalytique. A de faibles concentrations, la doxorubicine agit comme un poison en formant un complexe ternaire, mais à de forte concentration, elle inhibe la formation du complexe, en empêchant la Top2 de fixer le premier brin d'ADN.

Les inhibiteurs de la Top2 sont des agents qui inhibent le cycle catalytique de la Top2, sans augmenter le nombre d'ADN coupé<sup>3</sup>. Agissant principalement sur le site ATP, ces molécules sont donc peu spécifiques de la Top2. Les seules qui soient sélectives de Top2

sont les bispipérazinediones, comme le dexrazoxane (Fig 23). Elles agissent au niveau de l'étape G du cycle catalytique. La mort cellulaire par apoptose est alors déclenchée par un échec de la mitose, l'ADN restant surenroulé. L'activité anticancéreuse de ces composés est cependant modeste, et leur utilisation en clinique utilise davantage leur pouvoir chélatant.

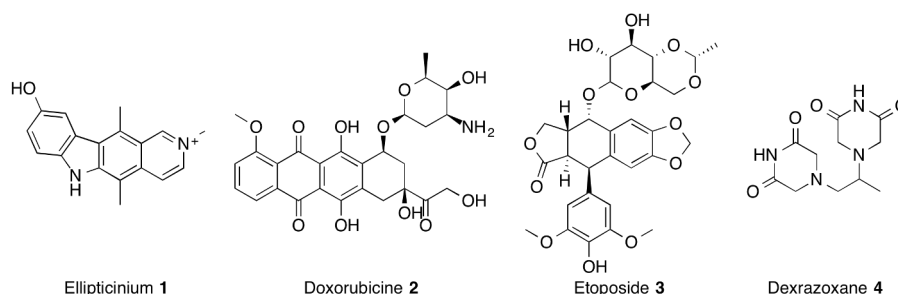


FIGURE 23 – Exemple de poisons et d'inhibiteur de Top2

Pour tester l'activité anti-topoisomérase des molécules, un test de relaxation de l'ADN est réalisé. Dans ce test, la protéine est mise en présence d'ADN surenroulé, d'ATP et de la molécule à tester à différentes concentrations. Après une électrophorèse en conditions natives, les différents états topologiques sont visualisés en présence de bromure d'éthidium, un agent intercalant de l'ADN dont la fluorescence augmente après intercalation. Comme montré sur la figure 24, plus l'ADN est relaxé, moins il migre. En effet, un ADN surenroulé va pouvoir passer facilement dans les mailles du gel, tandis qu'un ADN relaxé va être retardé par celles-ci. Cela permet ainsi de déterminer si la Top2 a pu dérouler l'ADN ou non, donc si la molécule est un inhibiteur de l'activité de la Top2 ou non.

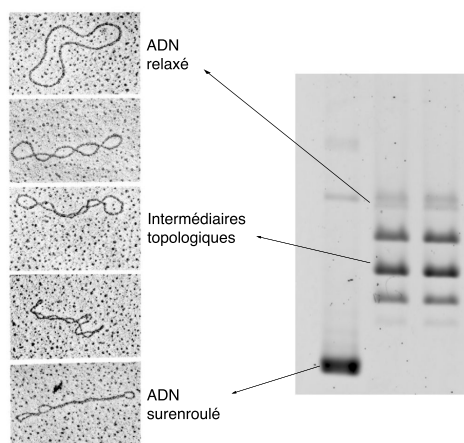


FIGURE 24 – Exemple d'électrophorèse d'ADN en fonction des différents états topologiques<sup>1</sup>



### 1.3 Protéomique chimique

La protéomique chimique permet l'isolation et l'identification de protéines par l'utilisation d'une sonde chimique. Il est ainsi théoriquement possible d'extraire l'ensemble des protéines interagissant avec un médicament donné, afin d'en déterminer non seulement la cible principale, mais aussi les complexes associés et les cibles secondaires.

Une sonde (Fig 25) pour la protéomique chimique a été précédemment développée au laboratoire pour l'étude des interactants de la novobiocine, un antibiotique. La novobiocine inhibe l'ADN gyrase - une topoisomérase bactérienne - en agissant sur son site ATP. La sonde conçue se compose de trois parties, une tête affine - la novobiocine, un lien clivable HAZA, permettant le clivage en conditions non dénaturantes, et une biotine pour se lier au support solide.

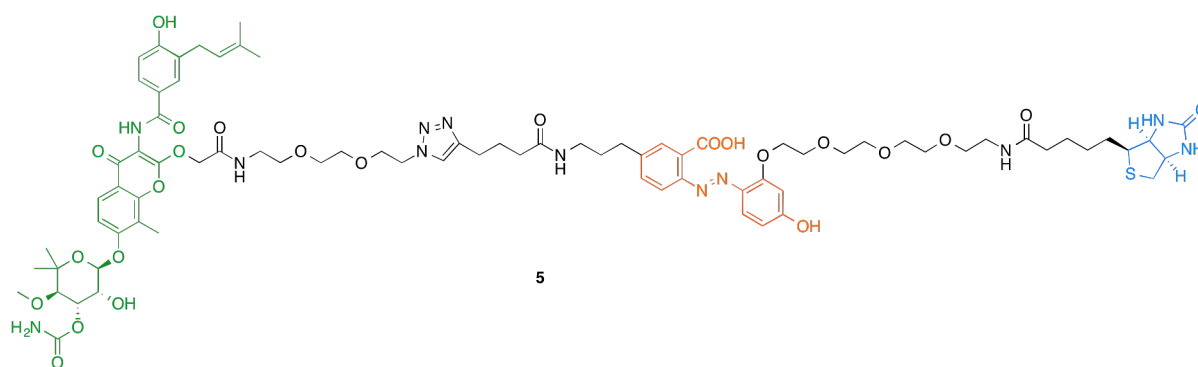


FIGURE 25 – Structure de la sonde **5** pour la protéomique chimique pour l'étude de l'ADN gyrase

Après optimisation, le protocole établi pour l'expérience de capture et libération des protéines est décrit figure 26. Les billes sont dans un premier temps fonctionnalisées avec la sonde (Fig 26-1). Elles sont ensuite incubées en présence du lysat cellulaire (Fig 26-2). Une filtration permet alors d'éliminer tout ce qui ne s'est pas lié à la sonde. Une élution au dithionite de sodium à 5 mM permet ensuite le clivage du lien HAZA en conditions non dénaturantes pour les protéines (Fig 26-3). Finalement, les protéines récupérées sont analysées par spectrométrie de masse (Fig 26-4).

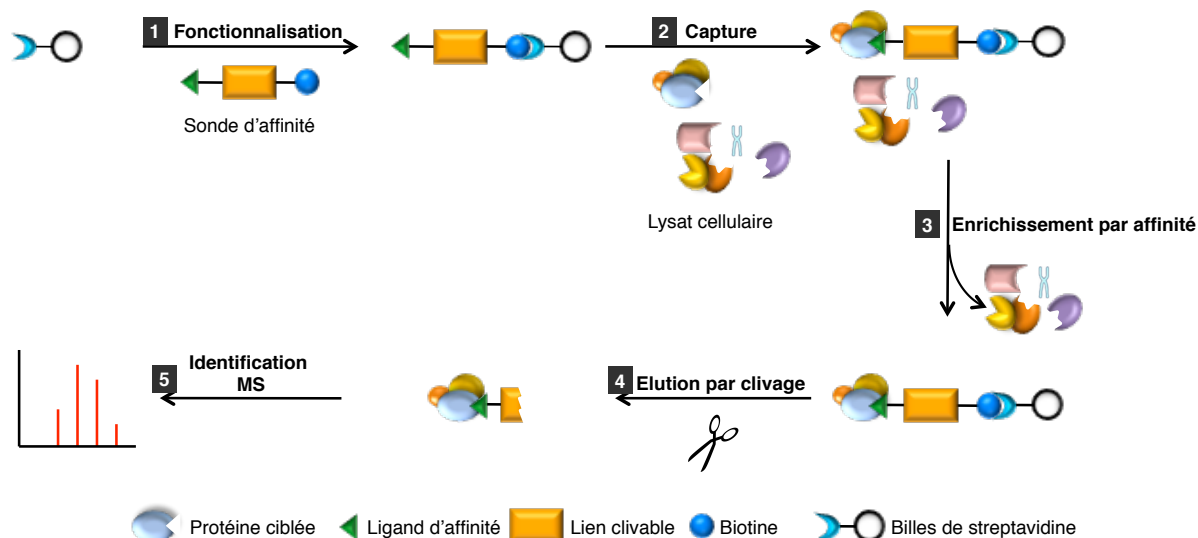


FIGURE 26 – Schéma de principe de la protéomique chimique

Dans la continuité de ces travaux, cette technique a alors été appliquée, au cours de ce travail de thèse, à la détermination des cibles secondaires de molécules ciblant la Top2. Ainsi, trois drogues ont été sélectionnées, étoposide et doxorubicine pour leur vaste utilisation en chimiothérapie du cancer, ainsi que dexrazoxane, comme seul inhibiteur spécifique de la Top2 n'intervenant pas au niveau du complexe avec l'ADN. De nombreuses dérivatisations de doxorubicine et d'étoposide sont décrites dans la littérature, mais aucune concernant le dexrazoxane n'est publiée à ce jour.

## 2. Sondes d'affinité dérivées de Doxorubicine

La doxorubicine est une anthracycline inhibitrice de la Top2. Elle agit non seulement par stabilisation du complexe Top2-ADN coupé, mais aussi par intercalation dans l'ADN.

### 2.1 Première génération : Dérivatisation par formation d'amide

La dérivatisation de la doxorubicine est déjà bien décrite, notamment pour le développement de prodrogue ou encore pour sa vectorisation. Puisqu'elle présente une fonction amine libre, la première fonction utilisée pour la dérivatisation est la fonction amide<sup>6</sup>, par réaction avec un lien OEG portant une fonction acide **9**. La synthèse de ce lien OEG se fait en trois étapes décrites dans la littérature à partir du OEG présentant deux fonctions alcool **6** (Fig 27)<sup>7</sup>.

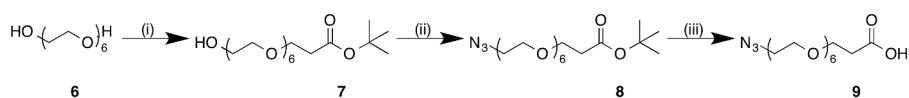


FIGURE 27 – Synthèse du lien OEG bifonctionnel **9** : (i) acrylate de *tert*-butyl, Na métal, THF, ta, 5 jours, 62 %; (ii) DPPA, DBU, Toluène/DMF 9:1, ta, 3 jours, 94 %; (iii) TFA/DCM 1:1, 0 °C-ta, 3 h, qtt

Une fois le lien OEG obtenu, une première sonde d'affinité est synthétisée en deux étapes, tout d'abord un couplage peptidique entre la doxorubicine native **2** et le OEG **9** puis une réaction de click avec le composé alcyne-HAZA-biotine **10** (Fig 28).

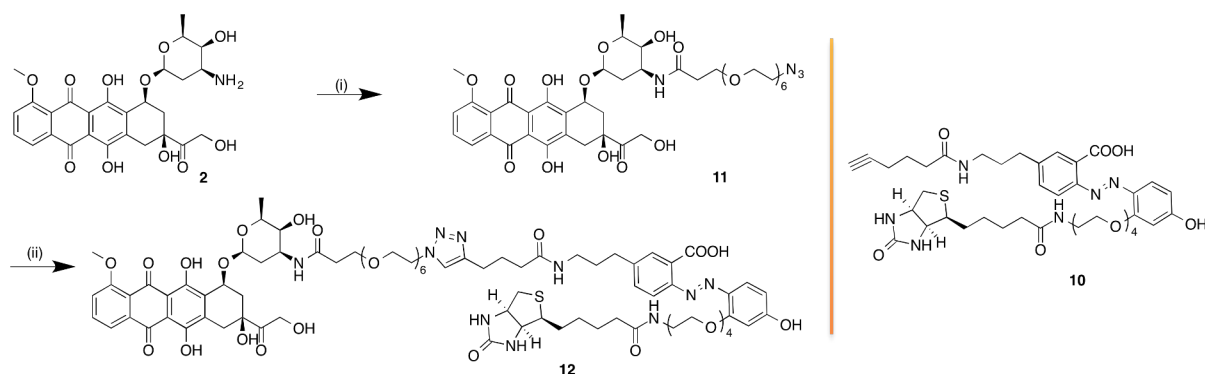


FIGURE 28 – Synthèse d'une première sonde d'affinité dérivée de doxorubicine : (i) **9**, HATU, DIPEA, DMF, ta, 16 h, 50 %; (ii) **10**, CuSO<sub>4</sub>, sodium ascorbate, DMSO, H<sub>2</sub>O, ta, 16 h, 12 %

Avant de procéder à des expériences de pulldown, l'activité de la sonde en tant qu'inhibiteur de Top2 est alors testée. Une inhibition de la Top2 est observée à 200  $\mu$ M pour la sonde **12**, alors que doxorubicine présente une activité inférieure à 1  $\mu$ M. Après relecture de la publication décrite par Vega et collaborateurs, seul des tests de toxicité sur cellules ont été réalisés, permettant la libération de la doxorubicine native par protéolyse, l'activité anti-topoisomérase *in vitro* n'avait pas été évaluée<sup>6</sup>.

## 2.2 Seconde génération : Dérivatisation par amination réductrice

Suite à ce premier résultat, afin de conserver une structure plus proche de la doxorubicine native, notamment la basicité de l'amine<sup>8</sup>, une amination réductrice est donc envisagée, pour obtenir l'amine secondaire. La synthèse de l'aldéhyde **14**, décrite en 1978<sup>9</sup>, est délicate à cause de la forte volatilité du composé, résultant en de mauvais rendements (Fig 29). Une fois l'aldéhyde obtenu, une première tentative d'amination réductrice en présence de 3 équivalents de cyanoborohydrure de sodium a mené à la réduction de la

cétone aliphatique de la doxorubicine. Des conditions plus douces en réduisant la quantité de cyanoborohydrure à 0,3 équivalents ont permis l'obtention du dérivé désiré (31 %).

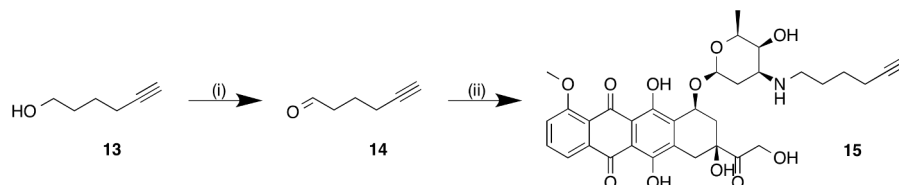


FIGURE 29 – Synthèse d'un second dérivé de doxorubicine : (i) chlorure d'oxalyle, TEA, DMSO, DCM,  $-78^{\circ}\text{C}$ -ta, 1 h, 18 % ; (ii) **2**, cyanoborohydrure de sodium, acide acétique,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  2:1, ta, 16 h, 31 %

Il s'agit alors de synthétiser un nouveau lien HAZA-biotine, contenant le lien OEG **9** déjà synthétisé se terminant par une fonction azoture. Pour cela, à partir de l'intermédiaire Fmoc-HAZA-Boc **16** synthétisé au laboratoire par Michel Mosser, un nouveau lien est obtenu en 5 étapes.

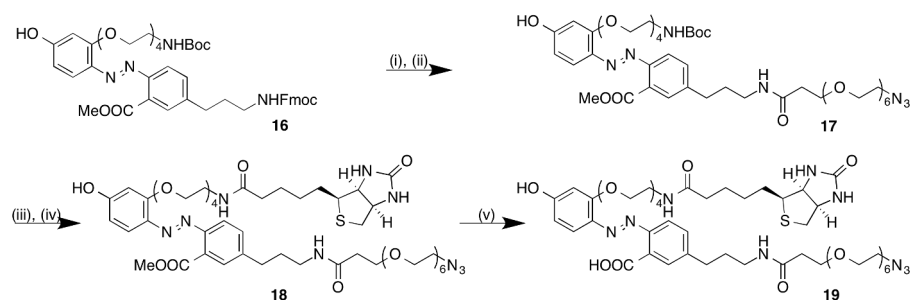


FIGURE 30 – Synthèse d'un second lien clivable HAZA : (i) Pipéridine, DCM, ta, 3 h, qtt ; (ii) **9**, PyBOP, DIPEA, DMF, ta, 16 h, 26 % ; (iii) TFA/DCM 1:1,  $0^{\circ}\text{C}$ -ta, 2 h, qtt ; (iv) biotine, HBTU, DIPEA, DMF, ta, 16 h, 76 % ; (v) LiOH, MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  8:2,  $40^{\circ}\text{C}$ , 16 h, 61 %

Ainsi, une deuxième sonde d'affinité dérivée de doxorubicine a été obtenue par réaction de click entre **15** et **19**.

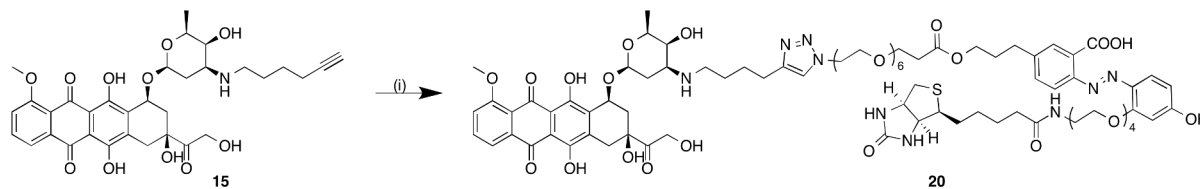


FIGURE 31 – Synthèse d'une seconde sonde d'affinité dérivée de doxorubicine : (i) **19**,  $\text{CuSO}_4$ , sodium ascorbate, DMSO,  $\text{H}_2\text{O}$ , ta, 16 h, 9 %

Les tests de relaxation de l'ADN ont été réalisés pour l'évaluation de l'activité des composés **15** et **20** (Fig 32).

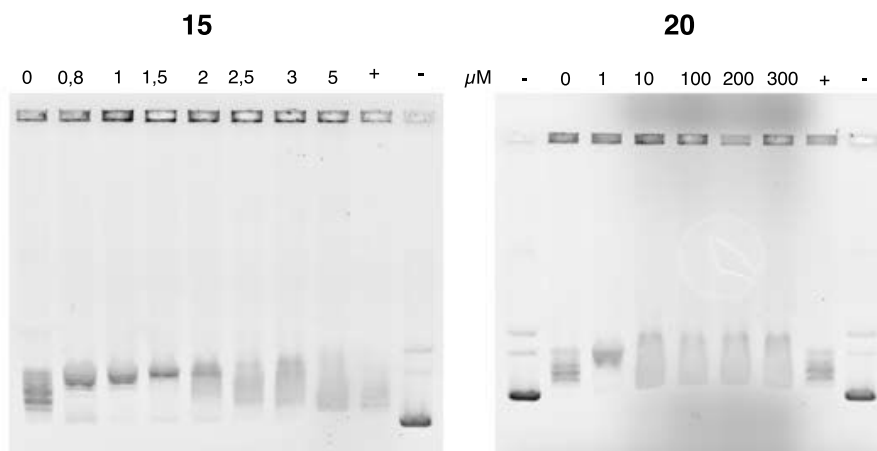


FIGURE 32 – Gels de relaxation de l'ADN colorés au bromure d'éthidium en présence de concentration croissante ( $\mu\text{M}$ ) en sonde **15** et **20**; + : doxorubicine native 5  $\mu\text{M}$ , - : témoin, ADN sans topoisomérase

L'exploitation des gels obtenus est assez délicate. Pour rappel, pour avoir un inhibiteur de la Top2, l'ADN doit rester surenroulé, et donc migrer en bas du gel, comme observé dans les puits témoins. Lorsque la Top2 agit, des bandes intermédiaires sont observées, comme dans les puits où la concentration est de zéro. Les signaux observés sur l'ensemble des autres pistes ne ressemblent pas à ce que l'on attend sur un gel d'ADN, mais correspondent sans doute à l'intercalation des dérivés de la doxorubicine dans l'ADN. Ainsi, il est difficile de conclure quant à l'activité anti-Top2 des sondes étudiées.

### 2.3 Purification par affinité

Malgré la probable absence d'activité anti-Top2 des deux sondes **12** et **20**, il est intéressant de voir si d'autres protéines présentent une affinité pour la doxorubicine, qui serait des cibles secondaires de la drogue. Ainsi, différentes expériences de pulldown ont été réalisées sur des lysats de cellules cancéreuses humaines.

#### Protocole de Pulldown

Pour obtenir le lysat cellulaire, les cellules sont suspendues dans un tampon de lyse, en présence d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases, pour laisser les protéines dans leur état natif ainsi que des DNAase et des RNAase pour casser l'ADN et l'ARN. Les cellules sont ensuite lysées par sonication. Le lysat est clarifié par centrifugation et la concentration en protéines est mesurée par la méthode de Bradford.

Les billes magnétiques de streptavidine sont fonctionnalisées avec la sonde par une incubation à température ambiante pendant 1 h 30. Un contrôle négatif est réalisé en utilisant des billes non fonctionnalisées. Après un lavage, les billes sont incubées 1 h en présence du lysat cellulaire, à 4 °C. Un nouveau lavage pour éliminer les protéines intéraffaisant de manière non-spécifique est réalisé, puis les protéines sont éluées 15 min en présence de dithionite de sodium à 5 mM.

Les protéines sont visualisées par gels SDS-PAGE colorés au bleu de coomassie et/ou nitrate d'argent (Fig 33-A). Pour l'analyse en spectrométrie de masse, les protéines éluées sont colorées après SDS-PAGE 4-12 % au Safe Blue Stain (Fig 33-A).

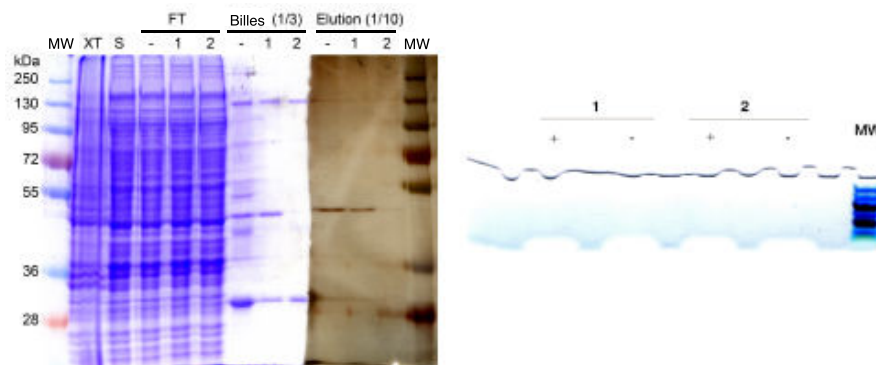


FIGURE 33 – Gels SDS-PAGE obtenus après le pulldown sur lysat cellulaire. **XT** : extrait cellulaire complet, **S** : surnageant après centrifugation (lysat cellulaire), **FT** : Flow-through, fraction non retenue sur les billes

Après l'analyse par spectrométrie de masse, le nombre de protéines identifiées est souvent très important, pouvant aller de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de protéines. L'étape clé de l'analyse est alors de faire le tri parmi les protéines, pour ne conserver que celles qui sont réellement pertinentes. Pour réaliser ce tri, plusieurs critères sont mis en place :

- identification des protéines à partir de 1 peptide
- exclusion des kératines humaines
- exclusion des protéines apparaissant dans le contrôle et dont le nombre de peptides est supérieure à 2/3 du nombre de peptides en présence de sonde
- exclusion des protéines qui n'apparaissent qu'une fois quand plusieurs expériences sont réalisées

Des statistiques descriptives sont alors réalisées : nombre de protéines, localisation des protéines, activité cellulaire. Une autre donnée intéressante est fournie par le logiciel String, qui permet de visualiser les interactions connues entre les différentes protéines.

## Avec la sonde 12

Cette sonde a été testée sur des lysats de cellules HeLa et RS4;11. Les cellules HeLa proviennent d'un prélèvement de métastase sur une patiente présentant un cancer du col de l'utérus. Les cellules RS4;11 ont été prélevées au niveau de la moelle épinière d'une patiente atteinte d'une leucémie lymphoblastique aiguë.

Au cours de ces expériences, peu de protéines ont été capturées, 35 dans le cas des cellules HeLa, 4 avec RS4;11. Parmi celles-ci ne figure pas la Top2, comme cela était attendu. Après le tri pour ne conserver que les protéines pertinentes, seulement deux protéines sont conservées dans chaque expérience (Fig 34).

Protéine	Description	Fonction
Cellules Hela		
FLG2	Filaggrin-2	Activité structurale, catalytique
GSTP1	Glutathione S-transférase P	Transférase
Cellules RS4;11		
TBB4B	Tubulin beta-4B chain	Constitution du cytosquelette
TBA3C	Tubulin alpha-3C chain	Constitution du cytosquelette

FIGURE 34 – Protéines capturées lors du pulldown sur les cellules HeLa et RS4;11 par la sonde 12

Suite au faible nombre de protéines capturées sur les cellules HeLa, et puisque doxorubicine est à priori un médicament qui pénètre dans le noyau pour s'intercaler dans l'ADN, le pulldown est alors réalisé sur les noyaux de cellule HeLa. 80 protéines sont alors capturées, et après application des critères de tri, seules 9 protéines sont conservées, résumées dans la figure 35.

Protéine	Description	Fonction
PERM	Myeloperoxidase (MPO)	Oxydoréductase
PIGR	Polymeric immunoglobulin receptor	Liaison à des protéines
LYSC	Lysozyme C	Hydrolase
IGHG1	Ig gamma-1 chain C region	Liaison à des protéines
IGHG3	Ig gamma-3 chain C region	Liaison à des protéines
ARGI1	Arginase-1	Hydrolase
ZA2G	Zinc-alpha-2-glycoprotein (AZGP1)	Liaison à des protéines, Activité catalytique
TRFL	Lactotransferrin (LTF)	Hydrolase
HS71L	Heat shock 70 kDa protein 1-like (HSPA1L)	Liaison à des protéines, à l'ADN

FIGURE 35 – Protéines capturées lors du pulldown sur les noyaux HeLa par la sonde 12

Tout d'abord, la Top 2 n'a pas été capturée au cours de l'expérience. Étonnamment, l'analyse de leur localisation cellulaire montre que la plupart des protéines sont des protéines

sécrétées (80 %), et que les 20 % restants sont des protéines cytoplasmiques (Fig 36). Elles sont principalement impliquées dans la réponse immunitaire et les processus métaboliques. L'analyse de String met en évidence une unique interaction, entre le lysozyme et la lactotransferrine, des antimicrobiens.

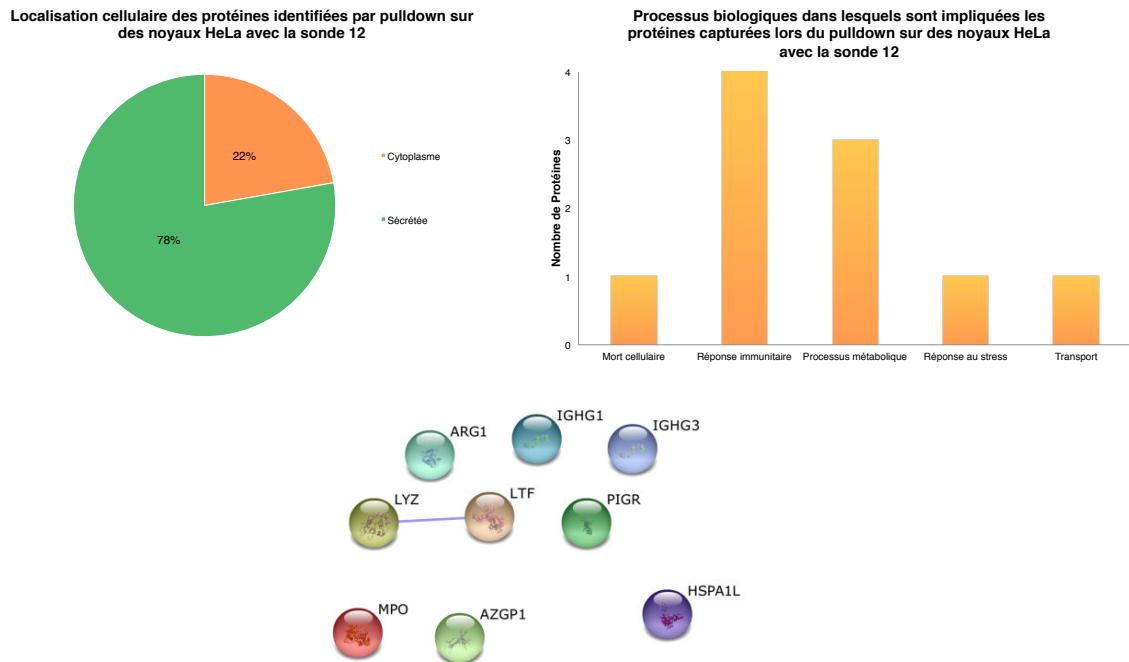


FIGURE 36 – Analyse des propriétés des protéines capturées lors du pulldown sur les noyaux de cellules HeLa par la sonde **12**

Ainsi, aucune protéine nucléaire n'a été capturée lors de ces pulldowns. Pour améliorer la détection des protéines du noyau, mais aussi pour augmenter la certitude de l'interaction entre la protéine et la sonde, il serait intéressant de pouvoir travailler sur un extrait nucléaire plus pur.

### Avec la sonde **20**

Au vu des résultats précédents sur les cellules HeLa, la sonde **20** a été utilisée pour le pulldown sur des cellules RS4;11. 17 protéines sont capturées lors de cette expérience, 13 sont conservées après le tri (Fig 37).



Protéine	Description	Fonction
XRCC5	X-ray repair cross-complementing protein 5	Réparation de l'ADN
XRCC6	X-ray repair cross-complementing protein 6	Réparation de l'ADN
PRKDC	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	Activité transférase
TBB5	Tubulin beta-5 chain	Constitution du cytosquelette
TBA4A	Tubulin alpha-4A chain	Constitution du cytosquelette
TBB4B	Tubulin beta-4B chain	Constitution du cytosquelette
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Activité catalytique
hnRNP M	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	Ribonucléoprotéine
DCD	Dermcidin	Activité peptidase
TP5	Lamina-associated polypeptide 2 $\alpha$	Liaison à l'ADN
HSP7C	Heat shock cognate 71 kDa protein	Activité chaperone
GRP75	Stress-70 protein	Activité chaperone
H2A1H	Histone H2A type 1-H	Liaison à l'ADN

FIGURE 37 – Protéines capturées lors du pulldown sur les cellules RS4;11 par la sonde **20**

Encore une fois, la Top2 n'a pas été capturée. Dans ce cas, la majorité des protéines sont issues soit du noyau, soit du cytoplasme (Fig 38). Elles sont principalement impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques, mais aussi dans la croissance cellulaire. Enfin, l'analyse de String met en évidence les interactions entre XRCC5, XRCC6 et PRKDC.

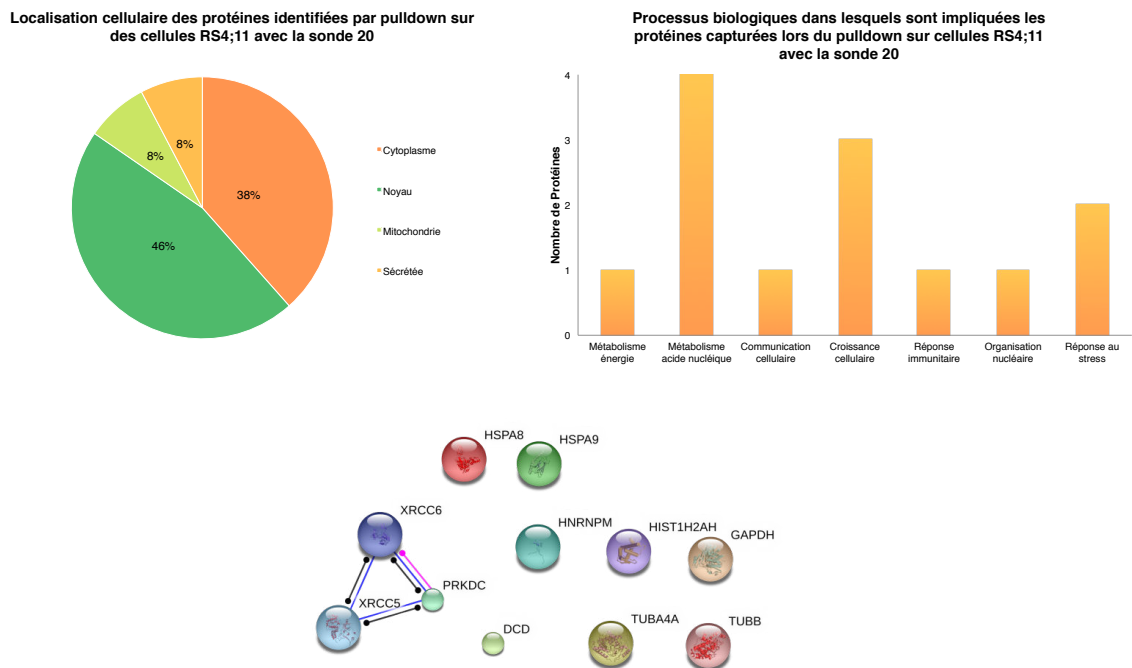


FIGURE 38 – Analyse des propriétés des protéines capturées lors du pulldown sur les cellules RS4;11 par la sonde **20**

Suite à ces premiers travaux, il serait intéressant de vérifier *in vitro* l'activité de doxoru-

bicine sur les protéines XRCC5, XRCC6 et PRKDC. De plus, deux protéines chaperones ayant été capturées au cours de deux pulldown différents, il serait pertinent d'explorer le rôle de doxorubicine sur ces protéines.

### 3. Sondes d'affinité dérivées de l'Étoposide

L'étoposide est un poison de la Top2, couramment utilisé en chimiothérapie. Il stabilise le complexe Top2-ADN coupé. Contrairement à la doxorubicine, il ne s'intercale pas dans l'ADN.

#### 3.1 Première génération : Dérivatisation par acétalisation

Dans un premier temps, la dérivation décrite par Yalowich en 2001 a été envisagée<sup>10</sup>. Ils proposent une rétro-acétalisation, avant de reformer dans une seconde étape l'acétal avec l'aldéhyde d'intérêt (Fig 39). Ainsi, l'étoposide natif **3** est chauffé en présence d'acide acétique pendant la nuit, la solution étant alors évaporée et purifiée sur HPLC préparative pour conduire au composé **21** (53 %). L'obtention de l'aldéhyde d'intérêt se fait en une étape à partir de l'acide 4-formylbenzoïque (67 %)<sup>11</sup>. Cependant, l'étape d'acétalisation ne permet pas l'obtention du produit d'intérêt, mais simplement de récupérer le produit de départ.

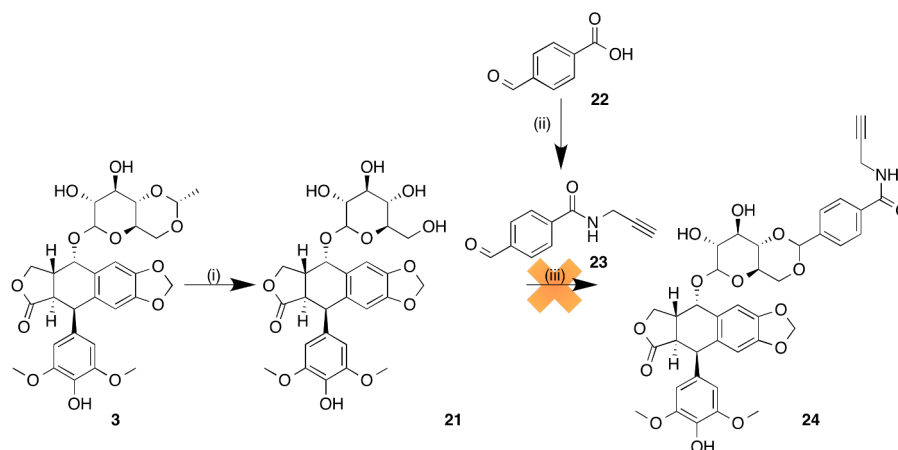


FIGURE 39 – Premier essai de dérivation de l'étoposide : (i) AcOH/H<sub>2</sub>O 1:4, 70 °C, 16 h, 53 %; (ii) propargylamine, EDC, DIPEA, DCM, ta, 2,5 h, 67 %; (iii) TsOH, CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>, ta, 2 jours, 0 %

L'utilisation d'un autre aldéhyde est alors envisagée. La réaction est donc réalisée en présence de 4-éthynylbenzaldéhyde, qui ne conduit pas au produit désiré mais à un mélange d'analogues d'étoposide, certains présentant des protons aromatiques non présents sur le spectre de l'étoposide. Suite à ce premier résultat encourageant, d'autres conditions

d'acétalisation sont utilisées (Fig 40). Le produit est alors identifié par LC-MS, mais la purification par HPLC préparative ne permet malheureusement pas de l'isoler.

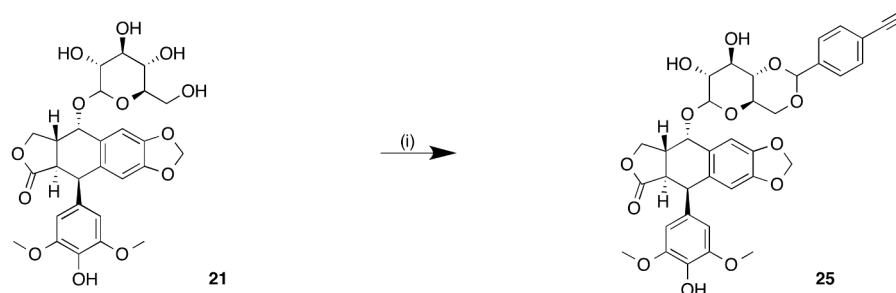


FIGURE 40 – Seconde dérivatisation de l'étoposide : (i) 4-éthynylbenzaldéhyde, acide camphor-sulfonique,  $\text{MgSO}_4$ , THF/ $\text{CHCl}_3$  1:9, ta, 16 h

### 3.2 Seconde génération : Arylation de l'épipodophyllotoxine

Suite à cette première tentative d'obtention d'un dérivé d'étoposide, la dérivatisation est reconsidérée. En effet, de nombreuses dérivatisations de l'étoposide sont décrites comme conduisant à des produits biologiquement actifs, en utilisant la podophyllotoxine comme produit de départ. Cependant, l'utilisation de la podophyllotoxine n'est pas intéressante, car elle nécessite l'épimérisation de l'un des centres asymétriques, et la déméthylation d'un des groupement méthoxy sur la partie phénol pour obtenir des analogues d'étoposide. Débuter la synthèse à partir de la 4-déméthylépipo-podophyllotoxine permet d'éviter ces deux étapes. Parmi les dérivatisations publiées, celle proposée par le groupe de Lee permet l'introduction d'une chaîne latérale très variable tout en conservant l'activité anti-Top2 de la sonde<sup>12</sup>.

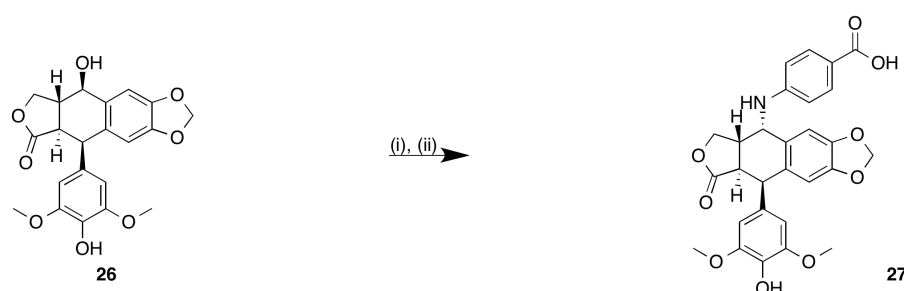


FIGURE 41 – Dérivatisation à partir de la 4-déméthylépipo-podophyllotoxine : (i) NaI,  $\text{MeSO}_3\text{H}$ , DCM, 0 °C-ta, 5 h ; (ii) acide 4-aminobenzoïque,  $\text{BaCO}_3$ , THF, ta, 16 h, 37 %

L'activité de cette sonde intermédiaire a alors été testée sur Top2 selon le test de relaxation de l'ADN. La dérivatisation a ainsi bien permis d'obtenir une sonde inhibitrice de la protéine, de manière similaire à l'étoposide natif (Fig 42).

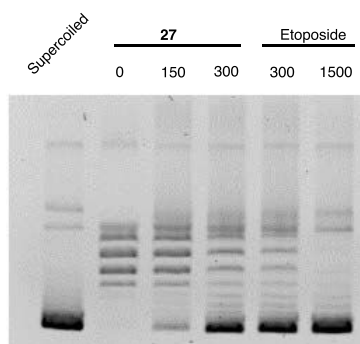


FIGURE 42 – Test de relaxation de l'ADN en présence de différentes concentration ( $\mu\text{M}$ ) de sonde **27**

Suite à ce premier test, une sonde d'affinité a alors été synthétisée (Fig 43). La mono-protection de la diamine **28** (54 %) suivie d'un couplage peptidique sur l'acide 4-(Boc-amino)benzoïque (55 %) puis de la déprotection du groupement Boc a conduit à l'aniline **29**. Cette aniline est alors utilisée dans le couplage sur la 4-déméthylépipodophyllotoxine, permettant l'obtention de l'amine protégée **30** (31 %). Celle-ci est alors déprotégée, et couplée au lien OEG précédemment synthétisé, pour amener au composé azoture **31** (12 %). Une réaction de click avec le lien HAZA **10** permet enfin l'obtention de la sonde d'affinité **32** (10 %).

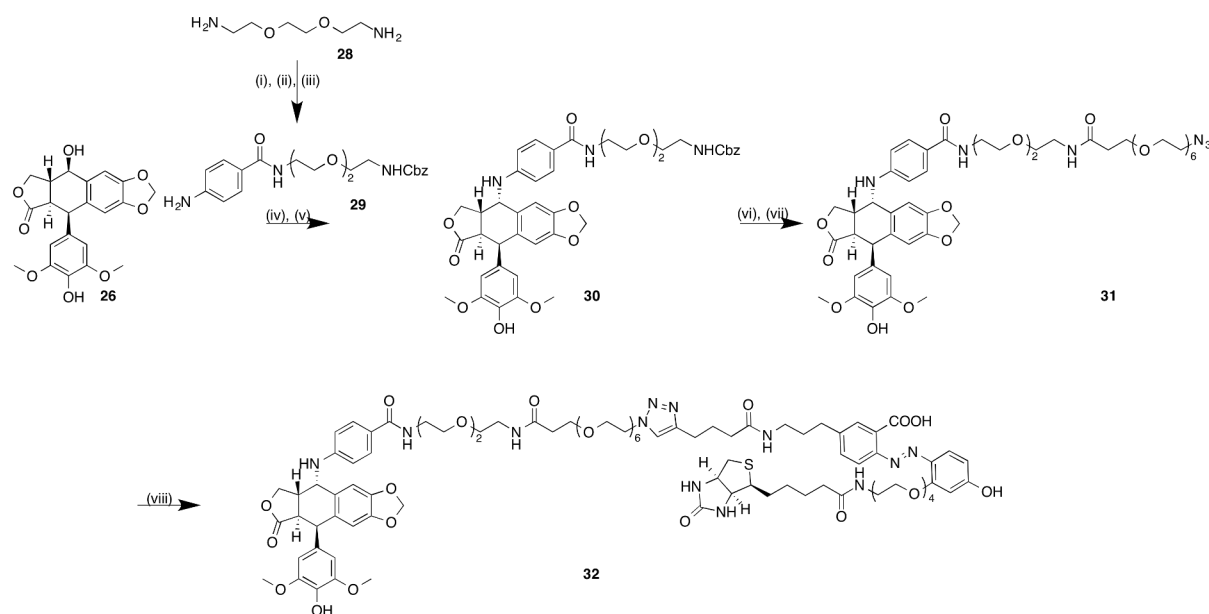


FIGURE 43 – Dérivatisation à partir de la 4-déméthylépipodophyllotoxine : (i) Cbz-OSu, dioxane, ta, 16 h, 54 %; (ii) acide 4-(Boc-amino)benzoïque, EDC, DIPEA, DCM, ta, 16 h, 55 %; (iii) TFA/DCM 1:1, 0 °C, 2 h, qtt; (iv) NaI, MeSO<sub>3</sub>H, DCM, 0 °C-ta, 5 h; (v) **29**, BaCO<sub>3</sub>, THF, ta, 16 h, 31 %; (vi) H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, ta, 16 h, 73 %; (vii) **9**, EDC, DIPEA, DCM, ta, 16 h, 12 %; (viii) **10**, CuSO<sub>4</sub>, ascorbate de sodium, DMSO, H<sub>2</sub>O, ta, 16 h, 10 %

Les tests de relaxation de l'ADN réalisés sur les différents dérivés montrent que la sonde d'affinité présente bien une activité anti-Top2 (Fig 44).

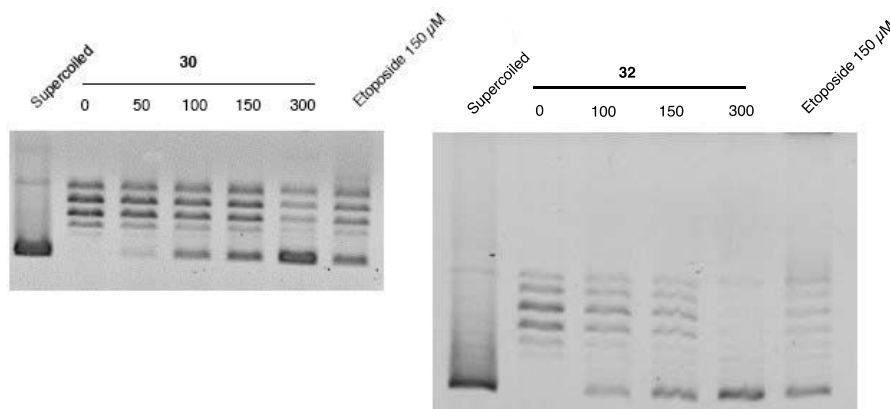


FIGURE 44 – Test de relaxation de l'ADN en présence de différentes concentration ( $\mu\text{M}$ ) de sonde (A) **30**, (B) **32**

### 3.3 Purification par affinité

Les tests de relaxation de l'ADN montrant une activité similaire à l'étoposide natif, des expériences de capture en lysat cellulaire sont alors réalisées. Les lysats cellulaires sélectionnés sont les RS4;11, utilisées précédemment, et les cellules Calu-1, prélevées chez un patient atteint d'un carcinome épidermoïde de la plèvre. Ces lignées cellulaires sont sélectionnées car l'étoposide est utilisé entre autre dans le traitement de la leucémie et du cancer du poumon.

Le protocole utilisé est celui décrit précédemment, l'expérience étant réalisée en triplicat pour chaque type cellulaire, en utilisant la sonde **32**. Avec les deux types de cellules, environ 400 protéines sont capturées lors de l'expérience. Après avoir appliqué les règles de tri décrites précédemment, le nombre de protéines capturées est alors de 8 dans le cas de RS4;11 et 6 dans celui de Calu-1.

#### RS4;11

En utilisant les cellules RS4;11, les protéines identifiées sont les suivantes (Fig 45).

Protéine	Description	Fonction
LGALS3BP	Galectin-3-binding protein	Matrice extra-cellulaire
NONO	Non-POU octamer-binding protein	Liaison à l'ADN, l'ARN, aux protéines
ODZ3	Teneurin-3	Inconnue
S100P	Protein S100-P	Liaison au Ca <sup>2+</sup>
hnRNP U	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	Liaison à l'ARN
hnRNP A3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	Liaison à l'ARN
UBAP2L	Ubiquitin-associated protein 2-like	Inconnue
SPB12	Serpin B12	Inhibiteur de protéase

FIGURE 45 – Protéines capturées lors du pulldown sur les cellules RS4;11 par la sonde **32**

La première observation surprenante est que la Top2 ne figure pas parmi les protéines capturées. Ces protéines sont principalement issues du noyau cellulaire (Fig 46). Elles sont majoritairement impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques. Selon l'analyse de String, aucune de ces protéines ne présente une interaction connue avec une autre protéine capturée.

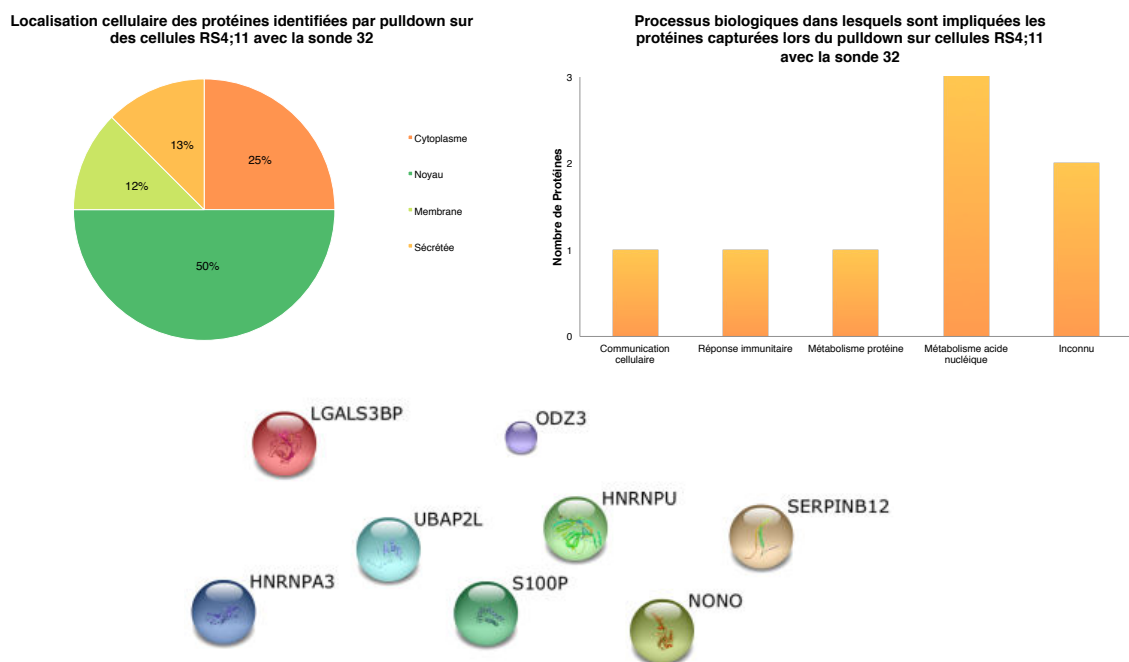


FIGURE 46 – Analyse des propriétés des protéines capturées lors du pulldown sur RS4;11 par la sonde **32**

## Calu-1

Les protéines identifiées lors du pulldown sur les cellules Calu-1 sont résumées dans la figure 47.

Protéine	Description	Fonction
LGALS3BP	Galectin-3-binding protein	Matrice extra-cellulaire
SRP72	Signal recognition particle subunit	Liaison à l'ARN
UBC	Polyubiquitin-C	Protéase
PAIRB	Plasminogen activator inhibitor 1	Liaison à l'ARN
hnRNP A0	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	Liaison à l'ARN
F120A	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1	Liaison à l'ARN

FIGURE 47 – Protéines capturées lors du pulldown sur les cellules Calu-1 par la sonde **32**

De nouveau, la Top2 n'a pas été capturée, malgré l'activité anti-Top2 de la sonde. Parmi les protéines capturées, la majorité se situe dans le cytoplasme (Fig 48). Elles sont principalement impliquées dans le métabolisme des protéines et des acides nucléiques. Parmi ces 6 protéines, 3 sont connues pour interagir ensemble, SRP72, UBC et hnRNP A0.

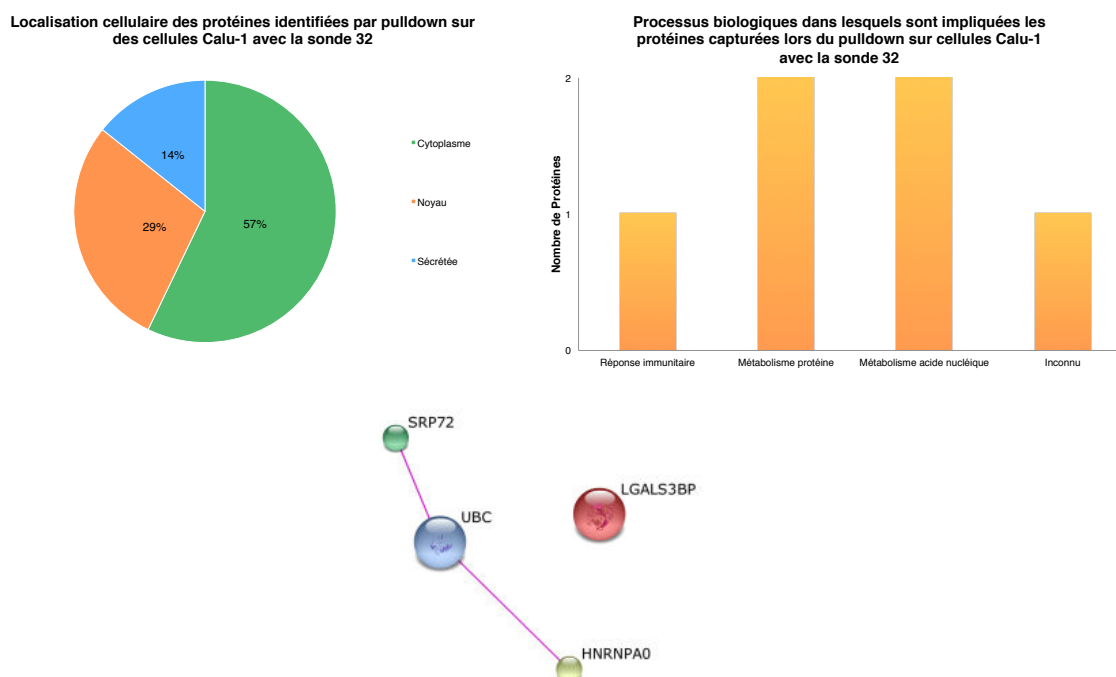


FIGURE 48 – Analyse des propriétés des protéines capturées lors du pulldown sur Calu-1 par la sonde **32**

Il est important de noter que dans les deux pulldowns, la Galectin-3-binding protéine a été capturée. Il s'agit d'une protéine impliquée dans la régulation des activités cellulaires

cancéreuses. Il serait alors intéressant de vérifier *in vitro* l'activité de l'étoposide sur cette protéine.

Comme la Top2 n'a pas été capturée, une expérience de pulldown sur la Top2 recombinante a alors été réalisée, et montre que la sonde ne permet pas sa capture. Puisque la sonde inhibe Top2, la raison de l'absence de capture pourrait résider dans la faiblesse de l'interaction, Top2 étant alors éluée lors des différents lavages.

### 3.4 Troisième génération : Ajout d'une sonde de photoaffinité

Pour tenter de capturer Topoisomérase IIA avec la sonde d'affinité, l'idée est d'introduire une sonde de photoaffinité dans la dérivation pour permettre de former un lien covalent entre la sonde et la protéine, pour pouvoir capturer la protéine. Ainsi, une étape d'irradiation s'ajouterait entre la capture et l'enrichissement, pour s'assurer de conserver les protéines présentant une affinité pour l'étoposide (Fig 49).

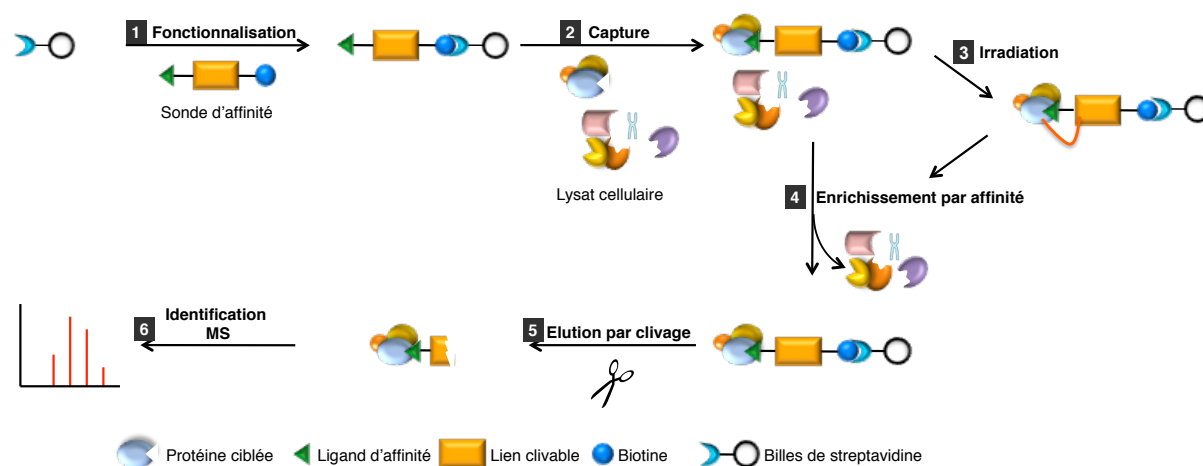


FIGURE 49 – Ajout d'une étape d'irradiation dans le protocole de pulldown

Couramment utilisées, deux fonctions photoactivables sont sélectionnées pour ce travail. Tout d'abord, la diazirine, qui présente l'avantage de réagir à des longueurs d'onde auxquelles les protéines ne sont pas sensibles. De plus, c'est une fonction orthogonale à la réaction de click, mais son coût est conséquent. En parallèle, l'azoture aromatique est également choisi pour son coût bien plus faible, permettant ainsi de tester les réactions, mais également car il s'agit d'une bonne fonction photoactivable, même si les longueurs d'onde de travail sont plus basses.

Au vu de ce qui est présent dans la boîte à outils, quatre molécules sont alors envisagées (Fig 50). Elles sont composées de la partie ligand 4-déméthylpodophyllotoxine, d'une



sonde de photoaffinité diazirine ou azoture aromatique, et d'une fonction de click, alcyne ou azoture aliphatique pour introduire le lien HAZA. Dans le cas de la diazirine, le lien HAZA peut-être introduit avant ou après la ligation à la protéine. Dans le cas de l'utilisation de l'azoture aromatique comme sonde de photoaffinité, la réaction de click ne peut avoir lieu qu'après l'irradiation.

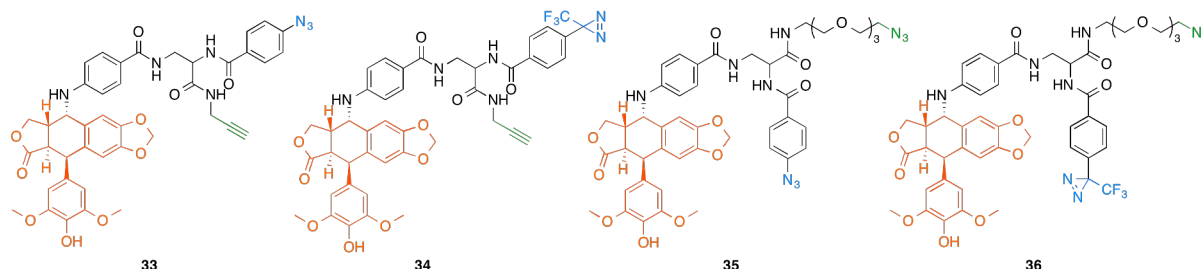


FIGURE 50 – Quatre sondes de photoaffinité envisagée pour la capture de Topoisomérase II

La rétrosynthèse envisagée (Fig 51) pour ces sondes est basée sur l'utilisation d'un petit lien tridenté, l'acide  $N_\alpha$ -Fmoc-L-2,3-diaminopropionique **37**. La partie photosensible est introduite dans la dernière étape par couplage peptidique, pour éviter sa dégradation. Les composés **38** et **39** sont obtenus par réaction de couplage entre la 4-déméthylépidothylotoxine et les anilines **40** et **41**. Celles-ci sont obtenues par deux couplages successifs, d'abord entre **37** et l'aniline protégée **42**, puis avec l'amine propargylique ou le lien OEG amine-azoture.

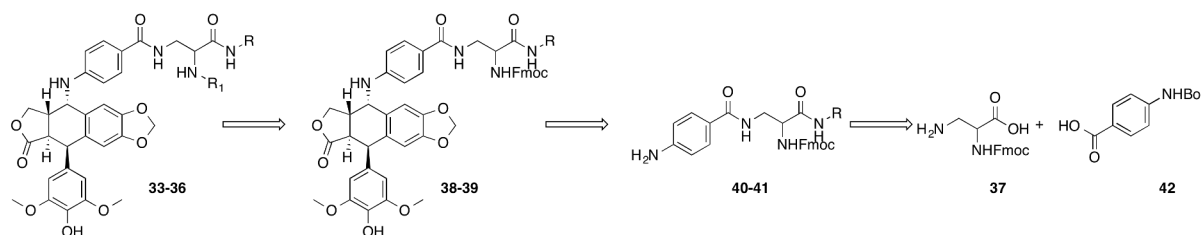


FIGURE 51 – Rétrosynthèse proposée pour l'obtention des sondes de photoaffinité

L'ester activé de l'aniline **42** est donc formé (54 %) puis mis en réaction avec **37** pour former le composé **43** (73 %) (Fig 52). Le couplage de l'acide libre avec l'amine propargylique est réalisé (37 %) puis l'aniline est déprotégée (60 %) pour réagir avec **26** selon le protocole précédemment mis au point. Cependant, le couplage n'a pas lieu et les deux produits de départ sont récupérés. La raison supposée de cette absence de réaction est la très faible solubilité de l'aniline **40**.

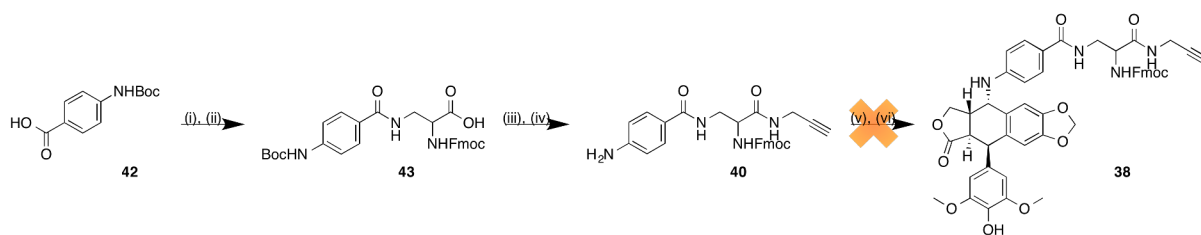


FIGURE 52 – Première synthèse envisagée pour l'obtention des sondes de photoaffinité : (i) EDC, NHS, DIPEA, DCM, ta, 16 h, 54 % ; (ii) **37**, DIPEA, DMF, ta, 16 h, 73 % ; (iii) propargylamine, HBTU, DIPEA, DMF, ta, 16 h, 37 % ; (iv) TFA/DCM 1:1, 0 °C-ta, 2 h, 60 % ; (v) **26**, NaI, MeSO<sub>3</sub>H, DCM, 0 °C-ta, 5 h ; (vi) **40**, BaCO<sub>3</sub>, THF, ta, 16 h, 0 %

L'idée est alors de déprotéger d'abord l'amine secondaire de **43**, de coupler ainsi la sonde photosensible puis la fonction de click, et enfin de terminer par la réaction avec la 4-déméthylépipodophyllotoxine. Cette voie de synthèse est donc testée pour obtenir la sonde **33** (Fig 53). L'amine secondaire est déprotégée et couplée à l'ester activé de l'acide 4-azidobenzoïque pour former le dérivé **46** (71 %). L'acide libre est alors couplé à l'amine propargylique (48 %) et l'aniline est ensuite déprotégée pour obtenir le composé **47**. Le couplage avec la 4-déméthylépipodophyllotoxine est alors réalisé pour conduire au produit désiré **33**.

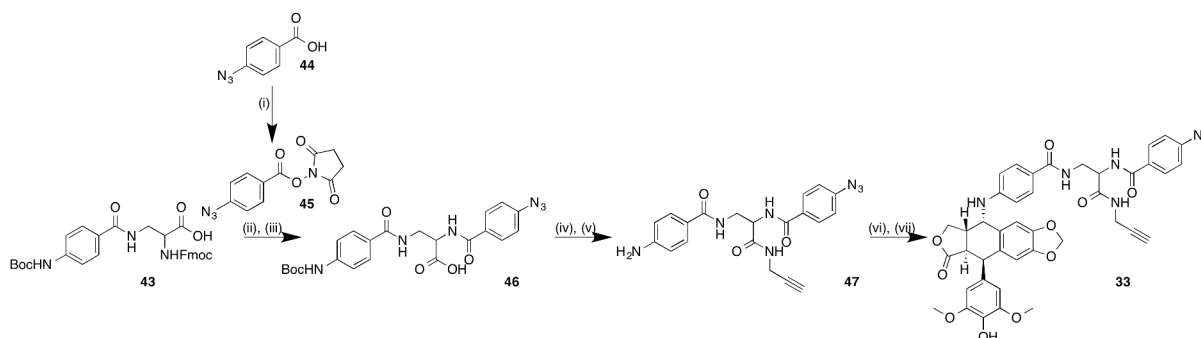


FIGURE 53 – Seconde synthèse envisagée pour l'obtention des sondes de photoaffinité : (i) EDC, NHS, DIPEA, DCM, ta, 16 h, 76 % ; (ii) pipéridine, DCM, ta, 16 h, 89 % ; (iii) DIPEA, DMSO, ta, 16 h, 71 % ; (iv) propargylamine, HBTU, DIPEA, DMF, ta, 16 h, 48 % ; (v) TFA/DCM 1:1, 0 °C-ta, 2 h, qtt ; (vi) **26**, NaI, MeSO<sub>3</sub>H, DCM, 0 °C-ta, 5 h ; (vii) **47**, BaCO<sub>3</sub>, THF, ta, 16 h, 39 %

Similairement, les composés **48** à **50** ont été obtenus (Fig 54). Cependant, de manière surprenante, les couplages sur la 4-déméthylépipodophyllotoxine n'ont pas conduit aux produits souhaités.

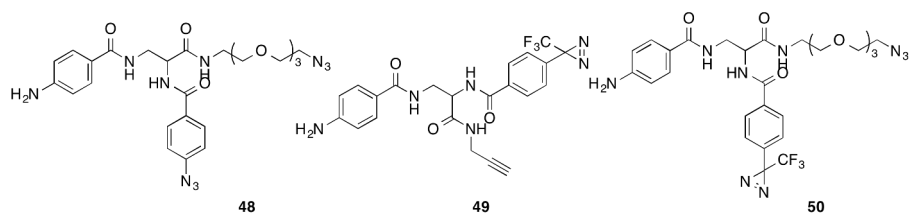


FIGURE 54 – Trois anilines obtenues

Une troisième voie de synthèse a alors été envisagée (Fig 55). Pour cela, le couplage sur la 4-déméthylépipo-dophyllotoxine est réalisé en premier, avec l'acide 4-aminobenzoïque (53 %). L'acide est alors activé, puis couplé sur le Fmoc-DAP-OH **37**. Étonnamment, la présence de DIPEA a provoqué la déprotection du groupement Fmoc, menant ainsi au zwitterion **51**, non purifié au vu de la complication qu'engendre ce type de molécules. Le composé est ainsi directement couplé à l'ester activé **45**, menant au produit **52** avec un rendement sur 3 étapes de 3 %.

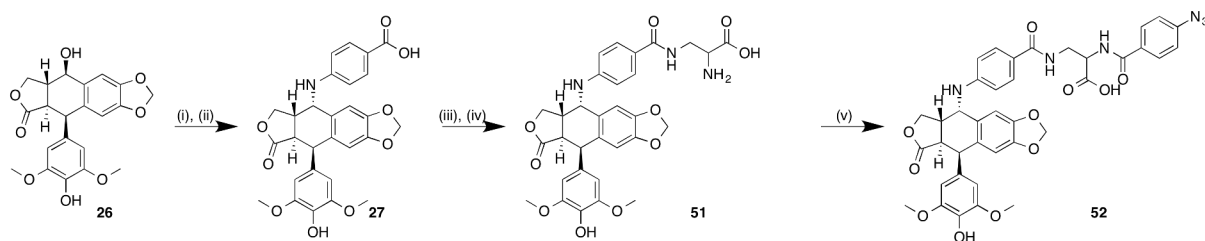


FIGURE 55 – Troisième synthèse envisagée pour l'obtention des sondes de photoaffinité : (i) NaI, MeSO<sub>3</sub>H, DCM, 0 °C-ta, 5 h ; (vii) acide 4-aminobenzoïque, BaCO<sub>3</sub>, THF, ta, 16 h, 37 % (iii) EDC, NHS, DIPEA, DCM, ta, 4 h, qtt ; (iv) DIPEA, DMF, ta, 16 h, qtt ; (v) **45**, DIPEA, DMF, ta, 16 h, 3 %

L'analogue de **52** avec la diazirine a été identifié dans le brut de réaction, cependant il semble se dégrader rapidement au cours de l'extraction, puisqu'il n'a pas pu être isolé.

Ce travail ayant été réalisé en fin de thèse, pour tenter d'obtenir un composé pour les analyses biologiques, une dernière voie de synthèse a été tentée. Devant la complexité d'obtention de ces sondes, et puisque la seule sonde isolée **33** ne peut être couplée au lien HAZA avant irradiation, les quelques milligrammes obtenus de composé **52** ont alors été engagé directement dans le couplage avec le HAZA, sans isolation de la sonde **33** intermédiaire (Fig 56). Ainsi, le lien HAZA **19** a été engagé dans une réaction de click avec l'amine propargylique protégée, puis le composé obtenu a été déprotégé. Le composé **52** a été activé sous forme d'ester NHS, et les deux composés ont été mis en réaction. Malheureusement, le produit désiré **54** n'a pas été formé.

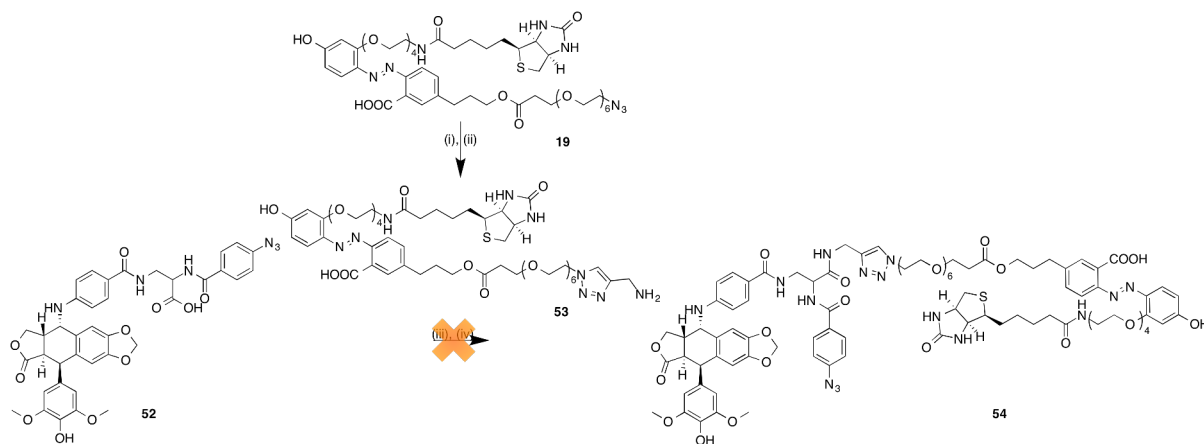


FIGURE 56 – Troisième synthèse envisagée pour l’obtention des sondes de photoaffinité : (i) amine propargylique,  $\text{CuSO}_4$ , ascorbate de sodium,  $\text{H}_2\text{O}$ , ta, 2 h, qtt ; (ii) TFA/DCM 1:1, 0 °C-ta, 2 h, qtt ; (iii) carbonate de *N,N*-disuccinimide, DIPEA, DMF, ta, 4 h ; (iv) DIPEA, DMF, ta, 16 h, 0 %

## 4. Sondes d’affinité dérivées de Dexrazoxane

Le dexrazoxane est l’unique inhibiteur spécifique de la Top2 agissant sur son site ATP. Il n’est pas utilisé en clinique en tant qu’agent anticancéreux, mais pour ses propriétés chélatantes. La dérivatisation de ce composé n’est pas décrite dans la littérature, cependant une structure co-cristallisée de la Top2 avec le dexrazoxane a été publiée (Fig 57)<sup>13</sup>. Elle montre notamment que les pipérazinediones sont impliquées dans des interactions avec la protéine, le méthyle étant libre.

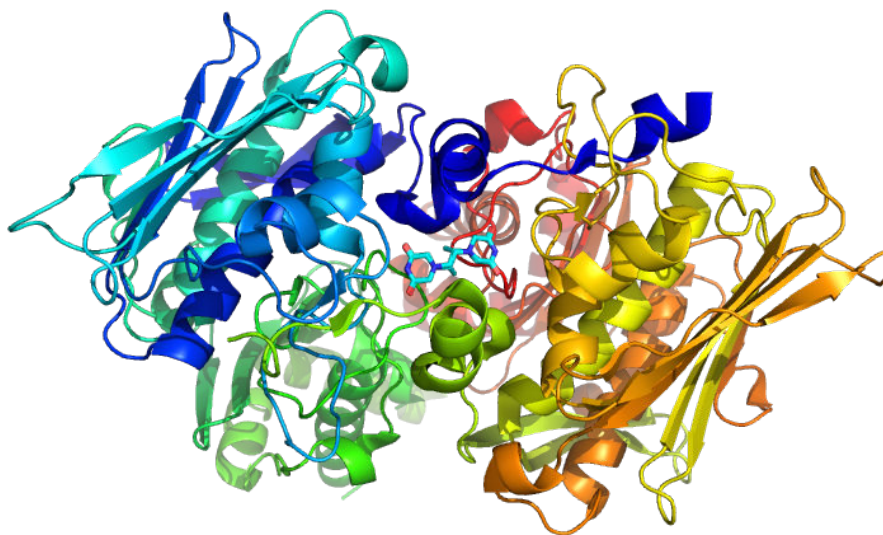


FIGURE 57 – Structure cristalline de Top2 et du dexrazoxane

## 4.1 Synthèse par substitution nucléophile

La modification structurale du dexrazoxane doit se faire sur le groupement méthyle. Puisqu'il n'existe que peu d'analogues du dexrazoxane présentant une chaîne latérale, l'approche au cours de ce travail est de vérifier dans un premier temps la conservation de l'activité d'un composé simple, comme **55**. La rétrosynthèse envisagée introduit dans la dernière étape la chaîne latérale, permettant facilement la modification de celle-ci. Ainsi, le dexrazoxane serait obtenu par bis-substitution d'un dérivé dibromé par la pipérazinedione, obtenue en une étape à partir de l'ester méthylique de glycine (Fig 58). Le dérivé dibromé serait facilement synthétisable à partir de l'alcène correspondant.

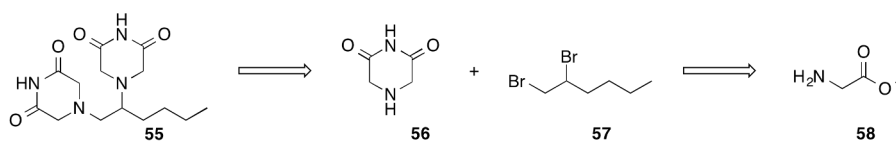


FIGURE 58 – Première rétrosynthèse envisagée pour obtenir les dérivés de dexrazoxane

Ainsi, l'ester méthylique de glycine est mis en réaction en présence de 2-bromoacétamide pour former en une étape la pipérazinedione clé du dexrazoxane (Fig 59). Il est important de noter que ces pipérazinediones sont des composés très polaires et non UV-visible, rendant les manipulations assez compliquées.

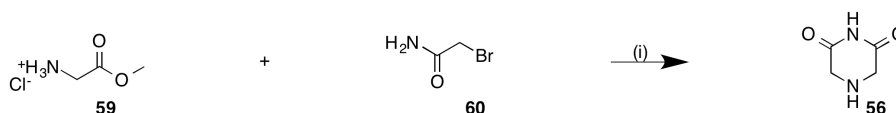


FIGURE 59 – Synthèse de la pipérazinedione clé de dexrazoxane : (i)  $\text{KHCO}_3$ , ACN, reflux, 16 h, 43 %

Pour tenter de substituer cette pipérazinedione sur le composé dibromé **57**, de nombreuses conditions ont été testées, sans succès, ne permettant de récupérer que les produits de départ.

- ACN, tube scellé, 100 °C, 20 min
- DMF, ta, 16 h
- TEA,  $\text{KHCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{DMSO-d}_6$ , ta-50 °C, 16 h
- $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH, ta, 16 h

Lorsque la réaction de substitution est réalisée sur le composé monobromé **61**, la réaction ne fonctionne malheureusement pas, de même que la réaction d'amination réductrice avec l'aldéhyde **62** (Fig 60). Pour vérifier que les protocoles sont corrects, la benzylpipérazine

est mise en réaction via la réaction d'alkylation avec **61** et le produit désiré est obtenu (83 %). De la même façon, la réaction d'amination réductrice avec **62** fonctionne (75 %). Cependant, la bis-alkylation avec **57** ne permet pas l'obtention du produit souhaité.

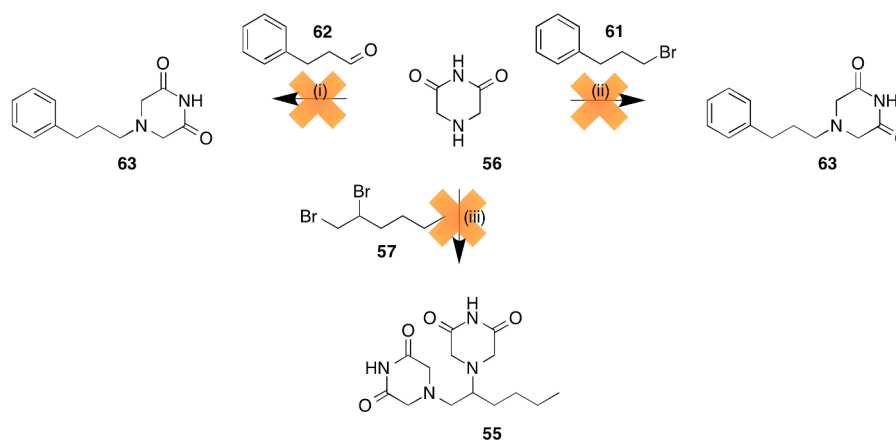


FIGURE 60 – Tentative de substitution par la pipérazinedione **56** : (i)  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ,  $\text{MeOH}/\text{ACN}$  1:3, ta, 16 h ; (ii)  $\text{ACN}$ ,  $25^\circ\text{C}$ , 16 h (iii)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{MeOH}$ , ta, 16 h

L'idée est alors de protéger l'azote de l'imide (Fig 61), puisque cela permet d'introduire une fonction détectable par UV et de plus limite la polarité du composé **56**.

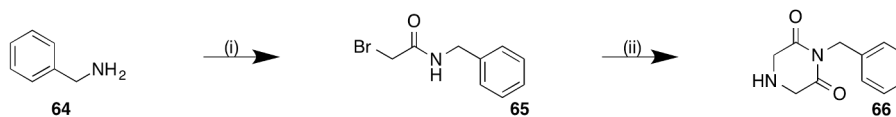


FIGURE 61 – Synthèse de la pipérazinedione protégée **66** : (i) chlorure de bromoacétyle, DIPEA,  $\text{DCM}$ ,  $-78^\circ\text{C}$ -ta, 20 min, qtt ; (ii) **59**,  $\text{KHCO}_3$ ,  $\text{ACN}$ , reflux, 16 h, 36 %

Lorsque les réactions de substitution nucléophiles sont réalisées avec la pipérazinedione protégée **66**, les produits désirés ne sont pas obtenus (Fig 62). Cependant, même si c'est avec un rendement très moyen, le produit d'amination réductrice avec l'aldéhyde **62** est isolé (13 %).

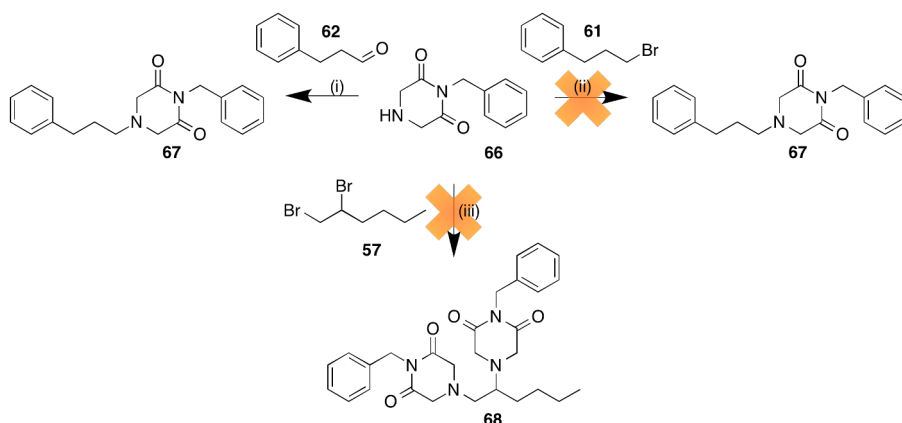


FIGURE 62 – Tentative de substitution par la pipérazinedione **66** : (i)  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , MeOH, ta, 16 h, 14 % ; (ii) ACN, 25°C, 16 h (iii)  $\text{KHCO}_3$ , ACN, ta, 16 h

## 4.2 Synthèse par amination réductrice

Puisque l'amination réductrice fonctionne avec le composé **66**, la synthèse envisagée est alors modifiée. La première étape de formation de l' $\alpha$ -aminonitrile a d'abord été conduite en présence d'oxyde de fer  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , comme décrit par le groupe d'Alishiri<sup>14</sup>. La réaction n'ayant pas lieu, et les produits de départ étant récupérés, la procédure proposée par De<sup>15</sup> a été essayée, permettant d'obtenir l' $\alpha$ -aminonitrile **69** (46 %) . Malheureusement, la réduction du nitrile en aldéhyde n'a jamais pu être observée. En effet, plusieurs conditions ont été testées, soit trop douces en présence de DiBAIH et ne permettant de ne récupérer que le nitrile, soit trop fortes avec  $\text{LiAlH}_4$ , menant alors à la dégradation des produits.

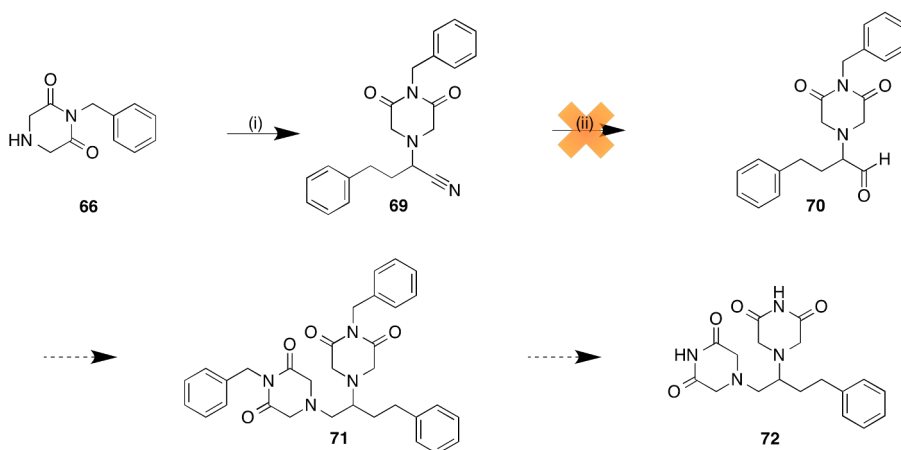


FIGURE 63 – Nouvelle voie de synthèse par un  $\alpha$ -aminonitrile : (i) **62**, TMSCN,  $\text{NiCl}_2$ , ACN, ta, 16 h, 46 % ; (ii) DiBAIH, THF, -78 °C-ta, 2 h

### 4.3 Synthèse par alkylation puis cyclisation

La dernière option envisagée est la voie de synthèse utilisée industriellement pour la production du dexrazoxane<sup>16</sup>. Dans cette synthèse, la 1,2-propanediamine est tétra-alkylée en présence d'acide chloroacétique, puis estérifiée et finalement cyclisée en présence d'ammoniac. Pour obtenir la diamine souhaitée, il a été envisagé d'introduire deux azotures sur une double liaison comme proposé par Thompson et collaborateurs<sup>17</sup>, puis de les réduire en amine par hydrogénation catalytique.

Ainsi, le 4-phényl-1-butène **73** est transformé en composé diazoture **74** en présence d'acétate de manganèse et d'azoture de sodium dans l'acide acétique (73 %), puis réduit par hydrogénation catalytique en la diamine correspondante **75** (85 %). La tétra-alkylation de celle-ci pendant 5 jours a conduit au tétra-acide **76** non isolé suivi de l'estérification permettant l'obtention du tétra-ester **77** (37 %). La cyclisation en présence d'ammoniac dans le dioxane et de méthanolate de sodium a permis à l'identification par LC-MS du composé **78**, malheureusement non isolé du fait des faibles quantités mises en jeu.

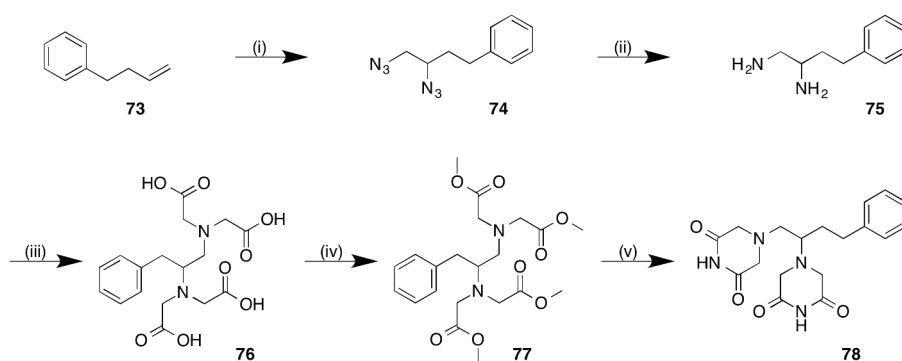


FIGURE 64 – Utilisation de la voie industrielle : (i) acétate de manganèse,  $\text{NaN}_3$ , AcOH, reflux, 2 h, 73 %; (ii)  $\text{H}_2$ , Pd/C, EtOH, ta, 16 h, 85 %; (iii) acide chloroacétique, NaOH,  $\text{H}_2\text{O}$ , 45 °C, 5 jours; (iv)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , MeOH, ta, 16 h, 37 %; (v)  $\text{NH}_3$ , NaOMe, dioxane, MeOH, ta, 3 jours

Au vu de ce premier résultat intéressant, le même protocole a été réalisé sur un alcène dérivatisable. Cependant, les conditions chimiques utilisées pour obtenir la bis-pipérazinedione sont très variées : oxydation dans la première étape, réduction dans la seconde, puis un milieu basique et enfin un milieu acide. Ainsi, il ne reste que peu de choix pour sélectionner le bon groupement protecteur de l'amine, le phtalimide qui se déprotège en présence d'hydrazine est alors choisi.

Pour cela, du phtalimide de potassium réagit avec le 4-bromobut-1-ène pour conduire à l'amine protégée correspondante **80** (92 %). L'alcène est alors transformé en bis-azoture selon le protocole précédemment établi, le composé **81** est obtenu (72 %). Cependant,



la réduction par hydrogénation des azotures en amines a alors conduit à un mélange d'oligomères, les amines récemment formées réagissant sur le phtalimide. La purification n'étant pas possible, ne faisant que déplacer l'équilibre, le mélange a alors été engagé dans l'étape d'alkylation puis d'estérification, permettant alors la purification et l'isolation du produit désiré **84** (3%). La tentative de cyclisation n'a cependant pas permis d'identifier la formation du produit **85**, même déprotégé par la présence d'ammoniac.

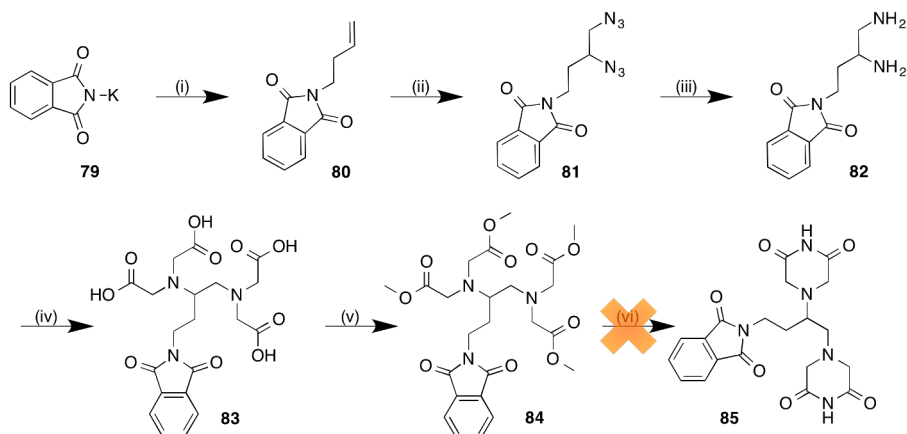


FIGURE 65 – Synthèse d'un dérivé de dextrazoxane : (i) 4-bromobut-1-ène, DMF, 1 h, 92 % ; (ii) acétate de manganèse,  $\text{NaN}_3$ , AcOH, reflux, 2 h, 72 % ; (iii)  $\text{H}_2$ , Pd/C, EtOH, ta, 16 h ; (iv) acide chloroacétique, NaOH,  $\text{H}_2\text{O}$ , 45 °C, 5 jours ; (v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , MeOH, ta, 16 h, 3 % ; (vi)  $\text{NH}_3$ , NaOMe, dioxane, MeOH, ta, 3 jours

Pour tenter d'améliorer la synthèse, et notamment d'isoler un intermédiaire amine purifiable, plusieurs options sont alors explorées. Dans un premier temps, la protection de l'amine par le phtalimide est remplacée par un carboxybenzyle. Pour ne pas le déprotéger lors de la réduction, le catalyseur de Lindlar et le nickel de Raney sont utilisés pour catalyser l'hydrogénation. Cependant, si la déprotection de l'amine n'a pas lieu, la réduction de l'azoture ne se produit pas non plus.

L'autre solution envisagée est la protection des amines au cours de leur formation. Ainsi, une première tentative d'hydrogénation en présence de  $\text{Boc}_2\text{O}$  est réalisée, menant seulement à la monoprotection, avec un rendement moyen (19 %). Dans le cas de l'hydrogénation en présence d'anhydride acétique, le même phénomène est observé. Après avoir isolé les produits, un essai de protection de la seconde amine n'a pas été concluant.

## 5. Conclusion

Une première dérivatisation de la doxorubicine a été réalisée, en introduisant le lien clivable par la formation d'une liaison amide pour obtenir la sonde **12**. Devant la faible acti-

vité anti-Top2, une seconde dérivatisation par amination réductrice a alors été conduite, menant à la sonde **15**. L'évaluation de l'activité anti-Top2 de cette nouvelle sonde a été délicate. Malgré cela, des expériences de pulldowns ont été réalisées. Top2 n'a pas été capturée au cours des expériences. Des protéines chaperones, ainsi que le complexe XRCC5, XRCC6 et PRKDC ont été identifiées. Il serait désormais intéressant d'étudier le rôle de doxorubicine sur ces différentes protéines.

Concernant l'étoposide, après une première tentative de dérivatisation par acétalisation, une autre stratégie est finalement adoptée. Ainsi, la 4-déméthylépipodophyllotoxine est substituée pour introduire une chaîne latérale, permettant l'obtention de la sonde **32**, présentant une activité anti-Top2. Lors de la réalisation des pulldowns, la galectin-3-binding protéine est capturée. Il serait alors intéressant d'évaluer l'interaction de l'étoposide avec cette protéine impliquée dans le cancer. Cependant, malgré l'activité anti-Top2 de la sonde, celle-ci n'a pas été capturée. Pour tenter de remédier au problème, une sonde présentant un lien photoactivable a été envisagée. De nombreuses voies de synthèse ont alors été testées, cependant par manque de temps, la synthèse n'a pas pu aboutir.

Concernant le dexrazoxane, la dérivatisation n'est pas publiée à ce jour. Néanmoins, une structure cristalline de la Top2 en présence du dexrazoxane a permis de déterminer le point de dérivatisation de celui-ci, le groupement méthyle. Plusieurs voies de synthèse ont été explorées, pour permettre dans un premier temps l'introduction de la chaîne latérale en fin de synthèse. Ainsi, la bis-substitution d'un dérivé dibromé par la pipérazinedione **56** a été testée dans un premier temps, sans succès. L'intermédiaire  $\alpha$ -aminonitrile **69** a pu être isolée, cependant la réduction de la fonction nitrile en aldéhyde n'a jamais été observée. Finalement, la dernière voie de synthèse testée est la voie industrielle, qui semble la plus prometteuse pour l'obtention du dérivé.

## Références Bibliographiques

1. Nelson, D.L. ; Lehninger, A.L. ; Cox, M.M.  
Principles of biochemistry, 5th edition **2008**.
2. <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Nucleic5.html>, 2013.
3. Nitiss, J.L.  
Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy.  
*Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 338–350.
4. Pommier, Y. ; Leo, E. ; Zhang, H. ; Marchand, C.  
DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs.  
*Chem. Biol.* **2010**, *17*, 421–433.
5. Pommier, Y.  
Drugging topoisomerases : lessons and challenges.  
*ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 82–95.
6. Vega, J. ; Ke, S. ; Fan, Z. ; Wallace, S. ; Charsangavej, C. ; Li, C.  
Targeting doxorubicin to epidermal growth factor receptors by site-specific conjugation of C225 to poly(L-glutamic acid) through a polyethylene glycol spacer.  
*Pharm. Res.* **2003**, *20*, 826–832.
7. Schellinger, J.G. ; Danan-Leon, L.M. ; Hoch, J.a. ; Kassa, A. ; Srivastava, I. ; Davis, D. ; Gervay-Hague, J.  
Synthesis of a trimeric gp120 epitope mimic conjugated to a T-helper peptide to improve antigenicity.  
*J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3230–3233.
8. Sun, C. ; Aspland, S.E. ; Ballatore, C. ; Castillo, R. ; Smith, A.B. ; Castellino, A.J.  
The design, synthesis, and evaluation of two universal doxorubicin-linkers : preparation of conjugates that retain topoisomerase II activity.  
*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 104–107.
9. Huang, S.l. ; Swern, D.  
Oxidation of Long-chain and Related Alcohols to Carbonyls by Dimethyl Sulfoxide “Activated” by Oxalyl Chloride’.  
*J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2480–2482.
10. Hasinoff, B.B. ; Chee, G.L. ; Day, B.W. ; Avor, K.S. ; Barnabé, N. ; Thampatty, P. ; Yalowich, J.C.

Synthesis and biological activity of a photoaffinity etoposide probe.

*Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1765–1771.

11. Tanaka, F. ; Mase, N. ; Barbas, C.F.  
Design and use of fluorogenic aldehydes for monitoring the progress of aldehyde transformations.  
*J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3692–3693.
12. Xiao, Z. ; Bastow, K.F. ; Vance, J.R. ; Lee, K.H.  
Antitumor agents. Part 227 : Studies on novel 4'-O-demethyl-epipodophyllotoxins as antitumor agents targeting topoisomerase II.  
*Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3339–3344.
13. Classen, S. ; Olland, S. ; Berger, J.M.  
Structure of the topoisomerase II ATPase region and its mechanism of inhibition by the chemotherapeutic agent ICRF-187.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 10629–10634.
14. Mojtahedi, M.M. ; Saeed Abaee, M. ; Alishiri, T.  
Superparamagnetic iron oxide as an efficient catalyst for the one-pot, solvent-free synthesis of  $\alpha$ -aminonitriles.  
*Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2322–2325.
15. De, S.  
Nickel(II) chloride catalyzed one-pot synthesis of  $\alpha$ -aminonitriles.  
*J. Mol. Catal. A Chem.* **2005**, *225*, 169–171.
16. Koch, A.  
Novel Method for Producing 4, 4-(1-Methyl-1, 2-Ethanediy)-Bis-(2, 6-Piperazinedione).  
*US Pat. App.* **2007**, *1*, US 2010/0152447.
17. Fristad, W. ; Brandvold, T. ; Peterson, J.R. ; Thompson, S.R.  
Conversion of alkenes to 1, 2-diazides and 1, 2-diamines.  
*J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3647–3649.



# Développement d'un nouveau lien clivable pour des applications en protéomique chimique

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Poly-(ADP-Ribose-Polymérase et Intégrité du Génome, en collaboration avec le Dr. Valérie Schreiber et le Dr. Jean-Christophe Amé.

## 1. PARP et protéomique chimique

En parallèle du travail réalisé sur les Topoisomérases, le développement d'un nouveau lien clivable pour la protéomique chimique a été réalisé. La protéine sélectionnée pour cette étude est la PARP1, faisant suite à des travaux précédents au laboratoire<sup>1</sup>.

### 1.1 PARP1

Les Poly(ADP-Ribose)Polymérases (PARPs) sont des protéines impliquées dans la régulation de nombreux processus cellulaires. Il s'agit d'une famille de 17 protéines, parmi lesquelles certaines sont toujours étudiées pour tenter de déterminer leur fonction. La plus connue est la PARP1 qui possède un rôle principal dans la synthèse de PAR (poly ADP-ribose). La poly(ADP-ribosyl)ation des protéines est une modification post-traductionnelle qui participe à la régulation de nombreux processus cellulaires. Ainsi, la PARP1 est impliquée dans des phénomènes tels que la réparation de l'ADN, la transcription ou encore la mort cellulaire<sup>2</sup>.

La PARP1 est une des protéines du noyau cellulaire. D'un poids moléculaire de 113 kDa, elle est composée de trois domaines fonctionnels. Le domaine N-terminal de 46 kDa permet la liaison à l'ADN grâce à deux doigts de zinc. Le domaine d'automodification de 22 kDa permet la libération de l'ADN en fin de processus. Enfin, le domaine catalytique de 54 kDa au niveau du C-terminal permet la polymérisation du PAR (Fig 66)<sup>3</sup>.

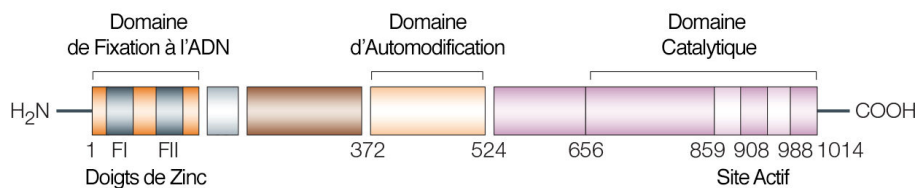


FIGURE 66 – Les différents domaines de la PARP1<sup>3</sup>

La PARP1 est une cible importante dans le traitement du cancer par chimiothérapie. En effet, puisqu'elle est impliquée dans la réparation de l'ADN, l'inhibition de la protéine permet donc une accumulation des dommages causés à l'ADN entraînant la mort par apoptose cellulaire.

De nombreux inhibiteurs ont été développés au cours de ces dernières années (Fig 67). Basés sur la modification du 3-aminobenzamide, avec une étape importante de cyclisation en lactame, les composés ont été optimisés jusqu'à l'obtention de l'Olaparib **87**. Cette molécule, découverte par Astra-Zeneca, est actuellement en essai clinique sur de nombreux types de cancer.

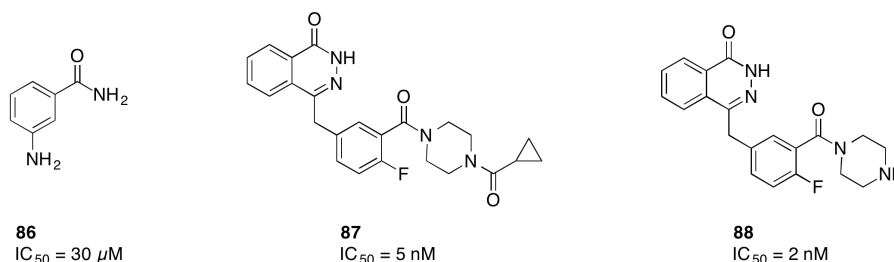


FIGURE 67 – Différents inhibiteurs de la PARP1

## 1.2 Sonde d'affinité Parpi-HAZA-Biotine

Au cours des précédents développements au laboratoire, une sonde d'affinité pour la capture de la PARP1 comprenant un **dérivé d'Olaparib**, le **lien clivable HAZA** et une **biotine** a été synthétisée avec différentes tailles d'espacement, par le Dr Burckel (Fig 68)<sup>1</sup>.

Les tests de capture et de libération de la PARP1 ont été réalisés sur protéine recombinante. Si la capture ne semble pas poser de problème, le clivage au dithionite de sodium ne libère qu'environ 50% de la protéine (Fig 69), indépendamment de la longueur du

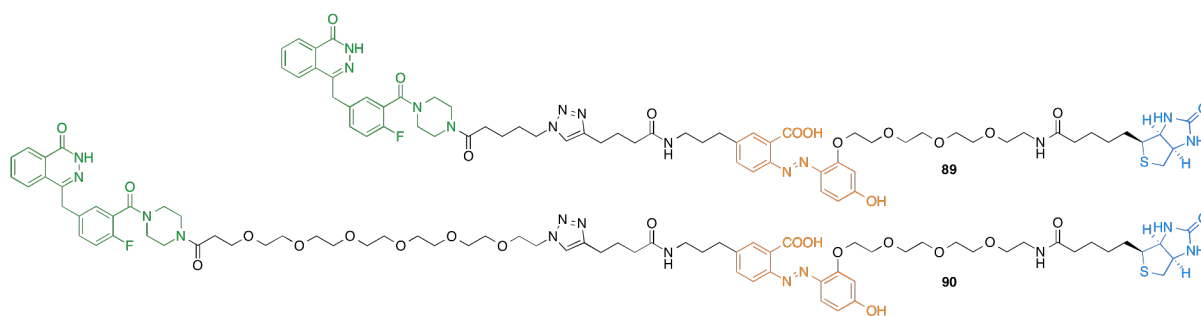


FIGURE 68 – Les deux sondes d’affinité pour PARP1

lien OEG. Une expérience de compétition avec de l’Olaparib natif en excès a alors été tentée pour essayer de libérer la totalité de la PARP1. Cependant, la libération observée n’est pas meilleure qu’en absence de compétition. Si ce résultat n’a pas empêché d’évaluer ensuite la sonde sur lysat cellulaire, il était tout de même intéressant d’essayer de comprendre le mécanisme mis en jeu.

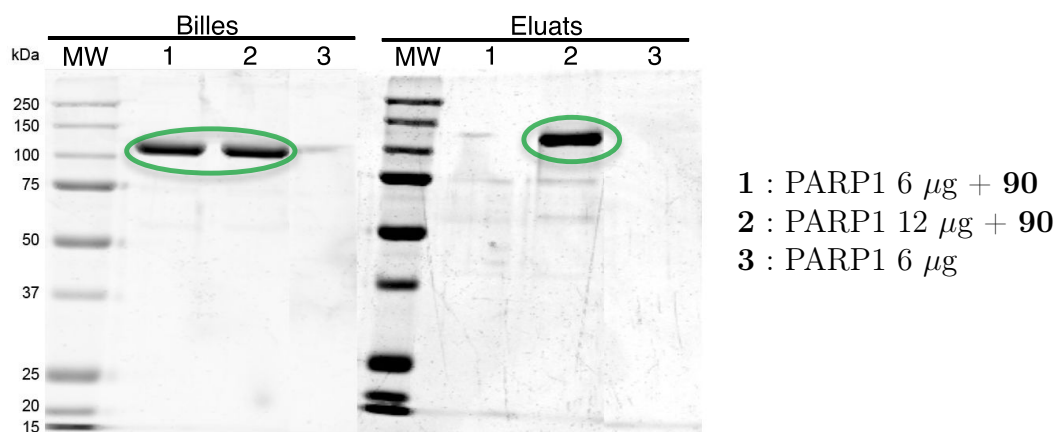
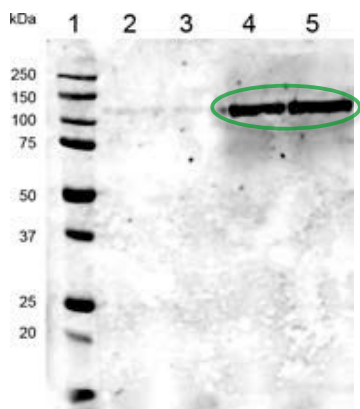


FIGURE 69 – Gels SDS-PAGES colorés au bleu de Coomassie de la capture par la sonde d’affinité **90** sur PARP recombinante et élution au dithionite de sodium (5 mM)<sup>1</sup>.

L’hypothèse alors formulée fut qu’une liaison covalente doit se former entre la sonde et la PARP. Une expérience dite de ‘binding’ a alors été mise au point, au cours de laquelle la PARP1 a été incubée avec ou sans sonde en présence ou non de dithionite de sodium. L’analyse par Western Blot en conditions dénaturantes (Fig 70), en utilisant de la streptavidine-Alexa 680 comme révélateur montre une PARP1 fluorescente, signe d’une probable liaison covalente.

Au vu de ces résultats, il nous est alors apparu comme nécessaire de développer un nouveau système clivable, dans des conditions toujours non dénaturantes pour les protéines,





- 1 : Marqueurs de poids moléculaire  
 2 : PARP1 442 nM  
 3 : PARP1 442 nM + Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 5 mM  
 4 : PARP1 442 nM + **90** 1 μM  
 5 : PARP1 442 nM + **90** 1 μM + Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 5 mM

FIGURE 70 – Analyse Western Blot révélée par la streptavidine-Alexa 680<sup>1</sup>.

et qui serait même idéalement orthogonal au premier système HAZA/dithionite de sodium développé au sein du laboratoire. A cette fin, un criblage de plusieurs structures jugées intéressantes face à différents types de stimuli a alors été réalisé.

## 2. Criblage HPLC

Ce travail a été réalisé lors du stage de Master 2 de Ricardo Totovao.

### 2.1 Mise au point du criblage

#### Choix des structures clivables

Lors de l'optimisation du motif HAZA, il a été confirmé que pour que la réduction de la fonction azo soit la plus rapide possible, il est nécessaire de la substituer par un groupement donneur d'un côté et accepteur de l'autre. Basée sur cette idée, les composés ont alors été conçus pour amener l'effet attracteur au plus proche de la liaison N=N, en espérant la rendre plus réactive. Dans un souci de simplicité de synthèse, le choix s'est donc porté sur la condensation entre le sel de benzènediazonium et une série de composés β-dicarbonylés présentant en α des protons acides (Fig 71).

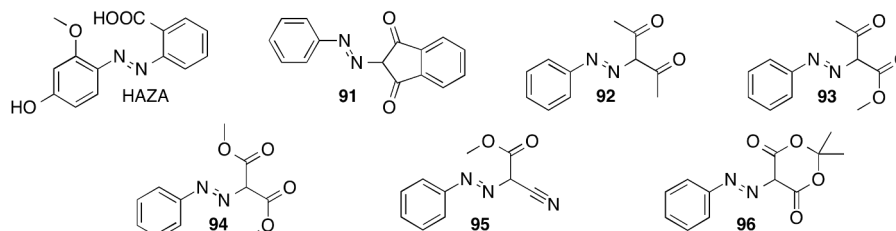


FIGURE 71 – HAZA et les 6 nouveaux composés synthétisés pour le criblage

## Choix des réactifs

18 réactifs ont été sélectionnés, nommés de **A** à **R**, pouvant se classer en différentes catégories (Structures Fig 76) :

- des réducteurs doux utilisés en biologie pour la réduction des ponts disulfure : glutathion (GSH, **A**), TCEP (**B**), dithiothréitol (DTT, **C**)
- des sulfites, utilisés classiquement pour la réduction des azobenzène : dithionite de sodium (**D**), bisulfite de sodium (**E**), bisulfite/metabisulfite de sodium (**F**), métabisulfite de sodium (**G**), sulfite de sodium (**H**)
- l'acide sulfonique de formamidine (**I**), qui réduit le fer en conditions biocompatibles
- le nitrométhane (**J**) qui peut réagir avec les dérivés carbonyles
- des dérivés d'hydrazine qui réduisent cétones et azo : hydrazine (**K**), hydroxylamine (**L**), methylcarbazate (**M**)
- des réactifs pouvant se condenser sur les composés  $\beta$ -dicarbonylés : ethylenediamine (**N**), 2-mercaptoethanol (**O**), urée (**P**), thiourée (**Q**), acide hydrazinecarbo-dithioique(**R**)

## Analyse HPLC

La mise en place de ce protocole s'est basée sur celui utilisé par le Dr Leriche au cours de l'optimisation du motif HAZA. Cependant, pour adapter ses mesures réalisées par spectroscopie UV-visible à une analyse HPLC, du benzamide a été ajoutée au milieu réactionnel comme étalon interne. Ainsi, l'étude de la réactivité des composés HAZA, **91** à **96** avec les réactifs **A-R** a été réalisée dans les conditions suivantes :

- le tampon utilisé est le tampon phosphate (phosphate buffer - PB) 100 mM pour s'affranchir des possibles modifications de pH provoquées par l'ajout de l'un des réactifs
- pour palier à la faible solubilité des composés, un mélange EtOH/PB 100 mM 1:1 est utilisé comme solvant
- une solution à 50  $\mu$ M en composé HAZA, **91** à **96** et à 1 mM en benzamide dans un mélange EtOH/PB 100 mM 1:1 est réalisée par dilution d'une solution stock à 10 mM dans le DMSO
- une solution à 120 mM en réactif **A-R** est réalisée dans le DMSO ou dans le PB 100 mM, en fonction de la solubilité
- la solution finale étudiée est obtenue par addition de 50  $\mu$ L de la seconde solution sur 950  $\mu$ L de la première, pour une étude à une concentration de 47,5  $\mu$ M en composés et de 6 mM en réactifs.

Chaque échantillon **91-96\*****A-R** a été préparé puis incubé pendant 12 h à 37 °C. Les analyses par HPLC de 15 min chacune ont alors été démarrées, chaque échantillon a été analysé après un temps d'incubation d'au moins 12 h. Une étude de stabilité a été couplée à l'expérience, en utilisant le DMSO pur comme réactif. Ces échantillons ont été analysés par HPLC juste après préparation, correspondant ainsi au t=0 min, puis après 12 h d'incubation et enfin, à la fin de l'ensemble des analyses.

En comparant le rapport de l'aire du composé sur l'aire de la benzamide à t=0 min et après incubation pour chacun des échantillons, le pourcentage de composés restants est déterminé. Un code couleur est alors établi, allant du vert - stable en présence du réactif - jusqu'au rouge - réactif (Fig 72).

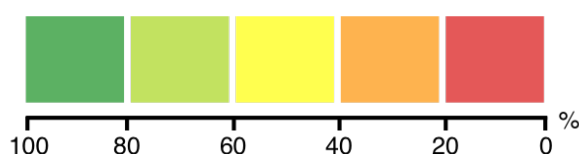


FIGURE 72 – Echelle de couleurs utilisées pour l'analyse des résultats du criblage

## 2.2 Synthèse et caractérisation des composés

### Synthèse

La synthèse envisagée est la même pour l'ensemble des produits. Ils s'obtiennent par la condensation du composé  $\beta$ -dicarbonylé avec le sel de benzenediazonium, obtenu à partir de l'aniline (Fig 73).

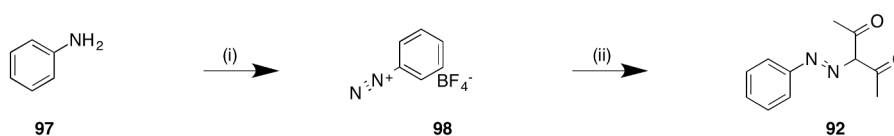


FIGURE 73 – Synthèse du composé **92** : (i)  $\text{HBF}_4$ ,  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 0 °C-ta, 2 h, 45 % ; (ii) acetoacetate,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , toluene, 0 °C-ta, 24 h, 80 %

D'après la littérature, l'utilisation du tétrafluoroborate comme contre-ion pour le sel de diazonium permet d'isoler celui-ci et de le conserver plusieurs jours contrairement aux sels de chlorure. Ainsi, le tétrafluoroborate de benzenediazonium **98** est obtenu par réaction de l'aniline avec le sodium nitrite en présence d'acide tétrafluoroborique<sup>4</sup>. La condensation du sel **98** en milieu basique sur les différents réactifs  $\beta$ -dicarbonylés, choisis pour leur

pKa intéressants, a alors conduit aux composés **91** à **96** dans des rendements moyens à bons après purification (Fig 74)<sup>5</sup>.


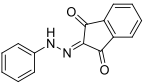

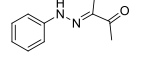

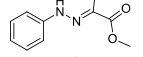

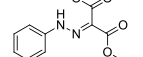

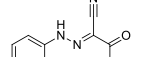

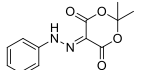
Entrée	Réactif	pKa	Produit	Rendement (%)
91		9		48
92		9		80
93		10		38
94		13		45
95				40
96		5		34

FIGURE 74 – Tableau récapitulatif des produits obtenus

## Caractérisation

Si les analyses de LC-MS ont confirmé la masse attendue pour les différents composés, les RMN ont été plus compliquées à interpréter. En effet, ces analyses ont révélé la présence de différents tautomères en solution (Fig 75), et dont les proportions dépendent du solvant utilisé. Des études structurales dans le DMSO et le chloroforme ont montré que la forme prédominante est la forme hydrazone III. Si ce n'est pas la forme azo attendue, cette structure est cependant intéressante et l'étude est poursuivie.

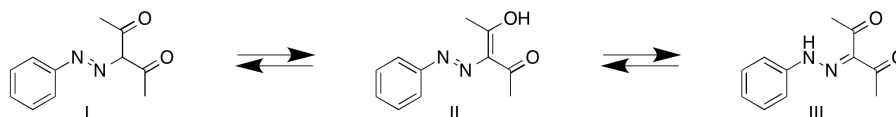


FIGURE 75 – Les 3 formes tautomères observées en solution pour **92**

Une fois les composés **91-96** obtenus et caractérisés, leurs spectres UV-visible ont été mesurés, montrant un maximum d'absorbance à 364 nm pour la majorité. C'est donc cette longueur d'onde qui a été sélectionnée pour réaliser les études de conversion en présence des réactifs **A** à **R**.

## 2.3 Résultats

### Criblage

Les résultats sont présentés sous forme d'un tableau utilisant le code couleur précédemment défini (Fig 76).

Ce tableau présente l'ensemble des caractéristiques généralement observées lors d'un criblage :

- la majorité des échantillons sont stables après 12 h à 37 °C
- le composé 96 n'est pas stable en solution
- certains composés répondent aux stimuli, mais pas avec une conversion suffisante après 12 h pour que cela soit intéressant à exploiter

Cependant, plusieurs résultats méritent notre attention. Tout d'abord, l'acide sulfinique de formamidine réagit avec l'ensemble des composés. Une étude réalisée précédemment au laboratoire a montré que la réaction est en réalité plutôt lente.

Ensuite, **92** ne semble pas réagir en présence de dithionite de sodium, mais disparaît en présence d'hydrazine. Cette première observation en ferait un bon candidat pour un nouveau motif orthogonal au motif HAZA, puisque celui-ci ne paraît pas sensible à l'hydrazine. De plus, l'hydrazine a déjà été utilisée pour des applications en milieu biologique. Enfin, **91** pourrait être un nouveau motif d'intérêt puisqu'il est dégradé en présence de dithionite de sodium.

	Stabilité	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
	DMSO	GSH	TCEP	DTT	Dithionite	Bisulfite	Bisulfite/Metabisulfite	Metabisulfite	Sulfite	Formamidine	$\text{-NO}_2$	$\text{H}_2\text{N}^+\text{NH}_2$	$\text{H}_2\text{N}^+\text{OH}$	$\text{O}=\text{N}^+\text{NH}_2$	$\text{H}_2\text{N}^+\text{NH}_2$	$\text{HS-CH}_2\text{OH}$	$\text{H}_2\text{N}^+\text{NH}_2$	$\text{H}_2\text{N}^+\text{NH}_2$	$\text{H}_2\text{N}^+\text{SH}$
HAZA	104%	111%	92%	97%	1%	104%	103%	101%	104%	0%	105%	105%	103%	105%	107%	104%	104%	104%	116%
91	99%	104%	99%	100%	0%	98%	98%	96%	92%	0%	100%	84%	98%	100%	99%	101%	99%	99%	107%
92	95%	99%	96%	96%	82%	96%	96%	96%	100%	5%	96%	4%	93%	95%	58%	95%	95%	96%	12%
93	93%	97%	99%	95%	40%	95%	94%	95%	95%	0%	94%	82%	90%	92%	52%	93%	93%	99%	109%
94	96%	98%	97%	97%	90%	95%	95%	97%	98%	62%	95%	95%	96%	94%	69%	96%	95%	95%	109%
95	82%	96%	93%	89%	73%	93%	93%	92%	90%	21%	87%	83%	40%	85%	84%	88%	83%	82%	95%
96	50%	93%	120%	63%	0%	82%	78%	74%	37%	0%	63%	30%	15%	62%	9%	66%	49%	47%	64%

FIGURE 76 – Tableau récapitulatif des résultats du criblage après au moins 12 h d'incubation

## Toxicité

Avant d'aller plus loin dans l'optimisation, la toxicité des produits HAZA, **91** et **92** a été évaluée. Pour cela, un test MTT sur des cellules HaCat (cellules humaines de keratinocytes) a mesuré la survie de celles-ci en présence des composés après 24 h d'incubation (Fig 77).

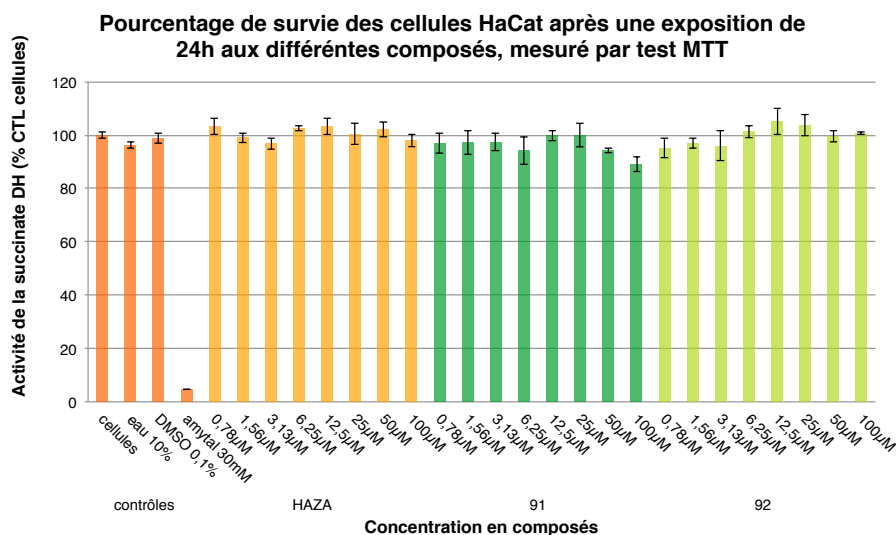


FIGURE 77 – Résultats du test MTT

Ainsi, **91** et **92** ne présentent pas de toxicité jusqu'à une concentration de 100 µM.

## Etude de **92**

Suite au premier résultat intéressant de réactivité entre **92** et l'hydrazine, un criblage de conversion est réalisé avec différents analogues d'hydrazine (Fig 78). Pour que cela puisse avoir un intérêt biologique, le temps de conversion observé cette fois est de seulement 4 h.

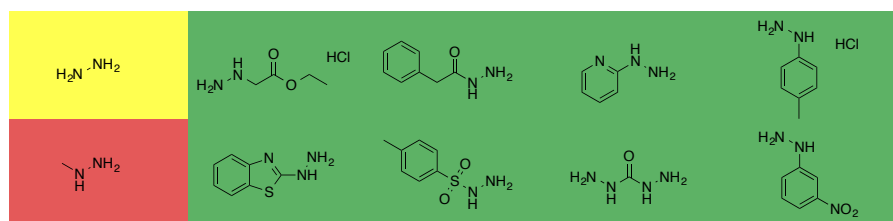


FIGURE 78 – Criblage d'analogues d'hydrazine

Le seul réactif intéressant est alors la méthylhydrazine. Une analyse LC-MS du milieu réactionnel semble indiquer que le produit de la réaction serait le pyrazole **99** issu de la

condensation de la dicétone avec l'hydrazine (Fig 79-A). Le produit est alors synthétisé à plus grande échelle, caractérisé et la structure est confirmée. Puisque cette condensation induit la présence d'une liaison de type azobenzène, une sensibilité au dithionite de sodium est alors attendue, qui permettrait l'obtention d'un système de capture/libération. Malheureusement, la non réactivité vis à vis du dithionite de sodium a été observée. Pour tenter d'améliorer celle-ci, son analogue **100** (Fig 79-B) a été synthétisé. Devant le peu de réactivité de **100** en présence de dithionite de sodium, l'optimisation s'est alors arrêtée la.

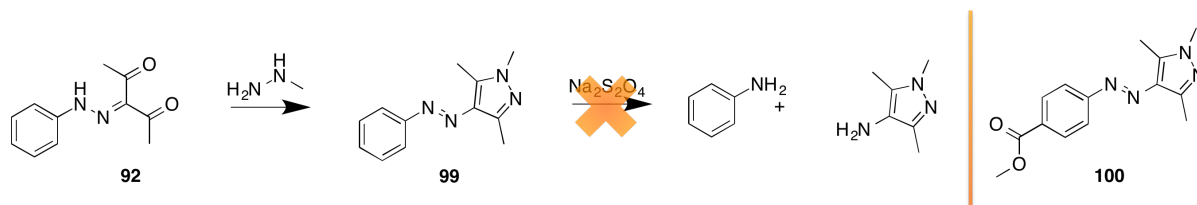


FIGURE 79 – Réaction de **92** avec la méthylhydrazine

### 3. Etude du motif PHID

#### 3.1 Optimisation de la réactivité

Pour avoir une rapide information sur la dérivatisation optimale autour du motif **91**, deux analogues ont été synthétisés de la même manière, l'un comprenant un groupement électro-donneur et l' autre électro-attracteur sur le cycle (Fig 80).

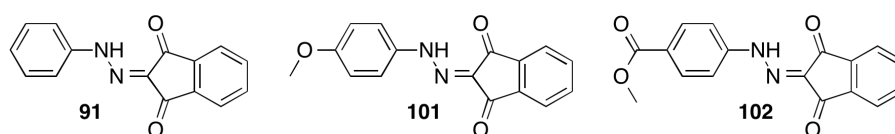


FIGURE 80 – Trois premiers motifs synthétisés

La cinétique de leur réaction en présence de dithionite de sodium a été réalisée. Pour les raisons discutées plus haut, une solution à 50  $\mu\text{M}$  dans un mélange EtOH/PB 100 mM 1:1 est préparée pour chaque composé, appelée solution A. Un spectre UV-visible est mesuré pour déterminer le maximum d'absorbance ( $\lambda = 415 \text{ nm}$ ), longueur d'onde à laquelle la cinétique est alors réalisée (Fig 81-A). En effet, lors de la réaction avec le dithionite, la couleur jaune-orangé de la solution disparaît. Ainsi, la cinétique de la réaction peut



être mesurée par la disparition de l'absorption au maximum d'absorbance. Pour palier au souci de dégradation du dithionite de sodium, la solution à 120 mM dans le PB 100 mM est préparée au dernier moment. 50  $\mu\text{L}$  de cette solution sont alors introduit dans la cuve, et au moment de l'ajout des 950  $\mu\text{L}$  de la solution A, la cinétique est lancée (Fig81-B). Cette méthode présente bien évidemment des problèmes de précision, notamment sur les premières secondes. Cependant, elle permet de donner une première indication quant à la rapidité de la réaction.

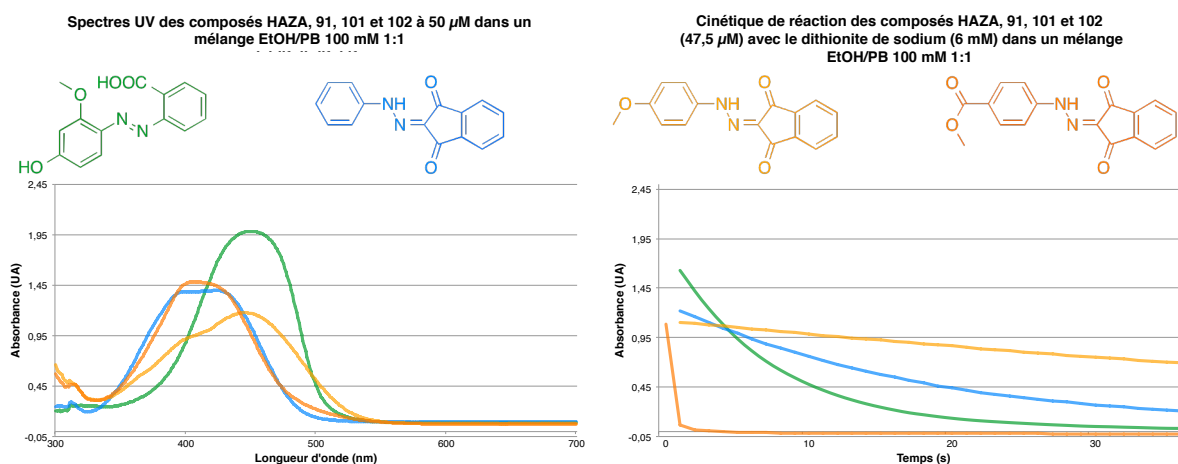


FIGURE 81 – Spectres UV et cinétique de réaction des composés HAZA, 91, 101 et 102 avec le dithionite de sodium

La détermination des temps de demi-vie  $t_{1/2}$  permet une comparaison facile de la réactivité des différents composés. Pour ces premiers produits, les temps de demi-vie sont récapitulés dans le tableau suivant.

composé	$t_{1/2}$ (s)	composé	$t_{1/2}$ (s)
HAZA	7	<b>101</b>	>40
<b>91</b>	15	<b>102</b>	<1

Ces premiers résultats montrent que la présence d'un groupement électro-attracteur sur le cycle phénylique permet d'obtenir des temps de réaction semblables voir meilleurs au motif HAZA précédemment développé au laboratoire.

La dérivation de ce motif, appelé PHID pour PhénylHydrazonoIndaneDione, en un lien bifonctionnalisable aux extrémités par des groupements orthogonaux a alors été réalisée (Fig 82). L'anhydride phtalique portant une fonction alcyne **103** a été transformé en deux étapes en l'indanedione correspondante **105**. Un couplage azoïque entre **105** et l'aniline **29**

précédemment synthétisée a permis l'obtention du composé **106**. Finalement, une réaction de click avec le OEG **8** préalablement synthétisé a conduit au composé bifonctionnel désiré **107**.

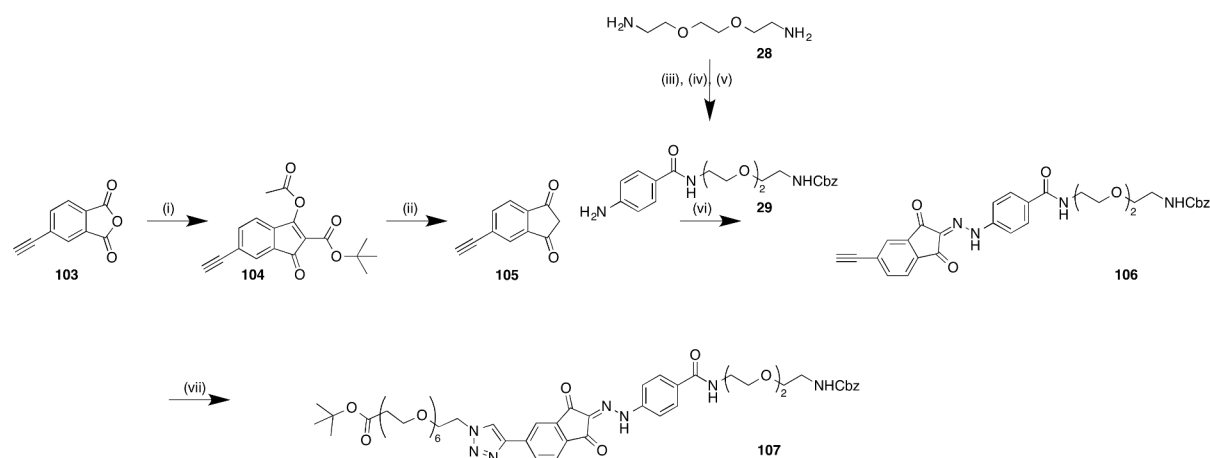


FIGURE 82 – Synthèse du composé **107** : (i) *tert*-butyl acetoacetate, Ac<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, DCM, ta, 16 h, 87 %; (ii) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O/MeOH, tube scellé, 70 °C, 16 h, 55 %; (iii) Cbz-OSu, dioxane, ta, 16 h, 54 %; (iv) acide 4-(Boc-amino)benzoïque, EDC, DIPEA, DCM, ta, 16 h, 55 %; (v) TFA/DCM 1:1, 0 °C, 2 h, qtt; (vi) HBF<sub>4</sub>, NaNO<sub>2</sub>, NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, acetone, H<sub>2</sub>O, 0 °C-ta, 16 h, 56 %; (vii) **8**, CuSO<sub>4</sub>, ascorbate de sodium, DMSO, H<sub>2</sub>O, ta, 16 h, 23 %

La cinétique de la réaction de ces composés avec le dithionite de sodium a alors été mesurée, en utilisant également le composé Fmoc-HAZA-Boc **16**, synthétisé au laboratoire en grande quantité par Michel Mosser, comme analogue HAZA de notre composé Cbz-PHID-*tert* Butyl **107**. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous:

composé	$t_{1/2}$ (s)	composé	$t_{1/2}$ (s)
HAZA	7	<b>102</b>	<1
<b>91</b>	15	<b>107</b>	<1
<b>101</b>	>40	<b>16</b>	<1

FIGURE 83 – Temps de demi-réaction des dérivés azoïques avec le dithionite de sodium

Il semble alors évident au vu de ces résultats que ces mesures avec un simple appareil de spectrométrie UV-visible ne sont pas satisfaisantes et ne permettent pas de déterminer lequel des motifs, PHID ou HAZA, se clive le plus rapidement. Des études de cinétiques en flux stoppé ont alors été réalisées.

## 3.2 Cinétique en flux stoppé

La technique de flux stoppé (ou stopped-flow) permet de mesurer des cinétiques de réactions dont les temps de demi-vie sont compris entre quelques dizaine de ms à quelques minutes.

Dans cette technique, chaque réactif en solution est stocké dans une seringue d'injection (Fig 84). Au déclenchement de l'expérience, un volume égal de chacune des solutions est injecté sous l'action d'un piston pneumatique (7-8 bars) dans une chambre de mélange, puis poussé à travers une cellule photométrique jusqu'à la seringue d'arrêt. Ce piston recule alors jusqu'à la butée, déclenchant la mesure. La mesure de l'absorbance en fonction du temps permet de suivre l'évolution du mélange. La régulation de la température se fait grâce à un thermostat qui assure une température constante au bain dans lequel se trouvent les seringues d'injection.

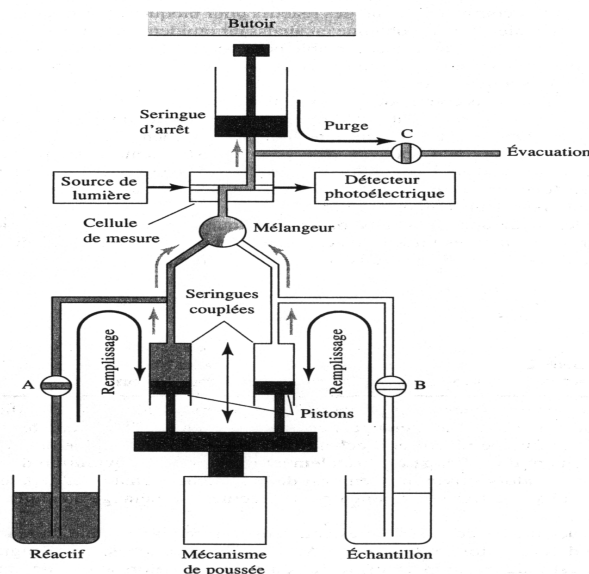


FIGURE 84 – Schéma de fonctionnement d'un spectrophotomètre à flux stoppé

Cette méthode permettra donc de mesurer précisément les constantes de la réaction avec le dithionite de sodium pour chacun des composés. En effet, la réaction est a priori une réaction d'ordre 2 avec une vitesse s'exprimant  $V = k_r * [substrat] * [dithionite]$ . Or, en travaillant avec une concentration de  $50 \mu\text{M}$  en substrat et entre  $1 \text{ mM}$  et  $7 \text{ mM}$  en dithionite, il s'agit d'un cas de dégénérescence de l'ordre, où l'expression de la vitesse devient un pseudo ordre un,  $V = k_{obs} * [substrat]$  avec  $k_{obs} = k_r * [dithionite]$ . Ainsi, en mesurant la constante apparente  $k_{obs}$  de la réaction à différentes concentrations en dithionite, la constante de la réaction  $k_r$  peut en être déduite.

Dans un premier temps, les spectres UV-visibles de chaque composé sont de nouveau mesurés. En effet, pour avoir la précision nécessaire à de telles mesures, l'ensemble des solutions sont préparées à partir d'eau dégazée conditionnées sous argon. Ainsi, une détermination précise du maximum d'absorption est réalisée pour chaque composé.

Pour adapter nos conditions au système du flux stoppé, certains arrangements sont alors nécessaires. Ainsi, alors que les premières études ont été réalisées en mélangeant 50  $\mu\text{L}$  d'une solution de dithionite à 950  $\mu\text{L}$  de la solution de composé, il faut désormais les préparer pour avoir des volumes égaux. De plus, il est normalement nécessaire d'avoir le même solvant dans les deux seringues pour limiter les erreurs de mesures dues au mélange.

Ainsi, les solutions en substrats sont donc préparées à 100  $\mu\text{M}$  dans un mélange PB 100 mM/EtOH 1:1 et la première solution en dithionite à 12 mM dans le même mélange. Cependant, lors de la première mesure, aucune diminution d'absorbance ne se produit, même après plusieurs minutes. Des petits tests en tubes sont conduits sur l'ensemble des substrats et aucune réaction n'est observée. En utilisant une solution de dithionite dans le PB 100 mM, la réactivité est retrouvée. Il en est alors déduit que c'est l'éthanol qui a un effet désactivateur sur le dithionite de sodium.

Le système est alors modifié. Les substrats sont toujours solubilisés à 100  $\mu\text{M}$  dans un mélange PB 100 mM/EtOH 1:1, tandis que le dithionite de sodium est préparé à 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM, 10 mM, 12 mM et 14 mM dans du tampon PB 100 mM seul. Ainsi, dans la chambre des mélanges, les conditions sont les suivantes :

- PB 100 mM/EtOH 3:1
- Substrat à 50  $\mu\text{M}$
- Dithionite de sodium à 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM et 7 mM
- à 25 °C et à pression atmosphérique
- à la longueur d'onde d'absorption maximale pour chaque composé

Pour palier au problème de la dégradation du dithionite de sodium en solution, qui sera d'autant plus visible que lors des expériences en cuve, les solutions sont re préparées toutes les 10 minutes et conservées sur de la glace. De plus, chaque expérience est réalisée 4 à 8 fois, pour s'assurer de la reproductibilité.

Par exemple, dans le cas de la molécule **102**, son maximum d'absorbance est détecté à 404 nm, et l'on observe bien une disparition de ce signal après ajout de dithionite de sodium (Fig 85-1). Une courbe en décroissance exponentielle est obtenue pour l'évolution de l'absorbance au cours du temps (Fig 85-B), de laquelle le logiciel déduit la constante

$k_{obs}$ . Tracer  $k_{obs} = f([dithionite])$  permet d'obtenir une droite, dont le coefficient directeur est  $k_r$  (Fig 85-C). Ici,  $k_r = 130,4 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ .

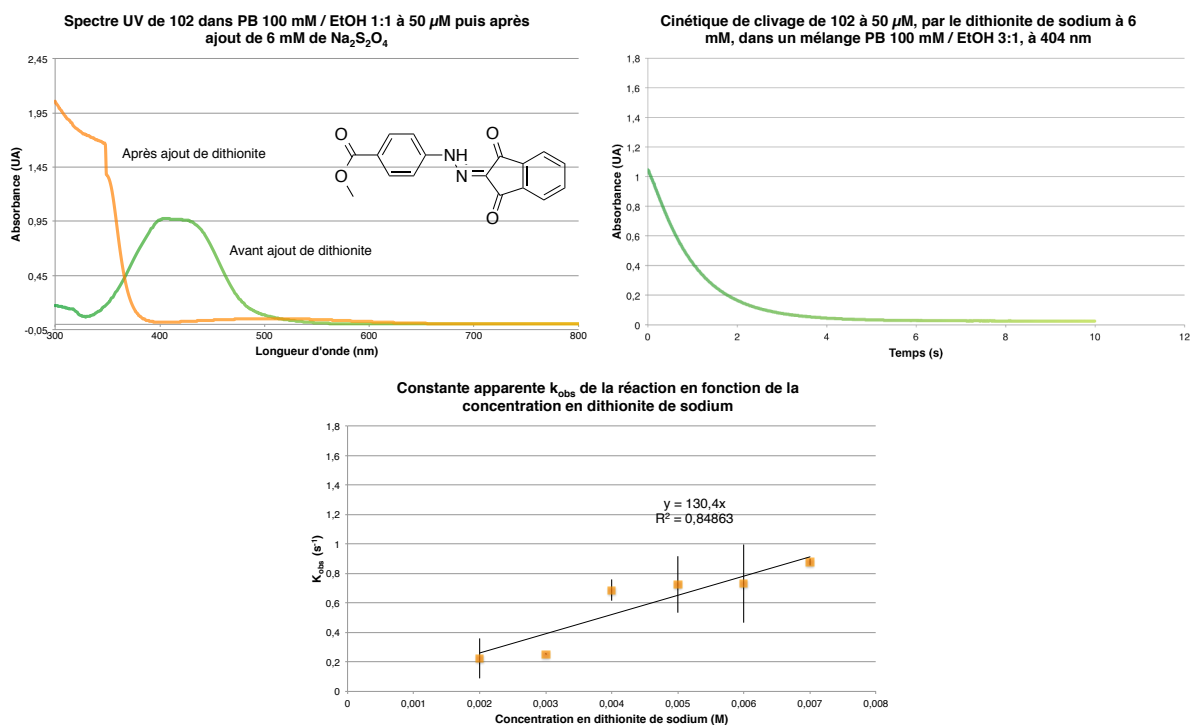


FIGURE 85 – Exemple de résultats obtenus en flux stoppé : cas de **102**

La détermination des constantes de réactions pour chacun des composés testés permet ensuite de comparer leur réactivité vis-à-vis du dithionite de sodium. Il est également intéressant de remonter au temps de demi-réaction, dépendant de la concentration en dithionite de travail. Pour pouvoir comparer aux valeurs obtenues précédemment par la cinétique en cuve, 6 mM est choisie comme concentration. Le temps de demi-réaction s'exprime alors  $t_{1/2} = \ln(2)/k_{obs}(6 \text{ mM})$ .

composé	$k_r$ ( $\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (s)	composé	$k_r$ ( $\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (s)
HAZA	73,3	1,7	<b>16</b>	(460,7), 44,4	3
<b>102</b>	130,4	0,9	<b>107</b>	179,7	0,6

FIGURE 86 – Constante de vitesse et temps de demi-vie de la réaction des différents substrats avec le dithionite de sodium

La première chose notable dans ce tableau est la présence de deux valeurs pour le dérivé Fmoc-HAZA-Boc **16**. Sans avoir pu le confirmer, il semble que la première constante

correspondre à la réduction de la liaison azo, et la seconde au clivage de la liaison N-N. Cependant, des tests supplémentaires auraient besoin d'être réalisés pour pouvoir confirmer cette hypothèse. Puisque c'est le clivage qui est intéressant ici, la deuxième valeur est utilisée pour comparaison quant à la réactivité relative. Ainsi, les motifs PHID réagissent plus rapidement que les motifs HAZA, que ce soit dans le cas des motifs simples ou bis-dérivatisables.

Devant de bons résultats comme ceux-ci, la synthèse d'une sonde d'affinité pour la capture puis le relargage d'une protéine est alors envisagée. Au vu des problèmes rencontrés pour le clivage sur la PARP 1, la synthèse d'une sonde d'affinité pour cette protéine est alors réalisée.

## 4. Synthèse et évaluation biologique d'une sonde d'affinité Parpi-PHID-Biotine

### 4.1 Synthèse de la sonde

Pour pouvoir être comparable au travail précédemment réalisé par le Dr Burckel, une sonde d'affinité est alors conçue de manière similaire. Elle comporte ainsi le dérivé d'Olaparib, le motif PHID au centre, et la biotine à l'autre extrémité (Fig 87).

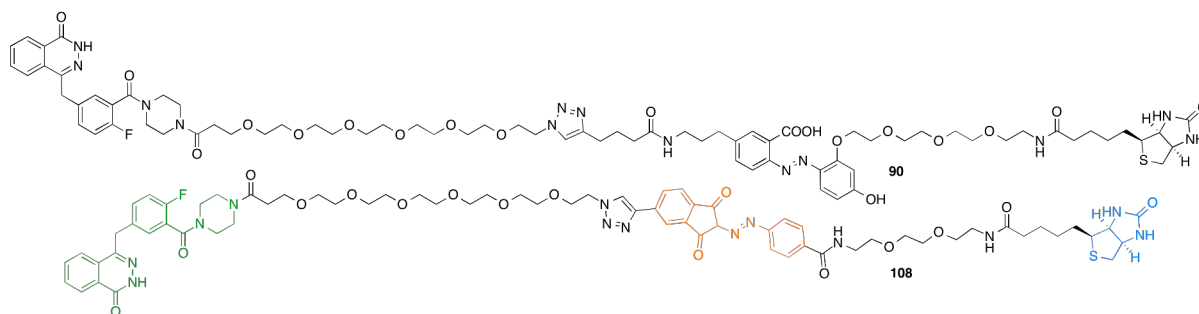


FIGURE 87 – Design d'une sonde d'affinité PHID similaire à la sonde HAZA précédemment synthétisée

Le dérivé d'Olaparib portant la chaîne PEG **109** étant disponible au laboratoire, une première tentative de synthèse a commencé par la réaction de click avec le composé **106** pour obtenir le dérivé **110** (Fig 88). Cependant, la déprotection par hydrogénation du groupement carboxybenzyle catalysée par du palladium sur charbon a conduit à la réduction du motif PHID, facilement notable par la disparition de la couleur.

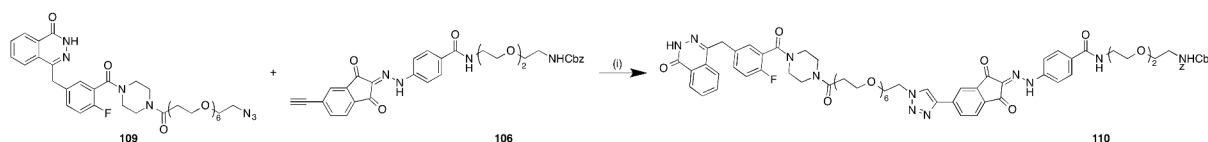


FIGURE 88 – Première voie de synthèse: (i) :  $\text{CuSO}_4$ , sodium ascorbate, DMSO,  $\text{H}_2\text{O}$ , ta, 16 h, 13 %

La déprotection du groupement carboxybenzyle sur le composé **106** a alors été réalisée dans un mélange TFA/thioanisole, pour conduire à l'amine libre **111** avec un rendement de 37 % (Fig 89). Le couplage peptidique avec l'ester activé de la biotine permet l'obtention du dérivé **112** avec un rendement de 54%. Finalement, la réaction de click avec le dérivé d'Olaparib **109** amène au produit final désiré avec un rendement de 22 % après purification par HPLC préparative.

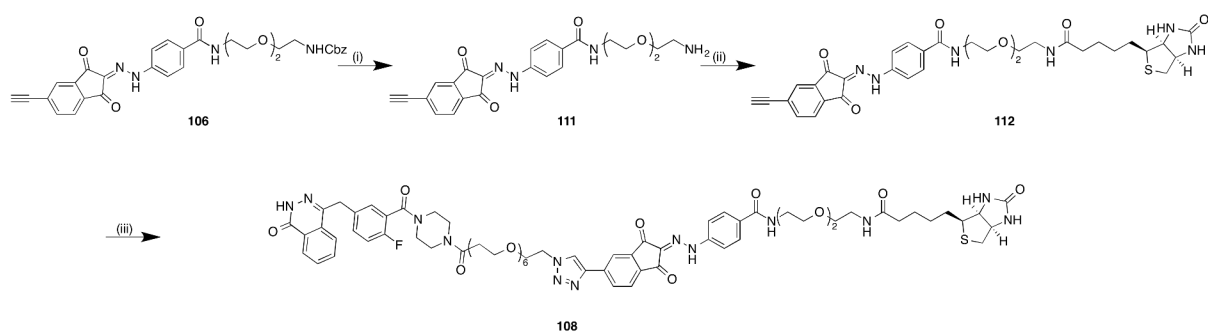


FIGURE 89 – Synthèse de la sonde d'affinité **108** : (i) : thioanisole, TFA, ta, 16 h, 37 %; (ii) : Biotine-NHS, DIPEA, DMF, ta, 16 h, 54 %; (iii) : **109**,  $\text{CuSO}_4$ , sodium ascorbate, DMSO,  $\text{H}_2\text{O}$ , ta, 16 h, 18 %

Après caractérisation de cette sonde, sa réactivité avec le dithionite de sodium a été testée et confirmée, avec un  $t_{1/2}$  de l'ordre de 1 s. Pour comparaison, le temps de demi-réaction de la sonde **90** est de 15 s. L'analyse LC-MS de l'échantillon obtenu après réaction montre la disparition du substrat et l'apparition d'une aniline de masse de 493 g/mol correspondant à la partie biotine de la molécule (Fig 90), ce qui indiquerait qu'il ne s'agit pas seulement de la réduction de la liaison mais bien de son clivage.

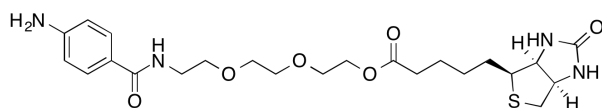


FIGURE 90 – Aniline observée par analyse LC-MS résultant du clivage de la sonde **108** par le dithionite de sodium

## 4.2 Evaluation Biologique

Ce travail d'évaluation biologique s'est principalement concentré sur deux choses. Tout d'abord, comparer l'efficacité des sondes **90** et **108** pour la capture et le relargage (pulldown) de la PARP1. Dans le même temps, essayer de comprendre pourquoi la sonde HAZA présente un mauvais clivage dans le cas de la PARP1, et notamment tenter de confirmer l'hypothèse de la liaison covalente, tout en vérifiant que ce phénomène ne se produit pas en présence de la nouvelle sonde PHID.

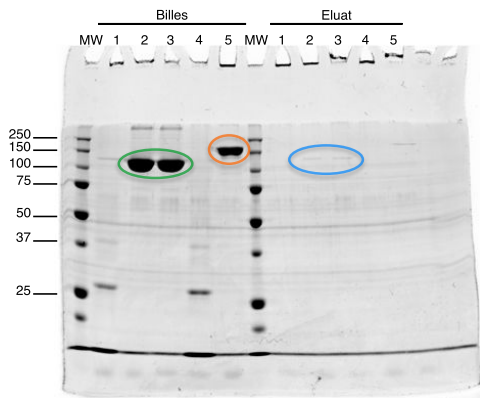
### Pulldown de Parp1

L'objectif ici est de démontrer que la sonde **108** synthétisée permet la capture de la PARP1, et que le clivage au dithionite de sodium est plus efficace que lorsque la sonde **90** est utilisée.

L'un des principaux défaut de cette technique de clivage au dithionite de sodium est la dégradation de celui-ci, entraînant parfois des problèmes de reproductibilité. Ainsi, pour servir de contrôle positif à l'efficacité du clivage, la sonde **5** et la gyrase sont utilisées à chaque manipulation.

Un premier test comparatif de capture et relargage de la PARP1 en présence des sondes HAZA **90** et PHID **108** est réalisée dans les conditions précédemment développées par l'équipe du Dr. Valérie Lamour et utilisées ensuite par le Dr. Helene Burckel. Ainsi, après une première série de lavages avec le tampon de purification, les billes sont incubées 30 min à ta en présence ou non d'un excès de sonde. Les billes sont alors rincées, et incubées 1 h à 4 °C avec la protéine correspondante. Une nouvelle série de rincages permet d'éliminer les protéines liées de manière non-spécifique aux billes, puis les billes sont incubées avec le dithionite de sodium pendant 20 min. Du bleu de charge est alors ajouté à ces éluats. Les billes sont lavées une dernière fois, puis du bleu de charge est ajouté. L'ensemble des échantillons billes et éluats sont chauffés 2 min à 90 °C puis déposé sur un gel d'acrylamide à 10 %. La migration des protéines sur le gel est réalisée sous 140 V pendant 75 min. Le gel est alors rincé à l'eau, coloré au bleu de coomassie pendant 30 min, décoloré dans une solution d'acide acétique dans le méthanol pendant la nuit, et enfin scanné sur l'Odyssey (Fig 91).





- 1 : PARP1 6  $\mu\text{g}$
- 2 : PARP1 6  $\mu\text{g}$  + 90
- 3 : PARP1 6  $\mu\text{g}$  + 108
- 4 : Gyrase 8  $\mu\text{g}$
- 5 : Gyrase 8  $\mu\text{g}$  + 5

FIGURE 91 – Gel SDS-PAGES coloré au bleu de Coomassie de la capture sur PARP1 et Gyrase recombinante et élution au dithionite de sodium (5 mM)

Sur le gel, on observe principalement deux bandes : la plus haute est la **Gyrase**, de poids moléculaire 160 kDa, puis la **PARP1** de poids moléculaire 113 kDa. La présence de la bande de la PARP1 dans les billes du puit 3 montre la capture de la PARP1 par la sonde **108**. Cependant, comme le montre la différence d'intensité pour le puit 5 entre les billes et l'éluat, le clivage au dithionite de sodium n'a pas été efficace, puisque la gyrase n'a pas été relarguée dans les éluats. On peut tout de même noter **une bande très fine dans les éluats** des puits 2 et 3, correspondant au faible clivage des sondes **90** et **108**.

Le même test est alors réalisé, avec un nouveau pot de dithionite de sodium. Une quantité plus faible de PARP1 est utilisée, pour économiser la protéine (Fig 92).



- 1 : PARP1 2  $\mu\text{g}$
- 2 : PARP1 2  $\mu\text{g}$  + 90
- 3 : PARP1 2  $\mu\text{g}$  + 108
- 4 : Gyrase 8  $\mu\text{g}$
- 5 : Gyrase 8  $\mu\text{g}$  + 5

FIGURE 92 – Gel SDS-PAGES coloré au bleu de Coomassie de la capture sur PARP1 et Gyrase recombinante et élution au dithionite de sodium (5 mM)

Le clivage est efficace, comme le montre les pistes 5, où la **gyrase** est relarguée avec un bon rendement. Cependant, une bande apparaît sur les billes du puits 1, en l'absence de sonde, d'intensité égale à celle des puits 2 et 3 en présence de sonde, correspondant à la

capture de la **PARP1**. Il s'agit sans doute d'interactions non-spécifiques de la PARP1 sur les billes de streptavidine.

Pour tenter de diminuer ces interactions non-spécifiques, un bloqueur de billes est alors utilisé, BeadBlockSolution. Il s'agit d'une solution de protéine contenant notamment de la caséine, dans laquelle les billes sont préalablement incubées, qui va couvrir les billes d'une couche de protéine, diminuant ainsi les interactions non-spécifiques avec la protéine d'intérêt. La manipulation est alors réalisée avec 12  $\mu\text{g}$  de PARP1, pour maximiser les chances de réussite de la manipulation (Fig 93). En effet, moins il y a de protéine et plus le non-spécifique est visible.

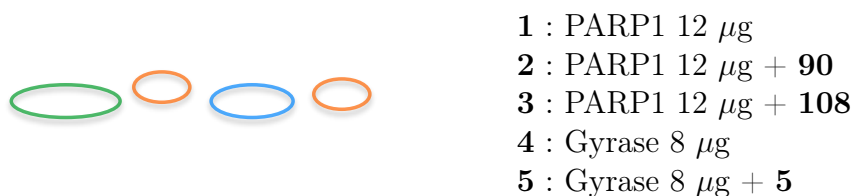


FIGURE 93 – Gel SDS-PAGES coloré au bleu de Coomassie de la capture sur PARP1 et Gyrase recombinante et élution au dithionite de sodium (5 mM) avec pré-incubation à l'aide de BeadBlockSolution

La première observation est que le gel est plus 'sale', présentant de nombreuses autres protéines. Ce sont les protéines de la solution BeadBlockSolution. L'intensité de la bande **PARP1** est égale dans les billes des puits 1, 2 et 3, indiquant que l'utilisation du Bead-BlockSolution n'a pas permis de diminuer le non-spécifique sur les billes. Le clivage a été efficace puisque la **gyrase** est bien présente dans l'éluat 5. On peut noter dans les **éluats des puits 2 et 3** une fine bande correspondant à la PARP1, mais pas suffisante pour que l'on puisse conclure.

Deux solutions sont alors envisageables. La première est celle de changer de billes. La seconde solution est de tenter de travailler sur une petite construction de la PARP1, de seulement 40 kDa, qui ne contient que le site actif de l'Olaparib.

Pour tester la validité de ces deux solutions, une manipulation contrôle est réalisée. Tout d'abord, les interactions non-spécifiques de la PARP1 avec les billes Pierce et les billes

Millipore ont été testées. Ainsi, après avoir été lavées, incubées avec du DMSO, puis lavées de nouveau, les billes sont incubées en présence de PARP1 pendant 1 h à 4 °C, rincées et enfin, dénaturées en présence de bleu de charge. Pour vérifier que le 40 kDa PARP1 peut être capturé par les sondes, le même protocole est utilisé à la différence que les billes sont incubées avec les sondes **90** et **108**. Pour connaître l'intensité correspondant à 100 % de capture, la même quantité de 40 kDa PARP1 est déposée directement sur le gel. Après migration, coloration au bleu de Coomassie et décoloration, le gel est scanné sur l'Odyssey (Fig 94).

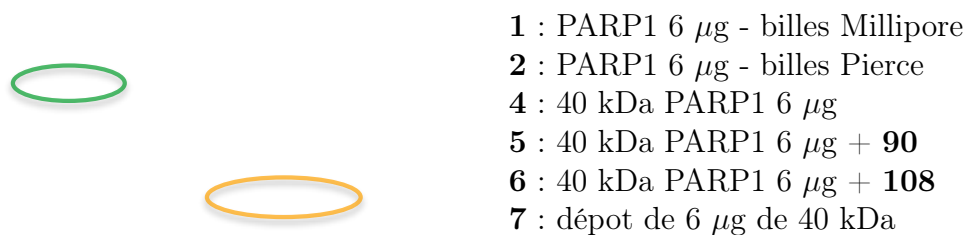
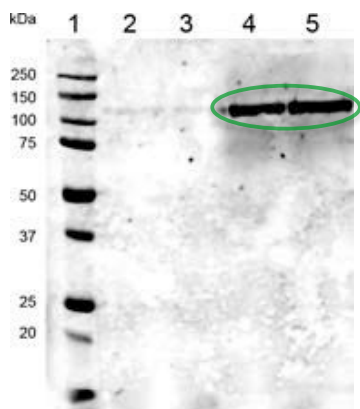


FIGURE 94 – Gels SDS-PAGES coloré au bleu de Coomassie des interactions non-spécifiques sur PARP1 recombinante et de la capture du 40 kDa PARP1

Les intensités dans les puits 5 et 6 des bandes correspondant au 40 kDa PARP1 sont beaucoup plus faibles que la bande dans la piste 7. Ainsi, les sondes ne semblent pas de capturer de manière efficace la petite construction. L'utilisation du 40 kDa PARP1 n'est donc pas optimale pour une expérience de capture et relarguage. L'intensité de la bande correspondant à la PARP1 dans la piste 1 est bien moins forte que celle de la piste 2. Ainsi, les interactions non spécifiques sur les billes Millipore sont bien moindre que celles sur les Pierce. Cela semble donc être la direction à prendre pour pouvoir enfin comparer l'activité de capture mais surtout de clivage des deux sondes **90** et **108**.

### Tests de Binding

Le premier WesternBlot réalisé en conditions dénaturantes avec une révélation à la streptavidine-Alexa 680 semblait indiquer la formation d'une liaison covalente entre la sonde HAZA **90** et la PARP1 (Fig 95). L'autre conclusion de cette première expérience est que la présence de dithionite de sodium ne modifie pas le résultat. Ainsi, l'étape de clivage du motif HAZA ne serait donc pas la cause de l'évènement.



- 1 : Marqueurs de poids moléculaire
- 2 : PARP1 442 nM
- 3 : PARP1 442 nM + Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 5 mM
- 4 : PARP1 442 nM + **90** 1 μM
- 5 : PARP1 442 nM + **90** 1 μM + Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 5 mM

FIGURE 95 – Analyse Western Blot révélée par la streptavidine-Alexa 680<sup>1</sup>.

Pour aller plus loin dans la compréhension, des analogues de la sonde ont été utilisés pour comprendre quelle partie de la molécule serait responsable (Fig 96). Ainsi, une molécule sans le groupement HAZA **113** est synthétisée, et l'intermédiaire **19** est également testé pour voir l'importance de l'inhibiteur. En effet, il se peut que l'inhibiteur amène la sonde dans une poche, la proximité permettant alors à la liaison de se former.

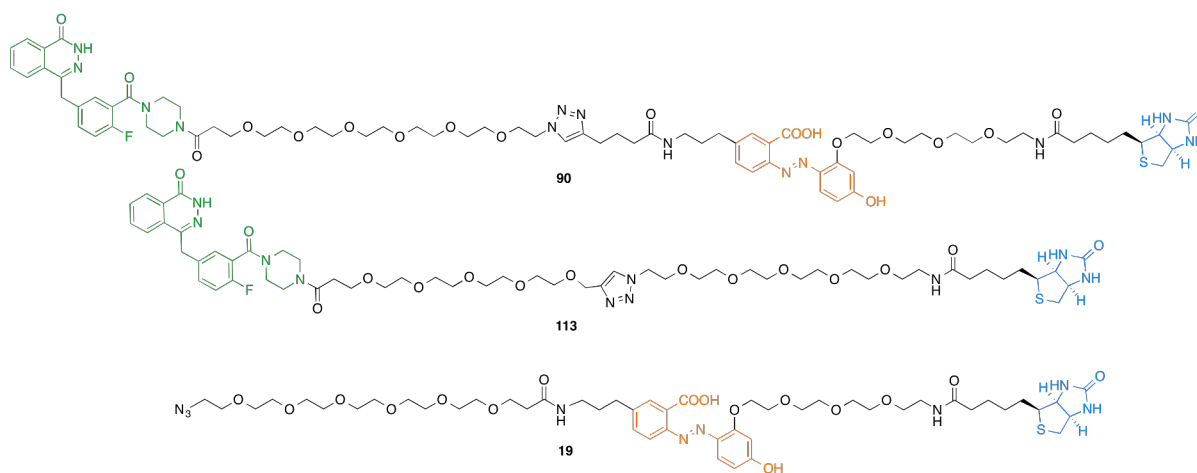


FIGURE 96 – Différents analogues utilisés

Ces trois molécules sont alors incubées avec la PARP1 dans du PBS pendant 1 h, à ta, avant d'être chauffées en présence de bleu de charge pendant 10 min à 90 °C. Une fois les protéines dénaturées, les contenus ont été chargés sur un gel d'électrophorèse. Après la migration, le gel a été transféré sur une membrane de nitrocellulose. Après un premier rinçage à la BSA, la membrane a été incubée en présence de streptavidine-Alexa 680 à 1:4000 pendant 1 h à ta. Le lavage avec un mélange PBS-tween-BSA a permis de retirer le fluorophore en excès, puis la membrane a été révélée sur l'Odyssey (Fig 97).

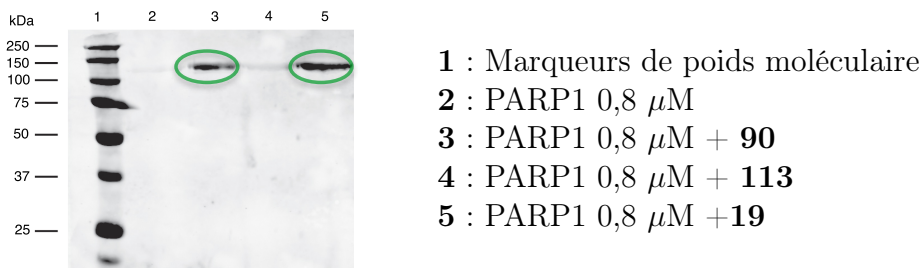


FIGURE 97 – Analyse Western Blot révélée par la streptavidine-Alexa 680

Une bande correspondant à la **PARP1** est observée lors de l'utilisation des sondes **90** et **19**, mais pas **113**. Ainsi, il semble donc que la partie de la molécule responsable de la liaison est bien le motif HAZA. Cependant, l'hypothèse selon laquelle l'inhibiteur joue un rôle en amenant les réactifs à proximité ne se confirme pas puisque le composé **19**, sans inhibiteur, crée quand même une liaison covalente.

Pour voir si cela dépend des protéines, un nouveau test est réalisé, dans lequel deux sondes sont utilisées, le composé **90** mais aussi la sonde novobiocin-HAZA-biotine **5** à 0,5  $\mu\text{M}$ . Différentes combinaisons de protéines sont alors essayées : PARP1; PARP1 + BSA; 40 kDa PARP1; 40 kDa PARP1 + BSA, et enfin la BSA seule. Le même protocole que précédemment est réalisé et la membrane est révélée sur l'Odyssey (Fig 98).

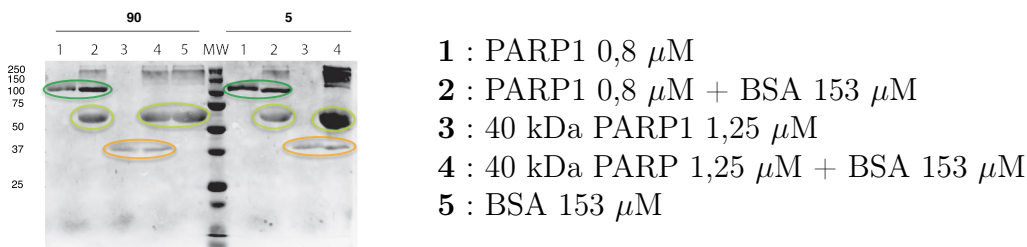


FIGURE 98 – Analyse Western Blot révélée par la streptavidine-Alexa 680

Les bandes correspondant à la **PARP1**, le **40 kDa PARP1** ou encore la **BSA** sont observables sur le gel. Ainsi, il semble que cela ne dépende pas de la protéine, mais aussi que même en présence de BSA, la PARP est fortement marquée.

L'hypothèse alors formulée est qu'il s'agit peut-être d'une réaction avec des cystéines libres présentes sur les protéines. En effet, il y en a plusieurs de disponibles sur la PARP1, et peu sur la gyrase. Pour vérifier cela, la sonde **90** est incubée en présence de cystéine, de GSH et de cystéine protégée et les mélanges sont suivis par HPLC pendant 12 h. Cependant, aucune réactivité n'est détectée.

Si un contrôle négatif est utilisé dans tous les cas, aucun contrôle positif n'est disponible. Or, il serait intéressant pour étudier le tampon de lavage et ajuster sa puissance, de pouvoir avoir ce contrôle positif. A cette fin, une biotine contenant une fonction APN est alors synthétisée. En effet, la fonction APN pour arylpropionitrile développée au laboratoire par le Dr Sasha Koniev permet la bioconjugaison sur les cystéines libres des protéines<sup>6</sup>. La BSA contenant une cystéine en position 34, elle peut donc être biotynilée en utilisant le composé **117** (Fig 99).

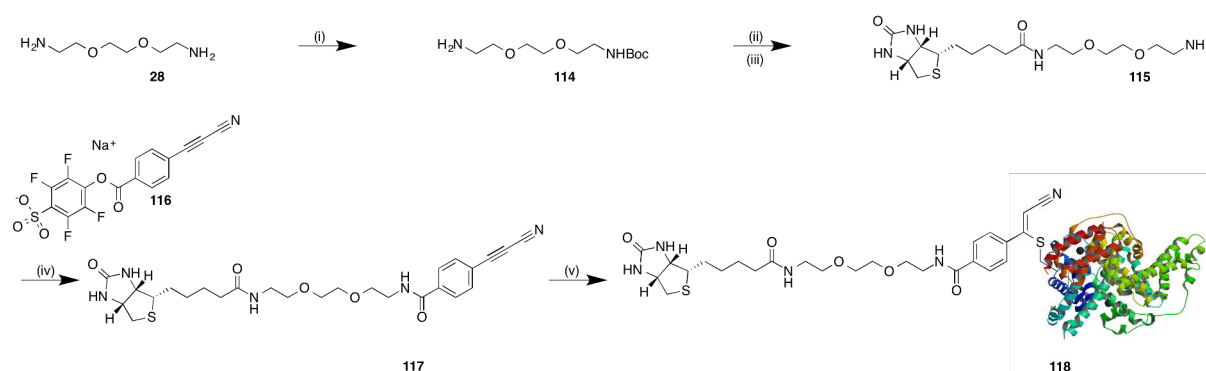


FIGURE 99 – Synthèse de la BSA-biotynilée : (i) :  $\text{Boc}_2\text{O}$ , DCM, 0 °C-ta, 16 h, 65%; (ii) Biotine-NHS, DIPEA, DMF, ta, 16 h, qtt; (iii) TFA, DCM, 0°C-ta, 1 h, qtt; (iv) DIPEA, DMF, ta, 16 h, 22%; (v) BSA, PBS 1x, 37 °C, 16 h

Une fois la BSA-biotine obtenue, 4 tampons de lavage sont testés pour voir leur influence. En effet, il est remarqué que dans un premier temps, il s'agissait d'un mélange PBS/tween/BSA. Cependant, parfois, du lait a été ajouté au mélange. Or, dans le lait, de la biotine est présente, pouvant donc se lier à la streptavidine-Alexa 680. De plus, du triton a parfois été ajouté au mélange. Un test de dotblot est donc réalisé, où sont déposées directement sur la membrane de la PARP1, du 40 kDa PARP1, et de la BSA-biotine. Ainsi, le meilleur tampon sera celui qui revelera la BSA-biotine avec le meilleur contraste, tout en révélant au minimum les PARP1. Les membranes sont d'abord incubées dans un des 4 tampons différents, pour coater la surface de la membrane :

1. PBS 1x - tween 0,1 % - BSA 1 %
2. PBS 1x - tween 0,1 % - BSA 1 % - lait 5 %
3. PBS 1x - tween 0,1 % - BSA 1 % - triton 0,1 %
4. PBS 1x - tween 0,1 % - BSA 1 % - lait 5 % - triton 0,1 %

Elles sont alors incubées avec la streptavidine à 1:4000 dans le même tampon pendant 1 h, lavées de nouveau, et enfin révélées à l'Odyssey (Fig 100).

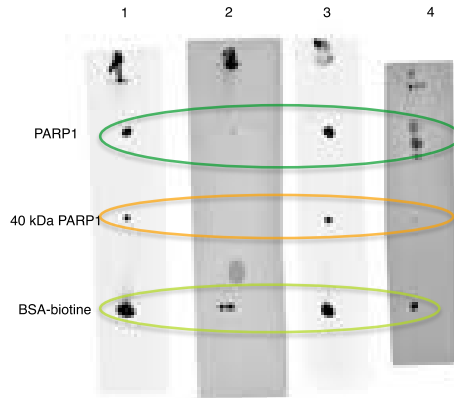


FIGURE 100 – Différents tampons de lavage pour les membranes de WesternBlot

Le point correspondant à la **BSA-biotine** est plus intense dans le cas des tampons 1 et 3. La **PARP1** et le **40 kDa PARP1** sont un peu révélés, ils se lient donc un peu avec la streptavidine, ce qui corrèle avec l'observation du non-spécifique sur les billes de streptavidine lors des tests de pull-down. Le contraste est meilleur dans les cas 1 et 3, puisque la membrane n'est pas grisée comme dans le cas de 2 et 4. Si le lait semble donc bien détériorer la révélation, le triton lui ne semble pas l'influencer.

Un nouveau test de binding est alors réalisé, en utilisant le tampon 3 comme tampon d'incubation de la membrane. Pour vérifier si les cystéines sont la cause ou non de cette liaison covalente observée, les protéines sont préincubées ou non en présence d'APN **119** (Fig 101) avant l'ajout des sondes. Puisque APN se lie aux cystéines, si celles-ci sont responsables du lien covalent formé, l'intensité de la bande PARP 1 dans les puits préincubés en présence d'APN doit diminuer par rapport aux puits sans APN. Pour avoir une idée de l'intensité de cette liaison, la gyrase est également utilisée. Enfin, pour connaître l'intensité que représenterait 100 % de binding, la même quantité de BSA-biotine est également utilisée (Fig 101).

Les bandes observées au niveau des pistes 3 et 4 démontrent la formation d'une liaison covalente entre la **PARP1** et les sondes **90** et **108**. Cependant, les intensités des bandes dans les pistes 3, 4 et 5, 6 sont égales, démontrant qu'il ne s'agit pas d'une réaction avec les cystéines. Au vu de la bande présente dans la piste 8, la **gyrase** forme également une liaison covalente avec la sonde **5**. Or, le clivage de la sonde **5** en présence de gyrase est décrit avec 97 % de rendement. De plus, l'intensité de la bande **BSA-biotine** dans le puit 10 est beaucoup plus importante que les autres. Ainsi, ces deux dernières observations impliquent que le phénomène de liaison covalente observé n'est pas d'une grande intensité.

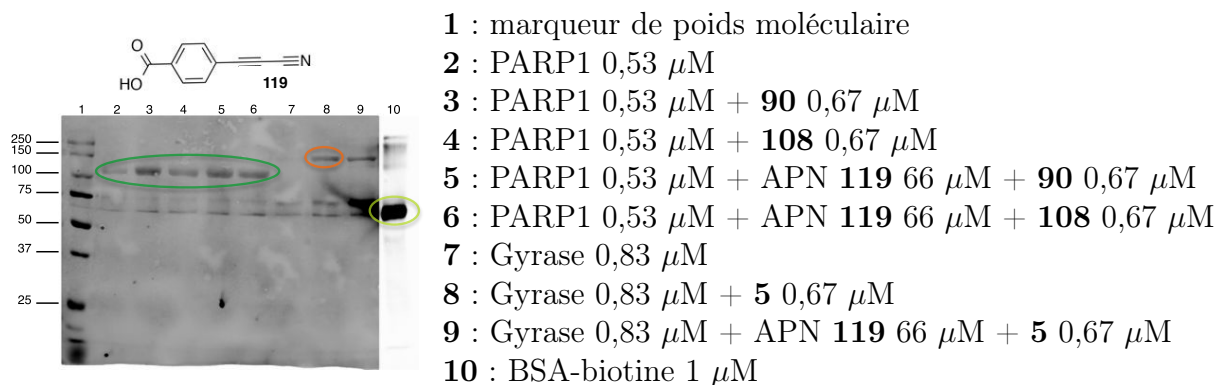


FIGURE 101 – Analyse Western Blot révélée par la streptavidine-Alexa 680

## 5. Conclusion

Suite à un criblage de différentes structures vis-à-vis de nombreux réactifs, un nouveau motif a été mis en évidence, le motif PHID. Après une rapide optimisation de la structure pour augmenter sa réactivité face au dithionite de sodium, un composé bifonctionnel a été synthétisé. Une étude de cinétique en flux stoppé a ensuite permis de comparer les réactivités des motifs HAZA et PHID. Le motif PHID s'est révélé plus réactif que le motif HAZA. Une sonde pour la protéomique chimique a alors été synthétisée, pour tenter d'améliorer les résultats préalablement obtenus au laboratoire avec une sonde HAZA pour la PARP. Cette nouvelle sonde contient donc un dérivé d'Olaparib, le motif PHID et une biotine.

Cette sonde a alors été évaluée pour la capture et la libération de la PARP1 recombinante. Cependant, aucun résultat concluant n'a pour l'instant pu être obtenu, du aux fortes interactions non-spécifiques entre la PARP1 et les billes magnétiques de streptavidine Pierce. L'utilisation d'une petite construction de PARP1 a permis de diminuer ce non-spécifique mais malheureusement, la capture avec la sonde est mauvaise. Lors des dernières manipulations, il a été montré que les billes Millipore présentent bien moins de non-spécifique en présence de PARP1 que les Pierce, ce qui devrait pouvoir permettre d'obtenir rapidement un résultat exploitable.

Concernant la possible liaison covalente observée par le Dr Helene Burckel, expliquant éventuellement les mauvais rendements de clivage obtenus, de nombreux tests ont été réalisés. Il a alors été mis en évidence qu'il s'agit en fait d'un phénomène d'une faible intensité, n'expliquant pas les 50 % de non-clivage observé.



## Références Bibliographiques

1. Burckel, H.  
Synthèse et évaluation de molécules bifonctionnelles alkylantes de l'ADN et inhibitrices de la PARP pour la radiochimiothérapie concomitante.  
PhD thesis, Université de Strasbourg, 2012.
2. Schreiber, V.; Dantzer, F.; Ame, J.C.; de Murcia, G.  
Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule.  
*Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 517–R28.
3. Jagtap, P.; Szabó, C.  
Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors.  
*Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 421–440.
4. Sapountzis, I.; Knochel, P.  
A general amination method based on the addition of polyfunctional arylmagnesium reagents to functionalized arylazo tosylates.  
*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 897–900.
5. Bock, H.; Rudolph, G.; Baltin, E.  
Notiz zur Oxydation 1.2-disubstituierter Hydrazine mit N-Brom-succinimid.  
*Chem. Ber.* **1965**, *98*, 2054–2055.
6. Koniev, O.; Leriche, G.; Nothisen, M.; Remy, J.S.; Strub, J.M.; Schaeffer-Reiss, C.; Van Dorselaer, A.; Baati, R.; Wagner, A.  
Selective irreversible chemical tagging of cysteine with 3-arylpropionitriles.  
*Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 202–206.

# Élimination d'une drogue circulante dans le sang par réaction de click

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Wojciech Krezel de l'Institut Clinique de la Souris.

## 1. Click and Clear

### 1.1 La coagulation

Les phénomènes mis en jeu lorsqu'une blessure a lieu sont complexes. Tout d'abord, la constriction des vaisseaux sanguins permet de ralentir le flux de sang au niveau de la plaie. Les plaquettes sanguines vont alors s'accumuler dans la blessure pour former le clou plaquettaire, ou thrombus blanc. Il s'agit de la phase d'hémostase primaire. La cascade de coagulation<sup>1</sup> commence en faisant intervenir de nombreux éléments :

- des cellules endothéliales qui expriment le facteur tissulaire (FT), élément déclenchant la coagulation
- des phospholipides anioniques membranaires, externalisés par les plaquettes, qui servent de surface de catalyse aux réactions de coagulation
- des facteurs de coagulation

Les facteurs de coagulation sont des pro-enzymes numérotées de I à XIII. Chacun existe sous deux formes, leur forme non active (FI) et activée (FIa). Ces facteurs de coagulation activés peuvent alors activer un autre facteur ou modifier une protéine impliquée dans la coagulation. Leur temps de demie-vie va de quelques heures à plusieurs jours en fonction des facteurs. Parmi ces facteurs, quatre d'entre eux possèdent une fonction carboxyle, qui leur permet de fixer le calcium et de se lier aux phospholipides. Il s'agit des facteurs II, VII, IX et X. Cette carboxylation nécessite la présence de vitamine K. En son absence, ces facteurs de coagulation sont inactivés.

Cette cascade de coagulation aboutit à la synthèse de fibrine qui vient renforcer le clou plaquettaire en emprisonnant des globules rouges, formant ainsi le thrombus rouge. L'élément central de cette cascade est la thrombine, ou facteur II activé (FIIa), puisque c'est elle qui transforme le fibrinogène en fibrine.

Cette cascade (Fig 102) débute par l'activation du facteur tissulaire lorsqu'il entre en contact avec le sang. Il forme alors un complexe avec le FVIIa. De manière plus ou moins directe, ce complexe active alors le FX. La présence de FXa, de FVa, de phospholipides membranaires et de calcium active alors la prothrombine FII en thrombine FIIa. En plus de transformer le fibrinogène en fibrine, la thrombine catalyse également sa propre synthèse en activant certains facteurs de coagulation. Elle participe également à la stabilisation du caillot en activant le FXIII.

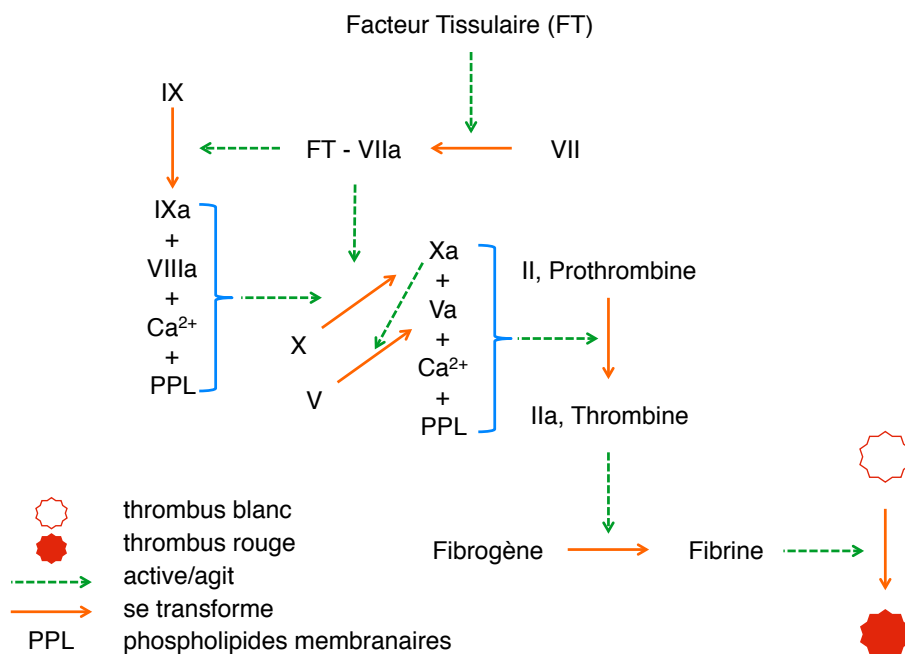


FIGURE 102 – Cascade de coagulation simplifiée

Pour éviter que la coagulation ne se généralise à l'ensemble du corps ou provoque des thromboses, des inhibiteurs de coagulation interviennent également. Ainsi, l'antithrombine inhibe le FIIa, mais aussi FIXa et FXa. Le système Protéine C - Protéine S inhibe les facteurs Va et VIIIa. Enfin, TFPI, un inhibiteur de la voie du facteur tissulaire inhibe l'activation du FX par le complexe FT-FVIIa.

Il est important de mentionner que le calcium joue un rôle central dans cette cascade de coagulation. C'est pourquoi les prélèvements de sang sont réalisés en présence de citrate, chélatant du calcium.

## 1.2 Les anticoagulants

### Les différentes classes

Il existe principalement 3 classes d'anticoagulants. Ils sont prescrits en prévention ou en traitement de troubles thrombo-emboliques.

Les héparines sont des polysaccharides qui activent l'antithrombine, inhibant ainsi les facteurs II et X (Fig 103-A). Ce sont des médicaments administrés en injection intraveineuse ou sous-cutanée, principalement lors d'opération chirurgicale pour éviter la formation de caillot. Les héparines sont également utilisées comme anticoagulant *ex vivo*, lors de prélèvements sanguins.

Disponible sous forme orale, les anti-vitamine K (AVK) sont les anticoagulants les plus anciens et les plus courants. Il en existe deux grandes familles, les dérivés de coumarine (Fig 103-B) et ceux d'indane-1,3-dione (Fig 103-C). Ils empêchent la réduction de la vitamine K, sa forme oxydée ne présentant pas d'activité biologique. Comme mentionné plus haut, la vitamine K joue un rôle clé dans la synthèse des facteurs de coagulation II, VII, IX et X. Ainsi, l'inhibition de la formation de la vitamine K empêche la carboxylation des facteurs II, VII, IX et X, ne pouvant alors pas se lier aux phospholipides membranaires et au calcium, interrompant donc la cascade de coagulation. Cependant, les facteurs ayant un temps de demie-vie pouvant aller jusqu'à plusieurs jours, il faut quelques jours pour stabiliser le traitement et obtenir une réelle activité anticoagulante. Les AVK présentent eux aussi un temps de demie-vie de l'ordre de 48 h, impliquant que l'activité anticoagulante se poursuit encore plusieurs jours après l'arrêt de traitement. Il s'agit d'un traitement délicat à mettre en place, nécessitant l'évaluation régulière de la coagulation chez le patient. Contrairement aux héparines, les AVK n'ont aucune activité anticoagulante *ex vivo*.

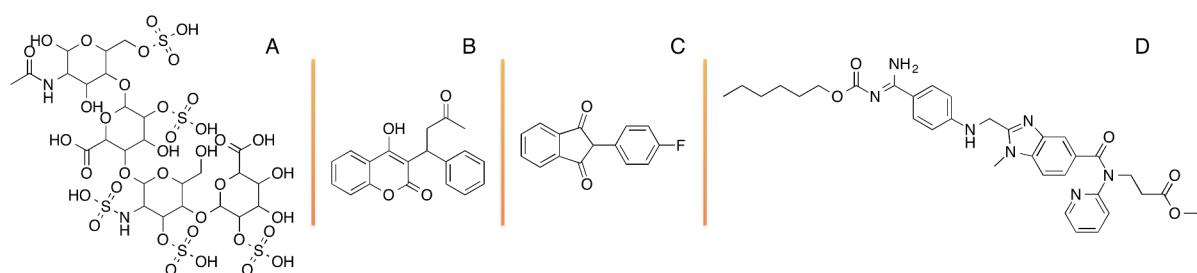


FIGURE 103 – Les différentes classes d'anticoagulants

Récemment, de nouveaux anticoagulants oraux (NACO) ont été développés. Ce sont des

médicaments qui inhibent directement un facteur de coagulation, comme le dabigatran (Fig 103-D) qui inhibe directement la thrombine. Leur principal avantage est qu'ils ne nécessitent pas de suivi biologique régulier.

## Les antidotes

En cas d'opération urgente, les patients sous traitement anticoagulant sont soumis à deux risques principaux<sup>2</sup> :

- un risque thrombotique, lors de l'arrêt des anticoagulants
- un risque hémorragique, si les anticoagulants sont maintenus ou bien à la reprise du traitement

L'arrêt des anticoagulants pour une opération n'est donc pas systématique, mais cependant nécessaire dans certains cas. Dans le cas d'une opération programmée, l'arrêt de l'administration des héparines permet une opération au plus tard 12 h après. Concernant les AVK, du à leur long temps de demie-vie, il faut attendre jusqu'à 5 jours avant de pouvoir opérer. L'injection de vitamine K permet de réduire ce temps à 24 h. Cependant, en cas d'opération urgente sur un patient traité par un AVK, l'injection d'une solution des facteurs II, VII, IX, et X permet de retrouver une coagulation immédiate. Concernant les NACOs, il n'existe pas d'antidote à ces anticoagulants.

Le développement d'un nouveau système dual composé d'un composé anticoagulant et de son antidote immédiat présente un grand intérêt. Actuellement en phase 3 d'essais cliniques, le système Reg 1 développé à l'université de Duke est composé d'un aptamère inhibant le facteur IXa, et d'un antidote (Fig 104)<sup>3</sup>. Cet aptamère est un ARN simple brin composé de 35 nucléotides, appelé RB006. Son antidote est un oligonucléotide complémentaire appelé RB007, l'interaction entre les deux unités étant très forte et irréversible. Ainsi, une fois injecté, RB006 se lie au facteur IXa, provoquant un effet anticoagulant. En cas de besoin, RB007 peut être injecté, et la formation du complexe RB006-RB007 libère le FIXa, permettant à la cascade de coagulation de reprendre son fonctionnement instantanément.



FIGURE 104 – Principe de fonctionnement du système Reg 1<sup>4</sup>

## L'évaluation de la coagulation

Il existe trois tests principaux pour détecter une anomalie de la coagulation:

- la numération des plaquettes
- le temps de céphaline activée (TCA)
- le temps de prothrombine (TP) ou temps de Quick

La numération des plaquettes consiste à compter le nombre de plaquette contenu dans un volume donné, pour évaluer le nombre de plaquette dans le corps. Cela ne permet pas d'évaluer l'activité des anticoagulants.

Le temps de céphaline activée ou TCA est le test pour mesurer l'activité de l'héparine, celui du temps de prothrombine pour mesurer l'activité des AVK. Ce sont des tests rapides réalisés en laboratoire sur le plasma fraîchement prélevé en présence de citrate de sodium, donc décalcifié et déplaqueté. Ils mesurent tous deux le temps de coagulation de l'échantillon suite à l'ajout d'un réactif. Dans le cas du TP, il s'agit de la thromboplastine calcique, qui est en réalité du facteur tissulaire en présence de phospholipides et de calcium<sup>5</sup>, ce qui déclenche donc la cascade de coagulation. Dans le cas du TCA, la cascade de coagulation est provoquée par l'ajout d'un activateur comme la silice, en présence de phospholipides et de calcium.

Il est important de retenir que plus le temps (TCA ou TP) est long, moins le système de coagulation est bon, plus le composé présente donc une activité anticoagulante.

### 1.3 Pharmacocinétique

La pharmacocinétique, souvent appelée ADME, est l'étude du devenir de la substance active du médicament après avoir été administrée<sup>6</sup>. Elle se compose de quatre grandes parties, responsable du sigle ADME :

- Absorption
- Distribution
- Métabolisme
- Excrétion

L'absorption est le passage du médicament du site d'administration jusque dans le sang, sans modification de structure. Il existe de nombreuses voies d'administration, allant de la voie orale à la voie intraveineuse en passant par la voie cutanée ou encore nasale. La voie d'administration choisie va changer les propriétés d'absorption du médicament. Pour évaluer cette absorption, on mesure la biodisponibilité, c'est-à-dire la dose de médicament qui atteint la circulation sanguine et la vitesse à laquelle cela se produit.

L'étude de la distribution d'un médicament permet de déterminer dans quels tissus se trouve le principe actif. Il peut se trouver simplement porté par les protéines plasmatiques, mais peut également s'accumuler dans un organe comme le foie.

Le métabolisme est la modification de la structure du principe actif par une enzyme qui modifie son activité biologique. Si le métabolisme peut avoir lieu dans de nombreux organes (intestin, rein, peau,...), les principaux acteurs du métabolisme sont les cytochromes P450 du foie. Les transformations sont classées en deux phases, phase I et phase II. Au cours de la phase I, les réactions peuvent être des oxydations, des réductions, ou encore des hydrolyses. Les groupements fonctionnels introduits sur les molécules au cours de la phase I sont alors utilisés en phase II pour l'introduction d'un groupement solubilisant dans l'eau, comme un sulfate ou un acide glucuronique.

L'élimination est la dernière phase de la vie du médicament. La plupart des molécules sont éliminées après passage au niveau du rein, dans les urines, mais également au niveau du foie dans la bile. Après sa métabolisation, le xénobiotique présente souvent un groupement glucuronique, très hydrosoluble, qui va provoquer son élimination dans les urines et dans la bile.

## 1.4 Le projet Click and Clear

Au cours de ce projet, l'objectif est d'utiliser les récents développements en chimie bioorthogonale, notamment la réaction de SPAAC, pour provoquer l'élimination rapide d'un anticoagulant circulant (Fig 105). En effet, un anticoagulant portant une fonction azoture pourrait être éliminé par injection d'un antidote comportant une partie cyclooctyne pour se lier à la drogue, et d'une partie sucre pour provoquer l'élimination.

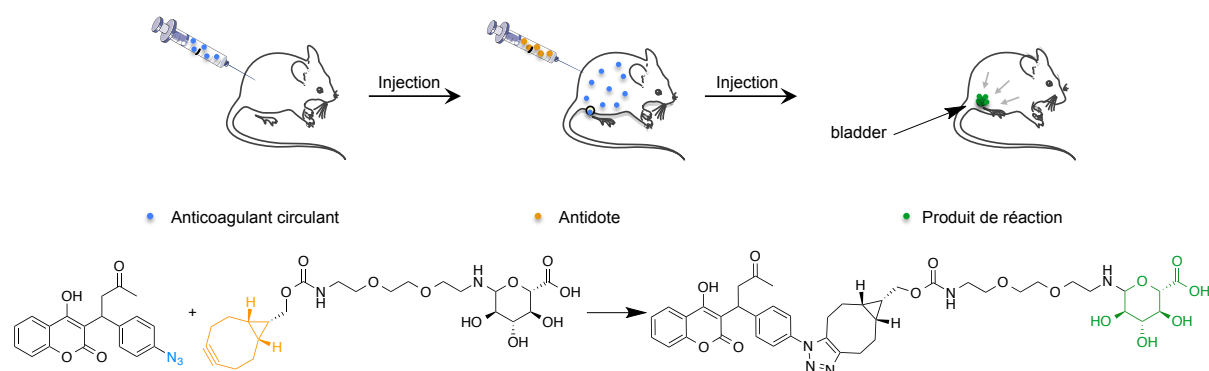


FIGURE 105 – Projet Click and Clear

Le choix de l'anticoagulant s'est porté sur les dérivés de coumarine. En effet, puisque de nombreux dérivés de coumarine présentent une activité anticoagulante, notamment la warfarine **120** et l'acénocoumarole **121**, l'introduction d'une fonction azoture ne devrait pas perturber cette activité (Fig 106). De plus, en comparaison de l'héparine, il s'agit de composés facilement synthétisables. Enfin, le test pour l'évaluation de la coagulation est connu et facilement réalisable. Le BCN **123**, pour bicyclononyne, a été sélectionné comme cyclooctyne, pour sa synthèse en seulement 3 étapes. Le glucuronide **124** a été choisi puisqu'il s'agit du sucre utilisé lors de la métabolisation.

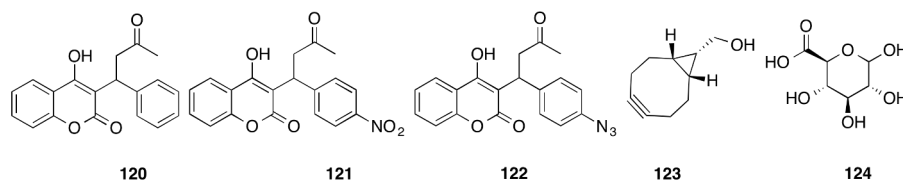


FIGURE 106 – Les différents composés impliqués dans le projet

Cette étude comporte donc deux phénomènes distincts, la réaction de click *in vivo* puis l'élimination *via* les urines. Pour pouvoir les distinguer, il s'agit donc de les étudier séparément. Dans un premier temps, l'étude de la réaction de click *in vivo* a donc été réalisée, entre la warfarine-N3 et le BCN. Une fois les différents paramètres mis au point, la synthèse de l'antidote complet comprenant le BCN et le sucre sera envisagée, et enfin l'élimination du produit de click sera étudié.

L'étude de la réaction de click *in vivo* nécessite tout d'abord la synthèse des dérivés de warfarine, et l'étude de la cinétique de la réaction *in vitro*. Les différentes mesures de coagulation seront alors réalisées chez la souris, puisque les AVK ne présentent pas d'activité anticoagulante s'ils sont administrés *ex vivo*. Enfin, la réaction de click chez la souris sera étudiée, et son optimisation réalisée.

## 2. Synthèse et cinétique de réaction

### 2.1 Synthèse des dérivés de Warfarine

La warfarine se synthétise en 2 étapes à partir du benzaldéhyde, qui subit dans un premier temps une réaction de Knoevenagel avec l'acétone, le produit formé étant alors couplé à l'hydroxycoumarine par une addition de Michael. Pour obtenir le dérivé de warfarine souhaité (Fig 107), le p-nitrobenzaldéhyde **125** est transformé en p-azidobenzaldéhyde **126** en 1 h à 110 °C dans un réacteur à micro-ondes en présence de  $\text{NaN}_3$  dans le



DMF (73 %). Celui-ci est alors engagé dans une réaction de Knoevenagel dans les conditions décrites par Zumbansen et collaborateurs<sup>7</sup>, en présence de trifluoroacétate de morpholinium **127**(63 %). La cétone  $\alpha, \beta$ -insaturée obtenue réagit alors en présence de 4-hydroxycoumarine pour donner la warfarine-N3 **122** désirée (55 %)<sup>8</sup>. La version cliquée de la warfarine **129** est également synthétisée, de manière quantitative, par réaction de SPAAC entre la warfarine-N3 **122** et le BCN **123**.

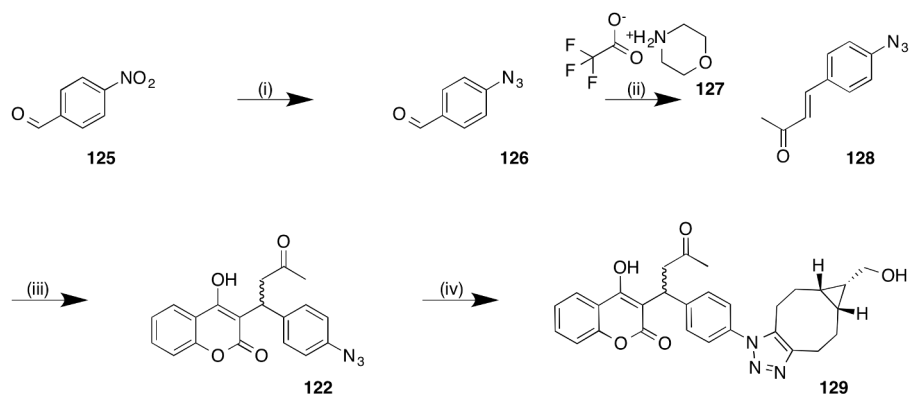


FIGURE 107 – Synthèse des dérivés de Warfarine : (i)  $\text{NaN}_3$ , DMF, 110 °C,  $\mu\text{W}$ , 1 h, 73 %; (ii) **127**, acétone, tube scellé, 100 °C, 1 h 30, 63 %; (iii) 4-hydroxycoumarine, *S*-proline, DCM, DMSO, ta, 16 h, 55 %; (iv) BCN, DMSO, ta, 16 h, qtt

La caractérisation par RMN des composés **122** et **129** s'est révélée plus complexe qu'attendue. En effet, le mélange étant racémique, un spectre simple était attendu pour **122** puisque deux énantiomères présentent le même spectre RMN. Cependant, il semble qu'une forme fermée de la warfarine existe, menant alors à deux diastéromères (Fig 108).

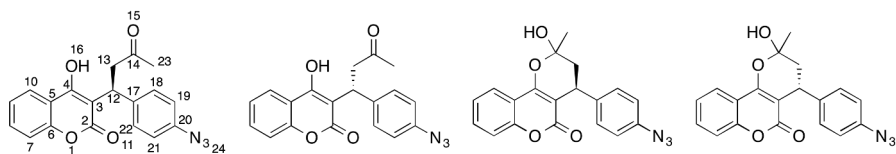


FIGURE 108 – Les différentes formes de la Warfarine-N3 **122** en solution

Ainsi, certains signaux sont démultipliés, permettant notamment de déterminer les proportions de chacune des espèces en solution. Ainsi, dans le chloroforme, on observe 3 signaux pour les protons 10 (Fig 109-A) et 23 (Fig 109-B), dans des proportions de 1:4:5. Par contre, dans l'acétone, il n'y en a que 2, cette fois pour les protons 19,21 (Fig 109-C) et 23 (Fig 109-D), dans des proportions de 3:7. Les analyses 2D permettent d'attribuer les deux signaux de 23 vers 1,7 ppm aux méthyls des formes fermées. Ainsi, dans l'acétone,

la forme ouverte n'existe pas. Cependant, pour déterminer précisément la structure du centre asymétrique de la forme fermée, ou encore savoir laquelle des deux formes fermées est majoritaire, des études plus poussées seraient nécessaires.

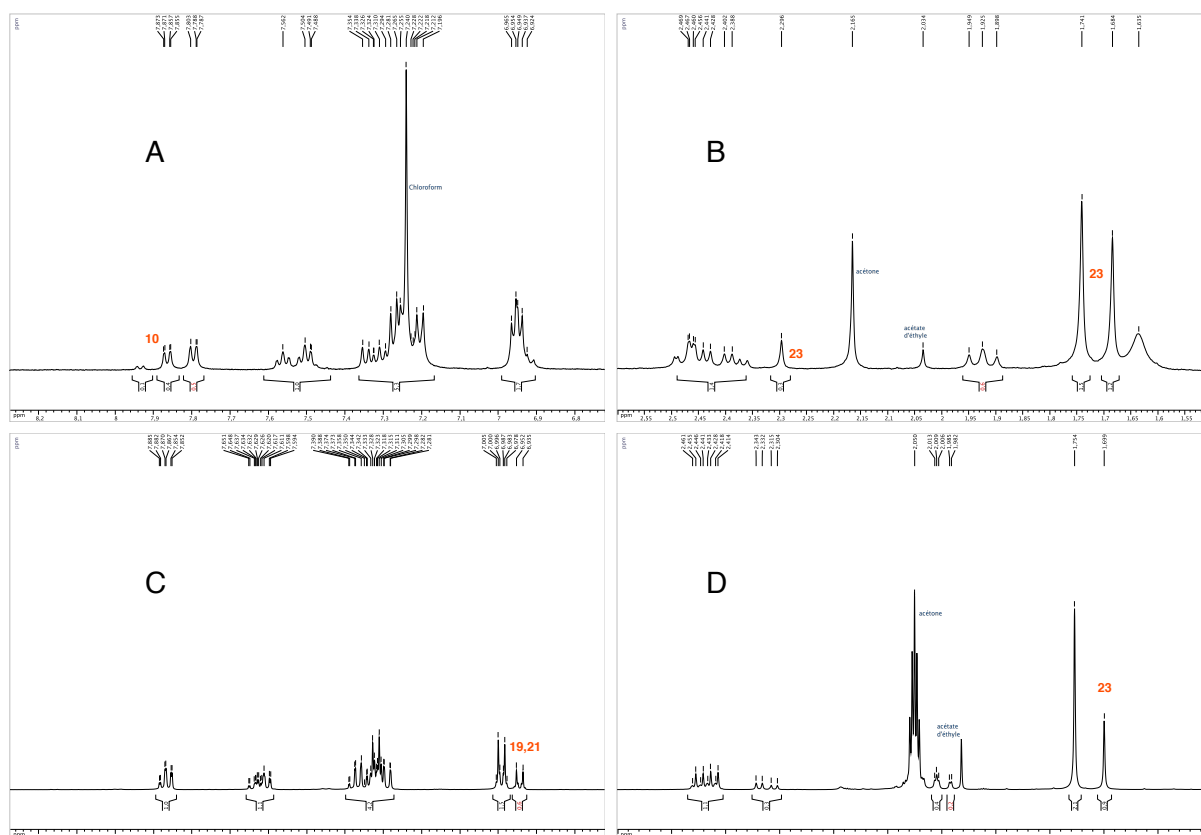


FIGURE 109 – Extraits des spectres RMN de **122** dans le chloroforme (A,B) et l'acétone (C,D)

Cette complexification l'est d'autant plus dans le cas de **129**, puisque la réaction de SPAAC conduit aux deux isomères de position. Le BCN étant optiquement actif, on se retrouve alors avec un mélange racémique de deux diastéréoisomères, pouvant être sous forme ouverte et/ou fermée.

## 2.2 Etude HPLC de la cinétique de la réaction

Si la réaction entre la warfarine-N3 **122** et le BCN a bien eu lieu, puisqu'elle a menée à l'obtention de la warfarine-clickée **129**, il s'agit alors d'étudier la cinétique de la réaction dans l'eau et dans le plasma à des concentrations similaires à celles rencontrées dans le milieu biologique pour s'assurer de la faisabilité de la réaction chez l'animal.

## Mise au point du protocole HPLC

Pour réaliser une étude cinétique par HPLC, différents paramètres ont tout d'abord besoin d'être établis. Puisqu'il s'agit de mimer le milieu biologique, les différentes réactions sont réalisées à 37 °C, dans un tampon PBS 1x pH 7,4 ou dans du plasma humain, récupéré auprès de l'établissement français du sang (EFS).

En premier lieu, il faut déterminer la longueur d'onde de travail, qui doit permettre de voir à la fois les réactifs et les produits avec une bonne intensité pour travailler à faible concentration. Les spectres UV des composés **122** et **129** ont donc été réalisés. La longueur d'onde d'absorption maximale des composés est déterminée à 306 nm, correspondant aux valeurs de la littérature<sup>9</sup>. L'analyse HPLC de chacun des composés a alors permis de montrer qu'en travaillant à une concentration de 100  $\mu\text{M}$ , l'injection de 50  $\mu\text{L}$  de solution permet d'obtenir pour chaque composé des pics fins et résolus, à des temps de rétention bien distincts.

Lorsque l'on travaille dans du plasma humain ou animal, il est important avant injection sur la colonne HPLC de précipiter les protéines pour ne pas la boucher. Cependant, cette précipitation ne doit pas provoquer de perte de matière des composés étudiés. Pour cela, deux solvants ont été évalués, le méthanol et l'acétonitrile. Ainsi, **122** et **129** ont chacun été incubés à 0,5 mM dans du plasma pour 40 min. Pour chaque échantillon, 100  $\mu\text{L}$  de plasma ont alors été prélevés, dilués avec 400  $\mu\text{L}$  de méthanol ou d'acétonitrile à 0 °C, centrifugés à 4000 t/min pendant 7 min à 4 °C, filtrés sur seringue 0,45  $\mu\text{m}$  puis 50  $\mu\text{L}$  ont été injectés en HPLC. La comparaison des intégrations des pics obtenus avec celles d'une solution de composés à 100  $\mu\text{M}$  dans le PBS permet de vérifier que l'ensemble du composé organique a été extrait. Ainsi, dans le cas du méthanol, une erreur de l'ordre de 25 % apparaît pour les deux composés, alors que pour l'acétonitrile, l'erreur est inférieure à 5 %. Le protocole retenu est donc celui de la précipitation en présence d'acétonitrile froid.

Il est ensuite nécessaire de choisir un étalon interne optimal, permettant la normalisation des résultats. Il doit s'agir d'un composé stable, soluble dans l'eau, qui s'extrait facilement dans le solvant d'extraction choisi, qui absorbe à la longueur d'onde de travail, qui ne coélue avec aucun des réactifs/produits et qui ne perturbera pas la réaction étudiée. Pour cela, de nombreux composés proches en structure ont été testés : 4-hydroxycoumarine **130**, 3-hydroxyflavone **131**, quercétin **132**, flavanone **133**, fisétine **134**, coumarine **135**, 8-hydroxy-7-méthoxycoumarine **136**, acide 3-coumarine-carboxylique **137**, 5,7-diméthoxycoumarine **138**, 7-hydroxycoumarine **139** et warfarine native **120** (Fig 110). Parmi ces 11 composés testés, un n'est pas soluble, 3 coéluent, 4

ne s'extraient pas et un présente un pic déformé. Le choix entre la coumarine **135** et la warfarine **120** a été fait arbitrairement, et la warfarine native a été choisie comme étalon interne. Une courbe d'étalonnage est alors réalisée, et une solution stock à 10 mM en warfarine et warfarine-N3 a alors été préparée et son ratio déterminé, servant ainsi de ratio initial.

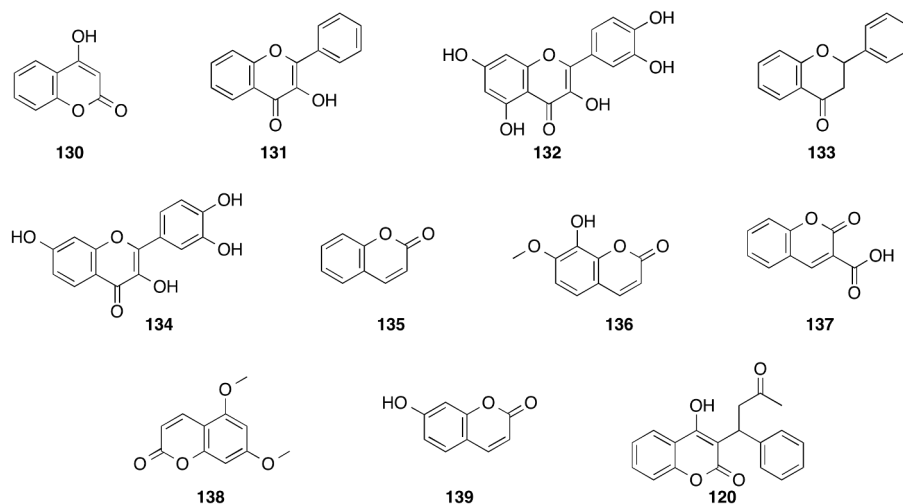


FIGURE 110 – Différents étalons internes évalués

Différents gradients sont alors testés pour tenter d'optimiser au maximum la séparation des différents pics. L'HPLC étant conditionnée avec de l'eau acidifiée à 0,05 % de TFA comme solvant A et de l'acétonitrile comme solvant B, différents gradients de 10 min ont été essayés, en modifiant les ratios de départ et d'arrivée. C'est le gradient habituellement utilisé au laboratoire qui donne les meilleurs résultats (Fig 111).

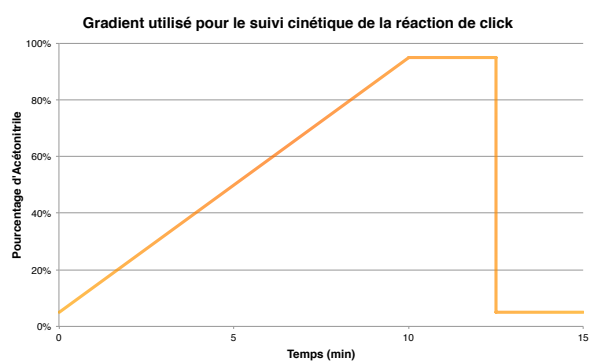


FIGURE 111 – Gradient retenu pour l'analyse HPLC

Lorsque la réaction est étudiée dans le plasma, il y a donc un temps de traitement de l'échantillon d'environ 8 min. Pendant ce temps, la réaction de SPAAC peut continuer

de se produire. Une trempe, réalisée par l'ajout d'acétonitrile froid, provoquant une forte dilution et un abaissement de la température est peut-être suffisante pour stopper la réaction. Cependant, pour s'en assurer, il peut être utile d'ajouter à l'acétonitrile un composé en large excès qui réagirait avec le BCN restant. L'azoture de benzyl, l'acide 4-(azidométhyl) benzoïque, et l'azoture de naphtyl ont été testés, mais malheureusement soit eux-mêmes soit le produit de click coéluent avec **122** ou **129**. Suite à la récente découverte de la réaction des sydnones **140** (Fig 112) avec les cyclooctynes<sup>10</sup>, celles-ci ont également été testées. Si le temps de rétention est proche de celui de **129**, ils ne coéluent cependant pas. Une expérience de cinétique est alors réalisée, en présence ou non de sydnone (Fig 112). Aucune différence n'est observée entre les deux cas, démontrant que la réalisation de la trempe est suffisante pour stopper la réaction tant que l'injection en HPLC a lieu immédiatement après le traitement. Il est donc décidé de ne pas en utiliser. Ainsi, lors des expériences sur les animaux, le sang devra être congelé juste après avoir été prélevé pour garantir la reproductibilité de la mesure.

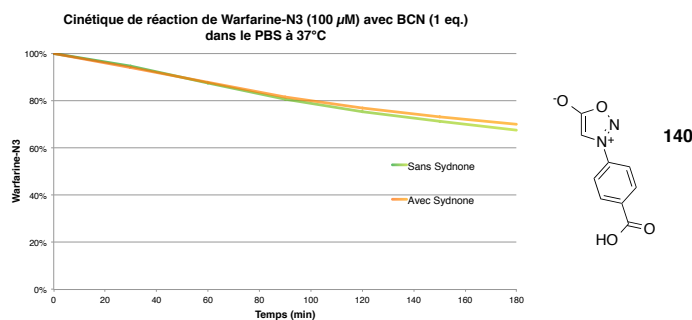


FIGURE 112 – Cinétique comparée avec et sans ajout de sydnone

Le protocole ainsi établi est donc le suivant. La réaction est réalisée à 100 µM en warfarine-N3 **122** en utilisant la warfarine native à la même concentration comme étalon interne. La quantité de BCN est variable en fonction de l'expérience. Lorsque la réaction est réalisée dans le plasma, les protéines sont précipitées avec de l'acétonitrile à 0 °C, qui suffit également à stopper la réaction. L'échantillon est alors centrifugé pendant 7 min à 4000 t/min à 4 °C, filtré sur seringue 0,45 µm puis un volume de 50 µL est alors injecté en HPLC, réglée sur 306 nm. Si la réaction est dans le PBS, aucun traitement n'est nécessaire. Pour pouvoir ensuite comparer l'ensemble des données, la disparition de la warfarine-N3 est observée et les intégrations obtenues sont normalisées grâce à celle de la warfarine native (Fig 113).

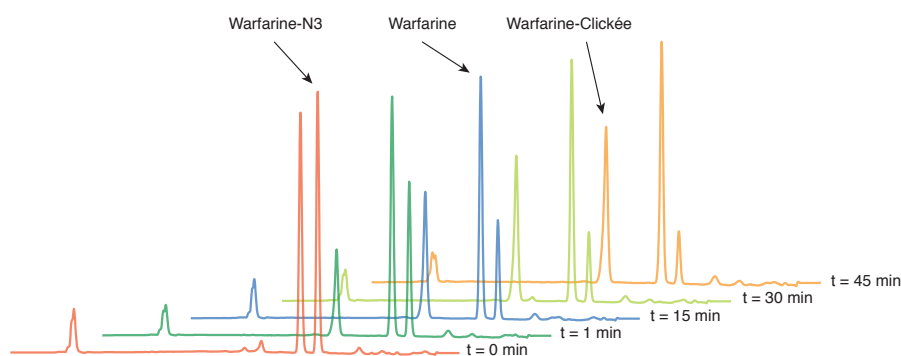


FIGURE 113 – Spectres HPLC obtenu dans le plasma, à 37 °C, 100  $\mu$ M en warfarin-N3 et BCN, avec la warfarine native comme étalon interne à 100  $\mu$ M et en précipitant les protéines à l’aide d’acétonitrile froid

### Cinétique de réaction

Dans un premier temps, pour déterminer la constante de la réaction dans le PBS et le plasma, la cinétique est réalisée en présence d’un seul équivalent de BCN, à 100  $\mu$ M en réactif. La vitesse de la réaction s’exprime  $V = k_r * [122] * [BCN]$ . Puisque l’on a  $[122] = [BCN] = C$ , la formule se réduit à  $V = k_r * C^2$ . En traçant alors  $1/C = f(t)$ ,  $k_r$  est le coefficient directeur de la droite. Si la régression linéaire pour mener à la constante est très bonne dans le cas du PBS, elle l’est un peu moins dans le cas du plasma.

Solvant	$k_r (M^{-1}.s^{-1})$
PBS	0,58
Plasma	11,1

FIGURE 114 – Constante de vitesse de la réaction de **122** avec BCN dans le PBS et le plasma

On remarque tout d’abord que la réaction est bien plus rapide dans le plasma que dans le PBS. Cela peut sans doute s’expliquer par la présence des protéines. En effet, **122** et BCN étant des molécules hydrophobes, elles sont certainement portées par les protéines du sang, favorisant ainsi la réaction. Cette ‘catalyse’ de la réaction par les protéines du plasma explique sans doute la moins bonne régression linéaire observée pour la détermination de la constante.

Cependant, avec un équivalent de BCN, la réaction n'est pas suffisamment rapide pour pouvoir être utilisée en milieu vivant. La cinétique est alors réalisée avec 5 et 10 équivalents de BCN. Encore une fois, on remarque que la réaction est bien plus rapide dans le plasma que dans le PBS.

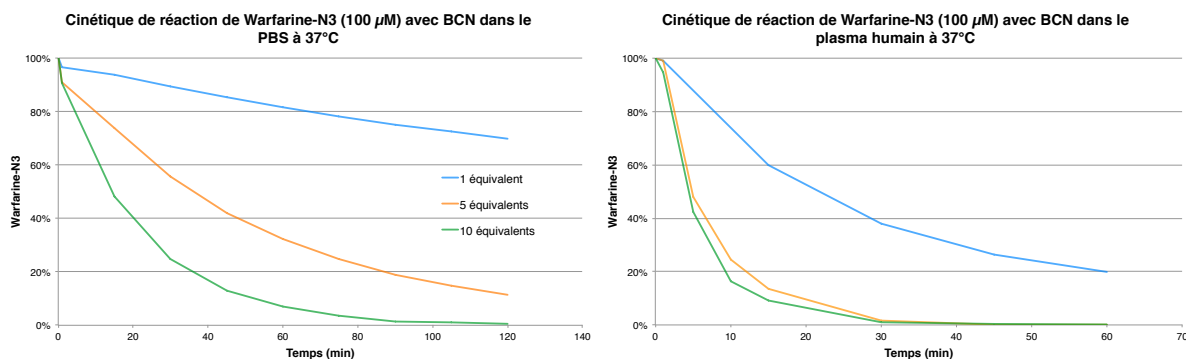


FIGURE 115 – Cinétique de réaction entre **122** et BCN

Ainsi, en utilisant 10 équivalents de BCN, la réaction atteint 90 % de conversion en 15 min dans le plasma, ce qui permet d'envisager l'expérimentation animal.

### 2.3 Evaluation *in vivo* de l'activité anticoagulante

L'activité anticoagulante des deux dérivés de warfarine a tout d'abord été mesurée par le test du temps de prothrombine. Le protocole établi est le suivant. La warfarine étant un médicament administré par voie orale, chaque composé a été suspendu dans une solution de méthylcellulose, à une dose de 10 mpk. Puisqu'il s'agit d'un médicament qui se prend tous les jours, les souris sont gavées deux fois à 24 h d'intervalle, puis sacrifiées 24 h après. Pour le gavage, une seringue avec une aiguille spéciale à bout rond permettant de déposer le composé directement dans l'estomac de l'animal est utilisée (Fig 116-A). Les échantillons de sang sont alors prélevés à l'aide de seringues contenant au préalable une solution de citrate (Fig 116-B), mélangés et reposés 15 min (Fig 116-C), puis ils sont centrifugés (Fig 116-D) pour récupérer les plasmas (Fig 116-E) qui sont alors utilisés pour mesurer le temps de prothrombine.

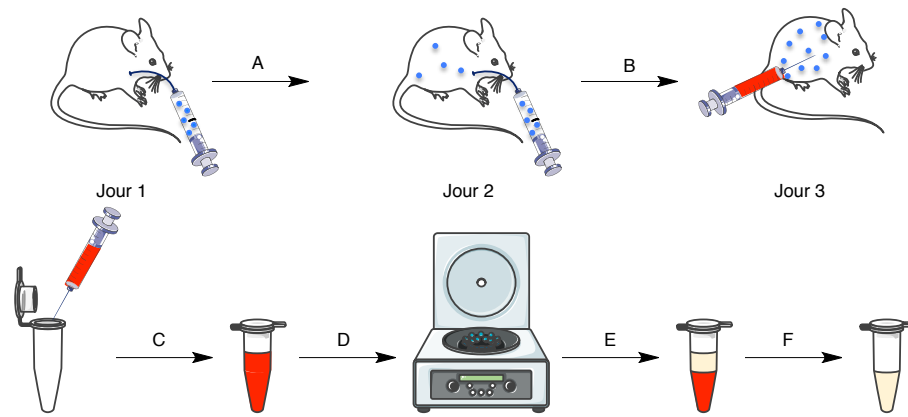


FIGURE 116 – Protocole pour la préparation des échantillons de plasma

Au cours du test, 50  $\mu\text{L}$  de plasma sont placés dans une cuve, en présence d'une bille magnétique. L'échantillon est chauffé pendant 2 min à 37 °C dans la **zone de chauffage**. Il est alors déplacé dans la **zone de mesure**, où la bille magnétique se met en mouvement sous l'action du champs magnétique. L'ajout de 100  $\mu\text{L}$  de **Néoplastine**, la thromboplastine calcique, sur l'échantillon déclenche le chronomètre, qui s'arrête lors de l'arrêt du mouvement de la bille, signe de la coagulation de l'échantillon.

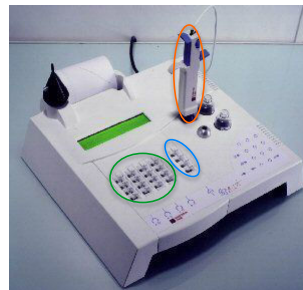


FIGURE 117 – Système STart 4, analyseur de coagulation semi-automatique, permettant la mesure du temps de prothrombine.

La warfarine native a été utilisée comme contrôle positif de l'activité anticoagulante, et la simple administration du vecteur comme contrôle négatif. Chaque composé a été testé sur un groupe de 5 animaux. En effet, il s'agit de trouver un bon compromis entre suffisamment d'animaux pour s'assurer d'une analyse statistique significative tout en maîtrisant le cout des animaux.



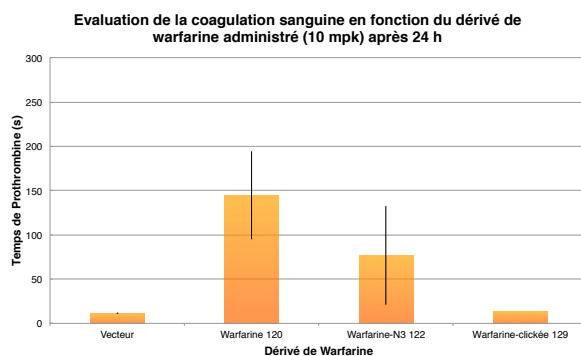


FIGURE 118 – Evaluation de l’activité anticoagulante de **122** et **129**

Ainsi, si son activité n’est pas aussi importante que la warfarine native, la warfarine-N3 **122** présente bien une activité anticoagulante (Fig 118). On remarque rapidement les fortes variations sur la mesure au cours de la manipulation, intrinsèques aux expériences sur animaux. Le résultat très intéressant est que la warfarine-clickée **129** ne semble pas présenter d’activité anticoagulante. Ainsi, le suivi de la réaction peut se faire par suivi de l’activité anticoagulante, puisque le réactif est actif et que le produit ne l’est plus.

### 3. Réaction *in vivo*

Après cette première évaluation de l’activité anticoagulante des différents composés, différents critères ont été évalués pour mettre au point l’expérience de click *in vivo*.

#### 3.1 Optimisation des conditions

##### Temps de sacrifice

Le premier paramètre qu’il semble important d’optimiser est le délai après lequel est réalisé le sacrifice (Fig 119). En effet, plus l’effet anticoagulant sera important, plus il sera facile de mettre en évidence la réaction de click par disparition de cet effet. A cette fin, les souris ont été gavées deux fois avec de la warfarine native à 24 h d’intervalle, puis sacrifiées 6 h, 24 h, 48 h et 72 h après le dernier gavage.

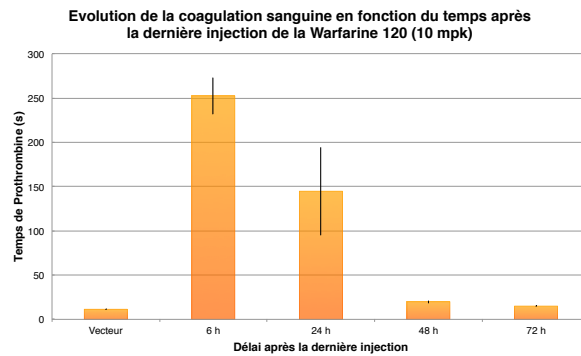


FIGURE 119 – Evolution de la coagulation sanguine au cours du temps

Ainsi, le temps optimal semble être 6 h, puisque non seulement l’activité anticoagulante est plus importante, mais en plus l’erreur sur la mesure est moindre. Cependant, pour des questions pratiques d’expérimentation, un temps de 8 h est finalement sélectionné pour la suite des expériences.

### Dose administrée

La dose de 10 mpk avait été sélectionnée pour les premières expériences pour être certain de voir un effet. Cependant, au vu des différentes publications sur le sujet, et des variations observées sur la mesure, il semble que cela soit un paramètre à optimiser. Les doses de 2, 4 et 10 mpk ont alors été testées (Fig 120).

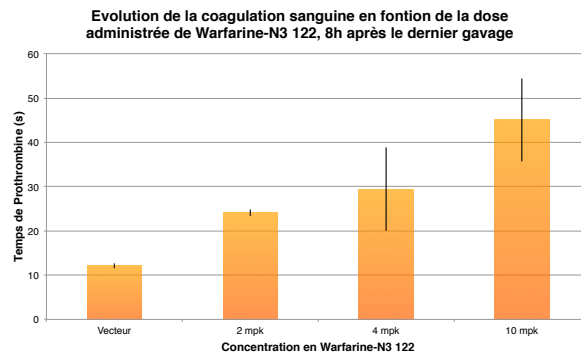


FIGURE 120 – Évolution de la coagulation sanguine en fonction de la dose administrée

Comme attendu, l’activité anticoagulante évolue avec la dose. La dose de 2 mpk semble un bon choix puisque l’activité anticoagulante est encore observable tout en minimisant les variations sur la mesure.

## 3.2 Premier essai de click chez l'animal

Suite à ces résultats d'optimisation, la réaction de click a alors été tentée chez l'animal, avec une dose de 2 mpk et un délai entre le gavage et le sacrifice de 8 h. En considérant que toute la dose de warfarine passe dans le sang, et pour avoir 10 équivalents de BCN, il faut donc administrer une dose de 10 mpk de BCN.

Dans un premier temps, l'injection intraveineuse de BCN a été envisagée, de manière à augmenter la probabilité de rencontre avec le dérivé de warfarine. Cependant, le volume d'injection en intraveineuse (100  $\mu\text{L}$ ) ne permet pas de dissoudre tout le BCN dans un mélange DMSO/saline. Une injection intrapéritonéale a alors été sélectionnée, permettant d'injecter une suspension de BCN dans le mélange DMSO/saline 7:3.

Les animaux sont d'abord gavés deux fois à 24 h d'intervalle avec une dose de dérivé de warfarine de 2 mpk (Fig 121-A, B). Certains animaux reçoivent alors deux heures plus tard (soit 6 h avant le sacrifice) une injection intrapéritonéale de BCN (Fig 121-C).

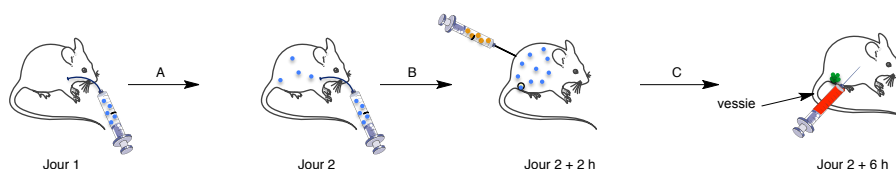


FIGURE 121 – Protocole pour la réaction de click

Ainsi, 6 groupes d'animaux ont été analysés :

- les contrôles négatifs, qui ne sont gavés qu'avec le vecteur méthylcellulose
- les animaux gavés avec la warfarine-clickée **129**
- les animaux gavés avec la warfarine-N3 **122**
- les animaux gavés avec la warfarine-N3 **122** puis traités avec le mélange DMSO/saline 7:3
- les animaux gavés avec la warfarine-N3 **122** puis traités avec BCN dans le mélange DMSO/saline 7:3

Comme observé précédemment, la warfarine-N3 **122** présente bien une activité mesurable, et la warfarine-clickée **129** ne semble pas en présenter (Fig 122). L'injection du mélange DMSO/saline tout comme celle de BCN provoque une augmentation du temps de prothrombine, contrairement à ce qui était attendu.

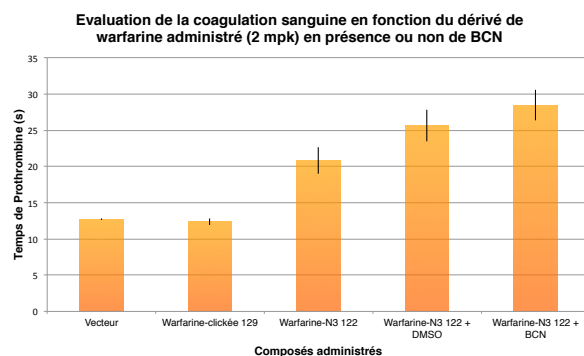


FIGURE 122 – Evolution de la coagulation sanguine en fonction de l’administration ou non de BCN

Plusieurs justifications peuvent expliquer ce phénomène. D’un point de vue chimique, il s’agit de savoir si le BCN est réellement passé dans le sang après l’injection intrapéritonéale. Une étude de pharmacocinétique déterminant les vitesses de passage dans le sang permettrait de pouvoir s’en assurer, mais aussi de déterminer le délai idéal après le gavage pour l’injection du BCN. D’un point de vue biologique, le délai entre la mesure de la coagulation et l’injection de BCN n’est peut-être pas optimal, puisqu’il est possible que la cascade de coagulation n’ait pas eu le temps de se réactiver.

### 3.3 Etude pharmacocinétique des différents composés

Pour tenter de mieux comprendre et d’optimiser les différents paramètres de l’expérience, des analyses de spectrométrie de masse sont donc réalisées par Patrick Gizzi de la plateforme PCBIS.

Dans un premier temps, une optimisation de la méthode HPLC et une gamme étalon sont réalisées dans un solvant organique pour chaque composé impliqué dans la réaction, warfarine-N3 **122**, warfarine-clickée **129** et BCN **123**.

Suite à cela, l’analyse de plasma de souris ayant été traité *ex vivo* avec chacun des composés a été réalisée. Si la détection des dérivés de warfarine dans le plasma ne présente pas de difficulté, le BCN n’est quant à lui pas détectable à cause d’un effet de suppression ionique. Pour le rendre détectable par cette technique, seule une modification structurale est possible. L’idée est alors de le mettre en évidence par fluorescence dans le plasma, en utilisant une coumarine pro-fluorescente développée par Bertozzi et collaborateurs. Cependant, cette différence de fluorescente entre la forme libre et la forme clickée de la coumarine n’est pas suffisante pour être appliquée, aux concentrations de travail, à une

analyse dans le plasma. En effet, la fluorescence basale du plasma couplée à la fluorescence basale de la coumarine est du même ordre de grandeur que celle du produit clické.

Concernant les dérivés de warfarine, une expérience pour déterminer la pharmacocinétique des différents composés a alors été réalisée (Fig 123). A cette fin, des souris sont gavées une première fois avec les dérivés de warfarine à 2 mpk. 24 h plus tard, un échantillon de sang est prélevé à l'aide d'un capillaire recouvert d'héparine au niveau d'une coupure réalisée sur la queue. Les souris sont alors gavées de nouveau, et des échantillons de sang sont prélevés après 30 min, 1 h, 2 h et 3 h selon le même protocole. La centrifugation des échantillons, suivi de la précipitation des protéines dans l'acétonitrile froid a permis leur analyse en LC-MS-MS.

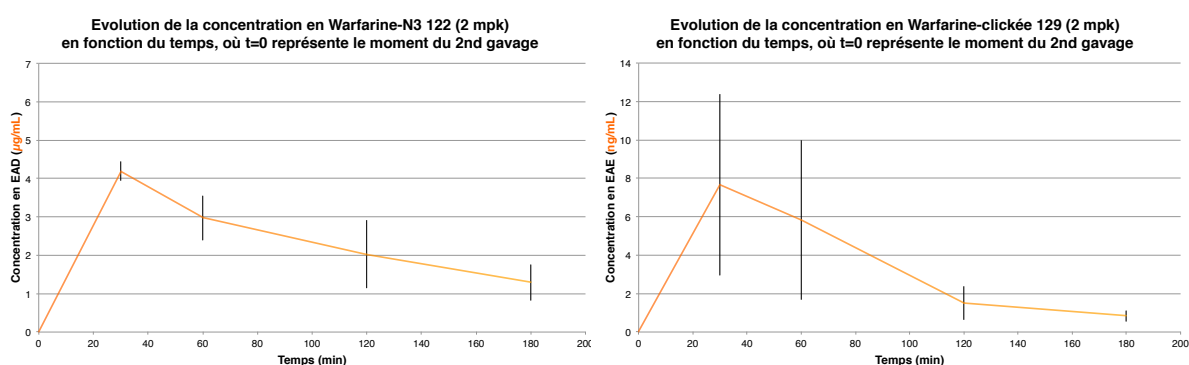


FIGURE 123 – Evolution de la concentration sanguine des dérivés de warfarine

Tout d'abord, 24 heures après le premier gavage, il ne reste plus de dérivés de warfarine dans le sang. Après le nouveau gavage, ils sont rapidement absorbés dans le sang. Dans le cas de la warfarine-N3 **122**, 30 minutes après le deuxième gavage, un dixième de la dose administrée se trouve dans le sang. Après 2 h, la quantité est divisée par 2. Ainsi, il semblerait plus intéressant d'injecter le BCN rapidement après le gavage, pour maximiser la probabilité de rencontre tant que la warfarine-N3 se trouve encore dans le sang. De plus, il est nécessaire de réaliser les points à 10 et 20 min pour terminer cette étude pharmacocinétique. Enfin, il serait intéressant dans de prochaines expériences de prélever le foie des animaux pour y doser la warfarine-N3.

Concernant la warfarine-clickée **129**, il semble que la quantité qui passe dans le sang est mille fois moins importante que dans le cas de la warfarine-N3 **122**. Cette observation peut peut-être expliquer l'absence d'activité de la warfarine-clickée **122**. En effet, si elle ne passe pas dans le sang, elle ne pourra pas présenter une activité anticoagulante. Ainsi, il n'est pas certain que la réussite de la réaction de click entraîne une baisse d'activité

anticoagulante. Pour confirmer cela, une injection en intraveineuse du composé serait nécessaire, de manière à connaître précisément la dose administrée.

## 4. Formulation de BCN

### 4.1 Formulation

Une possibilité pour augmenter la solubilité du BCN pour pouvoir l'injecter directement en intraveineuse est de tenter de le formuler. Pour cela, une première étude est réalisée par François Daubeuf, pour déterminer le bon agent de formulation. Ainsi, des solutions à 10 mM de BCN dans différents solvants sont réalisées. En comparant l'absorbance de ces solutions à l'absorbance de la solution sans BCN, on en déduit quel solvant est le meilleur. En effet, si BCN n'est pas totalement solubilisé, une différence d'absorbance va apparaître, les courbes ne vont donc pas se superposer, le solvant n'est alors pas approprié.

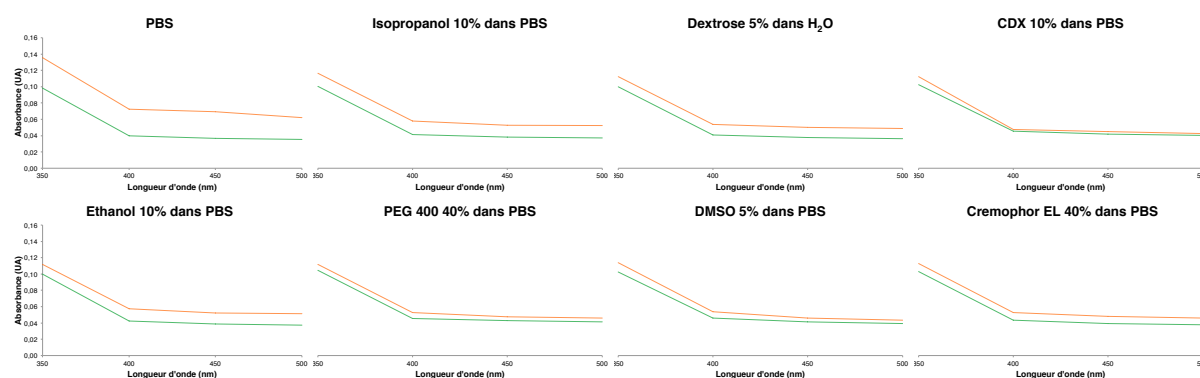


FIGURE 124 – Absorbance des solutions de solvants avec et sans BCN

D'après les différentes analyses (Fig 124), la formulation avec 10 % de 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine (CDX) dans le PBS semble la condition la plus intéressante.

### 4.2 Etude cinétique dans les nouvelles conditions

Il est important de vérifier que la formulation de BCN avec des cyclodextrines ne va pas intervenir dans la réaction. Pour cela, de nouvelles mesures de cinétique sont réalisées, dans les conditions développées précédemment.

Le BCN **123** est solubilisé à 10 mM dans une solution de 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine (CDX) à 10 % dans le PBS. La réaction est conduite comme précédemment, en présence

de 10 équivalents de BCN (Fig 125).

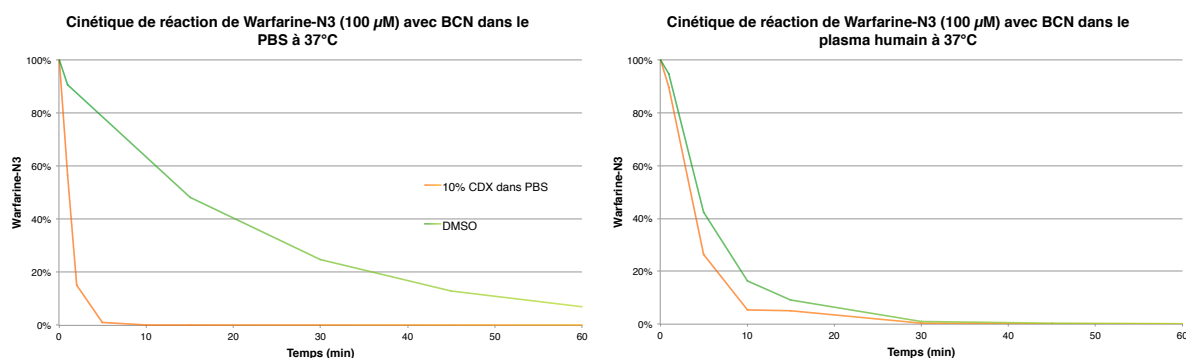


FIGURE 125 – Cinétique de réaction en présence ou non de cyclodextrine (CDX)

La vitesse de la réaction est fortement augmentée dans le PBS, alors qu'il ne semble y avoir que peu d'influence dans le plasma. En effet, les cyclodextrine jouent sans doute un rôle de support à la réaction, favorisant la rencontre entre les deux entités et accélérant ainsi la réaction.

## 5. Conclusion

La synthèse des dérivés de warfarine a été réalisée. Après la mise au point du système HPLC pour l'évaluation de la cinétique de la réaction, celle-ci a été évaluée et les constantes de réactions déterminées. L'évaluation de l'activité anticoagulante des différents dérivés de warfarine a dans un premier temps mis en évidence la possibilité de contrôler la réaction de click par le suivi de l'activité biologique. La biodisponibilité des différents composés mis en jeu a alors été déterminée. Néanmoins, le BCN non dérivatisé n'est pas détectable dans un système LC-MS-MS. De plus, sa faible solubilité ne permet pas une injection en intraveineuse.

Pour améliorer nos conditions, une étude de formulation de BCN a alors été réalisée, montrant que la 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine permet la solubilisation de BCN dans le PBS. L'injection de BCN par voie intraveineuse est désormais envisageable.

Afin de rendre BCN détectable par spectrométrie de masse, une modification chimique de BCN permettrait d'introduire des groupements facilement ionisables. Une étude pharmacocinétique du passage dans le sang du dérivé de BCN sera alors réalisable.

Il sera également nécessaire de compléter la pharmacocinétique réalisée sur la warfarine-N3 pour déterminer le délai idéal pour l'injection du BCN.

D'un point de vue biologique, il serait intéressant de pouvoir administrer de la vitamine K à des souris préalablement traitées avec la warfarine-N3. Cela permettrait de déterminer le temps nécessaire à la cascade de coagulation pour se réactiver, indication quant au délai utile pour le sacrifice des animaux.

L'ensemble de ces développements devraient nous permettre d'optimiser les différents délais, et de tester ainsi de nouveau, la réaction de click *in vivo*.



## Références Bibliographiques

1. Schved, J.F.  
Physiologie de l'hémostase.  
*Fac. Med. Montpellier-Nimes* **2007**, *1*, 1–6.
2. Marret, E.; Monteiro, P.  
Patient sous anticoagulants et antiagrégants.  
*53eme congrès Natl. d'anesthésie réanimation* **2011**, *1*, 1–9.
3. Rusconi, C.; Scardino, E.; Layzer, J.; Pitoc, G.  
RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa.  
*Nature* **2002**, *419*, 90–94.
4. <http://www.regadobio.com/>.
5. Boehlen, F.; Reber, G.  
Le temps de prothrombine revisité 70 ans après.  
*Rev. Med. Suisse* **2008**, *4*, 350–353.
6. Lechat, P.  
Pharmacologie.  
*Univ. Pierre Marie Curie* **2007**, *1*, 1–349.
7. Zumbansen, K.; Döhring, A.; List, B.  
Morpholinium Trifluoroacetate-Catalyzed Aldol Condensation of Acetone with  
both Aromatic and Aliphatic Aldehydes.  
*Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 1135–1138.
8. Halland, N.; Hansen, T.; Jorgensen, K.A.  
Organocatalytic asymmetric Michael reaction of cyclic 1,3-dicarbonyl compounds  
and alpha,beta-unsaturated ketones—a highly atom-economic catalytic one-step  
formation of optically active warfarin anticoagulant.  
*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 4955–4957.
9. Zhu, X.; Shin, W.G.  
Gender differences in pharmacokinetics of oral warfarin in rats.  
*Biopharm. Drug Dispos.* **2005**, *26*, 147–150.
10. Plougastel, L.; Koniev, O.; Specklin, S.; Decuypere, E.; Créminon, C.; Buisson,  
D.A.; Wagner, A.; Kolodych, S.; Taran, F.

4-Halogeno-sydnone for fast strain promoted cycloaddition with bicyclo-[6.1.0]-  
nonyne.

*Chem. Commun. (Camb)*. **2014**, 1, 5–7.



# Conclusion Générale

Les travaux réalisés au cours de cette thèse portent sur de nouveaux développements en chimie bioorthogonale pour différentes applications biologiques, en protéomique chimique et en pharmacocinétique.

Dans une première partie, nous nous sommes intéressés à l'étude en protéomique chimique des différents interactants de trois inhibiteurs de Topoisomérase IIA humaine. Ce sujet se situe dans la continuité d'un premier travail réalisé au laboratoire au cours duquel un lien clivable en conditions non dénaturantes a été développé pour la protéomique chimique. Trois inhibiteurs de Topoisomérase IIA humaine (Top2) ont été sélectionnés, la doxorubicine **2** et l'étoposide **3** pour leur vaste utilisation en chimiothérapie du cancer, et le dexrazoxane **4** pour son mode d'action différent, agissant sur le site ATP.

Deux dérivatisations de la doxorubicine ont été envisagées, tout d'abord par un amide (sonde **12**), puis par la réalisation d'une amination réductrice (sonde **20**). L'activité anti-topoisomérase des sondes obtenues a été évaluée par le test de relaxation de l'ADN. Malgré l'apparente absence d'activité anti-Top2, des expériences de capture et libération (pulldown) de protéines sur lysat cellulaire ont été réalisées pour étudier les cibles secondaires. Deux lignées cellulaires ont été sélectionnées, HeLa et RS4;11. Comme attendu, la Top2 n'a pas été capturée, mais des protéines comme XRCC5 et XRCC6 impliquées dans la réparation de l'ADN ont été mises en évidence comme interactants de la doxorubicine. Il serait alors intéressant de valider l'activité ou non de la doxorubicine sur ces protéines.

Concernant l'étoposide, après une première tentative de dérivatisation de celui-ci par acétalisation, la stratégie utilisée s'est basée sur la 4-déméthylépipodophyllotoxine **26**. Ainsi, une chaîne latérale a été introduite par arylation de **26**, permettant l'obtention de la sonde **32**. L'activité anti-Top2 de cette sonde a été évaluée, et les expériences de pulldown ont alors été réalisées sur les lignées cellulaires RS4;11 et Calu-1. Une protéine

a été identifiée lors des deux expériences sur les deux lignées cellulaires, la Galectin-3-binding protéine. Une étude de l'activité de l'étoposide sur cette protéine serait alors intéressante. Alors que la sonde **26** présentait une activité anti-Top2, la Top2 n'a pas été capturée lors des expériences. La synthèse d'une sonde d'affinité présentant un lien photoactivable a été alors envisagée, sans avoir eu le temps d'être terminée.

La dérivatisation du dexrazoxane **4** n'est pas décrite à ce jour. Après une étude de la structure co-cristallisée de Top2 avec le dexrazoxane, il a été décidé de le dériver au niveau du groupement méthyle. La première voie de synthèse envisagée a été l'alkylation d'un composé dibromé **57** par la pipérazinedione **56**, sans réussite. Une seconde voie a alors été proposée, utilisant la pipérazinedione protégée **66**. Celle-ci a permis l'obtention de l' $\alpha$ -aminonitrile **69** par réaction avec l'aldéhyde **62**. Cependant, la réduction du nitrile a échoué. La dernière voie envisagée, et la plus prometteuse, est la voie utilisée industriellement, au cours de laquelle une diamine a été alkylée par de l'acide chloroacétique puis le composé a été cyclisé. Si la réaction semble fonctionner sur un dérivé modèle, l'introduction d'un groupement dérivatisable s'est révélée plus délicate. En effet, les conditions de réactions ont compliqué le choix d'un groupement protecteur résistant à l'ensemble des étapes de la synthèse. L'optimisation de cette voie de synthèse reste encore à réaliser.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés au développement d'un nouveau lien clivable, toujours pour des applications en protéomique chimique. En effet, un travail précédemment réalisé au laboratoire a montré que le clivage du lien HAZA en présence de la PARP1 n'est efficace qu'à 50 %. Ce phénomène a alors été attribué à la formation d'une liaison covalente entre la sonde **90** et la protéine, mise en évidence par western blot.

Pour déterminer un nouveau motif clivable, un criblage a dans un premier temps été réalisé. Six structures choisies pour leur analogie au motif HAZA ont été synthétisées. Leur stabilité en présence de 18 réactifs a été évaluée. Deux structures ont montré une réactivité intéressante, **91** avec le dithionite de sodium et **92** avec l'hydrazine. Après une rapide optimisation, seule l'étude du dérivé **91** a été poursuivie.

Des analogues de **91** - appelé motif PHID - ont été synthétisés et leur réactivité vis-à-vis du dithionite de sodium a été évaluée. Devant la rapidité de la réaction, une étude de cinétique en flux stoppé a été réalisée. Elle a démontré que la réaction du motif PHID avec le dithionite de sodium est plus rapide que dans le cas du motif HAZA. Suite à ce premier

résultat intéressant, une sonde pour l'étude protéomique de la PARP1 **108**, contenant un dérivé d'Olaparib, le lien PHID et une biotine a donc été synthétisée. L'analyse par spectrométrie de masse du produit de réaction entre **108** et le dithionite de sodium a confirmé qu'il s'agit bien d'une réaction de clivage.

Cette sonde **108** a alors été évaluée dans la capture et surtout la libération de la PARP1 recombinante. Malheureusement, l'apparition d'une forte interaction non spécifique entre la PARP1 et les billes de streptavidine a empêché l'évaluation du clivage de la sonde **108** en présence de la PARP1. Plusieurs solutions ont alors été envisagées, notamment l'utilisation d'un bloqueur de billes, d'une construction de PARP1 ne comprenant que le site actif, ou encore de changer les billes de streptavidine. Seule l'option du changement de billes a semblé être intéressante pour la diminution du non spécifique. Une nouvelle expérience sur des billes Millipore doit encore être réalisée pour pouvoir conclure.

Dans le même temps, l'étude du possible lien covalent entre la sonde **90** et la PARP1 a été réalisée. Des analogues de **90** ont été utilisés pour déterminer quelle partie de la sonde est responsable. Il a alors été mis en évidence que c'est le motif HAZA. Une étude plus quantitative a alors montré qu'il s'agit finalement que d'un phénomène mineur, n'expliquant pas les 50 % de non clivage.

Enfin, dans une troisième partie, la réaction de click entre un cyclooctyne et un azoture a été appliquée à l'élimination d'un médicament circulant *in vivo*. La warfarine a été sélectionnée comme anticoagulant car elle possède un temps de demi-vie dans le sang d'environ 48 h et qu'elle est facilement synthétisable. L'idée est alors de faire réagir par réaction de click *in vivo* une warfarine portant une fonction azoture avec une sonde contenant un cyclooctyne - le BCN, et un glucuronide - un sucre provoquant l'élimination. Dans un premier temps, la réaction entre la warfarine-N3 **122** et le BCN **123** a été étudiée.

La warfarine portant une fonction azoture a été synthétisée en 3 étapes à partir du 4-nitrobenzaldéhyde. La réaction de click avec le BCN a permis l'obtention du dérivé **129**. Après optimisation des conditions HPLC, la cinétique de la réaction entre **122** et **123** a été évaluée, dans le PBS et dans le plasma. L'activité anti-coagulante des dérivés **122** et **129** a été mesurée, permettant de penser que le suivi de la réaction pourra se faire par suivi de l'activité biologique, puisque **122** présente une activité et **129** non.

Les différents paramètres de l'expérimentation animale ont alors été étudiés. Le délai entre le gavage des animaux et leur sacrifice, ainsi que la dose de travail ont été op-

timisés. Un premier essai de click *in vivo* a alors été réalisé, mais il n'a pas permis de conclure quant à l'issue de la réaction. Pour continuer d'optimiser les conditions, une étude par spectrométrie de masse du passage dans le sang des différents composés a alors été conduite.

Au cours des différentes expérimentations, il apparaît clairement que BCN n'est que peu soluble dans le mélange DMSO/saline aux concentrations de travail, et il n'est de plus pas détectable dans le plasma par spectrométrie de masse. Pour palier à cela, la formulation du BCN a été réalisée, et la 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine s'est révélée comme étant la condition la plus intéressante. Cependant, cela ne permet pas de rendre BCN détectable par masse, il serait donc intéressant de pouvoir le dériver, pour réaliser son étude pharmacocinétique.

# Chemical Experimental Part

## General Methods

**General experimental procedures:** All air and moisture sensitive reactions were carried out under argon atmosphere. Organic solutions were concentrated by rotary evaporation at 25-60 °C at 15-30 torr. Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed using plates cut from glass sheets (silica gel 60F-254 from Merck). Visualization was achieved by 254 or 365 nm UV light and by immersion in an ethanolic solution of cerium sulfate, and subsequent treatment with a heat gun.

**Materials:** All reagents were obtained from commercial sources and used without further purifications. All dry solvents were obtained from Aldrich or Alfa Aesar.

**Instrumentation:** UV-Vis spectra and kinetics were recorded on a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer. Fluorescence kinetics were recorded on a multilabel plate reader (Victor X2, PerkinElmer). Microwave-assisted experiments were carried out in sealed reaction vessels in a Biotage Initiator (Biotage, Sweden). Reaction times listed refer to "hold time" at the specified temperature. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded at 23 °C on a Bruker 400 or 500 spectrometers. Recorded shifts are reported in parts per million ( $\delta$ ) and calibrated using residual undeuterated solvent signals. Data are represented as follows: Chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, m = multiplet, br = broad), coupling constant ( $J$ , Hz) and integration. High resolution mass spectra (HRMS) were obtained using a Agilent Q-TOF (time of flight) 6520 and low resolution mass spectra using a Agilent MSD 1200 SL (ESI/APCI) with a Agilent HPLC1200 SL. The centrifugation steps were conducted on a centrifuge Br4i Jouan in S40 mobile rotor.

**Analytical HPLC method:** HPLC experiments were performed on a Shimadzu system (Pump: model LC 20-AD, UV-detector: SPD 20-A, Autosampler: SIL 20-A) with a Sunfire C18 column (150 mm  $\times$  4.5 mm i.d., 5  $\mu$ m, Waters). Flow: 1 mL/min. Injection volume



= 10-100  $\mu$ L. Eluant A/B water/ACN, with 0.05% TFA. Gradient: 5% B to 95% B in 10 minutes and 5 minutes of re-equilibration. Detection: 254 nm.

**Preparative HPLC method:** The semi-preparative HPLC system consisted of a Waters 600 pump, a 2487 detector (Waters) and a 5 mL sample loop with a Sunfire C18 column (150 mm  $\times$  19 mm i.d., 5  $\mu$ m, Waters). Flow: 17 mL/min. Injection volume = 1-2 mL. Eluant A/B water/ACN, with 0.05% TFA. Gradient: 5% B to 95% B in 40 minutes and 10 minutes of re-equilibration. Detection: 254 nm.

**Flash Chromatography :** The purifications by flash chromatography were conducted on a Armen Spot 2 apparatus, using pre-packed silica gel column Chromabond Flash RS from Macherey-Nagel. The first system of solvent used was Cyclohexane/EtOAc, with a gradient going from 100 % Cyclohexane to 100 % EtOAc in 15 to 30 min. The second system used was DCM/MeOH, from 100% of DCM to DCM/MeOH 90:10 in 15 to 30 min. The collection was done *via* a UV-detector at 254 nm.

## General Procedures

### General procedure A for peptidic coupling

To a solution of the acid (1 eq.) in DMF (45 mM) was added the amine (1 eq.), the coupling reagent (1.2 eq.) and DIPEA (2.5 eq.). The reaction was stirred overnight at rt and purified by preparative HPLC to give the desired product.

### General procedure B for CuAAC

The alkyne (1 eq.) and the azide (2 eq.) derivatives were dissolved in DMSO (5 mM).  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (5 eq.) and sodium ascorbate (10 eq.) were dissolved in water (0.1 M) and added to the mixture. The reaction was stirred at rt overnight and purified by preparative HPLC to give the desired product.

### General procedure C for Boc deprotection

The protected amine (1 eq.) was dissolved in DCM/TFA 1:1 (0.1 M) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at rt for 2 h. The reaction mixture was concentrated under reduce pressure and used without further purification.

### General procedure D for etoposide arylation

To a solution of 4'-demethylepipodophyllotoxin (1 eq.) in dry DCM (0.1 M), NaI (3 eq.) was added and stirred for 5 min. Methanesulfonic acid (3 eq.) was then added dropwise with syringe at 0 °C and the stirring was continued for 5 h at rt. Nitrogen was bubbled through the solution to evaporate the excess of hydrogen iodide before removal of the

solvents *in vacuo*. To the crude product was added anhydrous BaCO<sub>3</sub> (2 eq.) and the amine (1.2 eq.) in dry THF (0.1 M) under nitrogen. The reaction mixture was stirred for 8 h at rt, then filtered and purified by preparative HPLC to give the desired product.

#### **General procedure E for hydrogenation**

To a degassed solution of protected amine (1 eq.) in MeOH (30 mM) is added Pd (10 %w/w) and the reaction was stirred at rt overnight under hydrogen. The reaction mixture is then filtered on celite, evaporated and purified either by preparative HPLC or flash chromatography (DCM/MeOH gradient, 15 min) to give the desired product.

#### **General procedure F for azoic coupling**

To a suspension of NaHCO<sub>3</sub> (2.4 eq.) and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2.8 eq.) in toluene (0.2 M) at 0 °C was added the diazonium salt (1 eq.) and the 1,3-indanedione derivative (1 eq.). A yellowish-greenish coloration appeared. The solution was stirred at 0 °C for 4 h, then at rt for 18 h. The mixture was diluted with DCM, and washed with water and brine. The organic layer was then dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduce pressure. The residue was purified by preparative HPLC to give the desired compound.

#### **General procedure G for azoic coupling**

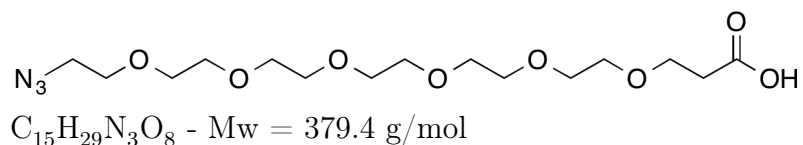
To a solution of the aniline derivative (1 eq.) in acetone (0.2 M) was added HBF<sub>4</sub> in water (2 eq.) and the reaction mixture was cooled to 0 °C. NaNO<sub>2</sub> (2 eq.) in water (1 M) was added slowly to the mixture and the reaction was stirred at 0 °C for 30 min, then at rt for 1 h.

The 1,3-indanedione derivative (1.05 eq.) was dissolved in acetone (0.2 M). NaOH (4 eq.) and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4 eq.) were dissolved in water (2 M) and added slowly to the mixture.

The first preparation was added to the second one and the mixture was stirred at rt overnight. The reaction mixture was diluted with water, the basic media was quenched with concentrated HCl and the aqueous layer was extracted with DCM. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduce pressure. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH gradient, 15 min) to give the desired compound.

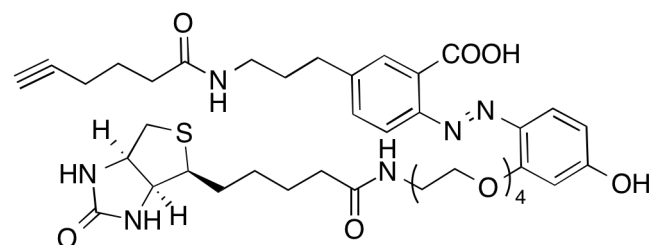
## Synthèse de sondes d'affinité pour l'étude en protéomique chimique de topoisomérase II

### 9 : 1-Azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oic acid



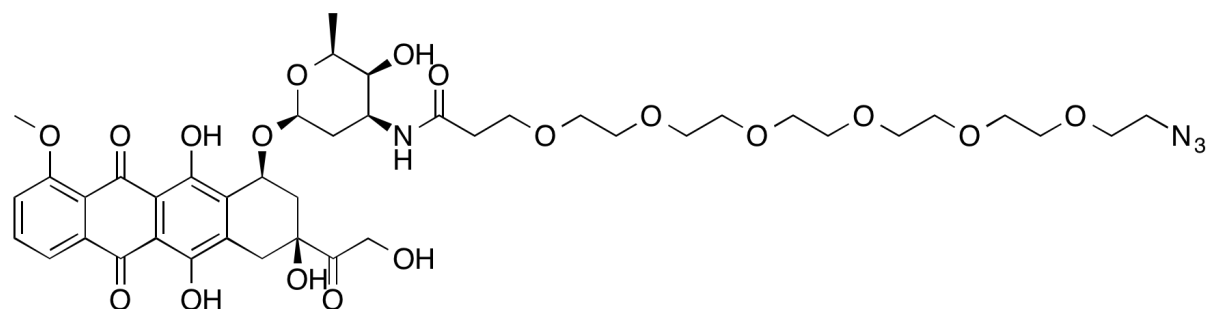
The compound **9** was synthesized according to literature procedure.<sup>1</sup>

### 10 : (*E*)-5-(3-(Hex-5-ynamido)propyl)-2-((4-hydroxy-2-((13-oxo-17-(2-oxo hexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecyl)oxy)phenyl)diazenyl)benzoic acid



The compound **10** was synthesized according to literature procedure.<sup>2</sup>

### 11 : 1-Azido-*N*-((2*S*,3*S*,4*S*,6*S*)-3-hydroxy-2-methyl-6-(((1*S*,3*S*)-3,5,12-tri-hydroxy-3-(2-hydroxyacetyl)-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotracen-1-yl)oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-4-yl)-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-amide



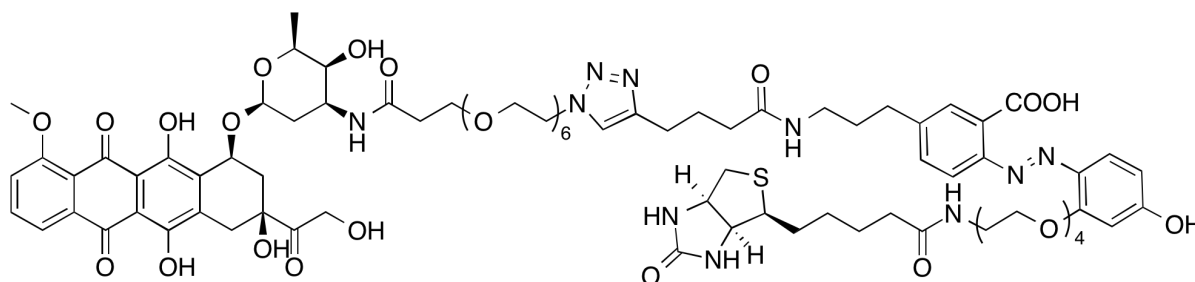
The compound **11** was synthesized following the general procedure **A** starting from the acid **9** (8.4 mg, 0.0221 mmol) and the amine doxorubicin hydrochloride (13.2 mg, 0.0221

mmol) using HATU as the coupling agent. The desired product was obtained as a red oil (10 mg, 0.0111 mmol, 50 %).

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400MHz):**  $\delta$  (ppm) 13.94 (s, 1H), 13.17 (s, 1H), 7.67 - 7.98 (m, 2H), 7.45 - 7.61 (m, 2H), 5.36 (s, 1H), 5.15 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 4.85 (br. s., 1H), 4.78 (t,  $J = 5.9$  Hz, 1H), 4.67 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 4.51 (d,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 4.05 - 4.16 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.29 - 3.55 (m, 28H), 2.78 - 2.98 (m, 2H), 1.97 - 2.31 (m, 4H), 1.69 - 1.82 (m, 1H), 1.36 (dd,  $J = 12.2, 3.9$  Hz, 1H), 1.06 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H) **<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 101 MHz):**  $\delta$  (ppm) 213.7, 186.5, 186.4, 169.3, 160.8, 156.1, 154.5, 136.2, 135.5, 134.6, 134.0, 120.0, 119.7, 118.9, 110.7, 110.6, 100.4, 75.0, 70.0, 69.9, 69.8, 69.7, 69.6, 69.5, 69.4, 69.2, 68.0, 66.8, 66.7, 63.7, 56.5, 50.0, 44.9, 36.6, 36.0, 32.1, 29.7, 17.0

**MS (ESI, m/z):**  $[M+Na]^+ = 927$

**12** : 2-((*E*)-(4-Hydroxy-2-((13-oxo-17-(2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecyl)oxy)phenyl)diazenyl)-5-(3-(4-(1-(21-(((2*S*,3*S*,4*S*,6*S*)-3-hydroxy-2-methyl-6-(((1*S*,3*S*)-3,5,12-trihydroxy-3-(2-hydroxyacetyl)-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracen-1-yl)oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-4-yl)amino)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)butanamido)propyl)benzoic acid

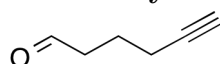


$C_{82}H_{110}N_{10}O_{28}S$  - Mw = 1715.9 g/mol

The compound **12** was synthesized following the general procedure **B** starting from the HAZA-alkyne (4 mg, 0.00493 mmol) and the azide **11** (8.93 mg, 0.00986 mmol). The product was obtained as an orange oil (2.03 mg, 0.00118 mmol, 12 %).

**HRMS (ESI, m/z)** : calc for  $C_{82}H_{113}N_{10}O_{28}S$   $[M+2H]^{2+}$  858.3679; found 858.3664

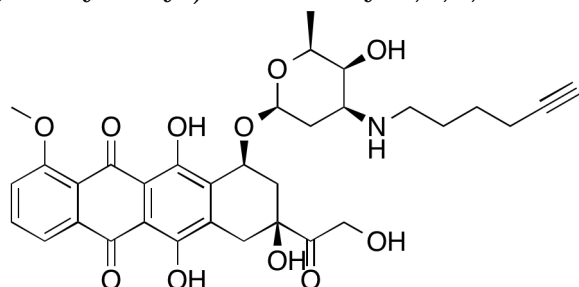
**14** : Hex-5-ynal



$C_6H_8O$  - Mw = 96.1 g/mol

The compound **14** was synthesized according to literature procedure.<sup>3</sup>

**15** : (8*S*,10*S*)-10-(((2*S*,4*S*,5*S*,6*S*)-4-(Hex-5-yn-1-ylamino)-5-hydroxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-6,8,11-trihydroxy-8-(2-hydroxyacetyl)-1-methoxy-7,8,9,10-tetrahydrotetracene-5,12-dione



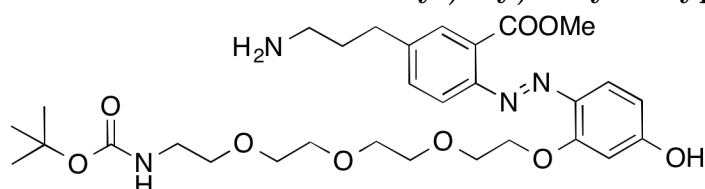
$C_{33}H_{37}NO_{11}$  - Mw = 623.7 g/mol

To a stirred solution of doxorubicin hydrochloride (1 eq., 25 mg, 0.0431 mmol), **14** (2.6 eq., 10.8 mg, 0.112 mmol) and glacial AcOH (5 eq., 0.0123 mL, 0.216 mmol) in  $CH_3CN/H_2O$  (2:1, 1.25 mL) was added sodium cyanoborohydride (0.3 eq., 1 M in THF, 0.0129 mL, 0.0129 mmol). The mixture was stirred in the dark at rt overnight. The reaction mixture was purified by preparative HPLC to give the desired product as a red oil (5 mg, 0.00802 mmol, 19 %).

$^1H$  NMR (MeOH- $d_4$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 7.67 - 7.82 (m, 2H), 7.42 - 7.57 (m, 1H), 5.44 (br.s, 1H), 4.95 (br.s, 1H), 4.63 - 4.77 (m, 2H), 4.19 - 4.30 (m, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.82 (br.s., 1H), 3.49 - 3.60 (m, 1H), 3.35 (s, 1H), 2.67 - 3.08 (m, 4H), 1.97 - 2.36 (m, 7H), 1.70 - 1.85 (m, 2H), 1.47 - 1.60 (m, 2H), 1.31 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H)

MS (ESI, m/z):  $[M+H]^+ = 624$

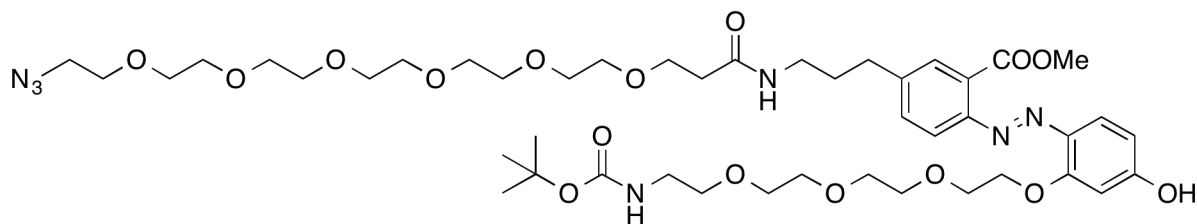
**16a** : Methyl (*E*)-5-(3-aminopropyl)-2-((2-((2,2-dimethyl-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-azahexadecan-16-yl)oxy)-4-hydroxyphenyl)diazenyl)benzoate



$C_{30}H_{44}N_4O_9$  - Mw = 604.7 g/mol

The compound **16a** was synthesized according to literature procedure.<sup>2</sup>

**17** : Methyl (*E*)-5-(1-azido-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-22-azapentacosan-25-yl)-2-((2-((2,2-dimethyl-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-aza-hexadecan-16-yl)oxy)-4-hydroxyphenyl)diazenyl)benzoate



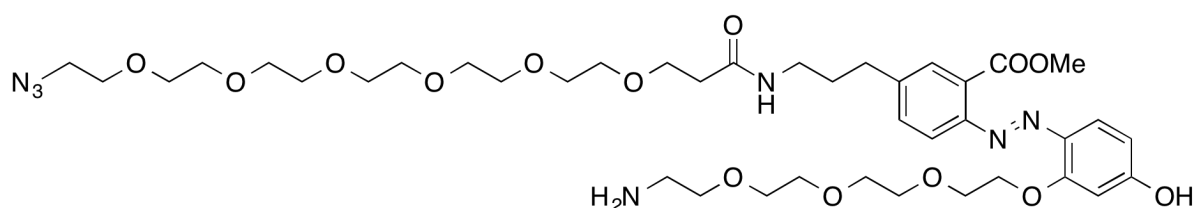
$C_{45}H_{71}N_7O_{16}$  - Mw = 966.1 g/mol

The compound **17** was synthesized following the general procedure **A** starting from the acid **9** (75 mg, 0.198 mmol) and the amine **16a** (97.6 mg, 0.161 mmol), using PyBOP as the coupling agent. The desired product was obtained as an orange oil (40.5 mg, 0.042 mmol, 26 %).

$^1H$  NMR (Chloroform-*d*, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 7.86 (br.s., 1H), 7.79 (br.s., 1H), 7.40 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 6.73 (br.s., 1H), 6.35 (d,  $J$  = 9.5 Hz, 1H), 6.00 (br.s., 1H), 4.35 (br.s., 2H), 4.09 (br.s., 2H), 3.92 (s, 3H), 3.49 - 3.79 (m, 33H), 3.46 (t,  $J$  = 4.9 Hz, 3H), 3.36 (t,  $J$  = 4.8 Hz, 2H), 3.27 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 4H), 2.64 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 2.46 (t,  $J$  = 5.3 Hz, 2H), 1.82 (quint,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 1.41 (s, 9H)

MS (ESI, *m/z*):  $[M+H]^+$  = 966

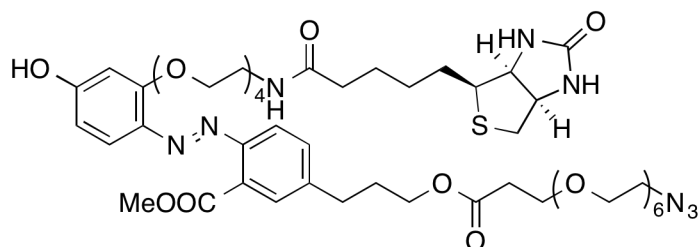
**17a** : Methyl (*E*)-2-((2-(2-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)-4-hydroxyphenyl)diazenyl)-5-(1-azido-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-22-azapentacosan-25-yl)benzoate



$C_{40}H_{63}N_7O_{14}$  - Mw = 866.0 g/mol

The compound **17a** was synthesized following the general procedure **C** starting from the protected amine **17** (40 mg, 0.0414 mmol, qtt).

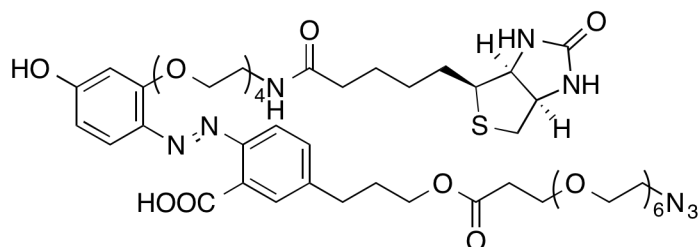
**18** : Methyl (*E*)-5-(1-azido-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-22-azapentacosan-25-yl)-2-((4-hydroxy-2-((13-oxo-17-(2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecyl)oxy)phenyl)diazenyl)benzoate



$C_{50}H_{77}N_9O_{16}S$  - Mw = 1092.3 g/mol

The compound **18** was synthesized following the general procedure **A** starting from the biotine (18 mg, 0.0738 mmol) and **17a** (41.2 mg, 0.0476 mmol) with HBTU as the coupling agent. The desired product was obtained as an orange oil (39.5 mg, 0.0362 mmol, 76 %).  $^1H$  NMR (Chloroform-*d*, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 7.93 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.45 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.34 (d,  $J = 9.5$  Hz, 1H), 7.01 (t,  $J = 4.8$  Hz, 2H), 6.85 (br.s, 2H), 6.50 (s, 1H), 6.38 (br.s, 1H), 4.52 - 4.59 (m, 1H), 4.48 (t,  $J = 4.3$  Hz, 2H), 4.33 - 4.40 (m, 1H), 4.10 (t,  $J = 4.5$  Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.74 (t,  $J = 5.5$  Hz, 3H), 3.60 - 3.70 (m, 26H), 3.46 - 3.59 (m, 7H), 3.35 - 3.42 (m, 4H), 3.29 (q,  $J = 6.3$  Hz, 1H), 3.11 - 3.20 (m, 1H), 2.91 (dd,  $J = 13.1, 4.8$  Hz, 1H), 2.75 (d,  $J = 13.1$  Hz, 1H), 2.68 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 2.51 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 2.22 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 1.85 (quint,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.56 - 1.75 (m, 4H), 1.42 (quint,  $J = 7.3$  Hz, 2H)

**19** : (*E*)-5-(1-Azido-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-22-azapentacosan-25-yl)-2-((4-hydroxy-2-((13-oxo-17-(2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecyl)oxy)phenyl)diazenyl)benzoic acid

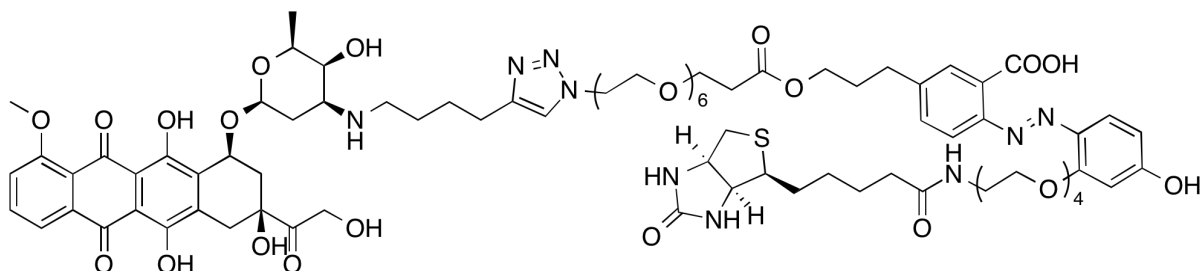


$C_{49}H_{75}N_9O_{16}S$  - Mw = 1078.2 g/mol

To a solution of **18** (1 eq., 61.8 mg, 0.0749 mmol) in MeOH/H<sub>2</sub>O (8:2, 12 mL) was added LiOH (30 eq., 53.8 mg, 2.25 mmol) in one portion. The reaction mixture was stirred at 40°C overnight. The solvent were evaporated and the residue was purified by preparative HPLC to give the desired product as an orange oil (37.1 mg, 0.0457 mmol, 61 %).

$^1\text{H}$  NMR (MeOH- $d_4$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 7.99 (s, 1H), 7.92 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.58 (t,  $J = 10.0$  Hz, 2H), 6.53 (dd,  $J = 9.3, 1.8$  Hz, 1H), 6.45 (s, 1H), 4.45 - 4.51 (m, 1H), 4.43 (br.s., 2H), 4.26 - 4.32 (m, 1H), 4.06 (br.s., 2H), 3.71 - 3.79 (m, 5H), 3.55 - 3.70 (m, 29H), 3.43 - 3.52 (m, 4H), 3.37 (t,  $J = 5.3$  Hz, 2H), 3.23 - 3.30 (m, 3H), 3.13 - 3.21 (m, 1H), 2.91 (dd,  $J = 12.7, 4.9$  Hz, 1H), 2.76 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 2.70 (d,  $J = 12.8$  Hz, 1H), 2.48 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H), 2.18 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 1.89 (quint,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 1.51 - 1.78 (m, 4H), 1.41 (quint,  $J = 7.5$  Hz, 2H)  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOH- $d_4$ , 101 MHz):  $\delta$  (ppm) 176.3, 143.3, 135.5, 132.5, 117.5, 104.1, 96.7, 71.8, 71.7, 71.6, 71.5, 71.3, 71.3, 70.7, 69.9, 68.5, 63.5, 61.8, 57.1, 51.9, 41.2, 40.5, 40.0, 38.0, 36.9, 33.7, 32.1, 29.9, 29.6, 27.0  
MS (ESI,  $m/z$ ):  $[M+2\text{Na}]^{2+} = 562$

**20** : 2-((*E*)-(4-Hydroxy-2-((13-oxo-17-(2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecyl)oxy)phenyl)diazenyl)-5-(1-(4-(4-(((2*S*,3*S*,4*S*,6*S*)-3-hydroxy-2-methyl-6-(((1*S*,3*S*)-3,5,12-trihydroxy-3-(2-hydroxyacetyl)-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracen-1-yl)oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-4-yl)amino)butyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-22-azapentacosan-25-yl)benzoic acid



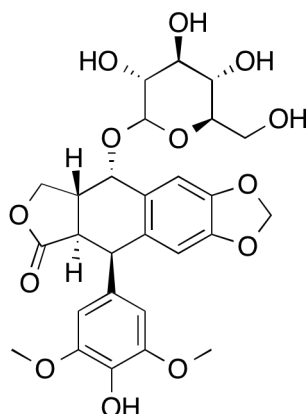
$\text{C}_{82}\text{H}_{112}\text{N}_{10}\text{O}_{27}\text{S}$  - Mw = 1701.9 g/mol

The compound **20** was synthesized following the general procedure **B** starting from the alkyne **15** (3.4 mg, 0.00552 mmol) and HAZA-azide (11.9 mg, 0.011 mmol). The product was obtained as an orange oil (0.87 mg, 0.000511 mmol, 9 %).

MS (ESI,  $m/z$ ):  $[M+H]^+ = 1703$



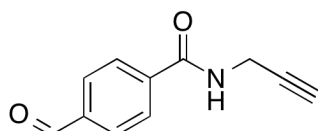
**21** : (5*R*,5*aR*,8*aR*,9*S*)-5-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-9-(((3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-5,8,8*a*,9-tetrahydrofuro[3',4':6,7]naphtho[2,3-*d*][1,3]dioxol-6(5*aH*)-one



$C_{27}H_{30}O_{13}$  - Mw = 562.5 g/mol

The compound **21** was synthesized according to literature procedure.<sup>4</sup>

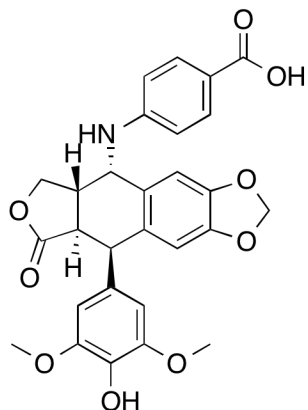
**23** : 4-Formyl-*N*-(prop-2-yn-1-yl)benzamide



$C_{11}H_9NO_2$  - Mw = 187.2 g/mol

The compound **23** was synthesized according to literature procedure.<sup>5</sup>

**27** : 4-(((5*S*,5*aS*,8*aR*,9*R*)-9-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-8-oxo-5,5*a*,6,8,8*a*,9-hexahydrofuro[3',4':6,7]naphtho[2,3-*d*][1,3]dioxol-5-yl)amino)benzoic acid



$C_{28}H_{25}NO_9$  - Mw = 519.5 g/mol

The compound **27** was synthesized following the general procedure **D** starting from 4-aminobenzoic acid (42.3 mg, 0.309 mmol). The product was obtained as a colorless oil (49.4 mg, 0.0952 mmol, 37 %).

<sup>1</sup>H NMR (Chloroform-*d*, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 7.99 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 6.78 (s, 1H), 6.54 - 6.62 (m, 3H), 6.34 (s, 2H), 5.99 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 4.82 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 1H), 4.63 (d,  $J$  = 4.3 Hz, 1H), 4.41 (dd,  $J$  = 8.3, 6.8 Hz, 1H), 3.94 (t,  $J$  = 9.4 Hz, 1H), 3.80 (s, 6H), 2.98 - 3.17 (m, 2H) <sup>13</sup>C NMR (Chloroform-*d*, 101 MHz):  $\delta$  (ppm) 174.3, 170.8,

151.5, 148.6, 147.7, 146.5, 134.3, 132.7, 132.2, 130.3, 129.5, 118.5, 111.4, 110.0, 109.1, 107.9, 101.6, 68.5, 56.5, 52.0, 43.4, 41.9, 38.4

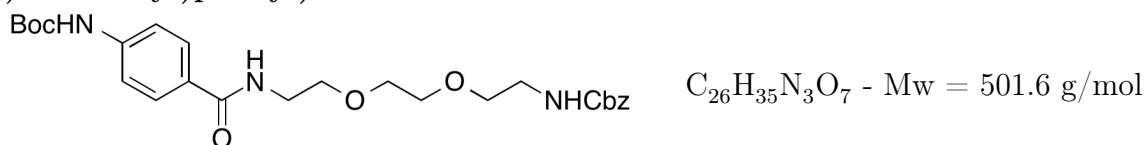
MS (ESI, m/z): [M-H]<sup>-</sup> = 518

**28a** : Benzyl (2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate



The compound **28a** was synthesized according to literature procedure.<sup>6</sup>

**28b** : *tert*-Butyl(4-((3-oxo-1-phenyl-2,7,10-trioxa-4-azadodecan-12-yl)carbamoyl)phenyl)carbamate

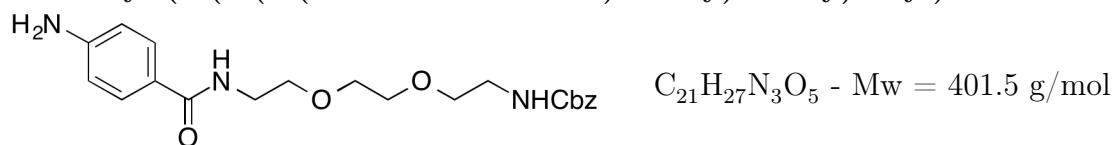


**28a** (1 eq., 220 mg, 0.78 mmol) was dissolved in DCM (9 mL). 4-(Boc-amino)benzoic acid (1.1 eq., 203 mg, 0.86 mmol), EDC (1.1 eq., 164 mg, 0.86 mmol) and DIPEA (3 eq., 0.386 mL, 2.34 mmol) were added. The reaction was stirred at rt overnight and concentrated under reduce pressure. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH gradient, 15 min) to give the desired product as an oil (215 mg, 0.43 mmol, 55 %).

<sup>1</sup>H NMR (Chloroform-d, 400MHz): δ (ppm) 7.71 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.27 - 7.39 (m, 5H), 7.19 - 7.25 (m, 1H), 6.71 - 6.80 (m, 1H), 5.37 - 5.51 (m, 1H), 5.08 (s, 2H), 3.61 (br.s., 8H), 3.54 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 3.36 (q, *J* = 5.0 Hz, 2H), 1.51 (s, 9H) <sup>13</sup>C NMR (Chloroform-d, 101MHz): δ (ppm) 166.9, 156.4, 152.4, 141.6, 136.4, 128.4, 128.0, 127.9, 117.6, 80.7, 70.1, 69.9, 69.7, 66.6, 40.7, 39.6, 28.2

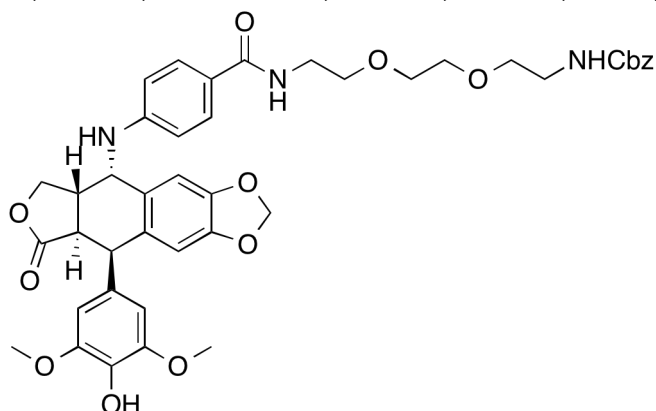
MS (ESI, m/z): [M+Na]<sup>+</sup> = 524

**29** : Benzyl (2-(2-(2-(4-aminobenzamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate



The compound **29** was synthesized following the general procedure **C** starting from the protected amine **28b** (215 mg, 0.43 mmol, qtt).

**30** : Benzyl(2-(2-(2-(4-(((5*S*,5*aS*,8*aR*,9*R*)-9-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-8-oxo-5,5*a*,6,8,8*a*,9-hexahydrofuro[3',4',6,7]naphtho[2,3-*d*][1,3]dioxol-5-yl)amino)benzamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate



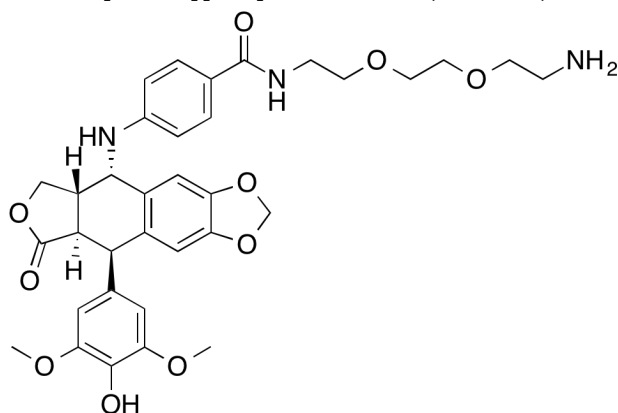
$C_{42}H_{45}N_3O_{12}$  - Mw = 783.8 g/mol

The compound **30** was synthesized following the general procedure **D** starting from the amine **29** (595 mg, 1.48 mmol). The product was obtained as a colorless oil (305 mg, 0.39 mmol, 31 %).

**<sup>1</sup>H NMR (Chloroform-*d*, 400 MHz):**  $\delta$  (ppm) 7.67 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.29 - 7.39 (m, 5H), 6.76 (s, 1H), 6.64 (br.s, 1H), 6.52 - 6.56 (m, 3H), 6.33 (s, 2H), 5.97 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 5.33 (br.s, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.75 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1H), 4.60 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 4.36 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 3.90 (t,  $J = 9.5$  Hz, 1H), 3.79 (s, 6H), 3.63 (br.s., 8H), 3.59 (t,  $J = 5.3$  Hz, 2H), 3.33 - 3.44 (m, 2H), 2.94 - 3.14 (m, 2H) **<sup>13</sup>C NMR (Chloroform-*d*, 101 MHz):**  $\delta$  (ppm) 174.5, 170.4, 156.5, 149.9, 148.4, 147.6, 146.5, 136.4, 134.2, 132.1, 130.4, 129.8, 129.1, 128.5, 128.1, 128.1, 123.7, 111.5, 110.0, 109.2, 107.9, 101.5, 70.2, 70.0, 68.6, 66.7, 56.5, 52.0, 43.4, 41.9, 40.8, 38.4

**MS (ESI, *m/z*):**  $[M+H]^+ = 784$

**30a** : *N*-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethyl)-4-(((5*S*,5*aS*,8*aR*,9*R*)-9-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-8-oxo-5,5*a*,6,8,8*a*,9-hexahydrofuro[3',4',6,7]naphtho[2,3-*d*][1,3]dioxol-5-yl)amino)benzamide



$C_{34}H_{39}N_3O_{10}$  - Mw = 649.7 g/mol

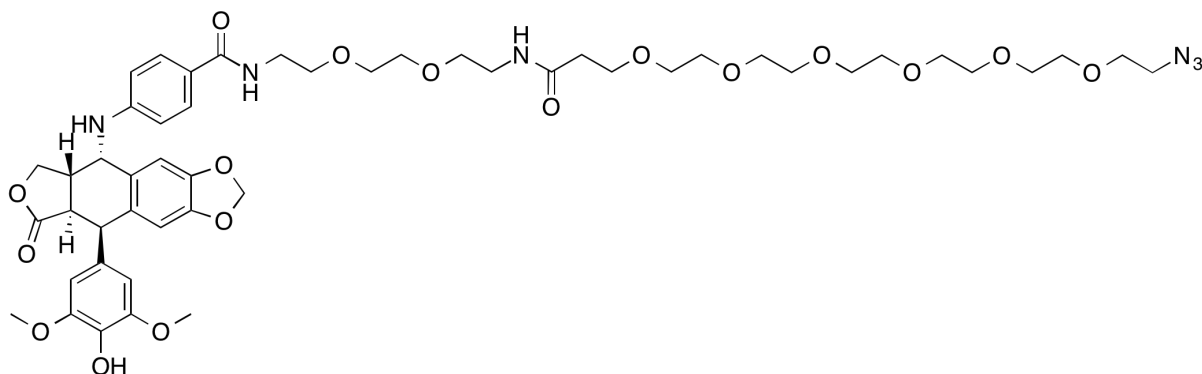
The compound **30a** was synthesized following the general procedure **E** starting from the

protected amine **30** (111 mg, 0.142 mmol). The product was obtained as a colorless oil (67.2 mg, 0.103 mmol, 73 %).

**<sup>1</sup>H NMR (Chloroform-d, 400 MHz):**  $\delta$  (ppm) 7.71 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 6.76 (s, 1H), 6.72 (br.s., 1H), 6.50 - 6.60 (m, 3H), 6.33 (s, 2H), 5.97 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 4.76 (t,  $J = 5.3$  Hz, 1H), 4.62 (br.s., 1H), 4.37 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 4.26 (br.s., 1H), 3.87 - 4.03 (m, 2H), 3.78 (s, 6H), 3.52 (q,  $J = 4.8$  Hz, 6H), 2.94 - 3.14 (m, 2H), 2.86 (q,  $J = 4.8$  Hz, 6H) **<sup>13</sup>C NMR (Chloroform-d, 101 MHz):**  $\delta$  (ppm) 174.4, 167.3, 149.4, 148.4, 147.5, 146.6, 134.3, 132.1, 130.3, 129.9, 129.1, 124.1, 111.4, 109.9, 109.1, 108.0, 101.6, 73.1, 70.2, 70.1, 70.0, 56.4, 52.1, 43.4, 41.9, 41.6, 39.5

**MS (ESI, m/z):**  $[M+H]^+ = 650$

**31 : 1-Azido-N-(2-(2-(2-(4-(((5*S*,5*aS*,8*aR*,9*R*)-9-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-8-oxo-5,5*a*,6,8,8*a*,9-hexahydrofuro[3',4',6,7]naphtho[2,3-*d*][1,3]dioxol-5-yl)amino)benzamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-amide**

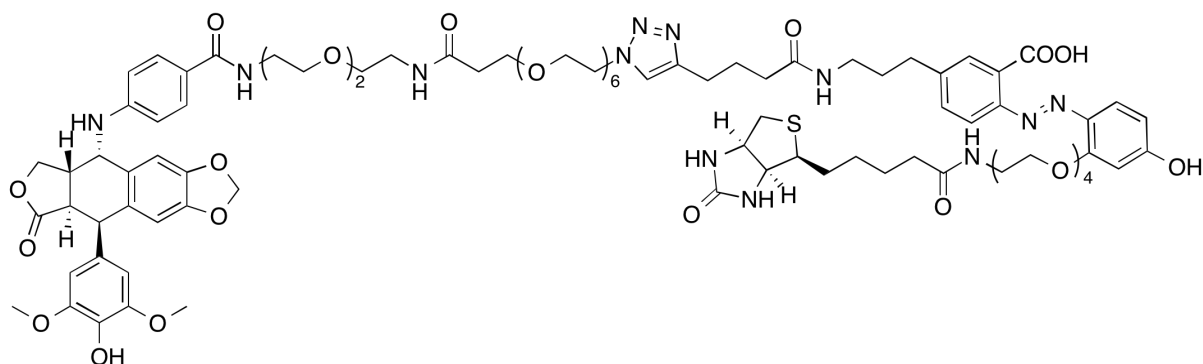


$C_{49}H_{66}N_6O_{17}$  - Mw = 1011.1 g/mol

**30a** (1 eq., 67.2 mg, 0.103 mmol) was dissolved in DCM (1 mL) and **9** (1.5 eq., 58.8 mg, 0.155 mmol), EDC (1.5 eq., 29.7 mg, 0.155 mmol) and DIPEA (1.5 eq., 0.0256 mL, 0.155 mmol) were added. The reaction was stirred at rt overnight and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by preparative HPLC to give the desired product as a colorless oil (12.5 mg, 0.0124 mmol, 12 %).

**<sup>1</sup>H NMR (Chloroform-d, 400 MHz):**  $\delta$  (ppm) 7.72 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.03 (br.s., 1H), 6.90 (br.s., 1H), 6.77 (s, 1H), 6.59 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 6.54 (s, 1H), 6.33 (s, 2H), 5.97 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 4.78 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1H), 4.61 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 4.38 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 3.92 (t,  $J = 9.5$  Hz, 1H), 3.80 (s, 6H), 3.71 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 3.61 - 3.68 (m, 30H), 3.57 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2H), 3.45 (t,  $J = 5.3$  Hz, 2H), 3.38 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H), 2.93 - 3.18 (m, 2H), 2.48 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H)

**32** : 2-((*E*)-4-Hydroxy-2-((13-oxo-17-(2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecyl)oxy)phenyl)diazenyl)-5-(3-(4-(1-(1-(4-(((5*S*,5*aS*,8*aR*,9*R*)-9-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-8-oxo-5,5*a*,6,8,8*a*,9-hexahydrofuro[3',4',6,7]naphtho[2,3-*d*][1,3]dioxol-5-yl)amino)phenyl)-1,12-dioxo-5,8,15,18,21,24,27,30-octaoxa-2,11-diazadotriacontan-32-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)butanamido)propyl)benzoic acid

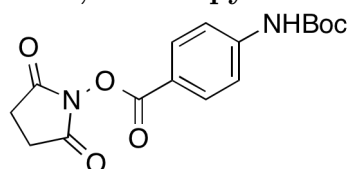


$C_{89}H_{120}N_{12}O_{27}S$  - Mw = 1822,06 g/mol

The compound **32** was synthesized following the general procedure **B** starting from the HAZA-alkyne (10.1 mg, 0.0124 mmol) and the azide **31** (12.5 mg, 0.0124 mmol). The product was obtained as an orange oil (2.2 mg, 0.00121 mmol, 10 %).

**HRMS (ESI, m/z)** : calc for  $C_{89}H_{122}N_{12}O_{27}S$   $[M+2H]^{2+}$  911.4126; found 911.4124

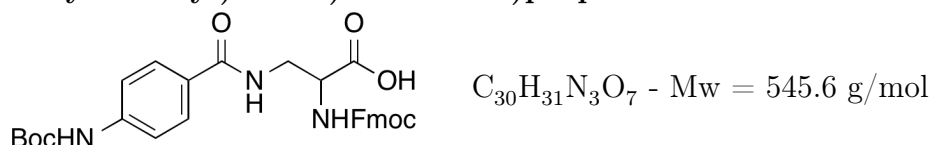
**42a** : 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)benzoate



$C_{16}H_{18}N_2O_6$  - Mw = 334.3 g/mol

To a solution of 4-(Boc-amino)benzoic acid (1 eq., 1 g, 4.21 mmol) in DCM (10 mL) was added EDC (1.1 eq., 0.889 g, 4.64 mmol), NHS (1.2 eq., 0.582 g, 5.06 mmol) and DIPEA (2.2 eq., 1.53 mL, 9.27 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at rt. The organic layer was washed with saturated  $NaHCO_3$ , water and brine, was dried over  $MgSO_4$  and the solvent was evaporated. A white powder was obtained and the product was used without further purification (764 mg, 2.29 mmol, 54 %).

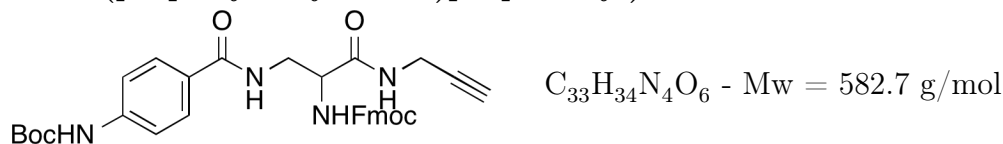
**43** : **2-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-(4-((tert-butoxycarbonyl)amino)benzamido)propanoic acid**



**42a** (1.08 eq., 740 mg, 2.21 mmol) was dissolved in DMF (11.6 mL), Fmoc-DAP-OH (1.01 eq., 701 mg, 2.09 mmol) and DIPEA (2.04 eq., 0.694 mL, 4.2 mmol) were added. The reaction was stirred at rt overnight. The reaction was diluted with 100 mL of water, and the aqueous layer was acidified with concentrated HCl to reach pH 3. The aqueous layer was extracted with DCM (3x100 mL). The organic layer was then washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The crude product was then purified by flash chromatography (DCM/MeOH gradient, 15 min). The product was obtained as a white powder (886 mg, 1.62 mmol, 73 %).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 9.63 (br.s, 1H), 8.40 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H), 7.90 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 7.61 - 7.77 (m, 5H), 7.52 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 7.38 - 7.45 (m, 2H), 7.25 - 7.35 (m, 2H), 4.17 - 4.34 (m, 4H), 3.60 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 2H), 1.49 (s, 9H) <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 101 MHz):  $\delta$  (ppm) 171.9, 166.2, 156.0, 152.6, 143.8, 143.7, 140.7, 128.0, 127.6, 127.0, 125.1, 120.0, 117.0, 79.5, 65.7, 53.9, 46.6, 41.4, 28.1

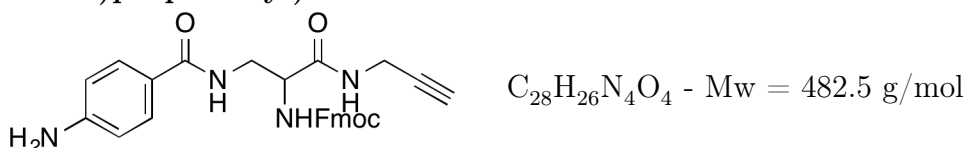
**39** : **(9H-Fluoren-9-yl)methyl(3-(4-((tert-butoxycarbonyl)amino)benzamido)-1-oxo-1-(prop-2-yn-1-ylamino)propan-2-yl)carbamate**



The compound **39** was synthesized following the general procedure **A** starting from the acid **43** (100 mg, 0.183 mmol) and propargylamine (20.1 mg, 0.22 mmol) using HBTU as the coupling agent. The desired product was obtained as a white powder (40 mg, 0.0687 mmol, 37 %).

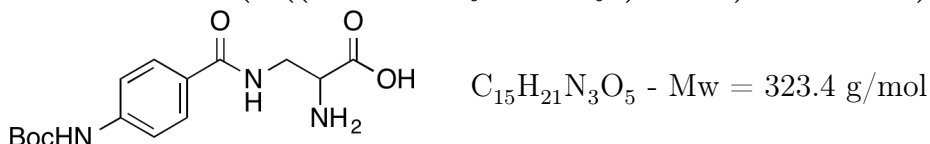
<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 9.63 (s, 1H), 8.45 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 8.33 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 7.89 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 7.71 (m, 4H), 7.48 - 7.54 (m, 2H), 7.38 - 7.45 (m,  $J$  = 3.0 Hz, 2H), 7.20 - 7.36 (m, 1H), 5.77 (s, 1H), 4.16 - 4.34 (m, 3H), 3.82 - 3.90 (m, 2H), 3.52 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 1H), 3.10 (t,  $J$  = 2.8 Hz, 1H), 1.49 (s, 9H) <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 101 MHz):  $\delta$  (ppm) 166.4, 152.5, 143.7, 140.6, 128.0, 127.6, 127.0, 125.2, 120.1, 117.1, 80.9, 79.4, 73.0, 65.4, 55.1, 46.8, 46.6, 28.0

**40 : (9H-Fluoren-9-yl)methyl(3-(4-aminobenzamido)-1-oxo-1-(prop-2-yn-1-ylamino)propan-2-yl)carbamate**



The compound **40** was synthesized following the general procedure **C** starting from the protected amine **39** (20 mg, 0.0414 mmol, 60 %).

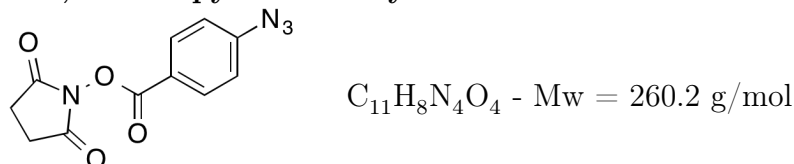
**43a : 2-Amino-3-(4-((tert-butoxycarbonyl)amino)benzamido)propanoic acid**



**43** (1 eq., 100 mg, 0.183 mmol) was dissolved in DCM (5 mL) and piperidine (11 eq., 0.2 mL, 2.03 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at rt overnight and injected in preparative HPLC. The desired product was obtained as a white powder (52.6 mg, 0.163 mmol, 89 %).  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 9.66 (br.s, 1H), 8.60 (t,  $J$  = 5.1 Hz, 1H), 7.77 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 7.53 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 3.53 - 3.74 (m, 3H), 1.51 (s, 9H)  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 101 MHz):  $\delta$  (ppm) 169.2, 166.9, 152.9, 142.9, 128.7, 127.6, 117.5, 80.1, 54.1, 54.0, 28.6

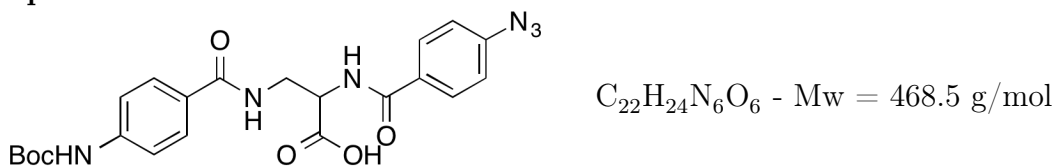
MS (ESI, m/z):  $[M+H]^+$  = 324

**45 : 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-4-azidobenzoate**



To a solution of 4-azidobenzoic acid (1 eq., 500 mg, 3.06 mmol) in DCM (7.27 mL) was added EDC (1.1 eq., 646 mg, 3.37 mmol), NHS (1.2 eq., 423 mg, 3.68 mmol) and DIPEA (2.2 eq., 1.11 mL, 6.74 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at rt. The organic layer was washed with saturated  $NaHCO_3$ , water and brine, was dried over  $MgSO_4$  and the solvent was evaporated. A white powder was obtained and the product was used without further purification (605 mg, 2.33 mmol, 76 %).

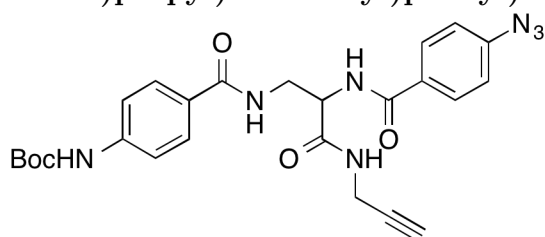
**46 : 2-(4-Azidobenzamido)-3-(4-((tert-butoxycarbonyl)amino)benzamido)propanoic acid**



To a solution of **43a** (1 eq., 52.6 mg, 0.163 mmol) in DMSO (4 mL) was added **45** (1.2 eq., 50.8 mg, 0.195 mmol) and DIPEA (7.43 eq., 0.2 mL, 1.21 mmol). The reaction mixture was stirred at rt overnight and then injected in preparative HPLC. The desired product was obtained as a white solid (54 mg, 0.115 mmol, 71 %).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 12.74 (br.s., 1H), 9.62 (s, 1H), 8.77 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.54 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.74 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.54 - 4.62 (m, 1H), 3.62 - 3.83 (m, 2H), 1.48 (s, 9H) <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 101 MHz): δ (ppm) 171.6, 166.6, 165.3, 152.6, 142.4, 136.0, 130.4, 129.2, 128.0, 127.4, 118.9, 117.1, 79.5, 63.2, 53.2, 28.0

**46a** : *tert*-Butyl(4-((2-(4-azidobenzamido)-3-oxo-3-(prop-2-yn-1-ylamino)propyl)carbamoyl)phenyl)carbamate

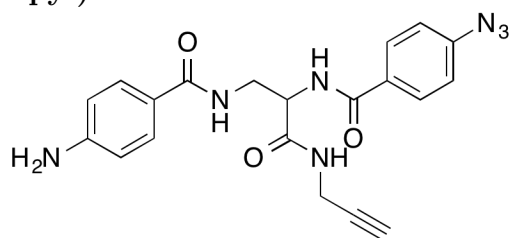


C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub> - Mw = 505.5 g/mol

The compound **46a** was synthesized following the general procedure **A** starting from the acid **46** (54 mg, 0.115 mmol) and propargylamine (7.62 mg, 0.138 mmol) using HBTU as the coupling agent. The desired product was obtained as a white solid (27.7 mg, 0.0548 mmol, 48 %).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 9.61 (s, 1H), 8.59 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.48 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 7.91 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.72 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.55 - 4.63 (m, 1H), 3.87 (br.s., 2H), 3.61 - 3.69 (m, 2H), 3.09 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 1.48 (s, 9H)

**47** : 4-Amino-*N*-(2-(4-azidobenzamido)-3-oxo-3-(prop-2-yn-1-ylamino)propyl)benzamide

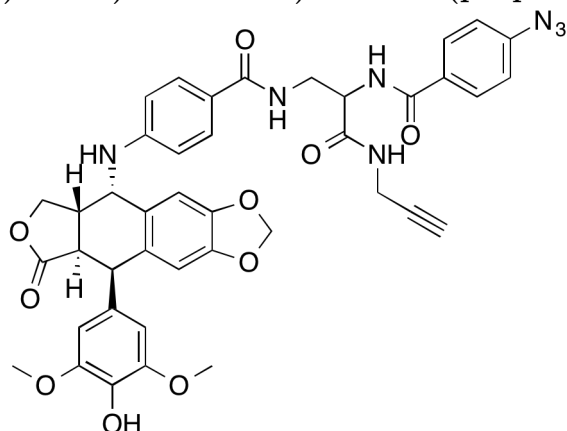


C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub> - Mw = 405.4 g/mol

The compound **47** was synthesized following the general procedure **C** starting from the protected amine **46a** (22.2 mg, 0.0548 mmol, qtt).



**33** : 4-azido-*N*-(3-(4-(((5*S*,5*aS*,8*aR*,9*R*)-9-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-8-oxo-5,5*a*,6,8,8*a*,9-hexahydrofuro[3',4':6,7]naphtho[2,3-*d*]dioxol-5-yl)amino)benzamido)-1-oxo-1-(prop-2-yn-1-ylamino)propan-2-yl)benzamide



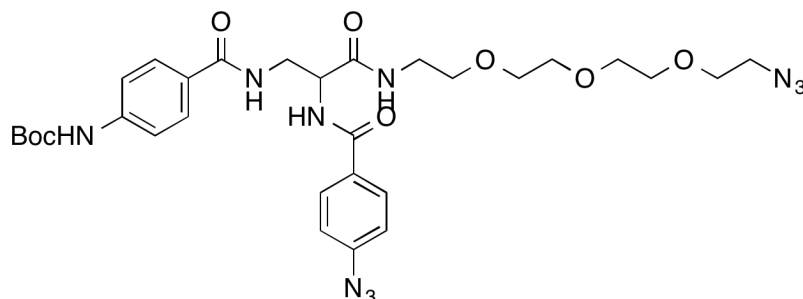
$C_{41}H_{37}N_7O_{10}$  - Mw = 787.8 g/mol

The compound **33** was synthesized following the general procedure **D** starting from the amine **47** (22 mg, 0.0543 mmol). The product was obtained as a white powder (16.6 mg, 0.0211 mmol, 39 %).

$^1H$  NMR (Chloroform-*d*, 500 MHz):  $\delta$  (ppm) 8.79 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 7.97 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.74 (d,  $J = 8.5$  Hz, 3H), 7.20 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 7.12 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 6.75 (s, 1H), 6.58 (dd,  $J = 8.5, 1.9$  Hz, 2H), 6.55 (s, 1H), 6.33 (s, 2H), 5.98 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 4.76 - 4.81 (m, 1H), 4.66 - 4.71 (m, 1H), 4.61 (d,  $J = 4.7$  Hz, 1H), 4.33 - 4.40 (m, 1H), 4.02 - 4.13 (m, 3H), 3.90 (t,  $J = 9.5$  Hz, 1H), 3.81 - 3.85 (m, 1H), 3.79 (s, 6H), 3.00 - 3.14 (m, 2H), 2.18 (t,  $J = 2.5$  Hz, 1H)  $^{13}C$  NMR (Chloroform-*d*, 126 MHz):  $\delta$  (ppm) 174.2, 170.3, 169.8, 167.7, 150.5, 148.5, 147.7, 146.5, 144.0, 134.3, 132.1, 130.3, 129.6, 129.5, 129.3, 129.2, 122.5, 122.5, 119.1, 111.6, 110.0, 109.1, 108.0, 101.6, 79.2, 71.5, 68.6, 56.7, 56.5, 52.1, 52.0, 43.4, 42.4, 41.9, 38.5, 29.2

MS (ESI, *m/z*):  $[M+H]^+ = 788$

**48a** : *tert*-Butyl(4-((1-azido-14-(4-azidobenzamido)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azapentadecan-15-yl)carbamoyl)phenyl)carbamate



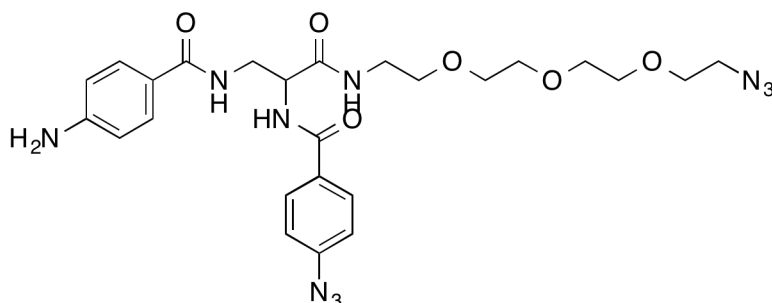
$C_{30}H_{40}N_{10}O_8$  - Mw = 668.7 g/mol

The compound **48a** was synthesized following the general procedure **A** starting

from the acid **46** (34.1 mg, 0.0728 mmol) and 1-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]-2-(2-azidoethoxy)ethane (21.2 mg, 0.0873 mmol) using HBTU as the coupling agent. The desired product was obtained as a colorless oil (32.8 mg, 0.0491 mmol, 67 %).

<sup>1</sup>H NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 7.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.78 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.16 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.75 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 3.86 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.53 - 3.64 (m, 12H), 3.40 - 3.45 (m, 2H), 3.34 - 3.37 (m, 2H), 1.53 (s, 9H) <sup>13</sup>C NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 101 MHz): δ (ppm) 172.3, 171.1, 169.1, 154.8, 145.3, 144.5, 131.8, 130.6, 129.6, 128.5, 120.2, 118.9, 81.4, 71.8, 71.7, 71.6, 71.3, 71.2, 70.6, 57.0, 51.9, 42.9, 40.6, 28.8

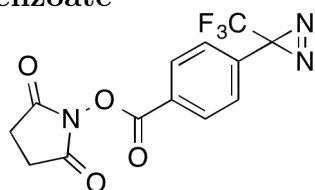
**48** : 4-Amino-*N*-(1-azido-14-(4-azidobenzamido)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azapentadecan-15-yl)benzamide



C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>N<sub>10</sub>O<sub>6</sub> - Mw = 568.6 g/mol

The compound **48** was synthesized following the general procedure **C** starting from the protected amine **48a** (27.9 mg, 0.0491 mmol, qtt).

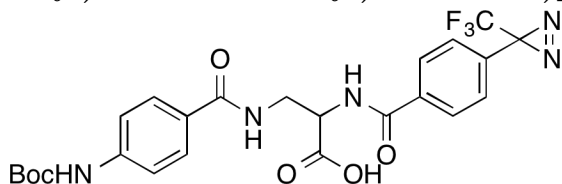
**49a** : 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzoate



C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> - Mw = 327.2 g/mol

To a solution of 4-[3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl]benzoic acid (1 eq., 100 mg, 0.435 mmol) in DCM (2 mL) was added EDC (1.08 eq., 90 mg, 0.469 mmol), NHS (1.2 eq., 60 mg, 0.521 mmol) and DIPEA (2.09 eq., 0.15 mL, 0.908 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at rt. The organic layer was washed with saturated NaHCO<sub>3</sub>, water and brine, was dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvent was evaporated. A white powder was obtained and the product was used without further purification (100 mg, 0.306 mmol, 70 %).

**49b** : 3-(4-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)benzamido)-2-(4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzamido)propanoic acid

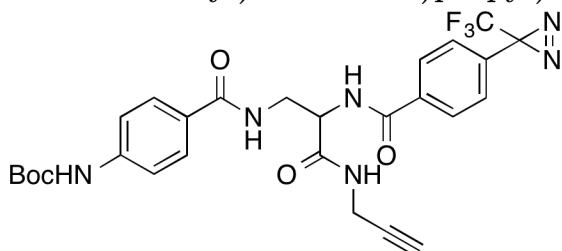


$C_{24}H_{24}F_3N_5O_6$  - Mw = 535.5 g/mol

**43a** (1 eq., 98.8 mg, 0.306 mmol) was dissolved in DMF (2 mL) and DIPEA (1.98 eq., 0.1 mL, 0.605 mmol) and **49a** (1 eq., 100 mg, 0.306 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at rt overnight and injected in preparative HPLC. The desired product was obtained as a white solide (20 mg, 0.0374 mmol, 12 %).

$^1H$  NMR (MeOH- $d_4$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 7.95 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.74 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 7.50 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.36 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 4.82 - 4.86 (m, 1H), 3.88 - 3.98 (m, 2H), 1.54 (s, 9H)  $^{13}C$  NMR (MeOH- $d_4$ , 101 MHz):  $\delta$  (ppm) 173.2, 171.1, 168.9, 154.9, 144.4, 136.7, 133.5, 129.5, 129.3, 128.8, 127.8, 118.9, 81.3, 55.5, 42.2, 28.8  
MS (ESI, m/z):  $[M+H]^+$  = 536

**49c** : *tert*-Butyl(4-((3-oxo-3-(prop-2-yn-1-ylamino)-2-(4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzamido)propyl)carbamoyl)phenyl)carbamate

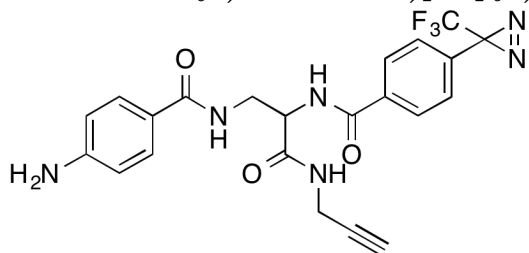


$C_{27}H_{27}F_3N_6O_5$  - Mw = 572.6 g/mol

The compound **49c** was synthesized following the general procedure **A** starting from the acid **49b** (20 mg, 0.0374 mmol) and propargylamine (2.47 mg, 0.0448 mmol) using HBTU as the coupling agent. The desired product was obtained as a white solid (13.1 mg, 0.0229 mmol, 61 %).

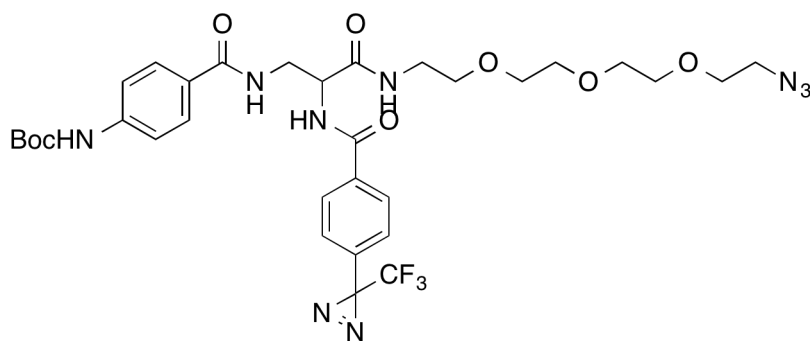
$^1H$  NMR (MeOH- $d_4$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 7.98 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.75 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.50 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.37 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 4.78 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 3.95 - 4.11 (m, 2H), 3.85 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 2H), 2.50 - 2.67 (m, 1H), 1.54 (s, 9H)

**49** : 4-Amino-*N*-(3-oxo-3-(prop-2-yn-1-ylamino)-2-(4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzamido)propyl)benzamide



The compound **49** was synthesized following the general procedure **C** starting from the protected amine **49c** (10.8 mg, 0.0229 mmol, qtt).

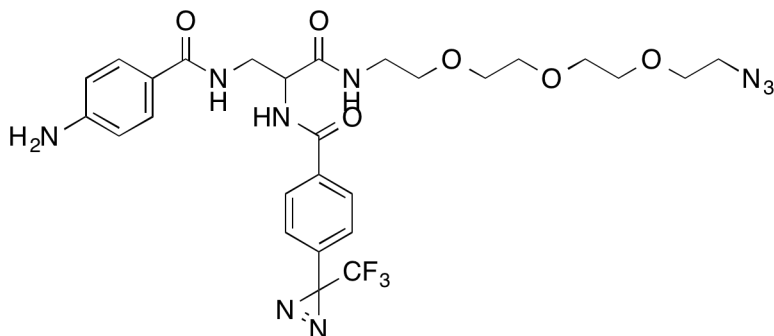
**50a** : *tert*-Butyl(4-((1-azido-13-oxo-14-(4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzamido)-3,6,9-trioxa-12-azapentadecan-15-yl)carbamoyl)phenyl)carbamate



The compound **50a** was synthesized following the general procedure **A** starting from the acid **49b** (29.3 mg, 0.0547 mmol) and 1-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]-2-(2-azidoethoxy)ethane (11.9 mg, 0.0547 mmol) using HBTU as the coupling agent. The desired product was obtained as a colorless oil (13.8 mg, 0.0188 mmol, 34 %).

$^1\text{H NMR}$  (MeOH- $d_4$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 7.99 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.77 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.51 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.37 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 3.81 - 3.89 (m, 2H), 3.47 - 3.77 (m,  $J = 11.5$  Hz, 11H), 3.39 - 3.47 (m, 2H), 3.35 - 3.39 (m, 4H), 1.54 (s, 9H)  $^{13}\text{C NMR}$  (MeOH- $d_4$ , 101 MHz):  $\delta$  (ppm) 171.8, 171.2, 136.6, 133.6, 129.5, 129.4, 128.7, 128.1, 127.8, 118.9, 85.4, 71.7, 71.7, 71.6, 71.3, 71.2, 70.6, 51.9, 40.6, 28.8

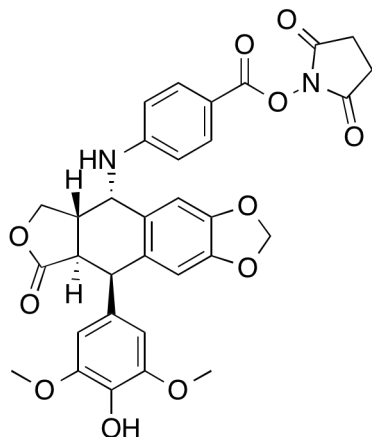
**50** : 4-Amino-*N*-(1-azido-13-oxo-14-(4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzamido)-3,6,9-trioxa-12-azapentadecan-15-yl)benzamide



$C_{27}H_{32}F_3N_9O_6$  - Mw = 635.6 g/mol

The compound **50** was synthesized following the general procedure **C** starting from the protected amine **50a** (11.9 mg, 0.0188 mmol, qtt).

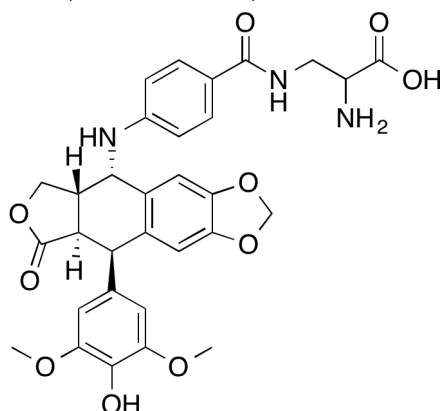
**51a** : 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-4-(((5*S*,5*aS*,8*aR*,9*R*)-9-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-8-oxo-5,5*a*,6,8,8*a*,9-hexahydrofuro[3',4':6,7]naphtho[2,3-*d*][1,3]dioxol-5-yl)amino)benzoate



$C_{32}H_{28}N_2O_{11}$  - Mw = 616.6 g/mol

To a solution of **27** (1 eq., 693 mg, 1.33 mmol) in DCM (15 mL) was added EDC (1.2 eq., 307 mg, 1.6 mmol), NHS (1.2 eq., 184 mg, 1.6 mmol) and DIPEA (5 eq., 1.1 mL, 6.67 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at rt. The organic layer was washed with saturated  $NaHCO_3$ , water and brine, was dried over  $MgSO_4$  and the solvent was evaporated. A white powder was obtained and the product was used without further purification (835 mg, 1.35 mmol).

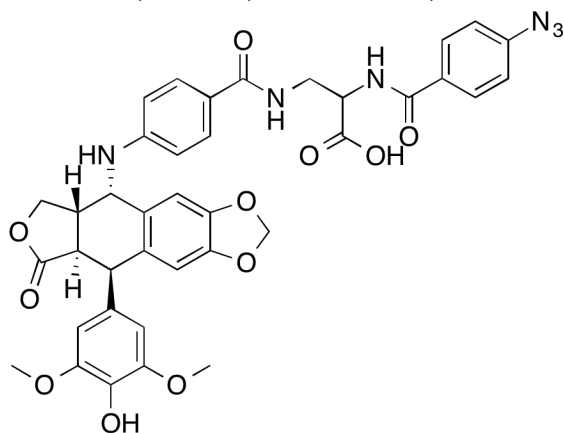
**51** : 2-Amino-3-(4-(((5*S*,5*aS*,8*aR*,9*R*)-9-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-8-oxo-5,5*a*,6,8,8*a*,9-hexahydrofuro[3',4':6,7]naphtho[2,3-*d*][1,3]dioxol-5-yl)amino)benzamido)propanoic acid



$C_{31}H_{31}N_3O_{10}$  - Mw = 605.6 g/mol

**51a** (1 eq., 835 mg, 1.35 mmol) was dissolved in DMF (15 mL) and DIPEA (4.47 eq., 1 mL, 6.05 mmol) and Fmoc-DAP-OH (1.13 eq., 500 mg, 1.53 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at rt overnight. The solvent was removed and the product was used without further purification (1.15 g, 1.9 mmol).

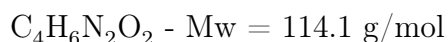
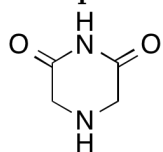
**52** : 2-(4-Azidobenzamido)-3-(4-(((5*S*,5*aS*,8*aR*,9*R*)-9-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-8-oxo-5,5*a*,6,8,8*a*,9-hexahydrofuro[3',4':6,7]naphtho[2,3-*d*][1,3]dioxol-5-yl)amino)benzamido)propanoic acid



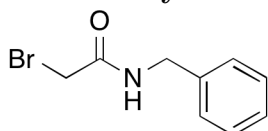
$C_{38}H_{34}N_6O_{11}$  - Mw = 750.7 g/mol

**51** (1 eq., 200 mg, 0.33 mmol) was dissolved in DMF (4 mL) and DIPEA (5 eq., 0.275 mL, 1.65 mmol) and **45** (1.5 eq., 128 mg, 0.495 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at rt overnight and injected in preparative HPLC. The desired product was obtained as a colorless oil (8 mg, 0.0107 mmol, 3 %).

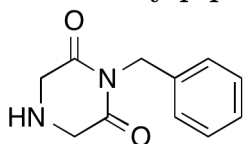
**MS (ESI, m/z):**  $[M-H]^- = 748$

**56 : Piperazine-2,6-dione**

The compound **56** was synthesized according to literature procedure.<sup>7</sup>

**65 : N-benzyl-2-bromoacetamide**

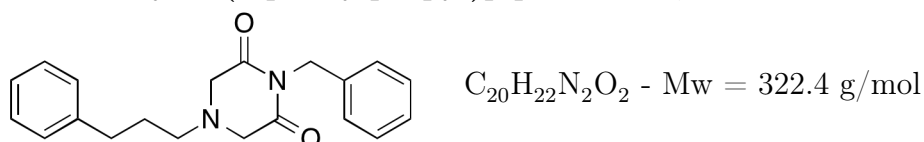
To a stirred solution of benzylamine (1.02 eq., 4.9 g, 5 mL, 45.7 mmol) and DIPEA (1.1 eq., 8.2 mL, 49.6 mmol) in DCM (200 mL) at -78 °C was added bromoacetyl chloride (1 eq., 7.08 g, 3.73 mL, 45 mmol) and the reaction was allowed to warm up to rt and stirred for 30 min. The mixture was washed with HCl 1 M, water and brine, dried over  $MgSO_4$  and evaporated under vacuum. The crude product was used without further purification (10.2 g, 44.6 mmol, 99 %).

**66 : 1-Benzylpiperazine-2,6-dione**

To a stirred suspension of methyl glycine hydrochloride (1 eq., 1.07 g, 8.52 mmol) and  $KHCO_3$  (2.63 eq., 2.24 g, 22.4 mmol) in ACN (40 mL) was added **65** (1.04 eq., 2.03 g, 8.9 mmol). The reaction mixture was stirred at reflux overnight. The reaction was filtered off, the residue was washed with ACN, and the filtrate was evaporated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc gradient, 15 min) to afford the desired product as a pink solid (625 mg, 3.06 mmol, 36 %).

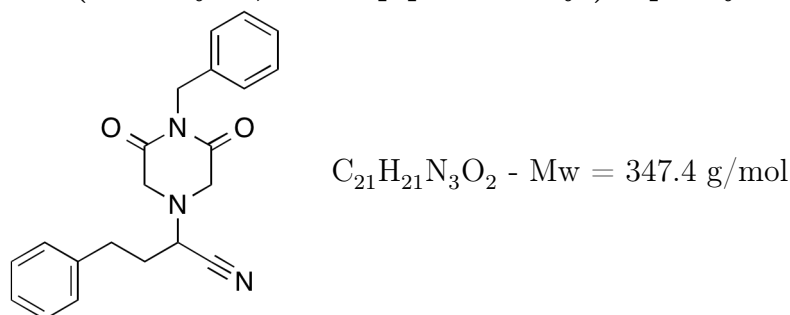
$^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 7.07 - 7.48 (m, 5H), 4.82 (s, 2H), 3.60 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 4H), 3.23 (quint,  $J$  = 7.7 Hz, 1H)  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 126 MHz):  $\delta$  (ppm) 172.1, 137.2, 128.2, 127.3, 126.9, 49.1, 40.8

MS (ESI, m/z):  $[M+H]^+$  = 205

**67 : 1-Benzyl-4-(3-phenylpropyl)piperazine-2,6-dione**

3-phenylpropanal (1.02 eq., 0.1 mL, 0.753 mmol) and **66** (1 eq., 150 mg, 0.734 mmol) were dissolved in MeOH (3 mL) and stirred for 5 min. Sodium cyanoborohydride (1.11 eq., 51.2 mg, 0.815 mmol) in MeOH (700  $\mu$ L) was added and the reaction mixture was stirred overnight. The solvent is evaporated and the crude mixture is purified by flash chromatography (Cyclohexane / EtOAc gradient, 15 min) to afford the desired product (31.3 mg, 0.0971 mmol, 13 %).

$^1H$  NMR (MeOH- $d_4$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 7.10 - 7.48 (m, 10H), 4.93 (s, 2H), 3.48 (s, 4H), 2.65 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 2.50 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 1.83 (quint,  $J$  = 7.5 Hz, 2H)

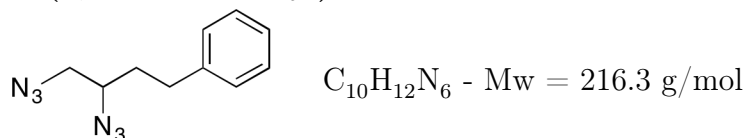
**69 : 2-(4-Benzyl-3,5-dioxopiperazin-1-yl)-4-phenylbutanenitrile**

To a stirred solution of **66** (1 eq., 103 mg, 0.504 mmol) in dry ACN (1.2 mL) was added 3-phenylpropanal (0.985 eq., 0.066 mL, 0.497 mmol), TMSCN (1.78 eq, 0.12 mL, 0.9 mmol) and  $NiCl_2$  (6.12 %, 4 mg, 0.0309 mmol). The reaction was stirred at rt overnight. The mixture was diluted with EtOAc, and washed with water and brine, dried over  $MgSO_4$  and evaporated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc gradient, 15 min) to afford the desired product (80 mg, 0.23 mmol, 46 %).

$^1H$  NMR (Chloroform- $d$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 6.97 - 7.23 (m, 10H), 4.79 (s, 2H), 3.17 - 3.55 (m, 5H), 2.49 - 2.77 (m, 2H), 1.89 - 2.05 (m, 2H)  $^{13}C$  NMR (Chloroform- $d$ , 101 MHz):  $\delta$  (ppm) 168.0, 138.7, 136.2, 128.9, 128.8, 128.5, 128.4, 127.8, 126.9, 114.9, 54.7, 53.4, 42.6, 31.7, 31.3, 26.9

MS (ESI,  $m/z$ ):  $[M+H]^+ = 348$

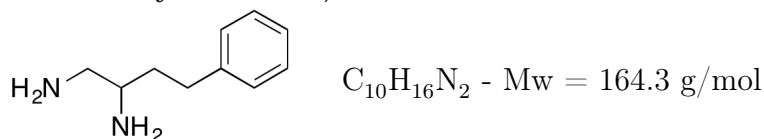


**74 : (3,4-Diazidobutyl)benzene**

4-Phenyl-1-butene (1 eq., 0.5 mL, 3.33 mmol),  $NaN_3$  (15 eq., 3245 mg, 49.9 mmol) and  $Mn(OAc)_3 \cdot 2H_2O$  (3.12 eq., 2780 mg, 10.4 mmol) were suspended in acetic acid (8.5 mL) and stirred at reflux whereupon the salts dissolved. The heating was continued until the solution lightened from dark brown to light yellow. The mixture was cooled to room temperature, diluted with water and extracted with DCM. The combined extracts were washed with brine, dried over  $MgSO_4$ , and evaporated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc gradient, 15 min) to afford the desired product as a white powder (527 mg, 2.44 mmol, 73 %).

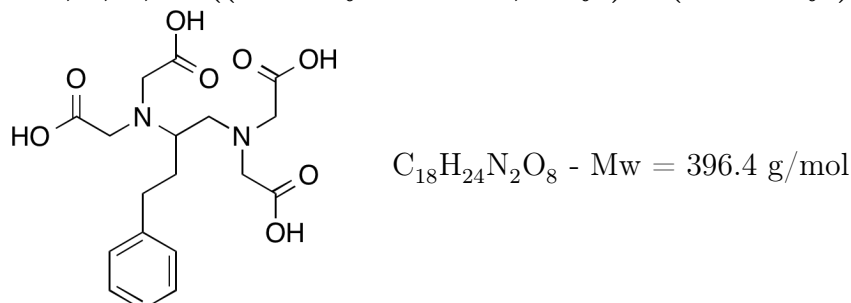
$^1H$  NMR (Chloroform-d, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 7.19 - 7.51 (m, 6H), 3.35 - 3.55 (m, 3H), 2.66 - 2.96 (m, 2H), 1.92 (q,  $J = 7.7$  Hz, 2H)  $^{13}C$  NMR (Chloroform-d, 101 MHz):  $\delta$  (ppm) 140.3, 128.6, 128.4, 126.3, 61.0, 54.9, 33.4, 32.0

MS (ESI, m/z):  $[M-N_2^+H]^+ = 189$

**75 : 4-Phenylbutane-1,2-diamine**

The compound **75** (1 eq., 527 mg, 2.44 mmol) was synthesized following the general procedure **E** starting from the protected amine **74** (527 mg, 2.44 mmol). The product was obtained after purification by preparative HPLC as a white powder (340 mg, 2.07 mmol, 85 %).

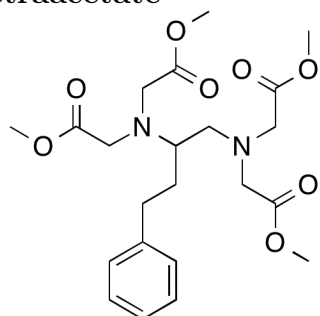
$^1H$  NMR (MeOH, 300MHz):  $\delta$  (ppm) 7.05 - 7.43 (m, 5H), 3.51 - 3.68 (m, 1H), 3.25 - 3.40 (m, 2H), 2.69 - 2.89 (m, 2H), 2.02 - 2.18 (m, 2H)

**76 : 2,2',2'',2'''-((4-Phenylbutane-1,2-diyl)bis(azanetriyl))tetraacetic acid**

**75** (1 eq., 63 mg, 0.384 mmol) was dissolved in  $H_2O$  (0.5 mL) and chloroacetic acid (6.02 eq., 218 mg, 2.31 mmol) was added. A solution of NaOH (14.2 eq., 218 mg, 5.45 mmol)

in H<sub>2</sub>O (0.5 mL) was then added dropwise. The reaction mixture was stirred for 5 days at 45 °C and evaporated under vacuum. The residue was used in the next step without purification.

**77 : Tetramethyl 2,2',2'',2'''-((4-phenylbutane-1,2-diyl)bis(azanetriyl)) tetraacetate**

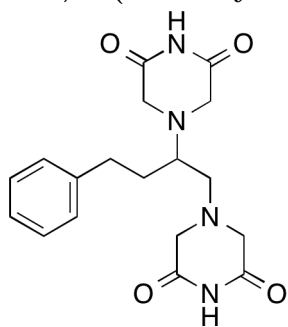


**76** (1 eq., 158 mg, 0.4 mmol) was dissolved in MeOH (4 mL) and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (12.7 eq., 500 mg, 0.5 mL, 5.1 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at rt overnight, diluted with EtOAc, washed with saturated NaHCO<sub>3</sub>, water and brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc gradient, 15 min) to afford the product (67.1 mg, 0.148 mmol, 37 % after two steps).

<sup>1</sup>H NMR (MeOH, 300MHz): δ (ppm) 7.08 - 7.35 (m, 5H), 4.26 (s, 4H), 3.77 (s, 6H), 3.69 (d, *J* = 2.8 Hz, 10H), 2.58 - 3.03 (m, 5H), 1.66 - 1.83 (m, 2H)

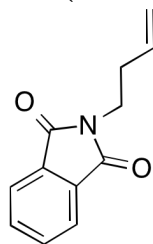
MS (ESI, m/z): [M+H]<sup>+</sup> = 453

**78 : 4,4'-((4-Phenylbutane-1,2-diyl)bis(piperazine-2,6-dione))**



To a solution of **77** (1 eq., 67.1 mg, 0.148 mmol) in MeOH (4.47 mL) was added NH<sub>3</sub> (5.3 eq., 0.5 M in dioxane, 1.57 mL, 0.786 mmol) and NaOMe (2 eq., 16 mg, 0.297 mmol). The solution was stirred at room temperature for 3 days. Each day, NH<sub>3</sub> (5.3 eq., 0.5 M in dioxane, 1.57 mL, 0.786 mmol) and NaOMe (2 eq., 16 mg, 0.297 mmol) were added. The reaction was then diluted with EtOAc, washed with saturated NaHCO<sub>3</sub>, water and brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under vacuum. Further isolation was unsuccessful.

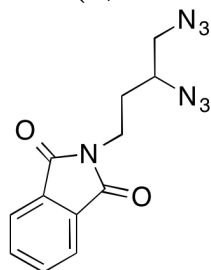
MS (ESI, m/z): [M+H]<sup>+</sup> = 359

**80 :2-(But-3-en-1-yl)isoindoline-1,3-dione** $C_{12}H_{11}NO_2$  - Mw = 201.2 g/mol

Potassium phthalimide (1 eq., 2.8 g, 15.1 mmol) was dissolved in DMF (53.8 mL) and 4-bromo-1-butene (1 eq., 1.54 mL, 15.1 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 60 °C overnight, diluted with water (500 mL) and extracted with DCM (4x150 mL). The organic layer was then washed with brine, dried over  $MgSO_4$  and evaporated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc gradient, 15 min) to afford the desired product as a white powder (2.1 g, 10.4 mmol, 69 %).

$^1H$  NMR (MeOH- $d_4$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 7.72 - 7.92 (m, 4H), 5.82 (ddt,  $J$  = 17.1, 10.2, 6.9 Hz, 1H), 4.96 - 5.10 (m,  $J$  = 2.8 Hz, 2H), 3.76 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 2.45 (q,  $J$  = 7.0 Hz, 2H)  $^{13}C$  NMR (MeOH- $d_4$ , 101 MHz):  $\delta$  (ppm) 169.7, 136.1, 135.4, 133.4, 124.1, 117.7, 38.2, 33.9

MS (ESI, m/z):  $[M+H]^+ = 202$

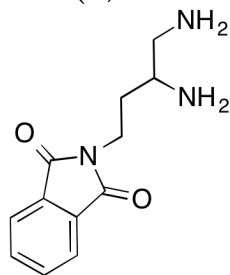
**81 : 2-(3,4-Diazidobutyl)isoindoline-1,3-dione** $C_{12}H_{11}N_7O_2$  - Mw = 285.3 g/mol

**80** (1 eq., 2.2 g, 10.9 mmol),  $NaN_3$  (15 eq., 10.7 g, 163 mmol) and  $Mn(OAc)_3 \cdot 2H_2O$  (3 eq., 8.79 g, 32.8 mmol) were suspended in acetic acid (50 mL) and stirred at reflux whereupon the salts dissolved. The heating was continued until the solution lightened from dark brown to light yellow. The mixture was cooled to room temperature, diluted with water and extracted with DCM. The combined extracts were washed with brine, dried over  $MgSO_4$ , and evaporated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc gradient, 15 min) to afford the desired product (1.84 g, 6.45 mmol, 59 %).

$^1H$  NMR (Chloroform- $d$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 7.64 - 7.96 (m, 4H), 3.85 (sxt,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 3.28 - 3.64 (m, 3H), 1.75 - 2.04 (m, 2H)  $^{13}C$  NMR (Chloroform- $d$ , 101 MHz):  $\delta$  (ppm) 168.5, 134.2, 131.9, 123.4, 59.7, 54.9, 34.7, 30.8

MS (ESI, m/z):  $[M+H]^+ = 286$

**82 : 2-(3,4-Diaminobutyl)isoindoline-1,3-dione**

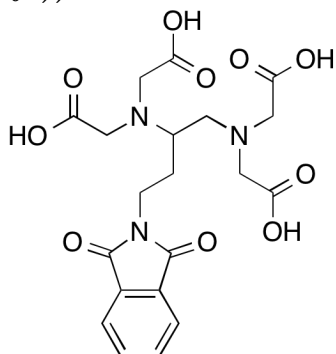


The compound **82** (1 eq., 432 mg, 1.51 mmol) was synthesized following the general procedure **E** starting from the protected amine **81**. The product was obtained after purification by preparative HPLC (190 mg, 0.815 mmol, 54 %).

$^1H$  NMR (MeOH, 300MHz):  $\delta$  (ppm) 7.66 - 7.94 (m, 4H), 3.78 - 3.84 (m, 2H), 3.36 - 3.70 (m, 3H), 1.67 - 1.98 (m, 2H)

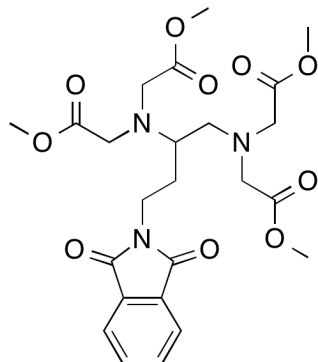
MS (ESI, m/z):  $[M+H]^+ = 234$

**83 : 2,2',2'',2'''-((4-(1,3-Dioxoisoindolin-2-yl)butane-1,2-diyl)bis(azane triyl))tetraacetic acid**



**82** (1 eq., 190 mg, 0.815 mmol) was dissolved in  $H_2O$  (1 mL) and chloroacetic acid (6 eq., 0.292 mL, 4.89 mmol) was added. A solution of NaOH (14 eq., 456 mg, 11.4 mmol) in  $H_2O$  (1 mL) was then added dropwise. The reaction mixture was stirred for 5 days at 45 °C and evaporated under vacuum. The residue was used in the next step without purification.

**84 : Tetramethyl 2,2',2'',2'''-((4-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)butane-1,2-diyl)bis(azanetriyl))tetraacetate**



$C_{24}H_{31}N_3O_{10}$  - Mw = 521.5 g/mol

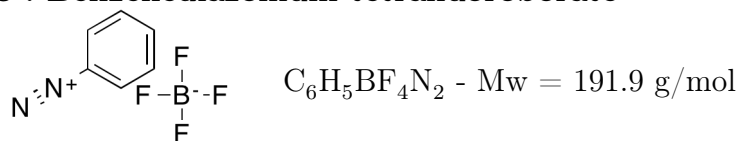
**83** (1 eq., 379 mg, 0.815 mmol) was dissolved in MeOH (8 mL) and  $H_2SO_4$  (11.3 eq., 0.5 mL, 9.18 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at rt overnight, diluted with EtOAc, washed with saturated  $NaHCO_3$ , water and brine, dried over  $MgSO_4$  and evaporated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc gradient, 15 min) to afford the product (12.7 mg, 0.0244 mmol, 3 % after two steps).

$^1H$  NMR (MeOH- $d_4$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 7.74 - 8.00 (m, 4H), 4.23 - 4.34 (m, 4H), 3.78 - 4.05 (m, 10H), 3.64 - 3.75 (m,  $J = 18.3$  Hz, 10H), 3.50 - 3.63 (m, 1H), 1.88 - 2.23 (m, 1H), 1.62 - 1.86 (m, 1H)  $^{13}C$  NMR (MeOH- $d_4$ , 101 MHz):  $\delta$ (ppm) 174.2, 173.3, 170.2, 170.0, 169.6, 168.8, 135.7, 135.6, 133.6, 133.4, 124.4, 124.3, 61.1, 55.7, 55.3, 53.6, 53.4, 53.1, 53.0, 52.6, 39.6, 35.9, 27.9, 26.8

MS (ESI, m/z):  $[M+H]^+ = 522$

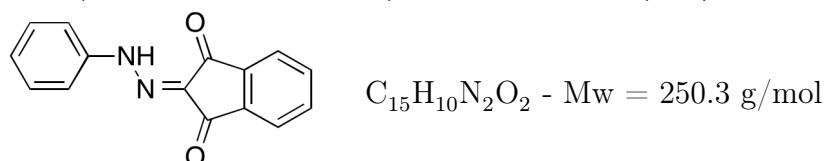
## Développement d'un nouveau lien clivable pour des applications en protéomique chimique

### 98 : Benzenediazonium tetrafluoroborate



The compound **98** was synthesized according to literature procedure.<sup>8</sup>

### 91 : 2-(2-Phenylhydrazono)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione

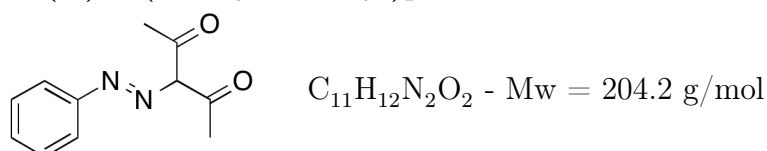


The compound **DAC** was synthesized following the general procedure **F** starting from the diazonium salt **98** (100mg, 0,31 mmol) and 1,3-indanedione (57 mg, 0,31 mmol). The product was obtained as an orange solid (37 mg, 0,15 mmol, 48%).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400MHz): δ (ppm) 13.07 - 13.28 (m, 1H), 7.91 (s, 4H), 7.63 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.47 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.24 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H) <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 101MHz): δ (ppm) 187.2, 185.7, 141.8, 140.1, 138.6, 135.5, 135.4, 130.7, 129.6, 125.6, 122.7, 122.6, 116.3

MS (ESI, m/z): [M+H]<sup>+</sup> = 251

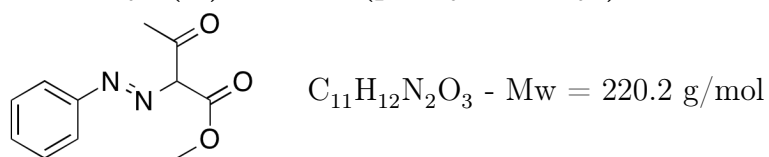
### 92 : (*E*)-3-(Phenyldiazenyl)pentane-2,4-dione



The compound **92** was synthesized following the general procedure **F** starting from the diazonium salt **98** (1 g, 5.21 mmol) and acetylacetone (0.522 g, 0.535 mL, 5.21 mmol). The product was obtained as a yellow solid (378 mg, 1.85 mmol, 36 %).

<sup>1</sup>H NMR (Chloroform-d, 400 MHz): δ (ppm) 14.75 (br.s, 1H), 7.43 (d, *J* = 4.3 Hz, 4H), 7.19 - 7.25 (m, 1H), 2.61 (s, 3H), 2.51 (s, 3H) <sup>13</sup>C NMR (Chloroform-d, 101 MHz): δ (ppm) 197.9, 197.1, 141.5, 133.2, 129.7, 125.9, 116.3, 31.1, 26.5

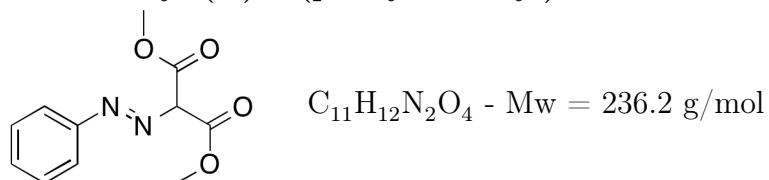
MS (ESI, m/z): [M-H]<sup>-</sup> = 203

**93 : Methyl (*E*)-3-oxo-2-(phenyldiazenyl)butanoate**

The compound **93** was synthesized following the general procedure **F** starting from the diazonium salt **98** (100mg, 0,31 mmol) and methyl 3-oxobutanoate (36 mg, 0,31 mmol). The product was obtained as an orange solid (36 mg, 0,12 mmol, 38%).

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  (ppm) 14.29 (s, 0.2H), 11.63 (s, 0.8H), 7.35 - 7.57 (m, 4H), 7.20 (t,  $J = 7.5$  Hz, 0.2H), 7.11 (t,  $J = 7.2$  Hz, 0.8H), 3.83 (s, 2.4H), 3.80 (s, 0.6H), 2.40 (s, 2.4H) **<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 101 MHz):**  $\delta$  (ppm) 195.8, 193.4, 163.0, 142.4, 130.5, 129.6, 129.4, 125.5, 123.9, 116.6, 115.2, 52.1, 51.8, 30.5, 25.4

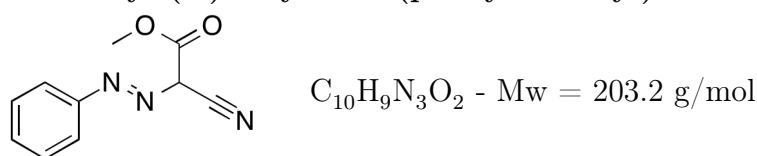
**MS (ESI, m/z):**  $[M-H]^- = 219$

**94 : Dimethyl (*E*)-2-(phenyldiazenyl)malonate**

The compound **94** was synthesized following the general procedure **F** starting from the diazonium salt **98** (100mg, 0,31 mmol) and dimethyl malonate (41 mg, 0,31 mmol). The product was obtained as a yellow solid (46 mg, 0,14 mmol, 45%).

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  (ppm) 12.06 (s, 1H), 7.30 - 7.49 (m,  $J = 3.9$  Hz, 4H), 7.11 (t,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.77 (s, 3H) **<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 101 MHz):**  $\delta$  (ppm) 162.9, 162.3, 129.4, 124.1, 120.5, 115.3, 52.2, 52.0, 40.7

**MS (ESI, m/z):**  $[M-H]^- = 235$

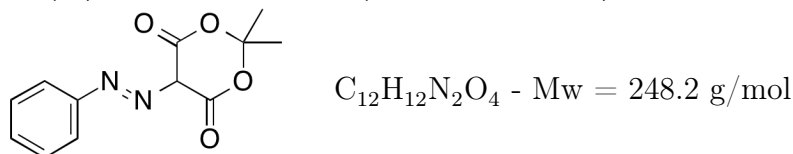
**95 : Methyl (*E*)-2-cyano-2-(phenyldiazenyl)acetate**

The compound **95** was synthesized following the general procedure **F** starting from the diazonium salt **98** (100mg, 0,31 mmol) and methyl 2-cyanoacétate (31 mg, 0,31 mmol). The product was obtained as a yellow solid (35 mg, 0,13 mmol, 42%).

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  (ppm) 12.92 (s, 0.25H), 12.27 (s, 0.75H), 7.36 - 7.58 (m, 4H), 7.22 (t,  $J = 7.3$  Hz, 0.25H), 7.17 (t,  $J = 7.3$  Hz, 0.75H), 3.87 (s, 0.75H), 3.83 (s, 2.25H) **<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 101 MHz):**  $\delta$  (ppm) 161.6, 129.6, 129.5, 125.7, 125.0, 116.2, 116.1, 54.9, 52.7, 52.6

MS (ESI, m/z): [M-H]<sup>-</sup> = 202

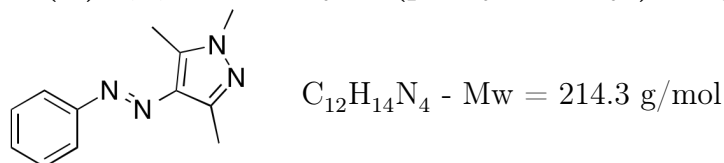
**96 : (*E*)-2,2-Dimethyl-5-(phenyldiazenyl)-1,3-dioxane-4,6-dione**



The compound **96** was synthesized following the general procedure **F** starting from the diazonium salt **98** (100mg, 0,31 mmol) and 5,5-dimethylcyclohexane-1,3-dione (43 mg, 0,31 mmol). The product was obtained as a yellow solid (36 mg, 0,11 mmol, 34%).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 13.31 (s, 1H), 7.66 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.48 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.29 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 1.75 (s, 6H) <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 101 MHz): δ (ppm) 159.7, 159.2, 141.6, 130.1, 127.2, 117.7, 113.2, 105.8, 27.4 MS (ESI, m/z): [M-H]<sup>-</sup> = 247

**99 : (*E*)-1,3,5-Trimethyl-4-(phenyldiazenyl)-1H-pyrazole**

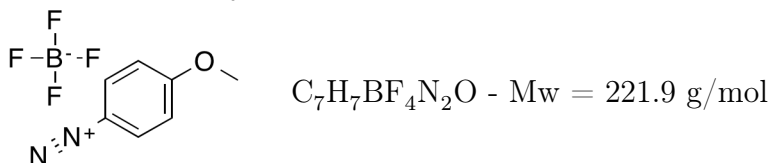


**99** (1 eq., 50 mg, 0.245 mmol) was dissolved in H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1, 1 mL) and methylhydrazin (10 eq., 0.131 mL, 2.45 mmol) was added. The reaction was stirred overnight, diluted with water (10 mL) and extracted with DCM (3x15 mL). The organic layer was then washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to give the desired product as an orange solid (52.5 mg, 0.245 mmol, qtt).

<sup>1</sup>H NMR (Chloroform-d, 400 MHz): δ (ppm) 7.79 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.43 - 7.51 (m, 2H), 7.34 - 7.41 (m, 1H), 3.78 (s, 3H), 2.58 (s, 3H), 2.52 (s, 3H) <sup>13</sup>C NMR (Chloroform-d, 126 MHz): δ (ppm) 153.6, 142.4, 138.7, 135.1, 129.2, 128.8, 121.7, 35.5, 13.8, 9.9

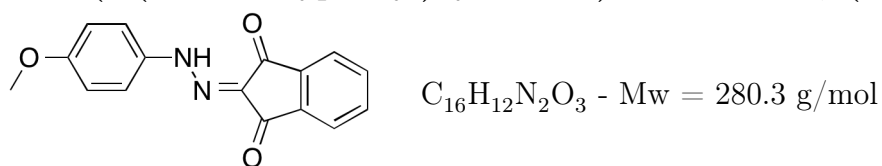
MS (ESI, m/z): [M+H]<sup>+</sup> = 215

**101a : 4-Methoxybenzenediazonium tetrafluoroborate**



The compound **101a** was synthesized according to literature procedure.<sup>8</sup>

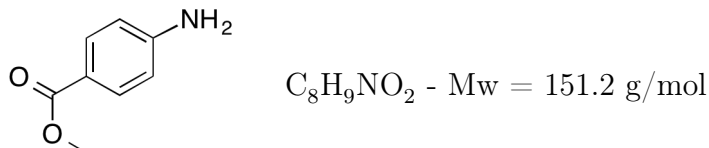


**101 : 2-(2-(4-Methoxyphenyl)hydrazono)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione**

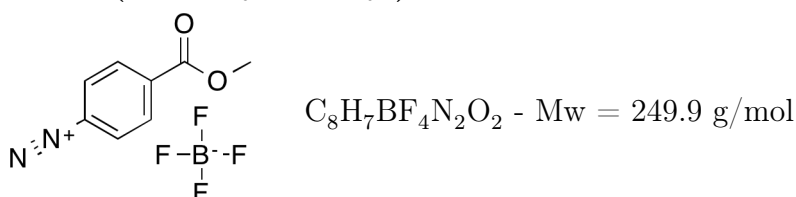
The compound **101** was synthesized following the general procedure **F** starting from the diazonium salt **101a** (400 mg, 1.8 mmol) and 1,3-indanedione (263 mg, 1.8 mmol). The product was obtained as an orange solid (257 mg, 0.92 mmol, 51 %).

$^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400MHz):  $\delta$  (ppm) 13.31 (br.s., 1H), 7.88 (s, 4H), 7.62 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 7.05 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H)  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 101MHz):  $\delta$  (ppm) 168.9, 158.6, 141.5, 138.6, 135.0, 134.7, 123.0, 122.6, 117.8, 115.0, 55.6

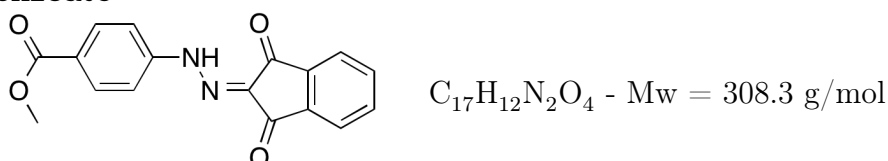
MS (ESI,  $m/z$ ):  $[M+H]^+ = 281$

**102a : Methyl 4-aminobenzoate**

The compound **102a** was synthesized according to literature procedure.<sup>9</sup>

**102b : 4-(methoxycarbonyl)benzenediazonium tetrafluoroborate**

The compound **102b** was synthesized according to literature procedure.<sup>8</sup>

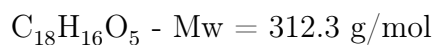
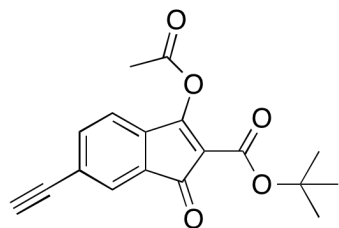
**102 : methyl 4-(2-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-inden-2-ylidene)hydrazinyl)benzoate**

The compound **102** was synthesized following the general procedure **F** starting from the diazonium salt **102b** (225 mg, 0.90 mmol) and 1,3-indanedione (131 mg, 0.90 mmol). The product was obtained as an orange solid (147 mg, 0.48 mmol, 53 %).

$^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400MHz): 13.11 (br.s., 1H), 8.03 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.93 (s, 4H), 7.74 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H)  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 101MHz):  $\delta$  (ppm) 165.7, 163.8, 135.7, 130.9, 125.8, 122.8, 116.1, 52.1

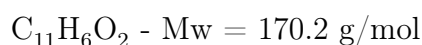
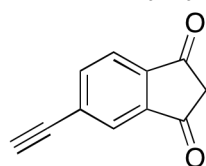
MS (ESI,  $m/z$ ):  $[M-H]^- = 307$

**104 : *tert*-Butyl 1-acetoxy-5-ethynyl-3-oxo-2,3-dihydro-1*H*-indene-2 carboxylate**



To a solution of 5-ethynyl-1,3-dihydro-2-benzofuran-1,3-dione (1 eq., 200 mg, 1.16 mmol) in DCM (4.13 mL), *tert*-butyl acetoacetate (1.2 eq., 0.23 mL, 1.39 mmol) was added, followed by acetic anhydride (2 eq., 0.218 mL, 2.32 mmol). To this reaction mixture, TEA (3 eq., 0.484 mL, 3.49 mmol) was added dropwise over a 15-min period. The reaction mixture was stirred overnight, concentrated under reduced pressure, and the residue was dissolved in water (25 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (3x25mL), the organic layer was then washed with brine (25 mL), dried over  $MgSO_4$  and concentrated under vacuum. The obtained product (317 mg, 1.01 mmol, 87 %) was used without purification.

**105 : 5-Ethynyl-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione**

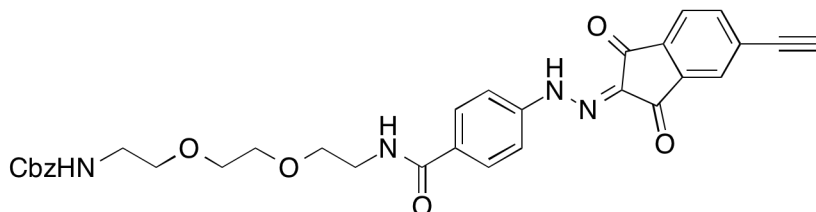


In a sealed vial, **104** (1 eq., 317 mg, 1.01 mmol) was dissolved in  $H_2O/MeOH$  (1:3, 7 mL).  $K_2CO_3$  (5.21 eq., 727 mg, 5.26 mmol) was added and the reaction was stirred at 70 °C overnight. The reaction mixture was then diluted with water (10 mL) and concentrated HCl was added slowly. The reaction mixture was extracted with DCM (3x30 mL), the organic layer was washed with brine, dried over  $MgSO_4$  and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc gradient, 15 min) to give the desired product (94.5 mg, 0.555 mmol, 55 %).

$^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400MHz):  $\delta$  (ppm) 7.88 - 8.05 (m, 3H), 4.69 (s, 1H), 3.38 (s, 2H)  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 101MHz):  $\delta$  (ppm) 197.2, 197.1, 143.1, 142.4, 138.4, 128.5, 125.3, 123.0, 85.5, 81.9, 45.3

MS (ESI, m/z):  $[M+H]^+ = 171$

**106** : Benzyl (*E*)-2-(2-(2-(4-(2-(5-ethynyl-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-inden-2-ylidene)hydrazinyl)benzamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate



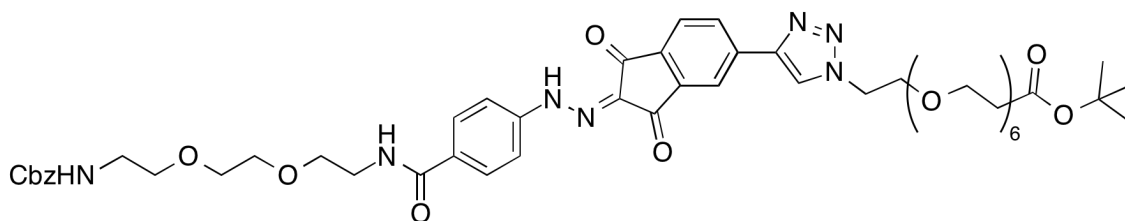
$C_{32}H_{30}N_4O_7$  - Mw = 582.6 g/mol

The compound **106** was synthesized following the general procedure **G** starting from the aniline derivative **29** (180 mg, 0.45 mmol) and the 1,3-indanedione derivative **105** (68 mg, 0.4 mmol). The product was obtained as an orange solid (130 mg, 0.224 mmol, 56 %).

$^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400MHz):  $\delta$  (ppm) 13.17 (d,  $J$  = 3.0 Hz, 1H), 8.53 (t,  $J$  = 5.4 Hz, 1H), 7.84 - 8.06 (m, 5H), 7.61 - 7.78 (m, 2H), 7.34 (s, 6H), 5.01 (s, 2H), 4.70 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H), 3.47 - 3.58 (m,  $J$  = 3.3 Hz, 6H), 3.39 - 3.45 (m, 4H), 3.14 (q,  $J$  = 5.8 Hz, 2H)  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 101MHz):  $\delta$  (ppm) 165.4, 156.1, 143.7, 138.4, 137.1, 131.1, 128.7, 128.3, 127.7, 125.4, 125.3, 123.2, 115.8, 85.5, 69.5, 69.1, 68.9, 65.2

MS (ESI, m/z):  $[M+H]^+$  = 583

**107** : *tert*-Butyl-(*E*)-1-(4-(1,3-dioxo-2-(2-(4-((3-oxo-1-phenyl-2,7,10-trioxa-4-azadodecan-12-yl)carbamoyl)phenyl)hydrazono)-2,3-dihydro-1*H*-inden-5-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oate



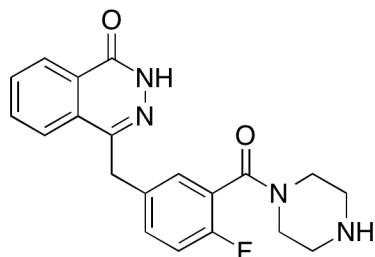
$C_{51}H_{67}N_7O_{15}$  - Mw = 1018.1 g/mol

The compound **107** was synthesized following the general procedure **B** starting from the alkyne **106** (50 mg, 0.086 mmol) and the azide **8** (37.4 mg, 0.086 mmol). The product was obtained as an orange solid (20.1 mg, 0.020 mmol, 23 %).

$^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400MHz):  $\delta$  (ppm) 13.21 (br.s, 1H), 9.00 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 1H), 8.58 (t,  $J$  = 5.4 Hz, 1H), 8.47 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.97 - 8.11 (m, 3H), 7.72 - 7.80 (m,  $J$  = 8.5, 4.0 Hz, 2H), 7.23 - 7.46 (m, 6H), 5.07 (s, 2H), 4.68 (t,  $J$  = 4.8 Hz, 2H), 3.96 (t,  $J$  = 4.9 Hz, 2H), 3.44 - 3.67 (m, 32H), 3.20 (q,  $J$  = 5.8 Hz, 2H), 2.45 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H)  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 101MHz):  $\delta$  (ppm) 170.3, 168.0, 165.4,

156.1, 144.7, 143.9, 141.2, 139.8, 139.2, 137.2, 132.0, 131.7, 130.8, 128.7, 128.3, 127.7, 127.6, 115.7, 115.6, 79.7, 69.7, 69.6, 69.5, 69.5, 69.1, 68.9, 66.2, 65.2, 54.9, 35.8, 27.7  
MS (ESI, m/z): [M-H]<sup>-</sup> = 1016

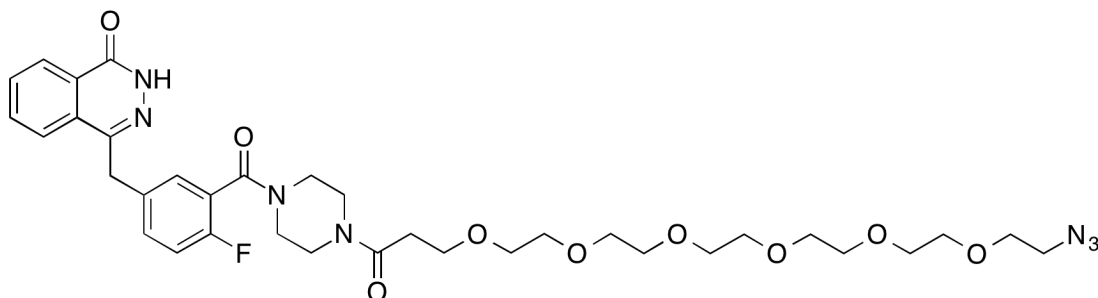
**109a : 4-(4-Fluoro-3-(piperazine-1-carbonyl)benzyl)phthalazin-1(2H)-one**



C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> - Mw = 366.4 g/mol

The compound **109a** was synthesized according to literature procedure.<sup>10</sup>

**109 : 4-(3-(4-(1-Azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oyl)piperazine-1-carbonyl)-4-fluorobenzyl)phthalazin-1(2H)-one**



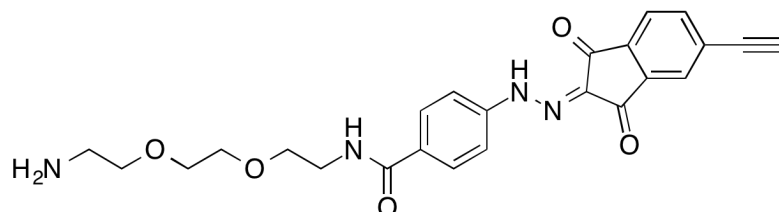
C<sub>35</sub>H<sub>46</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>9</sub> - Mw = 727.8 g/mol

The compound **109** was synthesized following the general procedure **A** starting from the acid **9** (104 mg, 0.27 mmol) and the amine **109a** (52 mg, 0.14 mmol) using HATU as the coupling agent. The desired product was obtained as a colorless oil (58.2 mg, 0.08 mmol, 56 %).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400MHz): δ (ppm) 12.59 (s, 1H), 8.26 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.89 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.83 (td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H), 7.46 - 7.42 (m, 1H), 7.37 - 7.35 (m, 1H), 7.23 (t, *J* = 9 Hz, 1H), 4.73 (br.s, 1H), 4.32 (s, 2H), 3.64 - 3.60 (m, 4H), 3.59 (t, *J* = 5.2 Hz, 3H), 3.56 - 3.42 (m, 20H), 3.38 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H), 3.19 - 3.14 (m, 2H), 2.61 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 2.55 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H) <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 101MHz): δ (ppm) 169.1, 169.1, 164.0, 164.0, 159.4, 158.5, 157.6, 155.2, 144.9, 134.8, 131.8, 131.6, 129.1, 129.0, 127.9, 126.1, 125.4, 123.7, 123.7, 123.5, 123.5, 116.0, 115.8, 69.8, 69.2, 66.8, 50.0, 46.7, 45.1, 44.7, 41.6, 41.1, 40.6, 36.4, 32.8

MS (ESI, m/z): [M+H]<sup>+</sup> = 727

**111** : (*E*)-*N*-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethyl)-4-(2-(5-ethynyl-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-inden-2-ylidene)hydrazinyl)benzamide

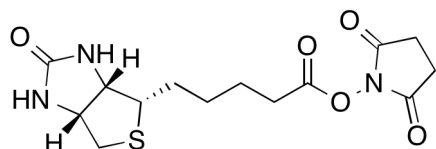


$C_{24}H_{24}N_4O_5$  - Mw = 448.5 g/mol

**106** (1 eq., 70 mg, 0.12 mmol) was dissolved in TFA (2.2 mL) and thioanisole (50 eq., 0.711 mL, 6.01 mmol) was added. The reaction was stirred at rt overnight and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by preparative HPLC to give the desired compound (19.9 mg, 0.045 mmol, 37 %).

$^1H$  NMR (MeOH- $d_4$ , 400MHz):  $\delta$  (ppm) 7.88 - 7.98 (m, 4H), 7.60 - 7.75 (m, 3H), 4.01 (d,  $J$  = 2.8 Hz, 1H), 3.72 (br.s, 8H), 3.57 - 3.65 (m,  $J$  = 5.3 Hz, 2H), 3.08 - 3.17 (m, 2H)  $^{13}C$  NMR (MeOH- $d_4$ , 101MHz):  $\delta$  (ppm) 179.8, 169.6, 145.7, 141.8, 140.0, 135.9, 132.7, 131.1, 130.2, 127.2, 124.4, 117.2, 93.8, 91.3, 71.6, 71.5, 70.8, 68.0, 40.9, 40.8 MS (ESI, m/z):  $[M-H]^-$  = 447

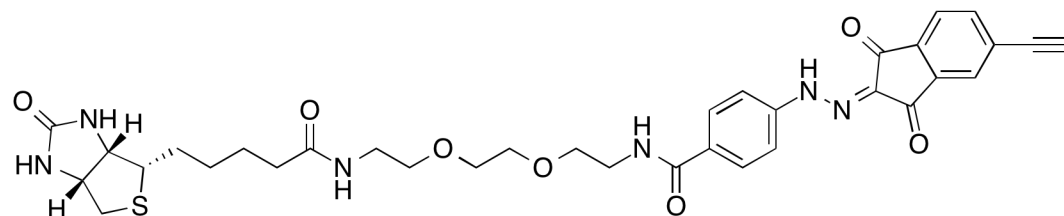
**112a** : Biotin *N*-hydroxysuccinimide ester



$C_{14}H_{19}N_3O_5S$  - Mw = 341.4 g/mol

The compound **112a** was synthesized according to literature procedure.<sup>11</sup>

**112** : (*E*)-4-(2-(5-ethynyl-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-inden-2-ylidene)hydrazinyl)-*N*-(2-(2-(2-(5-(2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)benzamide



$C_{34}H_{38}N_6O_7S$  - Mw = 674.8 g/mol

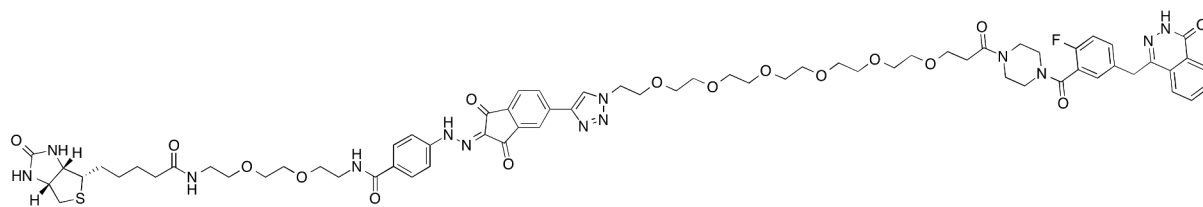
**111** (1 eq., 7.5 mg, 0.017 mmol) and **112a** (2 eq., 11.4 mg, 0.033 mmol) were dissolved in DMF (0.5 mL). DIPEA (10 eq., 0.0276 mL, 0.17 mmol) was added and the reaction

mixture was stirred at rt overnight. The mixture was directly purified by preparative HPLC to afford the desired compound (6.07 mg, 0.009 mmol, 54 %).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400MHz): δ (ppm) 13.18 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 8.54 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 7.89 - 8.01 (m, 5H), 7.82 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 7.65 - 7.74 (m, 2H), 6.31 - 6.44 (m, 1H), 4.70 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 4.25 - 4.34 (m, 1H), 4.06 - 4.16 (m, 1H), 3.52 - 3.59 (m, 8H), 3.17 (s, 5H), 3.03 - 3.11 (m, 1H), 2.81 (dd, *J* = 12.5, 5.0 Hz, 2H), 2.06 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.41 - 1.55 (m, 2H), 1.21 - 1.29 (m, 2H)

MS (ESI, m/z): [M+H]<sup>+</sup> = 675

**108** : (*E*)-4-(2-(5-(1-(21-(4-(2-Fluoro-5-((4-oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)methyl)benzoyl)piperazin-1-yl)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-inden-2-ylidene)hydrazinyl)-*N*-(2-(2-(2-(5-(2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)benzamide



C<sub>69</sub>H<sub>84</sub>FN<sub>13</sub>O<sub>16</sub>S - Mw = 1402.6 g/mol

The compound **108** was synthesized following the general procedure **B** starting from the alkyne **112** (6,1 mg, 0,01 mmol) and the azide **109** (15,1 mg, 0.02 mmol). The reaction mixture was treated with a solution of EDTA in H<sub>2</sub>O prior to injection in preparative HPLC. The product was obtained as an orange solid (5 mg, 0.00356 mmol, 18 %).

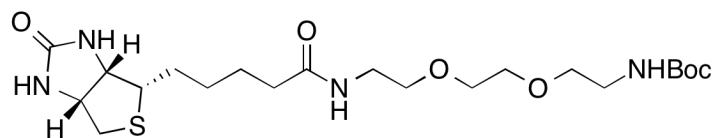
HRMS (ESI,m/z) : calc for C<sub>69</sub>H<sub>84</sub>FN<sub>13</sub>NaO<sub>16</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> 1424,57559; found 1424.57722

**114** : *tert*-Butyl(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate



The compound **114** was synthesized according to literature procedure.<sup>12</sup>

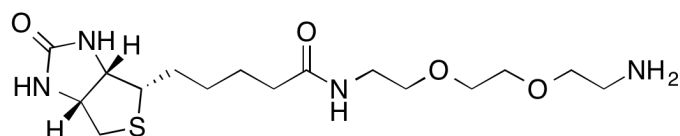
**115a** : *tert*-Butyl(2-(2-(2-(5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate



$C_{21}H_{38}N_4O_6S$  - Mw = 474.6 g/mol

**112a** (1 eq., 202 mg, 0.593 mmol) was dissolved in DMF (5.06 mL) and **114** (0.95 eq., 139 mg, 0.563 mmol) and DIPEA (5.16 eq., 0.506 mL, 3.06 mmol) were added. The reaction was stirred overnight at rt, then the solvent was evaporated. The product was used without further purification (281 mg, 0.593 mmol, qtt).

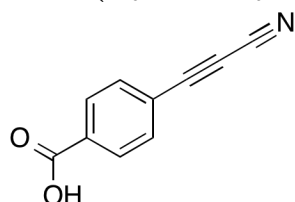
**115** : *N*-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethyl)-5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamide



$C_{16}H_{30}N_4O_4S$  - Mw = 374.5 g/mol

The compound **115** was synthesized following the general procedure **C** starting from the protected amine **115a** (222 mg, 0.593 mmol, qtt).

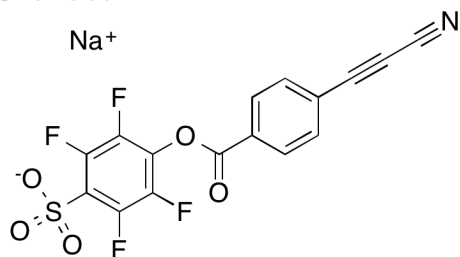
**119** : 4-(Cynoethynyl)benzoic acid



$C_{10}H_5NO_2$  - Mw = 171.2 g/mol

The compound **119** was synthesized according to literature procedure.<sup>13</sup>

**116** : Sodium 4-((4-(cyanoethynyl)benzoyl)oxy)-2,3,5,6-tetrafluorobenzene sulfonate



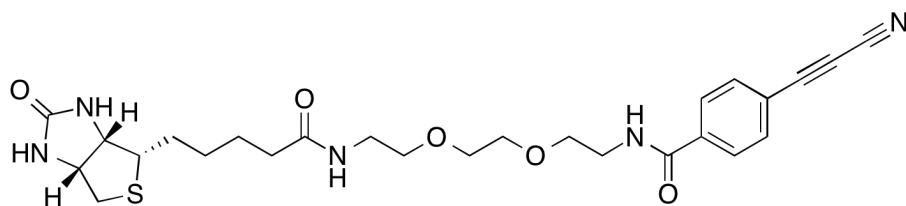
$C_{16}H_4F_4NNaO_5S$  - Mw = 421.3 g/mol

To a solution of **119** (1 eq., 54.2 mg, 0.317 mmol) and sodium 2,3,5,6-tetrafluoro-4-hydroxybenzene-1-sulfonate (1 eq., 84.9 mg, 0.317 mmol) in dry DMF (0.792 mL) was

added DCC (1 eq., 65.3 mg, 0.317 mmol). The resulting mixture was stirred at rt for 36 h, then cooled to 0 °C, stirred for 1 h, filtered and washed with 0.8 mL of dry DMF. The filtrate was diluted with 16 mL of Et<sub>2</sub>O, stirred for 15 min for complete crystallization and the precipitate was filtered to give the desired product (72.5 mg, 0.172 mmol, 54 % yield) as a white solid.

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ (ppm) 8.31 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 8.09 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H).

**117** : 4-(Cyanoethynyl)-*N*-(2-(2-(2-(5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)benzamide



C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S - Mw = 527.6 g/mol

To the solution of **115** (1 eq., 222 mg, 0.593 mmol) in dry DMF (1 mL) was added **116** (1.2 eq., 300 mg, 0.712 mmol) and DIPEA (5.1 eq., 0.5 mL, 3.03 mmol). The mixture was stirred at rt for 3 h and then purified by preparative HPLC to give the desired product (68.8 mg, 0.13 mmol, 22 % yield) as a yellow oil.

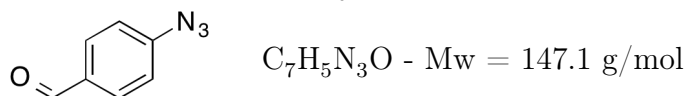
<sup>1</sup>H NMR (400MHz, MeOH-d<sub>4</sub>) : δ (ppm) 7.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H), 7.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H), 4.49 (dd, *J* = 4.8, 7.8 Hz, 1 H), 4.30 (dd, *J* = 4.5, 7.8 Hz, 1 H), 3.71 - 3.56 (m, 8 H), 3.54 (t, *J* = 5.5 Hz, 2 H), 3.34 (t, *J* = 5.5 Hz, 2 H), 3.24 - 3.14 (m, 1 H), 2.92 (dd, *J* = 4.8, 12.8 Hz, 1 H), 2.70 (d, *J* = 12.8 Hz, 1 H), 2.19 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H), 1.78 - 1.50 (m, 4 H), 1.48 - 1.35 (m, 2 H). <sup>13</sup>C NMR (101MHz, MeOH-d<sub>4</sub>) : δ (ppm) 176.3, 168.8, 166.2, 138.9, 135.0, 129.1, 121.5, 105.9, 83.1, 71.5, 71.4, 70.7, 70.6, 64.6, 63.5, 61.8, 57.1, 41.2, 40.4, 36.9, 29.9, 29.6, 27.0.

MS (ESI, m/z): [M+H]<sup>+</sup> = 528.8



## Elimination d'une drogue circulante dans le sang par réaction de click

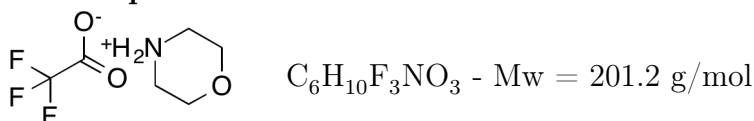
### 126 : 4-Azidobenzaldehyde



4-Nitrobenzaldehyde (1 eq., 500 mg, 3.31 mmol) and  $NaN_3$  (2 eq., 430 mg, 6.62 mmol) were dissolved in DMF (20 mL) in a microwave tube and stirred at 110 °C under microwave irradiation for 1 h. The mixture was diluted with water (150 mL), and extracted with DCM (3x100 mL). The organic layer was washed with brine (100 mL), dried over  $MgSO_4$  and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc gradient, 15 min) to give the desired product (355 mg, 2.42 mmol, 73 %) as a yellowish oil.

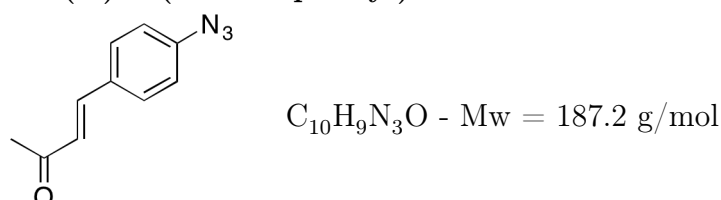
$^1H$  NMR (Chloroform-d, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 9.95 (s, 1H), 7.89 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 7.17 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H)  $^{13}C$  NMR (Chloroform-d, 101 MHz):  $\delta$  (ppm) 190.6, 146.2, 133.2, 131.5, 119.5

### 127 : Morpholinium trifluoroacetate



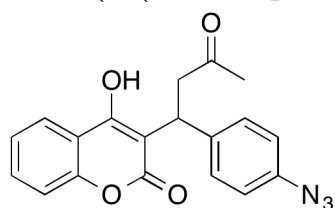
The compound **127** was synthesized according to literature procedure.<sup>14</sup>

### 128 : (E)-4-(4-Azidophenyl)but-3-en-2-one



To a solution of **126** (1 eq., 500 mg, 3.4 mmol) in acetone (3.4 mL) was added **127** (0.2 eq., 136 mg, 0.68 mmol). The reaction mixture was stirred in a sealed vial for 90 min at 100 °C. The acetone was evaporated and the crude mixture was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc gradient, 15min) to give the desired product **128** (400 mg, 2.14 mmol, 63 %) as a yellow powder.

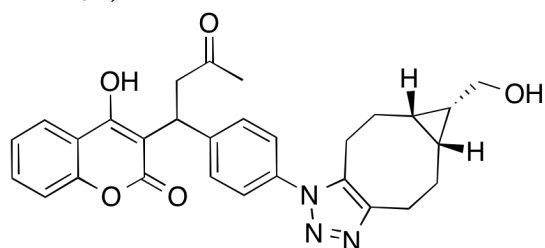
$^1H$  NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 7.70 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.64 (d,  $J$  = 16.3 Hz, 1H), 7.13 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 6.77 (d,  $J$  = 16.3 Hz, 1H), 2.39 (s, 3H)  $^{13}C$  NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 101 MHz):  $\delta$  (ppm) 201.8, 144.6, 143.9, 133.0, 131.4, 127.6, 120.8, 27.9 MS (ESI, m/z):  $[M+Na]^+$  = 210

**122 : 3-(1-(4-Azidophenyl)-3-oxobutyl)-4-hydroxy-2H-chromen-2-one** $C_{19}H_{15}N_3O_4$  - Mw = 349.4 g/mol

**128** (1 eq., 973 mg, 5.2 mmol) and 4-hydroxycoumarin (1.08 eq., 910 mg, 5.62 mmol) were dissolved in DCM (35 mL). S-proline (50 %, 299 mg, 2.6 mmol) was added and DMSO (15 mL) was added to solubilize it. The reaction mixture was stirred at rt overnight and DCM was removed under vacuum. The mixture was diluted with water (150 mL) and extracted with ethyl acetate (150 mL). The organic layer was washed with brine, dried over  $MgSO_4$  and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc gradient, 15 min) to give the desired product **122** (0.999 g, 2.86 mmol, 55 %) as a beige solid.

**$^1H$  NMR (Acetone, 500MHz):**  $\delta$  (ppm) 7.87 - 7.95 (m, 1H), 7.62 - 7.71 (m, 1H), 7.31 - 7.44 (m, 4H), 7.03 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1.4H), 6.98 (d,  $J = 8.5$  Hz, 0.6H), 6.41 (br.s, 0.7H), 6.17 (br.s, 0.3H), 4.12 - 4.19 (m, 1H), 2.44 - 2.52 (m, 1.1H), 2.33 - 2.40 (m, 0.3H), 2.04 - 2.06 (m, 0.4H), 2.02 - 2.03 (m, 0.2H), 1.79 (s, 2.1H), 1.74 (s, 0.9H)  **$^{13}C$  NMR (Acetone, 126MHz):**  $\delta$  (ppm) 161.7, 161.1, 160.3, 159.7, 154.0, 153.9, 142.4, 142.2, 138.6, 138.3, 132.7, 132.6, 130.2, 129.8, 124.7, 124.6, 123.8, 119.9, 119.4, 117.2, 117.1, 117, 116.9, 104.9, 103.2, 101.8, 100.4, 43.7, 41.9, 36.6, 36.2, 28.0, 27.1

**HRMS (ESI,m/z) :** calc for  $C_{19}H_{16}N_3O_4$   $[M+H]^+$  350,11354; found 350.11358

**129 : 4-Hydroxy-3-(1-(4-((5a*R*,6*S*,6a*S*)-6-(hydroxymethyl)-5,5a,6,6a,7,8-hexahydrocyclopropa[5,6]cycloocta[1,2-*d*][1,2,3]triazol-1(4*H*)-yl)phenyl)-3-oxobutyl)-2H-chromen-2-one** $C_{29}H_{29}N_3O_5$  - Mw = 499.6 g/mol

**122** (1 eq., 100 mg, 0.286 mmol) and BCN (4.65 eq., 200 mg, 1.33 mmol) were dissolved in DMSO (1 mL). The reaction was stirred at rt overnight and purified directly by preparative HPLC to give the desired compound (143 mg, 0.286 mmol, qtt) as a white powder.

**$^1H$  NMR (MeOH- $d_4$ , 400 MHz):**  $\delta$  (ppm) 7.98 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.66 (q,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.50 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.32 - 7.45 (m, 4H), 4.22 - 4.31 (m, 1H), 3.63 - 3.73 (m, 2H), 3.13 - 3.24 (m, 1H), 2.90 - 3.06 (m, 2H), 2.71 - 2.79 (m, 1H), 2.68 (s, 2H), 2.45 -

2.56 (m, 1H), 2.14 - 2.34 (m, 2H), 1.79 (s, 2H), 1.59 - 1.75 (m, 3H), 1.13 - 1.24 (m, 1H),  
0.99 - 1.12 (m, 2H) <sup>13</sup>C NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 101 MHz): δ (ppm) 232.4, 161.8, 154.3,  
148.1, 135.7, 133.4, 132.9, 130.2, 129.8, 127.3, 126.8, 125.5, 124.3, 117.7, 117.5, 110.9,  
101.1, 59.8, 44.0, 40.6, 37.0, 27.9, 27.0, 26.5, 24.6, 23.6, 23.2, 22.4, 21.0, 20.6

HRMS (ESI,m/z) : calc for C<sub>29</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 500,21800; found 500.21926

# Biological Experimental Part

## Instrumentation

**Infra-red Imaging System** : Li-Cor Odyssey

**Centrifugation** : Centrifuge Br4i Jouan with S40 mobile rotor.

## Synthèse de sondes d'affinité pour l'étude en protéomique chimique de topoisomérase II

**DNA relaxation assay** 100 ng of negatively supercoiled DNA (pUC19) are added to 250 ng of Top2 in a media containing 50 mM Potassium Acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM Magnesium Acetate, 1 mM DTT, 1 ng BSA. The probes are added with a final volume of DMSO of maximum 3 %. The reaction is triggered by the addition of 1 mM ATP, and the reaction mixture is incubated for 20 min at 37 °C. The reaction is stopped by addition of bromophenol blue and loaded on a 0.8 % agarose gel (Tris Borate EDTA 1X), and the migration was run for 3 h at 4.5 V/cm. The gel is then colored by ethidium bromide at 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  during 15 min, and scanned with a Typhoon 8600 apparatus.

**Cell culture** HeLa cells were purchased from European Collection of Cell Culture. Cells were cultured in Eagle medium supplemented with 10 % FCS and 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Gentamicin. Cells were expanded to maximal  $1.05 \times 10^6$  cells/ml. Cells were harvested by centrifugation for 20 min at 210 g.

RSA4;11 cells came from Dr. Preudhomme (Laboratoire d'Hématologie du CHU de Lille). Cells were cultured in RPMI1640 pH 7.25 supplemented with 10 % FCS, 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Gentamicin, 0.21 % Penicillin, 0.1 % Streptomycin and 2 % bicarbonate. Cells were expanded to maximal  $8.8 \times 10^5$  cells/ml. Cells were harvested by centrifugation for 20 min at 210 g.

Calu-1 cells came from Dr. W.E.C Bradley (Institut du Cancer de Montréal). Cells were cultured in MEM $\alpha$  medium (InVitrogen) supplemented with 10 % FCS and 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Gentamicin. Cells were expanded to maximal  $7.8 \times 10^5$  cells/ml (80 % confluence). They harvested by cell scraping and centrifugation for 10 min at 210 g.

**Preparation of cell lysate** Frozen cells were homogenized in purification buffer (20 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 % Tween 20) with 20 mM Sodium Fluorure and 1 mM Sodium Orthovanadate. One complete EDTA-free protease inhibitor tablet (Roche) per 25 ml, 100 U of DNase I and 100  $\mu$ g of RNase A per gram of cell were added. The sample was lysed by sonication (Bioblock scientific vibracell 72412, small probe, 35 % amplitude, 3 runs of 45s, 0.5s on/0.5s off) and then kept rotating for 25 min at 4 °C. Lysate was spun for 1 hr at 100 000 g at 4 °C. Protein concentration of supernatant was determined by Bradford assay (BioRad).

**Pulldown assay** 200  $\mu$ l of Pierce Streptavidin magnetic beads (ThermoFisher n°E364K5) were functionalized in purification buffer (20 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 % Tween 20) with 20 nmol of probe Doxo-HAZA-biotine (10 mM) by incubation at rt for 1,5 h-2 h. 5 mg of cell extract was then applied on beads and incubated for 1 h at 4 °C. After washes with purification buffer, proteins were eluted by adding 100  $\mu$ l of sodium dithionite 5 mM in purification buffer w/o Tween 20 at pH 7.2. For MS analysis, eluate was concentrated by speedvac and finally resuspended in sample buffer (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4.6 % SDS, 20 % glycerol, 0.1 % bromophenol blue, 100 mM DTT).

**Protein visualization** Controls taken during the purification and 1/10th of the eluate (before speedvac) were mixed to 10  $\mu$ l of sample buffer. Proteins were separated by SDS-PAGE on 10 % polyacrylamide gel at 200 V for 45 min in Tris-Glycine buffer. Gel was first stained with Coomassie blue then with silver nitrate.

**Sample preparation for MS** Proteins were separated by SDS-PAGE on 4-12 % Invitrogen NuPAGE gel at 180 V for 6 min in MES buffer. Gel was stained SimplyBlue SafeStain (Invitrogen) according to manufacturer's instruction.

**NanoLC-nanoESI/MS-MS analysis** Mass spectrometry analyses were performed on an Orbitrap Elite instrument (Thermo Scientific) with nanoESI source interfaced to a nanoLC system (Ultimate 3000 RSLCnano System, Thermo Scientific).

## Développement d'un nouveau lien clivable pour des applications en protéomique chimique

**General pulldown procedure on purified protein** 50  $\mu$ L of magnetic streptavidine beads (Pierce 10 mg/mL) were separated using magnetic separator and washed three

times with purification buffer (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Tween20 0.1%). Then the magnetic beads were incubated with a solution of affinity probe (2.5 μM in purification buffer, stock solution 10 mM in DMSO) for 1 h at rt. Functionalized beads were washed three times with purification buffer and incubated with purified proteins (2-6 μg) in purification buffer. After 1 h of incubation at 4 °C, the excess protein was removed and the beads were washed three times with purification buffer to remove unspecific bound proteins. The resulting magnetic beads were suspended in 30 μL of cleavage solution (5 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> in 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH9) for 15 min. The supernatant was collected and treated with 5X SDS sample buffer. Streptavidine beads were then resuspended in purification buffer and boiled with SDS sample buffer for 5 min at 90 °C. Samples were loaded onto a 10% SDS-PAGE gel and subjected to electrophoresis afterwards the proteins were detected by Coomassie gel staining.

**General binding procedure on purified protein** The proteins were incubated with the desired affinity probe for 30 min and then boiled with SDS sample buffer for 5 minutes at 90 °C. Samples were loaded onto a 10% SDS-PAGE gel and subjected to electrophoresis. They were transferred in 2 h (4 °C, 60 V) from the gel onto a nitrocellulose membrane by an electro transfer method in a solution of 20% ethanol and 10% 10XTG-SDS. The membrane was washed three times with PBS-tween-triton-BSA and was then incubated with Streptavidine-Alexafluor 680 (1/20000) for 1 h at rt. The membrane was washed three times with PBS-tween-triton-BSA, retained in water and revealed on the Odyssey.

## Elimination d'une drogue circulante dans le sang par réaction de click

**General procedure for the preparation of plasma sample for HPLC** To a 20 μL sample of plasma is added 80 μL of acetonitrile. The tube is then centrifugated for 7 min at 4000 rpm. The supernatant is then filtered on 0.45 μm syringe filter and injected on HPLC.

**General procedure for animals experiments** Male mice raised on mixed genetic background 50 % 129SVpass x 50 % C57BL6J were used for tests. All mice were housed in 7 am - 7 pm light/dark cycle in individually ventilated cages (Tecniplast, Italy). Food and water were freely available. For testing anticoagulant activity of warfarin and its analogues, the compounds were suspended in 1 % saline solution of methylcellulose and administrated per os (gavage) two times before carrying out the test. The first treatment was carried out in the morning, 24 h before the second treatment and mice were sacrificed for blood collection at different intervals after the second treatment. Blood collection was carried out by intra-cardiac puncture in mice which were killed by CO<sub>2</sub> inhalation

immediately after respiratory arrest. To prevent coagulation, a 10 % solution of sodium citrate was immediately added to blood sample to obtain final concentration of 1 % and samples were centrifuged at room temperature minimum 10 min later. For HPLC analyses of bioavailability of selected compounds, 40  $\mu$ l blood samples were collected from tail vein in immobilised mice at selected time intervals as indicated in the text.

## Références Bibliographiques

1. Schellinger, J.G.; Danan-Leon, L.M.; Hoch, J.a.; Kassa, A.; Srivastava, I.; Davis, D.; Gervay-Hague, J.  
Synthesis of a trimeric gp120 epitope mimic conjugated to a T-helper peptide to improve antigenicity.  
*J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3230–3233.
2. Leriche, G.; Budin, G.; Brino, L.; Wagner, A.  
Optimization of the Azobenzene Scaffold for Reductive Cleavage by Dithionite; Development of an Azobenzene Cleavable Linker for Proteomic Applications.  
*European J. Org. Chem.* **2010**, *1*, 4360–4364.
3. Huang, S.I.; Swern, D.  
Oxidation of Long-chain and Related Alcohols to Carbonyls by Dimethyl Sulfoxide “Activated” by Oxalyl Chloride’.  
*J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2480–2482.
4. Hasinoff, B.B.; Chee, G.L.; Day, B.W.; Avor, K.S.; Barnabé, N.; Thampatty, P.; Yalowich, J.C.  
Synthesis and biological activity of a photoaffinity etoposide probe.  
*Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1765–1771.
5. Bjelic, S.; Nivon, L.; Baker, D.  
Computational design of enone-binding proteins with catalytic activity for the Morita–Baylis–Hillman reaction.  
*ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 749–757.
6. Pastorin, G.; Wu, W.; Wieckowski, S.; Briand, J.P.; Kostarelos, K.; Prato, M.; Bianco, A.  
Double functionalization of carbon nanotubes for multimodal drug delivery.  
*Chem. Commun. (Camb).* **2006**, *1*, 1182–1184.
7. Mancilla, T.; Canillo, L.; Zamudio-Rivera, L.S.; Beltran, H.I.; Farfh, N.  
Synthesis and characterization of piperazine-2, 6-diones.  
*Org. Prep. Proced. int.* **2002**, *34*, 87–94.
8. Sapountzis, I.; Knochel, P.  
A general amination method based on the addition of polyfunctional arylmagnesium reagents to functionalized arylazo tosylates.  
*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 897–900.



9. Jung, M.E.; Ouk, S.; Yoo, D.; Sawyers, C.L.; Chen, C.; Tran, C.; Wongvipat, J. Structure-activity relationship for thiohydantoin androgen receptor antagonists for castration-resistant prostate cancer (CRPC). *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2779–2796.
10. Menear, K.A.; Adcock, C.; Boulter, R.; Cockcroft, X.I.; Copsey, L.; Cranston, A.; Dillon, K.J.; Drzewiecki, J.; Garman, S.; Gomez, S.; Javaid, H.; Kerrigan, F.; Knights, C.; Lau, A.; Loh, V.M.; Matthews, I.T.W.; Moore, S.; O'Connor, M.J.; Smith, G.C.M.; Martin, N.M.B. 4-[3-(4-cyclopropanecarbonylpiperazine-1-carbonyl)-4-fluorobenzyl]-2H-phthalazin-1-one: a novel bioavailable inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6581–6591.
11. Wang, J.; Uttamchandani, M.; Sun, L.P.; Yao, S.Q. Activity-based high-throughput profiling of metalloprotease inhibitors using small molecule microarrays. *Chem. Commun. (Camb)*. **2006**, *1*, 717–719.
12. Marom, H.; Miller, K.; Bechor-Bar, Y.; Tsarfaty, G.; Satchi-Fainaro, R.; Gozin, M. Toward development of targeted nonsteroidal antiandrogen-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid-gadolinium complex for prostate cancer diagnostics. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6316–6325.
13. Koniev, O. Development of new bioselective ligation reactions. PhD thesis, Université de Strasbourg, 2014.
14. Zumbansen, K.; Döhring, A.; List, B. Morpholinium Trifluoroacetate-Catalyzed Aldol Condensation of Acetone with both Aromatic and Aliphatic Aldehydes. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 1135–1138.

## Développements en chimie bioorthogonale pour des applications en protéomique chimique et en pharmacocinétique

### Résumé

Ce travail a consisté en la synthèse d'outils chimiques et au développement de leurs applications biologiques. Dans un premier temps, des sondes pour l'étude de la Topoisomérase IIA humaine ont été synthétisées. Ces sondes ont alors été testées sur lysat cellulaire pour la capture des protéines présentant une affinité pour ces médicaments. Dans un second temps, un nouveau lien clivable en conditions non dénaturantes pour des applications en protéomique chimique a été développé. Ainsi, après optimisation de la structure, il a été intégré au sein d'une sonde d'affinité pour évaluer sa capacité de capture et libération de la PARP 1. Enfin, la réaction de click entre un azoture et un cyclooctyne a été appliquée à l'élimination d'une drogue circulante dans le sang. Après l'étude cinétique de la réaction, l'activité biologique et la pharmacocinétique des différents composés ont été évaluées pour optimiser la réaction de click *in vivo*.

**Mots-clés** : chimie bioorthogonale, protéomique chimique, lien clivable, Topoisomérase II, SPAAC, anticoagulant, pharmacocinétique.

### Summary

The main goal of this work was to synthesize chemical tools and to develop their biological applications. In the first part, probes for the study of Topoisomerase II *via* chemical proteomic were synthesized. They were then used for pulldown experiments on cell lysats. In a second part, a new cleavable linker in non denaturing conditions was developed for chemical proteomic applications. After optimisation of the structure, it was incorporated in an affinity probe and tested for the pulldown of PARP 1. Finally, a click chemistry reaction, the SPAAC, was used to provoke the elimination of a circulating drug. After the study of the kinetic of the reaction, the biological activity and the pharmacokinetic of the different compounds were evaluated to optimise the click reaction *in vivo*.

**Keywords** : bioorthogonal chemistry, chemical proteomic, cleavable linker, Topoisomerase II, SPAAC, anticoagulant, pharmacokinetics.