Développement de nouvelles réactions de click séquentielles appliquées à la synthèse contrôlée par la cible d'inhibiteurs de protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer.

Alexis Lossouarn

▶ **To cite this version:**

Alexis Lossouarn. Développement de nouvelles réactions de click séquentielles appliquées à la synthèse contrôlée par la cible d'inhibiteurs de protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer.. Chimie thérapeutique. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMR078 . tel-03893943

HAL Id: tel-03893943
https://theses.hal.science/tel-03893943

Submitted on 12 Dec 2022

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

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

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Chimie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Développement de nouvelles réactions de click séquentielles appliquées à la synthèse contrôlée par la cible d'inhibiteurs de protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer

Présentée et soutenue par
Alexis LOSSOUARN

Thèse soutenue publiquement le 11 décembre 2020 devant le jury composé de		
Dr. Fabienne BURLINA	Directrice de recherche CNRS, Sorbonne Université, Paris 6	Rapportrice
Dr. Sébastien ULRICH	Chargé de recherche CNRS, ENSCM	Rapporteur
Dr. Laure HABERKORN	Directrice de la chimie de synthèse, Pôle d'Expertise Chimie à l'IdRS, Servier	Examinatrice
Pr. Jacques ROUDEN	Professeur, ENSICAEN	Examinateur
Dr. Cyrille SABOT	Chargé de recherche CNRS, Université de Rouen	Directeur de thèse
Pr. Pierre-Yves RENARD	Professeur, Université de Rouen	Co-directeur de thèse

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

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

ED 508 NC Normande de Chimie

Laboratoire Cobra

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Chimie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Développement de nouvelles réactions de click séquentielles appliquées à la synthèse contrôlée par la cible d'inhibiteurs de protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer

Présentée et soutenue par
Alexis LOSSOUARN

Thèse soutenue publiquement le 11 décembre 2020 devant le jury composé de		
Dr. Fabienne BURLINA	Directrice de recherche CNRS, Sorbonne Université, Paris 6	Rapportrice
Dr. Sébastien ULRICH	Chargé de recherche CNRS, ENSCM	Rapporteur
Dr. Laure HABERKORN	Directrice de la chimie de synthèse, Pôle d'Expertise Chimie à l'IdRS, Servier	Examinatrice
Pr. Jacques ROUDEN	Professeur, ENSICAEN	Examinateur
Dr. Cyrille SABOT	Chargé de recherche CNRS, Université de Rouen	Directeur de thèse
Pr. Pierre-Yves RENARD	Professeur, Université de Rouen	Co-directeur de thèse

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

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

ED 508 NC Normande de Chimie

Laboratoire Cobra

A ma famille, proche et élargie.

« Sois toujours comme la mer qui, se brisant contre les rochers, trouve toujours la force de recommencer. »

- *Jim Morrison*

« La chance aide parfois, le travail toujours. »

- *Proverbe Brahman*

« Ce qu'on sait, savoir qu'on le sait ; ce qu'on ne sait pas, savoir qu'on ne le sait pas : c'est savoir véritablement. »

- *Confucius*

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont au Docteur Cyrille Sabot, chargé de recherche au CNRS et directeur de ces travaux thèse, pour son encadrement de qualité, sa confiance et sa disponibilité sans bornes. Merci pour nos innombrables échanges et discussions de chimie, de stratégie de recherche et de rigueur scientifique qui m'ont fait grandir autant sur le plan professionnel que personnel.

Un très grand merci également au Professeur Pierre-Yves Renard, co-directeur de cette thèse, pour la très grande pertinence de ses conseils et de ses corrections pour le manuscrit, ainsi que les moments très conviviaux durant le congrès du RECOB.

Je tiens à exprimer ma plus sincère gratitude aux membres du jury, le Docteur Fabienne Burlina (Sorbonne Paris 6), le Docteur Sébastien Ulrich (ENSCM), le Docteur Laure Haberkorn (Servier) et le Professeur Jacques Rouden (ENSICAEN), pour l'honneur qu'ils m'ont fait en ayant accepté d'évaluer mes travaux de thèse au travers de ce manuscrit et de ma soutenance.

L'Agence Nationale de la Recherche (ANR) est vivement remerciée pour avoir financé ce projet de thèse.

Nous remercions également le Docteur Nachon et son équipe (IRBA) pour avoir fourni l'acétylcholinestérase, ainsi que le Professeur Laurent Joubert et le Docteur Vincent Tognetti (Université de Rouen-Normandie) pour les calculs théoriques.

Je souhaite exprimer mon immense gratitude et mes amitiés aux personnels de l'UMR pour leur aide et leur soutien, notamment Émilie P. (Dame ÉMEULYE) pour les nombreux conseils HPLC et pour ta bonne humeur contagieuse, Albert pour les HRMS, Marie H. pour les incalculables « Résa du HCT », Laurent C. pour la gestion des bugs informatiques et son humour toujours très à propos, Charles L. notre verrier MOF (merci pour la cafetière !), Corinne L. pour tes conseils en LC-MS, Françoise (« ça va mon grand ?? ») et Rabah A. pour ton aide sur les IC_{50} et pour ton humour. Je garde une place particulière pour MOman du labo, Laetitia B. (ou TiaTia, Tia² pour les intimes) sans qui tout ceci n'aurait pas été possible. Merci pour ta disponibilité infinie, ton acharnement pour faire fonctionner les machines qui refusaient de démarrer et ta rigueur (non non pas de dichlo dans l'HPLC…). Merci aussi pour

ta bonne humeur constante, ton rire et les failles spatiaux-temporelles quand le moral était dans le négatif !

Un immense merci également aux différents permanents, notamment Emilie D. de Chemforase pour ton humour qui décape (si si, on adore), Ludovic J. pour ta sympathie et ta bienveillance, Xavier F. pour nos discussions de plongée sous-marine, Stéphane L. pour ton humour et ton rire communicatif, Sébastien B. pour tes encouragements et tes imitations de Coluche et Alexandre H. pour ta bienveillance. Enfin un grand merci Thibault G. pour ton savoir encyclopédique en spectroscopie et ton humour toujours bien placé. Merci également à Patricia, notre Tata du labo, pour ton amitié et ton soutien (et surtout pour m'avoir supporté pendant trois ans à chanter dans le labo, vraiment, bravo).

Le jour où l'on arrive quelque part, on est toujours le petit nouveau. Aujourd'hui je suis grand, mais j'ai une grande pensée pour les anciens qui m'ont accueilli à mon arrivée : Kévin R. pour les bons fous rires et nos collaborations sur certains projets, Wilfried (Wiwi, l'homme au grand cœur qui n'assumait jamais ses blagues), Morgane D. (pardon mais j'aimais vraiment trop gratter la verrerie avec toi à côté…), Samuel A., Gromain « Mouglof » (« Eh le moche tu viens manger avec nous ? », et puis tes vannes vraiment nulles et les soirées jeux de société), Dorra G., Kathleen S., Pierrick B. (choupinou), Batoul R., Mahmoud H. (« Monsieur bonjour »), Speedy (« Salut beauté »)… Merci à Maxime M. pour son amitié et les nombreuses soirées passée chez lui au coin du feu ou les randos Normandes, à Margot B. pour les échanges de motivation durant ces trois années pas toujours faciles (enfin on a essayé quoi !) et Sandra S. pour sa bonne humeur et sa gaieté en titane. Une grande pensée pour Axel F. mon sacré voisin de paillasse et Agathe B. (« l'embuscade ça fait très mal … »). Un très grand merci à Madeleine C. pour m'avoir supporté pendant deux ans, son amitié et pour sa réceptivité musicale (« Et là, plus de munitions ! »), Steven V. avec qui les débats étaient toujours fournis et les parties de Catan, Mélissa G. (équipe Servier !), Rita E. H. (merci pour le repas Libanais !), Victor F. (vivement la crémaillère …) et Mathieu C. le petit nouveau (« Eh mais il est encore là lui ? »). Bon courage à Chloé P. qui me succède, et mes excuses à ceux que j'aurais pu oublier !

Un immense merci à Jacques et Françoise pour leur soutien et pour m'avoir accepté dans leur cercle familial, tout en partageant les plaisirs de la montagne et de la mer. Merci à Julie et Adeline pour leur complicité et pour partager Solène avec moi ! Merci à Patrick (mon meilleur colocataire !) pour ton amitié et ton enseignement de blagues pas toujours

catholique depuis fort longtemps. Merci à Matthieu et Emmanuelle B. pour les bons moments partagés et leur soutien.

Je pense à mes grands-parents, qui ont joué un grand rôle dans mon éducation et que je remercie pour cet apprentissage de la vie. Merci à mon frère, Mattéo, et mes sœurs, Emma et Lalie-Rose, pour leur complicité et les bons moments que nous passons à chaque retrouvaille. Je vous souhaite de trouver une voie qui vous permette de vous épanouir, comme j'ai pu trouver la mienne. Je garde une place particulière pour mes parents et leur soutien indéfectible dans mes projets et ma vie. Je ne serais certainement pas arrivé où je suis aujourd'hui sans vos encouragements. L'enfant qui ne voulait pas continuer l'école après quelques jours de CP est finalement devenu l'homme qui a mis un point final à ce manuscrit de thèse, qui quelque part, est également un peu le vôtre et je vous en suis éternellement reconnaissant.

Je tiens enfin à te remercier, Solène, de partager ma vie depuis ces dernières années et pour ton soutien quotidien. J'espère que notre route ensemble, accompagnée par notre petite Ola, sera encore longue et riche en bons moments à partager, quelle que soit la destination où tout cela nous mène. Même si c'est une route longue et sinueuse, je te souhaite que ta thèse t'enrichisse autant que la mienne m'a fait grandir.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS ... 1

SOMMAIRE ... 5

ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES ... 13

PRÉAMBULE ... 17

CHAPITRE I ... 21

INTRODUCTION GÉNÉRALE ET OBJECTIFS ... 21

I – De la découverte de molécules actives au développement de nouveaux médicaments ... 23

1.1. Les grandes phases de développement d'un médicament ... 24

1.2. Description générale du processus de recherche exploratoire ... 26

1.3. Répartitions des grandes classes de cibles thérapeutiques ... 28

1.3. Les approches classiques de chimie combinatoire et de criblages à haut débit ... 29

1.3.1. Criblages à haut débit (High–Throughput Screening, HTS) ... 29

1.3.2. Principe de la chimie combinatoire ... 31

1.4. Conception de médicament par la méthode des fragments (*Fragment-Based Drug Discovery*, FBDD) ... 34

1.5. Synthèse contrôlée par la cible de molécules actives (*Target-Guided Synthesis*) ... 37

1.5.1. La chimie combinatoire dynamique (Dynamic Combinatorial chemistry, DCC) ... 38

1.5.1.1. Principe de la DCC ... 38

1.5.1.2. Réactions dynamiques éligibles en DCC ... 40

1.5.1.3. Exemples d'applications de la DCC ... 42

1.5.2. Le criblage par couplage dynamique (Dynamic Ligation Screening, DLS) ... 45

1.5.2.1. Principe de la DLS ... 45

1.5.3. La synthèse guidée par la cible sous contrôle cinétique (Kinetic Target-Guided Synthesis, KTGS) ... 49

1.5.3.1. Principe et historique de la KTGS ... 49

1.5.3.2. Domaines thérapeutiques ciblés et cibles biologiques impliquées en KTGS ... 54

1.5.3.3. Les réactions décrites en KTGS[59,] ... 56

A - Formation de liaisons C-N ... 59

B - Formation de liaisons C-C ... 79

C - Formations combinées de liaisons C-C et C-N ... 83

D - Formation de liaison C-S ... 91

II – Enjeux en KTGS et objectifs des travaux de thèse ... 98

2.1. Enjeux et progrès en KTGS ... 98

2.1.1. Les limitations de la stratégie de KTGS ... 98

2.1.2. Les innovations en KTGS ... 99

2.1.2.1. Réaliser des expériences de KTGS en milieux complexes ... 99

2.1.2.2. Différents formats d'expériences de KTGS ... 101

2.1.2.3. Miniaturisation de systèmes automatiques et emploi de la microfluidique ... 104

2.1.2.4. Augmentation artificielle du pouvoir catalytique de la cible ... 106

2.1.2.5. Emploi de cibles mutantes ... 107

2.1.2.6. Progrès des techniques analytiques ... 109

2.1.2.7. Développement de nouvelles réactions en KTGS ... 110

2.2. Objectifs des travaux de thèse ... 115

2.2.1. Stratégie de « Click & Fish » : développement de nouvelles réactions séquentielles ... 115

2.2.1.1. De la ligation chimiosélective vers la KTGS : étude de réactions de Diels-Alder séquentielles ... 115

2.2.1.2. Formation et réactivité de nouvelles fonctions ... 116

2.2.2. Développement de sondes chimiques pour l'amplification du signal en spectrométrie de masse ... 117

2.2.3. Étude d'une nouvelle réaction éligible en KTGS ... 118

CHAPITRE II ... 119

ETUDE DE RÉACTIONS DE DIELS-ALDER A PARTIR DE MALÉIMIDES EN LIGATION CHIMIOSÉLECTIVE ET EN VUE D'APPLICATIONS EN KTGS ... 119

I – La réaction de Diels-Alder ... 122

1.1. Rappels et généralités ... 122

1.2. Le contrôle orbitalaire et la stéréochimie de la CDA ... 123

1.2.1. La demande électronique ... 123

1.2.2. Régiosélectivité de la CDA ... 124

1.2.3. Stéréosélectivité de la CDA ... 125

1.2.4. Paramètres influents la sélectivité et la cinétique de CDA ... 126

II – Emploi des maléimides et tétrazines en bioconjugaison et en ligation chimiosélective ... 130

2.1. Réactivité des maléimides ... 130

2.1.1. Généralités ... 130

2.1.2. Les maléimides en bioconjugaison ... 131

2.1.3. Les maléimides comme diènophiles en ligations chimiosélectives ... 134

2.1.4. Application dans le domaine de la catalyse biomoléculaires ... 136

2.2. Réactivité des tétrazines ... 137

2.3. Objectifs du projet ... 141

III – Résultats et discussions 143
3.1. Préparation et étude des réactifs 143
3.1.1. Sélection des dienes et synthèse des partenaires non-commerciaux 143
3.1.2. Étude de la stabilité des dienes synthétisés 148
3.1.3. Préparation des partenaires maléimides 150
3.2. Études et mesures cinétiques 152
3.2.1. Étude comparative qualitative des cinétiques réactionnelles 152
3.2.2. Étude comparative quantitative des cinétiques réactionnelles 155
3.2.2.1. Rappels théoriques de cinétique chimique simple 156
3.2.2.2. Mesures des constantes cinétiques k_2 158
A – Calibration interne et mesure du k_2 par spectroscopie de fluorescence 160
B – Calibrations interne et externe puis mesures des k_2 par HPLC 161
C – Bilan des cinétiques réactionnelles des CDA 163
3.3. Études stéréochimiques et de stabilité des cycloadduits 168
3.3.1. Synthèse et évaluation stéréochimique 168
3.3.2. Étude de la stabilité des cycloadduits 172
3.3.2.1. Réversibilité de la CDA en conditions physiologiques 172
3.3.2.2. Stabilité chimique des cycloadduits en milieu biologique 176
3.4. Étude de combinaisons de ligations chimiosélectives 177
3.4.1. Sélectivité par la différenciation cinétique 178
3.4.2. Exploration de nouvelles combinaisons de réactifs et des compatibilités chimiques entre les dienes et différents réactifs communs de ligation 180
IV – Conclusion 185
CHAPITRE III 193
ÉTUDE DE NOUVELLES SONDES CHIMIQUES HAUTEMENT DÉTECTABLES PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE OU PAR SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE POUR LE MARQUAGE DES LIGANDS EN KTGS. 193
I – La maladie d'Alzheimer et les cibles thérapeutiques 196
1.1. La maladie d'Alzheimer 196
1.1.1. Généralités et chiffres clés 196
1.1.2. Symptômes et caractéristiques de la maladie 197
1.1.3. Physiopathologie de la MA et les différents mécanismes suspectés 199
1.1.3.1. L'hypothèse cholinergique 199
1.1.3.2. Hypothèse de la cascade amyloïde 202
1.1.3.3. Autres hypothèses d'études 204
1.2. L'acétylcholinestérase (AChE) 206

1.2.1. Fonction et occurrence biologique de l'AChE 206

1.2.2. Structure et activité de l'AChE 207

1.2.3. Les inhibiteurs de l'AChE 213

1.2.3.1. Les d'inhibiteurs irréversibles 213

1.2.3.2. Structures d'inhibiteurs réversibles 214

1.2.3.3. Les ligands découverts en KTGS 217

1.3. Objectifs du projet 217

II – Stratégie de pré-marquage des fragments et d'amplification de signaux MS via une réaction bio-orthogonale 220

2.1. Les sondes moléculaires en spectrométrie de masse 220

2.1.1. La spectrométrie de masse : quelques rappels 220

2.1.2. Amas isotopiques caractéristiques 222

2.1.3. Augmentation artificielle de l'intensité du signal 224

2.2. Pré-marquage des fragments réactifs par la fonction azoture 229

2.3. De la réaction de Staudinger à la ligation de Staudinger-Bertozzi 231

2.3.1. Réaction classique de Staudinger et ses intermédiaires associés 231

2.3.2. Modifications dans le cadre de la ligation bioorthogonale 234

2.4. Découverte et études d'iminophosphoranes stables comme amplificateurs de signaux MS 237

2.4.1. Premières observations MS 237

2.4.2. Recherche d'un partenaire phosphine 241

2.4.2.1. Étude de solubilité 243

2.4.2.2. Étude qualitative des cinétiques de formation d'iminophosphoranes 243

2.4.2.3. Étude de la stabilité des iminophosphoranes 246

2.4.3. Synthèses de précurseurs azoture et exemplification structurale des iminophosphoranes 247

2.4.3.1. Préparations à partir de précurseurs d'azotures 247

A – Préparation de précurseurs nitrés 247

B – Réductions en anilines 249

C – Préparation d'autres précurseurs 250

2.4.3.2. Préparation des azotures aromatiques 251

A – Préparation d'azotures aromatiques par réactions de diazotation et de substitution nucléophile aromatique 251

B – Préparation d'azotures aromatiques par réactions de substitution nucléophile aromatique 253

C – Préparation d'azoture aliphatique par substitution nucléophile 254

2.4.3.3. Exemplification des aminophosphoniums 254

2.4.4. Études approfondies des iminophosphoranes/aminophosphoniums 256

2.4.4.1. Études de stabilités 256

2.4.4.2. Détermination du p*K*a du couple aminophosphonium/iminophosphorane 256

2.4.4.3. Limites de détection et de quantification analytiques par LC-MS 259

2.4.4.4. Étude de marquage à basses concentrations 261

2.5. Préparation d'une nouvelle sonde de la classe des phosphoniums 262

2.5.1. Préparation d'un phosphonium fonctionnalisable 262

2.5.2. Préparation de la fonction bicyclononyne 263

2.5.3. Synthèse de la sonde d'amplification MS 264

2.5.4. Tests de réactivité et de détectabilité 264

2.6. Synthèse des précurseurs et des ligands pour réaliser la KTGS en présence de l'AChE ... 266

2.6.1. Préparation des fragments précurseurs 266

2.6.1.1. Synthèse de la tacrine fonctionnalisée par un azoture 266

2.6.1.2. Synthèse du partenaire PIQ fonctionnalisé par un alcyne terminal 267

2.6.2. Préparation des ligands par voies chimiques 268

2.6.2.1. Préparation des ligands 1,4-triazole (*trans*) 268

2.6.2.2. Préparation des ligands 1,5-triazole (*syn*) 270

III – Stratégie de « *Click & Fish* » : étude d'une séquence réactionnelle impliquant la formation d'un motif pyrazolone en vue de marquer spécifiquement le ligand formé *in situ* 272

3.1. La fonction pyrazolone 272

3.1.1. Structure et généralités 272

3.1.2. Réactivité des pyrazolones 274

3.1.3. Synthèse d'une pyrazolone modèle 275

3.2. Recherche d'une fonction réactive complémentaire pour l'élaboration d'une sonde pro-fluorescente 277

3.2.1. Synthèse 278

3.2.1.1. Préparation de la sonde **HELIOS 400H**[417(a)] 278

3.2.1.2. Préparation de la sonde **S7**[423] 279

3.2.2. Étude comparative des différentes sondes pro-fluorescentes 279

3.2.3. Tests complémentaires 281

3.3. Préparation des fragments réactifs pour la KTGS 283

*3.3.1. Préparation du partenaire tacrine-hydrazine **179*** 284

*3.3.2. Préparation du partenaire PIQ comprenant un motif β-cétoester **178*** 286

3.3.2.1. Exploration de la voie **A** 286

3.3.2.2. Exploration de la voie **B** 287

IV – Conclusion 289

CHAPITRE IV 293

ÉVALUATION DE LA RÉACTION DE THIOL-YNE EN KTGS ET ÉTUDE DE NOUVEAUX LIGANDS FLUORESCENTS PHOTOISOMÉRISABLES 293

I – L'anhydrase carbonique II 296

1.1. Généralités 296

1.1.1. Occurrences biologiques et fonctions des anhydrases carboniques 296

1.1.2. Structure de la CAII et mécanisme d'action 297

1.2. Implications et rôles des α-CA dans diverses pathologies 301

1.2.1. Premières applications thérapeutiques 301

1.2.1.1. Les CAIs comme diurétiques 301

1.2.1.2. Le traitement du glaucome 302

1.2.1.3. Traitement du mal des montagnes et de la haute altitude 302

1.2.1.4. Implications de la CA II dans la croissance tumorale 303

1.2.1.5. Lutte contre l'obésité 304

1.2.1.6. Traitement de l'épilepsie 305

1.2.2. La CA II : une cible de plus en plus privilégiée contre la maladie d'Alzheimer 305

1.3. Développement et structures d'inhibiteurs 308

1.3.1. Les inhibiteurs commerciaux 309

1.3.2. Développement d'inhibiteurs sélectifs d'isoformes 310

1.3.3. Découvertes de ligands de la CAII par KTGS 311

II – Évaluation de la réaction de thiol-yne en KTGS 312

2.1. La réaction de thiol-yne : généralités 312

2.1.1. Préparations classiques d'éthers de thiovinyle 312

2.1.1.1. Emploi de catalyseurs, et d'acides de Lewis métalliques et de bases organiques ou minérales 312

2.1.1.2. Méthodes de synthèse par voies radicalaire 316

2.1.2. La thiol-yne en bioconjugaison 317

2.1.2.1. Alcynes terminaux non-activés par un groupement électroattracteur GEA 317

2.1.2.2. Alcynes terminaux activés par un groupement électroattracteur 319

2.1.2.3. Réaction de thiol-yne par effet « *template* » 323

2.2. Objectifs du projet 327

2.3. Vérification de la viabilité de la cible et de la reproductibilité de la littérature 328

2.3.1. Synthèse de fragments réactifs et de ligands de référence 329

2.3.1.1. Préparation des partenaires azotures 329
2.3.1.2. Préparation du partenaire alcyne 330
2.3.1.3. Préparation du ligand de référence 331
2.3.2. Détermination de la viabilité de la cible et de la reproductibilité de la littérature 331
2.4. Étude de la réaction de thiol-yne : de la méthodologie à la KTGS 334
2.4.1. Préparation de librairies chimiques 334
2.4.2.1. Sélections et préparations des partenaires thiols 335
2.4.2.2. Sélections et préparations des partenaires alcynes terminaux 336
2.4.2. Optimisation de la réaction de thiol-yne pour la préparation des références synthétiques 339
2.4.3. Criblage de KTGS par la réaction de thiol-yne 343
2.4.4. Étude de stabilité en milieux physiologique des ligands de KTGS et d'un analogue thioéther 352
2.4.5. Mesure des valeurs d'IC_{50} 356
III – Études des propriétés de photoisomérisation et de fluorescence des ligands de KTGS 361
3.1. La photoisomérisation 361
3.1.1. Définition et rappels 361
3.1.2. Les principales fonctions chimiques photoisomérisables 362
3.1.3. Principe général de photoisomérisation des azobenzènes 363
3.1.4. Application au design de nouveaux ligands de la CA II à activité modulable par photoisomérisation 365
*3.1.5. Étude de la photoisomérisation des ligands **235*** 367
3.1.5.1. Acquisitions des spectres UV 367
3.1.5.2. Effet du solvant 368
3.1.5.3. Choix de la source lumineuse et de la température 370
3.1.5.4. Contrôle de la dégradation du ligand sous irradiation lumineuse 371
3.1.5.5. Effet des longueurs d'ondes d'excitation 372
3.1.5.6. Suivi cinétique de la photoisomérisation et effet de la concentration 374
3.1.5.7. Test de réversibilité par activation thermique 375
3.2. Étude des propriétés de fluorescence des ligands 235 376
*3.2.1. Caractérisations spectroscopiques des ligands **235** Z* et *E* 376
*3.2.2. Emploi des ligands **235** Z et E comme sonde iFRET de la bCA II* 381
IV – Conclusion 386
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 389
PARTIE EXPÉRIMENTALE 401

ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

Å	Ångström
A	Absorbance
Ach	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIBN	Azobisisobutyronitrile
AMK	Anti-Markovnikov
ARN	Acide ribonucléique
ATZ	Acétazolamide
*b*CA II	Anhydrase carbonique II bovine
BCN	Bicyclononyne
BioCn	Bioconjugaison
BSA	*Bovin Serum Albumin*
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDI	1,1'-carbonyldiimidazole
Ch	Choline
CuAAC	Cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre
DABCO	1,4-diazacyclo[2.2.2]octane
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène
DCC	*Dynamic Combinatorial Chemistry*
DCE	Dichloroéthane
DCM	Dichlorométhane
DEHP	Phtalate de bis(2-diéthylhexyle)
DEI	Demande Électronique Inverse
DEL	Diode électroluminescente
DEN	Demande Électronique Normale
DIAD	Diisoazodicarboxylate
DIPEA	Di-*iso*-propylamine
DLS	*Dynamic Ligation Screening*
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPAP	2,2-diméthoxy-2-phénylacetophénone
DRX	Diffraction des rayons X
EC	*Enzyme Commission number*
EDCI.HCl	Chlorhydrate de *N*-éthyl-N'-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide)
E_{FRET}	Efficacité de transfert par FRET

EIC	*Extracted ion chromatography*
ESI	*Electrospray ionization*
ESIPT	*Excited State Intramolecular Proton Transfer*
FA	Fluorophore Accepteur
FBDD	*Fragment-Based Drug Discovery*
FD	Fluorophore Donneur
FDA	*Food and Drug Administration*
fM	Femtomolaire
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbonyle
FRET	*Förster resonance energy transfer*
g	gramme
GEA	Groupement électro-accepteur
GED	Groupement électro-donneur
GSH	Glutathion
h	Heure
HPLC	*High performance liquid chromatography*
HRMS	*High resolution mass spectrometry*
ICP	Plasma à couplage inductif
ICT	*Internal charge transfe*r
iFRET	*Intrinsic Förster Resonance Energy Transfer*
IR	Infra-rouge
kDa	kilo-Dalton
KTGS	*Kinetic Target-Guided Synthesis*
k_2	Constante cinétique du second ordre
LB/C	Ligation bioorthogonale/chimiosélective
LDD	Limite De Détection
LDQ	Limite De Quantification
min	Minute
MK	Markovnikov
mM	Millimolaire
MRM	*Multiple reaction monitoring*
MS	*Mass spectrometry*
m/z	Rapport de masse par l'état de charge
NAC	*N*-acétylcystéine
NaAsc.	Ascorbate de sodium
NBS	*N*-Bromosuccinimide
NHS	*N*-hydroxysuccinimide
nm	Nanomètre
nM	Nanomolaire
PB	*Phosphate buffer*

PBS	*Phosphate-buffered salin*
PEG	Polyéthylène glycol
pM	Picomolaire
PNPA	Acétate de 4-nitrophényle
PSH	plasma sanguin humain
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
RPE	Résonnance paramagnétique électronique
RuAAC	Cycloaddition azoture-alcyne catalysée au ruthénium
Sat.	Saturé
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SPAAC	*Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloadditions*
t	Temps
T	Température
TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
TBD	1,3,4,6,7,8-Hexahydro-2H-pyrimido[1,2-a]pyrimidine
TBET	*Through-Bond Energy Transfer*
TBTA	Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl]amine
TEP	Tomographie à émission de positons
TeP	Transfert d'électron photoinduit
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétdrahydrofurane
TLC-MS	*Thin-layer chromatography coupled with mass spectrometry*
TMS	Triméthylsilyl
TOF	*Time of flight*
TSTU	Tétrafluoroborate de *N*,*N*,*N'*,*N'*-tétraméthyl-*O*-(*N*-succimidyl)uronium
u.a.	Unités arbitraires
Ub	Ubiquitines
UV	Ultra-violet
ZBG	*Zing-Binding Group*
µM	Micromolaire
δ_{Stokes}	Déplacement de Stokes
ε	Coefficient d'extinction molaire
λ	Longueur d'onde
λ_{abs}	Longueur d'onde maximum d'absorption
λ_{em}	Longueur d'onde d'émission
λ_{ex}	Longueur d'onde d'excitation
Φ_F	Rendement quantique
µW	Micro-ondes
°C	Degré Celsius

PRÉAMBULE

La recherche, le développement et la production de nouvelles molécules biologiquement actives, principalement dans le domaine pharmaceutique ou encore agrochimique, sont des enjeux majeurs et stratégiques d'actualité de notre société. Les coûts annuels dans le monde pour le développement de nouveaux médicaments se chiffrent en centaines de milliards d'euros, ne serait-ce qu'en incluant les sommes allouées à la R&D, aux essais cliniques et au marketing. De plus, la demande sociétale croissante sur ces domaines de recherche est importante et omniprésente, ce qui oblige les industries pharmaceutiques et les laboratoires académiques à innover techniquement mais aussi technologiquement. Ceci passe alors par la mise en place de nouvelles stratégies pour la découverte de molécules plus innovantes. De nouvelles méthodes comme la chimie combinatoire et les criblages à haut débit ont d'ailleurs été des avancées majeures, mais ne répondent cependant plus tout à fait aux exigences actuels, notamment du fait de leur coût élevé et de la complexité technique que celles-ci impliquent.

Afin de pallier ces paramètres critiques, de nouvelles approches ont vu le jour ces trois dernières décennies, comme les stratégies d'assemblage de fragments (*Fragment-Based Drug Discovery*, FBDD) ou de synthèse contrôlée par la cible (*Target-Guided Synthesis*, TGS). La synthèse contrôlée par la cible biologique sous contrôle cinétique (KTGS) repose sur l'emploi de la cible biologique elle-même (enzyme/protéine, protéines en interaction, récepteurs, G-quadruplex, ARN …) afin de catalyser la formation de son propre ligand, à partir de fragments possédant des fonctions réactives biocompatibles. Lors d'une expérience de KTGS, la formation de liaisons covalentes stables et irréversibles entre les fragments permet en une seule étape la synthèse et l'identification d'un ligand affin. Pour optimiser les chances de succès, et favoriser la réaction entre les deux fragments au sein de la cible, cette dernière doit posséder plusieurs sites d'interactions afin de favoriser le rapprochement des fragments présentant des affinités avec chacun de ces sites. Bien que les expériences de KTGS deviennent de plus en plus nombreuses dans la littérature, le nombre de réactions applicables à cette stratégie reste cependant limité à une poignée de réactions. En effet, les réactions éligibles doivent répondre à des critères exigeants imposés par les biomolécules, qui sont : (1) des vitesses de réaction très lentes en l'absence de la cible biologique, (2) être biocompatibles

(pH, solvant, températures, pression et présence de biomolécule) et (3) disposer de fonctions chimiques stables et biocompatibles, tout en étant capables de procéder dans des conditions aqueuses et douces. Il faut également disposer de moyens analytiques spectroscopiques puissants, permettant de confirmer ou non, et sans ambiguïté, la formation d'une liaison covalente, y compris à de très faibles concentrations. En effet, la non détection d'un composé d'intérêt est une source de faux négatif, pouvant conduire à l'échec du criblage.

Afin de répondre à ces défis, deux grands axes de recherche ont été imaginés dans le cadre de ces travaux de thèse :

1) Développer de nouvelles approches par réactions séquentielles (*via* deux stratégies distinctes), visant à augmenter la détectabilité des potentiels produits formés grâce à leur marquage par des sondes chimiques pour la spectrométrie de masse et/ou par émission de fluorescence

2) contribuer à l'élargissement de la gamme de réactions éligibles en KTGS en mettant au point une nouvelle réaction

Afin d'établir nos preuves de concepts pour la KTGS, deux enzymes bien connues de la littérature et souvent ciblées pour plusieurs pathologies ont été retenues. Il s'agit de l'acétylcholinestérase (AChE), une estérase du système synaptique, et l'anhydrase carbonique II (CA II), une métalloenzyme ubiquitaire de la famille des lyases. L'AChE est une cible privilégiée dans la lutte contre la maladie neurodégénérative d'Alzheimer, au même titre que la CA II, qui est également connue pour son implication dans de nombreuses pathologies comme le glaucome, divers désordre neurologiques, l'obésité ou encore divers types de cancers.

Les différents chapitres présentés dans ce manuscrit seront articulés de la manière suivante :

1) Le premier chapitre sera une présentation concise des différentes classes de TGS existantes. La KTGS étant au centre des travaux de cette thèse, une attention particulière sera portée à cette stratégie, ainsi qu'à la description des objectifs de ces travaux visant à répondre à ses limites.

2) Le deuxième chapitre portera sur l'étude de la réaction de Diels-Alder entre les maléimides et différentes familles de diènes biocompatibles. L'objectif sera d'une part de compléter les connaissances manquantes dans la littérature vis-à-vis de cette réaction de ligation chimiosélective, mais également d'étudier son éligibilité pour des applications en KTGS pour l'approche de réactions séquentielles dite de « Click & Fish ».

3) Le troisième chapitre sera focalisée sur l'étude de deux stratégies distinctes de marquages séquentiels des ligands formés lors d'expériences de KTGS, menées en présence de l'enzyme AChE. La première partie portera sur l'élaboration de nouveaux reporters chimiques pour la spectrométrie de masse, permettant la fonctionnalisation du ligand formé par la cible biologique grâce à une fonction discrète portée par ce dernier. La seconde partie sera basée sur la stratégie de « Click & Fish » mentionnée ci-dessus *via* l'emploi de sondes pro-fluorescentes, réagissant spécifiquement avec la fonction formée au sein de la cible biologique.

4) Enfin, le quatrième chapitre sera centré sur l'étude d'éligibilité de la réaction de thiol-yne en KTGS, en employant cette fois la CA II comme cible thérapeutique, ainsi que l'étude des propriétés de photoisomérisation et de fluorescence de nouveaux ligands.

Ces travaux de thèse ont été réalisés entre le 2 octobre 2017 et le 31 décembre 2020 au sein du laboratoire COBRA (UMR CNRS 6014) à l'Université de Rouen-Normandie, parmi l'équipe 2 de chimie bioorganique. Cette thèse a été dirigée par le Dr. Cyrille Sabot (chargé de recherche au CNRS) et le Pr. Pierre-Yves Renard (professeur des Universités). Ce projet a été financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) sous l'acronyme « Click_and_Fish » (2016-2020, ANR-16-CE07-0004 portée par le Dr. Cyrille Sabot).

Plusieurs collaborations ont permis le développement de ces projets. L'enzyme *m*-AChE a été fournie par l'équipe du Dr. Florian Nachon (Institut de Recherche Biomédicale des armées, Brétigny-sur-Orge, France). Mme Lætitia Bailly (INSA de Rouen et UMR 6014, Rouen, France) a apporté son expertise et son soutien technique pour les analyses par chromatographie liquide en phase inverse, couplée ou non à la spectrométrie de masse, et ceci sur l'ensemble des projets menés durant cette thèse. Le Dr. Kévin Renault (Institut de Chimie Moléculaire UMR 6302, Université de Bourgogne, Dijon, France) a apporté sa contribution lors de l'étude d'éligibilité de réactions de Diels-Alder (Chapitre II de ce

manuscrit). Le Pr. Laurent Joubert et le Dr. Vincent Tognetti (Université de Rouen-Normandie) ont apporté leur expertise en calculs théoriques et modélisation dans le cadre d'un projet présenté dans le chapitre IV. Les travaux étant toujours en cours, les résultats n'ont malheureusement pas pu être présentés dans ce manuscrit.

CHAPITRE I

INTRODUCTION GÉNÉRALE ET OBJECTIFS

La première partie de cette introduction fait un tour d'horizon sur les différentes étapes et stratégies de recherche en chimie médicinale, suivi par quelques rappels concernant la chimie combinatoire et le criblage à haut débit. Une description succincte de l'approche par fragment (*Fragment-Based Drug Discovery*, FBDD) sera apportée avant d'évoquer de manière plus détaillée les différentes méthodes de synthèse contrôlée par la cible biologique (*Target-Guided Synthesis*, TGS). Ces méthodes incluent (1) la chimie combinatoire dynamique (*Dynamic Combinatorial Chemistry*, DCC) et (2) le criblage par couplage dynamique (*Dynamic Ligation Screening*, DLS), tous deux menant à l'établissement de liaisons covalentes réversibles. Enfin, (3) la synthèse contrôlée par la cible sous contrôle cinétique (*Kinetic Target-Guided Synthesis*, KTGS), conduisant à la formation de liaisons covalentes irréversibles et faisant l'objet de ces travaux de thèse, sera décrite de manière plus approfondie.

Dans un deuxième temps, les enjeux et les limitations de la KTGS seront exposés, ainsi que les travaux décrits dans la littérature depuis les deux dernières décennies permettant d'y répondre en partie. Enfin, les objectifs des travaux de thèse seront exposés, de même que les stratégies qui ont été imaginées afin de répondre à ces objectifs.

I – De la découverte de molécules actives au développement de nouveaux médicaments

La recherche d'un médicament est toujours initiée par le besoin de traiter une maladie et est devenue une demande sociétale très forte. Que ce soient nos ancêtres ou bien les animaux, la consommation récurrente de ressources naturelles variées (plantes, algues, insectes, champignons, animaux …), au-delà des besoins nutritifs, résulte de la nécessité d'absorber des substances biologiquement actives afin de répondre à un besoin physiologique. Aujourd'hui, la science et l'industrie permettent le développement et la mise à disposition de nouvelles petites molécules bioactives et efficaces, dont l'origine n'est pas nécessairement un milieu naturel ou bio-inspirée.[1]

[1] Schreiber, S. L. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 64–66.

1.1. Les grandes phases de développement d'un médicament

Généralement, le développement et la première phase de la « vie » d'un nouveau médicament, soit le temps nécessaire pour sa mise sur le marché, peut s'étaler sur une vingtaine d'année, voire plus, et ce à partir du début des recherches exploratoires (Figure 1).[2] Il s'agit donc de projets d'envergure sur le long terme, qui monopolisent des ressources humaines, financières et matériels importantes, et dont le premier choix critique, en amont de toute chose, est la pertinence de la cible thérapeutique.[3] Cette décision initiale conditionnera en grande partie la robustesse globale du projet et donc son succès.

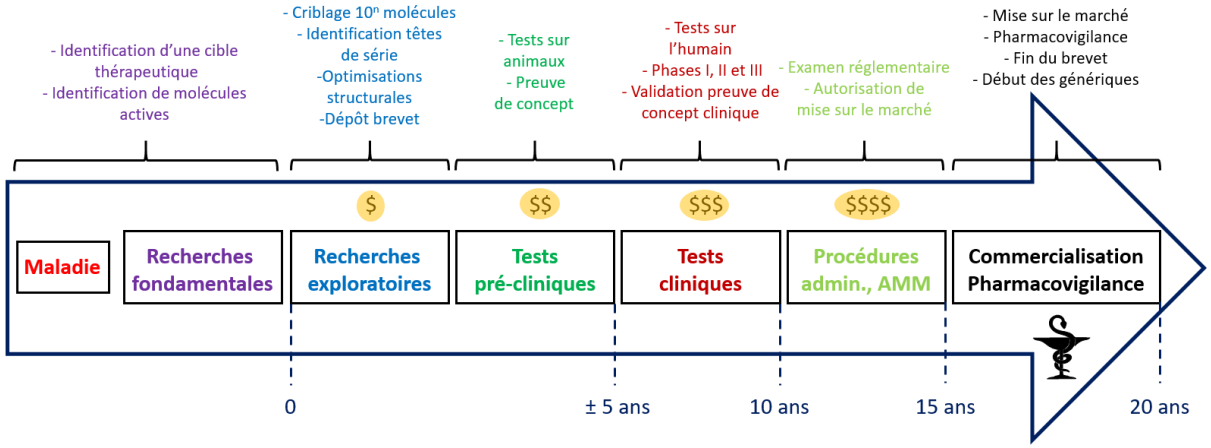


Figure 1. Étapes générales nécessaires pour le développement d'un médicament.

Une fois cette cible thérapeutique identifiée, la première phase du processus permet l'identification et l'optimisation structurale de molécules actives susceptibles d'interagir avec cette cible thérapeutique, si possible de façon sélective et spécifique. Pour les composés présentant une activité biologique intéressante et une originalité structurale innovante, un brevet est alors déposé afin de protéger la propriété intellectuelle au cas où le projet aboutirait à la commercialisation d'une molécule.

Les tests pré-cliniques visent ensuite à réaliser les premiers tests d'efficacité thérapeutique sur les animaux afin d'obtenir une première preuve de concept. En cas de résultats positifs, certaines molécules sont sélectionnées (moins d'une dizaine) pour devenir des candidats afin de passer aux étapes de tests cliniques sur l'Homme.

[2] Drews, J. *Science* **2000**, *287*, 1960–1964.

[3] Knowles, J.; Gromo, G. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 63–69.

Lors des études cliniques, il s'agit de valider définitivement la preuve de concept de l'efficacité thérapeutique du traitement pour ensuite l'étudier en profondeur, en particulier d'évaluer les effets secondaires et la variabilité inter-individus de l'efficacité thérapeutique. Pour cela, le processus se divise en trois phases. La phase I vise à cerner la toxicité du traitement et sa posologie sur une cohorte de 10 à 100 volontaires sains maximum. La phase II permet ensuite de démontrer l'efficacité du traitement et d'affiner la dose optimale à administrer (posologie). Cette phase se déroule avec l'aide de 50 à quelques centaines de malades volontaires. La phase III vise en dernier lieu à comparer l'efficacité de la nouvelle molécule par rapport à un traitement déjà existant, s'il en existe un, mais également de la confronter aux résultats de traitements placebos.

Dans le cas où les résultats des différentes phases sont concluants, un dossier de demande d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) est alors déposé, récapitulant les résultats obtenus sur les phases précliniques et cliniques, afin de passer les examens réglementaires. Si le dossier est accepté, la production industrielle et la commercialisation du nouveau médicament peuvent alors démarrer. Cependant, une phase IV dite de pharmacovigilance est systématiquement entreprise afin de détecter tout effet secondaire grave ou inattendu, pouvant survenir dans un temps long et qui n'aurait pas été identifié lors de la phase III.

Comme le montre la Figure 1, la recherche exploratoire et les tests précliniques occupent une place prépondérante en terme de temps consacré au développement des candidats pour la phase clinique.[4] Bien que ce ne soit pas la partie la plus coûteuse sur l'ensemble du processus, la solidité des recherches en amont des tests cliniques et de l'AMM est primordiale.[5]

Effectivement, le taux d'échec lors de ces deux dernières parties est conséquent et représente un gouffre financier pour les entreprises. L'importance des recherches en amont, donc de la démarche et des stratégies mises en jeux pour cette première étape, est cruciale.

[4] Keserű, G. M.; Makara, G. M. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 741–748.

[5] Bleicher, K. H.; Böhm, H.-J.; Müller, K.; Alanine, A. I. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 369–378.

1.2. Description générale du processus de recherche exploratoire

Une fois la cible biologique soigneusement sélectionnée et validée,[6] la phase de recherche exploratoire, qui engage la chimie de synthèse, la modélisation moléculaire, la pharmacologie ou encore la biologie,[7] se décompose en plusieurs étapes (Figure 2).

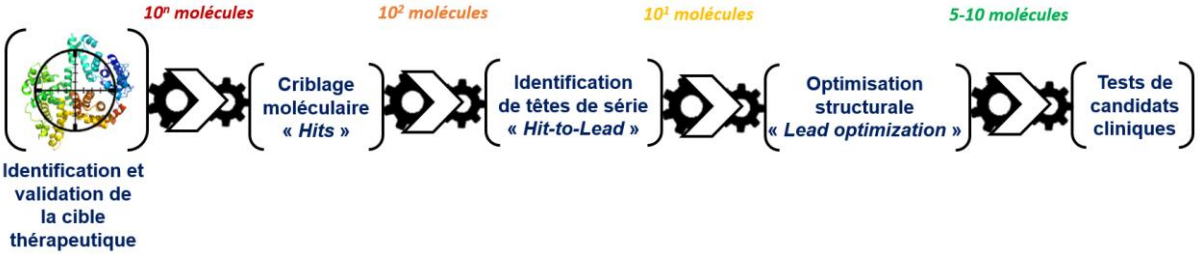


Figure 2. Déroulement général de la recherche exploratoire et préclinique vers les tests cliniques.

Un processus de criblage de banques chimiques (physiques ou dématérialisées), contenant plusieurs dizaines voire centaines de milliers de composés de diverses sources, est tout d'abord engagé (Figure 3).[2] Comme le montre la Figure 3, les sources de molécules sont multiples et de natures variées (produits naturels, banques de produits de synthèses, composés endogènes, littérature et brevets, etc.). Il s'agit généralement du point de départ de l'exploration et qui vise à découvrir des premières molécules possédant une activité biologique vis-à-vis de la cible (*Hits*). Cette étape permet dans certains cas de trouver des structures chimiques intéressantes, d'ores et déjà actives, pouvant directement mener à l'étape d'identification de têtes de séries (*Hit-to-Lead*). Bien-évidemment, la stratégie d'approche sera intrinsèquement dépendante du niveau de connaissances et de données disponibles sur la pathologie et sur la pertinence de la cible thérapeutique visées.

[6] Knowles, J.; Gromo, G. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 63–69.

[7] Wu, G.; Zhao, T.; Kang, D.; Zhang, J.; Song, Y.; Namasivayam, V.; Kongsted, J.; Pannecouque, C.; De Clercq, E.; Poongavanam, V.; Liu, X.; Zhan, P. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 9375–9414.

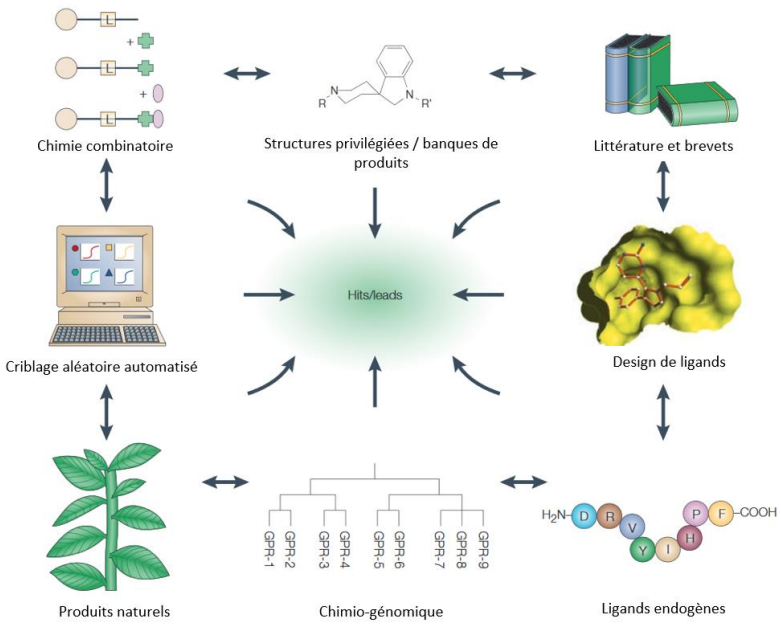


Figure 3. Sources physiques et dématérialisées de hits et/ou de leads (figure extraite et adaptée de l'article [3]*)*

Les têtes de séries (*leads*) servent alors de points de départs pour les études de relations structure-activité. Les optimisations structurales chimiques effectuées sur ces leads ont principalement plusieurs objectifs (*lead optimization*) :

- Amélioration des activités biologiques
- Gain de sélectivité par rapport à la cible
- Amélioration et études préliminaires de la pharmacocinétique *in vivo*
- Apport d'originalité et d'innovations structurales
- Étude de la brevetabilité

Cette étape est critique dans le processus global, puisqu'elle va concrètement définir si oui ou non le projet est viable et donc marquer le début des investissements financiers majeurs pour la compagnie pharmaceutique. Environ 25% des projets initiés sur de nouvelles cibles parviennent à fournir au moins un composé lead,[8] avec *in fine* seulement 4 à 6% des projets aboutissant à un médicament commercial malgré les nombreux efforts et investissements réalisés.[9]

[8] Deprez-Poulain, R.; Deprez, B. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 569–580.

[9] Munos, B. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 959–968.

1.3. Répartitions des grandes classes de cibles thérapeutiques

Une grande variété de cibles biologique est exploitée depuis de nombreuses décennies par les entreprises pharmaceutiques (Figure 4).[10]

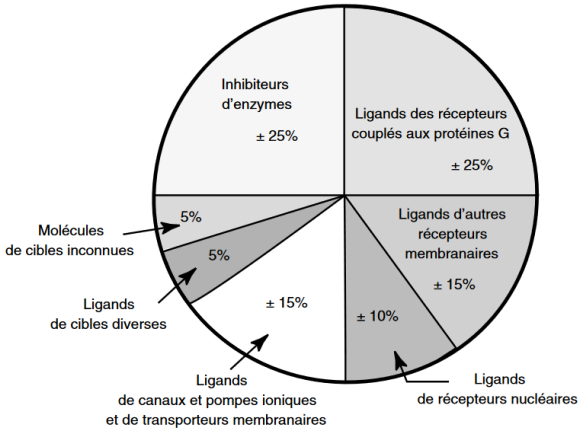


Figure 4. Distributions des différentes classes de cibles thérapeutiques (figure extraite de l'ouvrage [11]).

En 2006, il y avait entre 300 et 400 cibles biomoléculaires qui étaient impliquées dans le traitement de maladies, dont la majorité (environ 80%) sont codées par le génome humain.[12] Les 20% restants sont originaires d'organismes pathogène comme les virus, les bactéries et autres parasites. Cependant, en 2002, l'analyse du génome humain, donc en se limitant aux protéines potentiellement exprimées, a laissé entrevoir qu'entre 4000 et 8000 macromolécules biologiques pouvaient devenir de potentielles cibles thérapeutiques. Ces chiffres sont la preuve que le champ des possibles au niveau pharmaceutique est encore très vaste et majoritairement inexploré.[13]

Les approximativement 1400 médicaments approuvés et commercialisés se répartissent sur ces différentes cibles. Ces chiffres demeurent relativement constants puisque les arrivées sur le marché de nouvelles molécules complètent celles qui en sont retirées.[10]

D'après le graphique de répartition de la Figure 4, il apparaît très clairement que les enzymes et les ligands des récepteurs membranaires occupent une place privilégiée parmi les cibles biologiques des différentes classes existantes. Quelques exemples dans la littérature

[10] Landry, Y.; Gies, J.-P. *Fund. Clin. Pharmacol.* **2008**, *22*, 1–18.

[11] Landry, Y.; Gies, J-. P. *Pharmacologie des cibles à la thérapeutique.* Dunod, Paris, 2014. Chap. 1, p. 6.

[12] Overington, J. P.; Al-Lazikani, B.; Hopkins, A. L. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2006**, *5*, 993–996.

[13] Finan, C.; Gaulton, A.; Kruger, F. A.; Lumbers, R. T.; Shah, T.; Engmann, J.; Galver, L.; Kelley, R.; Karlsson, A.; Santos, R.; Overington, J. P.; Hingorani, A. D.; Casas, J. P. *Sci. Trans. Med.* **2017**, *9*, 383–398.

permettent de rendre compte de la grande diversité des enzymes cibles, humaine ou non, ayant déjà des traitements commerciaux.[14]

1.3. Les approches classiques de chimie combinatoire et de criblages à haut débit

1.3.1. Criblages à haut débit (High–Throughput Screening, HTS)

Cette méthode de criblage de composés organiques, d'origines naturelle ou de synthèse, est traditionnellement employée afin d'évaluer rapidement l'activité d'une chimiothèque de molécules vis-à-vis d'une biomolécule ou d'un processus biologique d'intérêt. Il s'agit ici de réaliser un maximum de tests « à l'aveugle » afin d'augmenter les chances de trouver un hit, ce qui diffère d'une conception moléculaire rationnelle.

L'emploi de banques de produits très vastes comprenant quelques milliers à plusieurs centaines de milliers de molécules a conduit au développement de procédures entièrement automatisées, notamment grâce à la robotisation.[15] Durant les dernières décennies, des plateformes robotisées sont ainsi apparues dans les centres de recherches pharmacologiques et font aujourd'hui partie du paysage classique de la chimie médicinale (Figure 5).

Figure 5. Photographies de systèmes automatisés de HTS.

Quel que soit le domaine considéré, la miniaturisation est de manière générale un défi et un besoin constant dans notre société. Ceci a en l'occurrence beaucoup apporté en HTS avec le remplacement des traditionnelles plaques de 96 puits (volume = 200 µL) par celles de 3456 puits (volume = 5 µL). Ce changement a ainsi permis la réduction drastique des quantités de biomolécules et de molécules engagées dans chaque essai. Dans ce cadre, la nano-chimie

[14] Imming, P.; Sinning, C.; Meyer, A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 821–834.

[15] Macarron, R.; Banks, M. N.; Bojanic, D.; Burns, D. J.; Cirovic, D. A.; Garyantes, T.; Green, D. V. S.; Hertzberg, R. P.; Janzen, W. P.; Paslay, J. W.; Schopfer, U.; Sittampalam, G. S. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 188–195.

est également l'objet de nombreuses recherches et a permis de repousser encore cette miniaturisation d'un facteur mille, bien qu'un matériel très spécifique soit nécessaire.[16]

Par ailleurs, les progrès constants en matière d'informatique et surtout d'intelligence artificielle permettent l'essor de « robots scientifiques » dans le domaine du screening et sont présentés comme étant l'avenir de cette science.[17] La dématérialisation des screening, pouvant être menés *in silico via* l'emploi de l'amarrage (*docking*) moléculaire marque également un tournant décisif de notre ère.[18] Ces outils virtuels représentent une source d'économie substantielle en termes de temps consacré, d'emploi de ressources (bio)chimiques et d'expériences vaines voire inutiles. Cependant, ils ne reflètent que partiellement les possibilités d'interaction entre une molécule et une cible biologique, car ils ne tiennent pas nécessairement compte de la flexibilité conformationnelle de la cible, d'un effet synergique lié à de potentielles interactions avec une cible supplémentaire, ni de l'ensemble des effets allostériques.

Malgré les nombreux avantages qu'offrent la technique de HTS, celle-ci demeure chronophage et onéreuse. De nombreux obstacles sont rencontrés comme la synthèse et/ou l'accès à une immense quantité de molécules, capable de refléter au mieux l'espace chimique potentiellement accessible, et le traitement des résultats obtenus dans les meilleurs délais. De plus, un grand nombre d'interférences aboutissant à de faux résultats positifs ou négatifs peuvent avoir lieu lors des tests (liste non-exhaustive) :

- dégradation des molécules de la chimiothèque (stockage : solution de DMSO)
- réactivité avec la cible biologique et dénaturation
- méthode inadaptée suivant la nature de la cible[19]
- formation d'agrégats[20]

[16] Mugherli, L.; Burchak, O. N.; Balakireva, L. A.; Thomas, A.; Chatelain, F.; Balakirev, M. Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7639–7644.

[17] King, R. D.; Whelan, K. E.; Jones, F. M.; Reiser, P. G. K.; Bryant, C. H.; Muggleton, S. H.; Kell, D. B.; Oliver, S. G. *Nature* **2004**, *427*, 247–252.

[18] Lenci, E.; Trabocchi, A. *ChemBioChem*, **2019**, *20*, 1-20.

[19] Koes, D.; Khoury, K.; Huang, Y.; Wang, W.; Bista, M.; Popowicz, G. M.; Wolf, S.; Holak, T. A.; Dömling, A.; Camacho, C. J. *PLOS ONE* **2012**, *7*, e32839.

[20] (a) Sink, R.; Gobec, S.; Zega, A. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 4231–4255. (b) Reker, D.; Bernardes, G. J. L.; Rodrigues, T. *Nat. Chem.* **2019**, *11*, 402–418.

- présence de d'ions métalliques[21]
- présence d'inhibiteurs ubiquitaires et récurrents dans les chimiothèques[22]

1.3.2. Principe de la chimie combinatoire

La chimie combinatoire vise la préparation de multiples composés chimiques présentant des similarités structurales au moyen de la synthèse divergente (Schéma 1).[23]

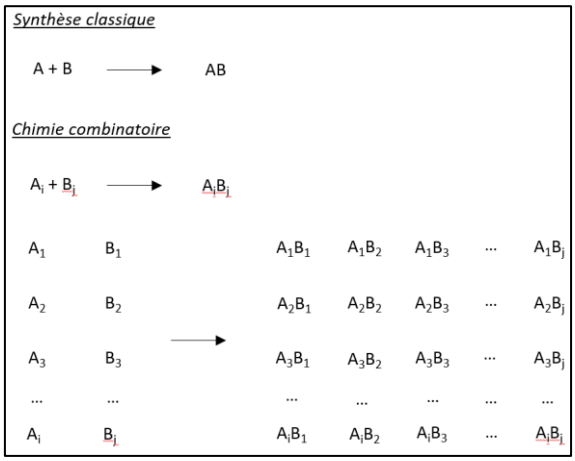


Schéma 1. Comparaison de la synthèse chimique classique et de la chimie combinatoire.

La technique de chimie combinatoire peut être réalisée à partir de librairies chimiques relativement restreintes (quelques dizaines à centaines de précurseurs) en employant une réaction chimique optimisée. Les réactions multi-composantes de Passerini et de Ugi, mettant en jeu respectivement trois et quatre réactifs simultanément, sont des exemples très représentatifs de la puissance de cette stratégie en terme de diversité chimique (Schéma 2).

Comme mentionné précédemment, les avancées technologiques comme la robotisation et l'automatisation,[24] la miniaturisation ou encore l'intelligence artificielle ont permis d'accéder à des systèmes de synthèse ultra-performants[25] permettant la préparation quotidienne de grands nombres de molécules (jusqu'à plusieurs milliers par jour). La limitation

[21] Hermann, J. C.; Chen, Y.; Wartchow, C.; Menke, J.; Gao, L.; Gleason, S. K.; Haynes, N.-E.; Scott, N.; Petersen, A.; Gabriel, S.; Vu, B.; George, K. M.; Narayanan, A.; Li, S. H.; Qian, H.; Beatini, N.; Niu, L.; Gan, Q.-F. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 197–200.

[22] (a) M Nissink, J. W.; Blackburn, S. *Future Med. Chem.* **2014**, *6*, 1113–1126. (b) Pouliot, M.; Jeanmart, S. Pan. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 497–503.

[23] Nicolaou, K. C.; Hanko, R.; Hatwig, W. *Handbook of combinatorial chemistry. Drugs, catalysts, materials*. Wiley-VCH: Weiheim, Germany, 2002; Vol. 1 and Vol. 2.

[24] Peplow, M. *Nat. News* **2014**, *512*, 20–22.

[25] Reizman, B. J.; Jensen, K. F. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 1786–1796.

de cette technique de chimie combinatoire reste liée au type de réaction pouvant être mis en jeu, et donc à l'espace chimique correspondant à la diversité structurale des molécules accessibles *via* cette technique.

Afin d'illustrer plus en détail le réel intérêt de ces avancées technologiques considérables, de récents travaux du Pr. Alexander Dömling peuvent être cités à titre d'exemples. Son groupe s'est d'abord intéressé à l'optimisation d'une séquence réactionnelle comprenant la formation préalable d'α-amido amides par réaction multi-composantes d'Ugi, suivie par des réactions de condensation/cyclisation/oxydation de Pomeranz-Fritsch, ou de la modification de Schlittler-Müller (Schéma 2). Cette méthodologie a ainsi donné accès à une très grande variété de structures comprenant un motif isoquinoléine.[26]

Cette séquence réactionnelle a pu ensuite être transposée sur chaîne instrumentale automatisée, combinant un synthétiseur à éjection acoustique de nano-gouttelettes (2,5 nL), une série d'appareils analytiques et un ordinateur regroupant les données de synthèses et d'analyses.[27] Grâce à ce système, 384 expériences ont pu être menées en moins de 48 h et à partir d'une chimiothèque restreinte, comprenant de l'acide benzoïque, du 2,2-diméthoxyacétaldehyde, sept amines et 62 isonitriles. La quantité finale et totale de tous les composés de départ employée a été d'environ 50 mg (soit ± 130 µg de réactifs par réaction), ce qui est très faible étant donné le nombre d'expériences effectuées.

Cependant, malgré ces progrès considérables, les problèmes de fond de l'approche par HTS couplée à la chimie combinatoire ne sont toujours pas résolus. En effet, l'évaluation individuelle de l'activité biologique vis-à-vis de la cible des composés disponibles demeure indispensable et le résultat incertain (Schéma 3). Afin d'y répondre, de nouvelles approches toujours plus variées font l'objet d'intenses recherches,[7] notamment *via* l'identification de fragments combinables et/ou sur l'implication directe de la cible ont vu le jour et sont en plein essor.

[26] Wang, Y.; Patil, P.; Kurpiewska, K.; Kalinowska-Tluscik, J.; Dömling, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 3533–3537.

[27] Wang, Y.; Shaabani, S.; Ahmadianmoghaddam, M.; Gao, L.; Xu, R.; Kurpiewska, K.; Kalinowska-Tluscik, J.; Olechno, J.; Ellson, R.; Kossenjans, M.; Helan, V.; Groves, M.; Dömling, A. *ACS Cent. Sci.* **2019**, *5*, 451–457.

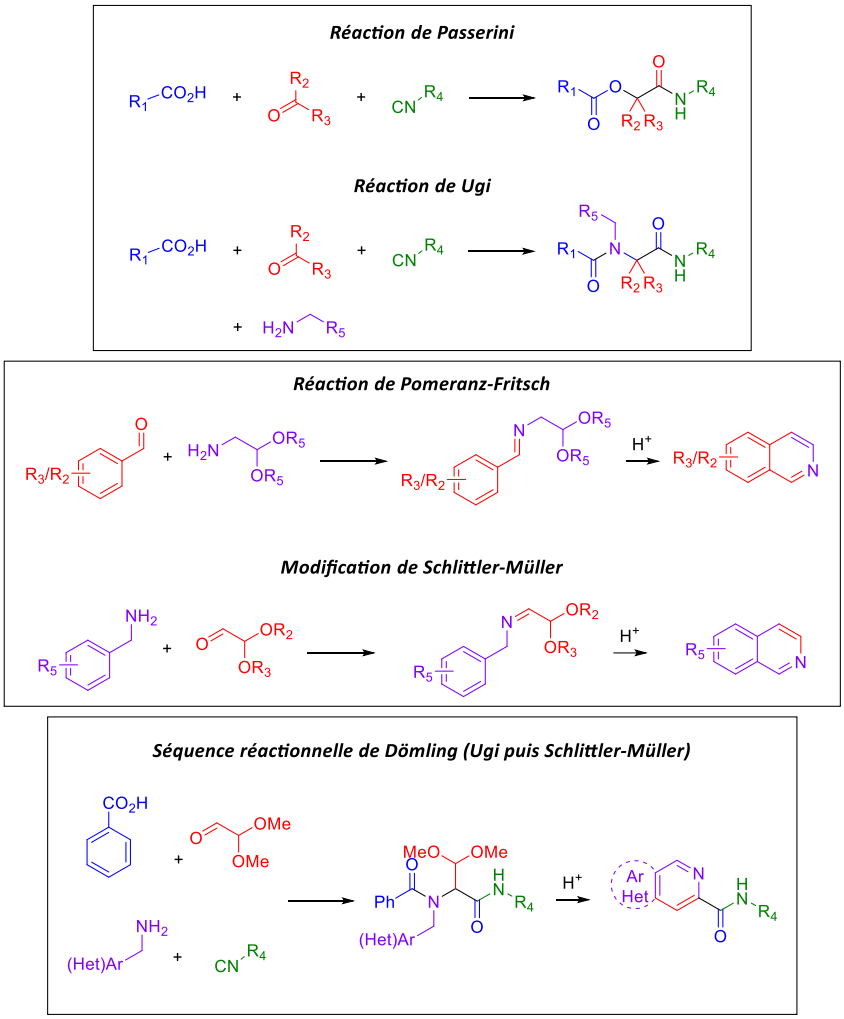


Schéma 2. Réactions de Passerini, Ugi, Pomeranz-Fritsch, modification de Schlittler-Müller et séquence réactionnelle de Dömling.

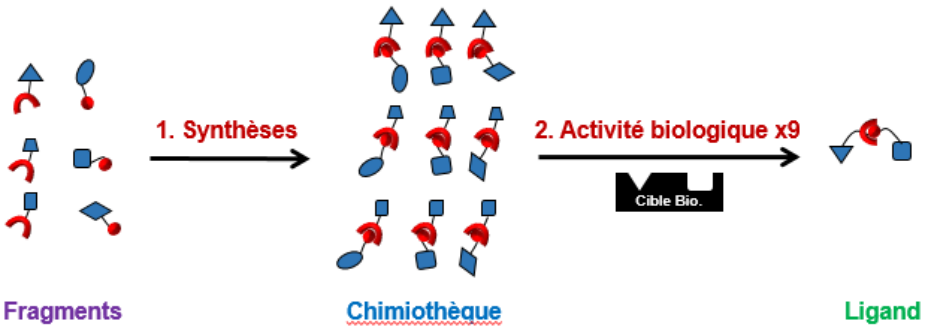


Schéma 3. Chimie combinatoire couplée au HTS.

1.4. Conception de médicament par la méthode des fragments (*Fragment-Based Drug Discovery*, FBDD)

Depuis la fin des années 90, le criblage de fragments moléculaires est devenu très attractif comme point de départ dans la conception de médicaments.[28] L'objectif est d'identifier rapidement de petits fragments possédant une certaine affinité avec la cible afin de s'en servir comme point de départ dans le processus de recherche (Figure 6).[29]

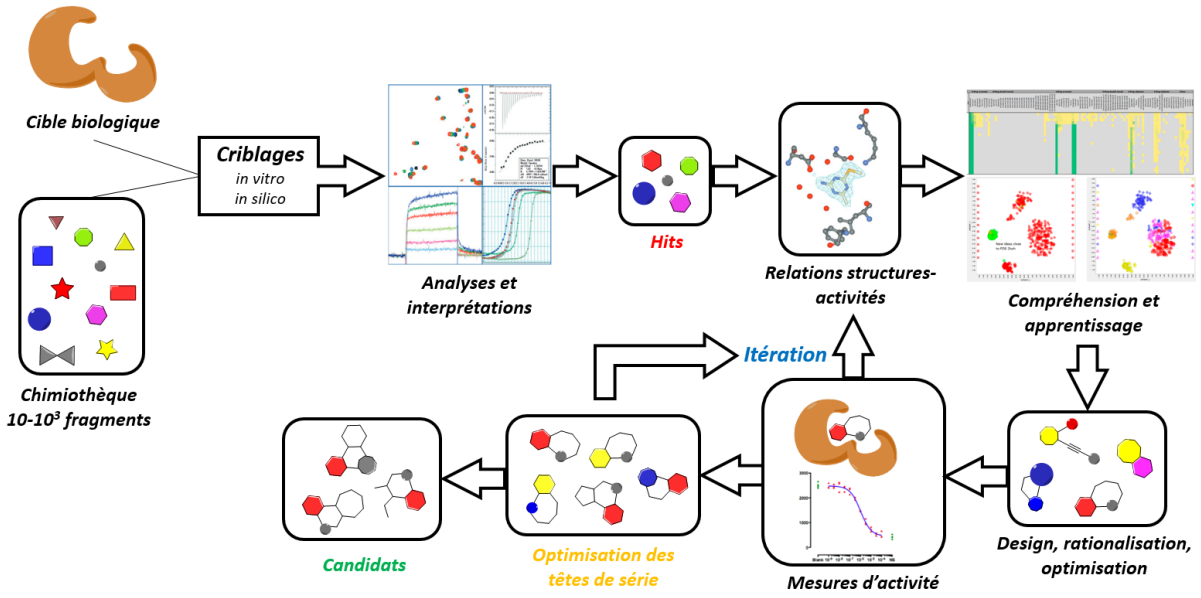


Figure 6. Principe de la FBDD pour le développement de candidats moléculaires.

Par analogie aux cinq règles de Lipinski,[30] la règle de trois de Jhoti permet principalement de savoir si un composé peut être qualifié de fragment moléculaire, ou de « *drug-like* » en anglais (Figure 7).[29(b),31] Bien évidemment, d'autres règles plus spécifiques comme des critères de solubilités et de pénétration biologique,[32] de surfaces polaires,[31] de puissance d'activité,[33] le nombre d'atomes lourds (autres que l'hydrogène) souhaité,[34] etc. peuvent être appliquées comme filtres supplémentaires.

---

[28] Pour une publication didactique et les références citées, voir : Krimm, I. *Med. Sci. (Paris)* **2015**, *31*, 197–202.

[29] (a) Murray, C. W.; Verdonk, M. L.; Rees, D. C. *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 224–232. (b) Scott, D. E.; Coyne, A. G.; Hudson, S. A.; Abell, C. *Biochemistry* **2012**, *51*, 4990–5003.

[30] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3–25.

[31] Congreve, M.; Carr, R.; Murray, C.; Jhoti, H. *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 876–877.

[32] Lipinski, C. A. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2000**, *44*, 235–249.

[33] Hopkins, A. L.; Groom, C. R.; Alex, A. *Drug Discov. Today* **2004**, *9*, 430–431.

[34] Fink, T.; Bruggesser, H.; Reymond, J.-L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1504–1508.

Règles de Lipinski

L'absorption et la pénétration physiologique d'un composé seront favorisées si :

- nombre de donneurs de liaisons-H ≤ 5
- nombre d'accepteurs de liaisons-H ≤ 10
- masse moléculaire du composé < 500 g/mol
- Le logarithme décimal du coefficient de partage eau / 1-octanol, noté log(P), est < 5
- Les composés étant des substrats de transporteurs biologiques font exception à la règle

Règle des trois de Jhoti

Un composé peut être considéré comme fragment moléculaire si ces paramètres se limitent à :

- masse moléculaire ≤ 300 g/mol
- log(P) ≤ 3
- nombre d'accepteurs/donneurs de liaisons –H ≤ 3

Figure 7. Principaux rappels des règles de Lipinski et de la règle des trois de Jhoti.

De récentes études ont pu démontrer que l'emploi de banques contenant environ 2 000 composés serait suffisant en terme de diversité et de pré-couverture structurale de l'espace chimique.[35] Quelques structures de fragments types, rencontrés au travers de la littérature, sont représentés ci-dessous à titre d'exemple (Figure 8).

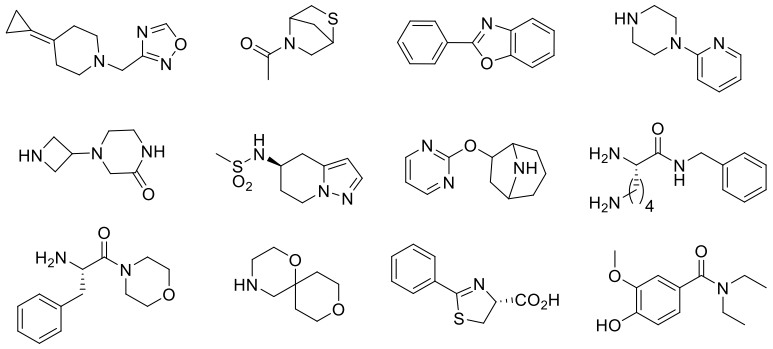


Figure 8. Exemples types de fragments moléculaires.

Lors du criblage, les tests de bio-activité peuvent être menés de manière individuelle ou par groupe de fragments (une dizaine maximum) selon la technique d'analyse employée.[28] Ces méthodes sont diverses, impliquant divers phénomènes physiques, et leur emploi est soumis à différents paramètres intrinsèques au projet.[36] Ces techniques biophysiques comptent notamment la résonnance magnétique nucléaire (RMN), la cristallographie par rayons X (RX), la calorimétrie isotherme, la spectrométrie de masse (MS), la résonnance plasmonique de surface ou encore la chromatographie à faible affinité. Généralement, la détection d'interactions faibles comprises en 100 et 5000 µM fait d'un fragment un potentiel hit pouvant être étudié avec plus d'attention. En raison de leur simplicité structurale, il est

[35] Shi, Y.; von Itzstein, M. *Molecules* **2019**, *24*, 2838–2848.

[36] Pour une vue d'ensemble des méthodes d'analyses en FBDD, voir : (a) Makara, G. M.; Athanasopoulos, J. *Curr. Opin. Biotech.* **2005**, *16*, 666–673. (b) Hubbard, R. E.; Murray, J. B. *Methods Enzymol.* **2011**, *493*, 509–531.

possible qu'un fragment puisse être un hit vis-à-vis de différentes cibles biologiques. Cependant, son parcours d'évolution et de modulation structurale sera différent d'une étude à l'autre, ce qui permettra ainsi d'accéder à une spécificité et une affinité suffisantes durant les phases de hit-to-lead, puis d'optimisation des têtes de série.[28]

Par ailleurs, l'exploration *in silico* de l'espace chimique, toujours plus vaste,[37] et l'apprentissage des machines grâce à l'intelligence artificielle deviennent là encore des outils incontournables en FBDD et en design moléculaire.[38] Grâce à cela, des centaines de milliers de composés peuvent être testés de manière dématérialisée et selon la même trame. De plus, les utilisations parallèles et complémentaires de criblages physiques et virtuels peuvent conduire à des résultats particulièrement puissants, comme ceux obtenus pour le candidat oral BEP-800, inhibiteur de l'enzyme Hsp90 et permettant la limitation de la prolifération de cellules cancéreuses (Schéma 4).[39]

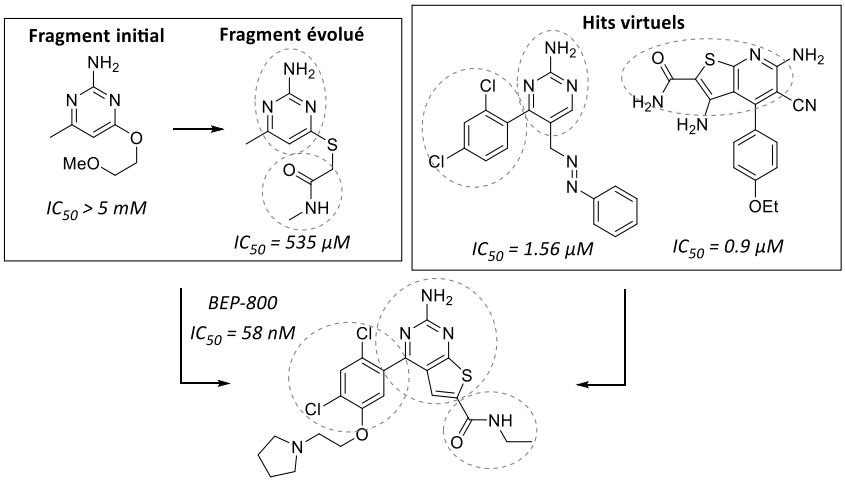


Schéma 4. Optimisation structurale du candidat oral BEP-800 par criblage physique et virtuel.

Une fois des fragments identifiés, un processus itératif de compréhension des relations structures-activités peut alors débuter, afin d'identifier les mécanismes d'action et les paramètres structuraux indispensables qui régissent l'activité des composés. La recherche d'analogues commerciaux ou déjà synthétisés est menée afin de débuter le design et l'optimisation moléculaire des leads. Trois options d'approche complémentaires peuvent être employées, à savoir **A**) l'expansion des fragments, **B**) la combinaison de fragments ou **C**) l'auto-

[37] Hoffmann, T.; Gastreich, M. *Drug Discov. Today* **2019**, *24*, 1148–1156.

[38] Grebner, C.; Matter, H.; Plowright, A. T.; Hessler, G. *J. Med. Chem.* **2020**, 63, 8809–8823.

[39] Brough, P. A.; *et al. J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4794–4809.

assemblage par la cible (Schéma 5).[40] Les stratégies **A** et **B** incarnent parfaitement le processus itératif relativement long présenté en Figure 6, contrairement à l'approche **C** de synthèse par la cible, plus directe, et qui faisant l'objet de ces travaux de thèse va être détaillée ci-après.

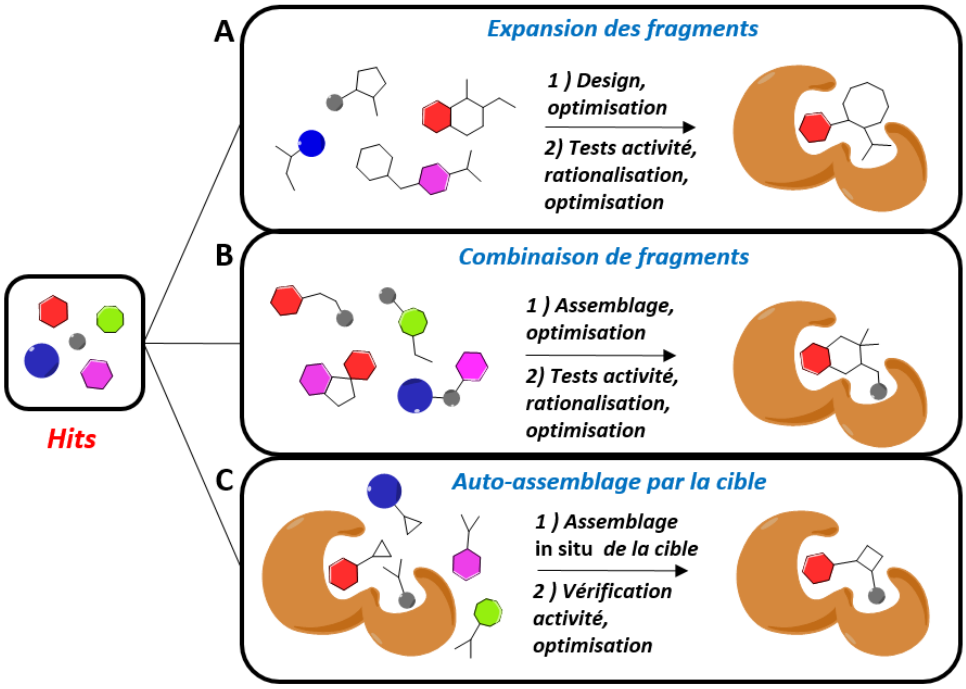


Schéma 5. Approches par (A) expansion des fragments, (B) combinaison et fusion de fragments et (C) auto-assemblage par la cible biologique.

1.5. Synthèse contrôlée par la cible de molécules actives (*Target-Guided Synthesis*)

La synthèse contrôlée par la cible (*Target-Guided Synthesis*, TGS) permet l'assemblage de molécules actives grâce à l'utilisation de fragments réactifs, « sélectionnés » par la cible suivant leurs affinités respectives. La cible fournit des effets de promiscuité et d'activation chimique, qui seront qualifiés d'effets « *template* » par la suite, et sert ainsi de catalyseur dans la formation de son propre ligand *via* la formation de liaisons covalentes entre les fragments de départ. Cette approche originale exerce un attrait de plus en plus important pour la recherche industrielle et académique, ce qui en fait un sujet de développement actif à l'échelle mondiale depuis plus de vingt ans.[41]

Comparativement aux autres méthodes d'approches par fragments classiques ou de la chimie combinatoire, la TGS permet un gain de temps substantiel car elle conduit à la

[40] Keserű, G. M.; Makara, G. M. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 741–748.
[41] Eliseev, A. V. *Drug Discov. Today* **2004**, *9*, 348–349.

formation ou stabilisation quasi-unique de ligands potentiellement biologiquement actifs, tout en supprimant une grande partie de synthèse organique et de tests de bio-activités nécessaires dans les autres stratégies. L'exploration de nombreuses combinaisons de ligands peut ainsi être réalisée de manière plus directe et rapide, afin de couvrir un espace chimique plus ou moins large selon l'état de connaissance de la cible et de la littérature.

Trois principales déclinaisons de TGS existent.[42] Les deux premières fonctionnent sous contrôle thermodynamique *via* l'établissement de liaisons réversibles. Il s'agit de la chimie combinatoire dynamique (*Dynamic Combinatorial chemistry*, DCC) et le criblage par couplage dynamique (*Dynamic Ligation Screening*, DLS).[43] La troisième, qui est la synthèse contrôlée par la cible sous contrôle cinétique, fonctionne de manière irréversible.

1.5.1. La chimie combinatoire dynamique (Dynamic Combinatorial chemistry, DCC)

1.5.1.1. Principe de la DCC

Dans cette méthode, une librairie « dynamique » de produits, souvent appelée « bibliothèque combinatoire dynamique » (*Dynamic Combinatorial Library*, DCL) est générée de manière *in situ* lors de l'expérience. Effectivement, les fragments réactifs sont mélangés en contact les uns des autres et s'assemblent de manière réversible, *via* des réactions chimiques spontanées. Ce processus est régi d'une part par les conditions expérimentales, mais aussi par les équilibres thermodynamiques instaurés entre les réactifs et les combinaisons de produits formés.[44] Selon la loi d'action de masse de Le Chatelier, un stimulus physique externe peut permettre la déstabilisation d'un état d'équilibre pour le conduire vers un nouveau, selon le nouvel environnement imposé. En DCC, le stimulus externe est représenté par l'introduction de la cible dans le milieu contenant la DCL (Schéma 6, **A**). Les produits possédant le plus d'affinité avec la cible vont ainsi être stabilisés au détriment des autres composés possédant des fragments en commun. Les intensités relatives de certains pics correspondants aux différents produits possibles en HPLC vont donc varier selon le nouvel équilibre instauré et ainsi permettre de repérer le(s) hit(s) (Schéma 6, **B**). Les produits dont les intensités de pics

[42] Pour un aperçu global des stratégies de TGS, voir : Jaegle, M.; Wong, E. L.; Tauber, C.; Nawrotzky, E.; Arkona, C.; Rademann, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 7358–7378.

[43] Schmidt, M. F.; Rademann, J. *Trends Biotech.* **2009**, *27*, 512–521.

[44] (a) Lehn, J.-M.; Eliseev, A. V. *Science* **2001**, *291*, 2331–2332. (b) Ulrich, S.; Dumy, P. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 5810–5825.

HPLC augmentent (flèche verte) sont donc vraisemblablement les ligands possédant des affinités intéressantes vis-à-vis de la cible. En théorie, les produits possédant des fragments communs avec le hit vont en partie se dissocier afin de compenser la déstabilisation du système par la cible, conformément au principe de Le Chatelier (flèche rouge). Ce type d'étude s'effectuant de manière comparative, des analyses doivent impérativement être effectuées avant puis après introduction de la cible, avec si possible une étape supplémentaire permettant de figer l'équilibre pour pouvoir mesurer de façon indépendante les intensités relatives.

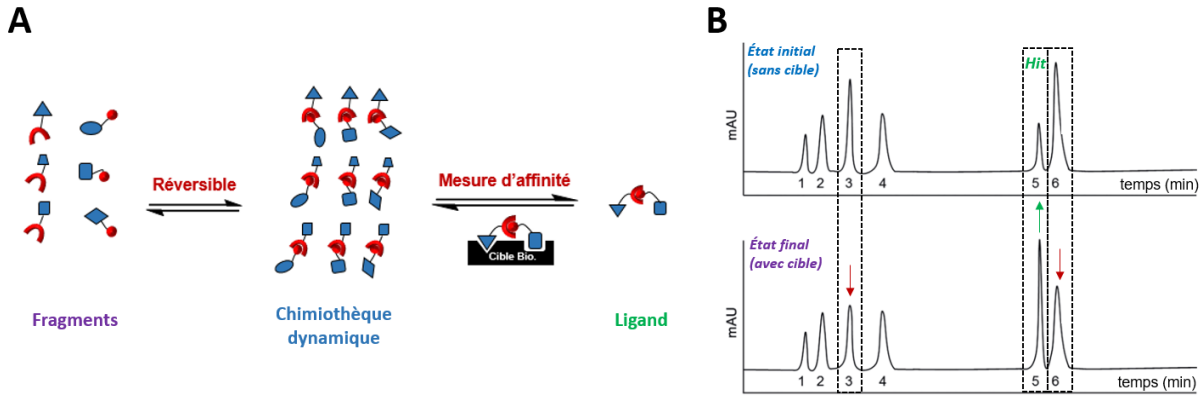


Schéma 6. (A) Principe général de la DCC. (B) Comparaison de chromatogrammes HPLC (avant et après introduction de la cible) et identification de(s) hit(s) (figure extraite et modifiée de la revue[49(d)]*).*

Le milieu d'étude étant toujours sous équilibre après ajout de la cible, son traitement et son analyse doivent être menés rapidement afin de conserver l'état final du système le plus intact possible. Si son analyse ne peut être effectuée rapidement, le mélange doit alors être congelé à basse température en attendant d'être étudié. D'autres contraintes et limites de cette DCC peuvent également être listées de manière non-exhaustive[45] :

- la réaction réversible employée doit être biocompatible (milieux aqueux, pH, température, présence de biomolécules…)
- la réaction doit être la plus chimiosélective possible (pas de réactivité fonctionnelle secondaire ou avec la cible)
- la solubilité des fragments et des produits doivent être équivalente dans le temps (pas de précipitation ou d'agrégation)
- l'équilibration du système doit être suffisamment rapide pour atteindre un « réel » mélange initial stable et dans un temps raisonnable

[45] Unver, M. Y.; Gierse, R. M.; Ritchie, H.; Hirsch, A. K. H. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 9395–9409.

- le recours à des techniques d'analyses parfois longues ou complexes à mettre en œuvre et restreint par le type de cible
- même si des progrès ont été effectués en techniques de spectrométrie de masse (MS), notamment pour la DCC,[46] il est préférable que les produits formés ne soient pas isobariques selon les combinaisons possibles
- la nécessité de fixer le système dans son état final d'auto-assemblage de manière physique (congélation) ou chimique (seconde réaction rendant la première irréversible)

Malgré ces nombreux paramètres complexes, de nombreuses applications ont pu être menées grâce à différentes réactions applicables en DCC. Quelques exemples représentatifs sont donnés ci-après.

1.5.1.2. Réactions dynamiques éligibles en DCC

Depuis les années 90, de nombreuses réactions réversibles ont été décrites et employées en DCC, atteignant en 2010 le nombre de 25 (Schéma 7).[47]

[46] (a) Poulsen, S.-A. *official J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17*, 1074–1080. (b) Kern, F.; Wanner, K. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 1232–1245.

[47] Corbett, P. T.; Leclaire, J.; Vial, L.; West, K. R.; Wietor, J.-L.; Sanders, J. K. M.; Otto, S. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3652–3711.

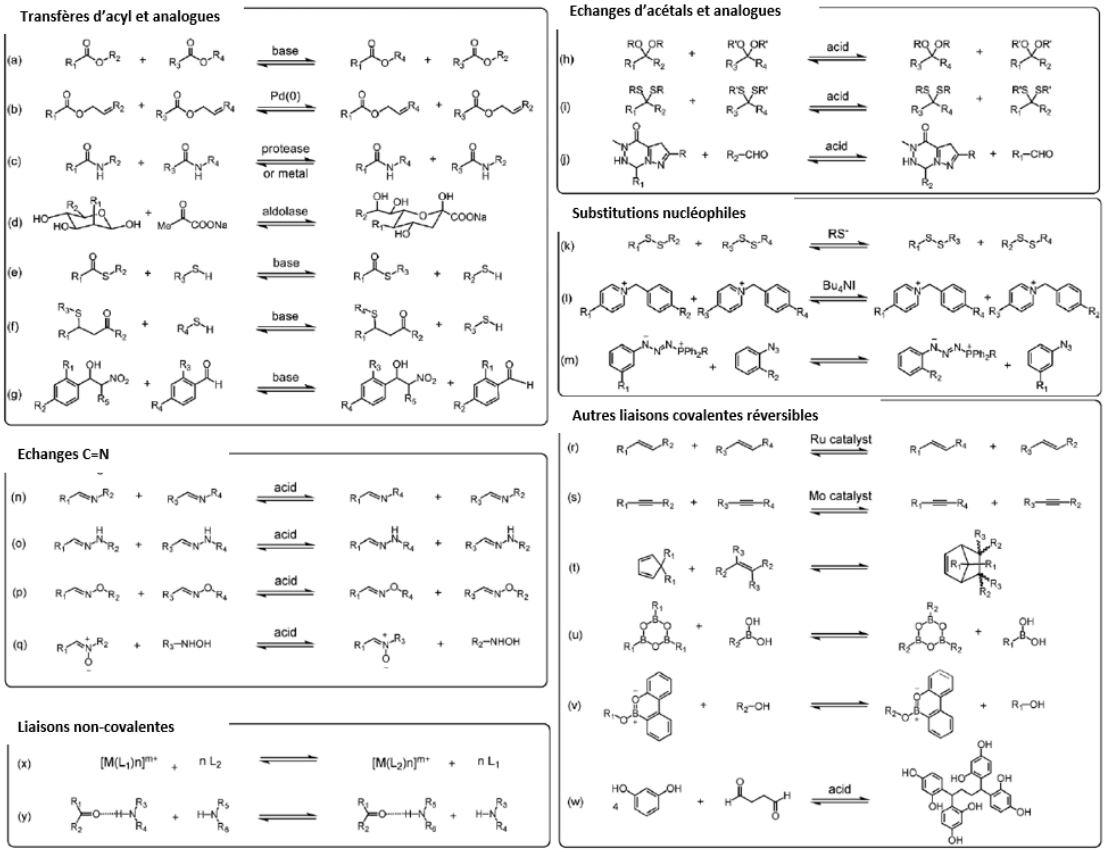


Schéma 7. Réaction réversibles décrites en DCC dans la littérature jusqu'en 2006 (figure extraite et modifiée de la revue[47]*).*

Depuis 2010 d'autres réactions de DCC ont été optimisées, mais seule une petite partie d'entre-elles ont été employées afin de générer des DCL afin de cibler des protéines/enzymes et plus récemment de l'ARN [48] (Schéma 8).[49]

[48] Juru, A. U.; Cai, Z.; Jan, A.; Hargrove, A. E. *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 3555–3558.

[49] Pour un bilan bibliographique et de conditions expérimentales en DCC, voir : (a) Herrmann, A. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1899–1933. (b) Mondal, M.; Hirsch, A. K. H. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 2455–2488. (c) Huang, R.; Leung, I. K. H. *Molecules* **2016**, *21*, 910–928. (d) Hartman, A. M.; Gierse, R. M.; Hirsch, A. K. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, *2019*, 3581–3590. (e) Frei, P.; Hevey, R.; Ernst, B. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 60–73.

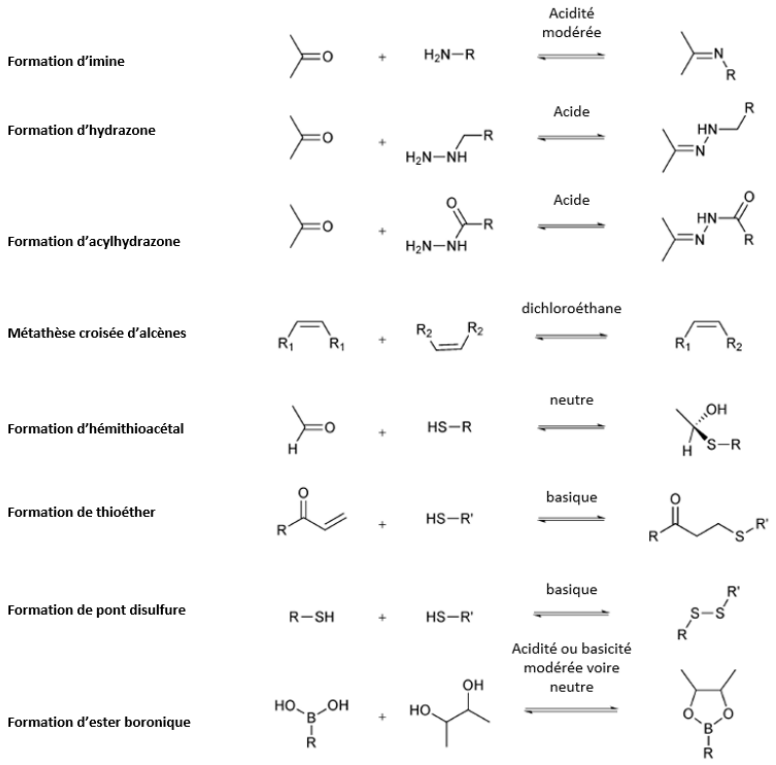


Schéma 8. Réactions de DCC employées pour cibler des protéines/enzyme ou de l'ARN (figure extraite et modifiée de la revue[49(b)]*).*

1.5.1.3. Exemples d'applications de la DCC

La littérature autour de ce sujet est très vaste en terme de recherche fondamentale et d'applications, notamment en chimie-biologie. Deux exemples représentatifs de la littérature ont été sélectionnés et sont présentés ci-après.

Exemples 1 : formation d'acylhydrazone

En 2010, les équipes de Campopiano et Greaney ont pu mettre au point un criblage DCC sur deux isozymes, que sont la sjGST et la hGSTP1-1 (famille des Glutathion S-Transférase, GST).[50] Pour cela, ils ont employé la ligation d'acylhydrazones équilibrée en présence d'aniline. Cette dernière sert dans ce cas de catalyseur nucléophile afin de pouvoir générer la DLC dans un temps raisonnable de 6 h à pH 6,2. Sinon, l'état d'équilibre de la DLC est atteint après sept jours environ dans les mêmes conditions. Bien entendu, un milieu acide modéré (pH ≤ 4)

[50] Bhat, V. T.; Caniard, A. M.; Luksch, T.; Brenk, R.; Campopiano, D. J.; Greaney, M. F. *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 490–497.

permet une génération rapide de l'équilibre, mais aucune application biologique n'est alors envisageable dans ce cas compte tenu de l'instabilité de la majorité des protéines à ce pH.

Lors de leur étude, une DCL relativement restreinte a été générée à partir de seulement d'un unique aldéhyde (4-chloro-3-nitrobenzaldehyde) et de 10 hydrazones aromatiques et hétéroaromatiques (Schéma 9). De manière intéressante, les deux isozymes ont réalisé une véritable sélection entre les partenaires hydrazones disponibles, ce qui a abouti à la formation de deux ligands différents. Cette expérience est la preuve que la DCC peut être employée pour la recherche de ligands spécifiques d'isozymes, ce qui peut parfois être un véritable défi.

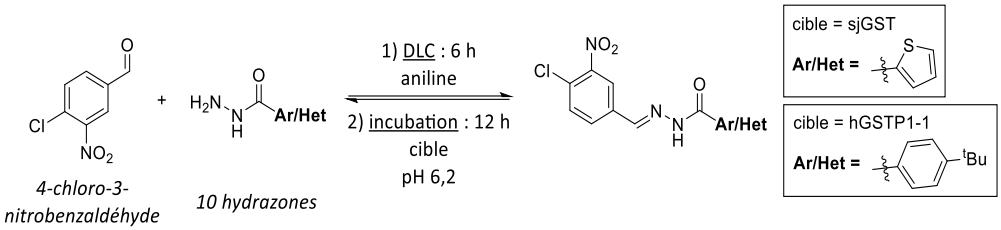


Schéma 9. Expérience DCC (famille GST) par ligation d'acylhydrazone catalysée par l'aniline.

Très récemment, le groupe du Dr. Hirsch a également employé cette technique afin d'identifier des modulateurs d'interactions protéine-protéine (PPIs).[51] Leur intérêt s'est porté sur la famille des protéines 14-3-3, responsable de la régulation de l'activité de diverses familles d'enzymes et de protéines, et corrélée à la maladie d'Alzheimer entre autres.[52]

Suivant un protocole similaire à celui exposé ci-dessus, les auteurs ont pu observer la stabilisation majoritaire de deux ligands modulateurs avec les combinaisons **A1-H3** et **A2-H3** à partir de librairies chimiques également restreintes (Schéma 10). Grâce à des contrôles compétitifs, par introduction initiale de la synaptopodine, une protéine interagissant fortement avec le domaine d'interaction connu (gorge étendue), il a pu être démontré que ces deux ligands interagissaient avec un domaine différent. Cette expérience fournit donc un premier niveau de compréhension quant au mécanisme d'action des ligands formés.

[51] Molzan, M.; Schumacher, B.; Ottmann, C.; Baljuls, A.; Polzien, L.; Weyand, M.; Thiel, P.; Rose, R.; Rose, M.; Kuhenne, P.; et al. *Mol. Cell. Biol.* **2010**, *30*, 4698−4711.

[52] Hartman, A. M.; Elgaher, W. A. M.; Hertrich, N.; Andrei, S. A.; Ottmann, C.; Hirsch, A. K. H. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 1041−1046.

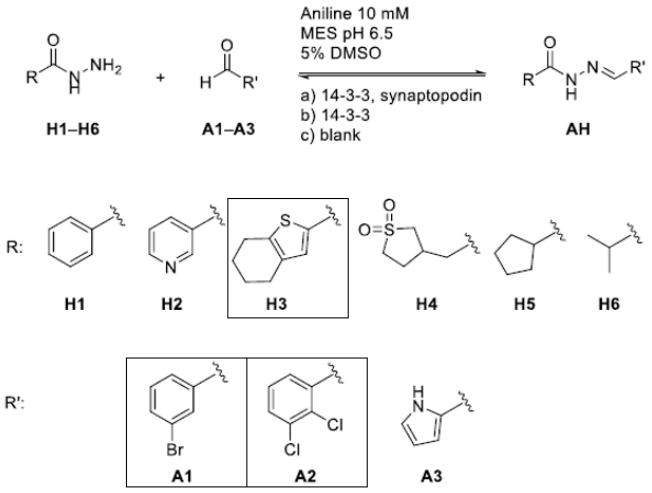


Schéma 10. Expériences DCC (famille protéine 14-3-3) par la ligation d'acylhydrazone catalysée par l'aniline (figure extraite et modifiée de l'article[52]*).*

Exemple 2 : formation et interconversion d'imines suivies par la réduction en amine

Les groupes de Supuran et de Barboiu ont exploité en 2009 la formation et l'interconversion d'imines en DCC pour la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'anhydrase carbonique II humaine (*h*CA II).[53] Il s'agit d'une métaloenzyme cytosolique et ubiquitaire, faisant partie de la famille de lyases des anhydrases carboniques (Cas) comprenant 15 isozymes.[54] Ces cibles biologiques seront présentées beaucoup plus en détails au début du chapitre III de ce manuscrit.

Les auteurs ont employé quatre aldéhydes et cinq amines afin de constituer leur DCL comprenant au final 20 imines différentes. La réduction *in situ* des imines en amines secondaires par le traitement au cyanoborohydrure de sodium ($NaBH_3CN$) du milieu a permis de « geler » l'équilibre thermodynamique à son état final (Schéma 11). La stabilisation majoritaire de cinq ligands par la *h*CA II a alors été observée et les mesures des constantes d'inhibition de ces derniers ont révélé une gamme de composés possédant des affinités allant de quelques dizaines à centaines de nM.

[53] Nasr, G.; Petit, E.; Supuran, C. T.; Winum, J.-Y.; Barboiu, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6014–6017.
[54] Supuran, C. T. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 825–833.

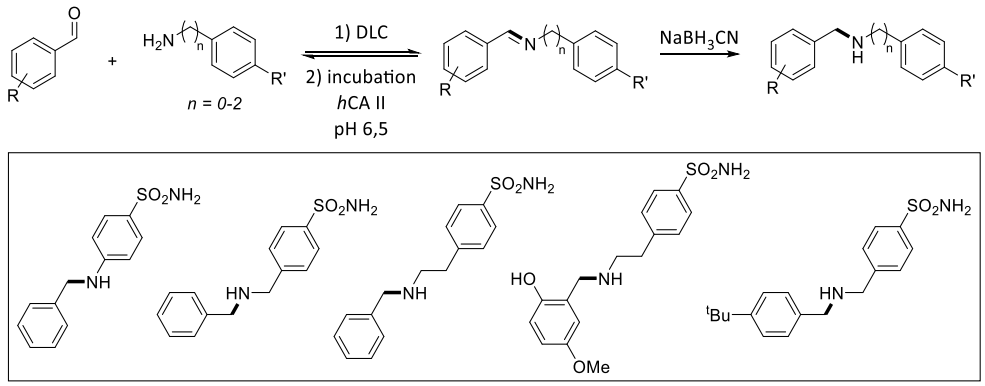
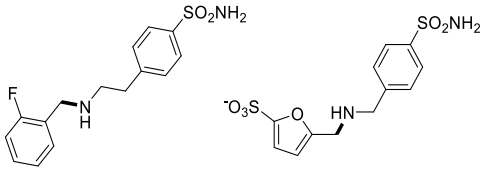


Schéma 11. Expérience DCC (hCA II) par formation et interconversion d'imines avec réduction séquentielle.

Encouragés par ces premiers résultats, les auteurs ont ensuite entrepris l'identification de ligands sélectifs des isozymes *h*CA I et *h*CA II grâce à cette méthode de DCC.[55] Ces travaux ont permis d'identifier des composés possédant des activités biologiques différentes traduisant une certaine sélectivité pour l'isozymes *h*CA II, reconnues comme étant difficiles à cibler spécifiquement (Schéma 12).



K_i (nM)			
	***h*CA I**	260	39
	***h*CA II**	6,9	7,6

Schéma 12. Identification d'inhibiteurs sélectifs des isozymes hCA I et hCA II par DCC.

1.5.2. Le criblage par couplage dynamique (Dynamic Ligation Screening, DLS)

1.5.2.1. Principe de la DLS

Apparenté à la DCC classique, le criblage par couplage dynamique (*Dynamic Ligation Screening*, DLS) a été développé par le groupe du Pr. Rademann en 2008.[56] Cette technique combine en partie l'approche DCC pour la formation dynamique des ligands, tout en permettant une détection directe de l'activité enzymatique. Cette stratégie a été mise à profit lors de la recherche de nouveaux inhibiteurs non-peptidiques de la principale protéase à

[55] Nasr, G.; Petit, E.; Vullo, D.; Winum, J.-Y.; Supuran, C. T.; Barboiu, M. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4853–4859.
[56] Schmidt, M. F.; Isidro-Llobet, A.; Lisurek, M.; El-Dahshan, A.; Tan, J.; Hilgenfeld, R.; Rademann, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3275–3278.

cystéine du coronavirus SARS (SARS-CoV M^{pro}), responsable d'atteintes sévères au niveau du système respiratoire (Syndrome Respiratoire Aigu Sévère, SRAS) et dont le site actif est constitué de deux sous-cavités nommées S1 et S1'.

En DLS, la cible, les fragments réactifs (**2** et **3**) et un substrat pro-fluorescent (**1**) sont directement introduis ensemble dans le milieu (Schéma 13).

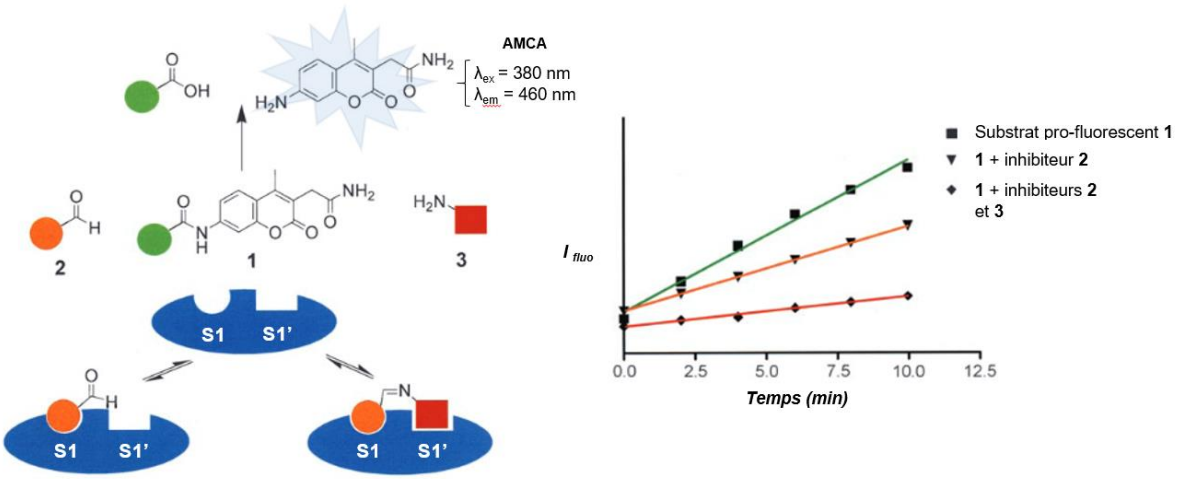


Schéma 13. Principe de la DLS et courbes de suivis par spectroscopie de fluorescence (schéma extrait et modifié de l'article[56]).

La molécule **1** est composé d'une partie peptidique Ac-TSAVLQ (disque vert), possédant une affinité connue pour le site S1, et d'un fluorophore, le 2-(7-amino-4-methyl-3-coumarinyl)acétamide (**AMCA**, λ_{ex} = 380 nm et λ_{ex} = 460 nm), dont les propriétés de fluorescence sont éteintes avec la suppression de l'effet « push-pull » par la liaison amide en position 7 de l'aminocoumarine. L'hydrolyse du lien amide entre la partie peptidique et l'**AMCA** par l'enzyme permet à cette dernière de retrouver instantanément ses propriétés de fluorescence.

Concernant le fonctionnement général, la liaison amide du substrat **1** est clivée par hydrolyse enzymatique à la vitesse maximale (V_{max}) atteignable par la cible, à la concentration donnée en substrat fluorogénique, en l'absence de fragments inhibiteurs et dans les conditions expérimentales données. Ceci permet d'établir une valeur de référence afin d'étalonner les autres tests (courbe verte). Dans le cas où les valeurs de pentes de courbes obtenues seraient inférieures à celle du V_{max}, ce résultat serait alors caractéristique d'une activité inhibitrice vis-à-vis de la cible biologique. Effectivement, si un seul fragment (**2** par exemple) interagit avec la cible, la vitesse d'hydrolyse (V_2) de **1** s'amoindrit

proportionnellement à l'affinité de **2** avec la cible (courbe orange). La même expérience peut également être réalisée avec le fragments **3** afin d'estimer son affinité pour l'enzyme (la courbe correspondante n'est pas représentée dans le schéma 13). Si les fragments **2** et **3** forment un ligand *via* la réaction réversible impliquée (formation d'imine dans ce cas) et que ce dernier est suffisamment afin de l'enzyme pour être stabilisé, la vitesse d'hydrolyse ($V_{\mathbf{2\text{-}3}}$) du substrat **1** va alors diminuer drastiquement. Cette diminution d'activité catalytique, caractérisée par $V_{max} >> V_{\mathbf{2\text{-}3}}$, annonce la découverte d'un potentiel hit (courbe rouge). Les principales différences entre la DCC et la DSL sont regroupées dans le tableau ci-après (Tableau 1).

Techniques	**DCC**	**DSL**
Étapes de synthèse	1) Formation de la DCL par réaction réversible et attente de l'équilibre thermodynamique. 2) Introduction de la cible et incubation. Instauration d'un nouvel équilibre. 3) Réaction ou traitement permettant de figer le système dans son état final.	1) Incubation directe des fragments réactifs (2 à 2 dans différents puits) en présence de la cible puis introduction de la sonde. 2) Réalisation des tests « blancs » en parallèle. Chaque partenaire est incubé en présence de la cible.
Étapes d'analyse et mesures d'activité	1) Identification des hits par comparaison des analyses HPLC-MS entre le mélange équilibré initial (sans cible) et le final (avec cible). 2) Synthèse d'analogues stables des composés identifiés comme potentiels ligands d'intérêt. 3) Mesures des activités des ligands synthétisés.	Identification directe de hits *via* la mesure de l'activité biologique par réaction enzymo-catalysée (mesure et détection réalisées par la méthode de spectroscopie de fluorescence par exemple).
Quantité de cible	Quantités de cible importantes, avec des concentrations élevées (µM à mM) et souvent en quantités stœchiométriques, afin de détecter plus facilement les produits stabilisés.	Quantités de cible relativement faible (≤µM) car exploitation de la catalyse enzymatique pour générer l'activité fluorogénique facilement détectable (nM).

Tableau 1. Caractéristiques divergentes et comparatives entre la DCC et la DSL.

Lors de cette étude, les auteurs ont employé en premier lieu un peptide fonctionnalisé par un aldéhyde (**pep.-ald.**), dont l'affinité pour la poche S1 a servi « d'ancrage » afin d'explorer l'affinité de 234 fragments nucléophiles (amines, thiols et hydrazines aromatiques ou aliphatiques) pour la poche S1'. Une dianiline aromatique (**DAA**) possédant des interactions modérées a été ainsi identifiée (Schéma 14, **A**). Dans une démarche itérative, la **DAA** a alors servi d'ancrage réciproque dans S1' pour permettre l'exploration des combinaisons de fragments non-peptidiques pour la poche S1. Pour cela, un dérivé de **DAA** plus affin et possédant des fonctions aldéhyde et aniline acétylée a été employé (**Ald.-AA**). Pour cette deuxième phase, 110 amines potentiellement affines de la poche S1 ont été étudiées. Le fragment hétérocyclique aminé (**FHA**) s'est alors démarqué (Schéma 14, **B**). Finalement, la combinaison des fragments **Ald.-AA** et **FHA** a permis l'obtention du **ligand final** non peptidique possédant une bonne constante d'inhibition K_i = 2.9 µM vis-à-vis de la cible SARS-CoV M^{pro} (Schéma 14, **C**).

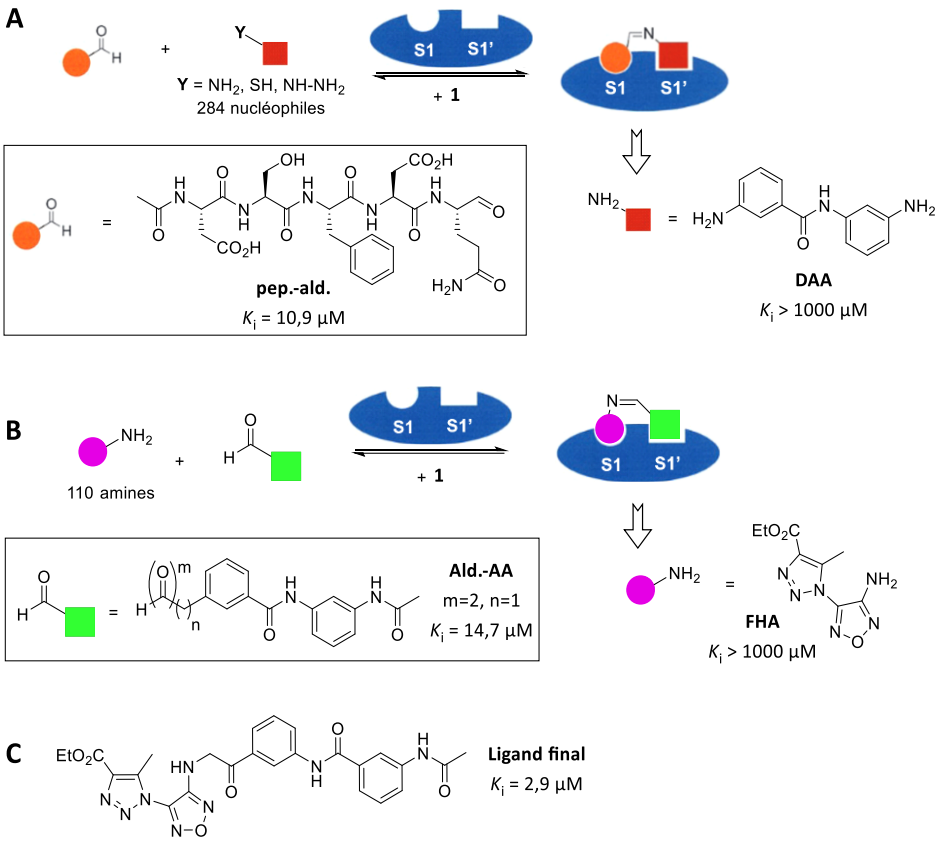


*Schéma 14. (**A**) Recherche de fragments affins de S1' par ancrage peptidique de S1. (**B**) Recherche de fragments non-peptidiques affins de S1 par ancrage dans la poche S1'. (**C**) Structure du ligand final par combinaison de fragments.*

Finalement, la DSL est une méthode transposable à toute activité enzymatique et à un format HTS classique, dont le matériel diverge peu. Grâce à l'utilisation directe de l'activité

catalytique de l'enzyme, des quantités très faibles de cible (quelques nM-µM) sont employées. De plus, la détection par spectroscopie de fluorescence permet de déceler de très faibles interactions de fragments avec la cible (quelques mM), ce qui est d'ordinaire particulièrement très difficile à observer avec les méthodes conventionnelles de la DCC, ce qui a donc repoussé les limites de détection analytique. Le recours à des librairies de fragments limitées (10^2–10^3 composés) et la possibilité de procéder de manière itérative sont également des points forts de la DSL, ce qui permet une accélération de la phase de recherche et une économie de produits (bio)chimiques conséquente.

Par ailleurs, bien que la DSL ait été appliquée sur d'autres cibles enzymatiques, comme la protéase aspartique β-secrétase (BACE-1),[57] et que d'autres stratégies dérivées aient été explorées,[58] il demeure indispensable que la cible biologique intervienne de manière catalytique dans ce processus (enzymo-catalyse), ce qui limite fortement la nature même de celle-ci.

La troisième déclinaison de la TGS, qui opère *via* la mise en jeu de réactions irréversibles et faisant l'objet de ces travaux de thèse, va maintenant être décrite plus en détail.

1.5.3. La synthèse guidée par la cible sous contrôle cinétique (Kinetic Target-Guided Synthesis, KTGS)

1.5.3.1. Principe et historique de la KTGS

Contrairement aux deux premières stratégies présentées précédemment, la synthèse guidée par la cible sous contrôle cinétique (*Kinetic Target-Guided Synthesis*, KTGS) repose sur l'établissement de liaison(s) covalente(s) stable(s) et irréversible(s) entre des fragments réactifs portant des fonctions chimiques complémentaires (Schéma 15).[59]

[57] Fernández-Bachiller, M. I.; Horatscheck, A.; Lisurek, M.; Rademann, J. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 1041–1056.
[58] Schmidt, M. F.; Rademann, J. *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 512–521.
[59] Bosc, D.; Jakhlal, J.; Deprez, B.; Deprez-Poulain, R. *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 381–404.

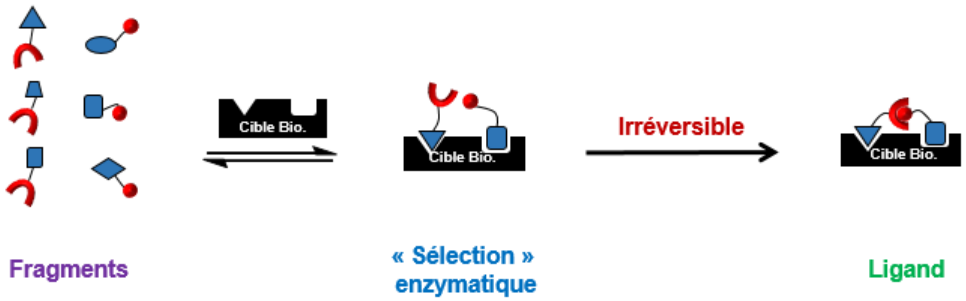


Schéma 15. Principe général de la KTGS.

La cible biologique peut « sélectionner » des fragments présents dans le milieu selon leurs affinités respectives. Le rapprochement de ces derniers, au sein même de la cible, va permettre l'adoption de dispositions et d'orientations spatiales idéales des fragments et de leurs fonctions réactives, afin de promouvoir la formation de liaisons covalentes irréversibles entre eux (effet « template »). Ainsi, la cible biologique va servir de « catalyseur » dans la formation de son propre ligand, non pas au sens enzymo-catalytique et biologique classique, mais dans le sens d'activateur énergétique (diminution de l'énergie d'activation de la réaction) par effet *template*.

La première pierre de la KTGS fût posée par accident en 1969, lorsque que Chase et Tubbs observèrent pour la première fois une réaction de S-alkylation *in situ* entre deux partenaires réactifs à l'aide d'une enzyme (Schéma 16).[60] Initialement, l'objectif de leur recherche était de fonctionnaliser des résidus d'acides aminés présents dans le site actif d'une enzyme, la carnitine *O*-acétyltransférase (CAT). Pour cela, ils ont employé des substrats dérivés de la (-)-carnitine (**Cn**), la bromoacétyl-carnitine (**BrAcCn**) qui est électrophile, et de la coenzyme A réduite (**CoASH**) qui est nucléophile. Les auteurs ont alors observé une très forte accélération de la réaction entre la **BrAcCn** et la **CoASH** en présence de la CAT, malgré leur faible réactivité en temps normal. Parallèlement, les auteurs ont mesuré les constantes de dissociation de l'adduit formé au sein de la CAT, ainsi que des molécules naturelles que sont la coenzyme A acétylée (**AcCoA**) et de la (-)-acétylcarnitine (**AcCn**) comme modèles de réactifs de départ, vis-à-vis de cette cible biologique. Les valeurs obtenues ont été respectivement de 12 nM, 34 µM et 350 µM, ce qui a démontré un effet synergique entre les deux partenaires de départ lors de la formation du ligand *in situ*.

[60] Chase, J. F. A.; Tubbs, P. K. *Biochem. J.* **1969**, *111*, 225–235.

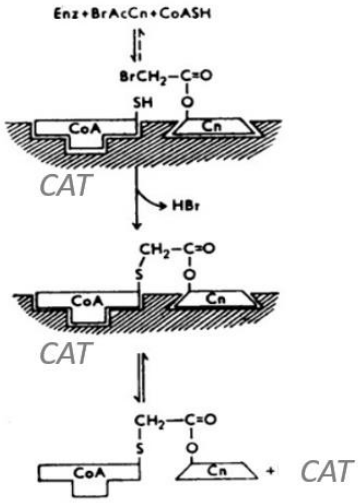


Schéma 16. Schéma de principe de la première expérience de KTGS par Chase et Tubbs (schéma extrait et modifié de l'article[60]*).*

La discussion et les observations contenues dans leur article ont ainsi permis de poser il y a maintenant 51 ans les principes et paramètres fondamentaux de la KTGS :

- la cible doit comporter au moins deux sites d'interaction pour « ancrer » chacun des deux fragments, favorisant ainsi leur proximité spatiale et permettant la formation du ligand (bi)dentate *via* l'établissement d'un lien covalent entre eux.
- La réaction employée doit être est très lente en absence de catalyseur et/ou de la cible biologique, afin d'éviter tout faux positif et de pouvoir observer une nette accélération de la cinétique en présence de la cible. Ce point concernant la cinétique réactionnelle sera détaillé et approfondi plus loin dans ce chapitre.
- Effet super-additif des fragments : le produit des énergies libres d'interaction (E_{li}) des complexes fragment-enzyme ($E_{li\ Fg\text{-}Ez}$) est très supérieur à la valeur de l'E_{li} du complexe ligand-enzyme ($E_{li\ Ld\text{-}Ez}$). En effet, un seul terme entropique défavorable entre en compte dans le cadre de l'interaction ligand-enzyme, contre deux dans le cas des interactions fragments-enzymes. Ainsi, le ligand final possède une affinité (constante d'association, K_a) bien supérieure à la somme des affinités des fragments seuls par rapport à l'enzyme ($\Delta G = -RT \times \ln(K_a)$). Ceci implique donc qu'un changement important de conformation dans le complexe ligand- enzyme permettrait également de favoriser ces interactions. Les travaux de Kirby en 1980,[61] portant sur la compréhension

[61] Kirby, A. J. *Adv. Phys. Org. Chem.* **1980**, *17*, 183–278.

mécanistique de réactions enzymatiques, puis ceux de Jencks en 1981,[62] décrivant l'influence des énergies additives d'interaction et de stabilisation des complexes ligand-enzyme par une approche thermodynamique, ont permis d'étayer ces conclusions.

Cependant, un paramètre plus récent concernant la réaction elle-même a été ajouté par la suite :

- La formation du lien covalent stable et irréversible entre les deux fragments doit s'effectuée *via* une réaction biocompatible. L'objectif est ainsi de limiter les interférences avec les fonctions chimiques portées par la biomolécule, évitant ainsi sa dénaturation et toute autre réaction parasite.

Suite à ces premiers travaux, Rideout a souhaité développer la formation d'une cytotoxine anti-cancéreuse (**DIOG**) à partir de deux fragments moins toxiques, le décanal (**DCAL**) et la *N*-amino-*N'*-1-octylguanidine (**AOG**), et ceci en vue d'applications ultérieures *in vivo*. La finalité était de pouvoir réduire les effets secondaires provoqués par la **DIOG** en raison de sa forte cytotoxicité en la générant spécifiquement et directement dans l'organisme (Schéma 17, **A**).[63] Il mit ainsi en évidence la formation *in situ* de la cytotoxine par l'hémoglobine de lysats d'érythrocytes grâce à la formation d'une liaison hydrazone stable.

Quelques années plus tard, suite à la conception de nouvelles structures biomimétiques d'inhibiteurs de la glycinamide ribonucléotide transformylase (GAR Tfase)[64] visant à réduire les réactions d'oxydation et d'hydrolyse *in vivo/vitro* des molécules naturelles,[65] Benkovic et Boger sont parvenus à former *in situ* des liaisons thio-éther (1991)[66] et imine stable (1997)[67] à partir de cette même enzyme (Schéma 17, **B**). A partir de ce moment, l'expansion de la stratégie de KTGS a alors réellement démarré en chimie médicinale.

[62] Jencks, W. P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, *78*, 4046–4050.

[63] Rideout, D. *Science*, **1986**, *233*, 561–563.

[64] J. K. De Martino, D. L. Boger, *Drugs Future,* **2008**, *33*, 969–979.

[65] Inglese, J.; Blatchly, R. A.; Benkovic, S. J. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 937–940.

[66] Inglese, J.; Benkovic, S. J. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2351–2364.

[67] Boger, D. L.; Haynes, N.-E.; Kitos, P. A.; Warren, M. S.; Ramcharan, J.; Marolewski, A. E.; Benkovic, S. J. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1817–1830.

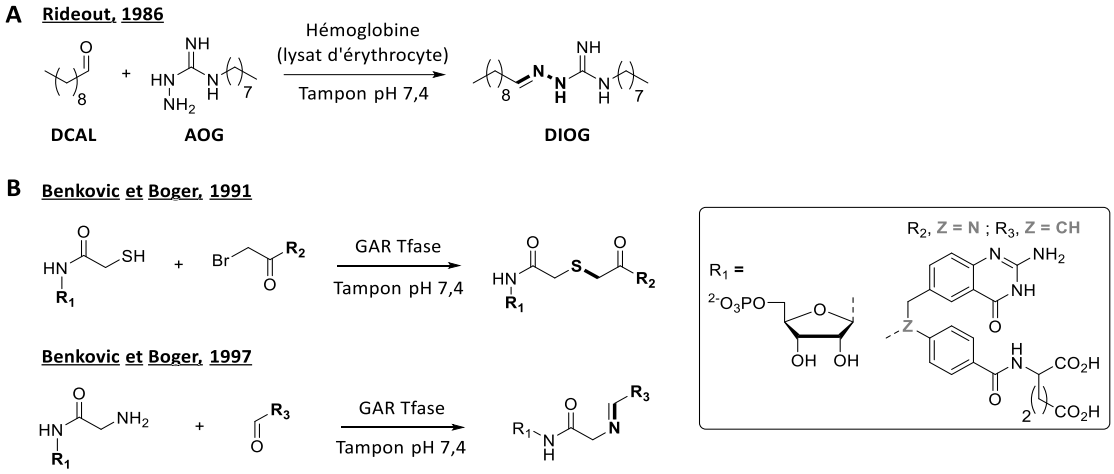


Schéma 17. (A) Formation in situ de liaison hydrazone stable par l'hémoglobine. (B) Formation in situ de liaisons thio-éther (1991) et imine stable (1997) par la GAR Tfase à partir de dérivés biomimétiques.

La KTGS est aujourd'hui devenue une méthode puissante et directe pour l'identification de composés affins. Son emploi en fait un atout majeur en chimie médicinal, tant pour la découverte de hits que pour l'optimisation de leads.

Par exemple, l'étude préliminaire de FBDD vis-à-vis de la protéase aspartique endothiapepsine a permis à l'équipe de Klebe d'identifier 11 hits à partir d'une librairie chimique de 364 fragments (Schéma 18, **A**).[68] Deux fragments ont été sélectionnés et leur combinaison, assistée par du docking moléculaire, a permis d'identifier des partenaires potentiels pour une exploration en KTGS.[69] Grâce à l'utilisation de seulement quatre partenaires alcynes et neuf partenaires azotures, quatre composés sur 36 combinaisons possibles ont pu être identifiés comme hits grâce à une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen *in situ*(Schéma 18, **B**). Le meilleur de ces hits identifiés a présenté une activité inhibitrice (IC_{50})[70] intéressante de 43 µM, alors que les partenaires alcyne terminal et azoture de départ ont présenté des IC_{50} respectives de 142 µM et 0 µM (pas d'inhibition), ce qui prouve l'efficacité de cet outil en identification et en design de molécules actives.

[68] Köster, H.; Craan, T.; Brass, S.; Herhaus, C.; Zentgraf, M.; Neumann, L.; Heine, A.; Klebe, G. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7784–7796.

[69] Mondal, M.; Unver, M. Y.; Pal, A.; Bakker, M.; Berrier, S. P.; Hirsch, A. K. H. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 14826–14830.

[70] IC_{50} : concentration inhibitrice médiane d'une molécule envers une cible biologique (concentration en inhibiteur pour laquelle l'activité de la cible est réduite à 50 % de sa valeur basale).

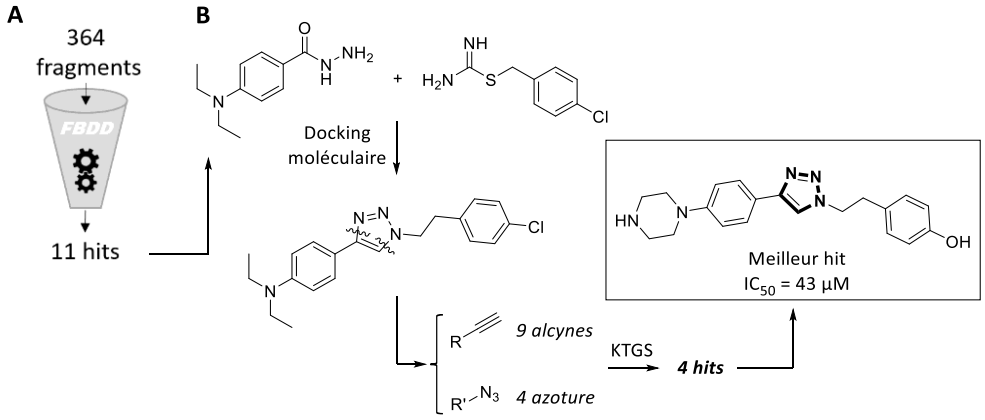


*Schéma 18. (**A**) Génération préliminaire de hits par FBDD. (**B**) Séquence de combinaison et d'optimisation de fragments, de docking moléculaire et de KTGS.*

1.5.3.2. Domaines thérapeutiques ciblés et cibles biologiques impliquées en KTGS

Depuis les 20 dernières années, la KTGS a pu prouver son utilité grâce à son implication dans de multiples domaines thérapeutiques, dont les limites se voient régulièrement repoussées (Figure 9, **A**).[71] La majorité des cas se concentrent sur les domaines de l'infection, de l'oncologie et des pathologies du système nerveux central (SNC), mais certaines cibles pourraient être comptabilisées dans plusieurs domaines à la fois. La répartition des classes de cibles biologiques met clairement en relief le fait que les enzymes en constituent une part prépondérante, avec 73 % des applications de KTGS (Figure 9, **B**).[71] L'arborescence de ces enzymes indique également que de nombreuses familles, représentant cinq classes enzymatiques sur six, ont été engagées en KTGS.[72]

[71] Bosc, D.; Camberlein, V.; Gealageas, R.; Castillo-Aguilera, O.; Deprez, B.; Deprez-Poulain, R. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 3817–3833.

[72] Six classes enzymatiques : Oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases et ligases (non représentées en KTGS pour ces dernières).

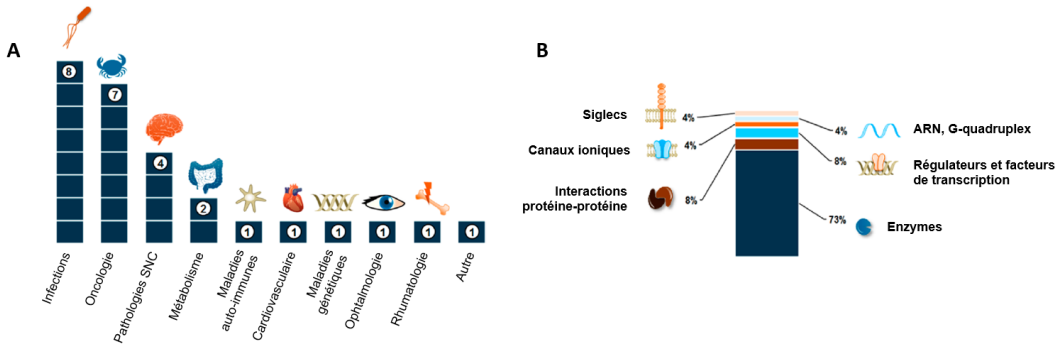


*Figure 9. (**A**) Thématiques thérapeutiques couvertes par la KTGS. (**B**) Répartition des classes de cibles impliquées dans des projets de KTGS[73] (figures **A** et **B** extraites et modifiées de la revue[71])*

En 2018, l'équipe du Dr. Hirsch a étudié les propriétés des poches enzymatiques de protéines engagées en KTGS, notamment afin d'établir un modèle prédictif visant à déterminer si une cible potentielle serait applicable au développement de médicaments et si elle serait éligible pour des expériences en KTGS.[74] Quatre paramètres ont été retenus pour cette étude : 1) le volume de la cavité enzymatique ; 2) sa profondeur maximale entre le fond et l'entrée de la cavité; 3) son ratio d'exposition (ratio entre la surface en contact du solvant vers l'entrée de la poche et la surface globale de la cavité) ; 4) la fraction de résidus d'acides aminés apolaires (AA_{ap}) dans sa séquence. Pour cette étude, 12 enzymes employées en KTGS ont été comparées à 20 enzymes possédant des ligands commerciaux (PLC) et choisies aléatoirement. Les résultats de comparaison sont résumés ci-dessous (Tableau 2).

	Volume (Å³)	*Profondeur (Å)*	*Ratio exposition*	*Fraction AA_{ap}*
Cavités KTGS	1445	26	0,144	0,42
Cavités PLC	1338	26,5	0,077	0,53

Tableau 2. Données comparatives des cavités enzymatiques de KTGS et des PLC.

Du point de vue dimensionnel, les cavités de KTGS et de PLC présentent des volumes et des profondeurs maximales très similaires. En revanche, les cavités de KTGS contiennent plus de résidus d'acides aminés apolaires par rapport à celles de PLC, mais la plus grosse différence se trouve être le ratio d'exposition avec un rapport de presque deux en faveur des cavités de KTGS. Ceci exprime le fait que les poches enzymatiques de KTGS sont plus « ouvertes » vers le solvant et moins profondes. Les auteurs ont supposé que ce paramètre

[73] Siglecs : Famille enzymatique constituée de 15 récepteurs d'acide sialique (lectines du type « immunoglobulines-like ») et particulièrement exprimée par les cellules immunitaires.

[74] Unver, M. Y.; Gierse, R. M.; Ritchie, H.; Hirsch, A. K. H. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 9395–9409.

permet effectivement une meilleure diffusion des fragments réactifs dans la cavité, augmentant ainsi les chances de succès pour la réaction *in situ*. Cependant, étant donné la petite dimension d'échantillonnage pour l'étude et le fait que trois cibles sur 12 de KTGS soient des interactions protéine-protéine, ce résultat a de fortes chances d'être biaisé. En définitif, les auteurs ont exprimé le fait qu'aucune exigence structurale particulière ne semble contre-indiquer l'utilisation de la KTGS sur l'ensemble des cibles enzymatiques.

D'un autre côté, les dernières années ont été les plus exploratoires et les plus riches en termes de nouvelles cibles biologiques étudiées en KTGS (ARN et G-quadruplex, interactions protéine-protéine, ribosomes…), ce qui laisse supposer que cette tendance pourrait encore s'accentuer dans les années à venir et pourrait enrichir la diversité des cibles. De plus, la stratégie KTGS est maintenant arrivée à sa maturité technique et théorique, ce qui devrait à terme encourager son emploi pour de nouvelles applications et ce notamment par les groupes pharmaceutiques privés.[71]

1.5.3.3. Les réactions décrites en KTGS[59,75]

Comme expliqué précédemment, le recours à des réactions biocompatibles voire bio-orthogonales, selon la définition du Pr. Bertozzi,[76] est indispensable en TGS et plus particulièrement dans sa version sous contrôle cinétique qui met en jeu la formation de liens irréversibles. Effectivement, les réactions éligibles en KTGS doivent pouvoir survenir en conditions physiologiques (pH ≈ 7, température ≤ 37 °C, pression ≈ 1 atm., etc.) et sans dénaturer les cibles thérapeutiques, voire interférer avec les processus biologiques dans le cas de réactions réalisées dans les milieux biologiques.

Ainsi, les fonctions chimiques complémentaires portées par les fragments et qui entreront en réaction au sein de la cible, ainsi que la fonction chimique qui en résulte, doivent remplir un cahier des charges restreint mais stricte :

- Les fonctions réactives doivent être biocompatibles, voire bio-orthogonales

[75] (a) Xiangdong, H.; Manetsch, R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1316–1324. (b) Oueis, E.; Sabot, C.; Renard, P.-Y. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 12158–12169.

[76] (a) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998. (b) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666–676.

- Les fonctions réactives doivent être de petites dimensions afin de minimiser leur impact sur l'affinité du fragment pour la cible biologique
- La fonction formée (lien) doit être irréversible et stable dans les conditions de KTGS et lors des analyses
- Le produit de la réaction doit pouvoir être obtenu facilement par voie organique afin de préparer le produit de référence

D'autre part, la formation d'un lien covalent entre deux fragments dans la cible biologique est rendue possible par la stabilisation d'une conformation productive de ces deux derniers au sein de la cible biologique, définissant ainsi une géométrie préférentielle de l'état de transition de la réaction.[59] Afin de garantir une bonne énergie de stabilisation du complexe ligand final-cible biologique, il est important de choisir si possible des réactions dont le produit final possède une géométrie spatiale très proche de celle de l'état de transition, ce qui est par exemple le cas des réactions de cycloadditions.[41]

Par ailleurs, il est important que la cinétique de la réaction en l'absence de la cible biologique soit suffisamment faible afin que l'accélération induite par la cible puisse être observable et sans ambiguïté dans l'échelle de temps de la KTGS (Figure 10).[42,75(b)] Cette accélération cinétique sera essentiellement gouvernée par un facteur entropique (restriction du degré de liberté des fragments au sein de la cible), voire enthalpique (diminution de l'énergie d'activation de la réaction par la mise en jeu de liaisons faibles).

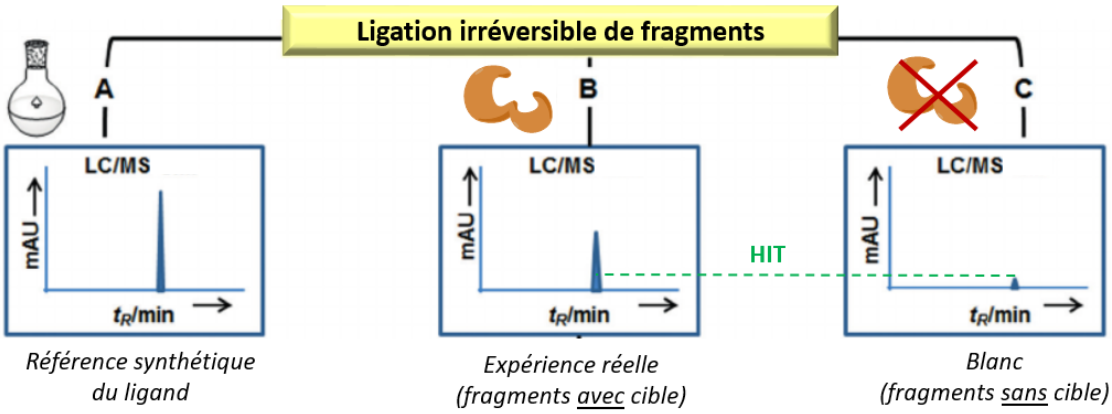


Figure 10. Démarche générale des expériences comparatives de KTGS grâce à l'effet d'accélération cinétique (figure extraite et modifiée de la revue[42])

Depuis la première alkylation *in situ* d'un thiol par Chase et Tubbs, le nombre de réactions éligibles en KTGS a augmenté de manière peu constante dans le temps. Aujourd'hui,

après 51 ans de recherche, seulement 14 réactions ont pu être décrites dans la littérature et se répartissent selon l'établissement de liaisons C-N, C-C, C-C combinées avec C-N et enfin C-S (Schéma 19). Ainsi, optimiser une réaction pour de potentielles application en KTGS peut s'avérer être un véritable défi scientifique et un travail de longue haleine. Les réactions de KTGS présentées sont détaillées selon leur type de liaisons covalentes formées.

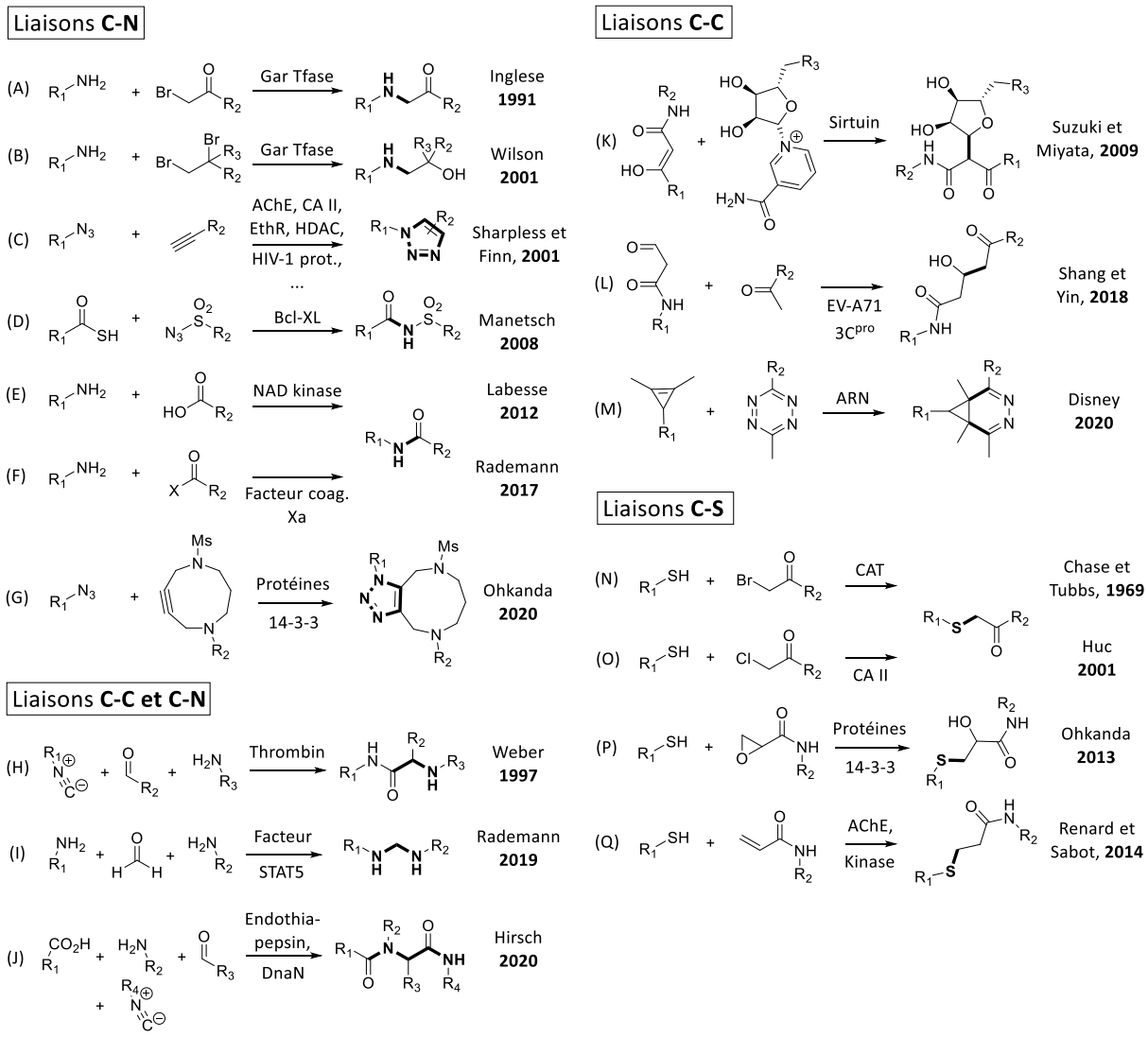


Schéma 19. Répartitions chronologique des réactions décrites en KTGS en fonction de la nature de la liaison formée.

(A) Substitution nucléophile ; (B) Ouverture d'époxyde (formation *in situ*) par addition nucléophile d'amine ; (C) Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen (réaction de « click ») ; (D) Séquence addition-cycloaddition-rétro cycloaddition [3+2] (réaction de « sulfo-click ») ; (E) et (F) Amidation ; (G) Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen avec un alcyne sous contrainte de cycle ; (H) Réaction de Ugi à trois partenaires ; (I) Réaction modifiée de Mannich ; (J) Réaction de Ugi à quatre partenaires ; (K) Substitution nucléophile ; (L) Aldolisation ; (M) Cycloaddition et rétro-cycloaddition de Diels-Alder ; (N) et (O) Substitution nucléophile ; (P) Ouverture d'époxyde par addition nucléophile de thiols ; (Q) Addition de thia-Michael.

Le choix de la réaction la plus adaptée pour les recherches à mener va être conditionné par différents paramètres tels que l'accessibilité des fragments réactifs (facilité de synthèse et de fonctionnalisation), la nature et la structure de la cible biologique (activité biologique,

topologie, stabilité…) ou encore les conditions expérimentales employées. En effet, certaines fonctions réactives peuvent potentiellement réagir de manière parasite avec la cible (alkylation de chaîne latérales des résidus protéiques dans le cas de réactifs électrophiles par exemple) ou être hydrolysées ou oxydées dans les conditions expérimentales employées (pH, type de tampon, température…). De même, la structure et les dimensions de ces fonctions peuvent ne pas être en adéquation avec la topologie de la cible biologique et notamment avec la géométrie des sites d'interactions visés. L'activité biologique naturelle de la cible peut également être un obstacle et conduire à des dégradations des fragments réactifs. En effet, des enzymes de la famille des hydrolases comme les protéases ou les estérases pourraient hydrolyser des fonctions amides ou esters présentes sur les fragments et donc conduire à l'échec des expériences de KTGS.

A - **Formation de liaisons C-N**

- *Substitution nucléophile du bromoacétamide par une amine*

En parallèle de leurs travaux sur la substitution nucléophile du bromoacétamide **3** par une fonction thiol, Boger et Benkovic se sont intéressés au même type de réaction en employant cette fois une amine primaire (**1** et **2**) comme fonction nucléophile (Schéma 20).[66] Les constantes de dissociation des produits formés par catalyse de la GAR Tfase (**GADDF** et **GCADDF**) se sont avérées être de l'ordre du subnanomolaire (nM), mais malheureusement les valeurs pour les réactifs correspondants **1** ou **2** et **3** ne sont pas reportés dans l'article. Cependant, les auteurs ont mentionné qu'un effet synergique était observé *via* la formation d'un ligand unique par réaction entre les deux réactifs.

Par ailleurs, le réactif **3** s'est avéré instable car très réactif par sa fonction bromoacétamide, ce qui a compliqué son emploi en KTGS.

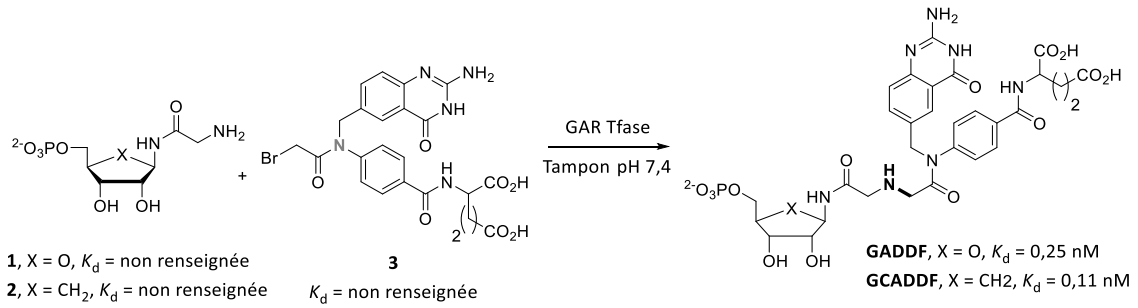


Schéma 20. Substitution nucléophile catalysée par la GAR Tfase d'un bromoacétamide par une amine.

- *Ouverture d'époxyde par addition nucléophile d'amine primaire*

Suite à ce premier résultat, les auteurs ont entrepris la synthèse et l'emploi du composé dibromé **4**, moins réactif que son analogue **3**, mais observèrent un résultat inattendu (Schéma 21).[77]

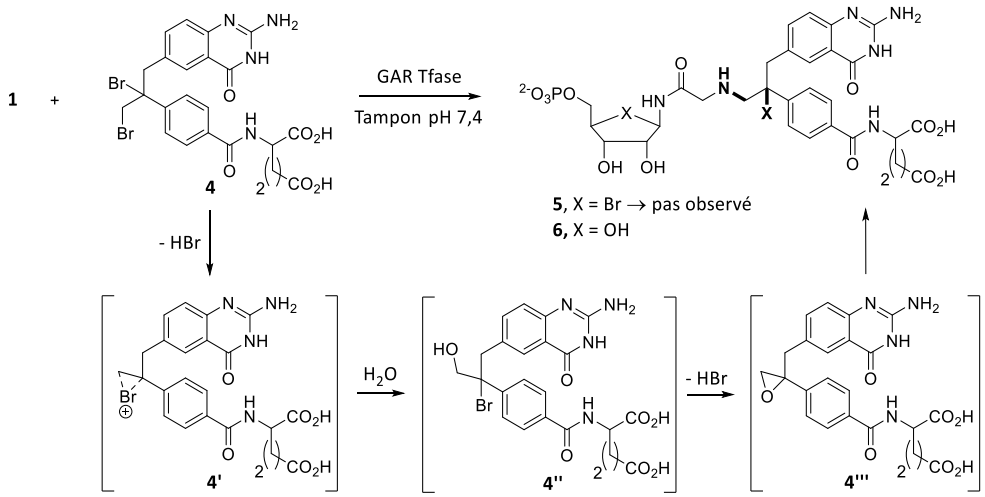


Schéma 21. Addition nucléophile avec ouverture d'époxyde (généré in situ*) par une amine.*

Le produit bromé **5** qui était attendu initialement n'a pas été observé lors de la réaction avec la GAR Tfase. A la place, les auteurs ont pu observer la formation de l'alcool **6**. Après des études analytiques (RMN ^{1}H et MS), il s'est avéré que le composé **4** était instable en milieu aqueux et générait des intermédiaires en chaîne : 1) génération du pont bromonium **4'** ; 2) addition d'eau et génération de la bromhydrine **4''** ; 3) formation intramoléculaire de l'époxyde **4'''**, le « véritable » partenaire électrophile de la réaction catalysée par la GAR Tfase.

- *Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen (réaction dite « click »)*

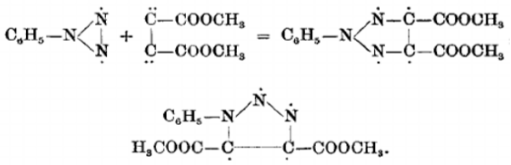
La cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture organique et un alcyne a été découverte il y a plus de 127 ans par Arthur Michael.[78] Pour cela, il mit en réaction l'azoture de phényle et le diméthyl-but-2-ynedioate et observa la formation d'un cycle aromatique 1,2,3-triazole **7** après une activation thermique de 100 °C pendant huit heures (Schéma 22).

[77] Greasley, S. E.; Marsilje, T. H.; Cai, H.; Baker, S.; Benkovic, S. J.; Boger, D. L.; Wilson, I. A. *Biochemistry* **2001**, *40*, 13538–13547.

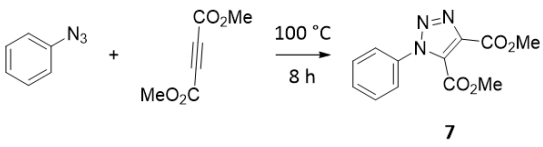
[78] Michael, A. *J. Prakt. Chem.* **1893**, *48*, 94–95.

Éminent spécialiste des réactions de cycloaddition, le Pr. Huisgen (1920 – 2020) reprendra ces travaux plusieurs décennies plus tard et deviendra ainsi le « père » de la chimie click.[79]

A



B



7

*Schéma 22. (**A**) Première réaction de click par Michael (schéma original extrait de l'article[78]). (**B**) Première réaction de click par Michael.*

La cycloaddition de Huisgen, dite réaction de « click » (qui n'est qu'un exemple de ces réactions répondant aux critères des réactions click énoncé par le Pr. Sharpless) est aujourd'hui devenue incontournable dans de nombreux domaines comme la bioconjugaison, la chimie médicinale, les biotechnologies, les (bio)polymères et la science des matériaux, etc.[80] Ce succès s'explique notamment par la facilité de fonctionnalisation de (bio)molécules par ces deux fonctions de petites dimensions et leur caractère « transparent » car très peu réactifs en milieux biologiques. Elles sont ainsi très souvent qualifiées de fonctions « bioorthogonales », même si la réduction des azotures aliphatiques[81] et aromatiques[82] en présence de biothiols ou du gazotransmetteur H_2S [83] est connu depuis longtemps.

Les 1,2,3-triazoles (*anti* et *syn*) sont de plus des bioisostères des liaisons amides respectivement de géométrie *E* et *Z*. Ils sont également dotés d'une très grande stabilité chimique en milieux biologiques (dégradation enzymatique, hydrolyse, oxydation, réduction…) et supportent une très large gamme de pH (Figure 11).[84]

---

[79] Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 565–598.

[80] Pour un bilan sur l'emploi et les applications des azotures organiques, voir : (a) Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249–1262. (b) Lutz, J.-F.; Zarafshani, Z. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 958–970. (c) Pickens, C. J.; Johnson, S. N.; Pressnall, M. M.; Leon, M. A.; Berkland, C. J. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 686–701.

[81] Handlon, A. L.; Oppenheimer, N. J. *Pharm. Res.* **1988**, *5*, 297–299.

[82] Staros, J. V.; Bayley, H.; Standring, D. N.; Knowles, J. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *80*, 568–572.

[83] (a) Zhao, M.; Li, H.; Li, H.; Qiao, Q.; Cao, C.; Xu, Z. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 86355–86358. (b) Henthorn, H. A.; Pluth, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15330–15336. (c) Renault, K.; Renard, P.-Y.; Sabot, C. *New J. Chem.* **2017**, *41*, 10432–10437.

[84] Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 278–308.

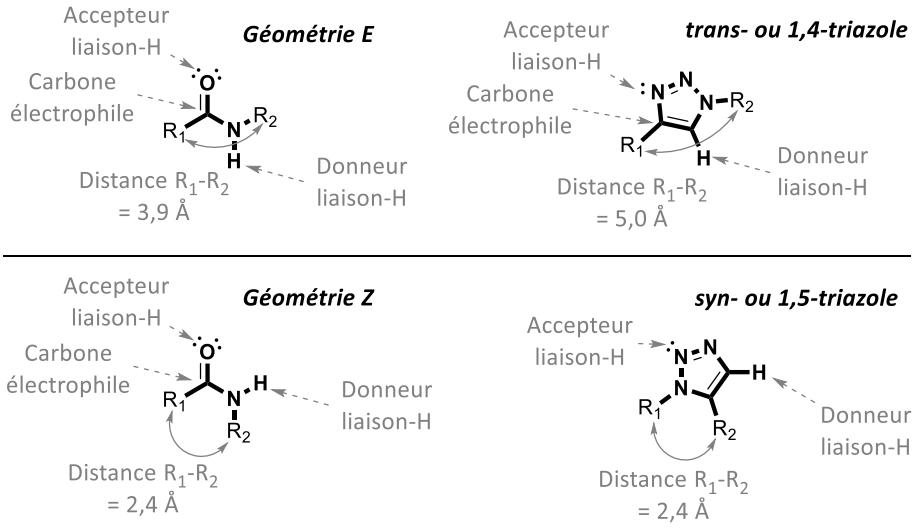


Figure 11. Comparaisons des liaisons amides avec leur bioisostères 1,2,3-triazoles.

Face à l'engouement suscité par cette chimie et aux nombreuses applications envisageables en chimie médicinale,[85] plusieurs méthodes ont été développées afin d'obtenir sélectivement chacun des deux régioisomères *anti*-triazole ou *syn*-triazole. Il faut rappeler que l'activation thermique, généralement menée sur une durée de plusieurs jours et couramment sans solvant, conduit à un mélange de régioisomères souvent inséparables et en quantités quasi-stœchiométriques (Schéma 23, A).[86] En 2002, les groupes des Pr. Sharpless et Meldal ont indépendamment développé un système catalytique utilisant une catalyse au cuivre (I) (**CuAAC**) et conduisant sélectivement au 1,4-triazole (Schéma 23, B).[87] Quatre points forts se dégagent de cette méthode : 1) la réaction peut être menée dans les milieux aqueux/physiologiques ; 2) le cuivre (I) est un catalyseur peu coûteux et abondant, bien que moyennement stable ; 3) la réaction possède une très grande tolérance fonctionnelle (alcools, amines, acides, amides …) et peut être réalisée avec des biomolécules (protéine, ADN...) ; 4) une source de cuivre (II) plus stable peut être employée et réduite *in situ* par l'ascorbate de sodium (vitamine C) pour conduire au cuivre (I) catalytique. Par ailleurs, de nombreux catalyseurs au ruthénium (**RuAAC**) ont également été employés afin de préparer sélectivement les 1,5-triazoles, même si quelques exemples montrent une totale sélectivité

[85] (a) Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 1128–1137. (b) Thirumurugan, P.; Matosiuk, D.; Jozwiak, K. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4905–4979. (c) Meghani, N. M.; Amin, H. H.; Lee, B.-J. *Drug Discov. Today* **2017**, *22*, 1604–1619.

[86] Chatkewitz, L. E.; Halonski, J. F.; Padilla, M. S.; Young, D. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 81–84.

[87] (a) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.,* **2002**, *41*, 2596-2599; (b) C. W. Tornoe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.,* **2002**, *67*, 3057-3064.

pour les 1,4-triazoles (Schéma 23, C).[88] De même, des stratégies impliquant des organomagnésiens[89] et des organozinciques[90] ont permis d'accéder aux *syn*-triazoles de manières efficaces et sélectives (Schéma D).

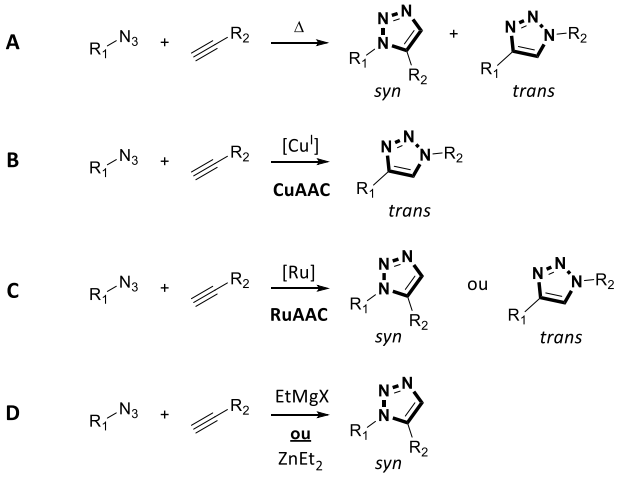


*Schéma 23. Réaction click par : (**A**) Activation thermique.*[86] *(**B**) Catalyse par le cuivre (I).*[87 (a)(b)] *(**C**) Catalyse par le ruthénium.*[88] *(**D**) Activation des organomagnésiens*[89] *ou des organozinciques.*[90]

L'utilisation de la réaction de Huisgen en KTGS est inspirée des travaux pionniers de Mock en 1983, décrivant la formation régiosélective du triazole en présence du catalyseur organique cucurbiturile (**CCLE**), un macrocycle composé d'unité glycoluriles (Schéma 24, **A**).[91] En effet, l'*anti*-triazole **10** est formé régiosélectivement à partir de l'alcyne **8** et de l'azoture **9**, en milieux aqueux acide (acide formique 88%) en présence du **CCLE** et à 40 °C (Schéma 24, B). Les études d'interactions par RMN entre les réactifs et le **CCLE** suggèrent effectivement que des liaisons hydrogènes entre les ammoniums de **8** et **9** et les fonctions urées du catalyseur permettent une orientation antiparallèle des fonctions réactives (alcyne et azoture) vers l'intérieur hydrophobe du **CCLE**, expliquant la régiosélectivité *anti* observée. Comparativement, la même réaction menée en l'absence de **CCLE** et dans les mêmes conditions conduit à un mélange de deux régioisomères **10**. Une accélération de la cinétique d'un facteur ± 10^5 a de plus été observé lorsque le **CCLE** est présent dans le milieux

[88] (a) Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998–15999. (b) Johansson, J. R.; Beke-Somfai, T.; Said Stålsmeden, A.; Kann, N. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 14726–14768.

[89] Krasiński, A.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1237–1240.

[90] Smith, C. D.; Greaney, M. F. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4826–4829.

[91] Mock, W. L.; Irra, T. A.; Wepsiec, J. P.; Manimaran, T. L. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3619–3620.

réactionnel.[92] L'ensemble de ces observations était effectivement favorable à l'utilisation de cette réaction en KTGS.

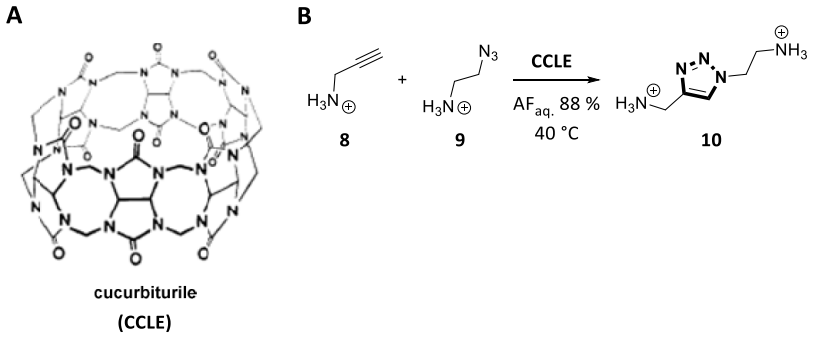


*Schéma 24. (**A**) Structure du **CCLE**. (**B**) Réaction de click régiosélective catalysée par le CCLE.*

Inspiré par ces travaux, le groupe du Pr. Sharpless a donc établi en 2002 la première preuve de concept de « click *in situ* » en employant l'acétylcholinestérase (AChE) comme cible thérapeutique et à partir de fragments réactifs comportant des fonctions azotures et alcynes terminaux (Schéma 25).[93] Sur 98 inhibiteurs potentiels (combinaison de toutes les structures de partenaires, des différentes longueurs de chaînes et des différents régioisomères *syn*/*anti* possibles), seulement quatre molécules (***syn*-TZ2/PA5**, ***syn*-TZ2/PA6**, ***syn*-TA2/PZ5** et ***syn*-TA2/PZ6**) ont pu être détectées, ce qui prouve la très forte sélectivité de l'enzyme lors de la « sélection » des réactifs et la promotion de la cycloaddition. Les ligands ainsi obtenus par KTGS restent encore aujourd'hui parmi les meilleurs inhibiteurs non-covalents connus, avec une gamme de K_D comprise entre 77 et 410 fM.

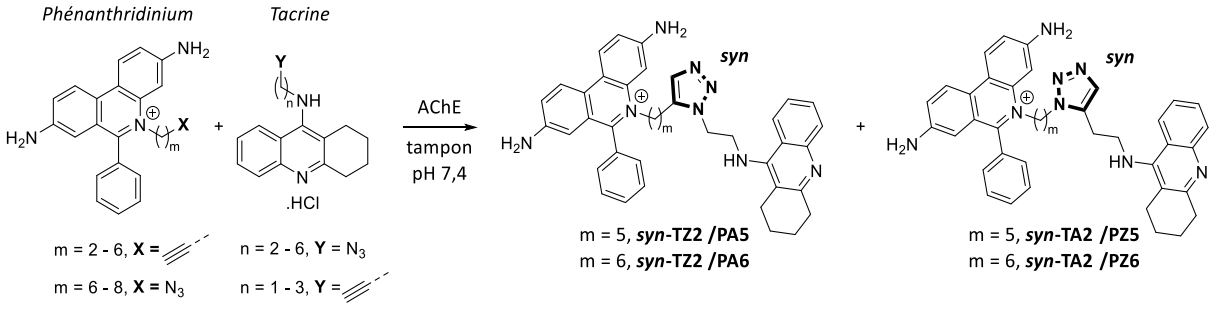


Schéma 25. Cycloaddition de Huisgen in situ *en présence de l'AChE.*

T = tacrine ; P = phénanthridinium ; A = alcyne ; Z = azoture ; m et n = nombre de CH_2.

[92] Mock, W. L.; Irra, T. A.; Wepsiec, J. P.; Adhya, M. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5302–5308.

[93] (a) Lewis, W. G.; Green, L. G.; Grynszpan, F.; Radić, Z.; Carlier, P. R.; Taylor, P.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1053–1057. (b) Manetsch, R.; Krasiński, A.; Radić, Z.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb H. C. *J. Am. Chem. Soc*. **2004**, *126*, 12809-12818.

L'AChE, qui sera décrite plus en détail au début du chapitre III, fait partie du SNC et est majoritairement située dans les fentes synaptiques. Impliquée dans le traitement palliatif de la maladie d'Alzheimer, cette estérase à sérine se prête particulièrement bien aux études de KTGS du fait de la structure de son site actif.[94] En effet, ce dernier se compose de deux sites de fixation, que sont le site catalytique situé au fond de la poche et comportant la triade catalytique (sérine, histidine et glutamate) et le site périphérique anionique (SPA), situé à l'entrée de la gorge, capable de stabiliser des ligands par des interactions de types π-π *stacking* et π-cation. Ces deux sites sont reliés entre eux par une « gorge » aromatique profonde (15-20 Å) et étroite (5 Å) (Schéma 26).

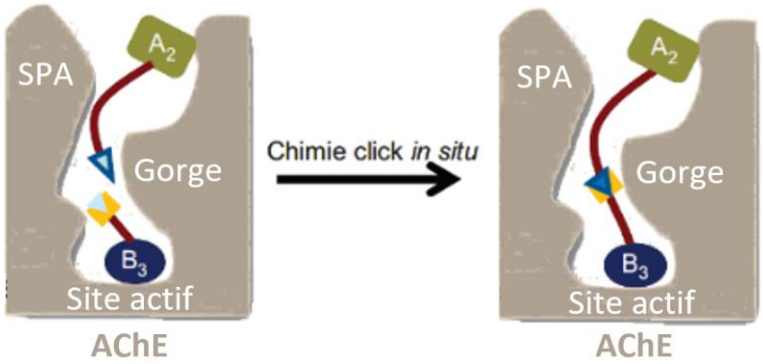


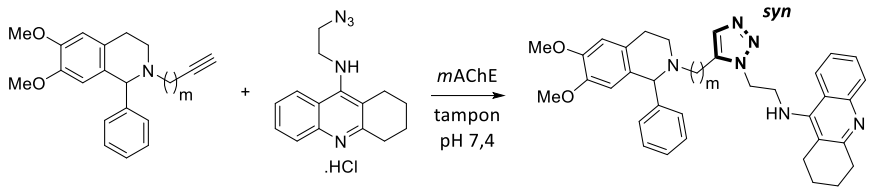
Schéma 26. Schéma de principe des positionnements des fragments réactifs dans l'AChE lors de la réaction de click (A2 = phénanthridinium ; B3 = tacrine).

La charge positive permanente du motif phénanthridinium lui permet d'interagir facilement avec le SPA. La tacrine quant à elle interagit avec le deuxième site de fixation situé tout au fond de la poche catalytique. La réaction de click a ainsi lieu dans une région spécifique de la gorge hydrophobe. Les interactions entre le *syn*-triazole formé par l'enzyme et les résidus d'acides aminés dans la gorge (liaisons hydrogènes et π-π *stacking*) indiquent clairement que le 1,2,3-triazole ne joue pas un simple rôle de lien passif, mais qu'il participe activement à l'activité globale du ligand *via* l'établissement d'interactions supplémentaires contribuant à sa stabilisation dans la gorge de l'enzyme.[93(b)]

L'exploration de nouvelles structures chimiques basées sur ces premiers travaux a également été entreprise dans une démarche d'optimisation de lead. De nouveaux inhibiteurs du site périphérique, comprenant un motif phényltetraisoquinoléine (**PIQ-A5** et **PIQ-A6**), ont ainsi été découverts par KTGS avec le partenaire **TZ2**, en présence de l'AChE d'origine murine

[94] Bourne, Y.; Sharpless, K. B.; Taylor, P.; Marchot, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 1611–1621.

(*m*-AChE) en tant que cible biologique (Schéma 27).[95] Les deux ligands ***syn*-TZ2PIQ-A5** et **-A6** ont été obtenus de manière totalement régiosélective (*syn*-triazole) et leurs constantes d'inhibition se trouve également dans la gamme du fM. Les différents ligands obtenus par KTGS ont pu servir pour l'étude structurale de la protéine, par des études de co-cristallisation protéine-ligand. A cette occasion, les auteurs se sont aperçus que l'enzyme adoptait une conformation inédite, bien différente de celle observée majoritairement en l'absence de ligand.[93(b)] Cette stratégie permet donc de mettre en évidence de nouvelles conformations spatiales, impossible à observer *via* d'autres méthodes, ce qui a ouvert de grandes opportunités pour le design moléculaire, l'étude des relations structure-activité,[96] ou plus largement une meilleure compréhension de la flexibilité de l'enzyme.[97]



PIQ-A5, m = 5
PIQ-A6, m = 6

TZ2

m = 5, ***syn*-TZ2PIQ-A5**
m = 6, ***syn*-TZ2PIQ-A6**

*Schéma 27. Découverte de nouveaux ligands du site périphérique comprenant un motif **PIQ** par KTGS.*

En 2014, le groupe du Pr. Renard et du Dr. Sabot a pu réaliser une réaction de click *in situ* en employant cette fois-ci l'enzyme d'origine humaine et d'intérêt thérapeutique, la *rh*-AChE,[98] caractérisée par une dynamique plus importante que la *m*-AChE, avec laquelle elle partage 88% d'homologie structurale.[99] La formation de nouvelles structures d'inhibiteurs hétérodimériques comprenant des motifs **PIQ** pour le SPA et huprine **HupZ** pour le site actif a ainsi pu être mis en évidence (Schéma 28).[100]

---

[95] Krasiński, A.; Radić, Z.; Manetsch, R.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6686–6692.

[96] (a) Bourne, Y.; Radić, Z.; Kolb, H. C.; Sharpless, K. B.; Taylor, P.; Marchot, P. *Chem.- Biol. Int.* **2005**, *157–158*, 159–165. (b) Bourne, Y.; Sharpless, K. B.; Taylor, P.; Marchot, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 1611–1621.

[97] Willand, N.; Desroses, M.; Toto, P.; Dirié, B.; Lens, Z.; Villeret, V.; Rucktooa, P.; Locht, C.; Baulard, A.; Deprez, B. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 1007–1013.

[98] *rh*-AChE : AChE humaine recombinante.

[99] Kryger, G.; Harel, M.; Giles, K.; Toker, L.; Velan, B.; Lazar, A.; Kronman, C.; Barak, D.; Ariel, N.; Shafferman, A.; Silman, I.; Sussman, J. L. *Acta Crystallogr* **2000**, *56*, 1385–1394.

[100] Oueis, E.; Santoni, G.; Ronco, C.; Syzgantseva, O.; Tognetti, V.; Joubert, L.; Romieu, A.; Weik, M.; Jean, L.; Sabot, C.; Nachon, F.; Renard, P.-Y. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 156–161.

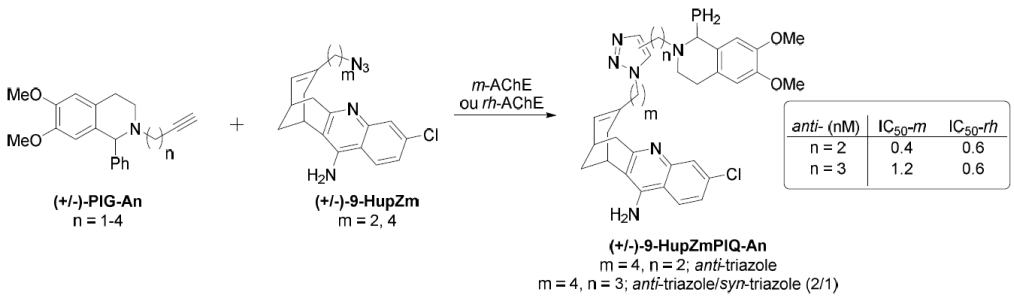


Schéma 28. Réaction de click in situ *avec modification des partenaires réactifs en présence de* m-*AChE ou de* rh-*AChE.*[101]

A la différence des premiers travaux de Sharpless, cette étude a conduit à la formation des *anti*-triazoles que ce soit en présence de la *m*-AChE ou de la *rh*-AChE. En plus du changement de régiosélectivité, il a également été établi que la région de la gorge où avait lieu la réaction se trouvait plus en hauteur vers le SPA. Ce changement s'explique principalement par la variation des longueurs de chaînes de part et d'autre de la **HupZ** et de la **PIQ**, mais aussi par le remplacement du motif tacrine **Tz** par un motif huprine **Hup** plus volumineux, ne permettant plus à la réaction click d'être réalisée dans la région confinée proche du site enzymatique. Une étude théorique réalisée en collaboration avec le Pr. Joubert (Université de Rouen-Normandie) a montré que des facteurs thermodynamiques et non cinétiques gouvernaient la régiosélectivité de la cycloaddition au sein de l'enzyme. Plus précisément, ce serait l'énergie interne, une composante de l'énergie totale du complexe protéine-ligand, qui serait à l'origine de la régiosélectivité *anti* observée.

Pierre angulaire de la KTGS en raison de sa robustesse, sa fiabilité ou encore sa simplicité de mise en œuvre, la click *in situ* représente environ les trois-quarts des applications publiées à ce jour et continue de susciter l'intérêt des chercheurs.[102] De nombreuses cibles thérapeutiques de natures variées ont ainsi été l'objet de recherches en KTGS grâce à la click *in situ*. Parmi elles se trouvent en majorité les enzymes comme la protéase du VIH (VIH-1-

[101] Schéma extrait du manuscrit de thèse du Dr. Antoine Lizzul-Jurse. « *Développement d'outils bio-organiques pour la mise au point de réactions de click in-situ appliquées à la synthèse par la cible d'inhibiteurs de la β-sécrétase* ». Thèse soutenue le 13 janvier 2017 à l'université de Rouen-Normandie.

[102] (a) Sharpless, K. B.; Manetsch, R. *Expert Opin. Drug Discov.* **2006**, *1*, 525–538. (b) Mamidyala, S. K.; Finn, M. G. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1252–1261.

Pr),[103] l'anhydrase carbonique II (CA II),[104] la chitinase,[105] la cyclooxygénase-2,[106] l'endothiapepsine,[69] la D-aminoacide oxydase (DAO),[107] une neurotoxine botulique (BoTN),[108] la tyrosine kinase cytoplasmique (Bcr-Abl),[109] ou encore la O-GlcNAc transférase.[110] La plupart des enzymes citées sont cependant structuralement connue et/ou ont déjà été employées pour le développement d'inhibiteurs décris dans la littérature, ce qui facilite l'initiation des projets en KTGS. Un exemple se démarque cependant en terme purement exploratoire. Effectivement, un nouveau site d'interaction exploitable a été détecté au sein d'une glycoprotéine associée à la myéline (MAG, Siglec 4) aux moyens d'études RMN et RPE.[111] Grâce à l'exploitation de ce nouveau site d'interaction, structuralement inconnu, un nouvel antagoniste bidentate a alors été découvert au moyen d'expériences de KTGS, ce qui prouve qu'une connaissance structurale de l'enzyme ou d'inhibiteurs décris n'est pas toujours un prérequis avec cette stratégie.

Le matériel génétique est également devenu une classe de cibles privilégiées en KTGS ces dernières années. L'ADN en lui-même[112] ainsi que les structures G-quadruplex[113]ont fait l'objet de plusieurs études et de nombreux ligands ont pu être découverts à ces occasions. Une étude de 2015 a d'ailleurs permis le développement de nouvelles sondes fluorescente

[103] Whiting, M.; Muldoon, J.; Lin, Y.-C.; Silverman, S. M.; Lindstrom, W.; Olson, A. J.; Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B.; Elder, J. H.; Fokin, V. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1435–1439.

[104] Mocharla, V. P.; Colasson, B.; Lee, L. V.; Röper, S.; Sharpless, K. B.; Wong, C.-H.; Kolb, H. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 116–120.

[105] (a) Hirose, T.; Sunazuka, T.; Sugawara, A.; Endo, A.; Iguchi, K.; Yamamoto, T.; Ui, H.; Shiomi, K.; Watanabe, T.; Sharpless, K. B.; Ōmura, S. *J. Antibiot.* **2009**, *62*, 277–282. (b) Hirose, T.; Sunazuka, T.; Ōmura, S. *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* **2016**, *74*, 1090–1097.

[106] Bhardwaj, A.; Kaur, J.; Wuest, M.; Wuest, F. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1–14.

[107] Toguchi, S.; Hirose, T.; Yorita, K.; Fukui, K.; Sharpless, K. B.; Ōmura, S.; Sunazuka, T. *Chem. Pharma. Bull.* **2016**, *64*, 695–703.

[108] Farrow, B.; Wong, M.; Malette, J.; Lai, B.; Deyle, K. M.; Das, S.; Nag, A.; Agnew, H. D.; Heath, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7114–7119.

[109] Peruzzotti, C.; Borrelli, S.; Ventura, M.; Pantano, R.; Fumagalli, G.; Christodoulou, M. S.; Monticelli, D.; Luzzani, M.; Fallacara, A. L.; Tintori, C.; Botta, M.; Passarella, D. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 274–277.

[110] Wang, Y.; Zhu, J.; Zhang, L. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 263–272.

[111] Shelke, S. V.; Cutting, B.; Jiang, X.; Koliwer-Brandl, H.; Strasser, D. S.; Schwardt, O.; Kelm, S.; Ernst, B. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5721–5725.

[112] (a) Poulin-Kerstien, A. T.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15811–15821. (b) Imoto, S.; Hirohama, T.; Nagatsugi, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5660–5663. (c) Di Antonio, M.; Biffi, G.; Mariani, A.; Raiber, E.-A.; Rodriguez, R.; Balasubramanian, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11073–11078.

[113] (a) Panda, D.; Saha, P.; Das, T.; Dash, J. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 16103. (b) Saha, P.; Panda, D.; Dash, J. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 731–750.

spécifiques et sensibles afin d'étudier la topologie structurale des G-quadruplex.[114] De même, des ligands très sélectifs des « i-motifs »[115] de l'ADN ont pu être découvert par click *in situ*.[116] La liaison spécifique d'ARN toxiques conduisant à leur neutralisation a également été rendue possible grâce à la découverte de nouvelles molécules se liant spécifiquement à ces fragments toxiques d'ARN.[117] Ces dernières, portant chacune sur leurs extrémités une fonction azoture et une fonction alcyne terminal, ont pu être oligomérisées par click *in situ* au sein de cette cible bloquant l'action délétère de ces ARN.

Dans un domaine tout à fait différent, l'antibiorésistance bactérienne est en passe de devenir un des plus grands défis scientifiques et sociétaux de notre ère.[118] Le développement de nouvelles stratégies permettant de lutter efficacement et « intelligemment » contre les bactéries est donc devenu un sujet de première importance en chimie médicinale. Dans ce cadre de recherche, les ribosomes bactériens ont fait leur entrée comme cibles en KTGS et la click *in situ* a permis le développement de nouveaux inhibiteurs.[119]

Une toute autre stratégie, basée sur les interactions macromoléculaires avec les anhydrases carboniques bovine et humaine (respectivement *b*CAII et *h*CAII) comme enzymes cibles, a permis de préparer des peptides par KTGS itérative.[120] Les enzymes ont ainsi permis d'assembler trois peptides fonctionnalisés par des fonctions azotures et alcynes terminaux grâce à deux réactions de click séquentielles (Figure 12).

---

[114] Hu, M.-H.; Chen, X.; Chen, S.-B.; Ou, T.-M.; Yao, M.; Gu, L.-Q.; Huang, Z.-S.; Tan, J.-H. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17202.

[115] Zeraati, M.; Langley, D. B.; Schofield, P.; Moye, A. L.; Rouet, R.; Hughes, W. E.; Bryan, T. M.; Dinger, M. E.; Christ, D. *Nat. Chem* **2018**, *10*, 631–637.

[116] Saha, P.; Panda, D.; Müller, D.; Maity, A.; Schwalbe, H.; Dash, J. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 2058–2067.

[117] (a) Rzuczek, S. G.; Park, H.; Disney, M. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10956–10959. (b) Rzuczek, S. G.; Colgan, L. A.; Nakai, Y.; Cameron, M. D.; Furling, D.; Yasuda, R.; Disney, M. D. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 188–193. (c) Paul, R.; Dutta, D.; Paul, R.; Dash, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *132*, 12507-12511.

[118] (a) Walsh, C. *Nat. Rev. Microbiol.* **2003**, *1*, 65–70. (b) Levy, S. B.; Marshall, B. *Nat. Med.* **2004**, *10*, S122–S129. (c) Solomon, S. L.; Oliver, K. B. *AFP* **2014**, *89*, 938–941.

[119] Glassford, I.; Teijaro, C. N.; Daher, S. S.; Weil, A.; Small, M. C.; Redhu, S. K.; Colussi, D. J.; Jacobson, M. A.; Childers, W. E.; Buttaro, B.; Nicholson, A. W.; MacKerell, A. D.; Cooperman, B. S.; Andrade, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3136–3144.

[120] Agnew, H. D.; Rohde, R. D.; Millward, S. W.; Nag, A.; Yeo, W.-S.; Hein, J. E.; Pitram, S. M.; Tariq, A. A.; Burns, V. M.; Krom, R. J.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Heath, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4944–4948.

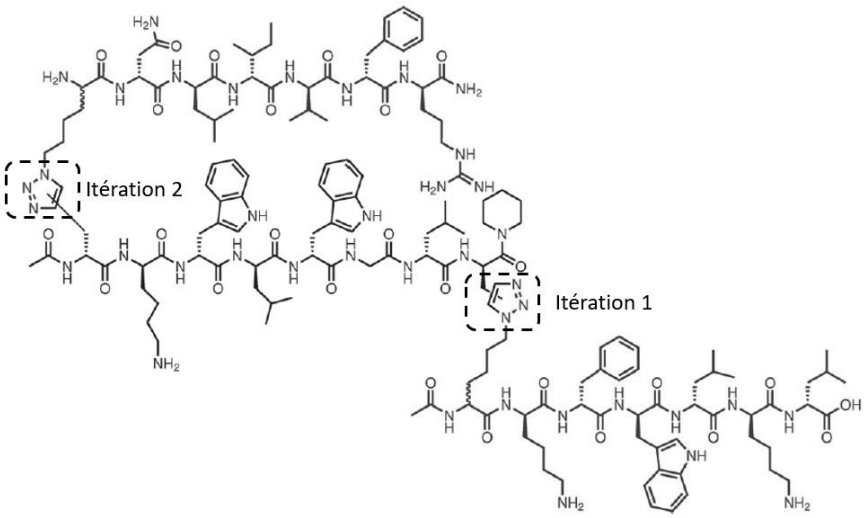


Figure 12. Structure finale du peptide assemblé par click in situ itérative (figure extraite et modifiée de la revue[97]).

A chaque itération (0, 1 et 2), l'affinité du produit peptidique a très fortement augmenté vis-à-vis de la cible : itération 0, constante d'affinité k_a (*b*CA II) = 500 µM ; itération 1, k_a (*b*CA II) = 3 µM ; itération 2, k_a (*b*CA II) = 64 nM et k_a (*h*CA II) = 45 nM. Les auteurs ont ensuite pu démontrer que ce peptide a trois tronçons possédait un comportement et une affinité équivalente à celle d'un anticorps spécifique de ces enzymes, sans pour autant impacter leurs activités catalytiques naturelles car ces interactions n'impliquent pas leurs sites actifs. De nombreuses applications ont pu être réalisées grâce à cette stratégie itérative et notamment pour le développement d'agents de capture protéiques/enzymatiques permettant ainsi le remplacement des anticorps spécifiques, très onéreux et difficiles à manipuler.[121]

Quelques structures de ligands découverts par click *in situ* sont présentés ci-dessous, accompagnées du nom des cibles correspondantes, et sont tirés des références mentionnées ci-dessus (Figure 13).

[121] Pour plus d'informations concernant le développement de mimes d'anticorps par KTGS, voir :(a) Millward, S. W.; Agnew, H. D.; Lai, B.; Lee, S. S.; Lim, J.; Nag, A.; Pitram, S.; Rohde, R.; Heath, J. R. *Integr. Biol.* **2012**, *5*, 87–95. (b) Agnew, H. D.; Coppock, M. B.; Idso, M. N.; Lai, B. T.; Liang, J.; McCarthy-Torrens, A. M.; Warren, C. M. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 9950-9970.

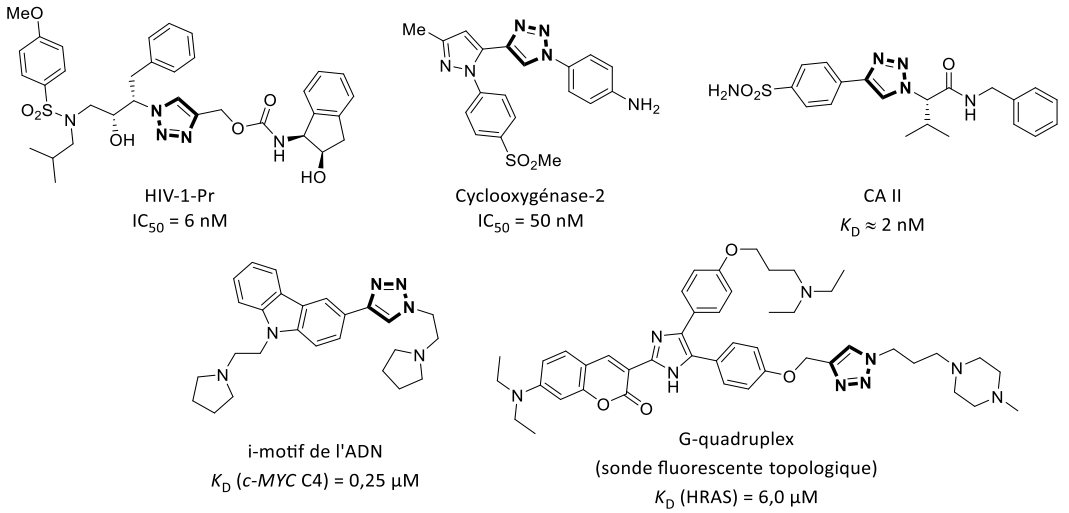


Figure 13. Structures moléculaires de ligands issues de recherches KTGS par click in situ*.*

Le Pr. Ohkanda a publié cette année une modification de la réaction de Huisgen.[122] Employant traditionnellement un alcyne terminal, ce dernier a ici été remplacé par un alcyne cyclique aminé à neuf chaînons lors d'une réaction de click *in situ* ciblant protéine 14-3-3ζ, déjà décrite précédemment dans ce chapitre. Le choix de ce type d'alcyne cyclique a été guidé par sa réactivité moins élevée (d'un facteur 10) que ses analogues à huit chaînons, bien connus en ligation bioorthogonale, et pour sa plus grande stabilité face aux (bio)thiols.[123] Ces considérations de cinétique réactionnelle et de stabilité chimique pour trouver une réaction éligible à la KTGS seront détaillées un peu plus loin dans ce chapitre.

Des analogues de la fusicoccin A, fonctionnalisés par un azoture aromatique (**FC-N_3**) et du phosphopeptide naturel **QSYpTV**, fonctionnalisés par des alcynes terminaux ou cycliques (respectivement **AV-P-D** et **CA-P-D**), ont été synthétisés afin de les étudier en click *in situ* (Schéma 29, **A**). Ces deux partenaires alcynes ont également été fonctionnalisés sur leurs extrémités par des motifs sulfonamide-dansyle fluorescents, permettant la détection par émission de fluorescence en HPLC (λ_{em} = 560 nm ; λ_{ex} = 330 nm) des composés de départ et des produits potentiellement formés.

[122] Masuda, R.; Kawasaki, Y.; Igawa, K.; Manabe, Y.; Fujii, H.; Kato, N.; Tomooka, K.; Ohkanda, J. *Chem. Asian J.* **2020**, *15*, 742–747.

[123] van Geel, R.; Pruijn, G. J. M.; van Delft, F. L.; Boelens, W. C. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 392–398.

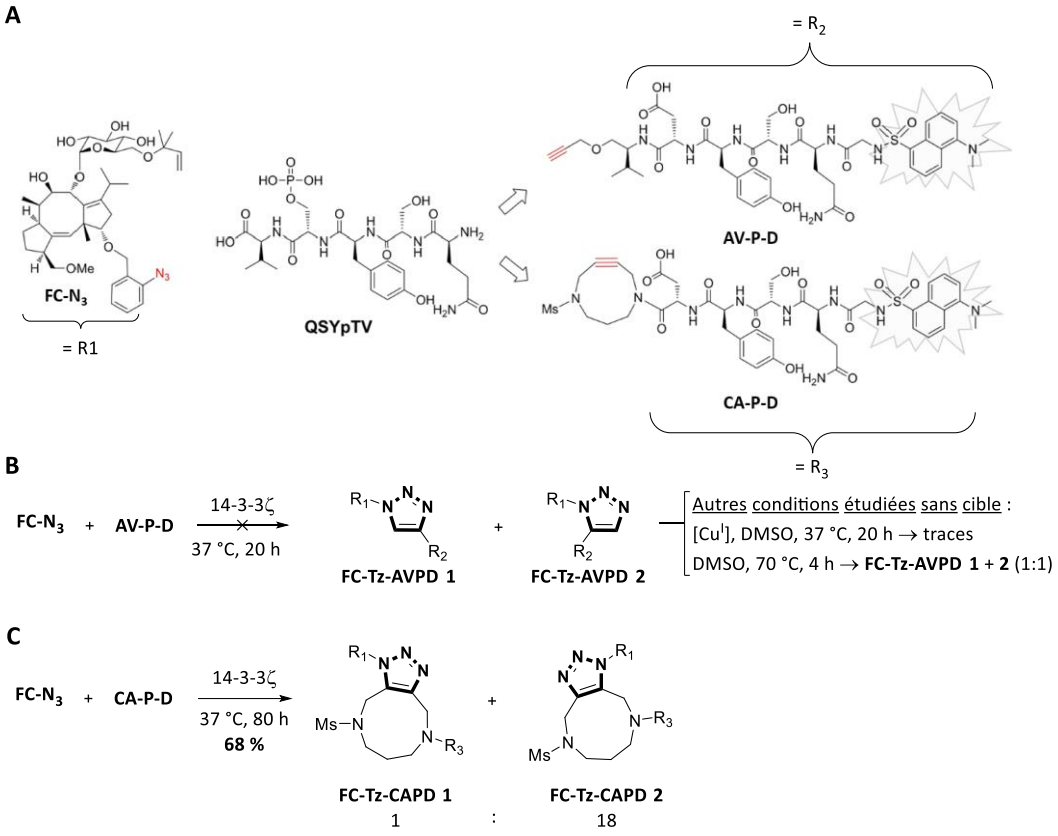


*Schéma 29. (**A**) Structures des analogues réactifs pour la click* in situ *catalysée par la protéine 14-3-3ξ. (**B**) Etude du partenaire **AV-P-D** (alcyne vrai) en KTGS. (**C**) Etude du partenaire **CA-P-D** (alcyne cyclique) en KTGS.*

L'incubation de l'azoture **FC-N₃** en présence de l'alcyne vrai **AV-P-D** et de la cible pendant 20 heures à 37 °C n'a permis d'observer aucune conversion en produits **FC-Tz-AVPD 1** et/ou **2** (Schéma 29, **B**). L'addition de cuivre dans le milieu dans les mêmes conditions expérimentales n'a permis la formation que de traces de triazole **FC-Tz-AVPD 1** après 20 heures. En revanche, l'activation thermique à 70 °C des réactifs durant quatre heures et en l'absence de la cible a permis la formation d'un mélange stœchiométrique des deux régioisomères. Face à ce premier résultat négatif, les auteurs ont alors incubé la **FC-N₃** et le **CA-P-D** en présence de la cible (Schéma 29, **C**). Le suivi des expériences (cible vs. réaction de contrôle vs. inhibiteur compétitif) ont mis en évidence une réelle accélération cinétique de la réaction en présence de la cible, atteignant un rendement d'environ 68% après 80 heures d'incubation, ce qui est particulièrement conséquent en KTGS. Par ailleurs, bien que des études structurales soient encore en cours afin de le confirmer, la cible semble former sélectivement l'isomère **FC-Tz-CAPD 2** avec un ratio d'environ 18:1 en sa faveur.

Malgré le besoin d'effectuer quelques modifications structurales sur le partenaire alcyne cyclique diaminé (BCAN) afin d'améliorer ses propriétés pharmacocinétiques et la

solubilité du produit final, son emploi s'est avéré très efficace dans ce cas précis de KTGS, comparativement au traditionnel alcyne terminal. La structure plus étendue du BCAN pourrait à terme devenir un atout pour certains types de cibles comme les interactions protéine-protéine, dont les surfaces à occuper sont souvent plus vastes et relativement plus étendues que les sites de liaisons des enzymes classiques. De surcroît, les interfaces de contact entre les réactifs et le solvant aqueux sont très importants, ce qui peut interférer dans les interactions ligand-cible. Ainsi, l'établissement d'un point d'encrage supplémentaire grâce à une fonction réactive spatialement plus étendue semble être une excellente alternative afin de pallier cette difficulté. Néanmoins, il faut garder à l'esprit qu'idéalement chacun des deux ligands régioisomères doivent pouvoir être obtenus par synthèse chimique afin de faciliter leur caractérisation et d'étudier leur activité biologique.

- *Formation de la liaison amide par réaction entre des thioacides et des azotures (réaction de « sulfo-click »)*

  En 2003, une nouvelle méthode de synthèse de liaisons amides en milieu acide a été développée par Williams *et al.* en faisant réagir des azotures organiques avec des fonctions thioacides (Schéma 30).[124] Le temps nécessaire afin d'obtenir une pleine conversion lors de la réaction est très substrat-dépendant. De même, la température à laquelle la réaction doit être réalisée est totalement dépendante du type de solvant employé. Par ailleurs, cette méthodologie s'est montrée tout à fait compatible avec un milieu aqueux et avec des substrats de types monosaccharides et nucléosides, ce qui a ouvert des perspectives intéressantes pour la chimie-(bio)organique.

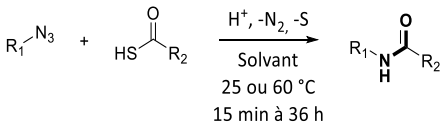


Schéma 30. Synthèse d'amide par réaction entre un azoture et un thioacide.

Une étude approfondie a mis en évidence deux mécanismes possibles de formation du lien amide. Chacun des deux mécanismes est effectivement conditionné par l'emploi d'azotures électroniquement enrichis ou appauvris, respectivement par des groupements donneurs (electron-donating group, EDG) et accepteurs (electron-withdrawing group, EWG)

[124] Shangguan, N.; Katukojvala, S.; Greenberg, R.; Williams, L. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7754–7755.

d'électrons (Schéma 31).[125] Malgré la différence principale lors de la première étape, les mécanismes proposés font tous les deux intervenir le même intermédiaire cyclique à cinq chaînons, permettant de libérer le tautomère de l'amide final et les sous-produits diazote N_2 et soufre élémentaire S.

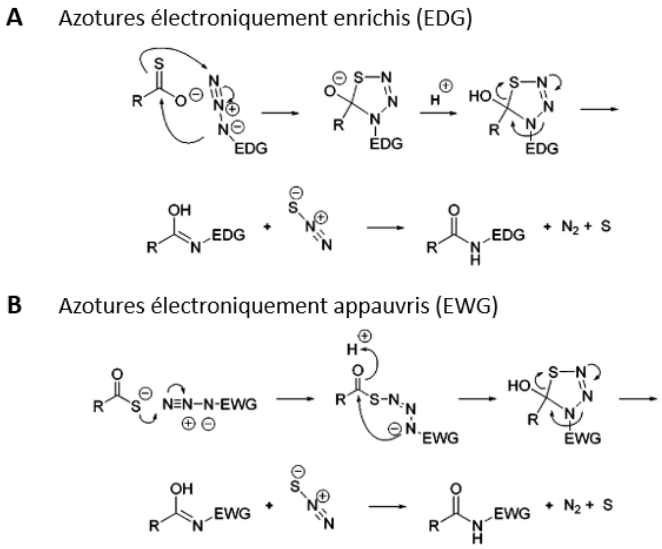


*Schéma 31. Mécanismes d'amidation avec des azotures électroniquement (**A**) enrichis et (**B**) appauvris (schéma extrait et modifié de l'article[125]).*

Les azotures sulfonylés pour leur part sont électroniquement déficients et sont également capables de réagir avec les thioacides (Schéma 32). Cette réaction particulière sera appelée « sulfo-click » par la suite. La première étape consiste en l'addition du thioacétate sur l'azoture de sulfonyle conduisant à l'intermédiaire **11**. Une cyclisation intramoléculaire conduit assez rapidement à l'intermédiaire cyclique **12**, dont la fragmentation par une rétro cycloaddition [3+2] conduit à la formation du *N*-acyl sulfonamide **13**, du diazote et du soufre élémentaire.

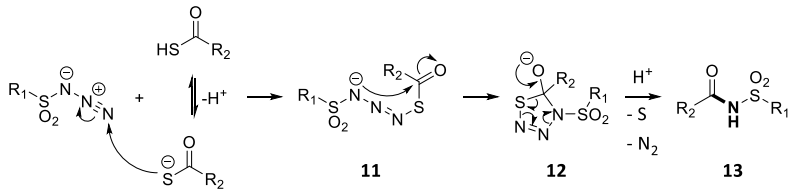


Schéma 32. Mécanisme d'amidation entre les thioacétates et les azotures de sulfonyle.

[125] Kolakowski, R. V.; Shangguan, N.; Sauers, R. R.; Williams, L. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5695–5702.

La réaction de sulfo-click étant compatible dans les milieux aqueux et les produits formés étant stables et biocompatibles, l'éligibilité de ce système en KTGS s'est alors imposée.

La première preuve de concept de sulfo-click en KTGS fût établie en 2008 par le Dr. Manetsch *et al.* en employant comme cible la protéine Bcl-X_L, une protéine anti-apoptotique de la famille des Bcl-2 et impliquée dans de multiples interactions protéine-protéine (IPP).[126] Grâce à une librairie chimique restreinte mais soigneusement choisie,[127] composée de trois thioacides et de six azotures sulfonylés, les auteurs sont parvenus à observer la formation spécifique du composé **SZ4TA2** par la Bcl-X_L sur les 18 combinaisons possibles (Schéma 33, **A**).

Par la suite, une investigation complémentaire à l'aide d'une chimiothèque plus vaste de réactifs a conduit à l'identification de trois ligands supplémentaires (**SZ7TA2**, **SZ9TA1** et **SZ9TA5**) et à la confirmation du hit de départ **SZ4TA2** (Schéma 33, **B**).[128] Ces composés sont ainsi les premiers modulateurs d'IPP découverts par KTGS.

Malheureusement, l'instabilité des thioacides en conditions de KTGS ou plus simplement pour leur stockage s'est avérée être un obstacle. La même équipe a donc développé une méthode de déprotection douce et rapide de thioesters comportant un motif Fmoc (**Fm thioesters**) à l'aide de DBU à 3 % dans le DMF et applicable en « one-pot » pour la préparation de N-acyl sulfonamides (Schéma 33, **C**).[129]

Après avoir remplacé le DBU par la pipéridine pour des raisons de biocompatibilité et de p*K*a, les auteurs sont parvenus à réaliser une séquence comprenant la déprotection de thioester **14** en thioacide **15**, puis son introduction dans le milieu de KTGS en présence de la Bcl-X_L et de l'azoture sulfonylé **16** (Schéma 33, **D**).

[126] Hu, X.; Sun, J.; Wang, H.-G.; Manetsch, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13820–13821.

[127] (a) T. Oltersdorf, S. W. Elmore and A. R. Shoemaker, *et al. Nature* **2005**, *435*, 677–681. (b) M. D. Wendt, W. Shen and A. Kunzer, *et al*. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1165–1181. (c) M. Bruncko, T. K. Oost and B. A. Belli, *et al. J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 641–662.

[128] Kulkarni, S. S.; Hu, X.; Doi, K.; Wang, H.-G.; Manetsch, R. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 724–732.

[129] Namelikonda, N. K.; Manetsch, R. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1526–1528.

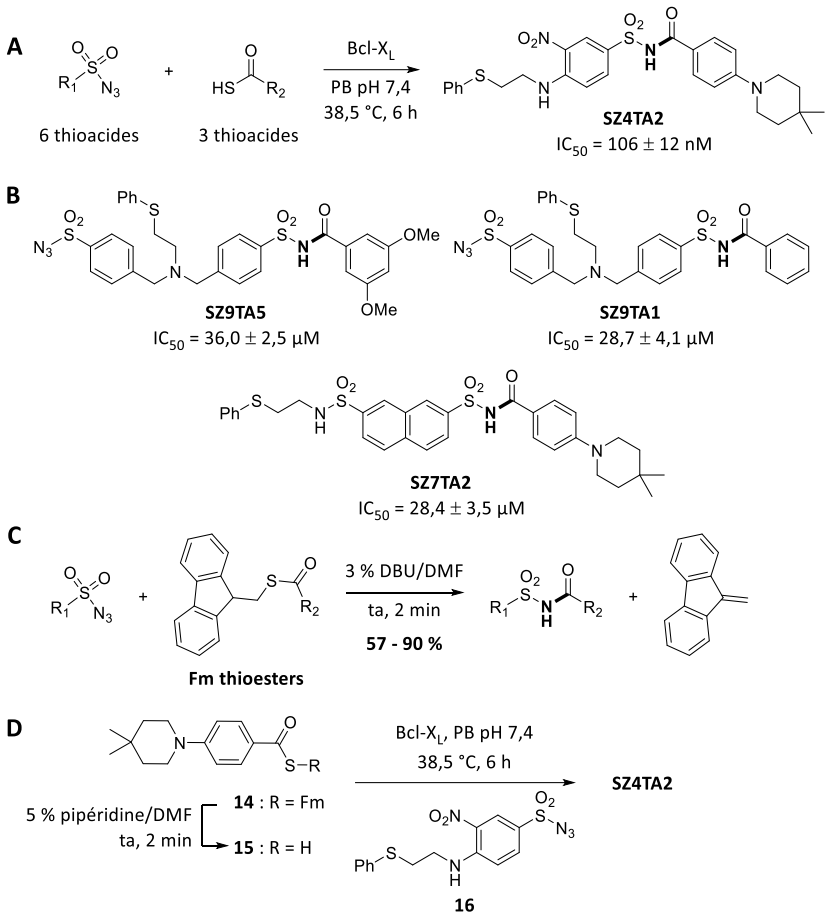


*Schéma 33. (**A**) Première réaction de sulfo-click en KTGS. (**B**) Structures des ligands supplémentaires découverts en KTGS. (**C**) Méthode de déprotection* in situ *des **Fm thioesters**. (**D**) Séquence de déprotection et de KTGS (Fm = Fmoc).*

- *Formation de liaison amide par réaction d'amidation directe*

En 2012, une équipe française de Montpellier est parvenue à montrer que la NAD kinase de la *Listeria monocytogenes* (LmNADK1) était capable de catalyser la formation de liaisons amides entre des fonctions acides carboxyliques non-activées et la 5'-amino-5'-déoxyadénosine.[130] Le site actif de cette NAD kinase a révélé deux sous-sites d'interactions par diffraction des rayons X : 1) le site A permet de fixer des motifs adénosines et 2) le site N est capable de fixer le nicotinamide β-riboside. La co-cristallisation de la LmNADK1 avec des dérivés adénosines substitués en position 5' a permis de montrer que les deux sites A et N étaient occupés par ces composés, ainsi que des distances relativement courtes (~ 5 Å) entre les positions 5' et 8 (site A) avec la position 5' (site N) étaient relativement faibles (Schéma 34,

[130] Gelin, M.; Poncet-Montange, G.; Assairi, L.; Morellato, L.; Huteau, V.; Dugué, L.; Dussurget, O.; Pochet, S.; Labesse, G. *Structure* **2012**, *20*, 1107–1117.

A). Partant de ces trois observations, les auteurs ont incubé les substrats **17** et **18,** portant respectivement des fonctions acide carboxylique et amine primaire, en présence de la LmNADK1 (Schéma 34, **B**). Plusieurs combinaisons de réactifs ont été testées et le composé **17** avait été fonctionnalisé par une fonction azoture en prévision d'un potentiel emploi de la réaction click pour l'assemblage du ligand final au sein de l'enzyme

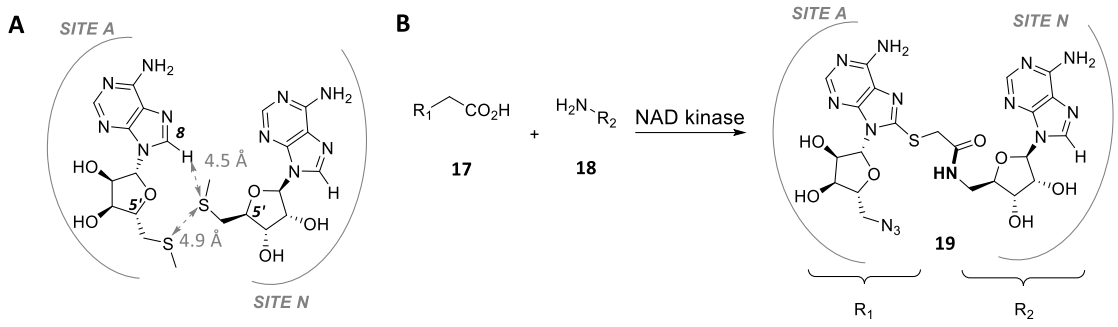


*Schéma 34. (**A**) Orientations et interactions spatiales entre les dérivés adénosines (**B**) Amidation* in situ *de la NAD kinase.*

La formation *in situ* de l'amide **19** a pu ainsi être démontrée par une analyse cristallographique. L'effet stabilisateur sur l'intermédiaire tétraédrique du résidu His223 (situé dans le site N) lors de la réaction d'amidation a été mise en évidence, ce qui démontre l'importance du rôle de la cible dans la stabilisation de l'état de transition et donc du positionnement spécifique des réactifs en son sein. Cette réaction d'amidation *in situ* est remarquable car l'acide carboxylique n'est pas activé, ce qui laisse supposer que l'énergie d'activation nécessaire pour que cette réaction ait lieu est importante.

Plus récemment, le groupe du Pr. Rademann a proposé une nouvelle stratégie plus généralisable d'amidation pour la KTGS, reposant sur l'emploi d'esters activés et d'amines comme partenaires de ligation. Leur preuve de concept a pu être réalisée à l'aide d'une protéase à sérine comme template, le facteur de coagulation sanguin Xa.[131] Concernant le partenaire électrophile, différents groupes partants ont été étudiés et finalement, les esters de phényle **20** et de 2,2,2-trifluoroéthyle **21** se sont avérés être les meilleurs compromis. Ainsi, la formation de l'amide **23** par effet template du facteur Xa et en présence de l'amine **22** et des esters **20** et **21** a pu être observée (Schéma 35).

[131] Jaegle, M.; Steinmetzer, T.; Rademann, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 3718–3722.

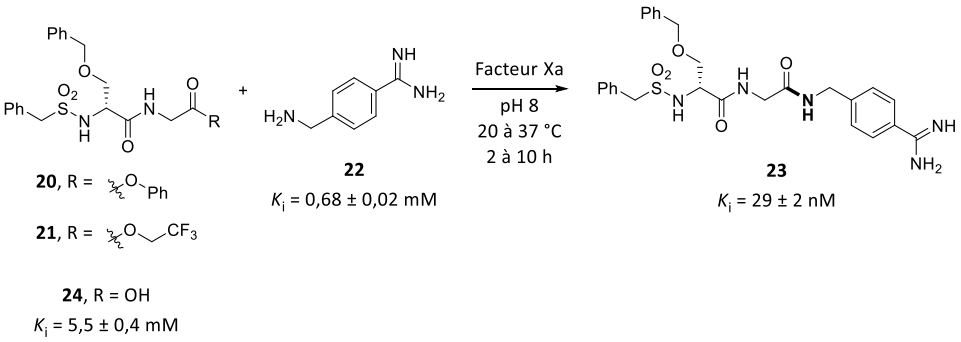


Schéma 35. Réaction d'amidation catalysée par le facteur de coagulation Xa.

La comparaison des valeurs de constantes d'inhibitions (K_i) des fragments précurseurs, respectivement de 5,5 ± 0,4 mM pour l'acides **24** et 0,68 ± 0,02 mM pour l'amine **22**, par rapport à celle de l'amide **23**, de 29 ± 2 nM, met clairement en lumière l'effet additif de la ligation des fragments sur l'activité finale. Comme il avait été démontré dans le cas du triazole formé *in situ*, les auteurs se sont interrogés quant à l'influence du lien amide sur l'activité biologique du ligand. Afin d'étudier l'influence de la fonction amide sur l'affinité, chacun des deux fragments acide et ester ont été dérivatisés en amides correspondants afin de mesurer leurs activités respectives (Figure 14). Les composés **25** et **26** n'ont pas présentés de meilleures activités que les fragments parents. Les auteurs en ont donc conclu que l'influence du lien amide en tant que tel était négligeable dans l'effet additif des fragments, mais qu'en revanche, la valeur entropique d'interaction entre le ligand **23** et la cible était bien moins négative que celles des complexes réactifs – cible, ce qui explique ce gain d'activité d'environ 10^6.

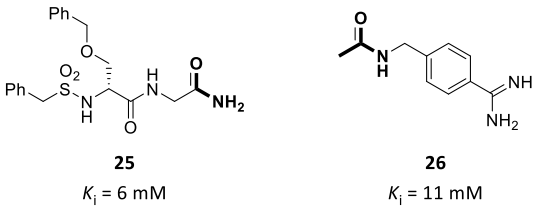


Figure 14. Mimes du linker amide comprenant les structures des fragments initiaux.

B - **Formation de liaisons C-C**

- *Substitution nucléophile par un énol*

La première formation de liaison C-C appliquée en KTGS fût réalisée en 2009 par le groupe du Pr. Miyata.[132] Les auteurs ont choisi pour cible l'enzyme sirtuin 1 (SIRT1), une histone désacétylases de la famille des sirtuines, cible très prisée dans la lutte contre le cancer, le VIH ou encore la maladie de Parkinson.[133] Dans le cas de SIRT1, cette enzyme ubiquitaire permet la désacétylation des chaînes latérales de résidus lysines sur de multiples substrats biologiques.[134] Son fonctionnement requiert en revanche l'assistance du cofacteur NAD^+ afin de réaliser les échanges d'acétyles tout en libérant le nicotinamide. Les auteurs ont souhaité tirer parti de l'affinité du NAD^+ pour SIRT1 dans l'optique de former de manière *in situ* de nouveaux inhibiteurs enzymatiques, *via* l'établissant une liaison C-C stable entre le NAD^+ et un autre fragment. Inspirés par la structure du mime pro-fluorescent de la lysine acétylée **27** utilisée pour le dosage enzymatique de SIRT1, des molécules analogues pouvant former des nucléophiles carbonés stables du type énols ont été synthétisés. Différents groupements de type GEA ou stabilisateurs d'anions (GSA) ont pu être ainsi étudiés afin de générer ces espèces réactives (Figure 15).

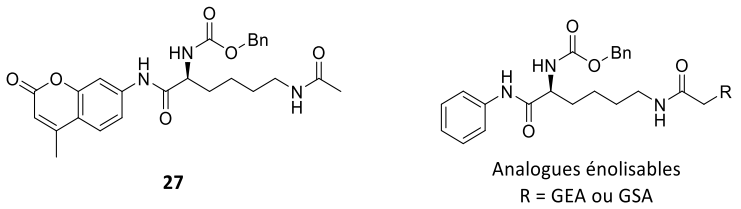


*Figure 15. Structures du mime pro-fluorescent **27** et des analogues énolisables.*

Sur 26 substrats énolisables testés en KTGS, le β-céto-amide **28** s'est démarqué des autres en formant avec le NAD^+ un ligand **29** possédant une IC_{50} de 3,9 ± 0,3 µM vis-à-vis de SIRT1 (Schéma 36). Grâce à une étude de docking, les auteurs ont pu déterminer que la forme énolique du composé **28** était fortement stabilisée par deux liaisons hydrogènes complémentaires. La première est intramoléculaire et est établie avec l'atome d'oxygène de

[132] Asaba, T.; Suzuki, T.; Ueda, R.; Tsumoto, H.; Nakagawa, H.; Miyata, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6989–6996.

[133] Pour plus d'informations sur les pathologies, voir les références bibliographiques citées dans l'article [126].

[134] Villalba, J. M.; Alcaín, F. J. *BioFactors* **2012**, *38*, 349–359.

l'amide, alors que la seconde est instaurée intermoléculairement avec l'imidazole du résidu histidine de l'enzyme.

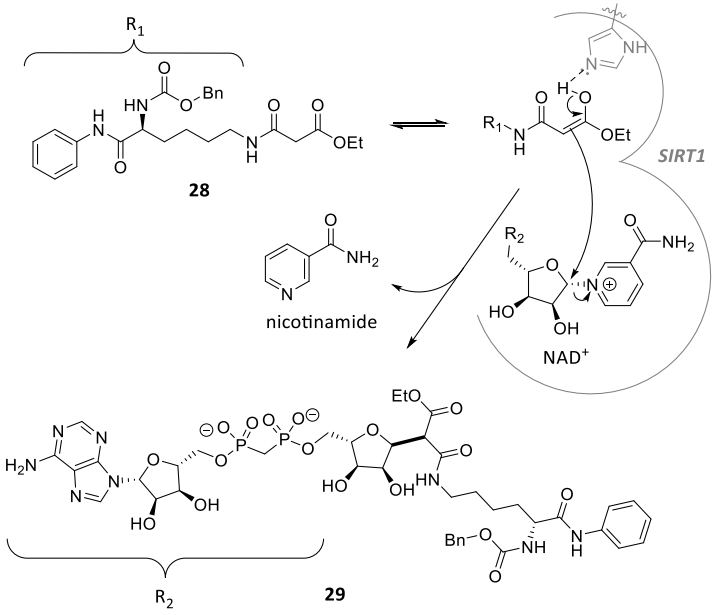


*Schéma 36. Substitution nucléophile du nicotinamide par l'énol **28** promue par SIRT1 sur le NAD⁺.*

Au-delà du caractère novateur de cette nouvelle réaction en KTGS, il s'agit du second exemple où l'un des réactifs impliqués dans la ligation se trouve être un cofacteur naturel de l'enzyme cible. De plus, le sous-produit formé (le nicotinamide) est également une molécule biologique naturelle donc totalement biocompatible et non dénaturante.

- *Formation de liaison C-C par réaction d'aldolisation*

En 2018, les Prs. Shang et Yin ont proposé une nouvelle approche hybride de la KTGS, reposant sur un criblage de fragments guidé par la cible (*Target-Guided Screening Of Fragments*, TGSOF) par installation préliminaire d'un inhibiteur irréversible dans la poche catalytique.[135] Les auteurs ont mené leur étude sur la cible EV-A71 $3C^{Pro}$, une protéase à cystéine provenant de l'entérovirus EV-A71, infectieux chez l'Homme,[136] et dont le site actif est constitué de trois sous-cavités P1, P2 et P3. Dans le but d'augmenter l'activité des ligands déjà connus dans la littérature, les auteurs ont décidé d'étudier le site P3 afin de pouvoir

[135] Fu, S.; Nie, Q.; Ma, Y.; Song, P.; Ren, X.; Luo, C.; Shang, L.; Yin, Z. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 2890–2893.
[136] Zhai, Y. Y.; Ma, Y. Y.; Ma, F.; Nie, Q. D.; Ren, X. J.; Wang, Y. X.; Shang, L. Q.; Yin, Z. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *124*, 559–573.

l'exploiter efficacement en design moléculaire. La plateforme moléculaire (*Ligation Building Block*, **LBB**) a été employée. Pouvant établir des interactions spécifiques avec les sites P1 et P2, elle a également permis la formation du complexe **Enz-LBB** par établissement d'une liaison covalente entre la Cys147 du site catalytique et l'ester α,β-insaturé du **LBB** (Schéma 37).

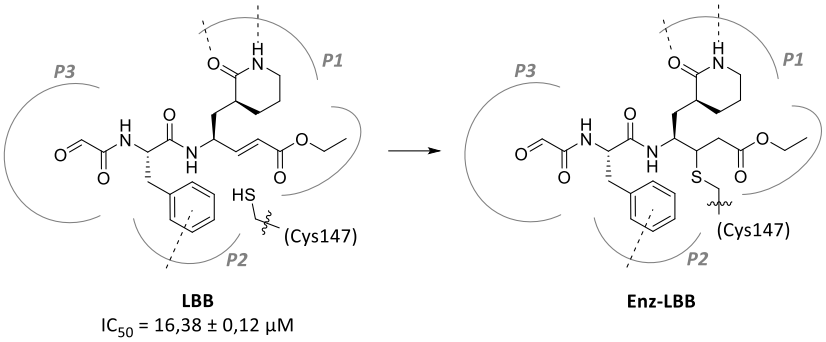


*Schéma 37. Structure et interaction du **LBB** avec les sous-sites P1 et P2.*

Le **LBB** comporte également une fonction céto-aldéhyde très électrophile qui offre la possibilité de réaliser des réactions d'aldolisation avec des cétones énolisables dans le site P3. Ainsi, 28 cétones méthyliques commerciales, de structures variées, ont pu être testées en présence de **Enz-LBB**. Après 12 heures d'incubation à température ambiante et à pH = 7,0, les différentes combinaisons de criblage ont été analysées par spectrométrie de masse (MS). Deux fragments, la 4-acétylpyridine et la 3-acétylpyridine, ont pu être identifiés comme hits (Schéma 38, **A**). Une digestion trypsique couplée à des analyses MS ont permis de confirmer que la réaction avait bel et bien eu lieu spécifiquement dans le site P3.

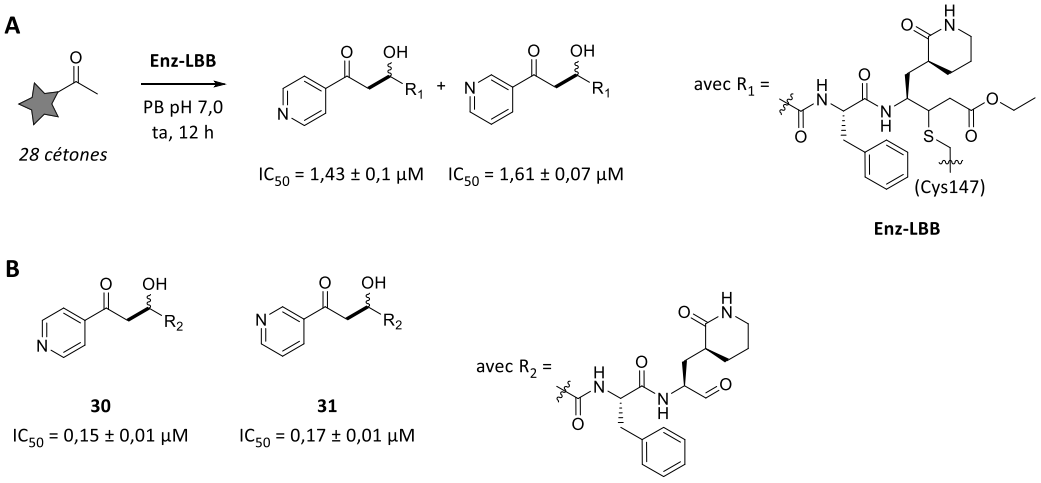


*Schéma 38. (**A**) Aldolisation* in situ *du complexe covalent **Enz-LBB** et détection des hits. (**B**) Optimisation structurale de ligands tridentates réversibles.*

Un gain d'activité d'un facteur de ~10 a pu être obtenu, grâce à la fonctionnalisation du complexe covalent **Enz-LBB** dans le site P3 par les deux hits. Bien que la contribution du lien aldol se soit avérée importante pour l'activité des ligands (établissement de liaisons hydrogènes entre le résidu Gly164 de l'enzyme et la fonction alcool), il a cependant été établi que la configuration du centre stéréogène formé lors de l'aldolisation n'avait aucune influence sur l'activité biologique.

Enfin, des ligands non-covalents **30** et **31** incluant les structures du **LBB** et des deux cétones hits ont alors été préparés (Schéma 38, **B**). De manière surprenante, un gain d'activité inhibitrice d'un facteur de ~10 a ainsi été obtenu avec ces nouveaux inhibiteurs réversibles, dont les valeurs d'IC_{50} sont inférieures à 1 µM.

- *Formation de liaison C-C par réaction de cycloaddition de Diels-Alder*

Le groupe du Pr. Disney est très impliqué dans la découverte de nouveaux inhibiteurs de séquences d'ARN toxiques, les r(CUG)^{exp}, et a employé avec succès la stratégie de KTGS pour l'assemblage de ligands avec cette cible biologique, grâce à la réaction click.[117(a),(b)] Très récemment, ce même groupe est parvenu à employer une séquence de cycloaddition - rétro-cycloaddition de Diels-Alder, promue par le r(CUG)^{exp}, entre des 3-méthyltétrazines et des 2,3-diméthylcyclopropènes.[137] La cinétique de formation des ligands au sein de la cible biologique *via* cette réaction bioorthogonale s'est d'ailleurs montrée beaucoup plus rapide (1 heure) par rapport à la réaction de click (24 heures) dans des conditions identiques. Ces expériences ont pu être menées de manière *in vitro*, mais également *in cellulo*.

Par ailleurs, les propriétés de quencher de fluorescence de la tétrazine ont permis l'incorporation d'un fluorophore sur le réactif afin de pouvoir suivre en temps réel l'avancée de la réaction. En effet, lorsque la tétrazine réagit, un recouvrement instantané des propriétés d'émission du fluorophore intervient. Cette stratégie a donc ouvert la voie sur de l'imagerie biologique car elle permet non seulement de trouver de bons ligands pour les cibles, mais également de détecter spécifiquement des cibles thérapeutiques dans des milieux biologiques (cellules).

[137] Angelbello, A. J.; Disney, M. D. A *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 1820–1825.

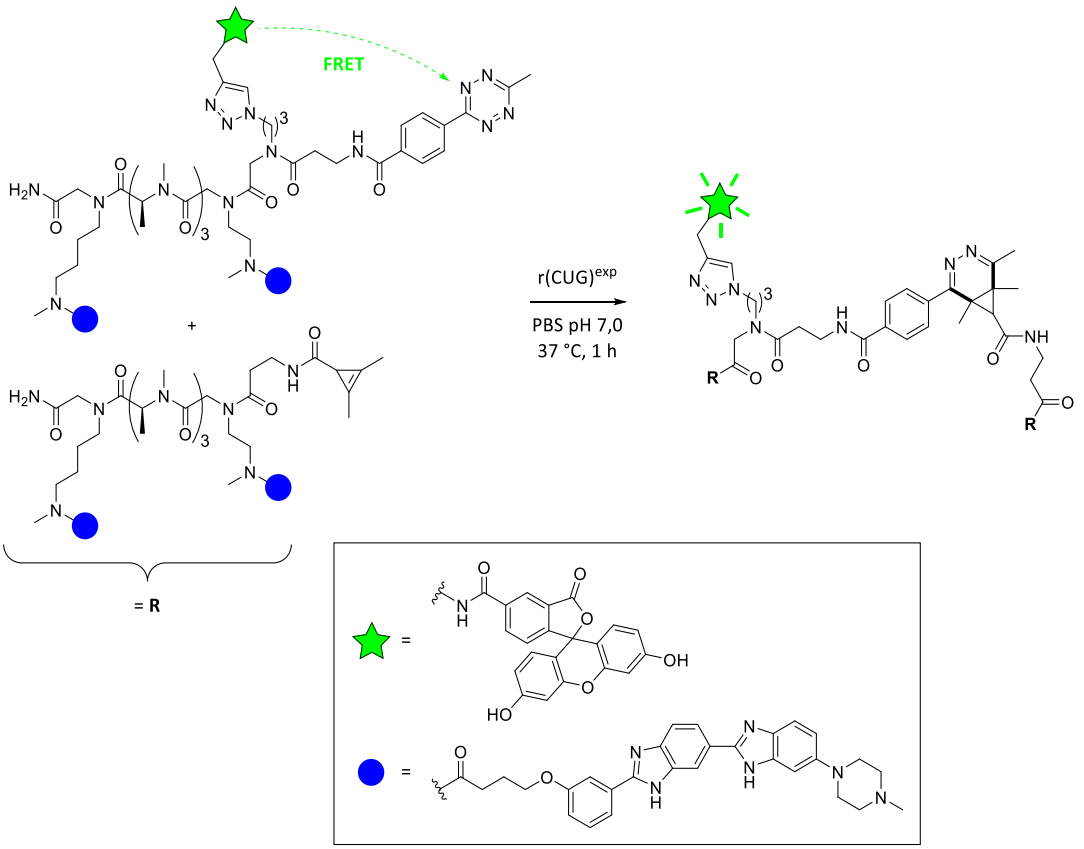


Schéma 39. Ligation tétrazine-cyclopropène in situ *catalysée par les ARN r(CUG)^{exp} en KTGS.*

C - Formations combinées de liaisons C-C et C-N

- *Réaction de Ugi à trois composés*

La première réaction multicomposante employée en KTGS fût brièvement mentionnée par Weber en 2004.[138] Comme présentée au début de ce chapitre, la réaction de Ugi implique normalement quatre fonctions chimiques différentes (isonitrile, acide carboxylique, amine et carbonyle) afin de former des motifs α-amido amides. La variante proposée par Weber comporte seulement trois réactifs, l'acide carboxylique ayant été exclu, ce qui conduit à la formation α-amino amides. Lors de l'étude *in situ*, des cristaux de thrombine stabilisés par des pontages covalents avec le glutardialdéhyde (Thrombin-CLEC) ont été employés comme cible, en présence de 10 µM de chaque réactif et dans un mélange aqueux/organique (Schéma 40).

[138] Weber, L. *Drug Discov. Today: Technol.* **2004**, *1*, 261–267.

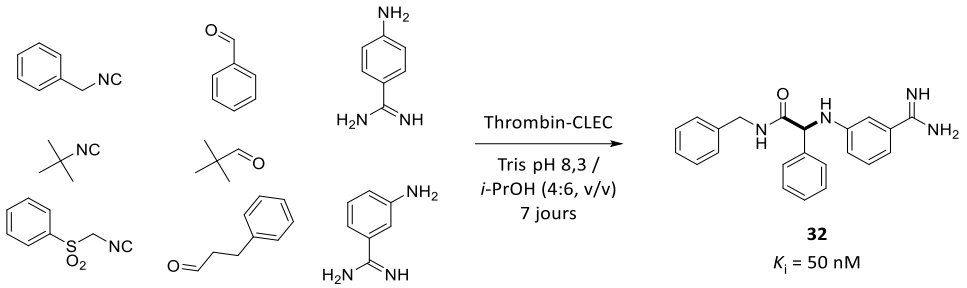


Schéma 40. Étude de KTGS par la réaction modifiée de Ugi en présence de Thrombin-CLEC.

Après une semaine d'incubation en présence de la cible, le composé **32** a pu être détecté, ce qui n'a pas été le cas dans l'expérience de contrôle réalisée en l'absence de Thrombin-CLEC.

- *Réaction de Mannich modifiée (Mannich-like)*

Le deuxième exemple de réaction multicomposante en KTGS a été récemment publié par le groupe du Pr. Rademann.[139] Alors que la réaction de Mannich classique implique trois fonctions chimiques (un aldéhyde, une amine et un nucléophile carboné du type cétone énolisable) et conduit à la formation de produits β-amino carbonylés (Schéma 41, **A**), dans cette approche modifiée pour la KTGS, elle fait intervenir une seconde amine à la place de la cétone énolisable et du formaldéhyde (FA) (Schéma 41, **B**).

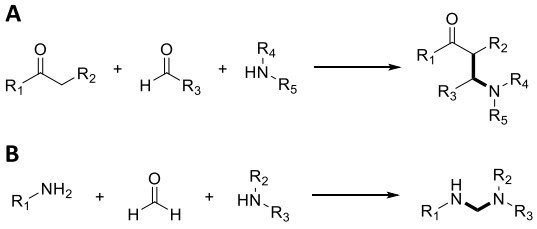


*Schéma 41. (**A**) Réaction de Mannich classique. (**B**) Réaction de Mannich modifiée à deux amines.*

Pour cette étude, le facteur de transcription STAT5 a été choisi comme cible thérapeutique. Un premier criblage comprenant 17 000 fragments a permis l'identification de l'amine **33** comme hit de départ pour la KTGS (Figure 16, **A**). Une étape préliminaire a été menée afin de repérer les structures potentiellement intéressantes pour la KTGS. Pour cela, plusieurs séries de fragments (**33** + FA + une amine nucléophile hétérocyclique) ont été incubés 12 heures, à pH 5 et température ambiante, dans le but d'obtenir les composés

[139] Wong, E. L.; Nawrotzky, E.; Arkona, C.; Kim, B. G.; Beligny, S.; Wang, X.; Wagner, S.; Lisurek, M.; Carstanjen, D.; Rademann, J. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 66–77.

correspondants de la réaction de Mannich-like. Après ce temps, la cible a été introduite dans chaque milieux et son activité a été systématiquement mesurée afin d'évaluer les combinaisons. Ceci a permis de cibler la famille des tétrazoles comme partenaires viables pour les expériences de KTGS (Figure 16, **B**). Ce criblage préliminaire, apparenté à la technique de DLS, s'est avéré fortement utile puisqu'il a permis la mise en évidence de la structure moléculaire générale la plus prometteuse en KTGS (Figure 16, **C**).

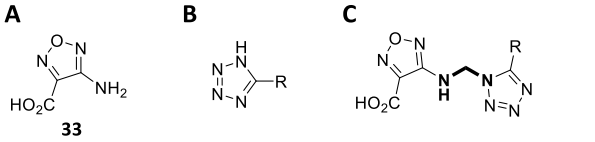


*Figure 16. (**A**) Amine **33** de départ. (**B**) Structure généralisée des tétrazoles. (**C**) Structure généralisée des ligands.*

La synthèse et la mesure de l'activité des meilleurs hits ont été réalisées suite à cette première phase. Le composé **35** s'est avéré être le meilleur ligand et ses précurseurs, le FA et le tétrazole **34**, ont été choisis comme partenaires pour les tests de KTGS (Schéma 42). Les auteurs ont donc entrepris l'étude de synthèse par la cible mais cette fois à un pH physiologique de 7,4. En conséquence, la formation du produit **35** a été exclusivement observée en présence du facteur STAT5, car la réaction de Mannich étant favorisée pour un pH inférieur à 6, la formation non-spécifique de produit dans la réaction de contrôle est donc fortement ralentie à pH 7,4, ce qui permet la mise en lumière de la formation du composé **35** par la cible.

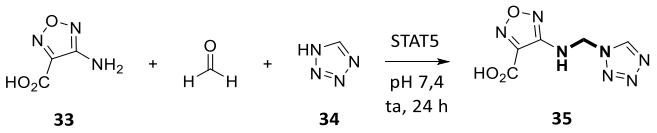
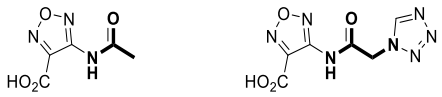


Schéma 42. Réaction de Mannich-like catalysée par le facteur STAT5.

En première intention, le recours à la réaction d'amidation développée en KTGS deux ans auparavant avait été imaginée. Cependant, l'étude d'analogues du ligand **35** a démontré que les amides **36** et **37** ne possédaient aucune activité inhibitrice envers le facteur STAT5 (Figure 17).



36 **37**

*Figure 17. Analogues amides inactifs **36** et **37** du ligand de référence.*

Effectivement, outre la faible flexibilité du lien amide, il s'est avéré que la présence de l'amine secondaire dans le lien formé dans le ligand **35** est impérative pour 1) établir une liaison hydrogène stabilisatrice avec le résidu Asn642 du site actif, et 2) promouvoir la KTGS. En effet, le résidu Asn642 contribue au rapprochement spatial et à l'activation chimique du tétrazole et de l'ion formiminium, issu de la condensation préliminaire de l'amine **33** sur le FA dans le site actif (Schéma 43). Ces résultats ont été confortés par une étude complète, employant des enzymes mutantes ou analogues de la STAT5, mais ne possédant pas le résidu Asn642 dans leur séquence. Elles se sont avérées incapables de catalyser la réaction de Mannich dans les mêmes conditions, et le composé **35** a présenté de bien moins bonnes activités inhibitrice envers ces enzymes. Dans cet exemple, la nature chimique du linker a donc un rôle majeur dans l'activité des molécules formées par la cible, mais également au niveau du mécanisme réactionnel de sa formation.

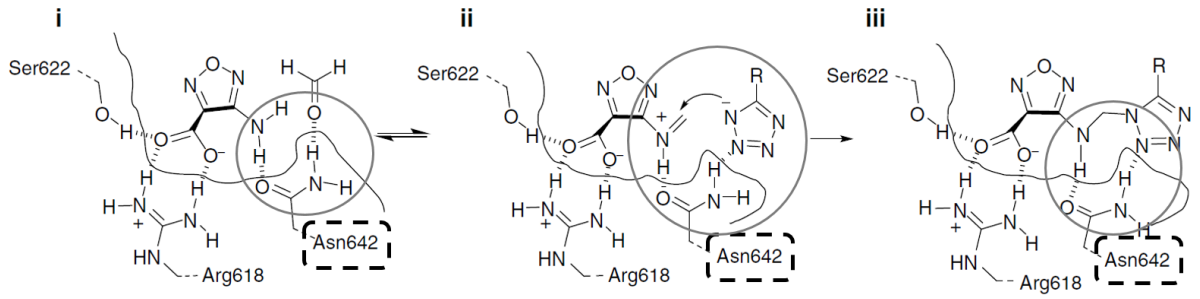


Schéma 43. Interactions et contributions mécanistiques de l'Asn642 (schéma extrait et modifié de l'article[139]).

- *Réaction de Ugi à quatre composants*

Suite à la première description de la réaction de Ugi modifiée en KTGS par Weber, la réaction de Ugi à quatre composants (U-4CR) a été explorée récemment par le groupe du Dr. Hirsch.[140] Lors de cette étude, une première preuve de concept a été réalisée avec à nouveau l'endothiapepsine comme cible thérapeutique d'intérêt. Il s'agit d'une protéase aspartique

[140] Mancini, F.; Unver, M. Y.; Elgaher, W.; Jumde, V. R.; Alhayek, A.; Lukat, P.; Herrmann, J.; Witte, M. D.; Köck, M.; Blankenfeldt, W.; Müller, R.; Hirsch, A. K. H. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 1–10.

connue pour son rôle dans différentes maladies comme la malaria, le VIH ou encore la maladie d'Alzheimer.[141] Des premiers travaux avaient conduit les mêmes auteurs à la découverte de l'inhibiteur **38** grâce à la stratégie de DCC par la ligation d'acylhydrazone.[142] Le composé **38** a pu être co-cristallisé avec l'endothiapepsine et l'étude du complexe par diffraction des RX a permis l'observation des interactions ligand-protéine, notamment avec la dyade catalytique Asp35 et Asp219 (Figure 18, **A**).[143]

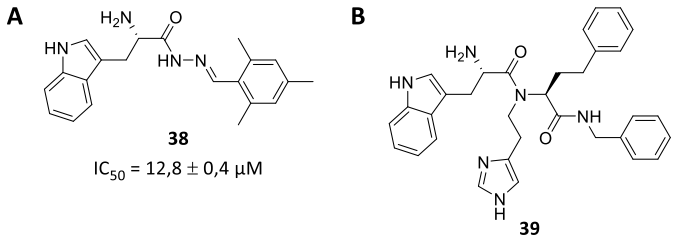


*Figure 18. (**A**) Structure du ligand **38** obtenu par DCC. (**B**) Résultat du design moléculaire* in silico du composé **39**.

A l'aide d'une étude de docking réalisée à partir de la structure du complexe **38**-enzyme, une optimisation structurale a été menée *in silico* afin d'élaborer le composé **39**, permettant de nouvelles interactions hydrophobes avec la cible, tout en conservant celles initialement établis avec le ligand **38** (Figure 18, **B**). En se basant sur la nouvelle structure de **39**, les auteurs ont déterminé que la U-4CR pouvait être employée pour sa synthèse. Des expériences de KTGS ont alors été entreprises à l'aide d'une librairie chimique restreinte mais sélectionnée avec soin, en estimant que 48 ligands pouvaient potentiellement se former (32 provenant de la U-4CR et 16 de la réaction analogue de Passerini). Après incubation, les analyses des réactions menées en présence de l'enzyme et les réactions de contrôle ont clairement démontrées que la formation des ligands **39** et **40** était accélérée en présence de la cible (Schéma 44). Parallèlement, aucun produit correspondant à une réaction du type Passerini n'a pu être observée dans le milieu. Ces deux β-amido amides ont donc été préparés suivant la même réaction et leurs activités inhibitrices ont pu être mesurées (de l'ordre du µM).

[141] Cooper, J. B. *Curr. Drug Targets*, **2002**, *3*, 155–173.

[142] Mondal, M.; Radeva, N.; Fanlo-Virgós, H.; Otto, S.; Klebe, G.; Hirsch, A. K. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9422–9426.

[143] Mondal, M.; Radeva, N.; Köster, H.; Park, A.; Potamitis, C.; Zervou, M.; Klebe, G.; Hirsch, A. K. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3259–3263.

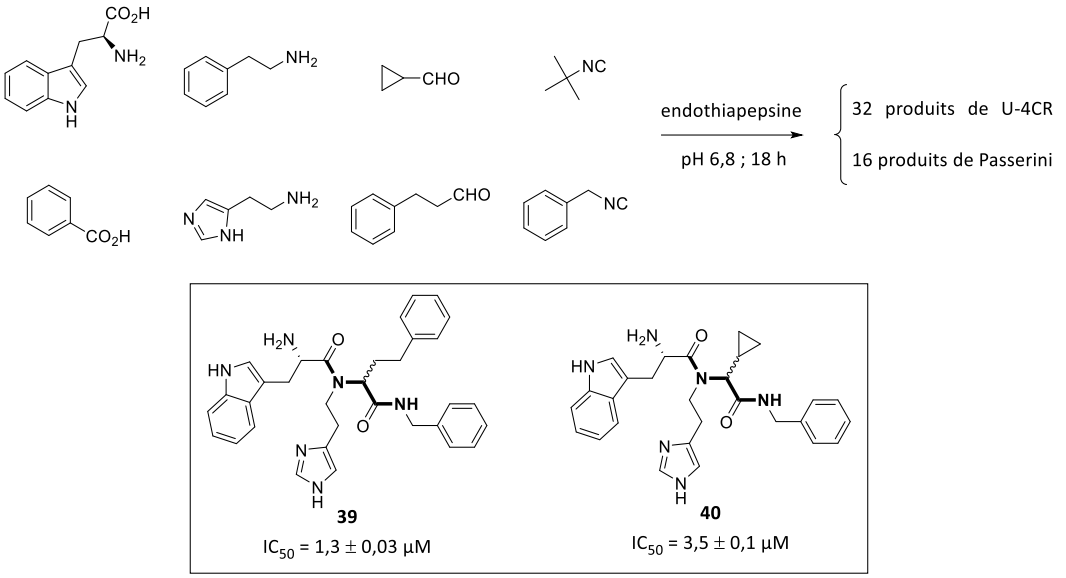


Schéma 44. Réaction de U-4CR catalysée par l'endothiapepsine en KTGS et structures des hits associés.

Dans un second temps, l'éligibilité de l'U-4CR vis-à-vis d'un autre type de cible en KTGS a été étudiée. Les interactions protéine-protéine, reconnues comme étant difficiles à inhiber à l'aide de petites molécules, ont été retenues pour la suite de l'étude. Le choix des auteurs s'est porté sur la cible DnaN. Cette enzyme, qui est constituée de deux sous-unités de l'ADN polymérase III reliées entre-elles sous la forme d'un anneau, joue un rôle crucial dans la synthèse et la réparation de l'ADN. La DnaN interagit avec les chaines linéaires des enzymes de type ADN polymérases I-V pour leur permettre d'atteindre un haut degré d'activité pour la synthèse de l'ADN. Le ciblage spécifique de la DnaN bactérienne, structuralement différente de celle des organismes eucaryotes, pourrait à terme conduire à la découverte de nouveaux agents antibactériens suivant de nouvelles stratégies d'approche afin d'éviter l'apparition de biorésistances. Comme précédemment, les auteurs ont réalisé un premier criblage *in silico* en soumettant les structures de 320 produits possibles de U-4CR. Le composé **41** s'est révélé prometteur puisque permettant l'établissement d'interactions simultanées entre les deux sous-sites I et II de la surface d'IPP (Figure 19).

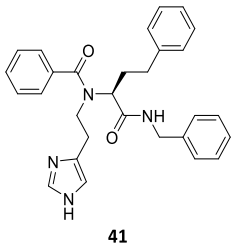


Figure 19. Structure du hit in silico ***41***.

De façon identique à la première étude, une librairie chimique restreinte comprenant les substrats susceptibles de former des ligands apparentés à **41**. Les composés ont été incubés en présence de la DnaN bactérienne et la formation des deux produits de Ugi **41** et **42** a été détectée en présence de la cible (Schéma 45). Ces deux hits ont à nouveau été synthétisés et leurs constantes d'équilibre de dissociation (K_D) ont été mesurées.

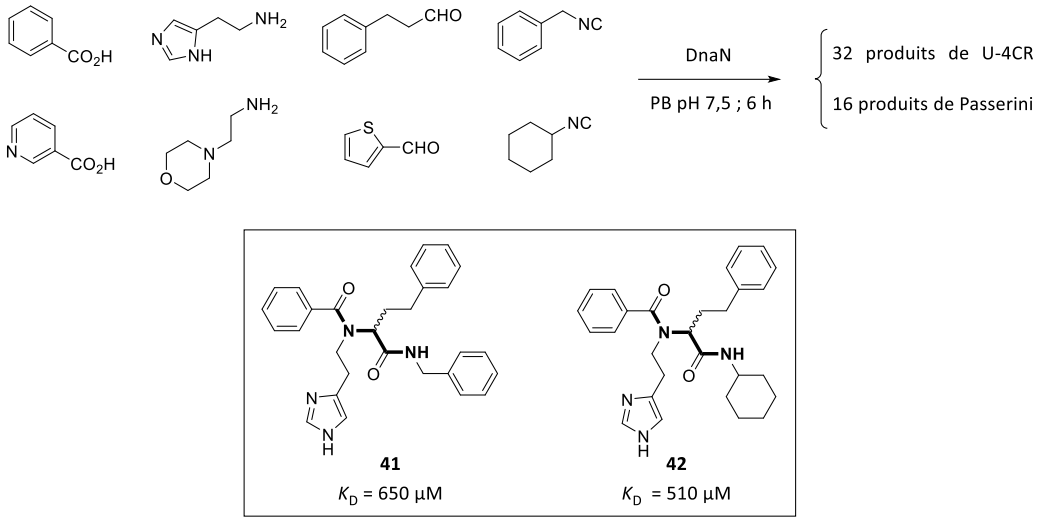


Schéma 45. Réaction de U-4CR catalysée par la DnaN bactérienne en KTGS et structures des hits associés.

En parallèle, les possibles réactions secondaires de Passerini et de cyclisation de Pictet-Spengler ont été suivies lors des expériences de KTGS. La formation de l'amine cyclique **43** résultant de la réaction entre les fonctions aldéhydes et β-aryléthylamines a ainsi été observée en parallèle de la réaction de U-4CR (Figure 20). Bien que cette amine ait été caractérisée aussi bien dans les réactions de contrôle qu'en présence de la DnaN, une légère accélération de la réaction a cependant pu être constatée en présence de l'enzyme, ce qui laisse supposer que la cyclisation de Pictet-Spengler serait une potentielle réaction candidate pour la stratégie de KTGS.

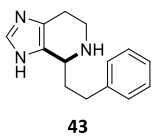


Figure 20. Produit formé et observé lors la réaction secondaire de Pictet-Spengler.

- *Étude et évaluation de la réaction de Groebke-Blackburn-Bienaymé en KTGS*

La réaction à trois composantes de Groebke-Blackburn-Bienaymé (BGG) permet d'accéder à la famille des imidazopyridines en une seule étape à partir d'une 2-aminopyridine, d'un aldéhyde et d'un isonitrile (Schéma 46). La première étape (I) est la formation du formiminium par condensation de l'aminopyridine sur l'aldéhyde. L'isonitrile réalise alors une addition nucléophile sur le formiminium, formant l'intermédiaire nitrilium (II), qui lui-même subit une addition nucléophile intramoléculaire de l'atome d'azote du cycle pyridine (III). Finalement, des étapes de transferts de protons et de tautomérisation (IV) permettent d'accéder au produit final imidazopyridine fonctionnalisé.

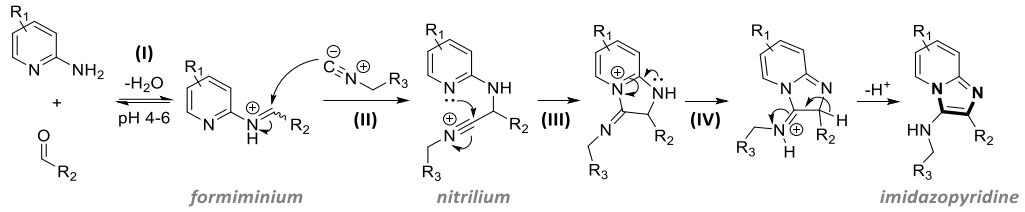


Schéma 46. Séquence mécanistique générale de la réaction de GBB à pH 4-6.

Le développement d'imidazopyridines fonctionnalisées comme inhibiteurs de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) et formées par la réaction de GBB a été précédemment étudié par ce même groupe (Figure 21).[144] L'uPA est une protéase à sérine et est surexprimée dans certaines tumeurs solides métastasiques, notamment dans les cancers du sein, des ovaires ou encore de la prostate. Suite à ces résultats préliminaires encourageants, les auteurs ont entrepris le développement de la réaction de GBB en KTGS en se servant de la même cible et des structures d'inhibiteurs découvertes précédemment comme références.[145] Malgré les résultats très encourageants des études de docking démontrant la faisabilité de la réaction au sein de l'uPA, ainsi que l'activité biologiques des ligands de références ou encore la compatibilité des réactifs en KTGS, les auteurs ne sont pas parvenus à mettre en évidence une accélération cinétique significative de la réaction par l'enzyme. Une difficulté majeure rencontrée s'est avérée être la première étape de formation de l'imine (I) dans les conditions imposées par la KTGS. Des stratégies de formation d'imines

[144] Gladysz, R.; Adriaenssens, Y.; De Winter, H.; Joossens, J.; Lambeir, A.-M.; Augustyns, K.; Van der Veken, P. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 9238–9257.

[145] Gladysz, R.; Vrijdag, J.; Van Rompaey, D.; Lambeir, A.-M.; Augustyns, K.; De Winter, H.; Van der Veken, P. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 12380–12393.

dans le milieu par déprotection d'adduits réversibles du type benzotriazoles ou acide *p*-toluènesulfonique ont également été investiguées, mais sans succès.

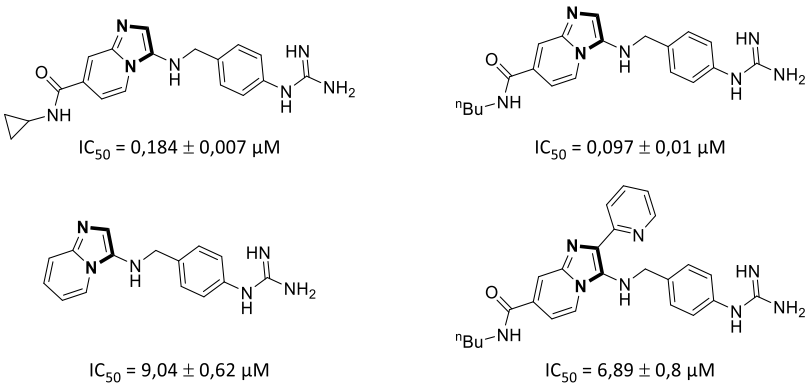


Figure 21. Structures d'inhibiteurs de l'uPA.

Cette étude n'en reste pas moins intéressante puisque que les auteurs se sont attachés à la rationalisation des paramètres à étudier pour le développement de réactions en KTGS et plus particulièrement celles à multiple composants. Sont principalement inclus dans cette étude la stabilité et l'intégrité de la cible, les concentrations de travail pour la KTGS (réactifs et cible), les types de tampons et gammes de pH à employer, les méthodes d'analyses préférables, quelques stratégies de stabilisations réversibles d'imines en milieux aqueux, etc... Il ne fait aucun doute que la réaction de GBB finira par faire son entrée en KTGS grâce à une preuve de concept significative. La recherche d'un nouveau type de cible et de conditions opératoires différentes en sera très probablement la clé.

D - **Formation de liaison C-S**

- *Substitutions nucléophiles d'halogénures d'alkyles par des thiols*

Comme mentionné précédemment dans ce chapitre, l'alkylation de thiols par des halogénures d'alkyles fût la première réaction de KTGS mise en évidence par Chase et Tubbs en 1969.[60]

Plus récemment, l'équipe du Pr. Huc est parvenue à démontrer que l'anhydrase carbonique II (CA II) était capable d'accélérer la formation de ses propres inhibiteurs par la

substitution nucléophile de thiols sur des chlorures d'alkyles.[146] A partir du thiol **44** et des chlorures d'alkyles **45a-e**, cinq ligands (**46a-e**) de la CA II ont été synthétisés et leurs activités inhibitrices respectives ont été mesurées grâce à l'activité estérase de l'enzyme (Figure 22, les composés sont classés de gauche à droite par ordre croissant d'affinité). A cette occasion, les auteurs ont pu constater que les chlorures d'alkyles plus polaires couplés au partenaires **44** ne donnaient pas les meilleures activités. Ceci implique que les interactions hydrophobes des réactifs **45a-e** avec la CA II prévalent sur l'activité globale du ligand.

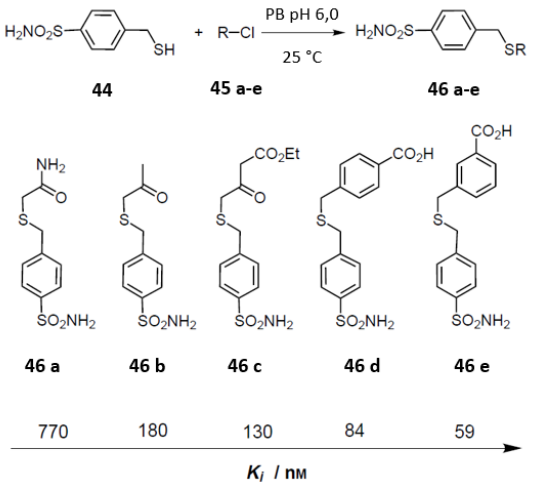


Figure 22. Synthèses et activités des ligands de la CA II par réaction de thio-alkylation.

Que ce soit en présence ou non de l'enzyme, la conversion du thiol **44** est totale quel que soit le chlorure d'alkyle employé. Pour cette raison, des expériences compétitives ont dues être menées en introduisant deux à deux les chlorures d'alkyles (**45a-e**) dans les réactions de contrôle et en présence de l'enzyme. De cette manière, la capacité de la CA II à catalyser la formation des ligands **46a-e** suivant les interactions et activités respectives des réactifs a pu être étudiée (Tableau 3). Le premier constat flagrant de cette étude est que l'enzyme favorise largement la formation du composé le plus actif pour chaque combinaison de chlorures étudiées (Entrées 1 à 4). De plus, le rendement est aussi tributaire de l'activité du composé formé. Ainsi, le produit présentant la meilleure activité inhibitrice voit son rendement de formation augmenter par rapport à l'autre (Entrée 5).

[146] Nguyen, R.; Huc, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1774–1776.

Entrée	*Chlorures comparés*	*Ratio chlorures (éq.)* [a]	*Produits (K_i en nM)*	*Rdt*[b] *sans CA II (%)*	*Rdt avec CA II (%)*
1	**45a**	**500**	**46a** (770)	46.5	16
	45b	**2**	**46b** (180)	53.5	84
2	**45a**	**125**	**46a** (770)	15	2
	45c	**1.08**	**46c** (130)	85	98
3	**45a**	**50**	**46a** (770)	50	8
	45d	**12.5**	**46d** (84)	50	92
4	**45a**	**50**	**46a** (770)	40	10
	45 e	**12.5**	**46e** (59)	60	90
5	**45b**	**25**	**46b** (180)	49	43
	45c	**9.25**	**46c** (130)	51	57

[a] Les ratios ont été ajustés afin de compenser les différences de réactivités des composés. [b] Rdt = rendements HPLC avec étalonnage interne (acide benzoïque).

*Tableau 3. Résultats des expériences de réactivités compétitives entre le thiol **44** et deux chlorures, avec ou sans CA II.*

De manière plus formelle, le « caractère purement KTGS » de cette réaction peut difficilement être défini. En effet, les rapports de réactivités avec ou sans l'enzyme sont d'environ deux, ce qui est un peu juste selon les critères de KTGS. Par ailleurs, le ratio des chlorures à engager doit être défini au préalable, afin de compenser leurs grandes différences de réactivité.

- *Ouverture d'époxyde par addition de thiols*

L'emploi des époxydes comme partenaires électrophiles en KTGS avec les amines primaires avait été initié de manière fortuite par Wilson en 2001.[77] Le Pr. Ohkanda a publié en 2013 une alternative visant à employer directement un époxyde, contrairement à la version de Wilson, afin de réaliser son ouverture par addition nucléophile d'un thiol *in situ*.[147] Son objectif final était de développer de nouveaux inhibiteurs d'interactions protéine-protéine de poids moléculaires modérés, en ciblant particulièrement la protéine 14-3-3ζ, dont

[147] Maki, T.; Kawamura, A.; Kato, N.; Ohkanda, J. *Mol. BioSyst.* **2013**, *9*, 940–943.

l'implication dans le développement de cancers[148] et de maladies neurovégétatives[149] a été établie.

La fusicoccine-A (**FC-A**) est une phytotoxine fongique connue pour sa capacité à se lier à la poche hydrophobe de la protéine 14-3-3ζ, dont la cavité adjacente permet de former des complexes ternaires stables avec le phosphopeptide **QSYpTV** (Figure 23, **A**). Grâce à ces données, les auteurs en ont conclu que la fonctionnalisation de dérivés analogues à la **FC-A** permettrait de réaliser une réaction *in situ*. En conséquent, des réactifs de type époxydes (**FC-AE1 à 6**) et thiol (**QSYDC**) ont été préparés pour les tests de KTGS en se basant sur les structures des molécules naturelles (Figure 23, **B**). Cependant, l'époxyde **FC-AE1** s'est avéré instable dans les conditions légèrement basiques de la KTGS et a conduit à la formation du diol **FC-AE6** par hydrolyse.

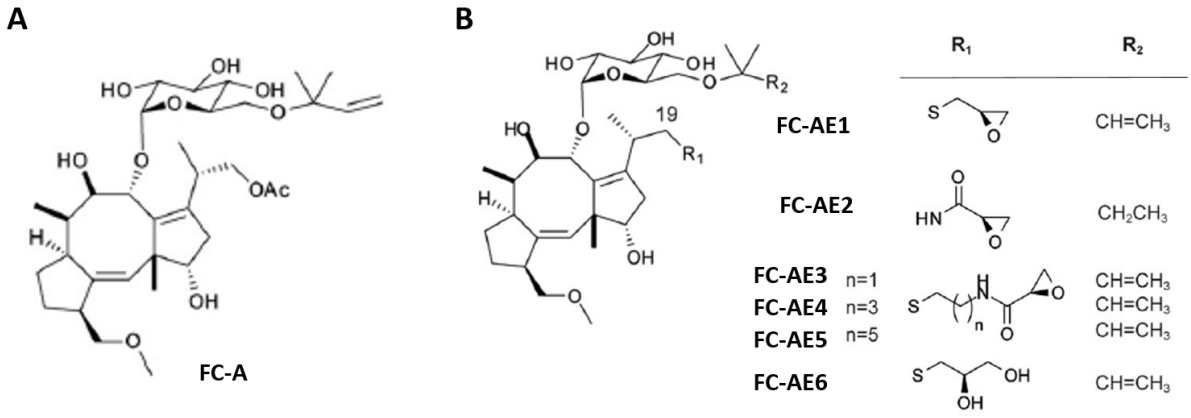


*Figure 23. (**A**) Structures de la **FC-A** et du phosphopeptide naturel **QSYpTC**. (**B**) Structures des analogues réactifs de KTGS.*

Les incubations deux à deux des réactifs en présence ou non de la cible ont été réalisées (Schéma 47, **A**). Ainsi, les calculs de rendements relatifs pour chaque expérience (contrôle vs. 14-3-3ζ) ont permis d'apprécier les accélérations relatives de la réaction en fonction des partenaires engagés (Schéma 47, **B**). En conclusion, la longueur de la chaîne carbonée portant la fonction époxyde est un critère très important. Ceci traduit le fait que la proximité et l'orientation spatiale des fonctions réactives est très sensible, c'est-à-dire à ± un

[148] Hermeking, H. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 931–943.

[149] Zhao, J.; Meyerkord, C. L.; Du, Y.; Khuri, F. R.; Fu, H. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2011**, *22*, 705–712.

carbone d'espacement près, ce qui illustre l'efficacité de la stratégie de KTGS pour l'optimisation structurale très précise des ligands.

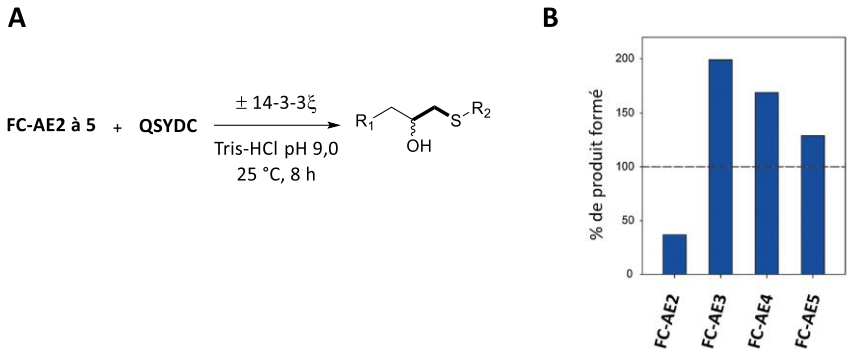


*Schéma 47. (**A**) Ouverture d'époxyde par addition de thiol catalysée par la protéine 14-3-3ζ.(**B**) Rendements relatifs des expériences KTGS catalysée par la protéine (figure extraite et modifiée de l'article[147]).*

- *Addition 1,4 de thiols sur des acrylamides*

Suite aux premiers résultats obtenus par cycloaddition de Huisgen dans l'AChE,[100] le couple de ligands PIQ et huprine (respectivement du site SPA et du site catalytique) a été à nouveau employé pour le développement de la réaction irréversible de thia-Michael *in situ*.[150] Une librairie très restreinte, contenant trois dérivés **(+/-)-Pm** portant la fonction thiol et trois dérivés d'acrylamide **(+/-)-Hn**, a été préparée et testée avec la *m*-AChE (Schéma 48). L'acrylamide a été choisi pour sa réactivité lente et plus faible que les maléimides ou que les accepteurs de Michael de type cétone ou ester afin de ralentir la réaction sans la *m*-AChE.

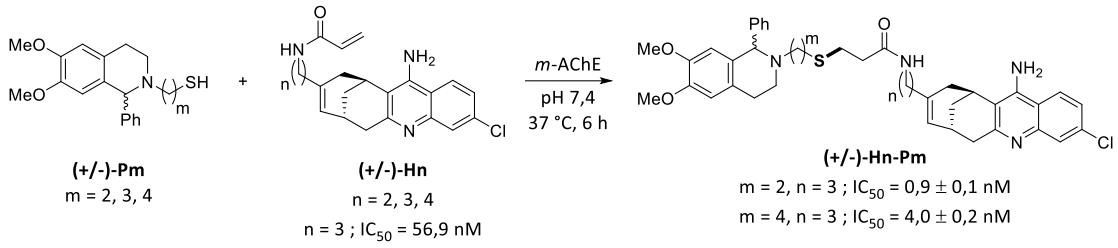


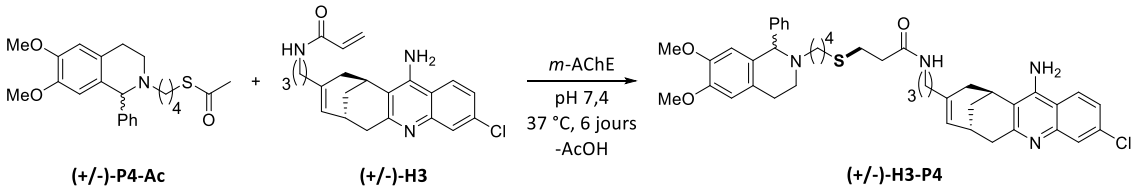
Schéma 48. Réaction de thia-Michael catalysée par la m-*AChE.*

Sur les neuf combinaisons possibles, seuls deux produits **(+/-)-H3-P2** et **(+/-)-H3-P4** ont été formés par la *m*-AChE après six heures d'incubation à 37 °C. Les mesures et comparaisons des valeurs d'IC_{50} des neuf produits indiquent clairement que les deux composés formés sont

[150] Oueis, E.; Nachon, F.; Sabot, C.; Renard, P.-Y. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 2043–2045.

parmi les plus affins, même si certaines combinaisons présentent des activités similaires, mais n'ont cependant pas pu être observées en KTGS même après 15 jours d'incubation.

Les thiols sont connus à la fois pour leur grande réactivité mais aussi pour leur instabilité naturelle face à l'oxydation et aux milieux basiques, conduisant à la formation de ponts disulfures stables ce qui en fait la principale limitation pour l'emploi des thiols en KTGS. Par analogie à la méthode de Manetsch, portant sur la déprotection tardive des thioacides pour la sulfo-click *in situ*, notre équipe a imaginé une nouvelle stratégie d'approche pour les thiols. En effet, la très forte activité naturelle d'estérase de la *m*-AChE a encouragé l'emploi de la fonction thioester comme source protégée de thiol car facilement hydrolysable en acide acétique (totalement biocompatible) et en thiols correspondant. Les dérivés **(+/-)-P4-Ac** et **(+/-)-H3** ont été ainsi incubés avec la cible dans les mêmes conditions décrites précédemment (Schéma 49). La cascade enzymatique comprenant l'hydrolyse du thioester puis la réaction de thia-Michael promue par l'AChE a été un succès, aboutissant à nouveau à la formation du ligand **(+/-)-H3-P4**. De plus, la réaction de contrôle sans la cible a démontré que la formation non-spécifique du ligand était quasi-nulle. Cependant, cette cascade réactionnelle est plus lente que l'addition de Michael seule (six jours d'incubation sont nécessaires, contre six heures initialement). Cependant, la différence cinétique de formation du ligand est nettement visible après deux jours en comparant le blanc et l'expérience enzymatique.



(+/-)-P4-Ac **(+/-)-H3** **(+/-)-H3-P4**

Schéma 49. Cascade enzymatique comprenant l'hydrolyse du thioester et la réaction in situ *de thia-Michael.*

En 2015, le groupe du Pr. Soellner a entrepris la recherche de nouveaux inhibiteurs réversibles de la kinase c-Src grâce à la même réaction de KTGS.[151] Le développement de nouveaux inhibiteurs covalents de la famille des kinase a permis à ce même groupe d'identifier plusieurs structures prometteuses.[152] Grâce à ce point de départ, les auteurs ont préparés le thiol **47** et ont décidé de travailler avec l'enzyme mutante analogue 3M c-Src comprenant un résidu sérine à la place d'un résidu cystéine dans son site actif. L'objectif a évidemment été

[151] Kwarcinski, F. E.; Steffey, M. E.; Fox, C. C.; Soellner, M. B. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 898–901.
[152] Kwarcinski, F. E.; Fox, C. C.; Steffey, M. E.; Soellner, M. B. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1910–1917.

d'éviter toute réaction parasite avec les partenaires acrylamides. Un premier criblage de 110 fragments comprenant une fonction acrylamide a été effectué selon un principe de KTGS « inversé ». Effectivement, la cible est classiquement le paramètre limitant entre les expériences « réelles » et de contrôles, mais cette fois elle a été introduite dans toutes les expériences, contrairement au thiol **47** qui a donc servi de facteur de différenciation (Schéma 50, **A**). Le suivi temporel de l'activité enzymatique a permis d'identifier quatre fragments (**Acr-1** à **4**) lors de ce premier criblage et ceci grâce au taux de décroissance de l'activité enzymatique plus élevé que le moyenne des fragments étudiés. Un second criblage de KTGS classique a été effectué en présence ou non de la cible cette fois, avec comme partenaires le thiol **47** et les réactifs **Acr-1** à **4** initialement identifiés (Schéma 50, **B**). Dans ces conditions, seul le ligand **47-Acr-3** a été formé en présence de la cible. Il présente une très bonne valeur de constante d'inhibition de 90 ± 2 nM. En raison de la possible dissociation des fragments **47** et **Acr-3** *in vivo* par réaction de rétro- Michael, les auteurs ont réalisé une optimisation structurale en remplaçant le motif thioéther par un simple pont méthylène -CH_2- (Schéma 50, **C**). Malgré un lien légèrement plus court avec cette variation structurale, la molécule **48** a présenté une valeur de K_i = 140 ± 3 nM proche de celle obtenue avec le thioéther **47-Acr-3**.

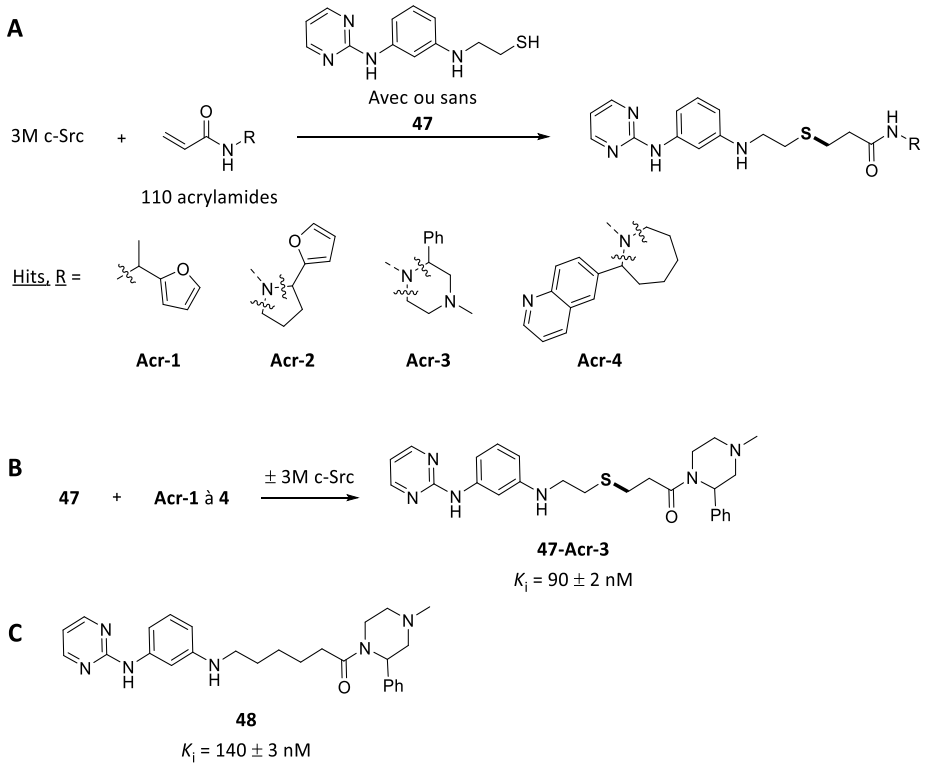


*Schéma 50. (**A**) Premier criblage de KTGS « inversé ». (**B**) Confirmation des hits par criblage KTGS classique. (**C**) Optimisation structurale sans fonction thioéther.*

II – Enjeux en KTGS et objectifs des travaux de thèse

2.1. Enjeux et progrès en KTGS

Comme il a été démontré en première partie de ce premier chapitre, la synthèse par la cible s'inscrit parfaitement dans le domaine de la chimie médicinale contemporaine et des biotechnologies. Bien que de nombreuses avancées aient été réalisées depuis les trente dernières années, notamment au niveau du nombre et de la nature des cibles thérapeutiques, *via* le développement de nouvelles réactions éligibles en KTGS ou encore la mise au point de techniques d'analyses plus sensibles, plusieurs enjeux et limitations demeurent en KTGS.

2.1.1. Les limitations de la stratégie de KTGS

Plusieurs limitations importantes ont été mises en évidence au fil des travaux employant la technique de KTGS pour le développement de nouvelles molécules actives. Une liste regroupant les principales limitations permet de s'en rendre compte :

- **Empoisonnement de la cible :**

La cible permet la formation en son sein d'un ligand souvent très affin. Une fois formé, ce dernier va ainsi occuper de manière prépondérante le site actif de la cible, empêchant par conséquent la diffusion des fragments réactifs vers les sites d'interactions du fait de leurs moins bonnes affinités avec la cible. Par conséquent, le « taux de roulement » de cette dernière pour la formation de son ligand sera d'autant plus faible que le ligand sera affin. *In fine*, la quantité globale et finale du ligand formé sera donc très faible, avec une concentration pouvant être de l'ordre de celle de la cible, ce qui impactera directement sa détectabilité *via* les différentes techniques analytiques et implique d'utiliser une plus grande quantité de cible.

- **Les « fortes » quantités de cible isolée et purifiée employée :**[59,71]

Les criblages moléculaires en KTGS sont le plus souvent menés à partir des cibles enzymatiques solubles, isolées et purifiées. Dans la majeure partie des cas, la cible se trouve à des concentrations moyennes comprises entre 1 et 600 µM, ce qui est relativement concentré pour certaines cibles. Pour que le produit soit facilement détectable, cela conduit généralement à employer la cible en quantité quasi-stœchiométrique par rapport aux réactifs. Ceci limite donc cette stratégie à des cibles solubles, isolables et relativement stables, ce qui explique pourquoi aucune enzyme membranaire n'a pu être utilisée en KTGS à ce jour. Par

ailleurs, la cible n'est pas toujours commercialement disponible ou peut s'avérer très onéreuse à produire en quantité suffisante, ce qui provoque une augmentation substantielle des coûts pour chaque expérience.

- **Le risque de résultats « faux négatifs » :**

La faible concentration des produits formés (généralement < 1 µM) peut aboutir à la non-détection de hits en raison de limites instrumentales et donc biaiser les résultats d'expérience.

- **Les temps d'incubation parfois longs :**

En moyenne, une expérience de KTGS est incubée de 20 à 37 °C durant 24 à 36 heures. Cette durée peut dans certains cas être augmentée à plusieurs jours, voire une semaine. Dans ces conditions, la stabilité structurale de la cible biologique peut être compromise et une dénaturation plus ou moins importante peut être observée. La quantité de ligand formée peut ainsi être réduite du fait de la dégradation de cibles actives dans le milieu et ainsi aboutir à un faux négatif.

- **Le recours à des réactions éligibles en KTGS encore peu nombreuses :**

Le recours à des réactions biocompatibles, voire bio-orthogonales, fait partie intégrante des exigences de la KTGS et malgré les nombreuses avancées qui ont été effectuées jusqu'à encore récemment, le nombre de réactions décrites en KTGS dans la littérature demeure faible (une quinzaine en 2020).

2.1.2. Les innovations en KTGS

Afin de répondre à ces différentes limitations, de nombreuses études et projets ont été menés dans le but de développer de nouveaux outils techniques et chimiques pour la KTGS.

2.1.2.1. Réaliser des expériences de KTGS en milieux complexes

Afin de palier au besoin de travailler avec des cibles thérapeutiques isolées purifiées, plusieurs groupes ont réalisé des criblages de KTGS directement sur des matrices biologiques plus ou moins complexes. Outre les premiers travaux de Rideout concernant la formation d'un

lien hydrazone stable par l'hémoglobine de lysats d'érythrocytes,[63] d'autres exemples se sont ajoutées plus récemment grâce à la réaction de cycloaddition de Huisgen.

Des ligands dérivés de la kanamycin de brins d'ARN toxiques ont ainsi été découverts en réalisant les expérimentations *in cellulo* en comparant les résultats obtenus sur des cellules saines à ceux observés sur des cellules infectées.[117(a),(b)]

En 2018, des lysats d'érythrocytes bovins ont été employés comme source non purifiée de *b*CA II, naturellement abondante dans le cytosol des globules rouges, afin de catalyser la formation d'un inhibiteur de cette enzyme.[153] En réalisant des études comparatives des cinétiques de formation du ligand, en présence ou non d'inhibiteur connu commercial de la CA II, les auteurs ont pu mettre en évidence une légère augmentation de la quantité de ligand ciblé en absence d'inhibiteur compétitif.

Toujours dans le cadre de la lutte contre la biorésistance et du développement de nouvelles générations d'antibiotiques, les ribosomes bactériens sont devenus des cibles thérapeutiques privilégiées. La découverte de quatre nouveaux inhibiteurs macrocycliques (**solith.-Tz-« fonction »**) de la croissance bactérienne a été réalisée ici par chimie click *in cellulo* (ICCC) sur des souches de bactéries résistantes (*Staphylococcus aureus* UCN18) comme source directe de ribosomes (Schéma 51, **A**).[154] Les différentes expériences ont pu être menées en parallèle dans des plaques de 96 puits (Schéma 51, **B**).

Des travaux complémentaires[155] ont menés à l'élaboration de systèmes complets de criblage sous une format de HTS qui permettent à la fois de : 1) contrôler visuellement la croissance des bactéries (la viabilité des bactéries est évaluée par test de luminescence utilisant un couple luciférine/luciférase : si le ribosome est inhibé, la coloration bleue disparait), puis de réaliser les analyses LC-MS pour confirmer les résultats de hits ; 2) optimiser les concentrations de travail pour l'ICCC ; 3) réaliser toutes les expériences de contrôles et de KTGS en parallèle ; 4) mesurer les valeurs de concentrations minimales pour lesquelles la croissance bactérienne est inhibée (MIC).

---

[153] Antti, H.; Sellstedt, M. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 351–353.

[154] Jin, X.; Daher, S. S.; Lee, M.; Buttaro, B.; Andrade, R. B. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 907–911.

[155] Sang, Z.; Lu, Y.; Zhou, Y.; Ju, Y.; An, Q.; Shen, S.; Shi, J.; He, J.; Yang, T.; Luo, Y. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 5886–5889.

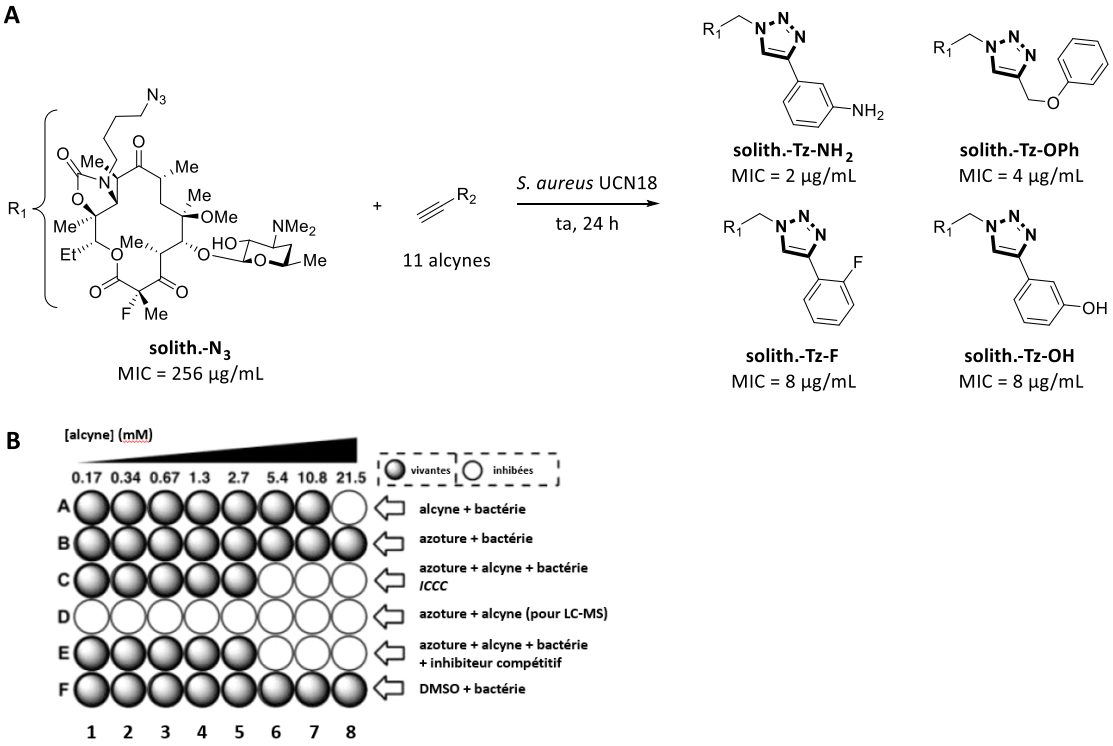


*Schéma 51. (**A**) ICCC catalysée par les ribosomes bactérien et structures des hits. (**B**) Format d'expériences d'ICCC sur plaque 96 puits (schéma extrait et modifié de l'article[174]).*

Ces nouvelles approches en milieux complexes, couplées à l'élaboration de techniques « plus simples, plus rapides et plus directes », représentent une économie financière et un gain de temps substantiels pour la recherche de nouvelles molécules actives, mais peuvent être complexes à mettre en œuvre et nécessite l'emploi de nombreux contrôles.

2.1.2.2. Différents formats d'expériences de KTGS

Plusieurs formats d'expériences KTGS ont été employés dans la littérature.[59] Le premier, qui est le plus classique et le plus répandu, consiste à réaliser des tests binaires où chaque combinaison de réactifs est testée une à une (Figure 24, **A**). Cette technique peut être considérée comme la plus sûre dans le cadre de développement de preuves de concept, comme par exemple l'évaluation d'une nouvelle réaction en KTGS.

Le second format consiste à réaliser les expériences en multi-réactifs (Figure 24, **B**). Un des partenaires, seul, est mis en présence de la cible avec différents groupes de *n* réactifs complémentaires et mélangés (clusters). Ce format permet la réduction des quantités totales de cible engagées et du temps d'analyse nécessaire. Cependant, de faux positifs peuvent être

observés et les techniques d'analyses (LC-MS par exemple) sont susceptibles de perdre de la performance en terme de sensibilité et de sélectivité à cause de la complexité des mélanges. La génération de composés isobares est également un problème pour les analyses, ce qui requiert soit d'éviter cette possibilité dans les combinaisons, soit d'effectuer des expériences binaires complémentaires pour vérifier les résultats.

Enfin, des expériences orthogonales en multi-composés peuvent être menées. Il s'agit ici d'établir deux groupes d'études (Partitions A et B), composés chacun de plusieurs clusters de réactifs (A1, A2, …, An et B1, B2, …, Bn), puis de les mettre en réaction au même moment avec la cible et un unique réactif complémentaire (Figure 24, **C**). L'objectif est d'obtenir des répartitions telles qu'un cluster donné du groupe A (A1 par exemple) n'ait qu'un seul réactif en commun avec les clusters du groupe B. Grâce à cela, chacun des réactifs sera testés dans des environnements entièrement différents. Cette stratégie vise ainsi la réduction des faux négatifs/positifs, tout en conservant la rapidité et l'aspect économique des expériences multi-composés classiques.

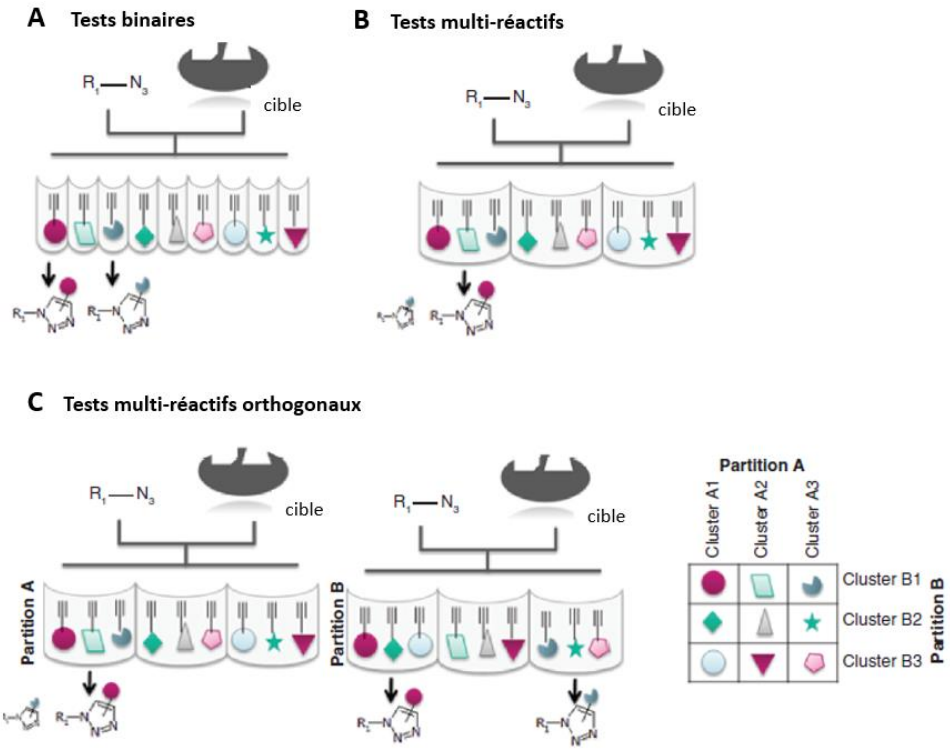


*Figure 24. Formats d'expériences de KTGS par (**A**) tests binaires, (**B**) tests multi-réactifs et (**C**) tests multi-réactifs orthogonaux (schéma extraits et modifiés de la revue[59]).*

Cette troisième stratégie avait été développé par le groupe du Pr. Deprez-Poulain en 2015, lors d'une étude de click *in situ* sur l'enzyme humaine principalement responsable de la

dégradation de l'insuline (*human insulin-degrading enzyme*, *h*IDE).[156] Il s'agit d'une protéase à zinc de la famille des M16, dont le site actif singulier est très large et est composé de deux domaines, le C-terminal et le N-terminal qui contient l'ion zincique. Deux formes sont en équilibre : la forme ouverte, qui est inactive mais qui permet l'entrée des substrats et des ligands par la « porte », et la forme fermée, qui permet la mise en proximité spatiale des résidus importants pour l'activité catalytique et qui sont répartis sur les deux domaines, formant ainsi le site actif et la chambre catalytique lors de la « fermeture » (Figure 25, **A**).

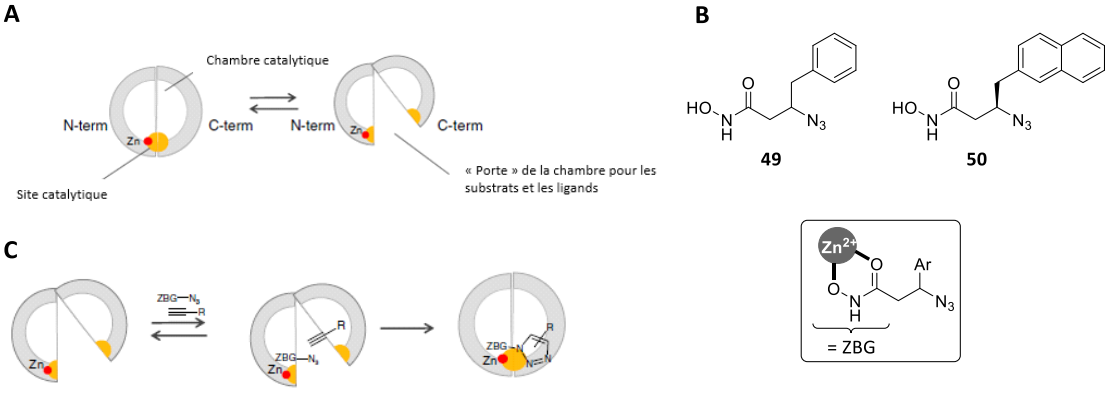


*Figure 25. (**A**) Equilibre des formes ouverte et fermée de la* h*IDE (figure extraite et modifiée de l'article). (**B**) Structures des partenaires **49**et **50** et mode de chélation de l'atome de zinc. (**C**) Stratégie d'inactivation de l'*h*IDE par KTGS.*

Deux partenaires azotures **49** et **50** permettant de chélater l'ion zincique grâce à leur fonction acide hydroxamique (*zinc-binding group*, ZBG) ont été choisis pour ce projet de KTGS (Figure 25, **B**). Pour la click *in situ*, les partenaires azotures **49** ou **50** viennent se positionner dans la partie N-terminal en chélatant l'atome de zinc, pendant que les partenaires alcynes « sélectionnés » par l'enzyme peuvent se placer de l'autre côté dans le site C-terminal. L'idée est de pouvoir identifier des ligands capables de se former lorsque la chambre catalytique est en position fermée, et ainsi de pouvoir conserver préférentiellement cette position en jouant sur l'équilibre conformationnel de l'enzyme de manière à réduire son activité catalytique (Figure 25, **C**).

Concernant le criblage des partenaires alcynes dans le domaine C-terminal par KTGS, le format de réaction en multi-réactifs orthogonale a été imaginé à cette occasion afin de tester rapidement 90 structures d'alcynes (Figure 26, **A**). Deux partitions **A** et **B** contenant respectivement neuf et dix clusters ont été élaborées et étudiées. Après 72 heures

[156] Deprez-Poulain, R. *et al. Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8250–8263.

d'incubation à 37 °C en présence de l'*h*IDE, plusieurs produits ont pu être détectés mais les analyses d'activités biologiques ont démontré que le ligand **51** formé dans les deux partitions était finalement le plus actif et le plus efficace (Figure 26, **B**).

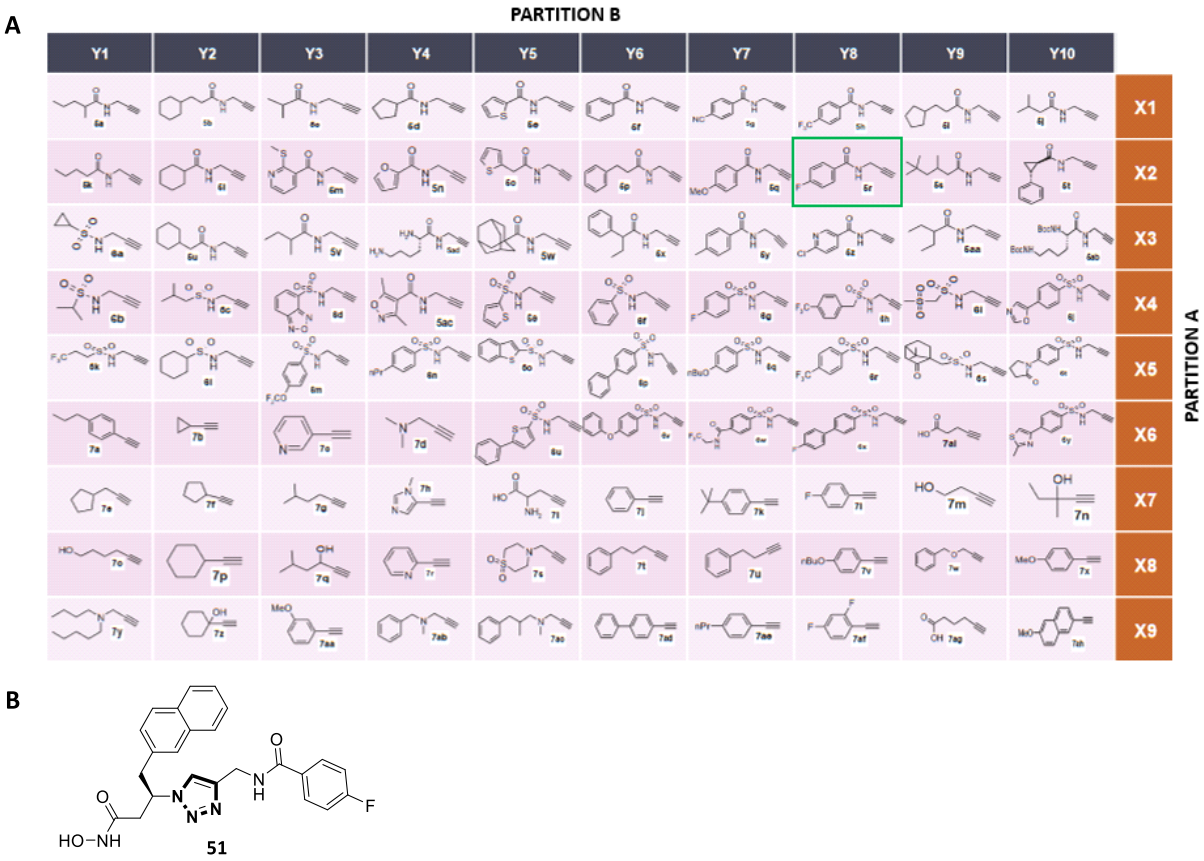


*Figure 26. (**A**) Partitionnement des alcynes pour la KTGS en multi-composés orthogonale. (**B**) Structure du ligand **51**.*

2.1.2.3. Miniaturisation de systèmes automatiques et emploi de la microfluidique

L'automatisation et la miniaturisation sont également devenues de précieux outils en KTGS. En 2006, le criblage automatisé et en parallèle de KTGS a été décrit dans la littérature à l'aide d'un circuit intégré de type « microfluidique » (Figure 27).[157] Ainsi, ce système a permis de tester par réaction de click *in situ* 20 partenaires azotures en présence d'un partenaire alcyne et de l'enzyme CA II. Le volume final de mélange réactionnel dans les microréacteurs est en moyenne de 4 µL pour ce type de circuit. Les solutions stocks de réactifs et de l'inhibiteur compétitif sont pré-mélangées dans des boucles de mélanges et homogénéisées

[157] Wang, J.; Sui, G.; Mocharla, V. P.; Lin, R. J.; Phelps, M. E.; Kolb, H. C.; Tseng, H.-R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5276–5281.

pendant 15 secondes. Ensuite, le mélange de réactif est lui-même dilué dans une solution stock contant l'enzyme. Le tout est à nouveau homogénéisé et puis envoyé dans le microréacteur pour y être incubé 40 heures à 37 °C. Le système de mélange est alors lavé avec le tampon de l'expérience avant de recommencer un nouveau cycle pour une combinaison différente de réactifs. Avec une durée d'environ 57 secondes par cycle, 32 expériences ont pu ainsi être démarrées en 30 minutes seulement. Après incubation, les mélanges réactionnels sont collectés et analysés par LC-MS. Afin de comparer et de s'assurer de la fiabilité des résultats, les mêmes expériences ont été réalisées par incubations classiques dans une plaques 96 puits. Les résultats obtenus suivant les deux méthodes ont été rigoureusement identiques. Outre la diminution drastique de la consommation de réactifs et de cible par rapport aux expériences classiques (facteur 5-12), ce système peu coûteux et modulable permet un gain de temps substantiel, ce qui est un paramètre critique en recherche pharmaceutique.

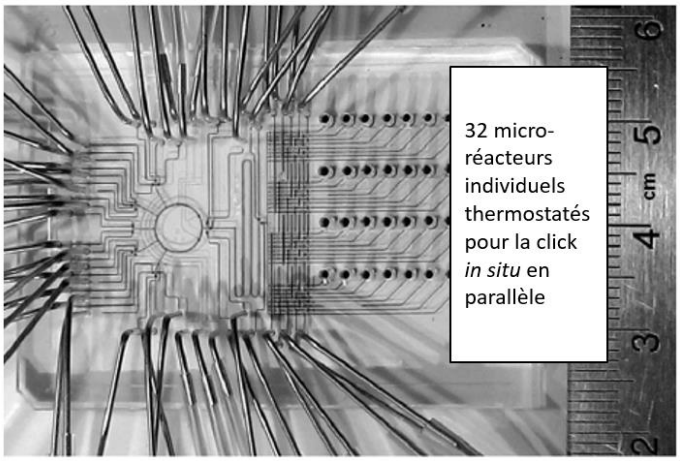


Figure 27. Circuit intégré de microfluidique (photographie extraite et modifiée de l'article[157]*).*

Une seconde génération de circuit microfluidique a été créée en 2009 par la même équipe et apporte de nombreuses améliorations au circuit initial.[158] Les caractéristiques sont regroupées ci-après (Tableau 4). Ce nouveau système a permis aux auteurs de réaliser plusieurs conditions expérimentales en parallèle afin d'optimiser les résultats de KTGS. De plus, la très grande fiabilité d'analyse et l'excellente reproductibilité permettent de s'affranchir des risques d'erreurs humaines grâce à cet outil.

[158] Wang, Y.; Lin, W.-Y.; Liu, K.; Lin, R. J.; Selke, M.; Kolb, H. C.; Zhang, N.; Zhao, X.-Z.; Phelps, M. E.; Shen, C. K. F.; Faull, K. F.; Tseng, H.-R. *Lab Chip* **2009**, *9*, 2281–2285.

Paramètres	Circuit 1ère génération	Circuit 2nd génération
Nombre de réacteurs	32	1024
Préparation des expériences	57 secondes	17 secondes
Elimination du tampon	Chaîne HPLC	Cartouche SPE en phase inverse
Méthode d'analyse	HPLC-MS	Détection directe de transition ion parent → ion fils par MS
Temps d'identification de hits	± 40 minutes	± 15 secondes

Tableau 4. Comparaison des systèmes de 1ère et de 2ème génération.

2.1.2.4. Augmentation artificielle du pouvoir catalytique de la cible

En temps normal, la cible à elle-seule permet de catalyser la formation d'une petite quantité de ligand avec un rendement souvent très faible. En 2010, l'équipe du Pr. Miyata s'est aperçue que la réaction de click au sein de l'enzyme histone désacétylase 8 (*rh*HDAC8[159]), une métalloenzyme possédant un ion zincique dans son site actif, atteignait un rendement d'environ 50%.[160] La réaction de KTGS s'est montrée très sélective en terme de partenaires azoture et alcyne (Schéma 52, **A**) et seul l'isomère *anti*-triazole ***a*52** a été formé lors de la cycloaddition, bien que le *syn*-triazole ***s*52** soit le plus actif des deux (Schéma 52, **B**). Ces observations ont suggéré d'une part une catalyse du type CuAAC avec en parallèle un effet de sélectivité des fragments par l'enzyme. Le dosage par ICP-MS dans un mélange de KTGS (réactifs + cible) des atomes de zinc et de cuivre a révélé des concentrations respectives de 0,95 µM et 0,10 µM. Le couplage de Sonogashira afin d'obtenir les alcynes terminaux a donc été vraisemblablement responsable de la contamination du milieu par du Cu(I). Les auteurs ont alors supposé que la formation d'un complexe enzyme-Cu(I) permettait d'obtenir un catalyseur bien plus efficace pour la réaction de click *in situ*, comparativement à la cible et au Cu(I) utilisés séparément. Des expériences de contrôles ont été menées et ont mis en évidence l'inhibition totale du système avec aucune formation de ligand ***a*52** ou ***s*52** lors de : 1) la saturation de l'enzyme en ion Zn^{2+}, 2) l'empoisonnement du Cu^{I} par addition d'un composé

[159] *rh*HDAC8 : histone désacétylase 8 humaine recombinante.

[160] Suzuki, T.; Ota, Y.; Kasuya, Y.; Mutsuga, M.; Kawamura, Y.; Tsumoto, H.; Nakagawa, H.; Finn, M. G.; Miyata, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6817–6820.

complexant et 3) l'absence ou non de la cible dans le milieu. Ces expériences ont en plus prouvé que le degré d'oxydation +I du cuivre était conservé dans le site actif de l'enzyme, y compris en présence d'oxygène, grâce au microenvironnement formé par les résidus de la chaîne protéique permettant la chélation du métal. En définitive, le complexe enzyme-Cu^{I} formé dans le milieu était responsable de la formation sélective des ligands *anti* de manière efficace, bien que ce système catalytique ne soit pas universel et ne permette que la formation exclusive des ligands affins.

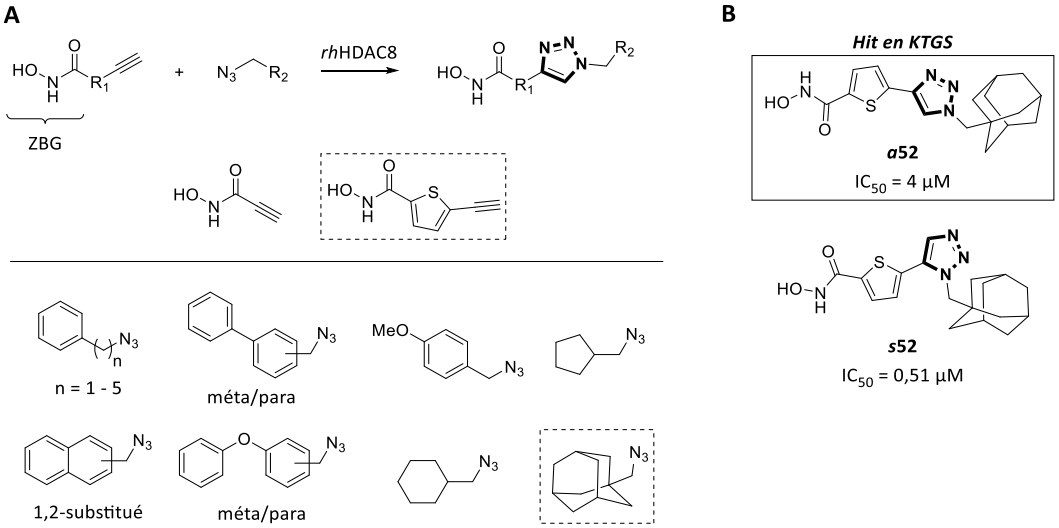


*Schéma 52. (**A**) Criblage par click* in situ *catalysé par la* rh*HDAC8. (**B**) Structures du hit **a52** et de son régioisomère **s52**.*

Bien que ce système soit attrayant, il faut tout de même garder à l'esprit que seul l'isomère *anti*-triazole est formé par le complexe même si le *syn*-triazole correspondant est plus actif. La technique permet donc l'identification rapide des meilleures combinaisons de fragments. Cependant, au risque d'obtenir de faux positifs ou de faux négatifs, une étude de l'activité biologique en fonction du régioisomère des produits obtenus doit être impérativement réalisée de manière complémentaire.

2.1.2.5. Emploi de cibles mutantes

La lenteur des cycles de formation de ligand au sein d'une enzyme résulte de l'affinité supérieure du produit formé par rapport aux réactifs de départ. La saturation du site actif en raison de la faible dissociation du ligand avec la cible est souvent le principal facteur limitant en terme de rendement. Afin de contourner ce problème, Abell *et al.* ont réalisé la mutation de la protéine biotine ligase du *Staphylococcus aureus* (S*a*BPL) en remplaçant le résidu

arginine 122 (R122) par un résidu glycine (G122) dans la séquence protéique.[161] Bien que la protéine mutée R122G ait conservé la même structure secondaire et la même activité que l'enzyme native, l'affinité de l'unique ligand triazole **53** formé par click *in situ* s'est trouvé inférieure à celle du partenaire biotine-alcyne **biot.-alc.** de départ (Schéma 53, **A**). En définitif, la diffusion du ligand et des réactifs a été augmentée au sein de la cible, aboutissant ainsi à une augmentation globale du nombre de cycles réactionnels. L'amélioration résultante du rendement en ligand **53** a permis d'augmenter sa détectabilité analytique et donc à diminuer le risque de faux négatifs (Schéma 53, **B**).

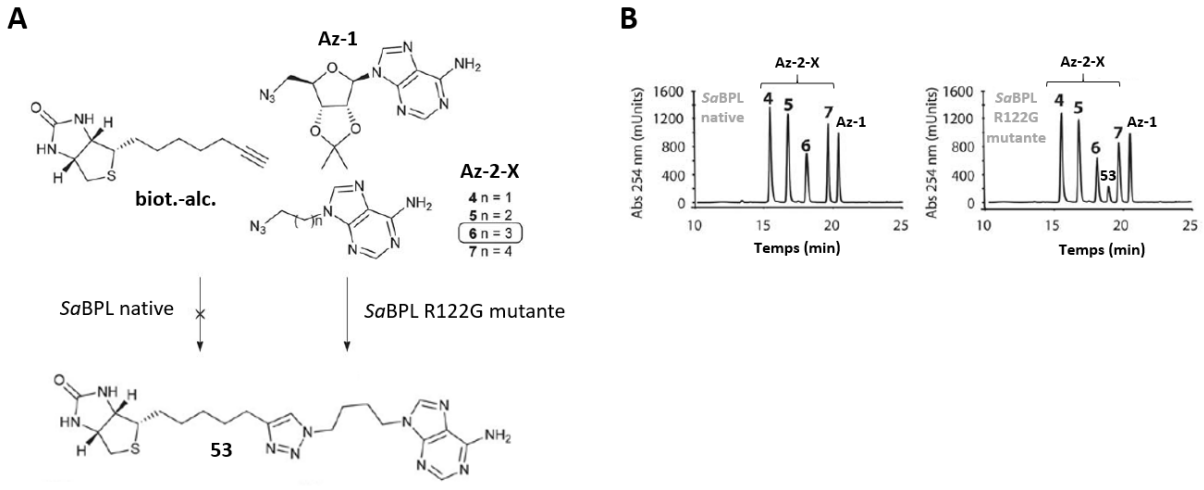


*Schéma 53. (**A**) Click in situ catalysé par la* Sa*BPL mutante. (**B**) Chromatogrammes de suivis des KTGS.*

Comme il a été montré un peu plus tôt dans ce chapitre, la mutation d'enzyme peut également s'avérer utile afin d'éviter les réactions parasites entre la cible et des fragments réactifs, par exemple l'addition de Michael d'un résidu cystéine sur un fragment comportant une fonction acrylamide.[151]

Une autre stratégie d'approche en KTGS consiste à établir un point d'ancrage grâce à un lien covalent entre un des partenaires réactifs et la cible, dans le but d'étudier des interactions faibles avec d'autres fragments réactifs complémentaires (tethering). Généralement, un échange de thiol ou la formation d'un pont disulfure est réalisé entre un fragment fonctionnalisé en conséquence et un résidu de cystéine de la cible.[162] Cette variante

[161] Tieu, W.; Costa, T. P. S. da; Yap, M. Y.; Keeling, K. L.; Wilce, M. C. J.; Wallace, J. C.; Booker, G. W.; Polyak, S. W.; Abell, A. D. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 3533–3537.

[162] Erlanson, D. A.; Lam, J. W.; Wiesmann, C.; Luong, T. N.; Simmons, R. L.; DeLano, W. L.; Choong, I. C.; Burdett, M. T.; Flanagan, W. M.; Lee, D.; Gordon, E. M.; O'Brien, T. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 308–314.

a été appliqué sur l'enzyme CA II en remplaçant le résidu histidine 65 (H65) par un résidu cystéine (C122). Cette CA II mutante H64C a ensuite été fonctionnalisée par un échange de thiol avec le composé **54** (Schéma 54). Pour terminer, l'alcyne terminal ***rac*-55** a été introduit dans le milieu qui a été incubé deux heures à 37 °C. Suite à une digestion enzymatique de la cible suivie par des analyses par spectrométrie de masse et des études structurales par DRX sur les cristaux obtenus, la click *in situ* par *tethering* a été confirmée et a permis d'établir que le l'alcyne de configuration *R*-**55** était le plus actif.

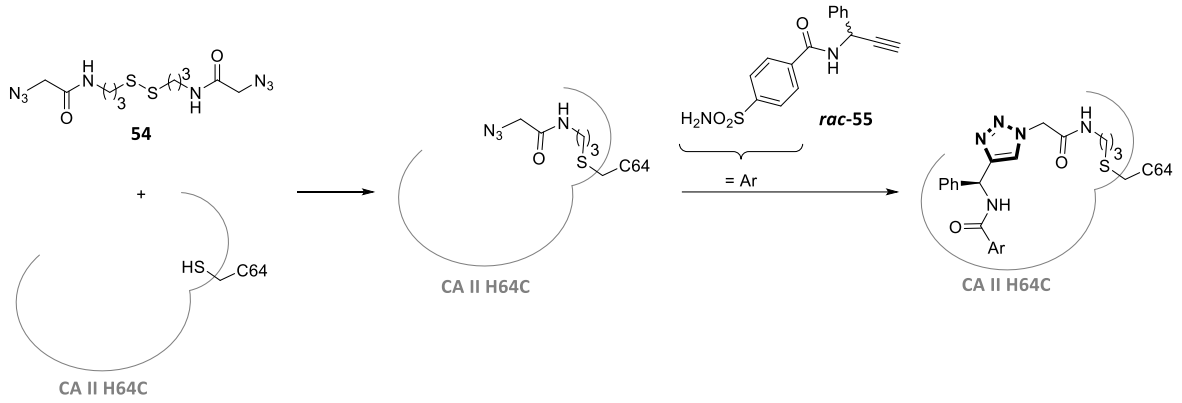


Schéma 54. Click in situ *par tethering de CA II mutante H64C.*

Malgré la puissance évidente de cette technique, elle requiert cependant un véritable savoir-faire et un matériel spécifique afin de produire les enzymes mutantes, ce qui n'est pas à la portée de toutes les unités de recherche. De plus, de solides connaissances structurales de la cible et du mode d'interaction des ligands ciblés sont impératifs, ce qui éliminent d'office les cibles thérapeutiques scientifiquement moins matures.

2.1.2.6. Progrès des techniques analytiques

Les faux négatifs sont souvent corrélés au manque de détectabilité des composés par les systèmes analytiques utilisés. Cependant, les améliorations technologiques permettent de repousser toujours plus loin la sensibilité et la précision des appareils, notamment en LC-MS qui est la technique la plus employée pour l'identification de hits en KTGS.[71]

Par ailleurs, la technique de DLS proposée par le Pr. Rademann a permis le suivi en direct des résultats d'expériences mais également de repousser certaines limites de détection de faibles interactions, notamment grâce à la forte sensibilité de la spectroscopie de fluorescence mesurant l'activité résiduelle de l'enzyme.[56] Effectivement, le couplage de

différents moyens de détection est également en passe de devenir une méthode standard afin d'éviter les faux négatifs/positifs et de gagner du temps d'analyse (par exemple : couplage de détection UV et fluorescence puis contrôle des hits en HPLC-MS).[42] Cependant, la technique de DLS souffre de deux inconvénients principaux, que sont 1) la cible biologique doit posséder une activité catalytique (enzymes, interactions protéines-protéines…), et de surcroit à la fin du temps d'incubation parfois long, afin de pouvoir déclencher chimiquement la sonde et 2) la réaction à employer doit être relativement rapide afin de limiter le temps d'incubation et donc de conserver l'intégrité de la cible et de son activité à la fin de l'expérience.

2.1.2.7. Développement de nouvelles réactions en KTGS

Bien que le nombre de réactions éligibles en KTGS ait significativement augmenté ces dernières années, et notamment depuis 2017 avec six nouvelles ligations décrites dans la littérature, l'importante diversité structurale de l'espace chimique et des cibles thérapeutiques demeure encourageante afin de développer de nouvelles méthodes de formation de molécule biologiquement actives. Les réactions à multiples-composants récemment décrites en KTGS (Mannich-*like* et Ugi) sont d'excellents exemples de la direction vers laquelle se dirigent ces développements et de la volonté des chercheurs à pouvoir repousser toujours plus loin les frontières dans ce domaine.

Les études bibliographiques sont une très grande source d'inspiration pour le développement de nouvelles réactions de ce type. Les exemples de réactifs utilisés en bioconjugaison (BioCn) et en ligations chimiosélectives/bio-orthogonales (LC/B), qui sont des réactions compatibles avec la cible biologique, peuvent être un bon point de départ pour le design et l'optimisation des partenaires chimiques afin d'obtenir des réactions plus lentes et atteindre un domaine où elles sont éligibles en KTGS.[163] Quelques rappels contextuels et définitions de ces trois classes de réactions sont donnés ci-dessous.

- Réactions de bioconjugaison :

Réaction de ligation où au moins une des deux fonctions engagées dans la réaction appartient naturellement à une biomolécule ou au système biologique étudié (addition de

[163] (a) Koniev, O.; Wagner, A. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 5495–5551. (b) Spicer, C. D.; Pashuck, E. T.; Stevens, M. M. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 7702–7743.

Michael de résidus cystéines sur des maléimides, amidation de chaînes latérales de résidus lysines sur des esters activés, etc.).

- Ligations bio-orthogonales :

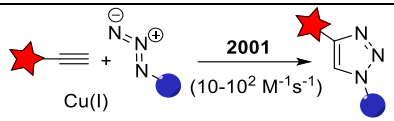
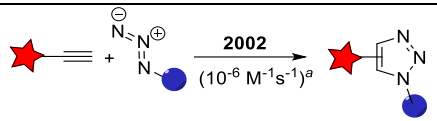
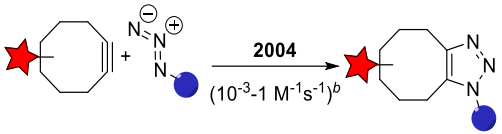
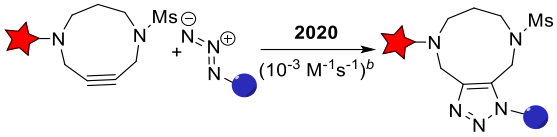
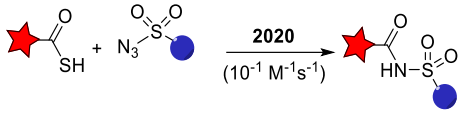
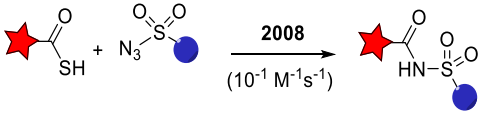
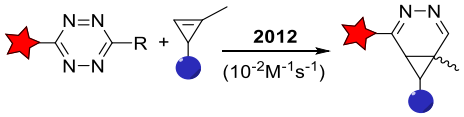
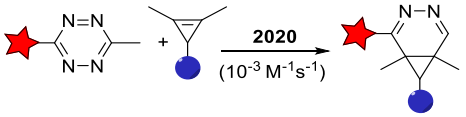
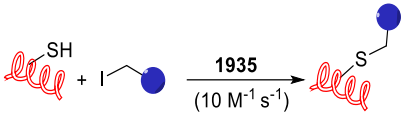
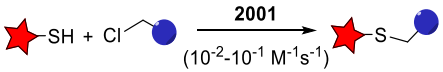
Ces réactions emploient des fonctions absentes de la matrice biologique et sont réalisables en milieux complexes (cellules, bactérie, petit animal…) avec une très bonne chimiosélectivité (cycloaddition puis rétro-cycloaddition de Diels-Alder entre un cyclooctène et une tétrazine). Elles sont généralement caractérisées par des constantes cinétiques réactionnelles élevées (≥ 10 $M^{-1}.s^{-1}$) et une plus faible réactivité avec les fonctions chimiques présentes dans le milieu biologique.

- Ligations chimiosélectives :

Apparentées aux ligations bio-orthogonales, les ligations chimiosélectives sont menées entre deux fonctions chimiques souvent absentes des matrices biologiques, mais sont cependant réalisées le plus généralement *in vitro*. Effectivement, un certain nombre de limitations ne permettent pas leur exploitation en milieux plus complexes, notamment : (1) le caractère réversible de certaines ligations (ligations oximes et hydrazones, les réactions de Diels-Alder et de rétro-Diels-Alder entre certains diènes biocompatibles et des maléimides, ...), (2) une des fonctions engagées peut réagir avec les fonctions de la matrice biologique (condensation de résidu lysine sur un aldéhyde, addition de Michael de biothiols sur des maléimides, ...), (3) la réaction requiert la présence d'un catalyseur ou d'un additif plus ou moins biocompatible (catalyse au Cu(I) pour la CuAAC entre un azoture et un alcyne, ...), (4) la réaction n'est pas réalisable en conditions strictement physiologiques de température et/ou de pH, (5) les constantes cinétiques ne sont pas suffisamment élevées (≤ 10 $M^{-1}.s^{-1}$) afin d'envisager des applications en milieux dilués et/ou biologiques.

Au-delà des besoins de chimiosélectivité et de biocompatibilité des fonctions chimiques engagées et formées, les réactions de KTGS doivent être les plus lentes possible en l'absence de la cible thérapeutique afin d'éviter les faux positifs. Comme il va l'être montré un plus loin, il s'avère qu'une valeur de constante cinétique de 10^{-3} $M^{-1}.s^{-1}$ est très généralement une valeur limite haute de réactivité en KTGS. Par ailleurs, en regardant de manière non exhaustive les études rapportées, il apparaît clairement que chaque type de réaction employé en KTGS possède au moins un analogue en BioCn ou en LB/C (Tableau 5). De ce fait, la

comparaison des valeurs des constantes cinétiques entre les réactions de KTGS ayant donné des résultats positifs et de leurs analogues utilisés en BioCn ou LB/C, lorsqu'elles sont connues en conditions similaires, met en lumière le besoin de diminuer la réactivité des réactifs dans un contexte de KTGS, contrairement aux applications de BioCn et LB/C. Il arrive cependant que les valeurs de constantes cinétiques ne soient pas connues et/ou soient complexes à calculer, notamment pour les réactions à multi-composantes et/ou à multiples intermédiaires. Cependant, étudier avec attention les données et/ou conditions expérimentales des réactions de BioCn et de LB/C peut s'avérer être tout aussi intéressant afin d'envisager des modifications pour une transposition en KTGS. Effectivement, les données permettant d'estimer la conversion dans le temps devient un très bon indicateur si elle est pondérée par les paramètres de réaction (température, solvant et concentration). Ces données étant plus simples à mesurer, elles sont souvent disponibles dans les articles et revues. Ainsi, une réaction spontanée en milieux aqueux qui serait accélérée en présence d'un catalyseur, d'une activation thermique ou par de fortes concentrations/excès de réactifs pourrait donc devenir un potentiel candidat en KTGS.

Réaction	Application en BioCn ou en LB/C	Application en KTGS	Modulation	Références
Cycloaddition 1,3-dipolaire			Pas de catalyseur au cuivre.	LB/C : [80(c)] KTGS : [91,92,93(a)]
Cycloaddition 1,3-dipolaire			Augmentation de la taille du cycle et incorporation d'hétéroatomes.	LB/C : [164,165,166] KTGS : [167,122]
Sulfo-click			Pas de modification.	LB/C : [168] KTGS : [128]
Cycloaddition de Diels-Alder			Augmentation de l'encombrement stérique.	LB/C : [169] KTGS : [137]
Alkylation			Emploi d'un moins bon nucléofuge.	BioCn : [170] KTGS : [146]

[164] (a) Ramil, C. P.; Li, Q. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11007–11022. (b) Li, W.; Zou, J.; Zhu, S.; Mao, X.; Tian, H.; Wang, X. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 1–6. (c) Terzic, V.; Pousse, G.; Méallet-Renault, R.; Grellier, P.; Dubois, J. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 8542–8551.

[165] Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.

[166] Zhang, C.; Dai, P.; Vinogradov, A. A.; Gates, Z. P.; Pentelute, B. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 6459–6463.

[167] (a) Igawa, K.; Aoyama, S.; Kawasaki, Y.; Kashiwagi, T.; Seto, Y.; Ni, R.; Mitsuda, N.; Tomooka, K. *Synlett* **2017**, *28*, 2110–2114. (b) Kawasaki, Y.; Yamanaka, Y.; Seto, Y.; Igawa, K.; Tomooka, K. *Chem. Lett.* **2019**, *48*, 495–497.

[168] Clavé, G.; Dursun, E.; Vasseur, J.-J.; Smietana, M. *Org. Lett.* **2020**, *22*, 1914–1918.

[169] Kamber, D. N.; Liang, Y.; Blizzard, R. J.; Liu, F.; Mehl, R. A.; Houk, K. N.; Prescher, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 8388–8391.

[170] (a) Polgar, J.; Halasz, P. *J. Biol. Chem.* **1935**, *112*, 361–371. (b) Polgar, J.; Halasz, P. *Eur. J. Biochem.* **1973**, *39*, 421–429.

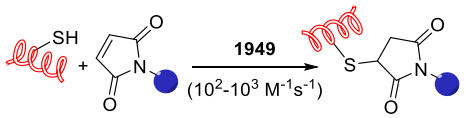
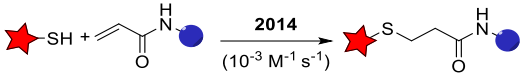
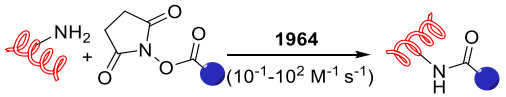
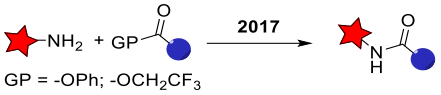
Addition de Michael	 	Diminution de la densité électronique de l'accepteur de Michael.	BioCn : [171,172] KTGS : [150,151]
Amidation	 	Emploi d'un moins bon nucléofuge	BioCn : [173,174] KTGS : [131]

Tableau 5. Comparaison non-exhaustive des constantes cinétiques de réactions employées en BioCn ou en LB/C avec leurs analogues de KTGS. Llles étoiles rouges et les sphères bleues représentent des fonctions synthétiques et les spirales rouges des biomolécules natives. Mesures réalisées dans : [a] l'acide formique aqueux à 40 °C et [b] l'acétonitrile deutérée.

[171] Nair, D. P.; Podgórski, M.; Chatani, S.; Gong, T.; Xi, W.; Fenoli, C. R.; Bowman, C. N. *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 724–744.

[172] Lee, Y.-J.; Wu, B.; Raymond, J. E.; Zeng, Y.; Fang, X.; Wooley, K. L.; Liu, W. R. A *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1664–1670.

[173] Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1839–1842.

[174] Dovgan, I.; Ursuegui, S.; Erb, S.; Michel, C.; Kolodych, S.; Cianférani, S.; Wagner, A. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 1452–1457.

2.2. Objectifs des travaux de thèse

Malgré les nombreuses avancées et progrès réalisés en KTGS ces dernières années, le besoin de développer de nouveaux outils et de nouvelles stratégies dans ce domaine demeure constant afin de répondre aux limitations persistantes de cette technique au fort potentiel, et de pouvoir ainsi généraliser l'emploi de la KTGS dans les secteurs du public et du privé.

Tout en s'appuyant sur le principe classique de la KTGS (Schéma 55), le sujet de thèse présenté ici est composé de trois principaux objectifs, s'alignant avec cohérence aux besoins d'innovation de cette science, principalement en terme de nouvelles stratégies et de perspectives pour sa généralisation en recherche.

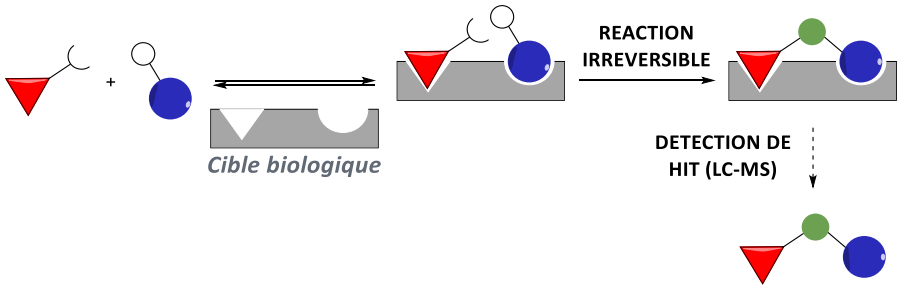


Schéma 55. Approche classique en KTGS.

2.2.1. Stratégie de « Click & Fish » : développement de nouvelles réactions séquentielles

2.2.1.1. De la ligation chimiosélective vers la KTGS : étude de réactions de Diels-Alder séquentielles

L'objectif de ce projet est de développer de nouvelles séquences réactionnelles permettant dans un premier temps la formation d'un ligand bidentate au sein de la cible biologique, puis de procéder à son marquage à l'aide d'une sonde pro-fluorescente afin de faciliter la détection du composé et ce notamment par spectroscopie de fluorescence (Schéma 56). Pour cela, une séquence réactionnelle sélective et réciproquement orthogonale a été imaginée en employant par alternance des cycloadditions de Diels-Alder à demandes électroniques normale puis inverse (Schéma 56).

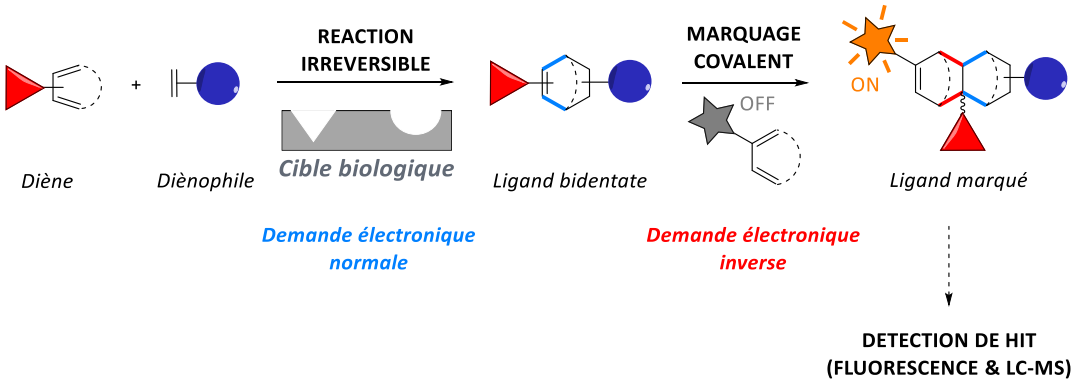


Schéma 56. Séquence réactionnelle de cycloadditions de Diels-Alder à demande électronique normale puis inverse.

La réaction de Diels-Alder en ligation chimiosélective a été particulièrement étudiée dans notre groupe ces dernières années, notamment la réaction de Kondrat'eva entre les maléimides et les oxazole.[175,176,177] Divers projets étaient en cours ou bien envisagés lors du début de ces travaux de thèse. En effet, des études cinétiques de cycloadditions entre le motif maléimide et des dienes riches en électrons (demande électronique normale) devaient être réalisées en vue d'applications en ligation chimiosélective et potentiellement en KTGS. Ainsi, afin de fournir une étude complète, cette réaction biocompatible sera étudiée dans le chapitre II du point de vue des cinétiques réactionnelles des partenaires, de leur synthèse et accessibilité, de leurs stabilités et des propriétés (stéréochimie et stabilité physiologique) des cycloadduits formés. Concernant la seconde réaction, qui permettrait le marquage du ligand formé par cycloaddition à demande électronique inverse, seules une étude bibliographique et une discussion concernant de récents travaux de notre groupe permettront d'analyser cette partie du projet.

2.2.1.2. Formation et réactivité de nouvelles fonctions

Cette partie vise à exemplifier cette stratégie de « Click & Fish » sur d'autres réactions que la réaction de Diels-Alder. La recherche de nouvelles réactions éligibles en KTGS reste et demeure un défi d'envergure dans ce domaine. Comme il a pu être démontré au travers de l'étude bibliographique exhaustive de cette introduction, les liens covalents formés *in situ* des cibles peuvent jouer un rôle déterminant dans l'activité des ligands, comme c'est le cas pour

[175] Jouanno, L.-A.; Chevalier, A.; Sekkat, N.; Perzo, N.; Castel, H.; Romieu, A.; Lange, N.; Sabot, C.; Renard, P.-Y. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 10353–10366.
[176] Renault, K.; Jouanno, L.-A.; Lizzul-Jurse, A.; Renard, P.-Y.; Sabot, C. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 18522–18531.
[177] Flon, V.; Bénard, M.; Schapman, D.; Galas, L.; Renard, P.-Y.; Sabot, C. *Biomolecules* **2020**, *10*, 619–632.

le triazole [93(a),100] ou encore la fonction méthylène-diamine.[139] Cependant, les fonctions formées n'ont jamais été étudiées autrement que dans une démarche de compréhension mécanistique ou de relations structure-activité avec les cibles.

L'exploitation de la réactivité des fonctions chimiques formées en KTGS n'a en effet jamais été étudiée ni même envisagée, notamment du fait de leur grande stabilité. Cependant, l'obtention d'un lien chimique capable de réagir ultérieurement et spécifiquement avec une autre fonction pour former, *in fine*, un nouveau motif stable présenterait un intérêt certain. Effectivement, parvenir à faire réagir sélectivement le lien ou la fonction formé par KTGS avec par exemple une sonde pro-fluorescente permettrait ainsi la détection spécifique, rapide et directe de ces composés (Schéma 57).

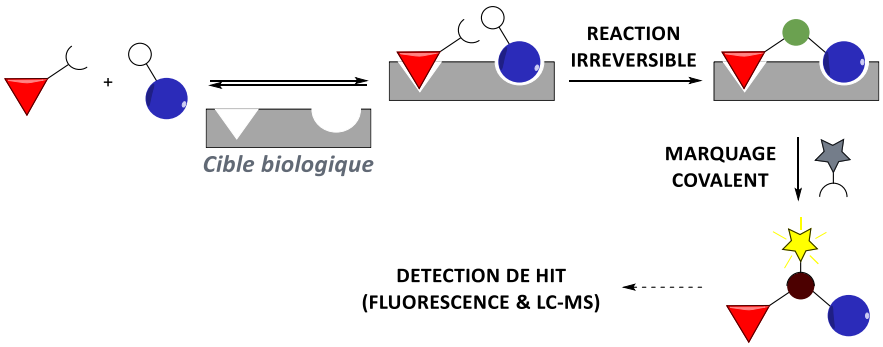


Schéma 57. Stratégie de réactions séquentielles et sélectives dite de « Click & Fish ».

Cette stratégie de réactions séquentielles sera développée dans le chapitre III. Il s'agira d'étudier une séquence réactionnelle permettant d'une part de lier les deux fragments entre eux, et d'autre part d'utiliser le lien formé comme fonction chimique capable de réagir spontanément avec une fonction masquant la fluorescence de la sonde pro-fluorescente en vue d'introduire un fluorophore hautement détectable. Ce projet vise donc à terme d'étoffer le nombre de réaction applicable en KTGS tout en proposant une nouvelle méthode de détection sélective des produits formés.

2.2.2. Développement de sondes chimiques pour l'amplification du signal en spectrométrie de masse

Également au cours du chapitre III, une alternative à l'approche susmentionnée sera également envisagée, et dans laquelle deux couples réactionnels seront utilisés : l'un pour réaliser la réaction de ligation entre les fragments pour former le ligand correspondant,

l'autre, discret pour la KTGS, afin d'introduire un reporter chimique sur le ligand afin d'augmenter sa détectabilité (Schéma 58). L'avantage supposé de cette approche est double. D'une part, elle permettrait d'éviter les faux négatifs en raison d'un manque de détectabilité des produits formés, ce qui demeure un risque conséquent en KTGS. De plus, il serait aussi possible de réduire les temps d'incubation en supprimant la nécessité de former le maximum de ligand possible afin d'améliorer sa détectabilité. Dans un premier temps, le pré-marquage d'un des réactifs par introduction de fonctions chimiques discrètes et permettant une fonctionnalisation tardive des produits de click formés sera évalué. Il s'agira ensuite d'évaluer les propriétés et l'efficacité de fonctions chimiques spécifiques permettant une amplification du signal en spectrométrie de masse (MS), qui est de loin la technique de détection la plus employée en KTGS et facilement accessible dans les laboratoires. A terme, une preuve de concept en conditions de KTGS devra être effectuée, permettant ainsi de valider ou non cette stratégie d'approche innovante.

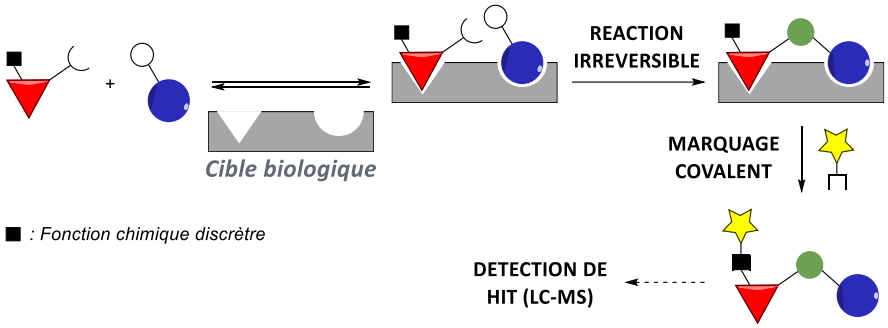


Schéma 58. Méthode de pré-marquage par une fonction discrète pour l'amplification du signal MS.

2.2.3. Étude d'une nouvelle réaction éligible en KTGS

Au cours du chapitre IV, qui clôturera ces travaux de thèse, une étude d'éligibilité de la réaction de thiol-yne en KTGS sera menée en vue d'apporter une nouvelle contribution à la liste toujours plus riche de réactions éligibles pour cette stratégie de FBDD (Schéma 59).

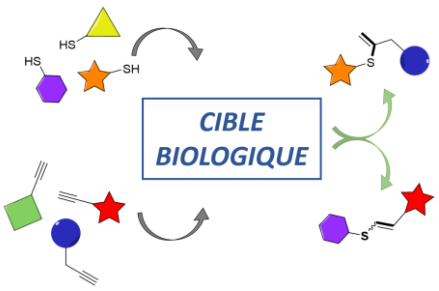


Schéma 59. Principe général de la réaction de thiol-yne en KTGS.

CHAPITRE II

ETUDE DE RÉACTIONS DE DIELS-ALDER A PARTIR DE MALÉIMIDES EN LIGATION CHIMIOSÉLECTIVE ET EN VUE D'APPLICATIONS EN KTGS

La ligation chimiosélective de Diels-Alder entre des maléimides et des diènes biocompatibles a été employée dans de nombreux domaines tels que la science des matériaux et des polymères, les biotechnologies ou encore la chimie bioorganique. Notre laboratoire a été particulièrement impliqué dans ce domaine ces dernières années avec le développement de la réaction de Kondrat'eva entre les 5-alkoxyoxazoles et le maléimide.[175,176,177] Cependant, malgré de nombreuses études décrites dans la bibliographie, les données disponibles ne permettent pas de rationaliser l'emploi des différents diènes selon l'application souhaitée (cinétique réactionnelle, stabilité des cycloadduits, etc…) et notamment pour leur potentiels utilisation en KTGS. Les travaux présentés au cours de ce chapitre auront un double objectif :

1) <u>En ligation chimiosélective</u> : ils permettront de combler les manques d'informations mentionnés ci-dessus et qui sont particulièrement utiles dans le choix de réactions facilitant la construction (bio)moléculaire selon le contexte d'étude.

<u>2) En KTGS</u> : les résultats obtenus permettront *in fine* de déterminer le ou les couples diènes/maléimide éligibles pour la KTGS, notamment sur leurs critères de cinétique et de stabilité des produits formés. D'autre part, des études préliminaires réalisées au laboratoire ont montré que des cycloadduits obtenus entre le furane et le maléimide étaient capables de réagir spécifiquement avec les tétrazines. Ces résultats pourront alors être complétés avec les différents diènes, en vue de les exploiter à terme dans le cadre du développement de réactions séquentielles.

Ainsi, dans une première partie, quelques généralités et rappels théoriques permettront d'introduire la réaction de cycloaddition [4+2] de Diels-Alder et des maléimides, avec notamment une présentation de leur rôle en tant que réactifs de bioconjugaison et de ligation chimiosélective. A cette occasion, une analyse de l'état de l'art concernant l'emploi de ces composés comme dièNophiles en ligation chimiosélective de Diels-Alder sera réalisée.

Dans une seconde partie, une étude de viabilité portant sur la rationalisation de l'emploi des diènes biocompatible selon les applications visées et quant à l'emploi de cette réaction en KTGS sera effectuée. Pour cela, différentes propriétés telles que les cinétiques réactionnelles ou les stabilités des réactifs et produits correspondants seront étudiées pour différentes combinaisons de maléimides et de diènes biocompatibles. De plus, quelques études de compatibilité et de réactivité chimique seront menées afin d'évaluer quelques

possibilités de combinaison de réactifs et de nouvelles stratégies de réactions orthogonales afin de valoriser les différents résultats obtenus.

I – La réaction de Diels-Alder

1.1. Rappels et généralités

Cette réaction de cycloaddition a été mise en lumière en 1928 par les deux chimistes allemands Otto Diels et Kurt Alder.[178] La découverte de cette réaction leur vaudra d'être récompensés par le prix Nobel de chimie en 1950. En effet, la cycloaddition de Diels-Alder (CDA) est devenue par la suite un véritable pilier de la synthèse organique et continue, presque un siècle plus tard, à faire l'objet de nombreuses recherches et permet un grand nombre d'applications dans de nombreux domaines scientifiques.[179]

La CDA fait partie de la famille des cycloadditions du type [4+2]. Cela veut dire que deux partenaires, un diène conjugué et un diènophile, contribuent dans ce processus de manières inter- ou intramoléculaire en apportant respectivement quatre et deux électrons π afin de former deux liaisons σ (Schéma 60).

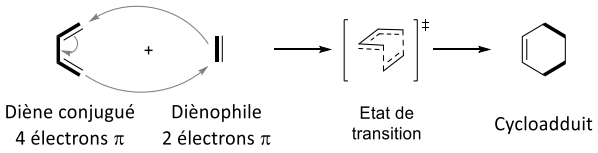


Schéma 60. Principe et mécanisme général de la cycloaddition de Diels-Alder.

Généralement, un mécanisme cyclique concerté (synchrone) est admis pour cette cycloaddition et permet la rupture et la formation simultanée des liaisons π et σ, conduisant ainsi à des produits du type cyclohexènes, aussi appelés « cycloadduits ».[180] Grâce à ce processus, des composés structuralement complexes peuvent ainsi être synthétisés en une seule étape, à partir de réactifs relativement simples et/ou souvent commerciaux.

[178] Diels, O.; Alder, K. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1928**, *460*, 98–122.

[179] Résultats de la recherche dans SciFinder^n des mots clés « Diels-Alder reaction » sur la période de 1928 à 2020 : 233.10^3 réponses tous documents confondus, dont 225.10^3 réponses correspondants aux journaux internationaux de publication. Recherche effectuée le 18/04/2020.

[180] Woodward, R. B.; Katz, T. J. *Tetrahedron* **1959**, *5*, 70–89.

1.2. Le contrôle orbitalaire et la stéréochimie de la CDA

La CDA est régie par des contrôles orbitalaires, ce qui veut dire qu'aucune espèce chargée intervient lors de la réaction, tant au niveau des réactifs que de l'état de transition et que les produits formés sont électroniquement neutres.

Bien qu'ancien, le modèle des orbitales frontières permet néanmoins une bonne compréhension des interactions entres les réactifs et sera donc employé par la suite.

1.2.1. La demande électronique

La CDA peut procéder selon une demande électronique normale (DEN) ou une demande électronique inverse (DEI). La DEN intervient lorsque le diène et le diènophile sont respectivement enrichi et appauvri en électrons. Ceci revient à dire que les orbitales moléculaires les plus hautes occupées en énergie (HO) du diène vont interagir avec les orbitales moléculaires les plus basses vacantes (BV) du diènophile (Figure 28, **A**). Concernant la DEI, les niveaux d'énergie du diènophile et du diène se trouvent ici inversés par rapport au premier cas de figure car le diène est ici appauvri en électrons, alors que le diènophile pour sa part est électroniquement enrichi (Figure 28, **B**). Par conséquent, les HO du diènophile vont interagir avec les BV du diène afin de réaliser la réaction.

Lorsque les partenaires sont substitués, les écarts de niveaux énergétiques entre les HO et BV de chacun des réactifs vont varier selon l'effet électronique induit par la nature du substituant. Considérons par exemple une CDA à DEN (Figure 28, **C**). Si le partenaire diène est fonctionnalisé par un groupement donneur d'électrons (GED), le niveau énergétique de sa HO va augmenter par rapport à celui du diène non modifié. Quant à lui, si le diènophile est fonctionnalisé par un groupement électroattracteur (GEA), l'énergie de son orbitale BV va alors diminuer. Ainsi, l'écart énergétique de la réaction de référence (ΔE_1) et celui de la réaction avec les partenaires fonctionnalisés (ΔE_2) vont devenir significativement différents avec $\Delta E_2 < \Delta E_1$. L'énergie d'activation nécessaire afin d'initier la réaction sera donc moindre dans le deuxième cas, ce qui va faciliter la cycloaddition. Dans le cas de la CDA par DEI, il suffit d'inverser les substituants GED et GEA du diène et du diènophile, ce qui provoque respectivement la diminution énergétique de la BV du diène et l'augmentation de la HO du

diènophile. Les écarts énergétiques vont varier de manière analogue au cas de la DEN présenté précédemment.

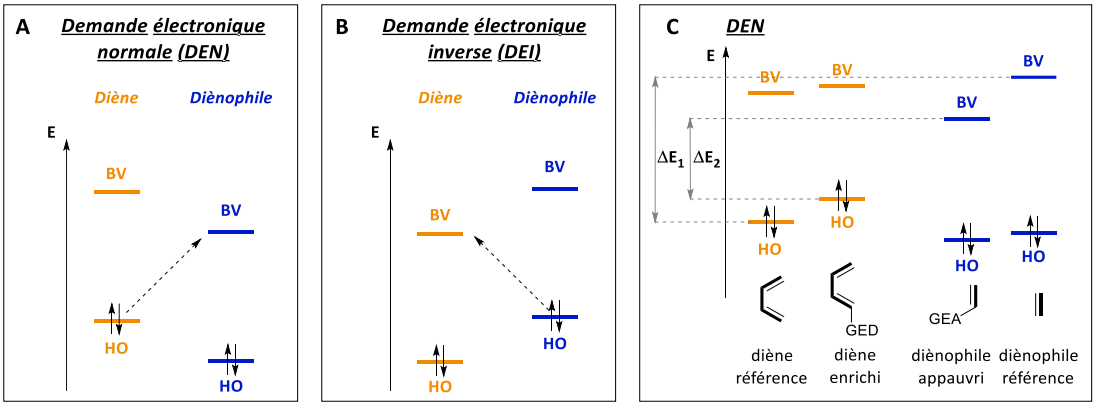


Figure 28. Comparaison des interactions orbitalaires en DEN et en DEI.

1.2.2. Régiosélectivité de la CDA

L'approche et les interactions orbitalaires entre le diène et le diènophile conduisent à une disposition spatiale telle que les deux réactifs se trouvent inscris dans deux plans parallèles distincts (Figure 29).

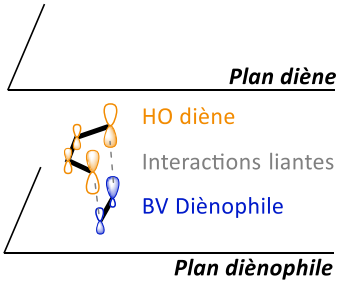


Figure 29. Disposition spatiale des réactifs entre deux plans parallèles.

Dans les cas où les réactifs ne sont pas symétriques, la CDA peut être régiosélective et ainsi conduire à la formation de plusieurs régioisomères du type « ortho », « para » et/ou « méta » (Figure 30, **A**). La régiosélectivité de la réaction va être définie selon les principales interactions des orbitales moléculaires impliquées dans le processus. Ces dernières sont elles-mêmes régies par la valeur des coefficients orbitalaires et de leurs similarités entre les réactifs (Figure 30, **B**). Les régioisomères de type « méta » ne sont pas représentés dans la Figure 30 **B** car ils constituent souvent une fraction minoritaire des produits obtenus et/ou correspondent parfois à des cas particuliers dépendants des structures des réactifs employés.

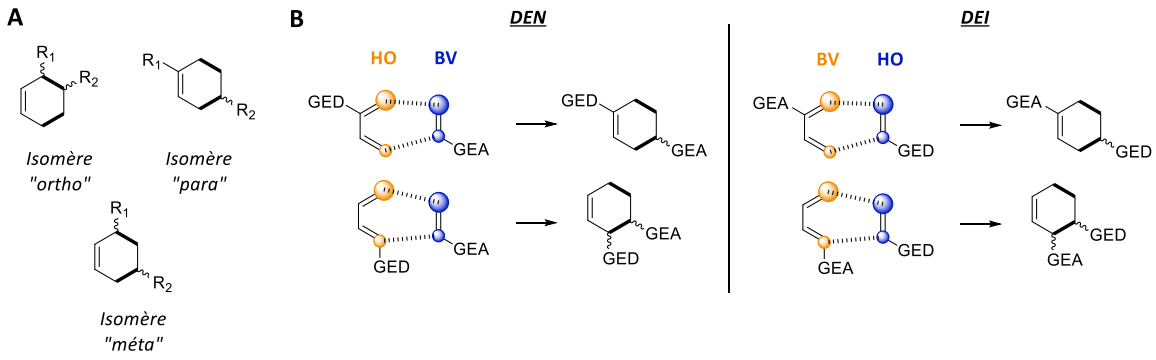


*Figure 30. (**A**) Les différents de régioisomères possibles. (**B**) Interactions principales en DEN et DEI selon les coefficients orbitalaires.*

Dans le cas d'hétérodiènophiles[181] (nitroso par exemple) ou de partenaires appauvris par des groupements GEA,[182] le mécanisme de cycloaddition peut devenir asynchrone lors des ruptures et des formations des différentes liaisons. Le système ayant ainsi le temps d'adopter des agencements spatiaux plus favorables grâce aux délocalisations électroniques, la stéréochimie des produits finaux peuvent donc être fortement influencées par ce phénomène.

1.2.3. Stéréosélectivité de la CDA

L'état de transition conservant la géométrie d'approche des réactifs suivant leurs plans parallèles, la CDA est donc stéréospécifique car la stéréochimie des réactifs est transmise aux structures des cycloadduits formés (Schéma 61).

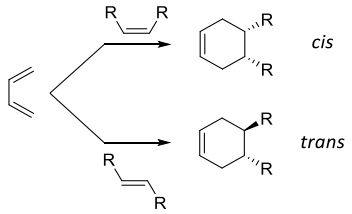


Schéma 61. Stéréospécificité de la CDA.

[181] Brulíková, L.; Harrison, A.; Miller, M. J.; Hlaváč, J. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 1949–1980.

[182] (a) Domingo, L. R.; Sáez, J. A. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3576–3583. (b) Black, K.; Liu, P.; Xu, L.; Doubleday, C.; Houk, K. N. *PNAS* **2012**, *109*, 12860–12865. (c) Pham, H. V.; Martin, D. B. C.; Vanderwal, C. D.; Houk, K. N. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 1650–1655.

Au-delà des possibles régioisomères sus-mentionnés, la formation de deux stéréoisomères peut également être observée.[183] Il s'agit des composés de types *endo* et *exo* qui sont obtenus selon le mode d'approche respectif des réactifs (Schéma 62).

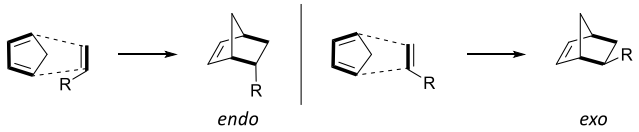


Schéma 62. Formation de composés endo *et* exo *lors d'une CDA.*

Cette stéréosélectivité résulte d'un second contrôle orbitalaire important qui intervient dans la disposition spatiale des réactifs et donc dans la géométrie de l'état de transition. En effet, des interactions orbitalaires secondaires non-liantes (IOSNL) peuvent influencer l'orientation des réactifs. Les IOSNL permettent la stabilisation, ou non, des états de transitions correspondants et dépendent de la nature du substituant portés par le dièNophile. Les produits *endo* sont donc souvent favorisés, mais si aucune IOSNL ne peut être formée, l'encombrement stérique devient alors un facteur prépondérant et conduit alors majoritairement à la formation du produit *exo* (Figure 31).

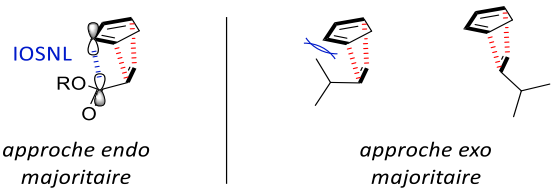


Figure 31. Effet des IOSNL ou de l'encombrement stérique sur la stéréosélectivité de la CDA.

1.2.4. Paramètres influents la sélectivité et la cinétique de CDA

En 1980, les Pr. Rideout et Breslow ont observé des facteurs multiplicateurs d'accélération cinétique d'environ 700 lorsque la CDA était effectuée en milieux aqueux.[184] Ils ont également pu observer un effet additif important vis-à-vis de la cinétique réactionnelle lorsque de la β-cyclodextrine était ajoutée dans le milieu. En conclusion, les auteurs ont indiqué que le renforcement des interactions hydrophobes entre les réactifs, favorisées par la promiscuité de ces derniers au sein du microenvironnement de la β-cyclodextrine, permettait

[183] (a) Woodward, R. B.; Baer, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, *66*, 645–649. (b) Woodward, R. B.; Baer, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 1161-1166

[184] Rideout, D. C.; Breslow, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7816–7817.

d'obtenir de très fortes accélérations réactionnelles. Ces études ont également permis d'établir que ce phénomène concernait aussi bien les CDA inter- et intramoléculaires. Effectivement, en plus des interactions hydrophobes des réactifs favorisant leur approche, la réduction du volume moléculaire lors de la réaction permet de réduire la surface de contact avec le solvant aqueux et donc de minimiser les forces de répulsions, ce qui est également une force motrice pour la CDA.[185]

Effectivement, les interactions par liaisons hydrogènes entre l'eau et les groupements fonctionnels des réactifs ont été étudiées.[186] Ceci a permis d'établir que les liaisons hydrogènes entre le solvant et le diènophile permettaient à la fois de stabiliser la structure du complexe réactif, mais également d'augmenter la réactivité du diènophile en abaissant l'énergie de son orbitale BV. Plus tard, en 2007, une étude a établi que l'interface eau-réactifs hydrophobes pouvait être comparée à un catalyseur.[187] En effet, les molécules d'eau situées à cet interface peuvent « mettre à disposition » leurs atomes d'hydrogènes afin d'établir les interactions précédemment décrites avec les réactifs, et donc d'augmenter la réactivité de ces derniers (Figure 32, **A**). Au contraire, si les réactifs sont hydrosolubles, aucune surface d'interactions entre les atomes d'hydrogènes et les réactifs ne peut se former. En effet, les molécules d'eau instaurent exclusivement des liaisons hydrogènes avec leurs voisines sans permettre une activation forte des réactifs (Figure 32, **B**).

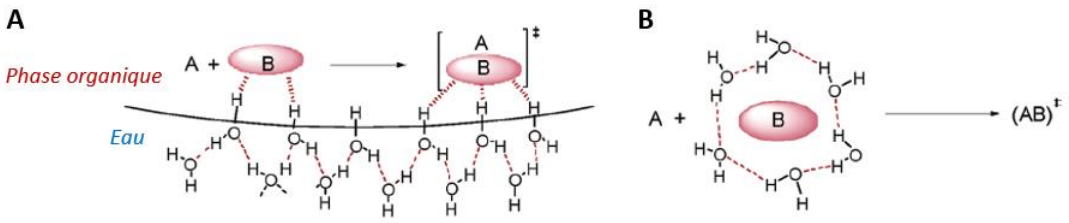


*Figure 32. (**A**) Modèle de catalyse à l'interface par établissement de liaisons hydrogènes. (**B**) Modèle classique de réaction en milieu homogène.*

Concernant le phénomène de contraction volumique, une étude a mis en lumière qu'en présence d'eau, l'état initial du système est déstabilisé ce qui facilite la réaction de CDA (Figure 33).[188] Cet effet est d'autant plus accentué lorsque le caractère hydrophobe du diène

[185] Blokzijl, W.; Blandamer, M. J.; Engberts, J. B. F. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4241–4246.
[186] Otto, S.; Blokzijl, W.; Engberts, J. B. F. N. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5372–5376.
[187] Jung, Y.; Marcus, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5492–5502.
[188] Meijer, A.; Otto, S.; Engberts, J. B. F. N. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8989–8994.

est important dans l'environnement proche près du centre réactif, c'est-à-dire des fonctions réactives. Ainsi, l'ensemble des interactions hydrophobes entre les deux réactifs vont être renforcées et faciliter le rapprochement de ces derniers selon une géométrie permettant la réduction de la surface sphérique d'interaction avec les molécules d'eau. Cette dernière est considérablement réduite dès lors que le cycloadduit se forme, ce qui favorise également la réaction et augmente donc sa vitesse.

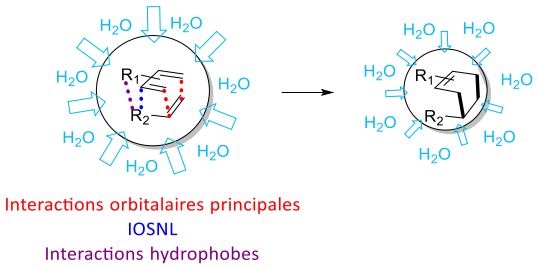


Figure 33. Effets des interactions orbitalaires et hydrophobes sur la contraction volumique favorable pour la CDA.

En conclusion, les accélérations cinétiques observées pour la CDA en milieux aqueux sont le résultat de différents facteurs, plus ou moins complexes et souvent interconnectés entre hydrophobicité et activation par les liaisons hydrogènes, dépendant parfois des structures des substrats engagés dans la réaction.[189]

La stéréosélectivité de la CDA est également très dépendante de la nature du solvant.[190] En milieux aqueux, l'approche des réactifs s'effectue selon la voie *endo* de manière prépondérante.[191] En effet, l'augmentation des transferts de charges au sein des réactifs grâce aux liaisons hydrogènes établies avec l'eau permet d'augmenter les IOSNL favorables à un système *endo*.[192] De plus, les interactions hydrophobes mentionnées juste avant vont favoriser ce type de géométrie initiale plus compacte et permettant l'obtention de volumes d'activation et de réaction plus faibles.[193] Les ratios d'isomères *endo*/*exo* sont très sensibles au milieu et aux conditions expérimentales employées. En effet, l'absence d'eau, la réalisation de CDA sans solvant, à de fortes concentrations en réactifs, ou encore l'utilisation de systèmes

[189] (a) Otto, S.; Engberts, J. B. F. N. *Pure App. Chem.* **2000**, *72*, 1365–1372. (b) Otto, S.; Engberts, J. B. F. N. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2809–2820.

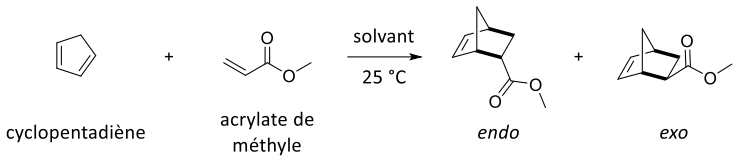
[190] (a) Grieco, P. A.; Garner, P.; He, Z. *Tet. Lett.* **1983**, *24*, 1897–1900. (b) Grieco, P. A.; Yoshida, K.; Garner, P. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3137–3139.

[191] Breslow, R.; Maitra, U.; Rideout, D. *Tet. Lett.* **1983**, *24*, 1901–1904.

[192] Breslow, R.; Maitra, U. *Tet. Lett.* **1984**, *25*, 1239–1240.

[193] Asano, T.; Le Noble, W. J. *Chem. Rev.* **1978**, *78*, 407–489.

en émulsions peuvent faire chuter drastiquement la proportion d'isomères *endo* (Schéma 63).[194] La présence de sels kosmotropes ou chaotropes (inorganiques de type LiCl ou organiques de type chlorure de guanidinium par exemples) font également varier les propriétés d'hydrophobicité du milieu, impactant directement la stéréochimie de la CDA.[192]



Solvant	Concentration réactifs (M)	Ratios *endo*/*exo*
éthanol	0,15	5,2
H_2O	0,15	9,3
cyclopentadiène	excès diène	2,9
H_2O	0,30	5,9
H_2O + surfactant	0,30	6,2
microémulsion	0,15	4,7

Schéma 63. Influence du solvant sur la sélectivité endo/exo *de la CDA.*

L'emploi d'acides de Lewis s'est également avéré efficace afin accélérer la CDA et d'obtenir de meilleures régiosélectivités.[195] En effet, dans le cadre d'une réaction à DEN, les interactions d'un acide de Lewis avec le diènophile induisent une diminution énergétique de la BV de ce dernier, tout en provoquant une augmentation de la dissymétrie des coefficients orbitalaires (Figure 34, **A**).[196] Ces paramètres permettent respectivement de diminuer l'énergie d'activation de la CDA et d'obtenir un meilleur contrôle de la régiosélectivité des produits formés.

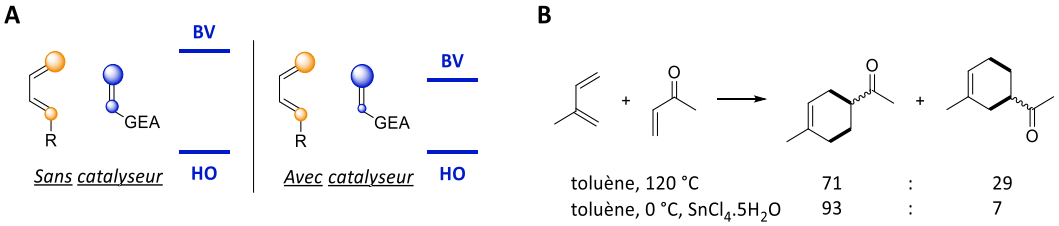


*Figure 34. (**A**) Effets orbitalaires de l'acide de Lewis sur le diènophile. (**B**) Exemple d'application d'un acide de Lewis.*

Grâce à l'utilisation d'un acide de Lewis et à la diminution de l'énergie d'activation, il est possible de s'affranchir de conditions dures, comme des températures élevées, ce qui peut

[194] Breslow, R.; Maitra, U.; Rideout, D. *Tet. Lett.* **1983**, *24*, 1901–1904.
[195] Domingo, L. R.; Ríos-Gutiérrez, M.; Pérez, P. *Molecules* **2020**, *25*, 2535–2561.
[196] Claiden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. *Organic Chemistry*. De Boeck, Oxford University Press, 2001. Chap. 35, p. 921.

permettre une bien plus grande tolérance fonctionnelle et une encore meilleure régiosélectivité (Figure 34, **B**).

II – Emploi des maléimides et tétrazines en bioconjugaison et en ligation chimiosélective

2.1. Réactivité des maléimides

2.1.1. Généralités

Les maléimides sont des composés chimiques à la fois réactifs mais également très stables vis-à-vis de l'air, de l'humidité, de la lumière et thermiquement. La combinaison de ces deux propriétés offre de véritables atouts et une simplicité d'emploi et de stockage au long terme, ce qui a permis la commercialisation de divers types de sondes fonctionnalisées par un motif maléimide pour la ligation (Figure 35). Aujourd'hui, les maléimides sont devenus des réactifs privilégiés pour le design de systèmes (bio)moléculaires et ont trouvé de nombreuses applications en biotechnologies, en chimie bioorganique, ou encore en science des matériaux et des polymères.[197]

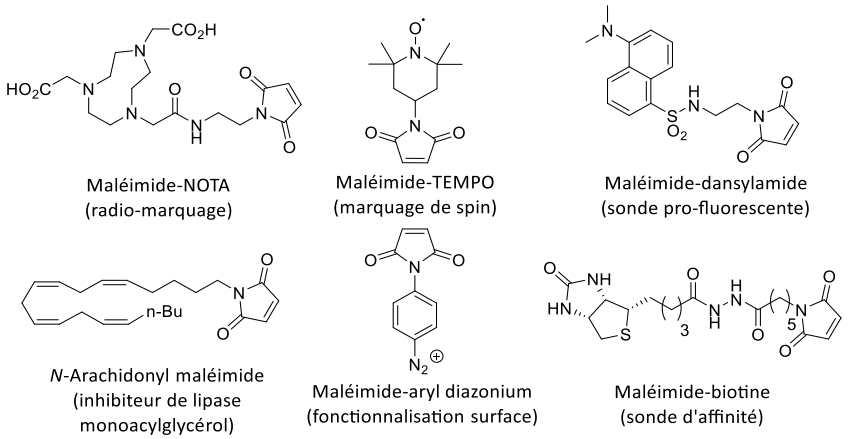


Figure 35. Exemples de composés commerciaux et fonctionnalisés par un maléimide.

[197] (a) Witus, L. S.; Francis, M. B. *Acc. Chem. Res*. **2011**, *44*, 774–783. (b) Akkapeddi, P.; Azizi, S. A.; Freedy, A. M.; Cal, P.; Gois, P. M. P.; Bernardes, G. J. L. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 2954–2963. (c) Hermanson, G. T. *Bioconjugate Technique.* Elsevier, Waltham, MA, 3rd edn, 2013.

La réactivité unique des maléimides s'explique par un écart énergétique relativement faible entre ses orbitales frontières π et π^* (Figure 36).[177,198] Effectivement, la présence de groupements électroattracteurs de chaque côté de la double liaison et la contrainte de cycle permettant un recouvrement orbitalaire permanant expliquent ce faible écart énergétique. Néanmoins, la bonne stabilité des maléimides en conditions physiologiques permet de réaliser de nombreuses applications en bioconjugaison et en ligation chimiosélective *via* l'utilisation de systèmes biomoléculaires.[163(a)]

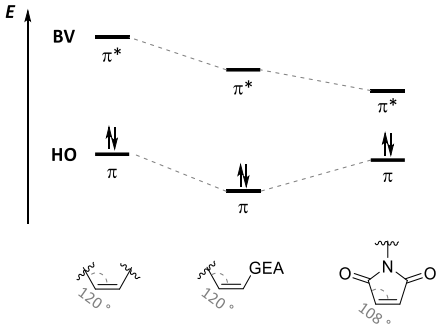


Figure 36. Profils énergétiques relatifs des orbitales frontières de différents dièNophiles.

2.1.2. Les maléimides en bioconjugaison

Comme décrit dans le premier chapitre, les maléimides sont de très bons électrophiles dans des réactions de thia-Michael avec des biothiols. Parmi les principales applications de cette réaction se trouvent le marquage par fluorescence de diverses biomolécules (Schéma 64, **A**),[199] qui est d'autant plus intéressant que le maléimide peut éteindre la fluorescence certains fluorophores *via* des mécanismes de TeP, liés à la double liaison, ce qui permet de minimiser le bruit de fond lors du marquage (seuls les fluorophores conjugués auront une fluorescence significative grâce à la disparition de la double liaison). Une seconde application très importante est la préparation de conjugués anticorps-médicaments, c'est-à-dire des anticorps fonctionnalisés par des composés anti-cancéreux, en vue de traitements oncologiques ciblés (Schéma 64, **B**).[200] Certains de ces immunoconjugués, plus précisément le

[198] Renault, K.; Fredy, J. W.; Renard, P.-Y.; Sabot, C. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 2497–2513.

[199] Chen, X.; Zhou, Y.; Peng, X.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2120–2135.

[200] Joubert, N.; Denevault-Sabourin, C.; Bryden, F.; Viaud-Massuard, M.-C. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *142*, 393–415.

brentuximab vedotin (Adcetris®) et le trastuzumab emtansine (Kadcyla®), ont d'ailleurs été approuvés par la FDA il y a quelques années maintenant (Schéma 64, **C**).

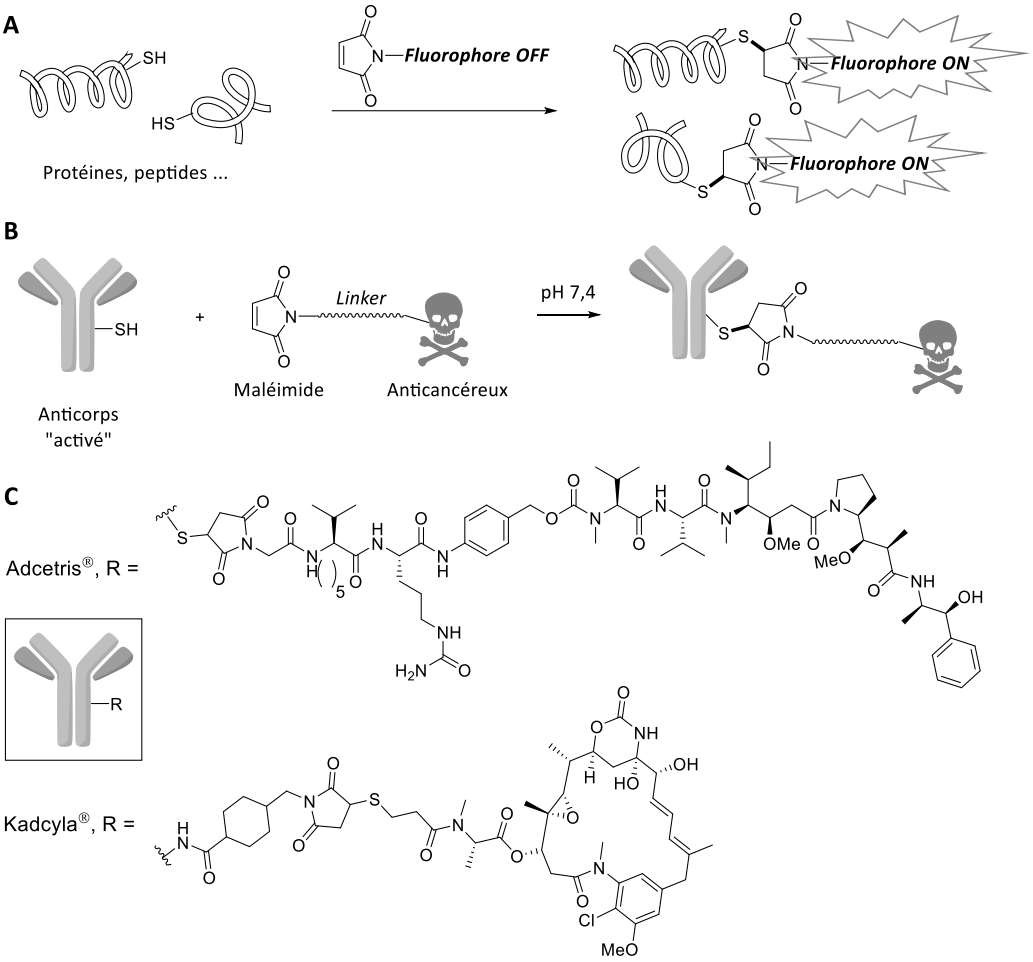


*Schéma 64. (**A**) Marquage par fluorescence de biothiols. (**B**) Emploi de maléimide pour la préparation d'immunoconjugués (**C**) Structures des immunoconjugués Adcetris® et Kadcyla®.*

Les additions 1,4 des thiols sur les maléimides sont très dépendantes du pH car le meilleur partenaire nucléophile lors de la réaction se trouve être le thiolate, dont la formation est favorisée en milieu plus alcalin que le pH physiologique (généralement pH ≥ 8).[201]

Malgré les applications attrayantes des maléimides en bioconjugaison, leur emploi peut parfois être compromis en raison de quelques limitations. En effet, « l'activation » des biomolécules (protéines, anticorps…) *via* la réduction des ponts disulfures en thiols à l'aide de divers agents chimiques est parfois nécessaire pour fournir le thiol requis pour la bioconjugaison sélective (Schéma 64, **B**). Cette étape peut malheureusement conduire à la

[201] Raycroft, M. A. R.; Racine, K. É.; Rowley, C. N.; Keillor, J. W. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 11674–11685.

dénaturation de la biomolécule et donc la rendre biologiquement inactive, ou modifier certaines propriétés de reconnaissance moléculaire.

Par ailleurs, le lien thioéther entre les deux partenaires est réversible en milieux aqueux, et plus particulièrement en présence de résidus basiques, ce qui peut conduire à la perte de conjugaison entre le thiol et le maléimide (Schéma 65).[177,198]

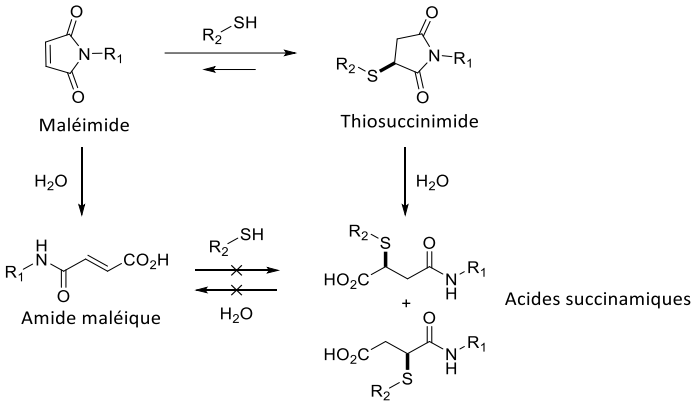
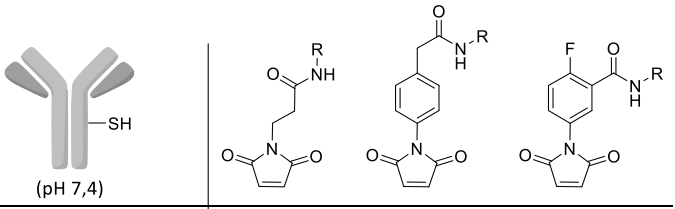


Schéma 65. Addition réversible de Michael et réactions parasites d'hydrolyses du maléimide ou du thiosuccinimide.

De plus, le maléimide peut s'hydrolyser plus ou moins lentement en acide maléique correspondant, ce qui ne permet plus à la réaction de thia-Michael d'avoir lieu car ce dernier est un mauvais accepteur de Michael. Parallèlement, le thiosuccinimide est également hydrolysable en acides succinamiques de manière irréversible. Afin de pouvoir comparer ces différentes réactions selon leurs constantes cinétiques et le types de maléimide employé, ces dernières ont été mesurées en conditions physiologiques à l'aide d'anticorps activés (Figure 37).[202]



Addition 1,4 thiol ($M^{-1}.s^{-1}$)	500	1300	4500
Hydrolyse thiosuccinimide (s^{-1})	0,014	1,3	2,8
Hydrolyse maléimide (s^{-1})	0,38	2,1	4,1

Figure 37. Constantes cinétiques d'addition de Michael et des hydrolyses parasites en conditions physiologiques.

[202] Christie, R. J.; Fleming, R.; Bezabeh, B.; Woods, R.; Mao, S.; Harper, J.; Joseph, A.; Wang, Q.; Xu, Z.-Q.; Wu, H.; Gao, C.; Dimasi, N. *J. Cont. Rel.* **2015**, *220*, 660–670.

Grâce à ces données, il apparaît clairement que les maléimides appauvris en électrons sont proportionnellement les plus réactifs, mais aussi les plus facilement hydrolysables. De manière plus générale et logique, les constantes cinétiques réactionnelles de l'addition 1,4 et de l'hydrolyses augmentent toutes de manière significative plus ou moins proportionnelles avec la valeur du pH en raison de l'augmentation de la proportion des ions thiolates.

L'emploi des maléimides en bioconjugaison via l'addition conjuguée d'un thiol n'étant pas l'objet de ces travaux, il ne sera pas plus développé par la suite. Le lecteur intéressé pourra néanmoins se rapporter à une revue récente issue des travaux de l'équipe.[198] Il était néanmoins important d'introduire certaines de ces notions qui s'avèreront utiles lors de la présentation des résultats abordés dans ce chapitre.

2.1.3. Les maléimides comme diènophiles en ligations chimiosélectives

En plus de leurs excellentes réactivités en tant qu'accepteurs de Michael, les maléimides sont également de très bons diènophiles pour la CDA à DEN (Schéma 66). Malgré la sensibilité des maléimides envers les thiols, cette réaction peut être utilisée en ligation chimiosélective car elle présente de nombreux avantages comme sa biocompatibilité, sa très bonne tolérance fonctionnelle, la spontanéité de la CDA en conditions douces et physiologiques (c'est-à-dire l'absence de catalyseurs métalliques) ou encore son respect des critères d'accélérations cinétiques en milieux aqueux propres aux CDA.

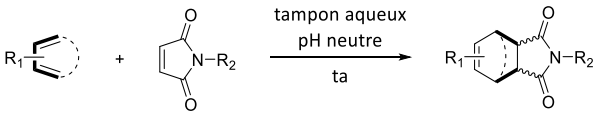
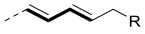
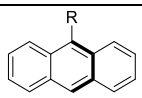


Schéma 66. Réaction de Diels-Alder entre un maléimide et un diène biocompatible.

Bien qu'un très grand nombre de dièns riches en électrons puissent être employés comme partenaires avec les maléimides, seuls quelques-uns ont pu être utilisés en ligations chimiosélectives avec ce type de diènophile, car ils doivent être biocompatibles et stables dans l'eau. Le tableau ci-dessous permet de résumer les différentes applications de la CDA suivant le type de diène employé (Tableau 6). Dans l'ordre des entrées (1 à 7) sont représentées les familles des dièns linéaires, des dièns cycliques (cyclopentadièns, fulvènes et

cyclohexadiènes), des aromatiques polycycliques (anthracènes) et des hétéroaromatiques (furanes et 5-éthoxyoxazoles).

Entrée	Diène	Systèmes (bio)moléculaires et applications
1		Ligation de protéines[203] avec des fluorophores[204,205] et des polysaccharides[206] // Ligation de peptides et d'oligonucléotides[207] // Modification[208] et marquages[209] d'oligonucléotides // Fonctionnalisation et marquage d'ADN[210] // Macrocyclisation de peptides[211]
2		Immobilisation de protéines[203,205,212] // Préparation d'immunoconjugués[213]
3		Encapsulation cellulaire par hydrogels[214]
4		Modification[208] et marquages[209] d'oligonucléotides
5		Marquage de ribozymes[215] // Fonctionnalisation d'ARN[216]

[203] Araújo, A. D. de; Palomo, J. M.; Cramer, J.; Seitz, O.; Alexandrov, K.; Waldmann, H. *Chem. Eur. J.* **2010**, *12*, 6095–6109.

[204] Araújo, A. D. de; Palomo, J. M.; Cramer, J.; Köhn, M.; Schröder, H.; Wacker, R.; Niemeyer, C.; Alexandrov, K.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 296–301.

[205] Araújo, A. D. de; Palomo, J. M.; Cramer, J.; Seitz, O.; Alexandrov, K.; Waldmann, H. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6095–6109.

[206] Pozsgay, V.; Vieira, N. E.; Yergey, A. A. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3191–3194.

[207] Marchán, V.; Ortega, S.; Pulido, D.; Pedroso, E.; Grandas, A. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e24.

[208] Steven, V.; Graham, D. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3781–3787.

[209] Hill, K. W.; Taunton-Rigby, J.; Carter, J. D.; Kropp, E.; Vagle, K.; Pieken, W.; McGee, D. P. C.; Husar, G. M.; Leuck, M.; Anziano, D. J.; Sebesta, D. P. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5352–5358.

[210] Borsenberger, V.; Howorka, S. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1477–1485.

[211] Montgomery, J. E.; Donnelly, J. A.; Fanning, S. W.; Speltz, T. E.; Shangguan, X.; Coukos, J. S.; Greene, G. L.; Moellering, R. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 16374-16381.

[212] Sun, X.-L.; Stabler, C. L.; Cazalis, C. S.; Chaikof, E. L. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 52–57.

[213] St. Amant, A. H. *et al.* (a) *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 2406–2414. (b) *Bioconjugate Chem.* **2019**, 30, 2340–2348. (c) *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 8489-8493.

[214] Madl, C. M.; Heilshorn, S. C. *Chem. Mater.* **2019**, *31* (19), 8035–8043.

[215] Wombacher, R.; Jäschke, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8594–8595.

[216] Seelig, B.; Jäschke, A. *Tet. Lett.* **1997**, *38*, 7729–7732.

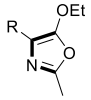
6		Immobilisation de protéines[217] // Fonctionnalisation de peptides[218] // Ligation[219] et modification[208] d'oligonucléotides // Matériaux dynamiques et hydrogels[220] // Préparation de glyco-conjugués anti-cancéreux[221] // Macrocyclisations de peptides[211]
7		Ligation de protéines[175] // Marquage de peptide[176,177]

Tableau 6. Structures des dienes biocompatibles et leurs principales applications pour la synthèse de conjugués (bio)moléculaires.

2.1.4. Application dans le domaine de la catalyse biomoléculaires

Le développement de systèmes biocatalytiques et biosynthétiques accélérant la réaction de cycloadditions [4+2] à l'aide de biomolécules a fait l'objet de nombreuses applications en synthèse.[203,222] L'accélération cinétique de la CDA entre des maléimides et différents dienes a pu être obtenue à l'aide d'anticorps catalytiques (abzymes)[223] et de brins d'ARN (ribozymes).[224] L'accélération de la réaction est obtenue en utilisant un analogue stable de l'état de transition de la réaction comme haptène pour les abzymes, ou ligand de sélection pour les ribozymes. La biomolécule ayant la capacité de stabiliser l'état de transition de la CDA, elle accélère la réaction en diminuant son énergie d'activation. L'état de transition très ordonné de la CDA, et le fait qu'il soit structuralement proche du produit de la réaction, fait que la géométrie structurale du produit est très semblable à la disposition initiale des réactifs au sein du biocatalyseur, fonctionnant donc par effet de proximité. Cependant, afin d'éviter

[217] Petrelli, A.; Samain, E.; Pradeau, S.; Halila, S.; Fort, S. *ChemBioChem* **2017**, *18*, 206–212.

[218] Hoogewijs, K.; Buyst, D.; Winne, J. M.; Martins, J. C.; Madder, A. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2927–2929.

[219] El-Sagheer, A. H.; Cheong, V. V.; Brown, T. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *9*, 232–235.

[220] (a) Wei, H.-L.; Yang, J.; Chu, H.-J.; Yang, Z.; Ma, C.-C.; Yao, K. *J. App. Poly. Sci.* **2011**, *120*, 974–980. (b) Koehler, K. C.; Anseth, K. S.; Bowman, C. N. *Biomacromol.* **2013**, *14*, 538–547. (c) Fisher, S. A.; Anandakumaran, P. N.; Owen, S. C.; Shoichet, M. S. *Adv. Func. Mat.* **2015**, *25*, 7163–7172. (d) Terryn, S.; Brancart, J.; Lefeber, D.; Assche, G. V.; Vanderborght, B. *Sci. Robot.* **2017**, *2*, eaan4268. (e) Kalaoglu-Altan, O. I.; Kirac-Aydin, A.; Sumer Bolu, B.; Sanyal, R.; Sanyal, A. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 2420–2428. (f) Baker, A. E. G.; Tam, R. Y.; Shoichet, M. S. *Biomacromol.* **2017**, *18*, 4373–4384.

[221] Bliman, D.; Demeunynck, M.; Leblond, P.; Meignan, S.; Baussane, I.; Fort, S. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 2370–2381.

[222] Lichman, B. R.; O'Connor, S. E.; Kries, H. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 6864–6877.

[223] (a) Hilvert, D.; Hill, K. W.; Nared, K. D.; Auditor, M. T. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 9261–9262. (b) Braisted, A. C.; Schultz, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7430–7431.

[224] (a) Tarasow, T. M.; Tarasow, S. L.; Eaton, B. E. *Nature* **1997**, *389*, 54–57. (b) Seelig, B.; Jäschke, A. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 167–176.

une inhibition des anticorps par le produit de la réaction,[62] les auteurs ont utilisé des CDA qui conduisent spontanément à des fragmentations ou de déstabilisations conformationnelles des produits formés afin d'obtenir de meilleures constantes catalytique.[223]

L'association de ces différents résultats, en particulier des biomolécules puissent accélérer la CDA avec un maléimide, constitue un ensemble de paramètres suggérant fortement que ce type de réaction pourrait être éligible en KTGS. Cependant, une étude préliminaire doit être réalisée afin d'évaluer la viabilité de cette réaction en fonction des partenaires connus.

Dans une partie qui sera présentée un peu plus tard au cours de ce chapitre, la CDA entre un maléimide et un diène suivie par une CDA entre le cycloadduit formé et un motif tétrazine a fait l'objet d'études par notre équipe. Ce type de séquence réactionnelle pourrait présenter un certain nombre d'avantages en construction (bio)moléculaire et également en KTGS dans le cadre de séquences réactionnelles. Ainsi, le motif tétrazine va être présenté selon son emploi en ligation bioorthogonale et en tant que quencher réactifs sur des sondes pro-fluorescentes.

2.2. Réactivité des tétrazines[225]

Parmi les trois régioisomères possibles de tétrazines existants, seules les 1,2,4,5-tétrazines sont reconnues pour leur très bonne réactivité en présence de diènophiles, réactivité qui a trouvé des applications dans le cadres de réactions bioorthogonales (Schéma 67). En effet, la tétrazine présente un motif hétérodiène appauvri en électrons.

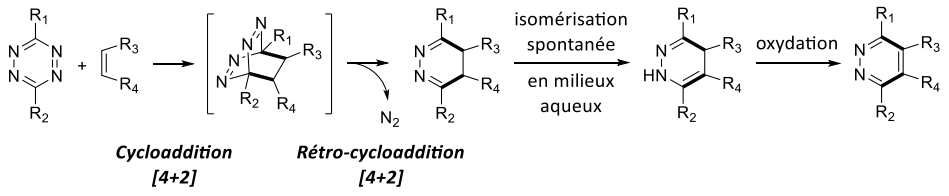


Schéma 67. Réaction de iEDDA entre une tétrazine et un diènophile.

[225] Pour des revues complètes sur le sujet, voir : (a) Selvaraj, R.; Fox, J. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 753–760. (b) Saracoglu, N. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 4199–4236. (c) Oliveira, B. L.; Guo, Z.; Bernardes, G. J. L. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4895–4950. (d) Kyungtae, K.; Kim, E. *Prot. Sci.* **2017**, *15*, 15–28. (e) Kozma, E.; Demeter, O.; Kele, P. *ChemBioChem* **2017**, *18*, 486–501. (f) Haoxing, W.; Devaraj, N. K. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 1249–1259.

En présence de dièmophiles enrichis en électrons, ou réactifs *via* une contrainte de cycle, une première cycloaddition [4+2] à demande électronique inverse (iEDDA) conduit à un intermédiaire instable qui élimine rapidement du diazote *via* une rétro-cycloaddition [4+2]. En milieux aqueux et en présence d'oxygène, le produit obtenu initialement peut finalement s'isomériser et puis s'oxyder pour conduire à l'hétérocycle pyridazine. De manière globale, la réactivité et la stabilité des tétrazines sont inversement proportionnelles et un compromis doit donc être trouvé suivant l'application ciblée. (Figure 38). Généralement, plus le noyaux tétrazine est appauvri en électrons, plus il est réactif en iEDDA mais est également instable.

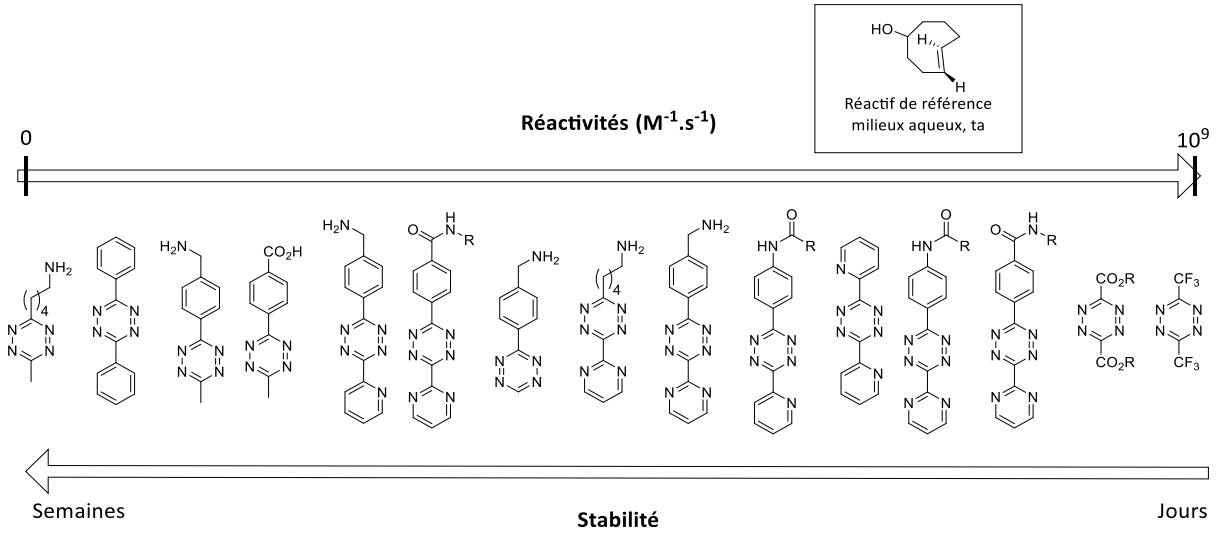


Figure 38. Réactivités et stabilités relatives des tétrazines.

Un grand nombre de dièmophiles ont pu être étudiés comme partenaires d'iEDDA avec les tétrazines et l'amplitude de réactivité est aujourd'hui d'environ 10^9 entre le plus et le moins réactif d'entre eux (Figure 39). Parmi les composés les plus réactifs se trouvent les *trans*-cyclooctènes, suivies par les alcynes et les alcènes sous contrainte de cycle ou fortement enrichis, puis enfin les diènes plus classiques. Au même titre que les tétrazines, une plus forte réactivité pour le diène est souvent synonyme de moins bonne stabilité et/ou de difficultés de synthèse, ce qui conduit encore une fois à devoir réaliser un compromis suivant l'objectif visé.

Une des applications des tétrazines est liée au fait qu'il est possible d'obtenir des sondes fluorogéniques, ou des réactifs pro-fluorescents fondés sur ce type de motif, la tétrazine faisant office à la fois de « quencher » de fluorescence et de fonction réactive. De tels réactifs sont aujourd'hui très largement employées en imagerie biologique de très haute-

résolution.[226] De nombreuses sondes aux structures variées ont été décrites dans la littérature et permettent une couverture importante du spectre visible en terme d'émission de fluorescence.[227] Ces différents données présentent un réel intérêt dans le contexte de ces travaux de thèse et leur utilisation va être maintenant développé.

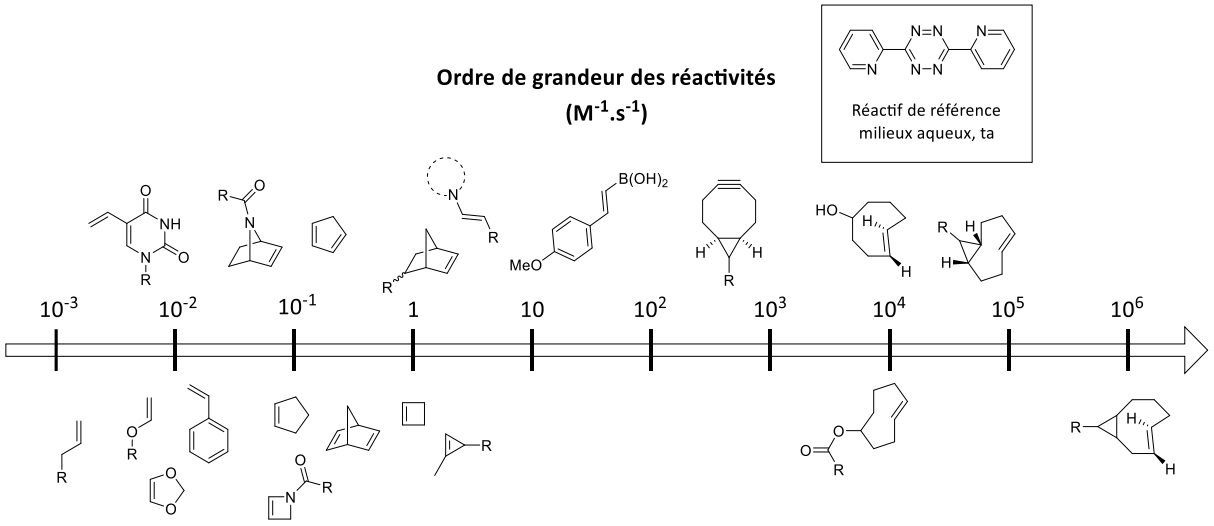


Figure 39. Ordres de grandeurs croissants des réactivités de diènophiles en iEDDA.

Comme le montre la figure 39, les alcènes tendus du type norbornène sont des partenaires des tétrazines pour les réactions d'iEDDA et ce avec des constantes cinétiques appréciables de l'ordre de 1-10 $M^{-1}.s^{-1}$.[228] De manière analogue, les cycloadduits obtenus par CDA entre les furanes et les maléimides ont une structure qui se rapproche du norbornène (bicycle ponté comportant une oléfine riche en électrons), et ont été étudiés par notre équipe et plus particulièrement par le Dr. Kévin Renault et le Dr. Laura Nogueira de Faria Cardoso. Ces derniers sont parvenus à démontrer que ces cycloadduits possédaient également de très bonnes réactivités avec les tétrazines (Schéma 68, **A**).

Cette stratégie de ligation présente l'avantage d'être très spécifique du cycloadduit formé. Effectivement, une absence de réactivités parasites entre la tétrazine et les maléimides

[226] (a) Siegl, S. J.; Galeta, J.; Dzijak, R.; Dračínský, M.; Vrabel, M. *ChemPlusChem* **2019**, *84*, 493–497. (b) Beliu, G.; Kurz, A. J.; Kuhlemann, A. C.; Behringer-Pliess, L.; Meub, M.; Wolf, N.; Seibel, J.; Shi, Z.-D.; Schnermann, M.; Grimm, J. B.; Lavis, L. D.; Doose, S.; Sauer, M. *Commun. Biol.* **2019**, *2*, 1–13.

[227] Wieczorek, A.; Werther, P.; Euchner, J.; Wombacher, R. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 1506–1510.

[228] Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2297–2299.

ou les motifs furanes a été constatée (Schéma 68, **B** et **C**),[229] ce qui ne serait pas le cas pour les motifs fulvène et cyclopentadiène qui sont des partenaires connus d'iEDDA avec les tétrazines.[230]

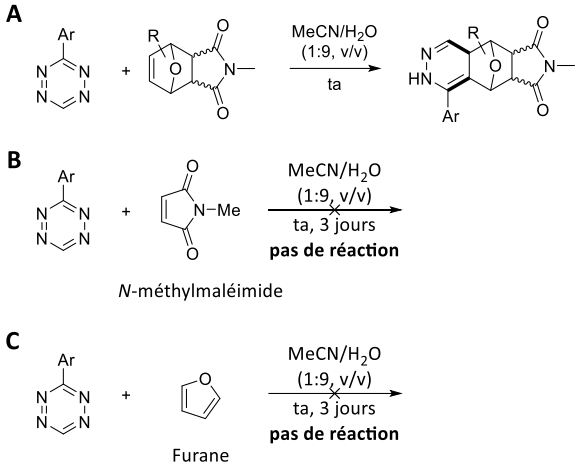


*Schéma 68. (**A**) Réactivité d'une tétrazine avec un oxabicycle succinimide. Étude de l'orthogonalité de la tétrazine avec (**B**) les maléimides et (**C**) le furane.*

Le Dr. Kévin Renault a utilisé une sonde pro-fluorescente à base de tétrazine, la sonde **56**, afin d'évaluer et de comparer rapidement les vitesses de réactions de dérivés du furane avec le maléimide. Cette sonde est très peu fluorescente à l'état natif étant donné que la tétrazine est un *quencher* efficace du motif azaphtalimide fluorescent. Cette sonde présente en revanche une forte exaltation de fluorescence lorsque la tétrazine réagit avec une oléfine puisque le *quencher* disparait. La sonde a donc été utilisée pour comparer de façon très rapide la formation des cycloadduits **57** et **58** entre le maléimide et différents furanes substitués. Cette étude a également permis de confirmer la compatibilité du motif furane avec la tétrazine (Figure 40, **A**). La séquence réactionnelle en version tri-composantes (CDA à DEN et iEDDA) a également pu être étudiée *via* un suivi de déclenchement de fluorescence (Figure 40, **B**). Bien que la cinétique de réaction du cycloadduit **57** avec la sonde soit beaucoup plus importante, la version en tri-composés présente tout de même un déclenchement significatif. Cette étude apporte une preuve que la séquence réactionnelle fonctionne et que les partenaires furanes et maléimides sont totalement inertes vis-à-vis de la tétrazine. Il s'agit de résultats importants

[229] Les résultats présentés ici sont extraits du manuscrit de thèse du Dr. Kévin Renault. « *Développement de ligations chimiosélectives « click » - applications à la synthèse de sondes fluorescentes* ». Thèse soutenue le 23 novembre 2018 à l'université de Rouen Normandie.

[230] (a) Haghdadi, M.; Alashti, M.; Bosra, H. G. *Struc. Chem.* **2018**, *29*, 1511–1523. (b) Levandowski, B. J.; Hamlin, T. A.; Eckvahl, H. J.; Bickelhaupt, F. M.; Houk, K. N. *J. Mol. Mod.* **2019**, *25*, 33–38.

dans le cadre de réactions séquentielles pour de potentielles applications en KTGS. Effectivement, cette grande sélectivité de la tétrazine pour l'oxabicycle formé *in situ* permettrait de réduire les réactions non-spécifiques et donc le bruit de fond obtenu par analyse spectroscopique. Ce paramètre permettrait donc de réduire les risques de résultats faux négatifs et de diminuer les seuils de détections analytiques.

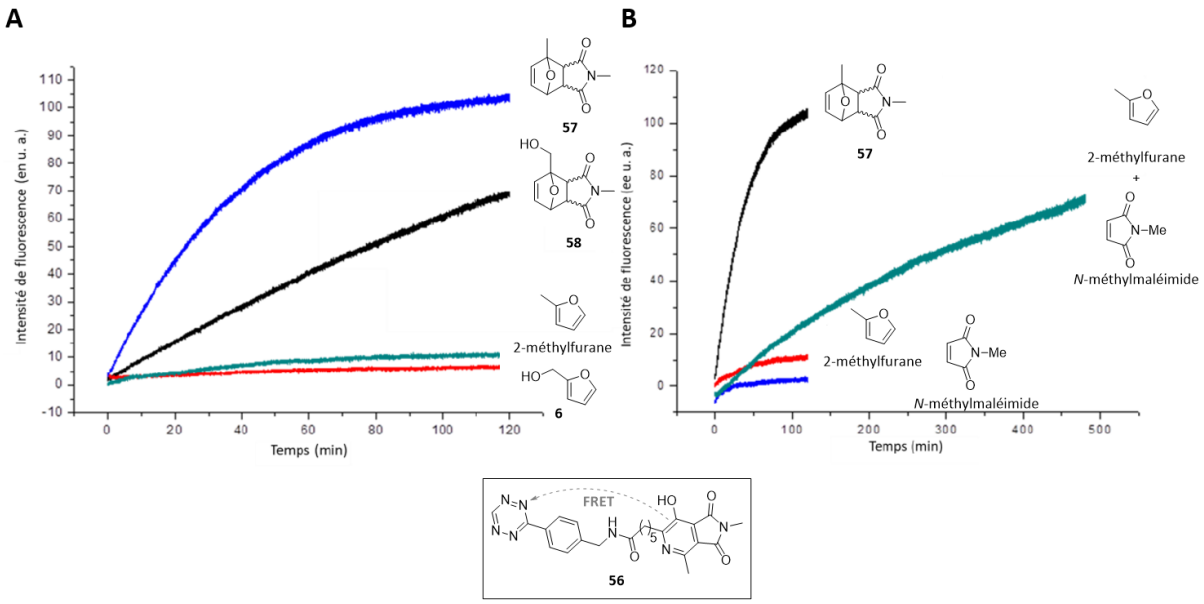


*Figure 40. (**A**) Etude de réactivité de la sonde **56** par déclenchement de fluorescence (λ_{ex} = 420 nm, λ_{em} = 520 nm) dans le PBS pH 7,4 à T = 25 °C. (**B**) Etude cinétique de la réaction en version tri-composés dans les mêmes conditions expérimentales. (Figure extraites et modifiées du manuscrit de thèse du Dr. Kévin Renault[229]).*

2.3. Objectifs du projet

Suite à ces premiers résultats encourageants obtenus par le Dr. Kévin Renault et le Dr. Dr. Laura Nogueira de Faria Cardoso, de nouvelles séquences réactionnelles employant une alternance des types de demandes électroniques (DEN et DEI) en CDA ont été conçues dans l'optique de les transposer en KTGS (CDA à DEN) puis pour la détection (CDA à DEI) des ligands formés (Schéma 69).

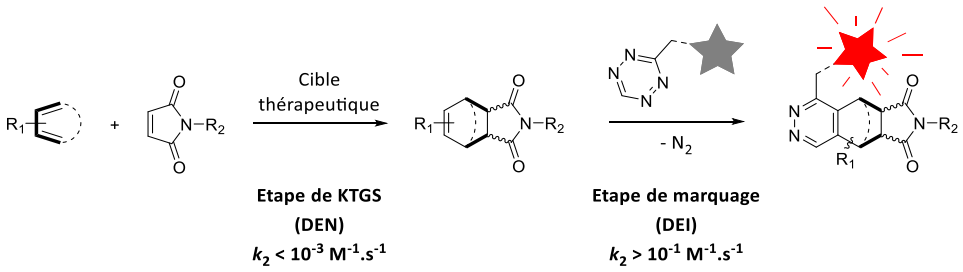


Schéma 69. Séquence réactionnelle de CDA pour le marquage post-KTGS.

De cette manière, il serait envisageable d'employer pour la phase de KTGS une première CDA entre des fragments comportant respectivement des diènes enrichis et des maléimides. Une seconde phase, post-KTGS, permettrait alors le marquage des ligands potentiellement formés grâce à une CDA à DEI à l'aide d'une sonde pro-fluorescente comportant un motif tétrazine. Pour cela, il est nécessaire que la réaction de la première étape soit lente en l'absence de la cible ($k_2 < 10^{-3}$ $M^{-1}.s^{-1}$), contrairement à celle de l'étape de marquage qui doit être spontanée et la plus rapide possible ($k_2 > 10^{-1}$ $M^{-1}.s^{-1}$).

Comme il a été clairement démontré au cours du chapitre d'introduction, la constante cinétique d'une réaction en milieux aqueux est une donnée cruciale pour son développement en KTGS. Également à titre de rappel, la stabilité des produits potentiellement formés en conditions physiologiques et en présence d'une cible thérapeutique est un critère primordial. Dans le cas contraire, la dégradation des ces derniers pourrait conduire à des résultats du type faux-négatifs et donc à l'échec du criblage.

Lors de la rédaction d'une revue, portant sur l'emploi des maléimides en chimie bioorganique, notre équipe s'est aperçue de la forte dispersion de données permettant d'établir des points de comparaison entre les différents diènes biocompatibles (cinétiques réactionnelles, stabilités chimiques des cycloadduits formés…), malgré les très nombreuses études et applications de la CDA à DEN dans ce domaine.[198] En effet, seuls quelques articles de travaux expérimentaux[188,208,213(a)] ou théoriques[231] permettent d'évaluer qualitativement et/ou quantitativement ces paramètres, mais cela demeure insuffisant étant donnée la grande disparité de conditions expérimentales et des systèmes (bio)moléculaires engagés.

Afin de pallier ce problème et de disposer de données comparables et fiables, il a été décidé d'effectuer une première étude comparative des diènes biocompatibles connus. La finalité de cette première partie du projet de thèse est donc de faciliter et de rationaliser le choix d'un diène suivant les besoins et les applications ciblés (KTGS, ligation rapide, stabilité, délivrance de principes actifs…).

[231] Tang, S.-Y.; Shi, J.; Guo, Q.-X. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 2673–2682.

III – Résultats et discussions

3.1. Préparation et étude des réactifs

3.1.1. Sélection des dienes et synthèse des partenaires non-commerciaux

Conformément aux travaux décris dans la littérature, les différents dienes biocompatibles issus des quatre grandes familles (linéaire, cyclique, aromatique polycyclique et hétéroaromatique) présentés précédemment comme partenaires réactifs avec les maléimides ont été sélectionnés (Figure 41).

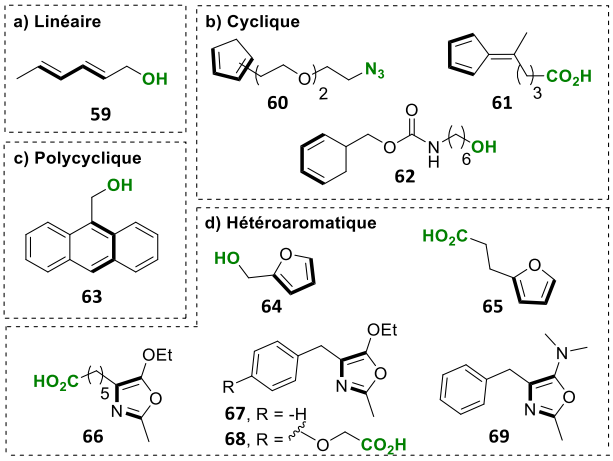


Figure 41. Dienes biocompatibles fonctionnalisés sélectionnés pour l'étude.

La position des substituants dérivatisables (fonctions vertes) a été choisie selon leur première utilisation dans la littérature ou pour toute future application potentielle. Les dienes **59**, **63**-**65** sont des produits commerciaux peu onéreux et étaient donc disponibles au laboratoire, les dienes **60**-**62** et **66**-**69** ont quant à eux dû être synthétisés.

Le cyclopentadiène **60** a été préparé en trois étapes avec un rendement global de 67%, à partir du 2-(2-(2-chloroéthoxy)éthoxy)éthan-1-ol et du cyclopentadiène fraîchement distillé (Schéma 70). Le respect des conditions de températures lors de la substitution nucléophile du groupement tosylate **70** par le carbanion du cyclopentadiène est primordial afin d'éviter une dimérisation du produit **60** par CDA et une dégradation des réactifs. Pour les mêmes raisons de dimérisation, le traitement de la réaction et la purification du produit final ont dû être effectués le plus rapidement possible. Le cyclopentadiène a été isolé sous la forme d'un

mélange de deux régioisomères inséparables (ratio ≈ 1:1), résultants d'un rapide transfert [1,5] d'hydrure bien connu pour ces espèces chimiques.[232]

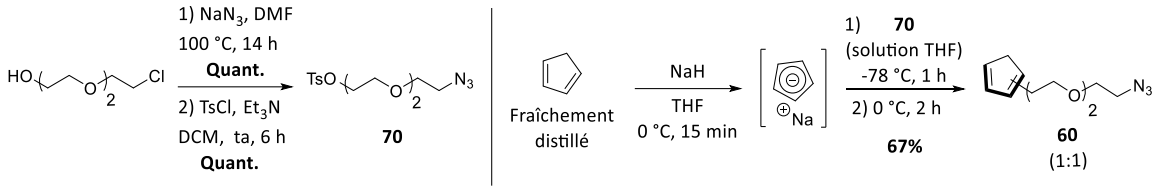


*Schéma 70. Synthèse du cyclopentadiène **60**.*

Par ailleurs, malgré un rendement isolé très modeste de 39%, le fulvène **61** a été obtenu en une seule étape par une condensation de Knoevenagel simple à mettre en œuvre et ce, à partir de réactifs commerciaux (Schéma 71).[233]

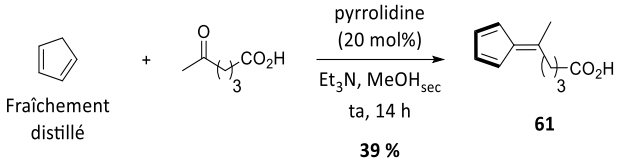


*Schéma 71. Synthèse du fulvène **61** par réaction de Knoevenagel* via *une catalyse iminium.*

Le cyclohexadiène **62** racémique quant à lui a nécessité cinq étapes de synthèse à partir du *rac*-cyclohex-3-èn-1-ylméthanol, étapes décrites dans la bibliographie, mais dont certaines ont dues être modifiées (Schéma 72).[208]

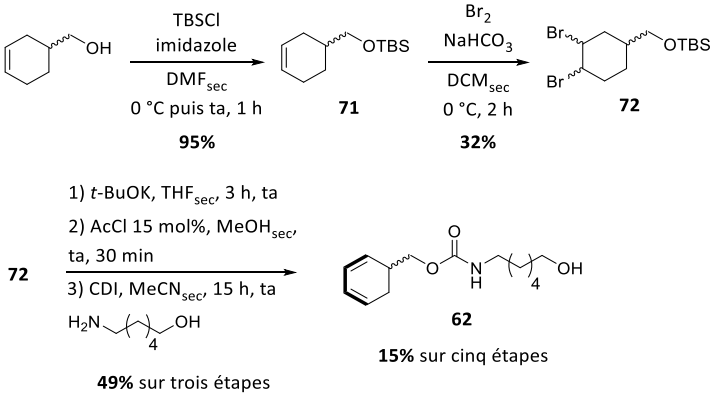


Schéma 72. Synthèse en cinq étapes du rac-*cyclohexadiène **62**.*

La procédure décrite dans la littérature pour l'étape de dibromation de l'alcène **71** a dû être modifiée *via* l'ajout d'une quantité stœchiométrique de $NaHCO_3$ lors de la réaction.

[232] Mironov, V. A.; Sobolev, E. V.; Elizarova, A. N. *Tetrahedron* **1963**, *19*, 1939–1958.

[233] Coşkun, N.; Erden, I. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 8607–8614.

En effet, les premières tentatives en l'absence de base ont conduit à une déprotection partielle du groupement TBS, conduisant à l'alcool correspondant, probablement en raison de la présence d'une petite quantité de HBr dans le milieu qui a pu être neutralisée par l'hydrogénocarbonate. Malgré cela, et bien qu'une conversion complète de l'alcène **71** ait été observée, des mélanges relativement complexes ont été obtenus et une séparation partielle des produits désirés a dû être réalisée avant de poursuivre la synthèse, ce qui a fait chuter le rendement à seulement 32%.

Pour les deux étapes suivantes (double élimination en milieu basique et déprotection par une catalyse acide du groupement TBS), aucune purification n'a pu être effectuée avant la formation de la liaison carbamate, les premières tentatives de purification intermédiaire ayant conduit à une baisse importante du rendement global de la synthèse.

Ainsi, le cyclohexadiène **62** a été obtenu avec un faible rendement global de 15%. De plus, les analyses RMN de ce composé ont mis en évidence la présence de 6% de son analogue aromatique (benzylcarbamate). Ces deux produits n'ont malheureusement pas pu être séparés par chromatographie sur gel de silice, recristallisation dans l'eau ou encore HPLC semi-préparative. Cependant, la présence de ce produit n'a pas présenté d'obstacle particulier pour la suite de l'étude en raison de son absence de réactivité en CDA.

Ces dernières années, notre équipe s'est particulièrement intéressée à la préparation et l'utilisation des 5-éthoxyoxazoles en synthèse organique et en ligation chimiosélective. Ces hétérocycles sont obtenus à partir des α-triflyloxy- et des α-amido-esters, respectivement par des réactions de type Ritter et de cyclo-déshydratations aromatisantes.[234] Par commodité, ces composés seront simplement nommés « oxazoles » dans la suite du manuscrit.

Le produit **66**, déjà présent au laboratoire, avait été synthétisé en six étapes sur l'échelle du gramme par le Dr Laurie-Anne Jouanno en 2013 (Schéma 73, **A**). L'oxazole **67** de son côté été préparé de manière classique en trois étapes à partir de la phénylalanine avec un rendement global de 72% (Schéma 73, **B**). Contrairement aux autres diènes sélectionnés pour l'étude, cet exemple ne possède pas de fonction conjugable, mais l'objectif est de pouvoir comparer sa cinétique réactionnelle avec celles des deux autres oxazoles. Par ailleurs, un

[234] (a) Jouanno, L.-A.; Sabot, C.; Renard, P.-Y. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 8549–8555. (b) Jouanno, L.-A.; Tognetti, V.; Joubert, L.; Sabot, C.; Renard, P.-Y. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2530–2533.

nouvel analogue benzylique **68** a pu être préparé en seulement trois étapes en partant du *N*-acétyl-tyrosinate commercial et avec 49% de rendement global (Schéma 73, **C**). Tout en conservant un bras fonctionnalisable grâce à la fonction acide carboxylique, ce composé a été obtenu plus rapidement et avec un meilleur rendement global que l'oxazole **66**.

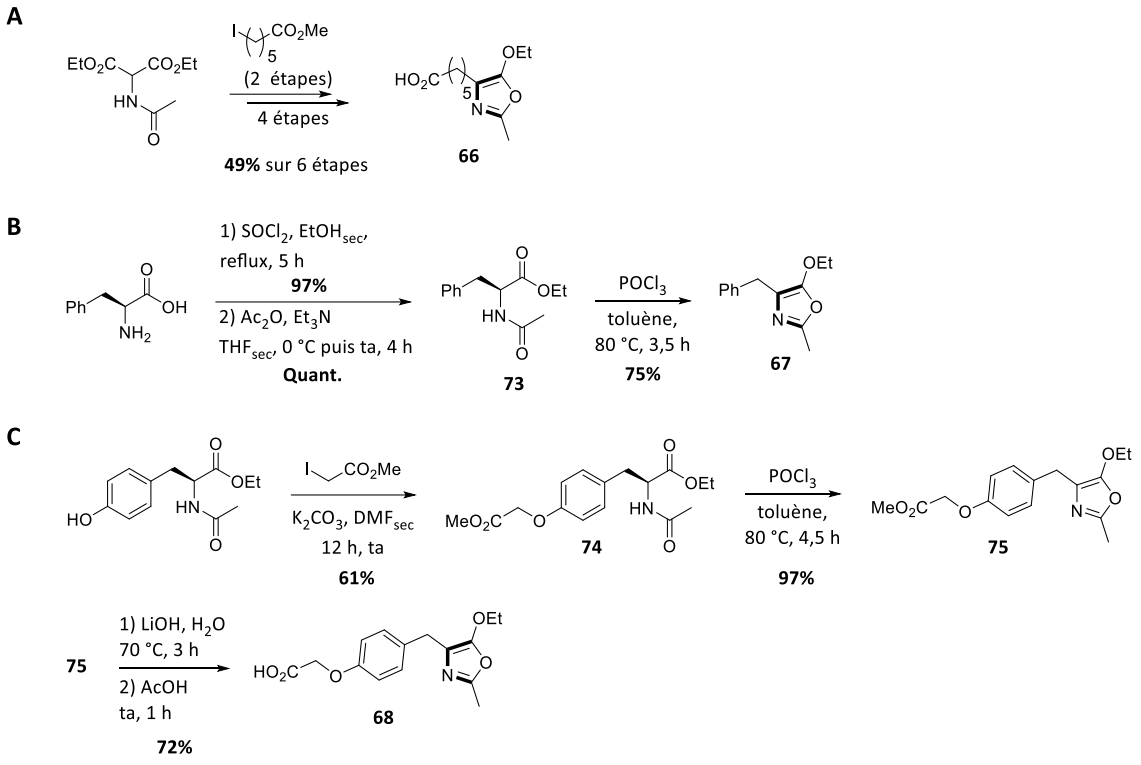


*Schéma 73. (**A**) Préparation de l'oxazole **66** par le Dr Jouanno. (**B**) Synthèse de l'oxazole **67** à partir de la phénylalanine. (**C**) Synthèse de de l'oxazole **68** à partir du N-acétyl-L-tyrosinate.*

Parallèlement, un nouveau design de la famille des oxazoles a été imaginé afin d'augmenter leur réactivité avec les maléimides. Pour cela, il a été choisi d'enrichir le diène en électrons *via* l'adjonction d'une fonction plus électro-donneuse en position 5 du cycle hétéroaromatique, notamment en remplaçant par exemple le groupement éthoxy par une fonction *N*,*N*-diméthylamine. Par analogie avec une précédente étude réalisée en 2014 par notre équipe, un mécanisme similaire de cycloaddition entre un 5-*N*,*N*-diméthylamino-oxazole et un maléimide peut être proposé (Schéma 74).[235] La présence subséquente de la fonction amine tertiaire permettrait effectivement d'accélérer la vitesse de cycloaddition en premier lieu, puis de participer au transfert intramoléculaire de proton avant d'être éliminée

[235] Jouanno, L.-A.; Di Mascio, V.; Tognetti, V.; Joubert, L.; Sabot, C.; Renard, P.-Y. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 1303–1319.

et de conduire finalement à l'aza-phtalimide correspondant, ce qui accélérerait le processus final d'aromatisation en conditions physiologiques (pH neutre et température ≤ 37 °C).

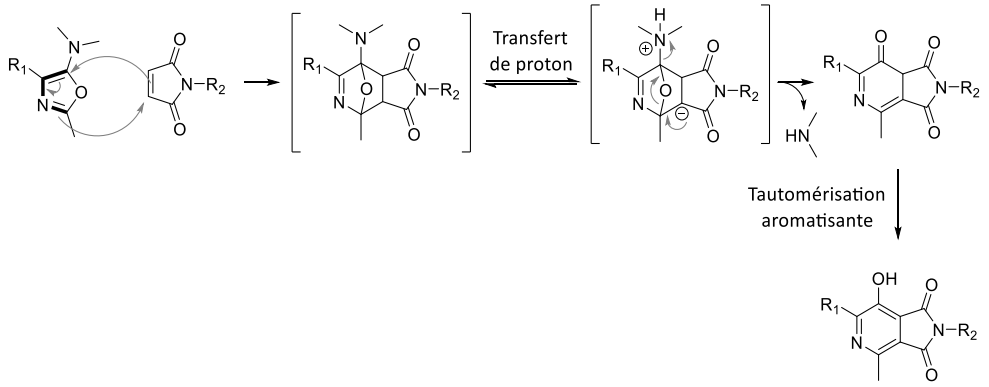


Schéma 74. Mécanisme présumé de cycloaddition puis d'aromatisation entre un maléimide et un 5-N,N-diméthylamino-oxazole.

Afin de vérifier cette hypothèse, la préparation du partenaire modèle **78** pour cette nouvelle génération d'oxazoles a été entreprise. En premier lieu, la synthèse du précurseur diamide **76** a été entreprise par une aminolyse d'ester sur le composé **73** en présence de *N*,*N*-diméthylamine dans l'éthanol à reflux (Schéma 75, **A**). Malheureusement, aucune conversion du réactif de départ n'a pu être observée après 24 heures de réaction à 80 °C. Finalement, le précurseur **76** a pu être obtenu avec un rendement de 32% par réaction d'amidation entre le chlorhydrate de *N*,*N*-diméthylamine et l'acide **77** activé par l'agent de couplage TSTU (Schéma 75, **B**).

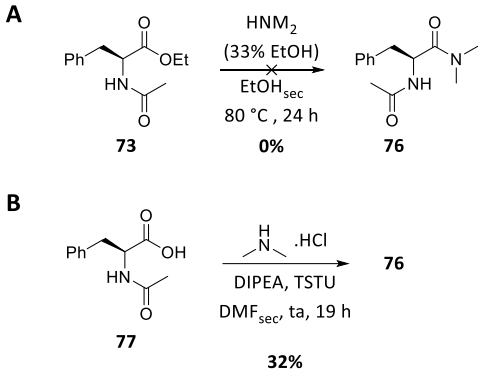


*Schéma 75. Préparation du précurseur **76** par (**A**) aminolyse d'ester et par (**B**) réaction de couplage.*

Une cyclodéshydratation intramoléculaire du précurseur **76** a été tentée suivant des conditions décrites dans la littérature afin d'accéder à l'oxazole **78**, mais aucune conversion

en produit souhaité n'a pu être observée (Schéma 76, **Conditions A**).[236] Ensuite, et par analogie aux méthodes de préparation des 5-éthoxyoxazoles, un essai de cyclodéshydratation intramoléculaire en présence d'anhydride triflique dans la pyridine a été réalisé (Schéma 76, **Conditions B**).[237] Cette fois, une conversion total du précurseur **76** a pu être constatée, mais un mélange complexe a été obtenu et l'oxazole **78** n'a pas pu être isolé et a donc dû être écarté de cette étude. De nouvelles conditions de préparation devront être étudiées afin de pouvoir former ce type d'oxazole et de pouvoir évaluer son comportement lors de CDA avec les maléimides dans des conditions physiologiques.

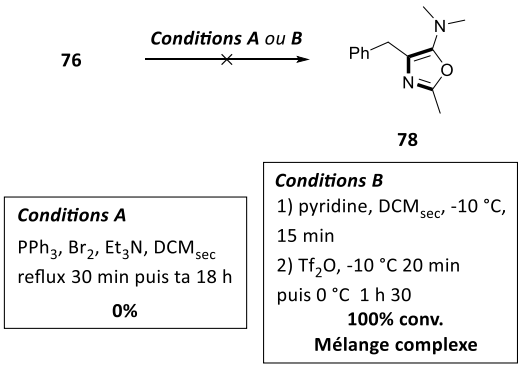


Schéma 76. Tentatives de cylodéshydratations intramoléculaires selon les conditions A et B.

3.1.2. Étude de la stabilité des diènes synthétisés

La stabilité et les conditions de stockage de réactifs à haute valeur ajoutée sont des données importantes afin de correctement planifier et coordonner leur synthèse et leur emploi.

Le cyclopentadiène est connu pour son instabilité en raison de sa rapide dimérisation par réaction d'homo-CDA (Schéma 77, **A**). Ce processus, réversible par chauffage, permet d'obtenir le cyclopentadiène pur par un simple chauffage et une distillation fractionnée simultanée. Afin de vérifier la stabilité du cyclopentadiène monofonctionnalisé, le composé **2** a donc été placé dans deux conditions de stockage A et B différentes, respectivement à température ambiante pendant 36 h et à -25 °C durant neuf mois (Schéma 77, **B**). Les modes de stockages A et B ont conduit à des taux de dimérisation respectifs de 80% et de 10%. Le

[236] Mazurkiewiscz, R. *Synthesis* **1992**, *10*, 941–943.
[237] Goodman, S. N.; Mans, D. M.; Sisko, J.; Yin, H. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1604–1607.

dimère correspondant n'a pas été isolé mais a pu facilement être caractérisé par spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS). Ces résultats semblent en adéquation avec la stabilité du cyclopentadiène de départ, malgré l'encombrement stérique supplémentaire lié à l'introduction de la chaîne latérale.

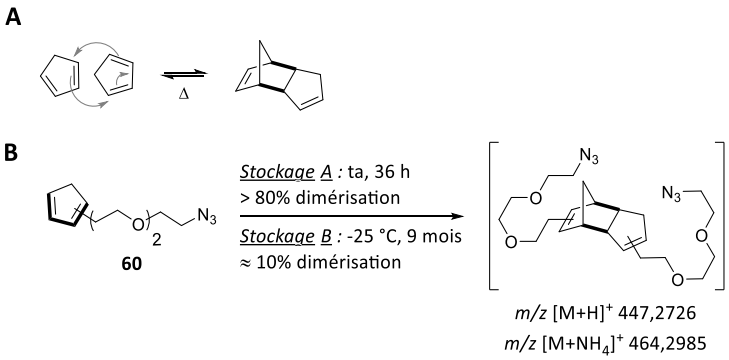


*Schéma 77. (**A**) Dimérisation réversible du cyclopentadiène (**B**) Conditions de stockage et produit de dimérisation observé par HRMS.*

De son côté, le fulvène **61** a démontré une parfaite stabilité lors de son stockage à température ambiante et sur une durée supérieure à 16 jours. Sa conjugaison électronique plus étendue et son encombrement stérique plus important sont probablement les facteurs favorisant sa stabilité, comparativement à son analogue **60**.

Le cyclohexadiène **62** pour sa part n'a montré aucune instabilité lors de son stockage à -25 °C pendant neuf mois et aucune aromatisation naturelle en analogue benzylcarbamate n'a pu être constatée.

La plupart des 5-éthoxyoxazoles qui ont été étudiés par notre équipe se sont avérés instables au-delà de quelques semaines de stockage à -25 °C. Effectivement, la *N*-oxydation du cycle aromatique survient relativement rapidement en raison de la richesse électronique de ces composés. Cependant, l'oxazole **66** a démontré une totale stabilité après environ six ans de stockage à -25 °C. Un état de protonation de l'atome d'azote par la fonction acide carboxylique pourrait être à l'origine de cette stabilité. Afin d'étayer cette hypothèse, l'oxazole modèle **67** a été stocké dans les mêmes conditions avec un équivalent d'acide acétique, ou sans, pendant neuf mois (Schéma 78). Après analyses, il s'est avéré que l'acide acétique a effectivement permis une bonne conservation du composé, avec environ 10% d'oxydation seulement, contre plus de 80% en absence d'acide. Comme précédemment, le produit d'oxydation n'a pas été isolé mais a pu être caractérisé par HRMS.

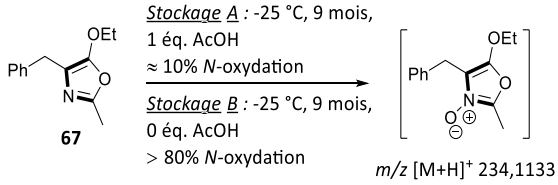


Schéma 78. Effet de l'état de protonation sur l'oxydation des oxazoles.

Conformément à ces observations, l'oxazole **68** comportant une fonction acide carboxylique a démontré une bonne stabilité avec seulement 10% d'oxydation après neuf mois de stockage à -25 °C. Ainsi, l'addition d'acide acétique semble être une très bonne solution pour le stockage au long terme de cette famille de diène.

3.1.3. Préparation des partenaires maléimides

En vue de l'étude comparative des cinétiques réactionnelles des différents diènes, la sonde pro-fluorescente **79**[238] contenant des motifs maléimide et dansyl-amide a été synthétisée en une seule étape à l'aide du maléimide **80** et du chlorure de sulfonyle **81** commercial (Schéma 79, **A**).

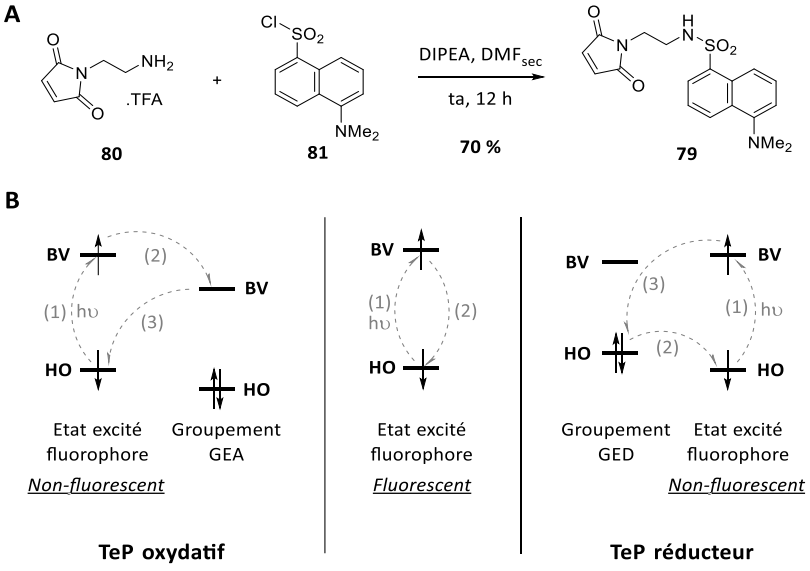


*Schéma 79. (A) Préparation de la sonde pro-fluorescente **79**. (B) Mécanismes de TeP oxydant et réducteur (les flèches grises et les numéros indiquent l'ordre chronologique des transferts électroniques).*

En effet, comme expliqué précédemment, les maléimides sont très employés pour l'élaboration de sondes pro-fluorescentes en raison de leur propriété d'extinction (*quench*) de fluorescence *via* le phénomène de transfert électronique photo-induit, ou « TeP » de type

[238] Corrie, J. E. T. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, *0*, 2975–2982.

oxydatif dans le cas des maléimides. Ce mécanisme va permettre le retour à l'état fondamental du fluorophore excité *via* par une désexcitation non radiative. Cependant, cet effet disparaît instantanément lorsque le maléimide entre en réaction, ce qui permet un recouvrement direct des propriétés de fluorescence. Selon la nature électronique du groupement responsable de l'extinction de fluorescence (GEA ou GED), la désexcitation est réalisée respectivement suivant des mécanismes de TeP oxydant ou réducteur.

Ensuite, un maléimide énantiomériquement pur **82** a été préparé. En effet, les CDA conduisant à la formation de centres stéréogènes de manière plus ou moins contrôlée, il était intéressant de voir l'impact de l'utilisation d'un maléimide chiral conduit à un mélange de diastéréoisomères, parfois séparables par chromatographie, et donc au nombre de diastéréoisomères formés post cycloaddition. La formation de multiples isomères est un critère important à prendre en considération lors de la sélection d'une ligation chimiosélective, puisque leur présence peut sensiblement compliquer les étapes d'analyses et de purification du conjugué. La séparation de ces isomères peut effectivement s'avérée être indispensable en raison de leur potentielle hétérogénéité vis-à-vis de leurs propriétés physico-chimiques et/ou biologiques respectives. Ainsi, le motif chiral du maléimide pourrait mimer la chiralité d'une biomolécule (protéine, acide nucléique, etc…), tout en s'affranchissant de sa faible stabilité dans le but d'étudier exclusivement le motif issu de la cycloaddition. Pour cela, une réaction de Mitsunobu[239] entre la copule chirale (*R*)-1-phényléthan-1-ol et le 1*H*-pyrrole-2,5-dione a été réalisée pour obtenir le maléimide chiral **82** avec un rendement de 34% (Schéma 80).

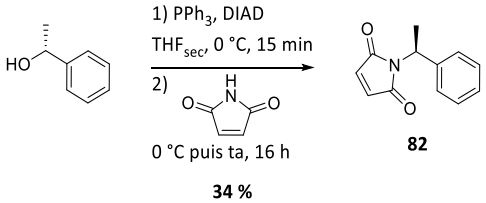


*Schéma 80. Synthèse du maléimide chiral **82**.*

[239] Kumara Swammy, K. C.; Bhuvan Kumar, N. N.; Balaraman, E.; Pavan Kumar, K. V. P. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2551–2651.

Cette même réaction a également été employée pour la synthèse du maléimide **83**, et qui a été obtenu avec 61% de rendement (Schéma 81). L'emploi de ce composé dans le cadre d'études de réactions orthogonales sera décrit plus loin dans ce chapitre.

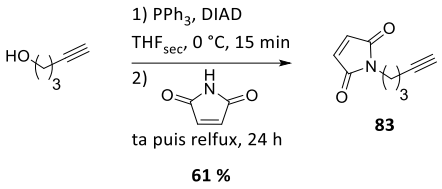


*Schéma 81. Synthèse du maléimide **83** par réaction de Mitsunobu.*

3.2. Études et mesures cinétiques

3.2.1. Étude comparative qualitative des cinétiques réactionnelles

Une première comparaison qualitative des cinétiques réactionnelles des diènes **59**-**68** a donc été menée par spectroscopie de fluorescence à l'aide de la sonde **79** (Schéma 82).

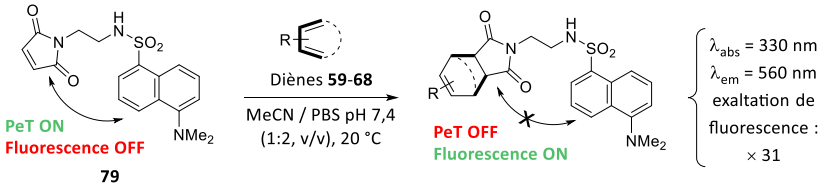


Schéma 82. Conditions réactionnelles des suivis cinétiques qualitatifs.

Les déclenchements réactionnels ont été directement effectués dans une cuve en quartz (volume = 3 ml, épaisseur = 1 cm) thermostatée à T = 20 °C. Les réactions ont été réalisées dans un milieu organique/aqueux composé de MeCN et de PBS pH 7,4 dans un ratio volumique respectivement de 1:2. Les concentrations finales dans la cuve ont été de 1 mM en sonde **79** et de 5 mM (5 éq.) en diène **59**-**68**. Grâce au suivi de l'évolution de l'intensité de fluorescence à λ_{em} = 560 nm (λ_{ex} = 330 nm), les courbes de fluorescence suivantes ont pu être obtenues (Figure 42). L'augmentation des intensités de fluorescence dans le temps ont permis d'effectuer un premier classement de réactivité des diènes selon les pentes relatives des courbes obtenues. Il apparaît donc clairement que le cyclopentadiène **60** est de loin celui qui réagit le plus rapidement parmi les diènes étudiés. Ensuite, et dans l'ordre de décroissance des réactivités, arrivent la famille des 5-éthoxyoxazoles, des diènes cycliques et puis des furanes. De manière surprenante, le fulvène **61** et l'anthracène **63** n'ont pas conduit à une

exaltation de fluorescence significative par rapport à la réaction de contrôle (hydrolyse non-spécifique de la sonde **79** dans le solvant, « Blanc »).

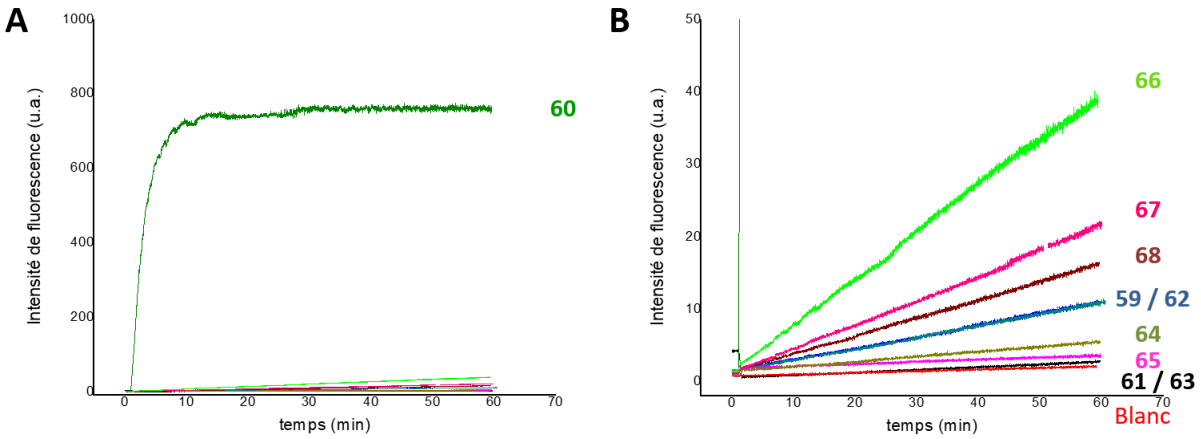


*Figure 42. (**A**) Courbes de suivis réactionnels de CDA ([**79**] = 1 mM et [**59-68**] = 5 mM) par spectroscopie de fluorescence (λ_{em} = 560 nm, λ_{ex} = 330 nm). (**B**) Agrandissement de la figure **A**.*

Afin de vérifier la concordance de ces résultats et la fiabilité de la méthode par spectroscopie de fluorescence, un second suivi par HPLC a été réalisé dans les mêmes conditions expérimentales afin de déterminer le taux de conversion après 60 min de réaction pour les diènes **59** et **61-67** et après 10 min pour le cyclopentadiène **60** (Tableau 7).

Diène	**59**	**60**	**61**	**62**	**63**	**64**	**65**	**66**	**67**	**68**
Conversion (%)	1	>99	39	4	13	<1	<1	17	11	*Ind.*
Temps (min)	60	10	60	60	60	60	60	60	60	

*Tableau 7. Conversions HPLC ($\lambda_{abs.}$ = 330 nm) des diènes **59-67** après 10 et 60 min. Ind. = indéterminée.*

Les taux de conversion ont été déterminés grâce à la détection spécifique des noyaux dansyl de la sonde **79** et des cycloadduits formés en réglant la longueur d'onde de détection à 330 nm. Cette longueur d'onde correspond effectivement à la seule contribution du fluorophore sur l'absorbance totale des cycloadduits, quelle que soit leur structure.

Conformément aux premières observations du suivi par émission de fluorescence, le cyclopentadiène **60** permet la conversion totale de la sonde **79** en 10 min dans ces conditions. De manières également cohérentes, les oxazoles **66** et **67** ont permis d'atteindre des conversions respectives de 17 et 11% après 60 min, suivis par le cyclohexadiène **62** et le diène linéaire **59** avec chacun des valeurs de conversions de 4 et 1%. Comme observé, les furanes ont démontré de très faibles réactivités (conversion < 1%) après une heure de mise en

réaction. En revanche, le fulvène **61** est apparu comme étant le second réactif le plus rapide, avec 39% de conversion en 60 min. L'anthracène **63** quant à lui semble posséder une réactivité tout à fait similaire à la famille des oxazoles en permettant d'atteindre 13% de conversion après une heure. Surpris par ces deux derniers résultats discordants, il a été supposé que l'absorbance du rayonnement incident par le fulvène et l'anthracène utilisés en excès (5 éq.) pouvait être à l'origine de l'absence d'émission de la sonde, bien qu'activée suite à la cycloaddition. Cette hypothèse a pu être vérifiée en vérifiant d'abord la gamme d'absorbances de l'anthracèn-9-ylméthanol. La gamme d'absorption de ce type de dérivé est bien connue dans la bibliographie et peut s'étaler de 300 à 400 nm dans un milieu organique/aqueux,[240] et peut donc potentiellement interférer avec le rayonnement d'excitation à 330 nm lors du suivi, d'autant plus que l'anthracèn-9-ylméthanol est utilisé en excès et qu'il possède un coefficient d'extinction molaire de l'ordre de 10 000 $M^{-1}.cm^{-1}$ à 350 nm. Par ailleurs, le spectre d'absorption du fulvène **61** a également été mesuré dans les mêmes conditions expérimentales de solvants et de température que les CDA comparatives. Une bande large d'absorption, centrée sur 358 nm, a pu être observée (Figure 43). Étant donné que la valeur d'absorbance à cette longueur d'onde est d'environ 0,05 u.a. pour une concentration de 40 µM en fulvène, il parait alors évident que pour une concentration 125 fois plus élevée (5 mM) la valeur d'absorbance sera très supérieure à 1. Ceci explique encore une fois parfaitement l'absorption quasi-totale du rayonnement d'excitation à 330 nm et donc l'absence d'émission de fluorescence.

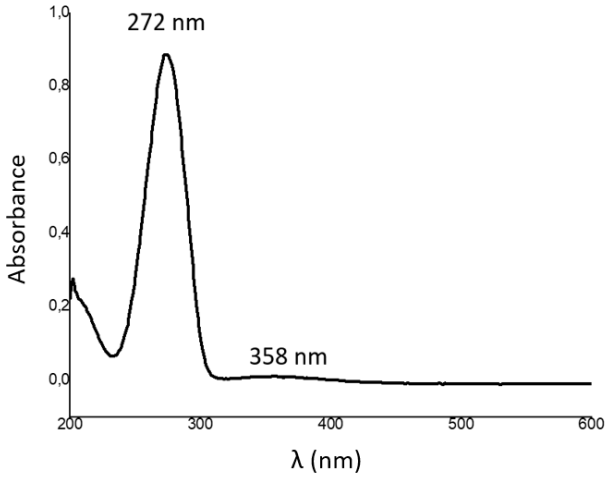


*Figure 43. Spectre d'absorption du fulvène **61** (40 µM) dans un mélange MeCN/PBS pH 7,4 (1:2, v/v).*

[240] Atta, S.; Ikbal, M.; Boda, N.; Gauri, S. S.; Singh, N. D. P. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, *12*, 393–403.

Parallèlement à ces résultats, l'influence du milieu aqueux sur la cinétique chimique de la CDA avec les maléimides a été étudiée de manière qualitative. Ainsi, le plus rapide des dienes, le cyclopentadiène **60** (5 mM), a été mis en réaction avec la sonde **79** (1 mM) dans deux systèmes de solvants différents : 1) MeCN/PBS pH 7,4 (1:2, v/v) et 2) MeCN. Les courbes d'exaltation de fluorescence suivantes ont été obtenues par un suivi spectroscopique des réactions (Figure 44). Comme précédemment, une conversion totale du maléimide **79** est observée après seulement 10 min dans le mélange MeCN/PBS pH 7,4 (1:2, v/v) alors que dans le milieu purement organique (MeCN), la réaction est nettement ralentie et une conversion totale n'est toujours pas atteinte après 45 minutes.

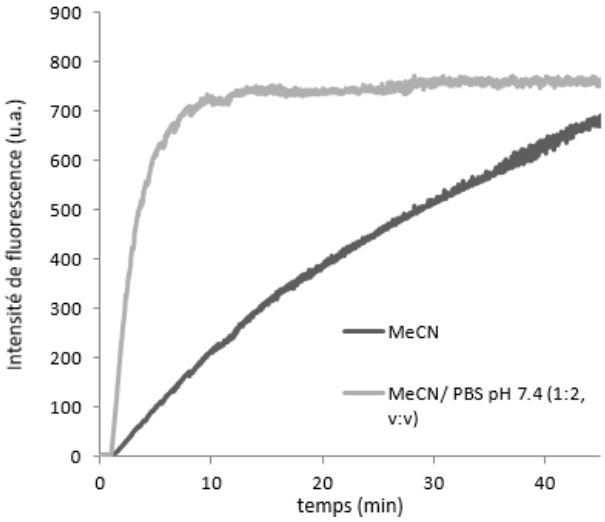


*Figure 44. Étude de l'influence du solvant sur la cinétique de la CDA entre le diène **60** (5 mM) et la sonde **79** (1 mM).*

Ces observations sont donc en accords avec la théorie des accélérations cinétique de la CDA en milieux aqueux décrite dans la partie introductive de ce chapitre.

3.2.2. Étude comparative quantitative des cinétiques réactionnelles

L'étude précédente a permis de réaliser un classement de réactivité des différents dienes étudiés. Néanmoins, afin d'apprécier la vitesse d'une réaction de ligation, que ce soit pour de la construction (bio)moléculaire ou dans le cadre d'études par KTGS, il est nécessaire d'en déterminer sa constante cinétique. La mesure de ces constantes respectives pour ces différents réactifs a donc été entreprise.

3.2.2.1. Rappels théoriques de cinétique chimique simple[241]

Si elle n'est pas catalysée, la réaction de Diels-Alder répond aux lois cinétiques des réactions d'ordre deux suivant le modèle réactionnel générique A + B → C. L'expression mathématique de la cinétique pour ce type de réaction est présentée ci-dessous (Équations 1, **[1]**). Cette relation de base peut être développée et intégrée selon les équations **[2]** et **[2]'**. Finalement, l'équation **[3]** permet d'établir la corrélation entre la constante cinétique de la réaction k_r (= k_2) et les concentrations en réactifs A et B initiales ($[A]_0$ et $[B]_0$) et à chaque instant dans le milieu ([A] et [B]). Cependant, cette relation **[3]** est relativement complexe à manipuler et implique de pouvoir connaître précisément la concentration des deux réactifs à chaque instant.

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_r[A][B] \qquad \textbf{[1]}$$

$$\int_0^x \frac{dx}{([A]_0 - x)([B]_0 - x)} = k_r \int_0^t dt \qquad \textbf{[2]}$$

$$\frac{1}{[B]_0 - [A]_0}\left\{\ln\left(\frac{[A]_0}{[A]_0 - x}\right) - \ln\left(\frac{[B]_0}{[B]_0 - x}\right)\right\} = k_r \int_0^t dt \qquad \textbf{[2]'}$$

$$\ln\left(\frac{[B]/[B]_0}{[A]/[A]_0}\right) = ([B]_0 - [A]_0)k_r t \qquad \textbf{[3]}$$

*Équations 1. **[1]** Relation cinétique d'ordre deux classique. **[2]** et **[2]'** Développement et intégrations de la première relation. **[3]** Relation finale entre les concentrations en réactifs et la constante de vitesse. x = $[A]_t$ et $[B]_t$*

Un autre modèle de réaction peut être employé afin de simplifier le problème. Dans le cas où un réactif peut réagir sur lui-même, comme par exemple le cyclopentadiène en homo-CDA, le modèle générique de la réaction devient alors 2A → C. Ce cas de figure est également valable lorsque que les réactifs A et B sont introduit en quantité stœchiométrique lors de la réaction. Le modèle mathématique de ce cas particulier est présenté ci-dessous (Équations 2, **[4]**). L'intégration de l'équation **[4]** de base *via* la relation **[5]** permet d'aboutir finalement à la formule **[6]** qui est bien plus simple que dans le modèle exposé précédemment. Cette dernière permet ainsi de calculer la constante k_r (= k_2) de la réaction en mesurant la concentration d'un des réactifs dans le temps.[213(a)]

[241] Atkins, P.; de Paula, J.; Friedman, R. *Quanta, Matter, and Change: A molecular approach to physical chemistry.* W. H. Freeman and Company, New York, 2009. Chap. 19, pp. 630–632.

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_r[A]^2 \qquad \textbf{[4]}$$

$$-\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]^2} = k_r \int_0^t dt \qquad \textbf{[5]}$$

$$\frac{1}{[A]} - \frac{1}{[A]_0} = k_r t \qquad \textbf{[6]}$$

Équations 2. ***[4]*** *Relation d'ordre deux à homo-réactifs ou avec* $[A]_0 = [B]_0$. ***[5]*** *Intégration de la loi cinétique.* ***[6]*** *Relation finale entre la constante cinétique et la concentration en réactif.*

D'après l'équation **[6]**, la constante d'ordre deux ($k_2 = k_r$) est donc égale à la valeur de la pente obtenue par régression linéaire de la relation 1/[A] = f(t) et d'ordonnée à l'origine $1/[A]_0$ (Figure 45).

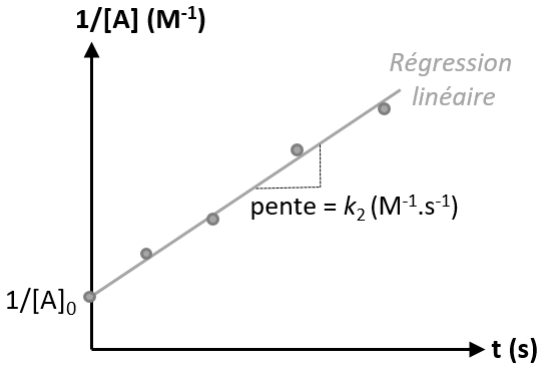


Figure 45. Méthode de calcul graphique de la constante k_2.

Une autre méthode de mesure par dégénérescence de l'ordre peut être employée et consiste à placer un des réactifs en excès par rapport à l'autre, avec par exemple $[B]_0 >> [A]_0$.[242] De cette manière, la variation de la concentration en réactif B devient alors négligeable dans le temps ($[B]_t \approx [B]_0$), ce qui fait passer la cinétique de réaction à un pseudo-ordre un. La loi de vitesse de base ne dépend alors plus que du temps et de [A] (Équations 3, **[7]**). L'intégration de cette loi conduit à l'équation **[8]**, qui elle-même réarrangée conduit à la formule **[9]**, qui est relativement simple.

[242] Eising, S.; Lelivelt, F.; Bonger, K. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 12243–12247.

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_r[A] \qquad \textbf{[7]}$$

$$\ln\left(\frac{[A]}{[A]_0}\right) = -k_r t \qquad \textbf{[8]}$$

$$[A] = [A]_0 e^{-k_r t} \qquad \textbf{[9]}$$

*Équations 3. **[7]** Relation d'ordre un ou de pseudo-ordre un avec $[A]_0 << [B]_0$. **[9]** et **[8]** Résultat et réarrangement de l'intégration de la relation initiale.*

Ainsi, selon l'équation **[9]**, la régression exponentielle de la courbe expérimentale [A] = f(t) permet de trouver la valeur de k_r en s^{-1}. Cependant, en raison de l'approximation initiale $[B] \approx [B]_0 \; \forall$ t par la dégénérescence de l'ordre, la constante cinétique observée ($k_{obs} = k_r \neq k_2$ dans ce cas) varie en fonction de la concentration de départ en B. Il est donc nécessaire de réaliser plusieurs mesures de k_{obs} en fonction de différentes valeurs de $[B]_0$ afin de pondérer correctement cette variable (Figure 46, **A**). Ainsi, la régression linéaire de la relation k_{obs} = f($[B]_0$) fournit une pente dont la valeur est égale à celle de k_2, la constante cinétique d'ordre deux de la réaction étudiée (Figure 46, **B**).

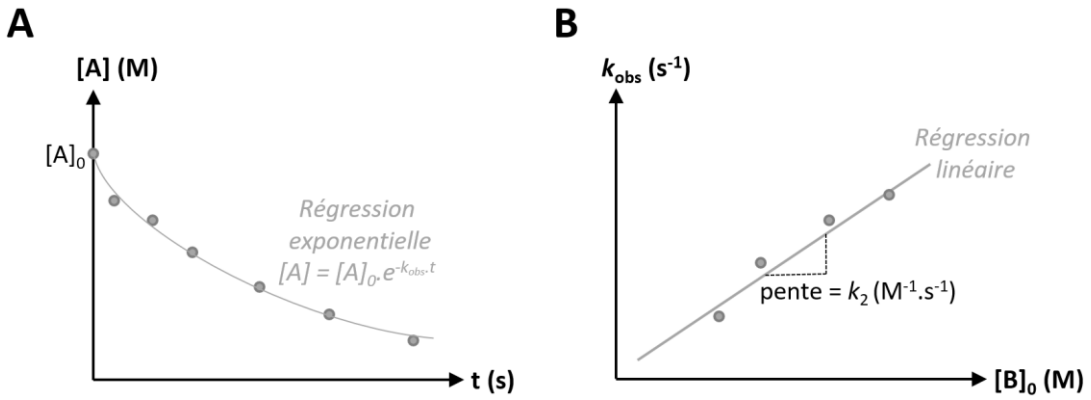


*Figure 46. (**A**) Courbe expérimentale et régression exponentielle de la relation [A]=f(t) donnant k_{obs}. (**B**) Calcul de la constante k_2 par régression linéaire de la relation k_{obs}=f($[B]_0$).*

3.2.2.2. Mesures des constantes cinétiques k_2

Dans l'optique de réaliser les calibrations internes nécessaires afin de pouvoir calculer les concentrations des réactifs et/ou des produits à tout moment de la réaction, les différents cycloadduits suivants ont été préparés afin de servir de référence d'étalonnage (Schéma 83).

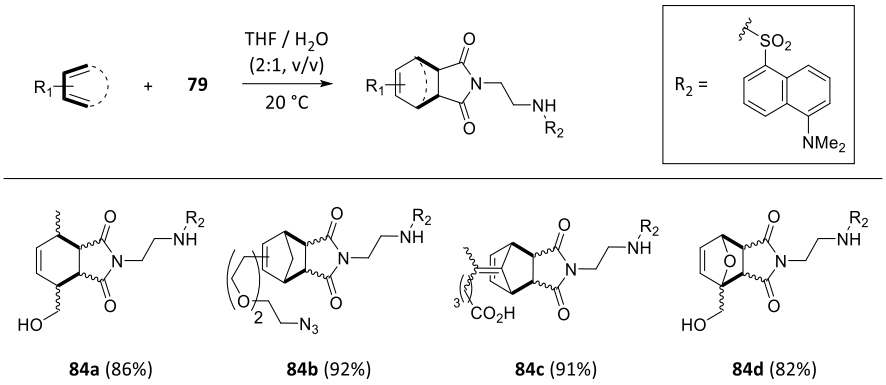


Schéma 83. Synthèses de cycloadduits de références pour l'étude cinétique.

Le choix d'employer la sonde **79** a effectivement été guidé par ses propriétés spectroscopiques d'absorption et d'émission de fluorescence (Figure 47). En effet, le motif dansyl possède une bande d'absorption à 330 nm, ce qui n'est pas le cas des diènes, dièneophiles et cycloadduits correspondants en ignorant la partie dansyl. Ainsi, il n'y aura donc pas de contribution de leur part pour cette longueur d'onde d'absorption qui sera donc spécifique du noyau dansyl de la sonde **79** et des cycloadduits **84a-d**. Le suivi des CDA grâce à l'absorbance pour λ = 330 nm sera donc précise et permettra d'éliminer les potentielles erreurs dues à des valeurs de coefficients d'extinction molaire (ε, $M^{-1}.cm^{-1}$) trop différents.

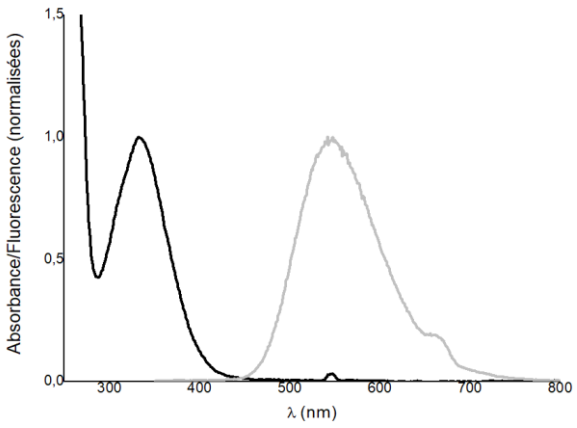


*Figure 47. Spectres normalisés d'absorption (noir) et d'émission (gris, λ_{ex} = 330nm) du cycloadduit **84b** dans un mélange MeCN/PBS pH 7,4 (1:2, v/v) à T = 20 °C.*

Concernant la réaction de Kondrat'eva, les oxazoles réagissent dans un premier temps avec les maléimides selon un mécanisme classique de cycloaddition [4+2] pour conduire à des intermédiaires oxabicycles (Schéma 84).[175] La réaction réalisée à pH ≤ 5,3 permet la formation du cycle aromatique 7-hydroxy-aza-phtalamide *via* l'élimination d'éthanol. L'intermédiaire oxabicycle peut cependant être obtenu à pH neutre, la deuxième étape d'aromatisation étant favorisée par un pH acide, ou pour des temps réactionnels élevés. Compte tenu que les

réactions ont toutes été réalisées à pH neutre et dans un temps réactionnel relativement court (≤ 6 heures pour les réactions de Kondrat'eva), le calcul de la constante k_2 a été déterminée à pH neutre et n'a bien entendu concerné que la première étape de cycloaddition. Toutefois, la synthèse et la purification de l'intermédiaire de référence n'étant pas envisageables, l'emploi d'une méthode de calibration externe en fonction de la sonde **79** a donc dû être entrepris et sera décrit plus loin.

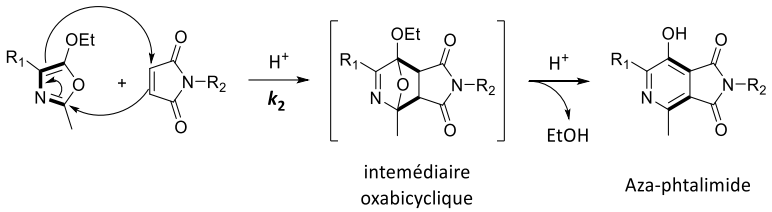


Schéma 84. Réaction de Kondrat'eva entre les 5-éthoxyoxazoles et les maléimides en milieu acide.

A la vue de sa forte réactivité, la mesure de la constante k_2 pour le cyclopentadiène **60** a été effectuée grâce à un suivi réactionnel par spectroscopie de fluorescence, ce qui permet une fréquence d'acquisition rapide et directe. Pour les diènes **59**, **61**, **64**, **66** et **67**, leurs réactivités plus modérées ont permis un suivi par HPLC.

A – Calibration interne et mesure du k_2 par spectroscopie de fluorescence

Une calibration interne de l'émission de fluorescence en fonction de la concentration du cycloadduit **84b** dans le milieu a été effectuée (Figure 48, **A** et **B**).

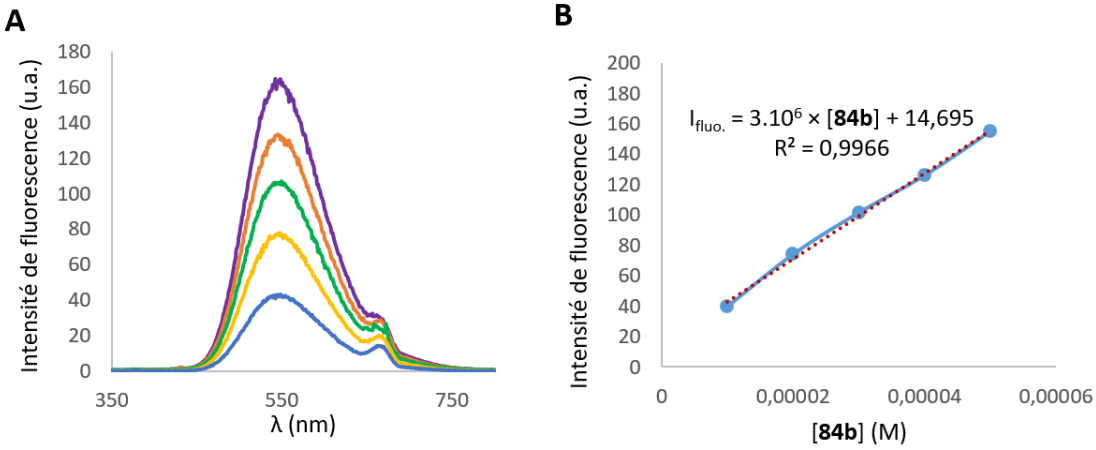


*Figure 48. (**A**) Spectres d'émissions (λ_{em} = 560 nm, λ_{ex} = 330 nm) et (**B**) la courbe de calibration des intensités de fluorescence en fonction des différentes valeurs de la concentration [**84b**] (10 à 50 µM) pour λ_{em} = 560 nm.*

La mesure de la constante k_2 a été réalisée suivant le modèle des réactions de pseudo-ordre un en suivant la formation du cycloadduit **84b** au cours du temps. Pour cela, la sonde **79**

(50 µM) a été mise en réaction avec le diène **60** en excès à différentes concentrations initiales (500 à 1000 µM) (Schéma 85, **A**).

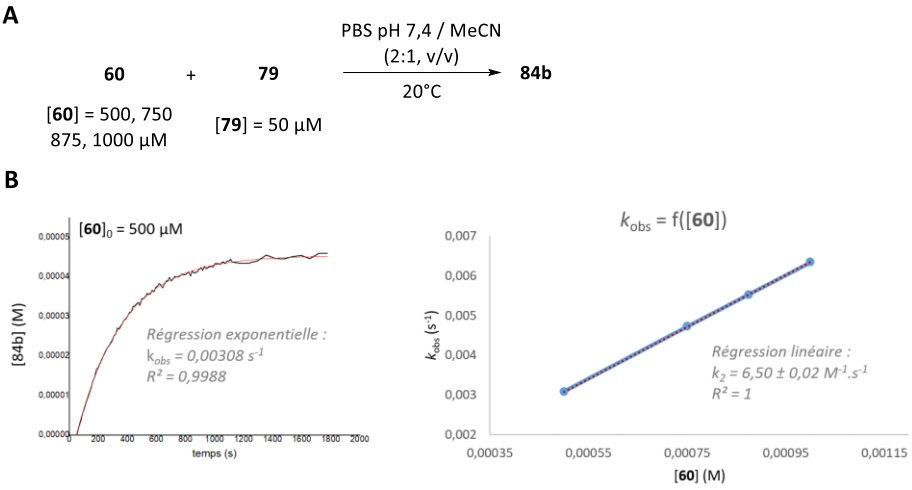


*Schéma 85. (A) CDA entre le cyclopentadiène **60** et le maléimide **79**. (B) Exemple de suivi cinétique de la concentration [**84b**] pour [**60**]$_0$ = 500 µM et calcul de k_2 par régression linéaire de la relation k_{obs}=f([**60**]$_0$).*

Le suivi de l'évolution de la concentration [**84b**] au cours du temps a été réalisé pour chaque concentration du diène **60** et la régression exponentielle de chacune des courbes expérimentales obtenues a fourni les valeurs de k_{obs} correspondantes (Schéma 85, **B**). Comme décrit précédemment dans les rappels théoriques, la régression linéaire de la relation k_{obs}=f([**60**]$_0$) a permis d'obtenir une valeur de k_2 = 6,50 ± 0,02 $M^{-1}.s^{-1}$, ce qui est en accord avec d'autres mesures rencontrées dans la littérature.[213(a)]

B – Calibrations interne et externe puis mesures des k_2 par HPLC

Le suivi cinétique d'une réaction par fluorescence nécessite de se placer dans des gammes de concentrations peu élevées, notamment afin d'éviter des effets de filtre en excitation et en émission. Ces phénomènes sont principalement dus à une absorbance trop élevée du milieu réactionnel, qui est elle-même corrélée aux concentrations des réactifs. Les diènes **59**, **61**, **64**, **66** et **67** ayant présentés des réactivités bien plus modérées que le cyclopentadiène **60**, le temps d'acquisition des suivis cinétiques à faibles concentrations (10 à 50 µM) par fluorescence auraient donc été très longs afin d'obtenir des taux de conversions significatifs. Afin de réaliser les mesures dans un temps raisonnable, il a été décidé de réaliser les mesures cinétiques par des suivis HPLC *via* la méthode de mesure du k_2 en utilisant des quantités stœchiométriques de réactifs à des concentrations initiales bien plus élevées (5 à 10 mM).

Pour la calibration interne des diènes **59**, **61** et **64**, des gammes de dilutions ($MeCN/H_2O$, 1:2, v/v) comprenant des ratios de concentration connus en sonde **79** et en cycloadduit **84a**, **84c** ou **84d** ont été préparées. Leurs analyses par HPLC a permis d'établir des relations linéaires entre les ratios expérimentaux obtenus en intégrant la surface des pics HPLC (**Aire**) et les ratios réels des concentrations en sonde et en cycloadduits (Tableau 8). L'équation de la régression linéaire et les valeurs des paramètres a et b associés ont pu être employés dans les formules de calculs des concentrations à chaque instant (Tableau 8, Formulaire).

Régression linéaire
$Aire_{79}/Aire_{84}$ = a × ([79]/[coum.]) + b

Diène	a	b	R^2
59	1,1601	-0,0005	1
61	1,5615	-0,0443	0,9999
64	1,2979	-0,0083	0,9996

Formulaire

- $[\mathbf{84}] = \dfrac{[\mathbf{79}]_0}{\left(\dfrac{(Aire_{79}/Aire_{84}) - b}{a}\right)}$
- $[\mathbf{79}] = [\mathbf{79}]_0 - [\mathbf{84}]$

*Tableau 8. Données des calibrations internes des diènes **59**, **61** et **64** par HPLC (λ_{abs} = 330 nm) et formules associées pour le calcul des concentrations.*

Pour la calibration externe des diènes oxazoles **66** et **67**, dont les cycloadduits intermédiaires ne peuvent pas être isolés (aromatisation en aza-phtalimide sur gel de silice par exemple), la coumarine (**coum.**) a été choisie comme étalon externe afin de calibrer les concentrations en sonde **79** dans le milieu réactionnel. En effet, les propriétés spectrales de la coumarine sont assez proches de celles du motif dansyl, ce qui permet d'obtenir une très bonne corrélation entre les ratios expérimentaux des aires de pics HPLC ($\lambda_{abs.}$ = 330 nm) et les ratios des concentrations réelles en sonde **79** et en coumarine (Figure 49).

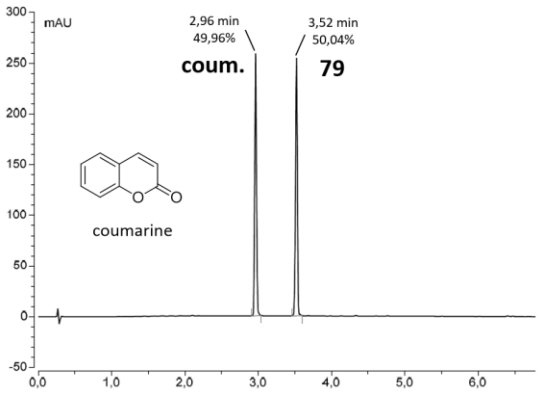


*Figure 49. Analyse HPLC (λ_{abs} =330 nm) d'un mélange équimolaire (500 µM) de coumarine et de sonde **79**.*

Comme précédemment, des gammes de dilutions (MeCN/H_2O, 1:2, v/v) comprenant des ratios de concentrations connues en sonde **79** et en coumarine ont été préparées. Leurs analyses par HPLC a permis d'établir à nouveau une relation linéaire entre les ratios expérimentaux des aires des pics HPLC (**Aire**) et ceux des concentrations sonde/coumarine (Tableau 9). Les paramètres de la droite de régression linéaire a et b ont pu être employés dans la formule de calcul de concentration en sonde à chaque instant (Tableau 9, Formulaire).

Régression linéaire
$Aire_{79}/Aire_{coum.} = a \times ([79]/[coum.]) + b$

a	b	R^2
0,9415	-0,0005	0,9999

Formulaire

- $[79] = \dfrac{[coum.]}{\left(\dfrac{(Aire/Aire_{coum.}) - b}{a}\right)}$

*Tableau 9. Données de la calibration externe des diènes **66** et **67** par HPLC (330 nm) et formule de calcul de concentration associée.*

Afin d'illustrer l'allure des résultats obtenus par suivi HPLC, la courbe expérimentale de suivi réactionnel pour le fulvène **61** ($[61]_0 = [79]_0 = 5$ mM) par calibration interne et la droite de régression linéaire, permettant d'obtenir la valeur de k_2, sont présentées ci-dessous (Figure 50).

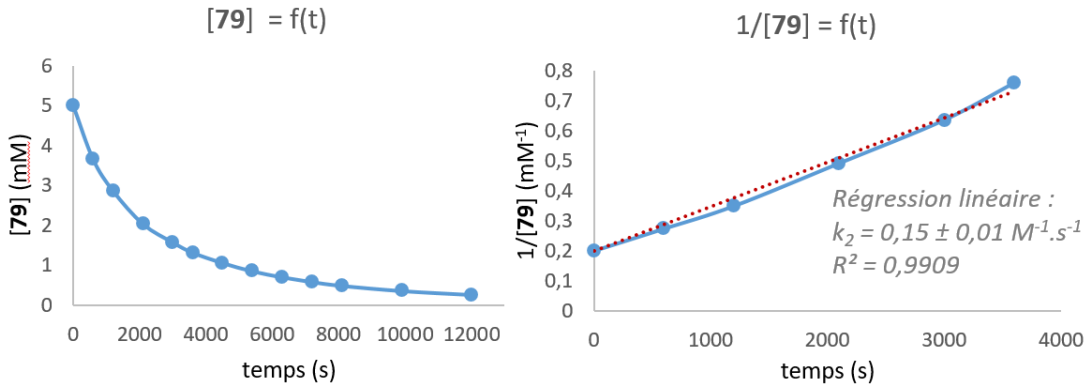


*Figure 50. Courbe expérimentale de disparition de la sonde **79** en présence du fulvène **61** et calcul de k_2 par régression linéaire.*

C – Bilan des cinétiques réactionnelles des CDA

Les valeurs des constantes cinétiques k_2 mesurées lors de cette étude ont été compilées ci-dessous (Tableau 10). Les valeurs de k_2 n'ayant pas été mesurées pour les diènes **62** (faible quantité disponible), **63**, **65** et **68**, une approximation de ces valeurs a pu être établie en raison des bonnes corrélations et proportionnalités de réactivités observées lors des

études qualitatives (déclenchement de fluorescence) et quantitatives (taux de conversions et valeurs de k_2).

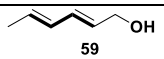
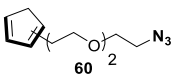
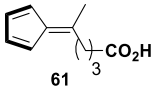
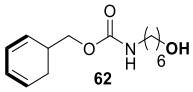
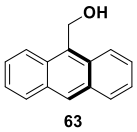
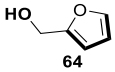
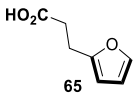
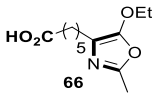
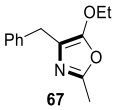
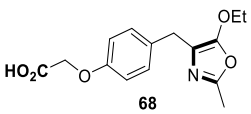
Diène	k_2 ($M^{-1}.s^{-1}$)	*Ordre de grandeur estimé de* k_2 ($M^{-1}.s^{-1}$)
 **59**	$(8,9 \pm 0,7) \times 10^{-4}$	/
 **60**	6,50 ± 0,02	/
 **61**	0,15 ± 0,01	/
 **62**	/	$\approx 10^{-3}$
 **63**	/	5×10^{-3} - 10^{-2}
 **64**	$(8,9 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	/
 **65**	/	$\approx 5 \times 10^{-4}$
 **66**	$(1,2 \pm 0,4) \times 10^{-2}$	/
 **67**	$(5,1 \pm 0,3) \times 10^{-3}$	/
 **68**	/	$\approx 10^{-3}$

Tableau 10. Compilation des valeurs de k_2 mesurées et estimées.

La réactivité supérieure des diènes cycliques par rapport aux diènes linéaires est bien connue du fait de la restriction conformationnelle de la forme *cisoïde* induite par le cycle.[243] Effectivement, la conformation planaire des deux doubles-liaisons π conjuguées permet un meilleur recouvrement orbitalaire et donc une réactivité plus importante en raison des énergies d'interactions supérieures.[244] Bien que les orbitales frontières soient le paramètre prépondérant pour la réactivité en CDA, les travaux du Pr. Houk sur l'influence des énergies de distorsion et des répulsions stériques des ponts carbonés formés ont permis une très bonne compréhension des phénomènes influençant la cinétique de CDA.[245] Effectivement, la forme « pyramidale » de l'état de transition en CDA implique une distorsion de l'angle hors du plan du cycle (Figure 51).

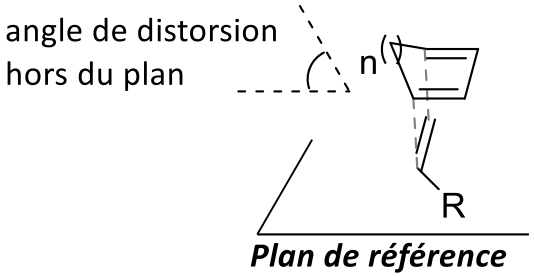


Figure 51. Angle de distorsion hors du plan lors de l'état de transition.

Or, plus la distorsion angulaire finale est faible et plus la barrière d'activation réactionnelle est facile à franchir du fait de la moindre demande énergétique.[246] Cette propriété s'intensifie lorsque la flexibilité du cycle considéré diminue, ce qui se traduit par de plus petites dimensions de cycles (Figure 51, n = 1). A l'inverse, une dimension de cycle plus importante va augmenter la flexibilité de ce dernier et va donc réduire la planéité moléculaire. Ceci va donc limiter le recouvrement orbitalaire du diène et également les interactions HO-BV avec les dièNophiles. L'augmentation du caractère asynchrone de l'état de transition qui en découle diminue donc la réactivité intrinsèque du diène.

De manière additive, la formation de « ponts » carbonés lors de la réaction peut induire des interactions répulsives avec le dièNophile en raison des contraintes stériques (Figure 52). Cet effet est souvent proportionnel à la longueur de la chaîne et donc à la

[243] Martin, J. G.; Hill, R. K. *Chem. Rev.* **1961**, *61*, 537–562.

[244] Craig, D.; Shipman, J. J.; Fowler, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 2885–2891.

[245] Paton, R. S.; Kim, S.; Ross, A. G.; Danishefsky, S. J.; Houk, K. N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10366–10368.

[246] Levandowski, B. J.; Houk, K. N. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 3530–3537.

dimension du cycle contenant initialement le diène conjugué. Ces répulsions ont donc pour effet de ralentir la réaction et d'augmenter la valeur de son énergie d'activation.

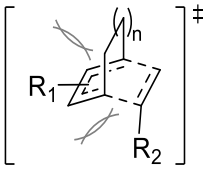


Figure 52. Contraintes stériques provoquées par la dimension de cycle du diène.

Les valeurs des énergies d'activation et de réaction en CDA sont par ailleurs intrinsèquement dépendantes du caractère aromatique d'un diène. Effectivement, la demande énergétique permettant d'aller à l'encontre de l'aromaticité du diène et de promouvoir la réaction peut être plus ou moins importante (furane < thiophène < pyrrole).[247] Dans le cas d'hétérodiènes azotés, la position des atomes d'azotes, va également contribuer à la demande énergétique en influençant l'énergie de distorsion nécessaire pour obtenir l'état de transition (Schéma 86). Cette valeur énergétique est plus basse dans le cas de liaison C-C que de liaison C-N, ce qui favorise l'adoption de la structurale pyramidale de l'état de transition et qui explique la différence de réactivité entre les différents isomères de position.

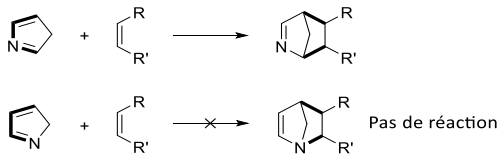


Schéma 86. Effet de la position de l'atome d'azote sur la réactivité d'un hétérodiène.

Ainsi, les études et paramètres cités permettent de confirmer et d'expliquer de manière rationnelle et logique l'échelle relative de réactivité des diènes étudiés, au même titre que les larges différences des valeurs de constantes k_2 mesurées.

Bien que ces différentes réactions de ligations bio-orthogonales et chimiosélectives soient de natures très variées, il est tout de même intéressant de comparer leurs échelles de réactivité grâce aux valeurs de k_2 connues dans la littérature et celles mesurées lors de ces travaux (Figure 53). Ainsi, la CDA avec une majorité des diènes biocompatibles étudiés est cinétiquement comparable à la ligation de Staudinger-Bertozzi. Le fulvène quant à lui présente

[247] Fell, J. S.; Martin, B. N.; Houk, K. N. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 1912–1919.

de bonnes similarités avec une ligation par SPAAC, alors que le cyclopentadiène est pour sa part tout à a fait comparable aux ligations de type CuAAC ou iEDDA.

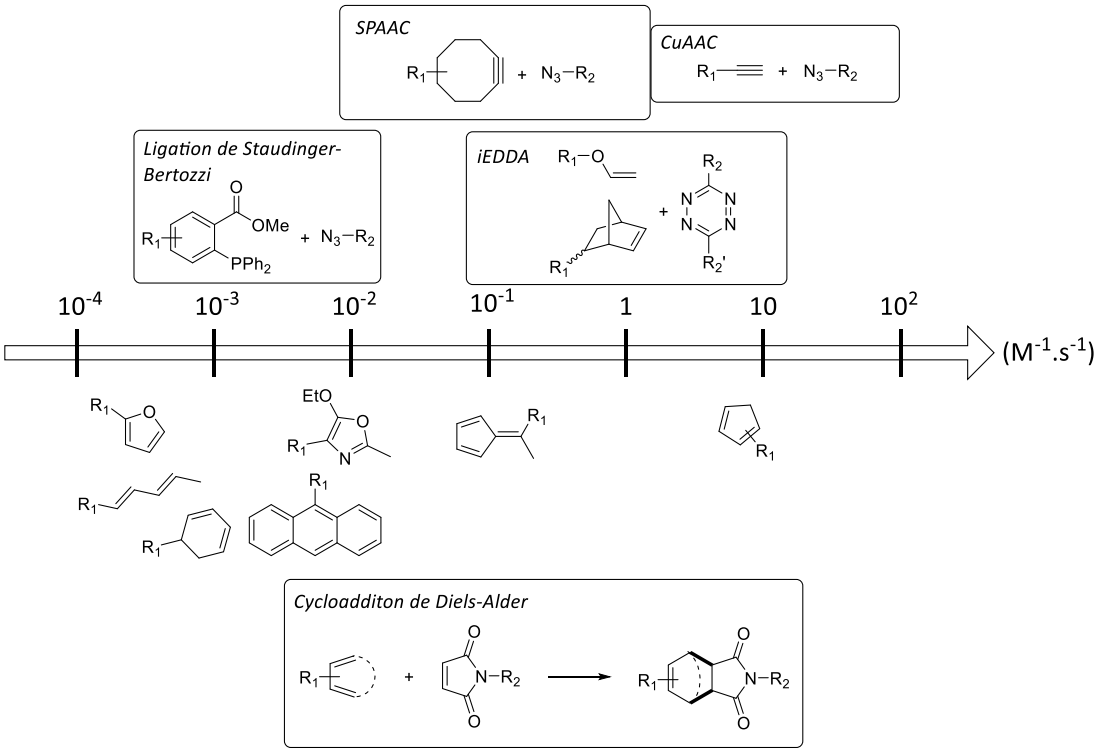


Figure 53. Échelle comparative des réactivités pour différentes réactions de LB/C et des diènes en CDA.

En conclusion, la planéité, l'anti-aromaticité et les faibles angles de distorsion transitoire du cyclopentadiène en font un réactif particulièrement intéressant pour des ligations chimiosélectives rapides, malgré sa stabilité relativement faible et les contraintes de synthèses associées. Le fulvène, quant à lui, présente une moins forte réactivité mais demeure stable à température ambiante et est très simple à synthétiser. Avec des valeurs de $k_2 >> 10^{-2}$ $M^{-1}.s^{-1}$, ces deux composés sont donc à priori inéligibles comme partenaires en KTGS. Ceci n'est en revanche pas le cas des autres dièenes étudiés, même si les 5-éthoxyoxaoles sont cinétiquement tangents.

Afin de compléter ces premiers résultats, une étude plus approfondie de la structure des cycloadduits a donc été entreprise afin d'évaluer le nombre de stéréoisomères formés lors des CDA avec ces différents dièenes en milieux aqueux et dans le but d'étudier leur stabilité en conditions physiologiques (rétro-CDA et hydrolyse). En effet, ces données sont relativement peu décrites dans la littérature, mais il est néanmoins critique d'en avoir connaissance selon

le type de ligation chimiosélective à réaliser, ou avant de pouvoir conclure quant à l'employabilité de ces réactions de CDA en KTGS.

3.3. Études stéréochimiques et de stabilité des cycloadduits

3.3.1. Synthèse et évaluation stéréochimique

La formation incontrôlée de centres stéréogènes lors de la cycloaddition, combinée à ceux présents initialement sur les biomolécules de part et d'autre des partenaires de ligation, peut mener à des mélanges plus ou moins complexes de stéréoisomères. Ce phénomène est d'autant plus marqué que les biomolécules utilisées sont de petites tailles et donc de faibles poids moléculaires (peptides, oligonucléotides…). Ainsi, le suivi réactionnel, la purification et la caractérisation des composés peuvent en être sérieusement complexifiées.[200,207,218]

Effectivement, le groupe du Pr. Madder a décrit en 2013 la modification de peptides fonctionnalisés par des motifs furanes dans le but de compléter les outils chimiques disponibles en LB/C.[218] Ainsi, des CDA ont été menées dans le toluène avec le *N*-phénylmaléimide (20 éq.) et le peptide **Pep.-1**, greffé sur support solide (Figure 54). Après dégreffage de la phase solide, les cycloadduits peptidiques bruts ont été analysés par HPLC. Comparativement au chromatogramme de référence du **Pep.-1**, il a en effet été observé la formation de plusieurs isomères après 48 heures de réaction à température ambiante, ainsi que la présence de réactifs non consommé. Afin d'obtenir une conversion totale du peptide, l'équipe du Pr. Madder a réalisé cette même réaction à 70 °C. Dans ces conditions, du réactif (maléimide) est toujours présent et une nouvelle distribution du mélange de diastéréoisomères a également été observée, ce qui a été attribué à une réversibilité de la réaction de CDA.

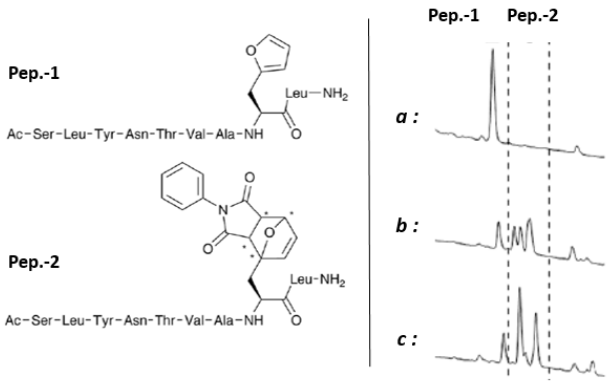


*Figure 54. Ligation du N-phénylmaléimide avec le **Pep.-1** par CDA et étude stéréochimique par HPLC (Figures extraites et modifiées de l'article[218]). a : Référence analytique du furane **Pep.-1**. b : Analyse du brut réactionnel (20 éq. N-phénylmaléimide, toluène, ta, 48 h). c : Analyse du brut réactionnel (20 éq. N-phénylmaléimide, toluène, 70 °C, 24 h).*

La stéréochimie des cycloadduits peut avoir en plus de réelles conséquences sur leurs propriétés biologiques et/ou physicochimiques qui peuvent totalement diverger.[211] De plus, la formation non-désirée d'isomères inactifs en parallèle du produit ciblé va diminuer le « rendement utile » de la réaction, ce qui peut avoir un réel impact économique si les composés possèdent une haute valeur ajoutée. Les paramètres stéréochimiques de la CDA en fonction des diènes employés comme partenaires avec les maléimides peuvent donc être des données importantes suivant les applications et domaines visés.

Une évaluation du nombre d'isomères formés en conditions aqueuses lors du processus de CDA avec chacun des diènes étudiés a été entreprise en conditions douces. Pour cela, les cycloadduits **85** – **91** ont été synthétisés à l'aide du maléimide chiral **82** et des diènes **59**-**64** et **66** à température ambiante (Schéma 87). En raison de la concentration plus élevée des milieux réactionnels pour la synthèse (0,14 – 0,25 M), le système de solvant initialement employé pour les études cinétiques a été remplacé par un mélange plus solubilisant composé de THF et d'eau (2:1, v/v). La préparation de l'aza-phtalimide **91** a été réalisée en présence de TFA (1 éq.). L'aza-phtalimide correspondant a été obtenu avec un rendement isolé de seulement 48%, ce qui est relativement faible malgré la totale conversion des réactifs observée par RMN. En effet, les étapes de purification par chromatographie en phase inverse puis de lyophilisation conduisent très souvent à des pertes de produit, ce qui pourrait facilement expliquer le relativement faible rendement obtenu dans le cas du composé **91**.

En ce qui concerne les analyses stéréochimiques des cycloadduits par HPLC et RMN ^{1}H, la présence d'au moins deux isomères a pu être identifiée dans tous les cas, sauf bien-entendu

pour le composé **91**, dont les centres stéréogènes sont supprimés lors de l'étape d'aromatisation. De manière générale, la complexité des spectres RMN obtenus pour les cycloadduits **85**-**90** n'a pas permis d'établir la configuration relative des isomères observés. Cependant, les conditions expérimentales (milieux aqueux, température ambiante…) et la nature du diènophile laissent supposer que la proportion d'isomères *endo* est prépondérante dans tous les cas. Il est par ailleurs intéressant de constater que le cycloadduit **86** est de loin l'exemple qui présente plus d'isomères, dont au moins cinq d'entre eux ont pu être observés. Le mélange de deux régioisomères du cyclopentadiène **60** de départ (1:1) et sa constante cinétique élevée, ne laissant pas de temps au système pour adopter un arrangement spatial plus favorable, sont deux facteurs permettant d'expliquer la formation de nombreux isomères lors de la CDA. En comparaison, le fulvène **61** réagit environ 43 fois moins vite que le diène **60** et ne possède pas de centre stéréogène ni d'isomérie particulière, ce qui permet de limiter le nombre de cycloadduits obtenus.

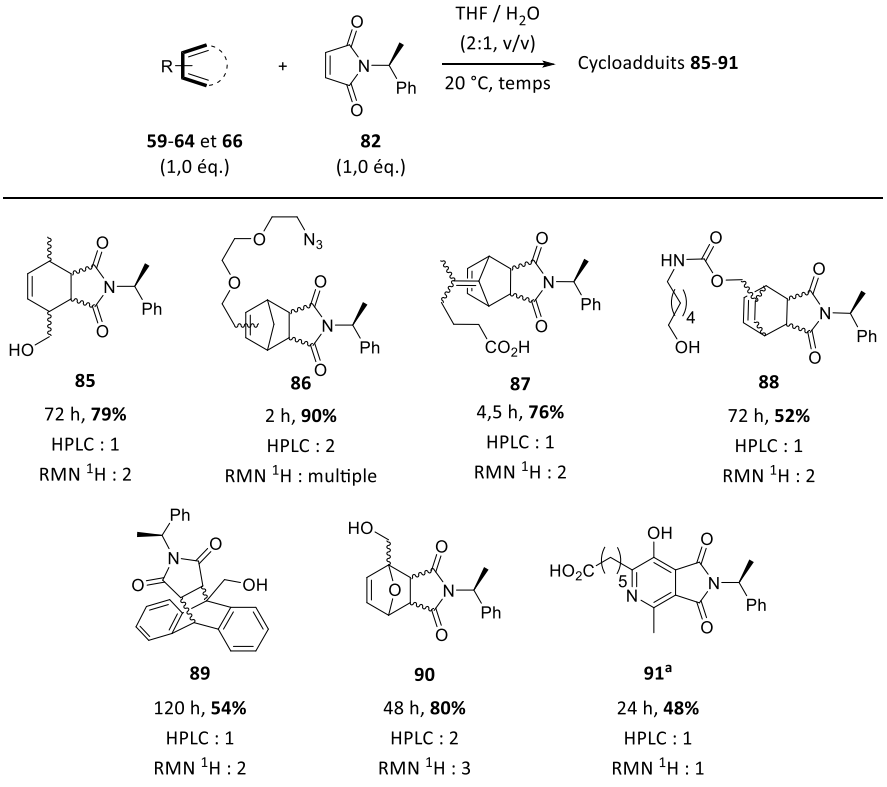


*Schéma 87. Synthèse des cycloadduits **85**-**91** et dénombrement des isomères par analyses HPLC et RMN ^{1}H ([a] : ajout d'un équivalent de TFA dans le milieu).*

La famille des aza-phtalimides représente donc ici le seul exemple de cycloadduits permettant à la fois d'éviter la formation de composés stéréochimiquement hétérogènes et possédant des propriétés de fluorescence. Effectivement, les études photophysiques de ces

motifs ont permis d'établir que les azaphtalimides formés étaient fluorescents, leurs valeurs d'absorbance et d'émission se trouvaient dans le domaine du visible avec des rendements quantiques compris entre 8 et 18% dans le PBS pH 7,4 (Figure 55, **A**).[175,176] Il a pu d'ailleurs être établit grâce à une étude de l'intensité de fluorescence en fonction du pH que l'espèce fluorescente était la forme phénolate. En effet, la valeur du p*K*a du couple phénol/phénolate a été déterminée aux alentours de 6,0, ce qui permet d'expliquer les meilleures performances des propriétés de fluorescence des aza-phtalimide dans les milieux aqueux et neutres. A titre d'exemple, les spectres d'absorbance et d'émission de l'aza-phtalimide **91** ont été réalisés dans le PBS pH 7,4 et sont présentés ci-dessous (Figure 55, **B**)

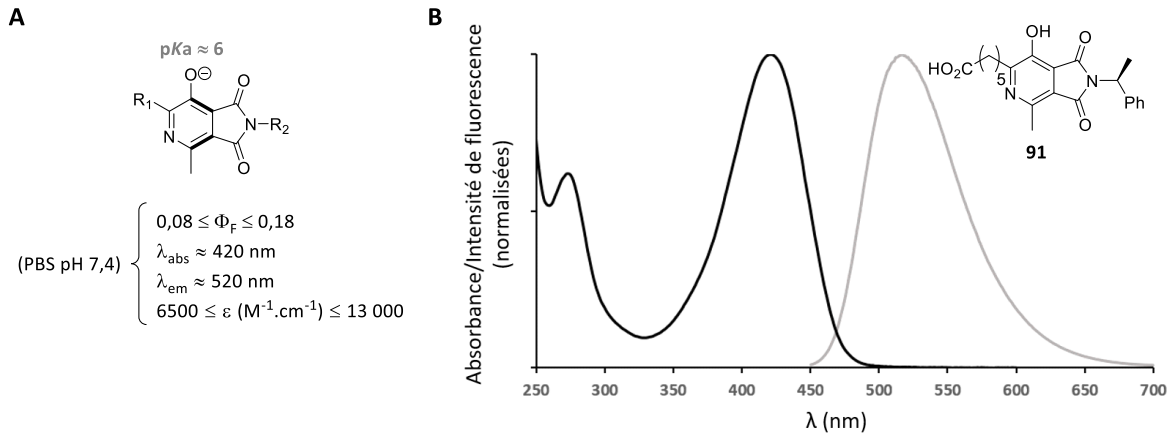


*Figure 55. (A) Propriétés spectroscopiques de fluorescence des aza-pthalimides. (B) Spectres normalisés d'absorption (noir) et d'émission (gris, λ_{ex} = 422 nm) du cycloadduit **91** dans le PBS pH 7,4 à T = 25 °C.*

Comme décrit dans le tableau 6, ces propriétés spectrales ont été employées par notre équipe lors d'études ultérieures dans diverses applications, comme la détection d'activité enzymatique par sonde FRET, le marquage de peptides par émission de fluorescence ou encore la préparation de la sonde pro-fluorescente **56** (Schéma 88).[175,176,198]

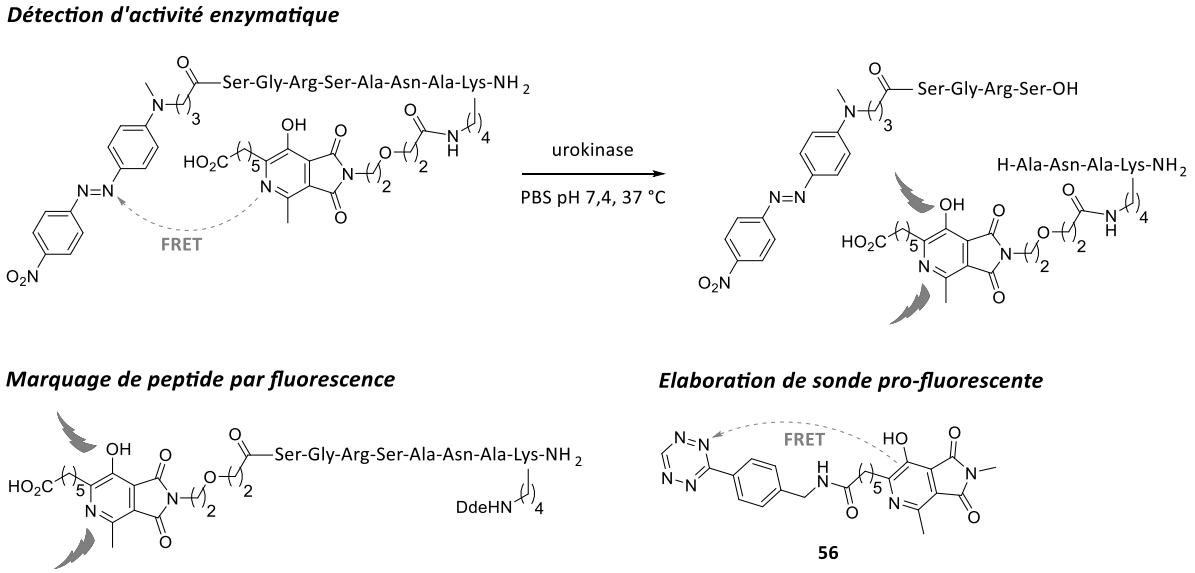


Schéma 88. Applications des propriétés spectrales des aza-phtalimides.

3.3.2. Étude de la stabilité des cycloadduits

La stabilité du lien cycloadduit est un paramètre également important dans le choix du diène à employer selon l'application visée, car lui seul permet d'établir la connexion entre les deux unités. Une étude de stabilité en conditions physiologiques a donc été effectuée à l'aide des cycloadduits précédemment synthétisés.

3.3.2.1. Réversibilité de la CDA en conditions physiologiques

Dans certains cas, la CDA possède la particularité d'être réversible et de conduire ainsi au diène et dièno phile de départ par une réaction de rétro-Diels-Alder. Cette réversibilité peut ainsi être préjudiciable si elle conduit à une dissociation prématurée des partenaires conjugués par un mécanisme de rétro-CDA. En effet, la rétro-CDA pourrait conduire à une perte définitive de conjugaison entre les deux partenaires en conditions biologiques puisque le maléimide pourrait être piégé par des biothiols présents dans le milieu, rendant la réaction de rétro-CDA *in fine* pseudo-irréversible (Schéma 89). De plus, les constantes cinétiques de la CDA seraient très probablement insuffisantes dans les conditions de dilution employées afin de reformer le cycloadduit initial.

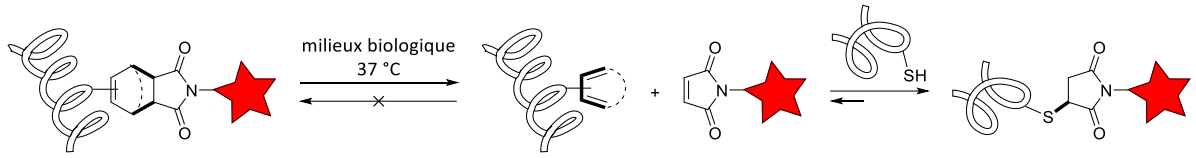


Schéma 89. Perte définitive de la ligation en milieu biologique par rétro-CDA.

Les cycloadduits obtenus à partir de furanes et de maléimides sont connus pour leur réversibilité en conditions physiologiques de pH et de température, ce qui a permis de très nombreuses applications pour la préparation de biomatériaux et/ou d'hydrogels dynamique.[220] Plusieurs études ont permis la rationalisation des facteurs permettant la modulation de la rétro-CDA comme la température[248] ou la nature et la position des substituants sur le diène,[249] ce qui a permis par exemple l'élaboration de systèmes d'échanges dynamiques de partenaires furanes.[250] Les résultats ont mis en relief et de manière convergente le manque d'homogénéité des comportements vis-à-vis de la rétro-CDA suivant la nature de l'isomère. Effectivement, les composés de type *endo* sont énergétiquement plus prompts à se dissocier que les isomères de type *exo*.

Par ailleurs, les conditions particulières de réversibilité pour d'autres cycloadduits de maléimides ont permis de nombreuses applications en science des matériaux. Par exemple, l'anthracène a été employé comme mécanophore pour l'élaboration de nano-architectures et de systèmes d'études de phénomènes interfaciaux.[251] De son côté, le cyclopentadiène a permis la régulation de phénomènes de photochromismes par un contrôle mécanique.[252] Bien-sûr, d'autres conditions chimiquement « dures » permettent également de promouvoir la réaction de rétro-CDA.[253] Cependant, hormis pour le furane, la réversibilité des différents types de cycloadduits en milieux et conditions physiologiques a cependant été très peu étudiée.

---

[248] Froidevaux, V.; Borne, M.; Laborbe, E.; Auvergne, R.; Gandini, A.; Boutevin, B. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 37742–37754.

[249] (a) Boutelle, R. C.; Northrop, B. H. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7994–8002. (b) Koehler, K. C.; Durackova, A.; Kloxin, C. J.; Bowman, C. N. *AIChE J.* **2012**, *58*, 3545–3552. (c) Stevenson, R.; De Bo, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 16768–16771. (d) Discekici, E. H.; St. Amant, A. H.; Nguyen, S. N.; Lee, I.-H.; Hawker, C. J.; Read de Alaniz, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 5009–5013.

[250] Li, F.; Li, X.; Zhang, X. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 7871–7877.

[251] (a) Sung, J.; Robb, M. J.; White, S. R.; Moore, J. S.; Sottos, N. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 5000–5003. (b) Kabb, C. P.; O'Bryan, C. S.; Morley, C. D.; Angelini, T. E.; Sumerlin, B. S. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 7702–7708. (c) Sulkanen, A. R.; Sung, J.; Robb, M. J.; Moore, J. S.; Sottos, N. R.; Liu, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 4080–4085.

[252] Hu, X.; McFadden, M. E.; Barber, R. W.; Robb, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 14073–14077.

[253] (a) Kotha, S.; Banerjee, S. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 7642–7666. (b) Oz, Y.; Sanyal, A. *Chem. Rec.* **2018**, *18*, 570–586.

De par son caractère dynamique, la rétro-CDA peut-être difficile à détecter *in vitro*. Il est néanmoins possible d'employer une méthode détournée de piégeage du maléimide formé grâce à la présence d'un excès de thiol dans le milieu, comme montré précédemment dans le schéma 89. La *N*-acétylcystéine (NAC) étant très représentative des biothiols susceptibles d'être présents dans le milieu a donc été choisie comme agent rapide de capture de maléimide.[254] La réactivité de la NAC vis-à-vis de la sonde **79** a cependant été contrôlée dans les conditions d'étude de la rétro-CDA pour évaluer ses paramètres cinétiques. Pour cela, la sonde **79** (1 mM, 1 éq.) a été mise en solution dans un mélange *i*-PrOH/PBS pH 7,4 (1:1, v/v) et le milieu a été thermostaté à 37 °C. Après deux minutes d'incubation, la NAC (10 mM, 10 éq.) a été additionnée dans le milieu réactionnel et la réaction de thia-Michael a été suivie par retour de fluorescence (Figure 56, **A**). Les résultats obtenus montrent que l'addition de Michael dans ces conditions semble instantanée et le contrôle par HPLC a permis de confirmer la conversion complète du maléimide **79** (Figure 56, **B**).

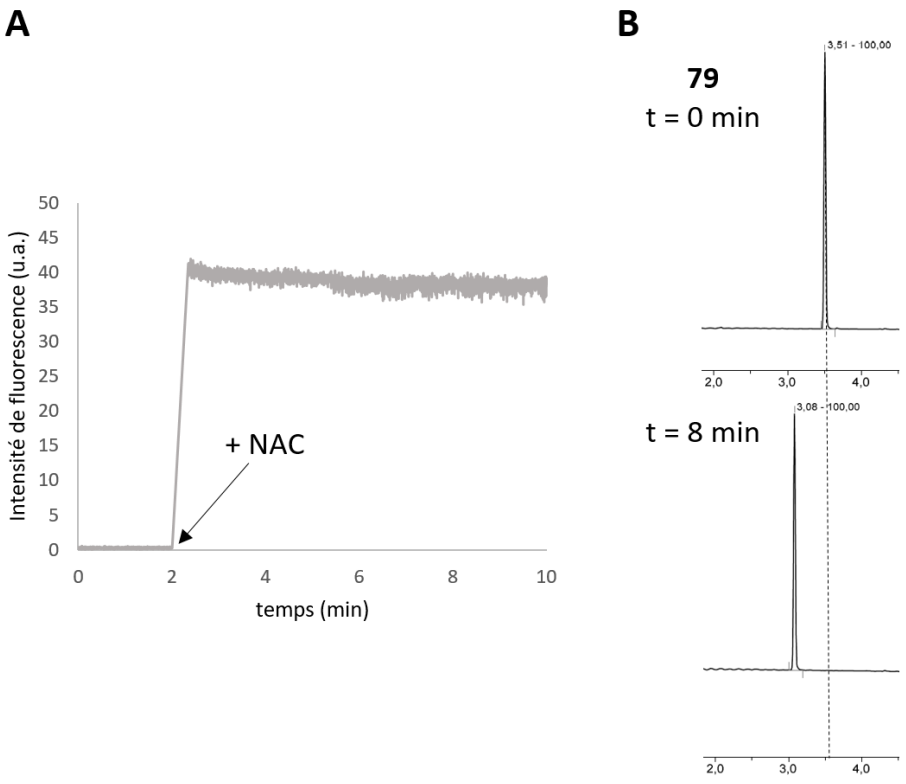


*Figure 56. (**A**) Suivi de l'addition de thia-Michael de la NAC (10 mM, 10 éq.) sur la sonde **79** (1 mM, 1 éq.) à 37 °C dans un mélange i-PrOH/PBS pH 7,4 (1:1, v/v) par spectroscopie de fluorescence (λ_{em} = 560 nm, λ_{ex} = 330 nm). (**B**) Chromatogrammes de contrôle de la réaction pour t = 0 min (référence sonde **79**) et t = 8 min de réaction.*

[254] Renault, K.; Renard, P.-Y.; Sabot, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *2018*, 6494–6498.

L'efficacité du piégeage de maléimide ayant été confirmé, le thioéther de référence **92** a été préparé à partir de la NAC et du maléimide chiral **82** pour servir de référence lors des expériences pour les études de stabilités des cycloadduits (Schéma 90).

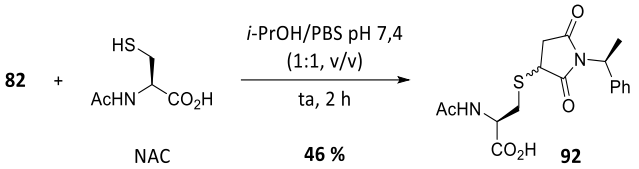


*Schéma 90. Préparation du thioéther de référence **92**.*

Les cycloadduits **85**-**91** ont finalement été mis en solution selon les mêmes conditions expérimentales que précédemment et le milieu a été incubé 24 heures à 37 °C (Schéma 91). Bien qu'une rétro-CDA ne puisse survenir avec l'aza-phtalimide **91** en raison de son aromaticité, sa stabilité en présence d'un excès de thiols a tout de même été testée dans ces conditions. Les cycloadduits isolés et purifiés ayant été introduits dans le milieu, ils ne présentent pas de traces de maléimides de départ. La formation et l'observation du thioéther **92** n'a pu donc s'effectuer que par le processus de rétro-CDA, libérant ainsi le maléimide **82** et permettant l'addition de Michael de la NAC. Une expérience de contrôle a également permis d'observer la stabilité totale du thioéther **92** dans ces conditions réactionnelles (absence de réaction de rétro-Michael).

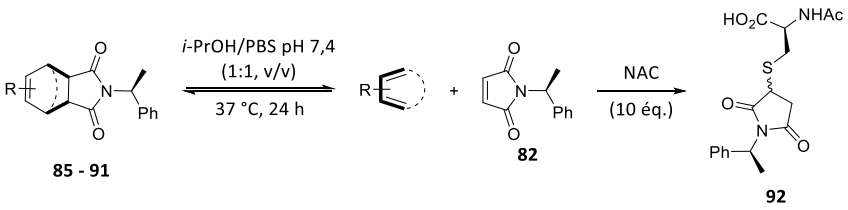


Schéma 91. Étude de rétro-CDA en conditions physiologiques et en présence d'un excès de NAC.

Suite aux analyses par LC-MS des milieux réactionnels, il s'est avéré que seul le cycloadduit **90**, issu du maléimide **82** et du furane **64**, était sujet à une rétro-CDA dans ces conditions douces. Environ 30% de dégradation du cycloadduit ont pu être observés par comparaison des signaux du thiosuccinimide **92** avec ceux du cycloadduit **90**, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus lors d'une récente étude de cinétique dynamique.[255] Par

[255] Carneiro de Oliveira, J.; Laborie, M.-P.; Roucoules, V. *Molecules* **2020**, *25*, 243–255.

ailleurs, il a pu être constaté que l'aza-phtalimide **91** est resté parfaitement stable en présence d'un excès de biothiol.

3.3.2.2. Stabilité chimique des cycloadduits en milieu biologique

La mono-hydrolyse des thiosuccinimides en conditions physiologiques est bien connue et a pu être exploitée afin d'augmenter la stabilité d'immunoconjugués, l'ouverture du cycle limitant la rétro-addition de Michael (Schéma 92).[256]

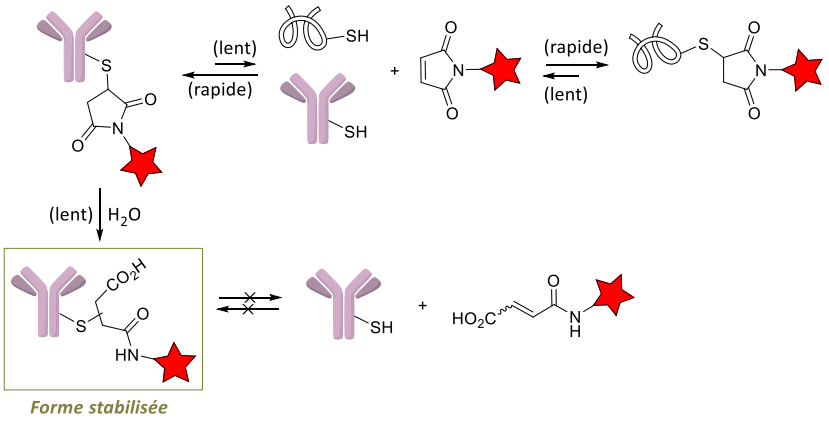


Schéma 92. Voies de dégradation et de stabilisation des immunoconjugués de type thiosuccinimides.

Le plasma sanguin humain (PSH) est un milieu biologique relativement complexe et est principalement composé en masse d'eau (≈ 90%), de protéines (≈ 8%, dont 54% d'albumines, 38% de globulines et 8% d'autres espèces protéiques) et de divers solutés (≈ 2%, dont des métabolites organiques, des sels minéraux, des substances régulatrices…).[257]

Dans le but d'évaluer la stabilité chimique des composés **85**-**91** en conditions biologiques, les cycloadduits ont donc été directement dilués dans du PSH et les solutions ont été incubées pendant 24 heures à 37 °C.[258] Après le traitement et la préparation des

[256] (a) Tumey, L. N.; Charati, M.; He, T.; Sousa, E.; Ma, D.; Han, X.; Clark, T.; Casavant, J.; Loganzo, F.; Barletta, F.; Lucas, J.; Graziani, E. I. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1871–1880. (b) Lyon, R. P.; Setter, J. R.; Bovee, T. D.; Doronina, S. O.; Hunter, J. H.; Anderson, M. E.; Balasubramanian, C. L.; Duniho, S. M.; Leiske, C. I.; Li, F.; Senter, P. D. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 1059–1062. (c) Fontaine, S. D.; Reid, R.; Robinson, L.; Ashley, G. W.; Santi, D. V. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 145–152. (d) Montes, E. G. de; Istrate, A.; Navo, C.; Jiménez-Moreno, E.; Hoyt, E.; Corzana, F.; Robina, I.; Jiménez-Osés, G.; Moreno-Vargas, A.; Bernardes, G. J. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 1885–1889.

[257] https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/plasma-blood-protein/blood-basics.html

[258] Montes, E. G. de; Istrate, A.; Navo, C. D.; Jiménez-Moreno, E.; Hoyt, E. A.; Corzana, F.; Robina, I.; Jiménez-Osés, G.; Moreno-Vargas, A. J.; Bernardes, G. J. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 6196–6200.

échantillons, les analyses par LC-MS ont permis d'établir que seuls les cycloadduits **85** et **91** ont été partiellement dégradés dans ces conditions. Le composé **85** a présenté environ 35% de mono-hydrolyse de la fonction imide et une forte isomérisation du cycloadduit de départ a pu être observée en parallèle (Schéma 93, **A**). Par ailleurs, seulement 4% de mono-hydrolyse de la fonction imide et des traces de *N*-oxydation ont pu être observés avec l'aza-phtalimide **91** (Schéma 93, **B**). Malgré ces observations, il peut être cependant précisé que de la conjugaison entre les deux partenaires demeure intacte grâce aux liens amides formés lors des mono-hydrolyses. Bien entendu, l'impact de ces dégradations et des isomérisations sur l'activité biologique des composés conjugués seraient à étudier suivant l'application visée.

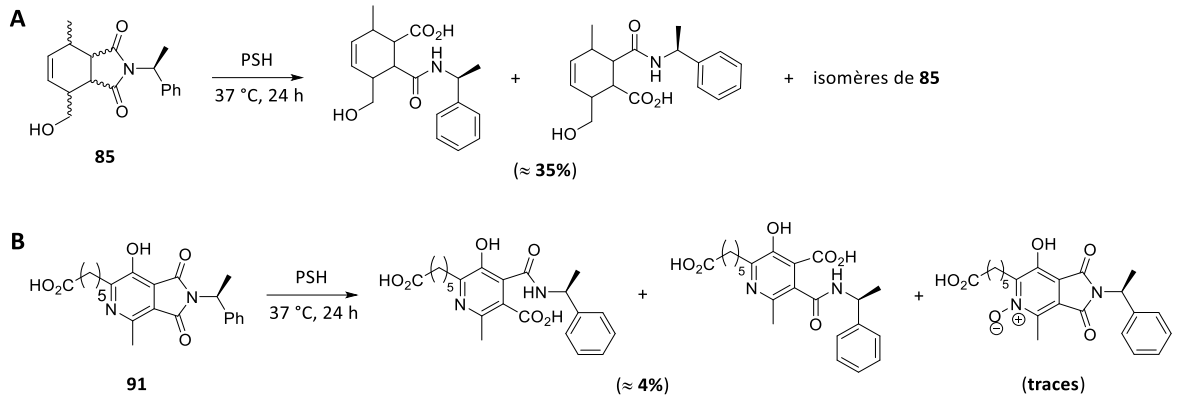


*Schéma 93. Dégradations partielles par incubation dans du PSH des cycloadduits (**A**) **85** et (**B**) **91**.*

La différence de stabilité de ces cycloadduits peut s'expliquer par le fait que les composés **86**-**90** possèdent dans leur structure un cycle ponté. Ce dernier permet très probablement d'augmenter l'encombrement stérique dans la région de la liaison imide, ce qui fournit une protection contre l'hydrolyse, ce qui n'est pas le cas des cycloadduits **85** et **91**.

3.4. Étude de combinaisons de ligations chimiosélectives

Le développement et l'emploi de nouveaux outils chimiques (hétéro)multifonctionnels permettant des LB/C sont très en vue depuis quelques années.[259] Ces systèmes font généralement appel à des fonctions chimiques réciproquement orthogonales et biocompatibles (Schéma 94, **A**).[260] Cependant, le nombre de fonctions chimique de ce type est

[259] (a) Iha, R. K.; Wooley, K. L.; Nyström, A. M.; Burke, D. J.; Kade, M. J.; Hawker, C. J.*Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5620–5686. (b) Beal, D. M.; Jones, L. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6320–6326. (c) Yokoi, T.; Ueda, T.; Tanimoto, H.; Morimoto, T.; Kakiuchi, K. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 1891–1894.

[260] Viault, G.; Dautrey, S.; Maindron, N.; Hardouin, J.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2693–2705.

relativement restreint. De plus, certaines d'entre elles peuvent s'avérer difficilement accessibles par voies synthétiques et certains précurseurs commerciaux fonctionnalisables peuvent être onéreux. Afin de pallier ces difficultés, certains systèmes séquentiels permettant l'emploi d'un réactif commun pour deux réactions différentes ont été inventés. Il est effectivement possible de conserver une certaine sélectivité grâce par exemple à des activations catalytiques (Schéma 94, **B**)[261] ou par photoactivation de l'un des partenaire (Schéma 94, **C**).[262] Même si dans certains cas il est nécessaire d'introduire les réactifs de manière successive, la mise en œuvre de ce type de stratégie demeure relativement simple.

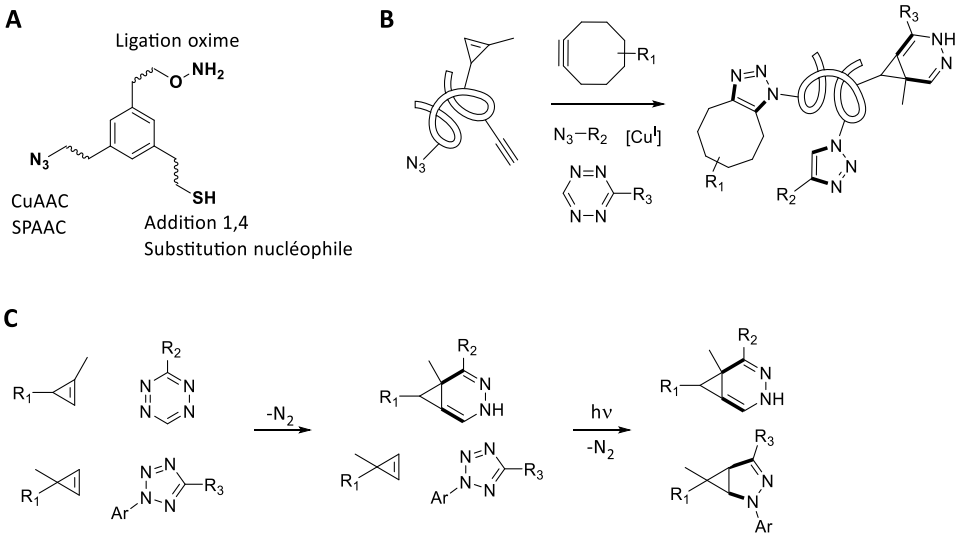


*Schéma 94. (**A**) Système réactionnel multi-orthogonal. Système séquentiel par (**B**) différenciation catalytique ou par (**C**) photoactivation.*

3.4.1. Sélectivité par la différenciation cinétique

Grâce à l'observation de larges différences de cinétiques réactionnelles, une nouvelle stratégie a été imaginée afin de tirer profit de cette propriété. En effet, il a été supposé qu'une différence suffisamment significative de réactivité entre deux diènes pourrait permettre de les différencier et d'établir une sélectivité lors de l'introduction d'un maléimide dans le milieu. Afin d'étayer cette hypothèse, le cyclopentadiène **60** et l'oxazole **66** ont été choisis du fait de leurs bonnes réactivités respectives et du ratio de leurs constantes cinétiques d'environ 542,

[261] (a) Simon, C.; Lion, C.; Spriet, C.; Baldacci-Cresp, F.; Hawkins, S.; Biot, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 16665–16671. (b) Winz, M.-L.; Linder, E. C.; Becker, J.; Jäschke, A. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 11781–11784.
[262] Patterson, D. M.; Prescher, J. A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *28*, 141–149.

en faveur de **60**. Une solution équimolaire de ces deux composés (1 mM) a donc été préparée dans un mélange MeCN/H_2O (1:1, v/v) et le maléimide **79** (1 éq.) a été additionné après une minute d'homogénéisation (Schéma 95, **A** ETAPE 1).

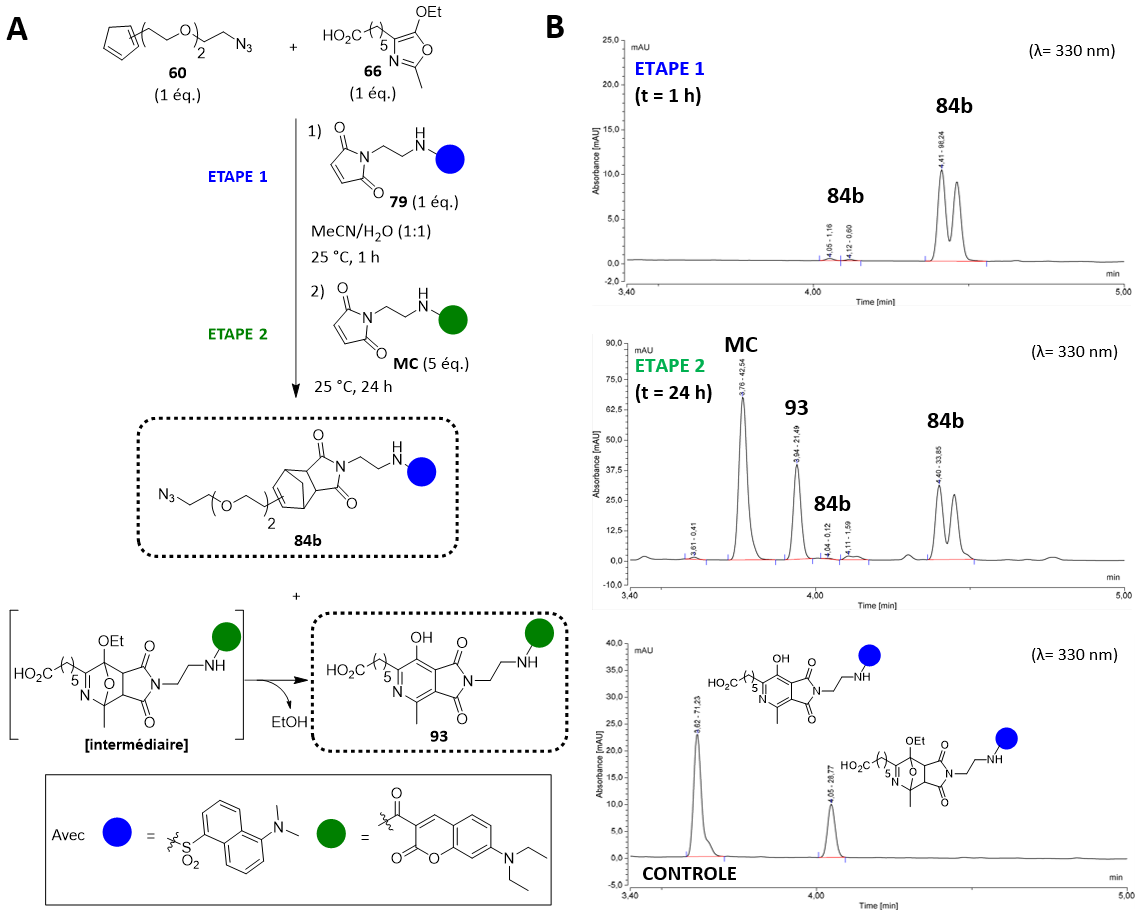


*Schéma 95. (**A**) Séquence réactionnelle sélective par différenciation cinétique. (**B**) Chromatogrammes de suivi des différentes étapes de la séquence et de l'expérience de contrôle ($\lambda_{abs.}$ = 330 nm).*

Cette première étape de la séquence a été analysée par HPLC après une heure de réaction à température ambiante (Schéma 95, **B** ETAPE 1). Seul le cycloadduit **84b** (multiples isomères) résultant de la réaction entre **60** et **79** a été observé. Effectivement, l'analyse de la réaction de contrôle entre l'oxazole **66** et le maléimide **79** a clairement indiqué l'absence de l'intermédiaire oxabicycle ou de l'aza-phtalimide correspondant lors de cette première étape (Schéma 95, **B** CONTROLE vs. ETAPE 1). Ainsi, le maléimide comportant le motif coumarine **MC** (5 éq.) a été additionné dans le milieu réactionnel (Schéma 95, **A** ETAPE 2). L'analyse de la réaction après 8 h à température ambiante a permis d'identifier la formation de l'aza-phtalimide **93** et la présence de l'intermédiaire oxabicycle correspondant dans un ratio ≈ 1:1. Fait intéressant, le composé **93** est devenu prépondérant par rapport à l'oxabicycle

intermédiaire (ratio ≈ 4,3:1) après 24 h de réaction dans les mêmes conditions (Schéma 95, **B**. ETAPE 2). Effectivement, l'aromatisation du composé qui d'ordinaire a lieu en milieu plus acide et/ou à plus haute température s'est réalisée ici en milieu neutre et à température ambiante. Il est tout à fait possible que la source interne de proton, due à la présence de la fonction acide carboxylique de **66**, additionnée à un temps de réaction relativement long soient à l'origine de l'aromatisation observée. Il aurait été intéressant de réaliser à nouveau cette séquence réactionnelle en employant un tampon aqueux de pH ≤ 5,3 et à une température de 37 °C afin de former directement le produit d'aromatisation aza-phtalimide, tout en vérifiant que les cinétiques de formation relatives des deux cycloadduits nécessaires pour la différenciation soient conservées.

Finalement, il a été établi et confirmé par cette expérience qu'il était parfaitement possible de contourner un besoin de chimiosélectivité en employant une différenciation cinétique à l'aide d'un réactif commun. Cette étude a cependant montré que la connaissance des constantes cinétiques réactionnelles ou des vitesses de conversions est indispensable afin de trouver un couple de diènes compatibles pour cette stratégie. Ici, la compatibilité chimique de **60** et **66** a également permis de réaliser cette preuve de principe selon une voie intermoléculaire séquentielle relativement simple et *via* une procédure *one-pot*. Ce type de compatibilité pourrait à terme permettre l'élaboration de nouveaux réactifs multifonctionnels ou de nouvelles stratégies de marquage et de constructions moléculaires.

3.4.2. Exploration de nouvelles combinaisons de réactifs et des compatibilités chimiques entre les diènes et différents réactifs communs de ligation

Parallèlement à l'étude de différenciation cinétique, et afin de valoriser l'ensemble de ces travaux, une exploration de réactivité et de compatibilité fonctionnelle a été entreprise afin d'envisager de nouvelles combinaisons de réactifs pour l'élaboration de réactions séquentielles en KTGS, de ligations innovantes et/ou de nouvelles plateformes chimiques orthogonales.

Comme il a pu être montré précédemment, les réactions de SPAAC et de CDA entre des dérivés maléimides et fulvènes se trouvent sur une gamme de réactivité similaire. Étant

donné leur correspondance cinétique et la compatibilité des alcynes cycliques avec les maléimides, l'emploi simultané de la SPAAC et de la CDA serait un atout pour de la construction moléculaire. Bien que quelques exemples de CDA à demande électronique inverse aient été décrites entre des dérivés de bicyclononyne (**BCN-OH**) et des analogues de cyclopentadiènes appauvris en électrons,[263] aucun article faisant mention d'une réactivité entre des cyclooctynes et des diènes électroniquement enrichis n'a pu être trouvé dans la littérature. Afin de vérifier cela, le fulvène **61** a été mis en présence d'une quantité stœchiométrique de **BCN-OH** dans un mélange équivolumique MeCN/PBS pH 7,4 (Schéma 96, **A**). Comme attendu, aucune conversion en cycloadduit correspondant n'a pu être observée, même après six jours de réaction à température ambiante. Parallèlement, le tétraméthoxydibenzocyclooctyne (**TMDIBO**), qui présente une réactivité similaire à celle du **BCN-OH** tout en étant plus stable[264] et qui a déjà été employé dans des systèmes chimiosélectifs,[265] a également été mis en réaction de manière équimolaire avec le fulvène **61** (Schéma 96, **B**). En raison de la faible solubilité du TMDIBO, un mélange DMSO/PBS pH 7,4 (2:1, v/v) a dû être utilisé. Après 48 heures de réaction à température ambiante, aucune conversion en cycloadduit correspondant n'a pu à nouveau être observée.

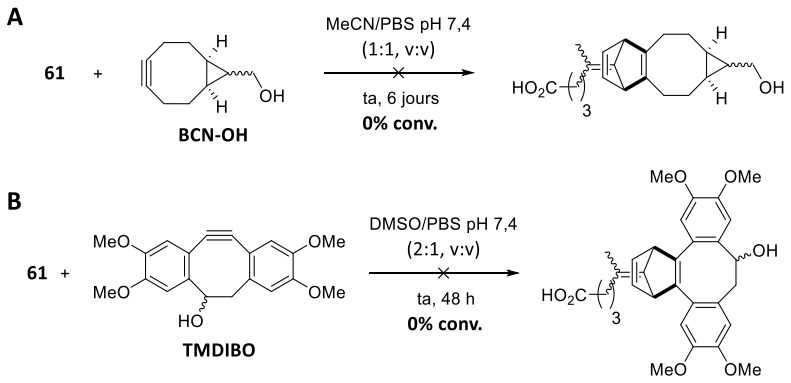


*Schéma 96. Étude de compatibilité fonctionnelle entre le fulvène **61** et (**A**) le **BCN-OH** et (**B**) le **TMDIBO**.*

[263] (a) Wang, D.; Viennois, E.; Ji, K.; Damera, K.; Draganov, A.; Zheng, Y.; Dai, C.; Merlin, D.; Wang, B. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 15890–15893. (b) Levandowski, B. J.; Gamache, R. F.; Murphy, J. M.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 6426-6431. (c) Levandowski, B. J.; Svatunek, D.; Sohr, B.; Mikula, H.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 2224-2227.

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

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

L'excellente compatibilité chimique du fulvène avec les alcynes sous contraintes de cycle a donc été confirmée grâce à ces deux expériences. Il est donc envisageable de réaliser des réactions de SPAAC et de CDA simultanément dans le même milieu et sans risquer l'observation de réactions parasites.

En 2014, notre équipe a décrit la préparation du composé **94** grâce à une combinaison réactionnelle composée d'une ligation de Kondrat'Eva et d'une réaction de CuAAC (Schéma 97).[175] Cette procédure *one-pot* a permis d'accéder en une seule étape et avec 60% de rendement au composé souhaité, ce qui a mis en évidence la bonne compatibilité chimique des oxazoles avec les azotures et les alcynes terminaux. Par extension, les maléimides sont également parfaitement orthogonaux avec ces deux fonctions chimiques. De plus, les conditions expérimentales de la CuAAC (présence de cuivre (I) et (II), conditions réductrices…) sont compatibles avec un pH de 5,0 et ne semblent pas inhiber de manière significative la ligation de Kondrat'Eva.

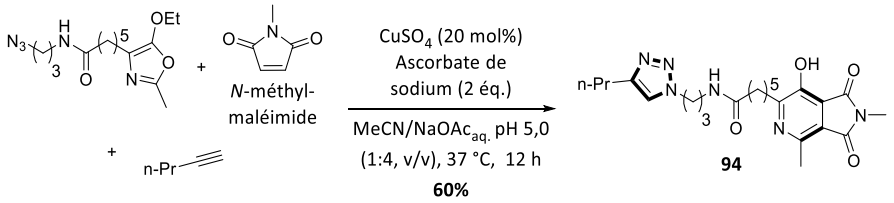


Schéma 97. Synthèse one-pot *du **94** par réaction de CuAAC et de ligation de Kondrat'Eva.*[175]

Souhaitant effectuer une construction moléculaire du même type, le choix du diène s'est porté sur le fulvène **61** en raison de sa bonne stabilité chimique apparente et de sa réactivité environ dix fois plus élevée que la famille des oxazoles. Le diène **61** a donc été mis en en réaction avec le maléimide **83**, comportant une fonction alcyne terminal, et de l'azoture **95** présentant un motif coumarine (Schéma 98). Concernant la réaction de CuAAC, une quantité catalytique de sulfate de cuivre et deux équivalents d'ascorbate de sodium ont été employés, conformément aux premiers travaux effectués.

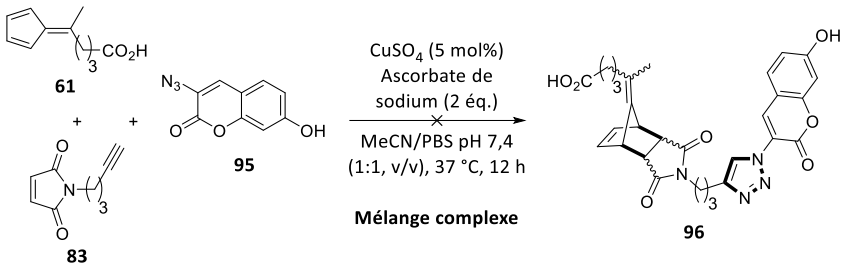


*Schéma 98. Tentative de préparation one-pot du composé **96**.*

Malgré la solubilité moyenne de l'azoture **95**, une certaine conversion a pu être observée pour tous les réactifs engagés. Lors de l'étude de stéréochimie décrite précédemment, le fulvène avait conduit à la formation de deux stéréoisomères lors de la CDA avec le maléimide chiral **82**. Etant donné que la formation stéréosélective du cycle *anti*-triazole était assurée par la catalyse au cuivre (I), un maximum de quatre isomères du composés **96** était attendu lors de cette procédure *one-pot*, mais malheureusement, un mélange complexe a été obtenu.

Face à ce premier résultat décevant, il a été décidé d'étudier la réactivité des différents partenaires en séparant les deux réactions employées. Ainsi, la CDA entre le fulvène **61** et le maléimide **83** (mélange équimolaire) dans les mêmes conditions a été réalisée (Schéma 99, **A**). Parallèlement pour la réaction de CuAAC, il a été décidé de remplacer le partenaire azoture en employant la coumarine **97** qui a présenté une meilleure solubilité dans ces conditions de solvants et de température (Schéma 99, **B**).

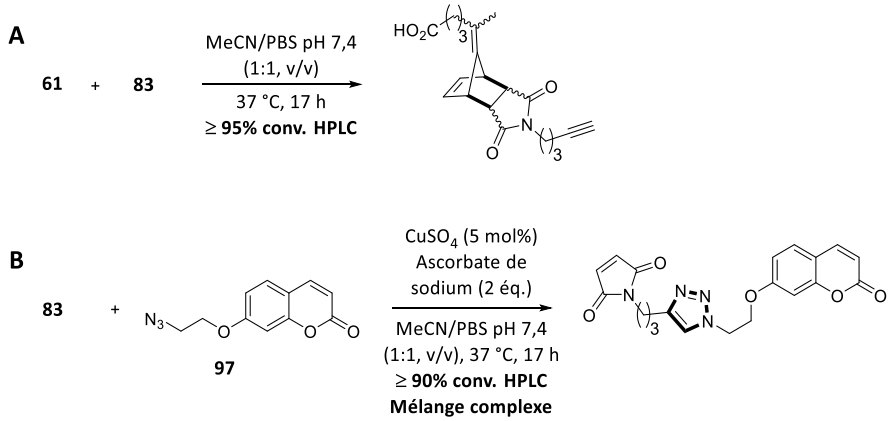


*Schéma 99. (**A**) Contrôle de la réaction de CDA entre le fulvène **61** et le maléimide **83**. (**B**) Contrôle de la réaction de CuAAC entre l'azoture **97** et l'alcyne terminal **83**.*

Concernant la réaction entre le fulvène **61** et la maléimide **83**, ce dernier a quasiment été consommé dans sa totalité, alors que le fulvène semble encore très présent dans le milieu

(Figure 57, **A**). Or, au moins trois produits se sont formés d'après le chromatogramme de suivi, ce qui laisse supposer que le maléimide **83** a subi une dégradation dans ces conditions. Dans le même temps, les analyses HPLC de la réaction de CuAAC ont démontré la formation de nombreux composés alors que la catalyse au cuivre (II) était censée assurer la formation d'un produit unique (Figure 57, **A**). A ce titre, l'extraction des traces UV en deux dimensions du chromatogramme de suivi a permis de constater que plusieurs de ces différents produits comportaient la signature spectroscopique de la coumarine **97**, ce qui a confirmé une potentielle dégradation des réactifs et/ou des produits formés (Figure 57, **B**).

Il est donc apparu que les deux réactions étaient limitantes dans ce procédé en raison d'une instabilité des réactifs notamment. Néanmoins, une légère optimisation des conditions expérimentales, comme par exemple l'utilisation de ligand du cuivre comme le TBTA pour stabiliser le Cu(I) généré *in situ*, pourrait permettre à terme de réaliser ces deux réactions de manière séquentielle, voire même en *one-pot*. Dans le cas contraire, la réaction de CuAAC pourrait être remplacée par une réaction de SPAAC. En effet, la spontanéité de cette réaction de click non-catalysée permettrait de s'affranchir des problèmes rencontrés avec les catalyseurs au cuivre.

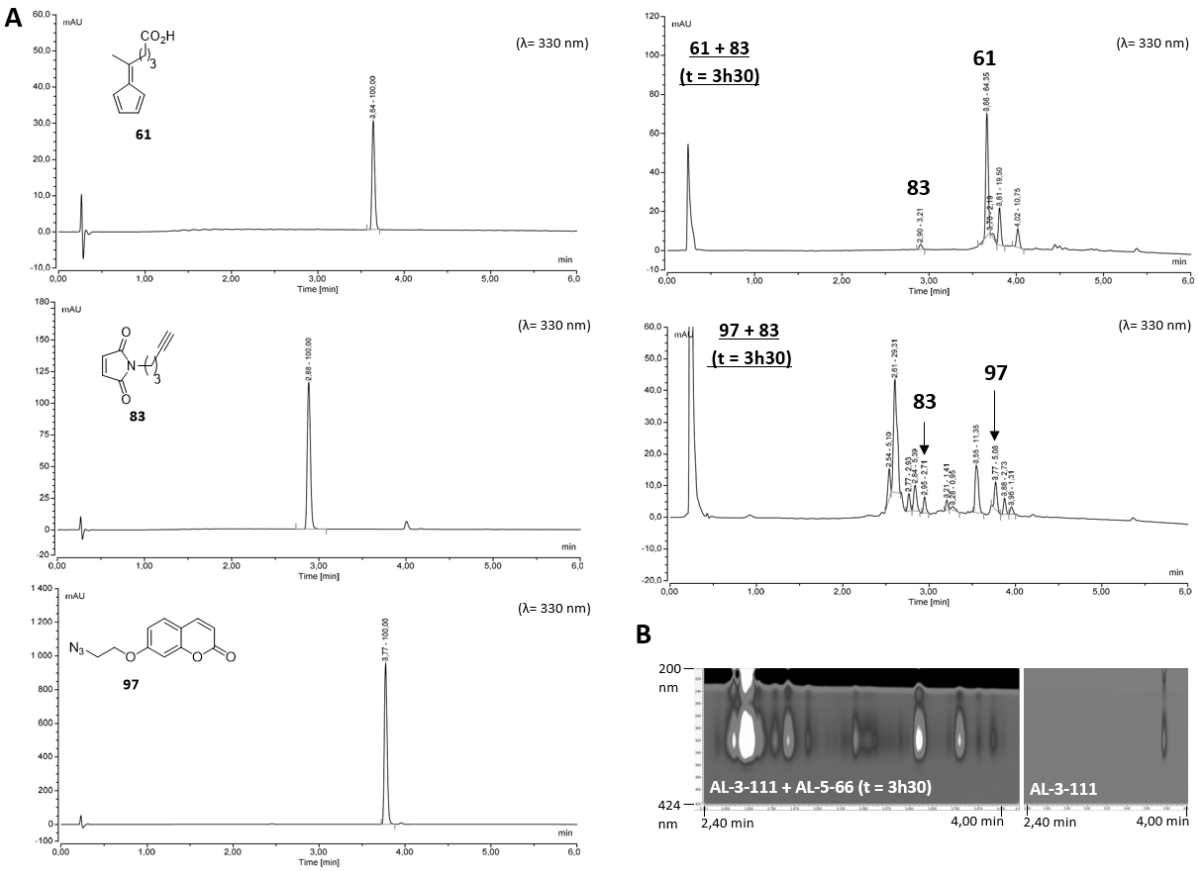


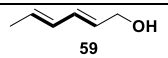
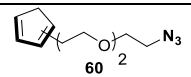
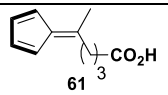
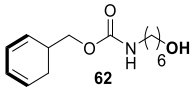
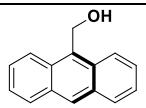
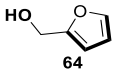
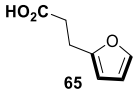
*Figure 57. (**A**) Chromatogrammes de références et de suivi des réactions de contrôle après 3h30 (λ = 330 nm). (**B**) Comparaison des traces UV observées lors de la réaction de CuAAC avec la trace UV de la coumarine **97**.*

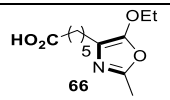
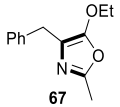
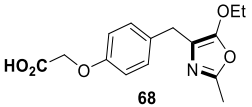
IV – Conclusion

Ainsi, la cycloaddition de Diels-Alder entre les maléimides et différents dièmes biocompatibles a été étudiée au cours de ce chapitre afin de rationaliser l'emploi de ces derniers dans le cadre de ligations chimiosélectives et selon les applications visées.

Pour cela, une évaluation de l'accessibilité synthétique des dièmes non-commerciaux et de leurs stabilités respectives a été réalisée dans un premier temps. Par la suite, des comparaisons de leurs cinétiques réactionnelles ont été effectuées, ce qui a permis d'établir précisément un ordre de réactivité des différents dièmes étudiés. La synthèse de cycloadduits chiraux a permis d'évaluer l'impact de la stéréochimie globale de la réaction (nombre d'isomères formés), sans pour autant fournir les configurations exactes des composés observés en raison de la complexité des spectres RMN. La stabilité chimique de ces différents cycloadduits ont également été étudiées en conditions physiologique et biologique (PSH). Les

différents résultats obtenus selon les différents axes d'études sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 11).

	Diènes			***Cycloadduits***			
Diène	**Accessibilité**	**Stabilité**	**k_2 ($M^{-1}.s^{-1}$)**	**Stéréochimie**	**Fluorescence**	**Réversibilité**	**Stabilité**
 **59**	Commercial	Stable : ++	$(8,9 \pm 0,7) \times 10^{-4}$	+	Non	Non	-
 **60**	Synthèse : +-	Stable : -	6,50 ± 0,02	--	Non	Non	++
 **61**	Synthèse : ++	Stable : ++	0,15 ± 0,01	+	Non	Non	++
 **62**	Synthèse : -	Stable : ++	$\approx 10^{-3}$	+	Non	Non	++
 **63**	Commercial	Stable : ++	$\approx 5 \times 10^{-3}$ - 10^{-2}	+	Non	Non	++
 **64**	Commercial	Stable : ++	$(8,9 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	-	Non	Oui	++
 **65**	Commercial	Stable : ++	$\approx 5 \times 10^{-4}$	Non évaluée	Non	Non évaluée	Non évaluée

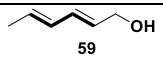
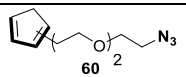
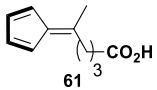
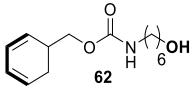
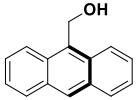
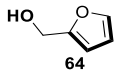
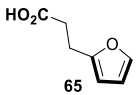
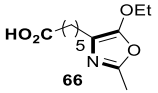
 **66**	Synthèse : +-	Stable : ++	$(1,2 \pm 0,4) \times 10^{-2}$	++	Oui	Non	+-
 **67**	Synthèse : ++	Stable : +-	$(5,1 \pm 0,3) \times 10^{-3}$	++	Oui	Non	Non évaluée
 **68**	Synthèse : +	Stable : +-	$\approx 10^{-3}$	++	Oui	Non	Non évaluée

Graduations relatives

Synthèse : ++ = très simple et/ou rapide ; -- = complexe et/ou longue.
Stabilité : ++ = très stable ou très réactif ; -- = très instable ou très peu réactif.
k_2 : les valeurs précédées du symbole « ≈ » sont des données estimées.
Stéréochimie : ++ = un seul isomère formé ; -- = multiples isomères formés.
Stabilité : ++ = très stable ; -- = très instable.

Tableau 11. Résultats des propriétés étudiées pour les différents diènes biocompatibles

Grâce à l'ensemble de ces résultats, l'éligibilité des différents couples diènes/maléimide pour des applications en KTGS grâce à la réaction de Diels-Alder a pu être évaluée. Ainsi, les diènes trop réactifs ($k_2 > 10^{-3}$ $M^{-1}.s^{-1}$) comme le cyclopentadiène **60**, le fulvène **61** ou encore l'anthracène **63** ont donc été écartés d'office. En effet, une cinétique de réaction trop élevée ne permettrait pas de distinguer une accélération cinétique entre les expériences de contrôle et celles en présence de la cible biologique. De même, les cycloadduits possédant des propriétés de réversibilité, comme la famille des furanes (**64** et **65**) ou une certaine instabilité comme dans le cas du diène linéaire **59**, ces réactifs ont également été écartés de toute éligibilité en KTGS car la dégradation dans le milieu d'incubation des produits formés conduirait à des résultats faux négatifs, ce qui est précisément à éviter. Concernant la famille des 5-éthoxyoxazoles (**66**-**68**), ces différents paramètres semblent en adéquation avec les critères stricts de la KTGS. Néanmoins, l'étape d'aromatisation conduisant à la formation de l'aza-phtalimide, dont la structure est sensiblement différente du cycloadduit intermédiaire formé initialement par la cible thérapeutique, ne permet pas non plus d'envisager cette réaction en KTGS, au risque d'aboutir à une perte conséquente de l'activité biologique du produit. Enfin, les dimensions moléculaires importantes et/ou la faible solubilité en milieux aqueux de l'anthracène **63** et du cyclohexadiène **62** ont donc également éliminé ces candidats. En définitif, il s'avère qu'aucun des diènes étudiés au cours de ces travaux ne présente les bons paramètres réunis afin d'envisager de futures applications en KTGS (Tableau 12).

Diène	Éligibilité en KTGS	Paramètre(s) non conforme(s)
 **59**	Non	Instabilité du cycloadduit (hydrolyse)
 **60**	Non	Cinétique réactionnelle importante
 **61**	Non	
 **62**	Non	Dimension de la fonction et solubilité moyenne en milieux aqueux
 **63**	Non	Cinétique réactionnelle importante, dimension de la fonction et solubilité moyenne en milieux aqueux
 **64**	Non	Réversibilité du cycloadduit
 **65**	Non	
 **66**	Non	Structure du cycloadduit aromatisé (azaphtalimide) trop divergente de la géométrie de l'état de transition

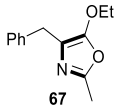
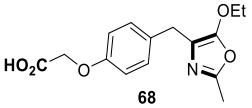
 **67**	Non	Structure du cycloadduit aromatisé (azaphtalimide) trop divergente de la géométrie de l'état de transition
 **68**	Non	

Tableau 12. Résultats d'éligibilités en KTGS des diènes biocompatibles étudiés.

Finalement, ces travaux ont pu être valorisés grâce à la publication des résultats comparatifs obtenus dans le journal Organic & Biomolecular Chemistry. Ceux-ci ont effectivement permis de rationaliser l'emploi des différents dienes biocompatibles décris dans la littérature et de fournir ainsi un support d'informations afin de guider les scientifiques dans leur choix du diène le plus adapté selon les applications et les conditions expérimentales souhaitées. Parallèlement, les études de différenciations cinétiques et d'orthogonalités de différentes fonctions chimiques ont mis en relief de nouvelles perspectives en ligation chimiosélective et pour le design de nouveaux réactifs (multi)-hétérofonctionnels.

« Maleimide-based metal-free ligation with dienes: a comparative study ». Lossouarn, A.; Renault, K.; Bailly, L.; Frisby, A.; Le Nahennec-Martel, P.; Renard, P.-Y.; Sabot, C. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 3874-3887. DOI: 10.1039/d0ob00403k.

CHAPITRE III

ÉTUDE DE NOUVELLES SONDES CHIMIQUES HAUTEMENT DÉTECTABLES PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE OU PAR SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE POUR LE MARQUAGE DES LIGANDS EN KTGS

Comme expliqué dans le chapitre d'introduction, l'obtention de faux négatifs lors d'expériences de KTGS peut avoir pour origine la non-détection des produits formés en raison de leur très faible concentration. De plus, il est parfois nécessaire d'accroître le temps d'incubation des cibles biologiques avec des réactifs afin de maximiser la quantité finale de ligand potentiellement formée pour augmenter leur détectabilité lors des analyses. Ce temps d'incubation supplémentaire peut néanmoins être délétère et contribuer à la dégradation de la cible biologique, ce qui ne permettra pas *in fine* d'augmenter significativement la quantité de ligand formée.

Afin de répondre à cette problématique et de repousser les limites analytiques, l'emploi de sondes chimiques permettant le marquage des ligands formés *in situ* a été imaginé selon deux stratégies distinctes qui seront abordées successivement dans ce chapitre :

1) le pré-marquage des ligands par une fonction bioorthogonale discrète (azoture) avec pour objectif l'introduction dans un second temps d'un marqueur de masse (cf. stratégie de « Pré-marquage », Chapitre I, Schéma 58).

2) l'étude de réactions séquentielles basées sur une première réaction de formation *in situ* du cycle pyrazolone, motif que pourrait alors réagir sélectivement avec des sondes fluorogéniques dans un deuxième temps (cf. stratégie de « *Click & Fish* », Chapitre I, Schéma 57).

Dans le cadre de ces travaux, la cible biologique étudiée est l'AChE, une enzyme impliquée dans les traitements palliatifs de la maladie d'Alzheimer. Une première partie de ce chapitre sera donc consacrée à la présentation de cette pathologie, ainsi qu'aux différents traitements actuellement à l'étude, avant de présenter les résultats des deux stratégies explorées.

I – La maladie d'Alzheimer et les cibles thérapeutiques

1.1. La maladie d'Alzheimer

1.1.1. Généralités et chiffres clés

Les premières traces écrites mettant en corrélation la démence sénile avec l'âge du sujet ont été rédigées durant l'antiquité par Pythagore, vers -700 avant notre ère.[266] Cependant, ce n'est qu'en 1906 que le Dr. Alois Alzheimer décrit pour la première fois et de manière scientifique les caractéristiques de cette maladie, qui porte aujourd'hui son nom. A ce jour, la maladie d'Alzheimer (MA) est la forme de démence la plus répandue chez l'Homme.[267] Il s'agit d'une maladie neurodégénérative progressive, multifactorielle dont l'étiologie est mal connue et malheureusement toujours incurable, conduisant bien souvent à la mort du patient.

En 2010, il a été estimé que le nombre de patients atteints par cette maladie était d'environ 36 millions à l'échelle planétaire.[268] Pour l'année 2015, une progression de 22% en seulement cinq ans a pu être observée, ce qui a représenté 44 millions de patients souffrant de la MA cette année-là.[269] Les modèles prédictifs élaborés depuis les deux dernières décennies semblent tous indiquer une augmentation drastique du nombre de cas dans les années à venir, avec environ 85 millions de patients en 2030 et plus de 100 millions en 2050.[270]

En plus des nombreux défis sociétaux et de santé publique qu'implique cette maladie,[271] les coûts financiers engendrés de manière générale sont absolument colossaux et difficilement appréhendables. En effet, en 2010 et 2015, les sommes dépensées dans le monde pour contrer les effets de cette maladie ont été estimées respectivement à 604 et à

[266] Berchtold, N. C.; Cotman, C. W. *Neurobiol. Aging* **1998**, *19*, 173–189.

[267] Querfurth, H. W.; LaFerla, F. M. *New Engl. J. Med.* **2010**, *362*, 329–344.

[268] Batsch, N. L.; Mittelman, M. S. *The World Alzheimer Report 2012*: *Overcoming the stigma of dementia*; Alzheimer's Disease International: London, 2012.

[269] Kumar, D.; Ganeshpurkar, A.; Kumar, D.; Modi, G.; Gupta, S. K.; Singh, S. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *148*, 436–452.

[270] Sloane, P. D.; Zimmerman, S.; Suchindran, C.; Reed, P.; Wang, L.; Boustani, M.; Sudha, S. *Annu. Rev. Public Health* **2002**, *23*, 213–231.

[271] O'Connor, D. *The World Alzheimer Report 2019*: *Attitudes to Dementia*; Alzheimer's Disease International: London, 2019.

818 milliards de dollars américains.[272] Bien-entendu, cette augmentation constante s'explique en partie par le nombre croissant de patients et laisse donc supposer, suivant les modèles prédictifs, que ces coûts pourraient atteindre plus de 2000 milliards de dollars en 2030.[273]

1.1.2. Symptômes et caractéristiques de la maladie

Auguste Deter, patiente du Dr Alzheimer, fut la première personne à être officiellement diagnostiquée pour cette maladie à l'âge de 56 ans. Avant sa mort, la patiente présentait de nombreux troubles de la mémoire, de la compréhension, de l'orientation et du comportement. L'autopsie de son cerveau a révélé, au niveau des neurones, la présence de plaques séniles extracellulaires, ainsi que des enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires et disparition importante des synapses. L'étudiant du Dr. Alzheimer, Gaeteno Perusini, a réalisé à l'occasion de diverses autopsies un dessin des neurones humains à différents stades de la maladie, avec une atteinte croissante de gauche à droite (Figure 58, **A**). De manière générale, ces dégradations neuronales s'accompagnent d'une atrophie caractéristique de l'encéphale qui témoigne des dégâts produits par la maladie (Figure 58, **B**).

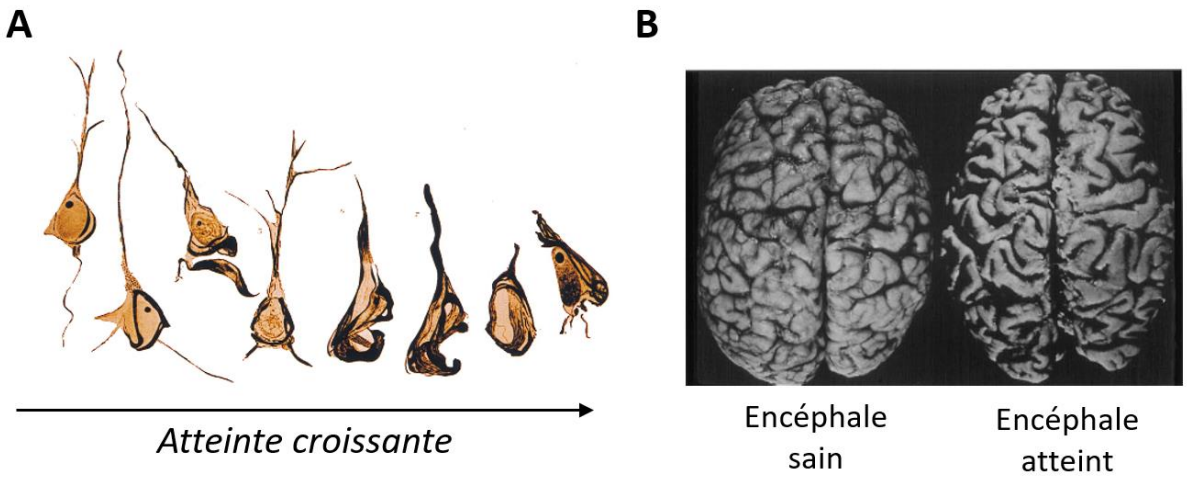


*Figure 58. (**A**) Dessin original de Gaeteno Perusini montrant l'atteinte et la dégradation neuronale (**B**) Comparaison photographique d'un encéphale sain et à un encéphale atteint par la MA (Figures extraites et modifiées de la revue[266]).*

Outre les troubles importants de la mémoire (amnésie), très majoritairement présents chez les patients, ces derniers présentent également dans un grand nombre de cas des pertes

[272] (a) Wimo, A.; Jönsson, L.; Bond, J.; Prince, M.; Winblad, B. *Alzheimers Dement.* **2013**, *9*, 1-11. (b) Wimo, A.; Guerchet, M.; Ali, G.-C.; Wu, Y.-T.; Prina, A. M.; Winblad, B.; Jönsson, L.; Liu, Z.; Prince, M. *Alzheimers Dement.* **2017**, *13*, 1–7.

[273] Jia, J. *et al. Alzheimers Dement.* **2018**, *14*, 483–491.

cognitives comme l'aphasie (troubles du langage), de l'apraxie (troubles du mouvement) et de l'agnosie (difficulté de reconnaissance visuelle). D'autres symptômes comportementaux sont également bien connus comme l'anxiété et la dépression, l'altération du jugement, des difficultés organisationnelles, des troubles de la personnalité ou encore de l'apathie.[274]

Même si l'origine exacte et les éléments déclencheurs demeurent encore inconnus à ce jour,[275] deux formes d'apparition de la MA au sein de la population ont pu être différenciées. La première, et la plus répandue, est la déclaration « aléatoire » de cette maladie qui est souvent attribuée à une somme de facteurs environnementaux complexe et au mode de vie des patients. Quelques facteurs épigénétiques et/ou aggravants ont été reconnus de manière générale comme le manque d'activité physique ou mentale,[276] certaines maladies métaboliques (obésité, diabète de type II…), la balance nutritive[277] ou encore le manque de sommeil.[278] Bien-entendu, le vieillissement est également un facteur prépondérant, avec une apparition des premiers symptômes généralement aux alentours de 60 à 65 ans. La seconde forme de déclaration de la MA concerne une petite partie de la population atteinte de la MA (5 à 10%). Plus agressive que la première forme, celle-ci peut se déclarer chez les individus de tous âges et aurait pour origine des altérations génétiques héréditaires.[279]

Face à la demande et à la pression sociétale mais également économique, de considérables efforts ont été effectués dans le but de comprendre cette maladie et ses origines afin de pouvoir développer des traitements thérapeutiques. Malheureusement, après plus de 100 ans d'étude, la science n'a toujours pas permis de répondre à toutes les questions,

[274] Alzheimer's Association. *Alzheimers Dement.* **2018**, *14*, 367–429.

[275] (a) Karlawish, J.; Jack, C. R.; Rocca, W. A.; Snyder, H. M.; Carrillo, M. C. *Alzheimers Dement.* **2017**, *13*, 374–380. (b) Tran, T.-S.; Tran, T.-D.; Tran, T.-H.; Mai, T.-T.; Nguyen, N.-L.; Thai, K.-M.; Le, M.-T. *Molecules*, **2020**, *25*, 4064–4078.

[276] Teri, L. *et al. J. Rehabil. Res. Dev.* **1998**, *35*, 411–419.

[277] Celik, E.; Sanlier, N. *Rev. Food Sci. Nutri.* **2019**, *59*, 102–113.

[278] (a) Lucey, B. P.; Hicks, T. J.; McLeland, J. S.; Toedebusch, C. D.; Boyd, J.; Elbert, D. L.; Patterson, B. W.; Baty, J.; Morris, J. C.; Ovod, V.; Mawuenyega, K. G.; Bateman, R. J. *Ann. Neurol.* **2018**, *83*, 197–204. (b) Shokri-Kojori, E. *et al. PNAS* **2018**, *115*, 4483–4488.

[279] (a) Ertekin-Taner, N. *Neurol. Clin.* **2007**, *25*, 611–667. (b) Cauwenberghe, C. V.; Broeckhoven, C. V.; Sleegers, K. *Genet. Med.* **2016**, *18*, 421–430.

même s'il a cependant pu être confirmé que plusieurs mécanismes et phénomènes physiologiques étaient impliqués dans le développement de la MA.[280]

1.1.3. Physiopathologie de la MA et les différents mécanismes suspectés

Parmi ces différents phénomènes, cinq principaux facteurs sont à l'origine de la diminution des capacités mnésiques, comme par exemple la déficience en acétylcholine (ACh) et le développement de lésions à l'intérieur et à l'extérieur des cellules neuronales (Figure 59).

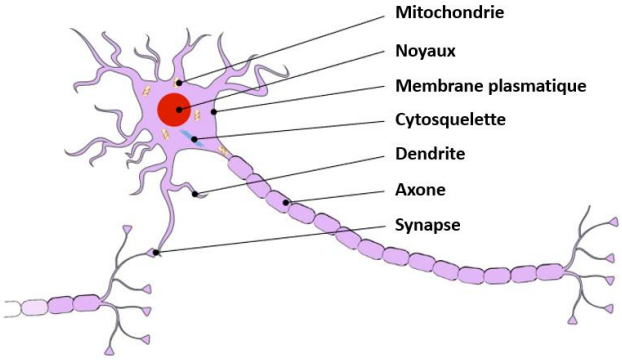


Figure 59. Représentation simplifiée d'une cellule neuronale et de ses principales composantes (Figure libre de droit et extraite de « Google Images »).

1.1.3.1. L'hypothèse cholinergique[281]

L'ACh fut le premier neurotransmetteur à être découvert au début du 20ème siècle par le neuroscientifique Henry Hallet Dale,[282] et cette découverte fut confirmée quelques années plus tard par le pharmacologue Otto Loewi.[283] Ces deux scientifiques furent récompensés en 1936 pour leurs travaux respectifs sur la neurotransmission en recevant le prix Nobel de médecine.

L'ACh est un ester provenant de la choline (Ch) et de l'acide acétique (AcOH). Elle joue un rôle central dans l'apprentissage, la mémoire et dans la communication neuronale. L'ACh est principalement localisée dans les systèmes nerveux centraux et périphériques (SNC et

[280] Pour des revues récentes et concises sur ce sujet, voir : (a) Liu, Z.; Zhang, A.; Sun, H.; Han, Y.; Kong, L.; Wang, X. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 6046–6058. (b) Kumar Thakur, A.; Kamboj, P.; Goswami, K.; Ahuja, K. *J. Anal. Pharm. Res.* **2018**, *7*, 226–235. (c) Rajasekhar, K.; Govindaraju, T. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 23780–23804.

[281] Craig, L. A.; Hong, N. S.; McDonald, R. J. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2011**, *35*, 1397–1409.

[282] Dale, H. H. *J. Pharmacol,* **1914**, *6*, 147–190.

[283] Loewi, O. *Pfügers Arch. Ges. Physiol.*, **1921**, *189*, 239-242.

SNP), ainsi qu'au niveau des jonctions neuromusculaires ou fentes synaptiques. Bien que son cycle de vie biologique soit relativement complexe, ce dernier peut être présenté de manière simplifiée. Concernant sa biosynthèse et son hydrolyse (Schéma 100), l'ACh est produite grâce à l'enzyme choline acétyle transférase (ChAT, EC : 2.3.1.6[284]) à partir de la Ch et de la coenzyme A acétylée (acétyl-CoA). A l'inverse, son hydrolyse au niveau des fentes synaptiques est réalisée en présence d'eau par l'acétylcholinestérase (AChE, EC : 3.1.1.7), ce qui permet de régénérer de la Ch et de l'AcOH.

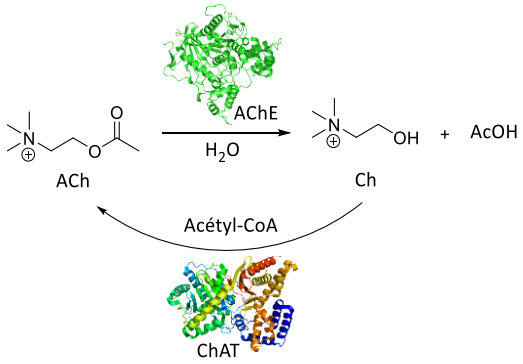


Schéma 100. Biosynthèse et hydrolyse de l'ACh.

L'ensemble du processus de transmission de l'influx nerveux au niveau du système cholinergique se décompose selon différentes étapes relativement simples (Figure 60).

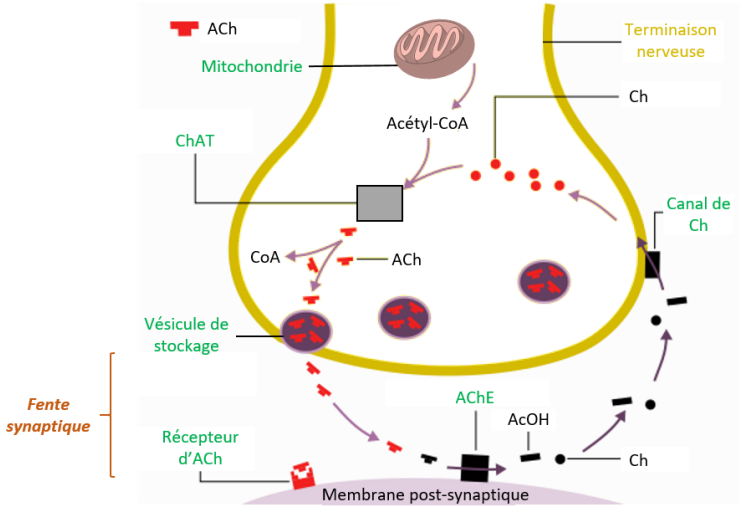


Figure 60. Transmission de l'influx nerveux par le système cholinergique.

[284] La nomenclature EC (Enzyme Nomenclature Comission, EC) est une classification numérique des enzymes. Le premier chiffre indique la classe des enzymes (type de réaction catalysée), le second indique le type général de substrat impliqué, le troisième caractérise le substrat spécifique et le quatrième est le numéro de série de l'enzyme.

La biosynthèse de l'ACh a lieu à l'intérieur de la terminaison axonale, qui contient la ChAT et les substrats nécessaires comme décrit précédemment avec le schéma 100. L'ACh ainsi produite est alors stockée dans plusieurs centaines de milliers de vésicules synaptiques, situés au niveau des jonctions neuronales. Lors de l'arrivée d'un influx nerveux *via* les axones, l'ACh est alors libérée des vésicules lors de leur fusion avec la membrane cellulaire, afin d'être diffusée dans la fente synaptique. Le neurotransmetteur permet alors l'activation des récepteurs d'ACh (AChR) au niveau du neurorécepteur situé en surface de la membrane post-synaptique, ce qui permet la transmission de l'influx nerveux. L'excès d'ACh dans la fente synaptique est alors hydrolysé par l'AChE, qui permet de stopper la transmission de l'influx nerveux et de générer de la Ch qui est alors en partie réabsorbée par la terminaison nerveuse de départ, et entre dans un nouveau cycle de biosynthèse d'ACh et de stockage.

L'ACh se fixe aux AChR (nicotinique et muscariniques) situés au niveau de la membrane du neurorécepteur. Les récepteurs nicotiniques sont constitués de protéines transmembranaires pentamériques, elles-mêmes composées de cinq sous-unités (2 α, β, γ et δ) qui forment un canal ionique (Figure 61).

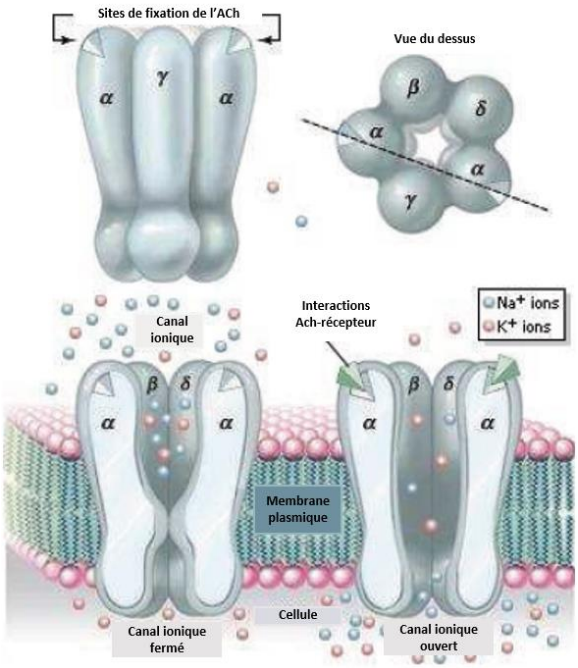


Figure 61 Structure des récepteurs nicotiniques et fonctionnement général des canaux ioniques.

Les sous-unités α possèdent chacune un site d'interaction avec l'ACh, qui une fois liée, permet l'activation du canal ionique. Les récepteurs nicotiniques ainsi activés (canal ionique ouvert) vont être très perméables aux ions sodium et potassium (système nerveux) ou sodium

et calcium (jonctions musculaires) ce qui permet le passage d'une grande quantité de ces ions à l'intérieur de la cellule synaptique. L'augmentation rapide de la concentration en cations dans cette région de la cellule entraîne une dépolarisation électrique qui permet la transmission et la continuité du signal nerveux ou de la contraction musculaire.[285] Les récepteurs muscariniques fonctionnent de manière similaire mais leur rôle est variable selon les tissus. Leur effet est cependant plus tardif que les récepteurs nicotiniques, mais leur durée d'action est à l'inverse plus longue.[285] Finalement, l'hydrolyse de l'ACh grâce à l'AChE est essentielle car elle permet le retour à l'état de repos des récepteurs cholinergiques avant de recommencer un cycle.

Le déclin de la production de ChAT et d'ACh est généralement observé lors de la progression de la MA, ce qui permet d'expliquer en grande partie la perte croissante de mémoire et des capacités cognitives du fait de l'affaiblissement des communications neuronales. Cet axe de recherche a donc été largement étudié pour le développement de traitements thérapeutiques et notamment *via* l'inhibition de l'AChE, ce qui sera décrit un peu plus loin.

1.1.3.2. Hypothèse de la cascade amyloïde[286]

La protéine précurseur de l'amyloïde (APP) est une glycoprotéine transmembranaire qui est impliquée dans de nombreux mécanismes de développement et de conservation du système neuronal et de la mémoire.[287] Le clivage de l'APP est réalisé principalement par la famille des secrétases (α-, β-, et γ-),[269] ce qui conduit à la formation de peptides bêta-amyloïdes (peptides Aβ) solubles. Lors du clivage normal, les α- secrétases puis les γ-secrétases interviennent dans cet ordre chronologique. En revanche, si des clivages successifs réalisés par les β-secrétases surviennent, ce mécanisme devient anormal et un déséquilibre entre la formation et l'élimination métabolique des peptides Aβ apparaît. Une accumulation de ces composés dans les zones concernées fait donc progressivement son apparition.[288] Une fois ce processus enclenché, l'agrégation continue de ces peptides conduit à la formation de

[285] Miyazawa, A.; Fujiyoshi, Y.; Unwin N. *Nature* **2003***, 423*, 949–955.

[286] Mawuenyega, K. G. *et al. Science*, **2010**, *330*, 1774

[287] Müller, U. C.; Deller, T.; Korte, M. *Nat. Rev. Neurosci.* **2017**, *18*, 281–298.

[288] (a) Haass, C.; Selkoe, D. J. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 101-112. (b) Selkoe, D. J.; Hardy, J. *EMBO Mol. Med.* **2016**, *8*, 595–608.

fibres, dont les empilements finissent par former un véritable réseau de plaques amyloïdes (plaques séniles) et qui sont considérées aujourd'hui comme une des causes majeures de la MA (Figure 62).[289] Suivant leurs emplacements et leurs dimensions, ces plaques peuvent à terme provoquer entre autres des distorsions des voies axonales, une inhibition des transmissions neuronales, le raccourcissement des tiges dendritiques, etc. Les peptides Aβ sont également connus pour être des antagonistes des AChR qui inhibent les interactions entre ces récepteurs et les molécules d'ACh, ce qui empêche donc l'ouverture des canaux ioniques et la transmission des signaux neuronaux. L'accumulation des peptides Aβ au niveau des jonctions synaptiques est donc un véritable problème puisque la mort de ces cellules survient assez rapidement du fait de la coupure de contact entre les synapses et les membranes plasmiques synaptiques.

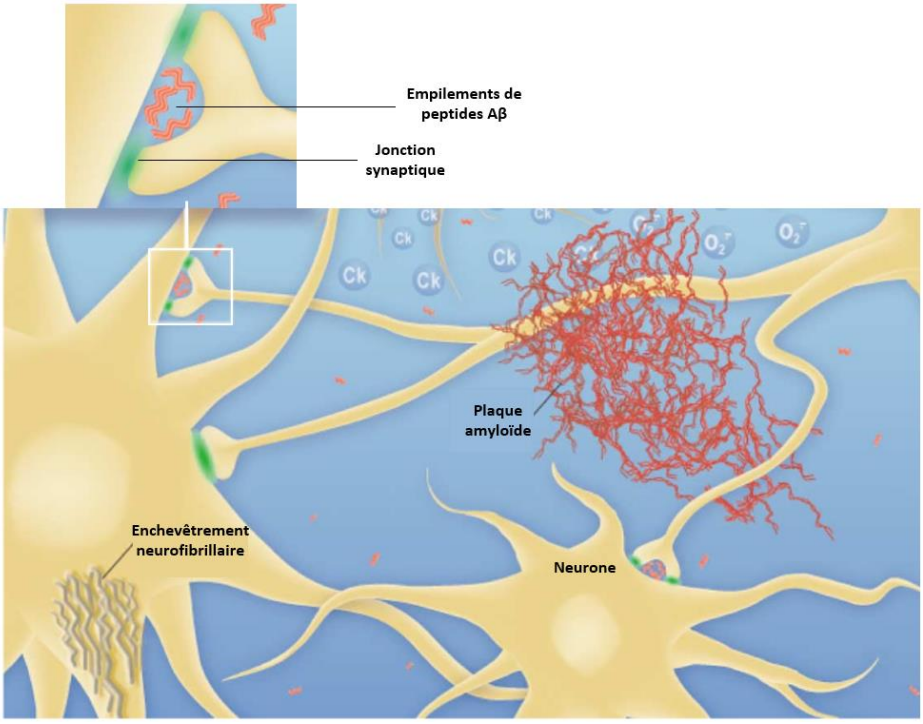


Figure 62. Agrégation des peptides Aβ et formation des plaques amyloïdes (figure extraite et modifiée de l'article[289]).

L'intérêt de développer des traitements permettant de cibler l'AChE est donc double car il a pu être clairement démontré il y a déjà de nombreuses années que cette enzyme jouait également un rôle très important dans la formation des plaques amyloïdes.[290] En effet, la

[289] Walsh, D. M.; Selkoe, D. J. *Neuron* **2004**, *44*, 181–193.

[290] (a) Inestrosa, N. C.; Alvarez, A.; Pérez, C. A.; Moreno, R. D.; Vicente,M.; Linker, C.; Casanueva, O. I.; Soto, C.; Garrido, J. *Neuron* **1996**, *16*, 881-891. (b) Genever, P.G.; Birch, M.A.; Brown, E.; Skerry, T.M. *Bone* **1999**, *24*, 297–303.

formation de complexes très stables AChE-peptides Aβ a pu être observée et ceci provoque une augmentation de la neurotoxicité de ces fibres qui ne sont plus métabolisables ni solubles.[291]

1.1.3.3. Autres hypothèses d'études

Les protéines intracellulaires Tau sont présentes principalement dans les axones et permettent notamment de stabiliser la structure des microtubules du cytosquelette.[292] La phosphorylation et la déphosphorylation de ces protéines est un mécanisme dynamique biologique normal permettant la stabilisation de ces microtubules. Bien que ce sujet soit encore très débattu au sein de la communauté scientifique, différents mécanismes physiologiques conduisent à des hyperphosphorylations ou à des hyper-déphosphorylations de ces protéines, ce qui rompt ainsi les équilibres établis.[293] Ces réactions sont respectivement assurées par les familles des kinases et des phosphatases.[294] Les protéines Tau hyperphosphorylées sont très insolubles et forment dans le temps des enchevêtrements de fibres (enchevêtrements neurofibrillaires) par agrégation. Ces protéines n'assurent donc plus la connexion et le maintien structural des microtubules, ce qui conduit à la mort de la cellule neuronale (Figure 62).[295]

Par ailleurs, le stress oxydant est également suspecté d'accélérer la dégradation des cellules neuronales. En effet, le cerveau à lui seul représente environ 20% de la consommation en dioxygène dans l'organisme. Par conséquent, il est d'autant plus vulnérable face aux dégradations cellulaires (membrane cellulaire, ADN, protéines…) qui surviennent lors de la formation excessive d'espèces oxygénées réactives (ROS),[296] principalement en raison de

[291] (a) Inestrosa, N. C.; Urra, S.; Colombres, M. Curr. Alzheimer Res. 2004, 1, 249–254. (b) Dinamarca, M. C.; Sagal, J. P.; Quintanilla, R. A.; Godoy, J. A.; Arrázola, M. S.; Inestrosa, N. C. *Mol. Neurodeg.* **2010**, *5*, 4–19.

[292] Avila, J.; Lucas, J. J.; Pérez, M.; Hernández, F. *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 361–384.

[293] (a) Mudher, A.; Lovestone, S. *Trends Neurosci.* **2002**, *25*, 22–26. (b) Guo, T.; Noble, W.; Hanger, D. P. *Acta. Neuropathol.* **2017**, *133*, 665–704.

[294] Kinases : Famille enzymatiques appartenant à la classe des transférases. Elles catalysent le transfert de groupes phosphoryles d'un substrat à un autre. Phosphatases : Famille enzymatiques appartenant à la classe des hydrolases. Elles permettent la suppression de groupements phosphates sur divers substrats par hydrolyse.

[295] (a) Lee, V. M.; Balin, B. J.; Otvos, L.; Trojanowski, J. Q. *Science* **1991**, *251*, 675–678. (b) Goedert, M.; Spillantini, M. G.; Cairns, N. J.; Crowther, R. A. *Neuron* **1992**, *8*, 159–168.

[296] (a) Galindo, M. F.; Ikuta, I.; Zhu, X.; Casadesus, G.; Jordán, J. *J. Neurochem.* **2010**, *114*, 933–945. (b) Dumont, M.; Beal, M. F. *Free Radical Biol. Med.* **2011**, *51*, 1014–1026.

disfonctionnements du système mitochondrial et d'inflammations chroniques exacerbés par l'âge.[297]

D'un autre côté, les ions métalliques jouent un rôle important vis-à-vis de l'homéostasie neurocellulaire[298] et en tant que cofacteurs dans le métabolisme,[299] mais ils font depuis plusieurs années l'objet d'études quant à leur implication dans la neurodégénération.[300] Leurs concentrations dans le cerveau est régulée par la barrière hémato-encéphalique (BHE), mais avec le temps, une accumulation cellulaire peut être observée notamment pour les ions de l'aluminium, de fer, de zinc, de cuivre ou encore de manganèse. Il a pu être établi que ces cations ont une influence néfaste sur la réponse mitochondriale vis-à-vis du stress oxydant qui peut ainsi être amplifié. De plus, leur présence en excès peut modifier la structure tertiaire des protéines environnantes ce qui peut entrainer leur disfonctionnement au sein des processus biologiques et leur agrégation. Il a également pu être établi que certains de ces ions métalliques jouent un rôle central dans la formation et la stabilisation des agrégats de peptides Aβ et des protéines Tau hyperphosphorylées.[301] De récentes études pointent du doigt l'emploi de métaux en agriculture, notamment du cuivre (dans la bouillie bordelaise par exemple), qui outre la pollution environnementale engendrée provoque une absorption importante et continue de ces composés au travers de la nourriture et ce, dès le plus jeune âge.[302]

En définitif, la MA est le résultat d'une somme de facteurs environnants, héréditaires et de phénomènes physiologiques complexes et souvent interconnectés. Cependant, les hypothèses concernant la déficience cholinergique et la cascade amyloïde ont fait l'objet de nombreux développements et quelques molécules ont pu être commercialisées par l'industrie pharmaceutique.

---

[297] Bredesen, D. E.; Rao, R. V.; Melhen, P. *Nature*, **2006**, *443*, 796–802.

[298] Farina, M.; Avila, D. S.; da Rocha, J. B. T.; Aschner, M. *Neurochem. Int.* **2013**, *62*, 575–594.

[299] Popescu, B. F. G.; Nichol, H. *CNS Neurosci. Ther.* **2011**, *17*, 256–268.

[300] Bolognin, S.; Messori, L.; Zatta, P. *Neuromol. Med.* **2009**, *11*, 223–238.

[301] Pour une revue et les références associées à ce sujet, voir : Savelieff, M. G.; Lee, S.; Liu, Y.; Lim, M. H. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 856–865.

[302] Coelho, F. C.; Squitti, R.; Ventriglia, M.; Cerchiaro, G.; Daher, J. P.; Rocha, J. G.; Rongioletti, M. C. A.; Moonen, A.-C. *Biomolecules* **2020**, *10*, 897–916.

1.2. L'acétylcholinestérase (AChE)

1.2.1. Fonction et occurrence biologique de l'AChE

L'AChE est une estérase appartenant à la famille des hydrolases à sérine. Cette enzyme est principalement localisée dans les fentes synaptiques du système cholinergique des neurones et dans les jonctions musculaires. Comme expliqué un peu plus tôt, l'AChE joue un rôle capital dans le système cholinergique en hydrolysant l'ACh dans les fentes synaptiques ce qui permet la mise en repos des AChR et d'interrompre la propagation de l'influx nerveux.

Chez l'Homme, le gène codant de l'AChE se situe sur le chromosome 7 et permet la formation de trois sous-types polymorphiques se différenciant par leurs extrémités en C-terminale[303] :

- $AChE_R$ (Readthrough) : Cette forme hydrosoluble intervient dans les mécanismes de défenses immunitaires et est particulièrement exprimée lors de période de stress dans le cerveau.[304]
- $AChE_H$ (Hematopoiesis) : Un peptide hydrophobe fonctionnalise la partie C-terminale de cette forme, ce qui permet son ancrage sur les tissus organiques. Chez l'Homme, ce type d'enzyme se trouve principalement à la surface des cellules sanguines (leucocytes et érythrocytes).[305]
- $AChE_T$ (Tailed) : Il s'agit de la forme très largement majoritaire chez les vertébrés et se trouve donc dans le cerveau et les muscles afin d'assurer le fonctionnement du système cholinergique. Pour cette forme, la partie C-terminale comporte une « queue » peptidique hydrophobe d'environ 26 kDa.[306]

[303] Massoulié, J.; Perrier, N.; Noureddine, H.; Liang, D.; Bon, S. *Chem.-Biol. Int.* **2008**, *175*, 30–44.
[304] Dori, A.; Ifergane, G.; Saar-Levy, T.; Bersudsky, M.; Mor, I.; Soreq, H.; Wirguin, I. *Life Sci.* **2007**, *80*, 2369–2374.
[305] Bartels, C. F.; Zelinski, T.; Lockridge, O. *Am. J. Hum. Genet.* **1993**, *52*, 928–936.
[306] Altamirano, C. V.; Lockridge, O. *Biochemistry* **1999,** *38,* 13414–13422.

1.2.2. Structure et activité de l'AChE

La première détermination de la structure de l'AChE fut établie par DRX (diffraction des rayons X de cristaux de protéine) en 1991, à partir d'enzyme issue de la raie torpille *Torpedo Californica* (Figure 63, **A**).[307] Cette première étape a ainsi permis d'accéder à de multiples informations structurales et conformationnelles de cette enzyme, notamment sur le positionnement du site catalytique (Figure 63, **B**).[308] L'AChE est une enzyme de forme ellipsoïdale dont les dimensions spatiales sont variables selon les espèces. Dans le cas de la *Tc*-AChE, l'enzyme mesure approximativement 45 × 60 × 65 Å.[308(b)]

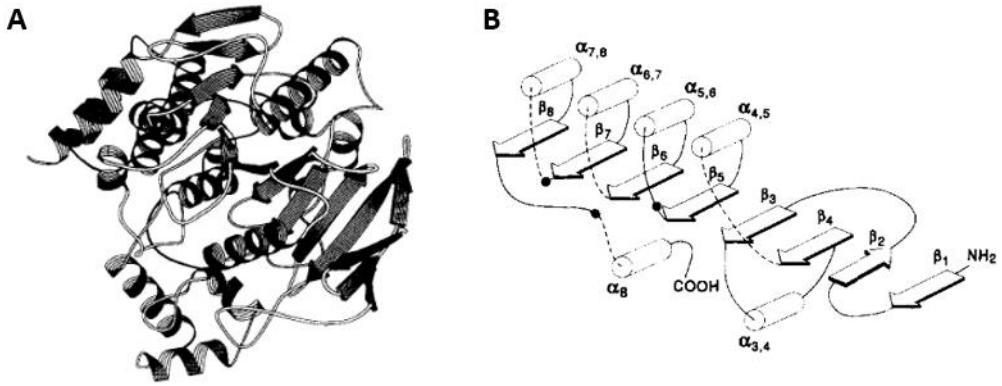


*Figure 63. (**A**) Représentation tridimensionnelle de la TcAChE. (**B**) Organisation schématique de la chaîne protéique (les cylindres correspondent aux hélices α, les flèches aux feuillets β et les points noirs aux résidus de la triade catalytique). (Les figures ont été extraites et modifiées de l'article[308(a)])*

Aujourd'hui, 254 structures de l'AChE provenant de différentes espèces ont pu être décrites et sont librement disponibles sur le site de PDB database.[309] Ces représentations tridimensionnelles sont des outils extrêmement utiles mais ne reflètent pas la véritable nature de l'enzyme du point de vue dynamique. Effectivement, la mobilité conformationnelle de la chaîne protéique et sa souplesse structurale ne peuvent être perçues au travers de ces schémas ce qui ne reflète pas son réel comportement dans le milieu biologique.

Il est également important de préciser que les études de DRX ont mis en évidence la présence de plusieurs molécules d'eau pouvant être qualifiées de « structurelles » vis-à-vis de

[307] Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. *Science* **1991**, *253*, 872–879.
[308] (a) Sussman, J.; Silman, I. *Curr. Op. Struc. Biol.* **1992**, *2*, 721–729. (b) Dvir, H.; Silman, I.; Harel, M.; Rosenberry, T. L.; Sussman, J. *Chem.-Biol. Int.* **2010**, *187*, 10–22.
[309] Nombre de structures référencées sous le mot clé « Acetylcholinesterase » sur le site PDB database. Recherche effectuée le 09 mai 2020.

l'enzyme.[310] En effet, ces dernières possèdent une très grande affinité pour les résidus d'acides aminés environnants, à tel point qu'elles peuvent être considérées comme des parties intégrantes de la structure protéique. Ces molécules d'eau ont un rôle de « lubrifiant » important pour la plasticité conformationnelle de l'enzyme et donc pour les échanges rapides d'entrée et de sortie des substrats/produits. Leur prise en compte lors d'études de docking et/ou de relation structure-activité est indispensable afin de ne pas biaiser les résultats en tentant par exemple d'occuper un environnement supposé vide.

C'est en 1993 que l'équipe du professeur Taylor a pu prouver l'implication de trois domaines différents de l'enzyme lors de l'hydrolyse de l'ACh : le site périphérique anionique (SPA), la gorge hydrophobe et le site catalytique ou « d'acylation ». Ces trois domaines sont connectés entre eux grâce à la gorge hydrophobe qui est relativement étroite et très aromatique, formant un site actif relativement profond (environ 20 Å) vers le centre de l'entité enzymatique (Figure 64).[311]

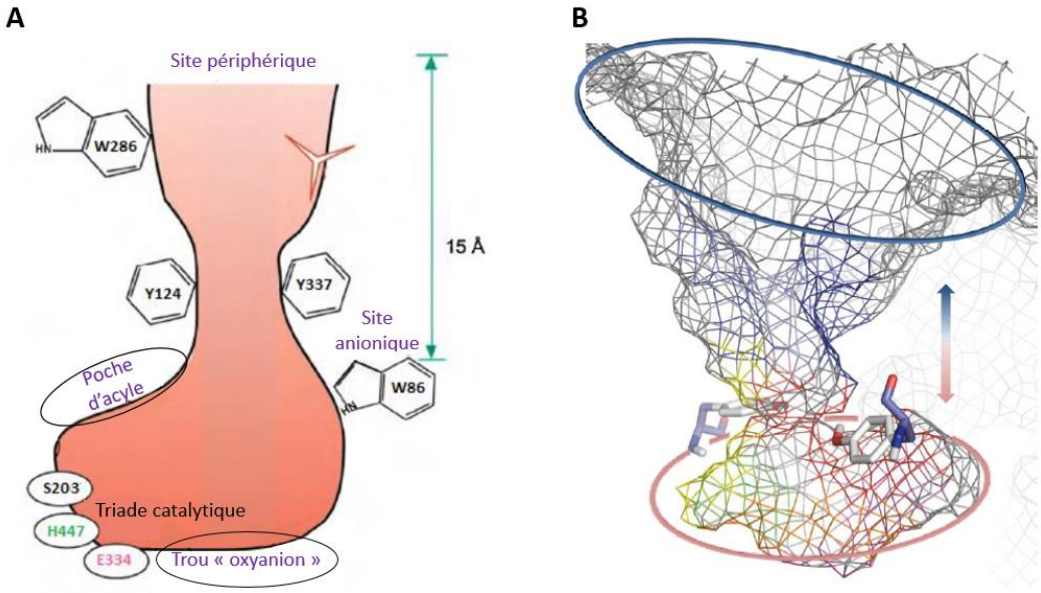


*Figure 64. (**A**) Vue schématique en coupe du site actif (figure extraite et modifiée de l'article.*[308(b)] *(**B**) Modélisation tridimensionnelle du site actif de la rh-AChE (cercle bleu : SPA ; cercle rouge : site d'acylation).*[312]

[310] Henchman, R. H.; Tai, K.; Shen, T.; McCammon, J. A. *Biophysic. J.* **2002**, *82*, 2671–2682.

[311] Radic, Z.; Pickering, N. A.; Vellom, D. C.; Camp, S.; Taylor, P. *Biochemistry* **1993**, *32*, 12074–12084.

[312] Figure extraite du manuscrit de thèse du Dr. Emilia Oueis, « Evaluation of new in situ click chemistry reactions for the discovery of acetylcholinesterase inhibitors. ». Thèse soutenue en 2013 à l'Université de Rouen Normandie.

- Le SPA est localisé de manière diffuse à la surface de l'enzyme et fait office de « porte » d'accès au site actif grâce à la forte densité de résidus aromatiques et polaires (Trp286, Tyr72, Tyr124, Glu285, Asp74 et Tyr341).[313] En effet, ces propriétés électroniques et électrostatiques confèrent au SPA de bonnes affinités avec les cations hydrophobes comme l'ACh en établissant principalement des interactions cation-π. Le SPA sert donc de site transitoire de fixation avant l'entrée du substrat dans le site actif, un peu comme une antichambre (Figure 64, **B**).[314] Par ce biais, le SPA permet une régulation dynamique de l'activité enzymatique en fonction de la concentration en ACh dans le milieu.[315] En effet, ce mécanisme repose sur une cascade d'interactions entre les résidus Trp286 et Trp86 dont les positionnements respectifs entraînent une modification conformationnelle du site d'acylation (Figure 64, **A**), activant ou désactivant l'enzyme en fonction de la concentration en ACh. A plus basse concentration, ce mécanisme permet d'augmenter la vitesse d'hydrolyse de l'enzyme afin de compenser la déficience en substrat.[316] Au contraire, lorsque la concentration en ACh devient trop importante, un phénomène d'inhibition enzymatique se produit en bloquant partiellement l'entrée de la gorge, ce qui limite l'engorgement du site actif et donc le disfonctionnement de l'enzyme.
- La gorge étroite, qui permet d'accéder au site d'acylation, possède un diamètre moyen de 5 Å ce qui signifie que le sens de circulation des substrats et des produits d'hydrolyse est alterné. Vers le milieu de la gorge, deux résidus tyrosines (Tyr124 et Tyr337) limitent l'espace par leurs groupements hydroxyles, mais le diamètre s'élargi de nouveau plus bas vers le site d'acylation.[313] Globalement, la surface de la gorge est constituée à 40% de résidus aromatiques ce qui explique son caractère hydrophobe et sa capacité à interagir avec l'ACh grâce à une gradient d'interactions en direction du site catalytique, ce qui permet le transfert rapide des substrats et produits.[317]
- Le site d'acylation de l'enzyme, ou site catalytique, est constitué de différentes sous-parties[313] : 1) la triade catalytique, qui est composée de trois résidus que sont la sérine

[313] Dans le cas où aucune précision n'est apportée, la numérotation de la chaîne protéique correspond à l'AChE humaine (*h*-AChE).

[314] Johnson, J. L.; Cusack, B.; Davies, M. P.; Fauq, A.; Rosenberry, T. L. *Biochemistry* **2003**, *42*, 5438–5452.

[315] Szegletes, T.; Mallender, W. D.; Thomas, P. J.; Rosenberry, T. L. *Biochemistry* **1999**, *38*, 122–133.

[316] Mallender, W. D.; Szegletes, T.; Rosenberry, T. L. *Biochemistry* **2000**, *39*, 7753–7763.

[317] Boschetti, N.; Brodbeck, U.; Jensen, S. P.; Koch, C.; Nørgaard-Pedersen, B. *Clin. Chem.***1996***, 42*, 19-23.

203 (Ser203, nucléophile), l'histidine 447 (His447, base) et le glutamate 334 (Glu334, acide). Le mécanisme d'hydrolyse des esters grâce à ce système sera décrit un peu plus tard. 2) La poche d'acyle permet d'accueillir la partie ester de l'ACh en établissant des interactions hydrophobes entre le groupement méthyle du substrat et les résidus Trp236, Phe295 et Phe297 constituants la poche. 3) Le trou oxyanionique est caractéristique de la famille des hydrolases à sérine. Il permet dans un premier temps l'activation de l'ester de l'ACh en vue de son hydrolyse et puis la stabilisation de l'intermédiaire tétraédrique oxyanionique. Cette sous-partie contient notamment les résidus Gly121, Gly122 et Ala204 qui permettent d'établir des liaisons hydrogènes entre leurs liaisons amides et l'oxyanion. 4) Le site « anionique » est défini par les résidus Trp86, Tyr337 et Ph338 et permet l'orientation de l'ACh dans le site actif en fournissant des points d'ancrages de type cation-π entre la fonction ammonium du substrat et les cycles aromatiques de la chaîne protéique. Ce site est également impliqué dans le mécanisme de régulation de l'activité de l'AChE par communication conformationnelle avec le SPA. Le terme anionique, qui est impropre puisque ce site (comme le périphérique) est principalement composé de résidus aromatiques, a été historiquement attribué à la partie de l'enzyme supposée liée le cation triméthylammonium de l'ACh. Avant la résolution de la structure, la communauté scientifique avait émis l'hypothèse que ce cation était lié à des résidus carboxylates chargés négativement, d'où cette dénomination qui a perdurée.

Après l'hydrolyse de l'ACh, les produits (la Ch et l'AcOH) quittent le site actif en rebroussant chemin au travers de la gorge, qui, rappelons-le, est à sens unique de manière alternée.[318] Comme expliqué précédemment, lorsque la concentration du substrat est très importante, l'engorgement du site actif peut survenir rapidement en raison des limites de diffusion et provoque ainsi le mécanisme d'inhibition enzymatique.[319] Cependant, des études ont pu mettre en évidence l'existence de « portes dérobées » (*backdoors*) au sein de l'enzyme chargée afin d'accélérer l'évacuation des produits d'hydrolyse et de permettre l'entrée directe

[318] Stojan, J.; Brochier, L.; Alies, C.; Colletier, J. P.; Fournier, D. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 1364–1371.

[319] Colletier, J.-P.; Fournier, D.; Greenblatt, H. M.; Stojan, J.; Sussman, J. L.; Zaccai, G.; Silman, I.; Weik, M. *EMBO J.* **2006**, *25*, 2746–2756.

des substrats.[320] Ces « portes » sont matérialisées le plus souvent par des chaînes latérales aromatiques de résidus de type Trp ou Tyr. Leurs rotations spatiales permettent l'ouverture de chemins normalement inexistants au travers de la structure protéique et donc de nouveaux mécanisme de sortie des produits. En 2008, le groupe du Dr. Nachon est parvenu à démontrer par des calculs moléculaires dynamiques que le résidu Trp83 de la *Dm*-AChE (*Drosophila melanogaster*) pouvait ouvrir un passage de 5 Å de diamètre avec la présence d'un ligand dans le site actif.[321] D'autres études ont permis de monter qu'un résidu tyrosine localisé au fond du site actif de la *Tc*-AChE pouvait réaliser le même type de mécanisme.[322] En effet, la rupture de la liaison hydrogène entre les chaînes latérales de la Tyr442 et des Trp83 et Trp432 de l'enzyme *Dm*-AChE permet l'ouverture d'un véritable couloir d'évacuation au fond du site catalytique, permettant ainsi une évacuation directe des produits vers le solvant (Figure 65). Ces systèmes de « portes et couloirs dérobés » sont très répandus chez des familles enzymatiques très variées, que ce soit pour éviter l'engorgement des substrats, pour transférer des intermédiaires toxiques vers un second site catalytique, etc.[323]

En raison de ses capacités d'autorégulation de son activité et d'évacuation des produits d'hydrolyse selon des mécanisme physiques secondaires, l'AChE présente une des plus hautes activités catalytiques dans l'organisme. Même si la valeur de la constante cinétique d'hydrolyse varie selon les espèces animales et les conditions expérimentales, la valeur moyenne est de l'ordre de 10^4 s^{-1},[324] ce qui veut dire que l'AChE est capable d'hydrolyser entre 4000 et 16000 molécules d'ACh par seconde.[325]

---

[320] (a) Harel, M.; Schalk, I.; Ehret-Sabatier, L.; Bouet, F.; Goeldner, M.; Hirth, C.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L. *PNAS* **1993**, *90*, 9031–9035. (b) Gilson, M. K.; Straatsma, T. P.; McCammon, J. A.; Ripoll, D. R.; Faerman, C. H.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L. *Science* **1994**, *263*, 1276–1278. (c) Colletier, J.-P.; Weik, M. *Annal. Pharm. Fra.* **2007**, *65*, 108–118.

[321] Nachon, F.; Stojan, J.; Fournier, D. *FEBS J.* **2008**, *275*, 2659–2664.

[322] Sanson, B.; Colletier, J.-P.; Xu, Y.; Lang, P. T.; Jiang, H.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Weik, M. *Prot. Sci.* **2011**, *20*, 1114–1118.

[323] Pour des revues récentes portant sur ce sujet, voir : (a) Gora, A.; Brezovsky, J.; Damborsky, J. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 5871–5923. (b) Marques, S. M.; Daniel, L.; Buryska, T.; Prokop, Z.; Brezovsky, J.; Damborsky, J. *Med. Res. Rev.* **2017**, *37*, 1095–1139.

[324] Wilson, I. B.; Harrison, M. A. *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 2292-295. (b) Taylor, P.; Camp, S.; Radić, Z. Acetylcholinesterase. *Encyclopedia of Neuroscience*; Squire, Academic Press: Oxford, 2009; pp 5–7.

[325] Rosenberry, T. L. *PNAS* **1975**, *72*, 3834–3838.

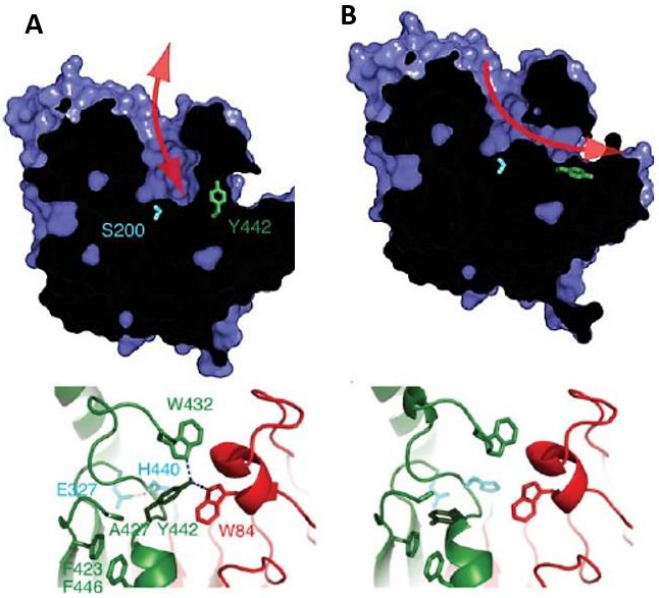


*Figure 65. (**A**) Fonctionnement et conformation moyenne classique d'entrée et de sortie des substrats et produits. (**B**) Rotation conformationnelle de la Tyr442 permettant l'ouverture d'un passage vers le solvant et conformation environnante associée. Les figures sont extraites et modifiées de l'article.*[322]

Comme précédemment expliqué, l'hydrolyse des esters par l'AChE est réalisée par la triade catalytique du site d'acylation et en présence d'eau (Schéma 101).

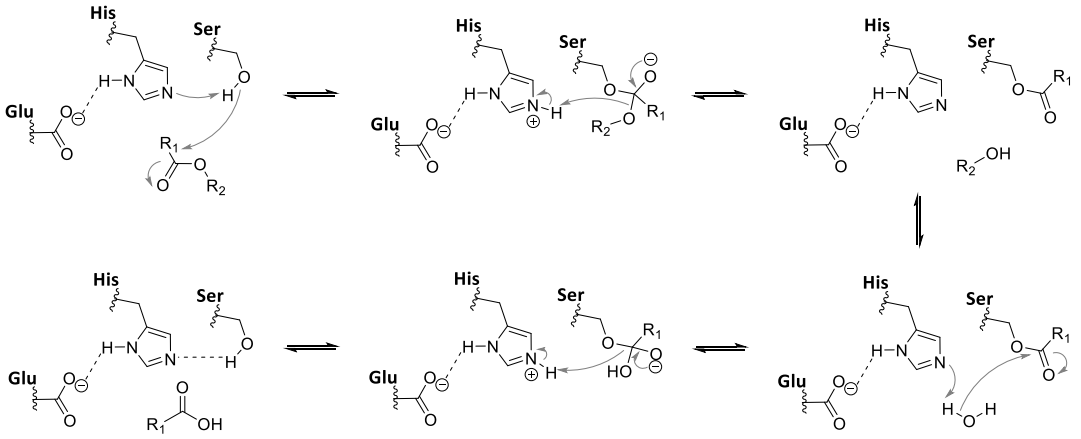


Schéma 101. Mécanisme d'hydrolyse des esters par la triade catalytique de l'AChE.

Le mécanisme est très similaire à celui d'une saponification chimique classique par un nucléophile de type base anionique. L'imidazole du résidu histidine permet une déprotonation de la fonction alcool de la sérine, l'alcoolate est alors suffisamment nucléophile pour s'additionner sur le carbonyle de l'ester. La liaison hydrogène entre le glutamate et l'histidine permet d'augmenter la basicité de l'imidazole en stabilisant l'imidazolium correspondant. L'intermédiaire tétraédrique ainsi formé et stabilisé par le trou anionique se fragmente en formant l'alcool correspondant par déprotonation de l'imidazolium. La sérine catalytique se

retrouve alors momentanément acylée. Le recouvrement des propriétés basiques de l'imidazole permet la déprotonation d'une molécule d'eau en générant ainsi une ion hydroxyde. Ce dernier permet finalement la saponification de l'ester formé lors de la première partie du mécanisme, ce qui génère l'acide carboxylique correspondant et réactive la triade catalytique pour un nouveau cycle.

1.2.3. Les inhibiteurs de l'AChE

1.2.3.1. Les d'inhibiteurs irréversibles

Les inhibiteurs irréversibles, ou suicides, sont des molécules qui permettent l'inhibition d'une enzyme *via* à la formation d'une liaison covalente stable avec cette dernière. La réactivation de l'enzyme doit donc être réalisée au moyen d'une seconde réaction permettant la libération des résidus de la chaîne protéique. Pour qu'un inhibiteur soit considéré comme irréversible, il faut que l'échelle de temps de la seconde réaction soit significativement supérieure à celle de la réaction catalytique de l'enzyme. Ces inhibiteurs comportent le plus souvent des fonctions électrophiles (aldéhydes, halogénoalcanes, carbamates, accepteurs de Michael, phosphonates avec groupement partant…) pouvant réagir avec les résidus d'acides aminés présentant une certaine nucléophilie (cystéine, lysine, sérines, thréonines, tyrosines …). La désactivation irréversible de l'AChE est généralement réalisée *via* la fonctionnalisation de la Ser203 catalytique ce qui neutralise la fonction d'hydrolase de l'enzyme. Cette voie d'inhibition a été largement employée pour la conception d'insecticides synthétiques mais également d'armements chimiques particulièrement redoutables (Figure 66).[326]

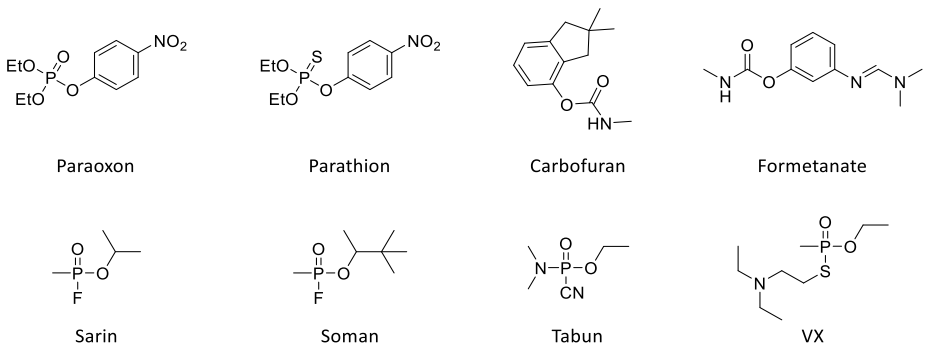


Figure 66. Exemples et structures d'insecticides et d'agents chimiques de type gaz de combats.

[326] Pohanka, M. **2011**, *155*, 219–230.

Ces composés sont de puissants neurotoxiques qui s'attaquent au système nerveux en perturbant très fortement son fonctionnement, ce qui exclue une quelconque application en chimie thérapeutique. En effet, l'arrêt brutal de l'activité de l'AChE entraîne une forte accumulation d'ACh au niveau des fentes synaptiques, ce qui provoque une transmission permanente de l'influx nerveux au travers des récepteurs cholinergiques qui demeurent en « position ouverte » (perméabilité cationique). Physiologiquement, cette atteinte provoque de grave convulsions qui sont suivies par une tétanie musculaire et la mort par arrêts respiratoire et cardiaque (paralysie du diaphragme).[327] La dangerosité de ces produits a conduit à l'arrêt de leur emploi et de leur production dans le domaine phytosanitaire au profit de produits plus sélectifs. Les armes chimiques ont quant à elles été interdites par la convention de 2009, qui a imposé l'arrêt de leur manufacture, excepté en quantités très restreintes et contrôlées pour des applications exclusivement consacrées à la recherche (antidotes et épurateurs).[328] Sur 195 pays dans le monde, seuls cinq ont refusé de signer ce traité (Corée du nord, Égypte, Angola, Somalie et Syrie).

1.2.3.2. Structures d'inhibiteurs réversibles

L'inhibition réversible d'une enzyme consiste à lier cette dernière de manière covalente réversible (cas des carbamates ou des carbonates dont la libération du résidu de sérine catalytique est lentement réversible grâce à la triade catalytique, contrairement aux cas des armes chimiques dont la phosphorylation de ce résidu est irréversible) ou de manière non-covalente avec des molécules spécifiques, majoritairement grâce à des liaisons hydrogènes, des interactions hydrophobes et/ou ioniques.

L'AChE est devenue au fil des années une cible privilégiée pour le traitement palliatif de la MA, même si les nombreuses hypothèses décrites précédemment de manière non-exhaustives sont toujours investiguées.[329]

[327] Zorbaz, T.; Braïki, A.; *et al. Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 9675–9691.

[328] (a) Mercey, G.; Verdelet, T.; Renou, J.; Kliachyna, M.; Baati, R.; Nachon, F.; Jean, L.; Renard, P.-Y. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 756–766. (b) Renou, J. *et al. RSC Adv.* **2016**, *6*, 17929–17940.

[329] Cavalli, A.; Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Recanatini, M.; Melchiorre, C. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 347–372.

Quelques molécules naturelles sont connues comme étant des inhibiteurs de l'AChE et quelques composés synthétiques ont même pu être mis sur le marché français comme la tacrine (retiré du marché car hépatotoxique), le donepezil et la rivastigmine, respectivement en 1994, 1997 et 1998 (Figure 67).

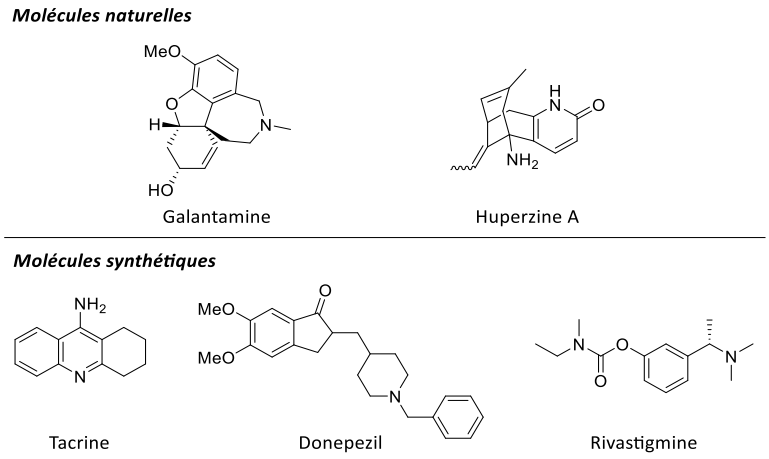


Figure 67. Structures d'inhibiteurs naturels et synthétiques de l'AChE.

Malheureusement, comme tous les composés disponibles sur le marché, ces inhibiteurs réversibles de l'AChE comme le donepezil par exemple ne constituent qu'un traitement symptomatique de la MA et ne permet qu'une amélioration restreinte (variable suivant les individus et le stade d'avancement de la MA) des capacités cognitives des patients et sur une durée très limitée d'environ deux ans. Passé ce délai, son efficacité devient quasiment inexistante comparativement aux traitements placébos et les nombreux effets secondaires indésirables conduisent à l'arrêt du traitement.[330]

Le donepezil possède la particularité d'être un ligand bidentate de l'AChE, car il interagit à la fois avec le SPA et le site d'acylation en passant par la gorge aromatique, contrairement aux autres molécules tout juste présentées (Figure 68).[331] En effet, la partie benzylique permet d'établir des interactions d'empilements π-π avec les résidus aromatiques situés vers le site anionique. Concernant le cycle pipéridine, son atome d'azote basique permet l'établissement de liaisons hydrogènes avec les molécules d'eaux structurelles et les chaînes latérales des résidus protéiques. Enfin, la partie 5,6-diméthoxy-indan-1-one permet

[330] (a) Hogan, D. B.; Patterson, C. *Can. J. Neurol. Sci.* **2002**, *29*, 306–314. (b) Selkoe, D. J.; Schenk, D. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2003**, *43*, 545–584.

[331] Cheung, J.; Rudolph, M. J.; Burshteyn, F.; Cassidy, M. S.; Gary, E. N.; Love, J.; Franklin, M. C.; Height, J. J. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10282–10286.

l'occupation et donc l'inhibition du SPA grâce aux multiples interactions d'empilements π-π avec les résidus aromatiques.

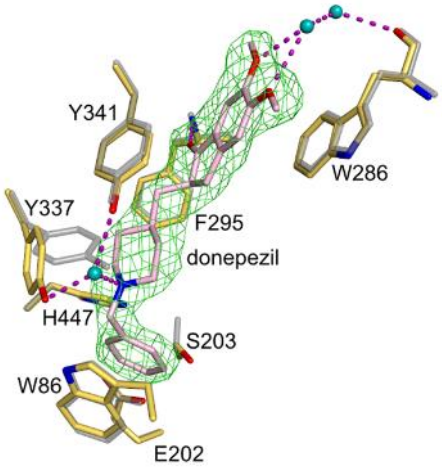


Figure 68. Simulation des interactions entre le donepezil et le site actif de l'AChE (figure extraite de l'article[331]). Les sphères de couleur cyan représentent les molécules d'eau structurelles.

Effectivement, selon l'hypothèse cholinergique, l'inhibition de l'AChE permet une augmentation artificielle de la concentration en ACh dans les fentes synaptiques, ce qui conduit à une amélioration des capacités cognitives en compensant l'inhibition des AChR par les agrégats de peptides Aβ et la baisse de production d'ACh. Qui plus est, l'occupation du site périphérique de l'enzyme permet dans une certaine mesure d'empêcher la formation de complexes stables AChE-peptides Aβ et donc la formation de plaques séniles suivant l'hypothèse de la cascade amyloïde.[332]

Le développement de ces ligands à double capacité de fixation (ligands homo-, hétérodimériques) est devenu un défi extrêmement intéressant, potentiellement applicable à la recherche de nouveaux traitements contre la MA, et qui se prête assez facilement à une approche de découverte de nouveaux ligands dimériques par KTGS.[333] Ces composés possèdent bien souvent de meilleures affinités avec les cibles grâce à la multiplication des points d'ancrage, ce qui provoque en parallèle une augmentation de la probabilité d'accroche de la molécule à la cible. La fixation d'une première partie du ligand va en effet permettre de rapidement fixer la seconde du fait la diminution entropique globale du système. De plus, un gain significatif de sélectivité en faveur de la cible thérapeutique peut être observé grâce à la

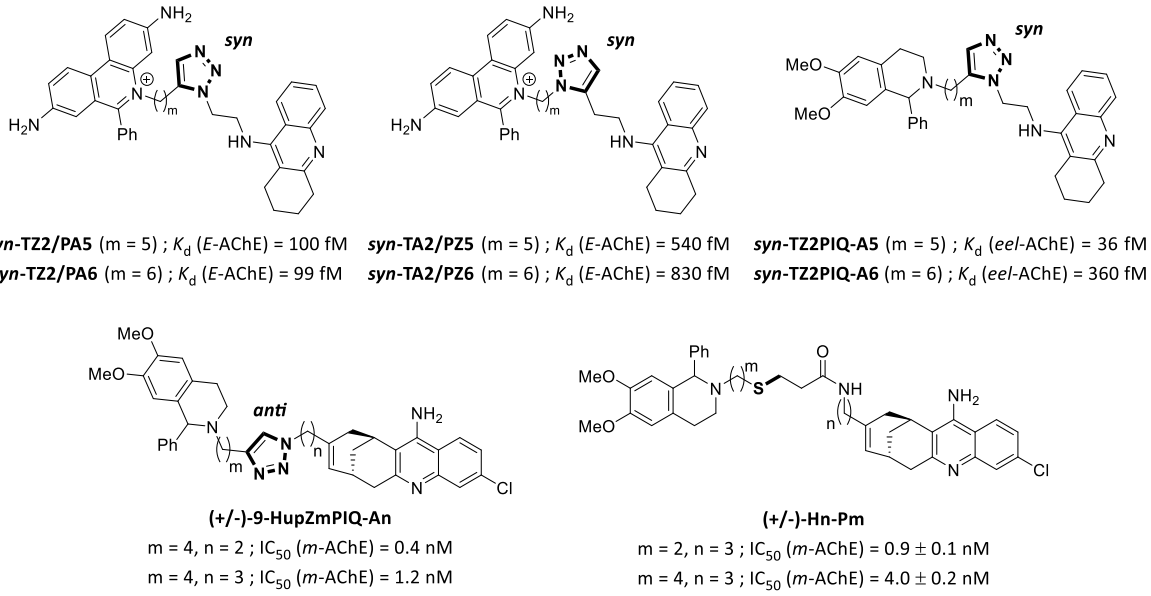
[332] Castro, A.; Martinez, A. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 4377–4387.

[333] Son, M.; Park, C.; Rampogu, S.; Zeb, A. Woo Lee, K. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1000–1015.

multiplication des interactions spécifiques, ce qui est un atout supplémentaire pour cette stratégie. De nombreux ligands dimériques de l'AChE ont ainsi été étudiés et décris dans la littérature.[334]

1.2.3.3. Les ligands découverts en KTGS

Comme décrit lors du premier chapitre d'introduction, la stratégie de KTGS permet précisément la formation de ligands hétérodimériques, voire hétérotri- et tétramériques, par réaction entre deux, trois ou quatre fragments réactifs au sein même de la cible. L'AChE a été employée comme cible modèle à plusieurs reprises pour le développement de nouvelles réactions en KTGS (réaction de click et addition de thia-Michael) et la recherche de nouveaux inhibiteurs bidentates, dont les structures sont rappelées ci-dessous (Figure 69).[93,95,100,150]



***syn*-TZ2/PA5** (m = 5) ; K_d (*E*-AChE) = 100 fM
***syn*-TZ2/PA6** (m = 6) ; K_d (*E*-AChE) = 99 fM

***syn*-TA2/PZ5** (m = 5) ; K_d (*E*-AChE) = 540 fM
***syn*-TA2/PZ6** (m = 6) ; K_d (*E*-AChE) = 830 fM

***syn*-TZ2PIQ-A5** (m = 5) ; K_d (*eel*-AChE) = 36 fM
***syn*-TZ2PIQ-A6** (m = 6) ; K_d (*eel*-AChE) = 360 fM

(+/-)-9-HupZmPIQ-An
m = 4, n = 2 ; IC_{50} (*m*-AChE) = 0.4 nM
m = 4, n = 3 ; IC_{50} (*m*-AChE) = 1.2 nM

(+/-)-Hn-Pm
m = 2, n = 3 ; IC_{50} (*m*-AChE) = 0.9 ± 0.1 nM
m = 4, n = 3 ; IC_{50} (*m*-AChE) = 4.0 ± 0.2 nM

Figure 69. Structures des ligands formés par l'AChE selon le processus de KTGS

1.3. Objectifs du projet

Le risque de résultats faux négatifs en raison de la non-détection des ligands formés et les temps d'incubation parfois longs, occasionnant une dégradation prématurée de certaines cibles, sont des limitations importantes en KTGS. Ainsi, l'augmentation artificielle de la

[334] (a) Camps, P.; Formosa, X.; Muñoz-Torrero, D.; Petrignet, J.; Badia, A.; Clos, M. V. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1701–1704. (b) Rosini, M. *et al. J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4381–4384. (c) Viayna, E. *et al. ChemMedChem* **2010**, *5*, 1855–1870. (c) Bizarro Lopes, J. P. *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 5566–5577.

détectabilité des ligands formés grâce à l'emploi de sondes moléculaire hautement détectables, grâce à des groupements de types marqueurs de masse ou fluorogéniques, est apparue comme étant une stratégie attrayante et conceptuellement accessible. En effet, en plus de limiter les risques de résultats du type faux négatifs, *via* la diminution artificielle des seuils de détection analytique. La possibilité de pouvoir observer plus facilement les produits formés pourrait permettre une réduction des temps d'incubations et donc de maximiser l'efficacité des cibles biologiques tout en accélérant les processus de criblage.

Deux approches ont été imaginées pour la détection tardive de la formation de ligands. La première consiste à fonctionnaliser un des fragments réactifs grâce à une fonction biologiquement discrète afin de pouvoir réaliser post incubation une réaction bioorthogonale permettant d'apporter, ou de former, des fonctions chimiques hautement ionisables et donc facilement détectables lors des analyses par LC-MS par amélioration du rapport signal/bruit (Schéma 102, **A**). La seconde approche, dite de « Click & Fish », qui repose sur l'utilisation de réactions biocompatibles séquentielles, vise à utiliser une stratégie de KTGS permettant de former au sein de la cible une nouvelle fonction présentant à la fois une très bonne stabilité biologique, mais également une certaine réactivité afin de pouvoir réagir spécifiquement avec des marqueurs (MS ou fluorescents) voire avec des sondes pro-fluorescentes (Schéma 102, **B**). Cette dernière stratégie nécessite de disposer de deux réactions complémentaires, orthogonales et compatibles (formation du ligand puis marquage de ce dernier). Si les deux réactions peuvent être menées de façon séquentielle, une utilisation simultanée permettrait une modification de l'affinité du ligand très affin formé par KTGS pour la cible et donc potentiellement d'éviter une occupation de tous les sites de la cible. C'est un biais potentiel de la stratégie de KTGS et qui peut s'apparenter au phénomène d'inhibition d'une enzyme par le produit de la réaction biocatalysée. Cette stratégie de « Click & Fish » menée en simultané pourrait potentiellement permettre une augmentation significative de la quantité de ligand formé, la cible endossant un double de rôle de template et de biocatalyseur pour former ces composés de haute affinité.

Dans l'optique d'établir rapidement une preuve de concept pour chacune des stratégies envisagées, la *m*-AChE[335] a été choisie comme premier modèle de cible

[335] La production de la *m*-AChE est réalisée par l'équipe du Dr. Florian Nachon (IRBA) à partir de cellules ovariennes d'hamsters chinois.

thérapeutique en raison de l'expérience acquise au laboratoire sur cette enzyme (en KTGS, recherche de ligands multi-cibles pour lutter contre la MA et développement de contre-mesures médicales aux intoxications par des agents organophosphorés), des partenariats établis avec les biologistes structuralistes de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA – Brétigny/Orge) et de l'Institut de Biologie structurale (Grenoble), capables de résoudre les structures de différents complexe ligand-AChE. De plus, la somme d'informations disponible dans la littérature vis-à-vis de cette cible en KTGS (conditions expérimentales, réactions de KTGS éligibles pour cette cible et structures des ligands associés…) a conforté ce choix.

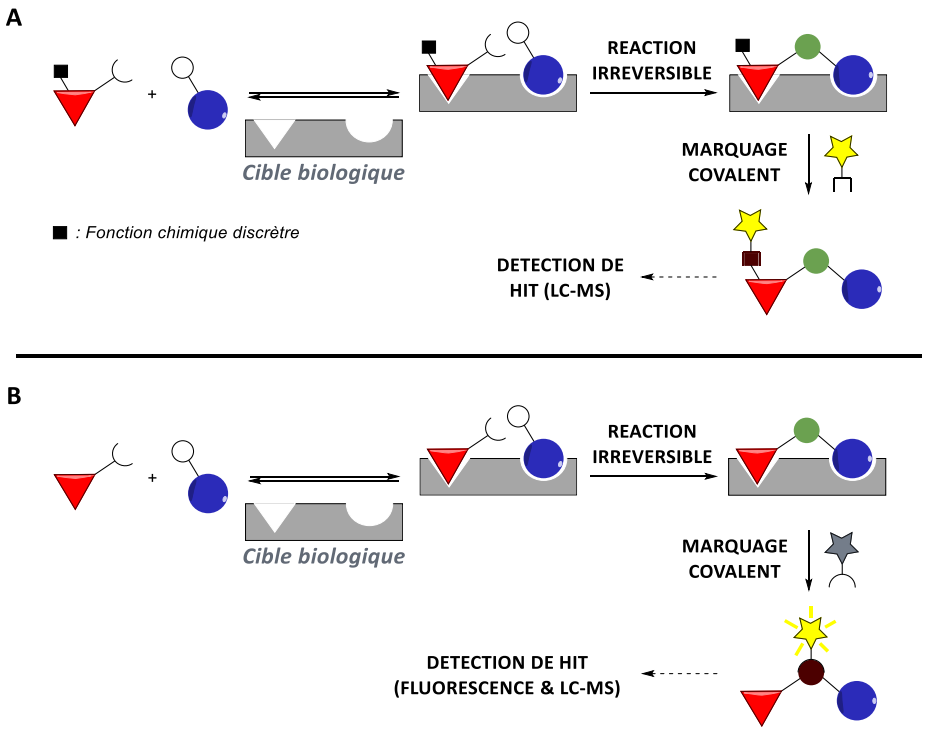


Schéma 102. (A) Stratégie de pré-marquage des réactifs par une fonction discrète pour l'amplification du signal MS. (B) Stratégie de réaction séquentielles et sélectives dite de « Click & Fish ».

II – Stratégie de pré-marquage des fragments et d'amplification de signaux MS via une réaction bio-orthogonale

2.1. Les sondes moléculaires en spectrométrie de masse

2.1.1. La spectrométrie de masse : quelques rappels

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse très employée et très présente dans les laboratoires de chimie du monde entier. Qu'elle soit effectuée en introduction directe ou par couplage de type LC-MS, sa très forte sensibilité permet la détection de produits à de très faibles concentrations dans un échantillon *via* la mesure de leur masse moléculaire avec un degré de précision dépendant de l'appareil. Cette méthode d'analyse est d'ailleurs la plus fréquemment employée lors d'expérience de KTGS pour la détection de potentiels hits.

Le processus d'analyse se compose de trois étapes se déroulant dans trois zones distinctes du spectromètre (Figure 70) :

- Les molécules présentes dans l'échantillon sont ionisées dans la source. Ce dernier peut être dissous dans un solvant, mélangé à une matrice d'ionisation, introduit à l'état brut (solide…), etc. Les molécules passent ainsi à un état de charge (positif ou négatif selon le mode utilisé) et les ions correspondants sont alors focalisés puis accélérés vers le spectromètre pour y être analysés.
- Après leur focalisation et leur accélération aux travers des lentilles, les ions sont séparés en fonction de leur ratio masse/charge (*m/z*) et/ou de leur vitesse par des analyseurs, aussi appelés « systèmes dispersifs ».
- Finalement, les ions sont collectés au niveau du détecteur ce qui permet leur transformation en courant électrique. L'intensité de ce dernier varie proportionnellement à la quantité d'ions collectés pour un composé donné.

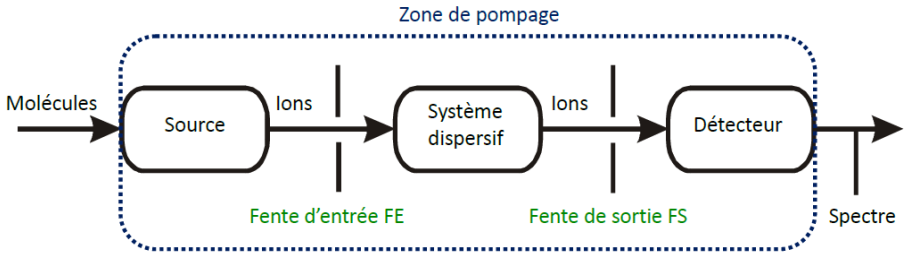


Figure 70. Conception simplifiée d'un spectromètre de masse.

De nombreux types de sources existent et reposent sur différents principes physiques pour permettre l'ionisation. Le choix de la source varie principalement selon la nature des échantillons et/ou des structures moléculaires à analyser. De manière non-exhaustive, les principales sources employées en routine aujourd'hui sont l'électronébulisation ou électrospray (ESI), l'ionisation à introduction directe sous pression atmosphérique (ASAP), l'analyse directe en temps réel (DART), l'ionisation et la désorption laser assistées par des matrices (MALDI) ou encore l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Dans l'ensemble, les différentes sources qui viennent d'être citées sont parmi les plus douces qui existent, c'est-à-dire qu'elles occasionnent peu de fragmentation lors de l'ionisation, ce qui permet de visualiser facilement des ions pseudo-moléculaires de type $[M+H]^+$ ou encore $[M+Na]^+$ des composés correspondants.

De manière similaire, les systèmes dispersifs peuvent être de natures très variées et sont employés selon la nature des composés analysés, le type de source utilisé ou encore la nécessité d'obtenir des spectres de basse ou de haute résolution (respectivement BR et HR). Les spectres de BR permettent de mesurer les masses moléculaires avec une précision de l'ordre du Da, voire du dixième de Da. En revanche, les spectres HR réalisés à l'aide d'appareils plus perfectionnés permettent de mesurer avec une très grande précision les masses moléculaires et donc de déterminer avec exactitude les formules brutes des ions détectés. De manière générale, les spectres HR ont une précision de l'ordre de 10^{-4} Da, mais certains appareils permettent d'atteindre une résolution > 10^6, ce qui revient à pouvoir différencier la masse d'un électron avec une précision de l'ordre de 10^{-5} Da. Parmi ces analyseurs les plus couramment utilisés, nous retrouvons le quadripôle (Q), la trappe ionique ou piège d'ions, le temps de vol (TOF), etc. Ces différents analyseurs peuvent pour certains être combinés afin de réaliser des sélections d'ions pour des études de fragmentations (MS/MS) et/ou afin d'augmenter la résolution des analyses (par exemples : Q-TOF, Q-Orbitrap, TOF-TOF, triple Q…).

Les détecteurs les plus communs aujourd'hui sont l'électromultiplicateur (ou multiplicateur d'électrons) et le tube photomultiplicateur. Ces deux systèmes comportent des systèmes d'amplification du signal grâce à des dynodes en série. Ces systèmes étant complexes et leur fonctionnement reposant sur des principes physiques avancés, ils ne seront pas plus détaillés ici.

En plus des nombreux progrès techniques et instrumentaux qui ont été réalisés lors des dernières décennies, quelques exemples dans la littérature décrivent l'emploi de sondes chimiques permettant l'obtention d'amas isotopiques caractéristiques de composés marqués et/ou permettant l'augmentation artificielle de l'intensité des signaux.

2.1.2. Amas isotopiques caractéristiques

Les espèces possédant plusieurs nucléides permettent l'obtention d'amas isotopiques caractéristiques et facilement modélisables par différents logiciels afin de comparer les résultats expérimentaux et théoriques.

L'atome de brome par exemple possède deux nucléides (^{79}Br et ^{81}Br) dont les abondances naturelles sont équivalentes (≈ 50% / 50%). Ainsi, l'amas isotopique de composés organiques mono-bromés est toujours composés de deux pics mono-isotopiques d'intensités égales et séparés de deux unités de masse (Figure 71).

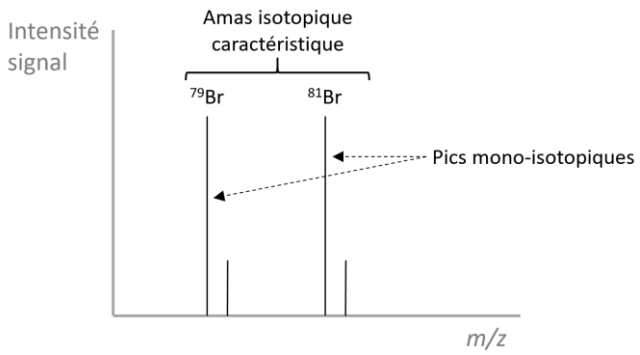


Figure 71. Exemple théorique de l'amas isotopique d'un composé organique simple mono-bromé.

La fonctionnalisation de biomolécules par de petits composés bromés a permis de nombreuses applications dans le domaine de la protéomique,[336] du marquage de peptides[337] ou encore de la détection de métabolites réactifs.[338] En plus de générer des amas isotopiques caractéristiques, la présence d'atome(s) de brome dans les structures résultantes a permis

[336] (a) Hernandez, H.; Niehauser, S.; Boltz, S. A.; Gawandi, V.; Phillips, R. S.; Amster, I. J. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3417–3423. (b) Palaniappan, K. K.; Pitcher, A. A.; Smart, B. P.; Spiciarich, D. R.; Iavarone, A. T.; Bertozzi, C. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 829–836.

[337] (a) Miyagi, M.; Nakao, M.; Nakazawa, T.; Kato, I.; Tsunasawa, S. A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 603–608. (b) Yang, Y.-Y.; Grammel, M.; Raghavan, A. S.; Charron, G.; Hang, H. C. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 1212–1222. (c) Maxson, T.; Tietz, J. I.; Hudson, G. A.; Guo, X. R.; Tai, H.-C.; Mitchell, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 15157–15166.

[338] LeBlanc, A.; Shiao, T. C.; Roy, R.; Sleno, L. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 1241–1250.

dans certains cas d'augmenter l'ionisabilité des composés et donc d'abaisser les limites de détections analytiques.[339]

Plus récemment, une sonde bimodale **BPT** permettant un marquage simultané de fluorescence et isotopique du brome a été développée dans le but d'augmenter la détectabilité de petites molécules naturelles comme la lysine (Schéma 103).[339]

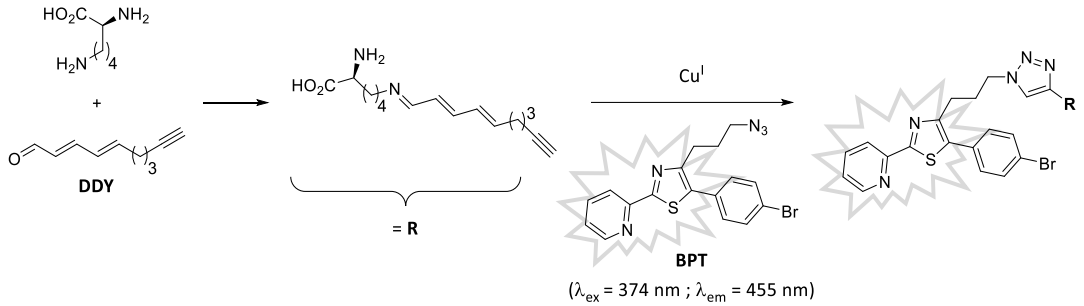


Schéma 103. Marquage séquentiel de la lysine par le BPT.

Dans un premier temps, la lysine native a été fonctionnalisée par l'aldéhyde **DDY** *via* la formation d'une liaison imine stable, grâce à la conjugaison électronique, suivie par une réaction orthogonale de CuAAC permettant de marquer l'imine intermédiaire par la sonde **BPT**.

Cette stratégie de marquage a pu être à nouveau appliquée afin de faciliter la quantification et la localisation des fonctionnalités apportées lors de réactions de bioconjugaison avec des biomolécules.[340] Pour cela, les auteurs ont préparé la coumarine **Coum-Az-Br** mono-bromée et fonctionnalisée par un azoture dans le but de pouvoir marquer des biomolécules fonctionnalisées par des alcynes vrais *via* des réactions de CuAAC ou de SPAAC (Schéma 104). Grâce à la signature isotopique de l'atome de brome et aux propriétés de fluorescence de type OFF → ON, l'interprétation des analyses de mélanges complexes et/ou après des digestions enzymatiques de molécules marquées a été grandement facilitée. En effet, la disparition de la fonction azoture, responsable de l'extinction de fluorescence de

[339] Wolfram, S.; Würfel, H.; Habenicht, S. H.; Lembke, C.; Richter, P.; Birckner, E.; Beckert, R.; Pohnert, G. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2470–2479.

[340] Yang, L.; Chumsae, C.; Kaplan, J. B.; Moulton, K. R.; Wang, D.; Lee, D. H.; Zhou, Z. S. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 2302–2309.

la coumarine par un phénomène de TeP, lors de la formation du cycle triazole permet un recouvrement instantané des propriétés spectrales de la coumarine.

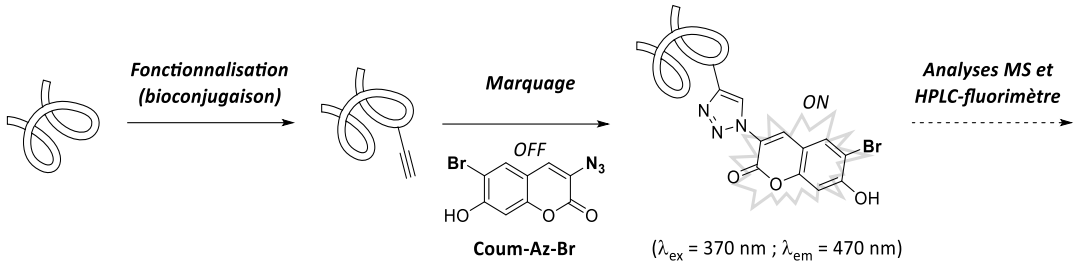


Schéma 104. Marquage isotopique et de fluorescence de biomolécules fonctionnalisées par des alcynes terminaux.

2.1.3. Augmentation artificielle de l'intensité du signal

En raison de la présence d'une charge permanente au sein de leurs structures, certaines fonctions chimiques sont connues pour leurs fortes réponses lors d'analyses MS. En effet, la nature ionique de ces composés permet la focalisation et l'accélération directes de quasiment tous les ions injectés à l'origine dans la source. Ainsi, le flux ionique qui arrive au détecteur est proportionnellement plus intense que les autres composés neutres au départ, ce qui conduit à un excellent rapport signal sur bruit. De plus, l'emploi de tampons ou de matrices d'ionisation lors de l'échantillonnage n'est également plus impératif, ce qui permet l'analyse directe des milieux sans conditionnement particulier. Les sels d'ammonium et de phosphonium sont des exemples très représentatifs de ces composés fortement détectables par analyses MS. La famille des ammoniums est relativement étendue puisqu'elle inclut les ammoniums quaternaires[341] et les différents sels de types pyridinium, isoquinoliniums ou encore imidazoliums.[342] La famille des phosphoniums biocompatibles est en revanche plus restreinte puisqu'elle ne compte que les sels detriéthylphosphoniums **TEPP** (de manière anecdotique),[343] de triphénylphosphoniums **TPP** et de tris(triméthoxyphényl)phosphoniums **TMPP** (Figure 72).

[341] (a) Setner, B.; Szewczuk, Z. *Anal Bioanal Chem* **2018**, *410*, 1311–1321. (b) Zhuang, M.; Hou, Z.; Chen, P.; Liang, G.; Huang, G. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 7308–7312.

[342] Waliczek, M.; Kijewska, M.; Rudowska, M.; Setner, B.; Stefanowicz, P.; Szewczuk, Z. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 37720–37732.

[343] DeGraan-Weber, N.; Ward, S. A.; Reilly, J. P. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2017**, *28*, 1889–1900.

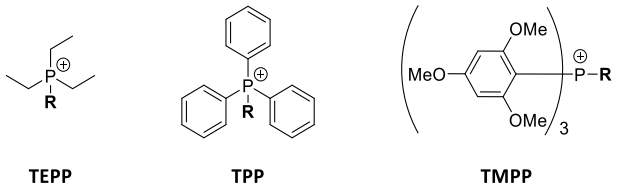


Figure 72. Structures des phosphoniums biocompatibles employés pour la marquage MS.

C'est en 1991 que le groupe du Pr. Wagner a pu démontrer que la fonctionnalisation d'un nonapeptide en position *N*-terminale ou *C*-terminale par un **TPP** permettait d'augmenter significativement la détection MS (Figure 73).[344]

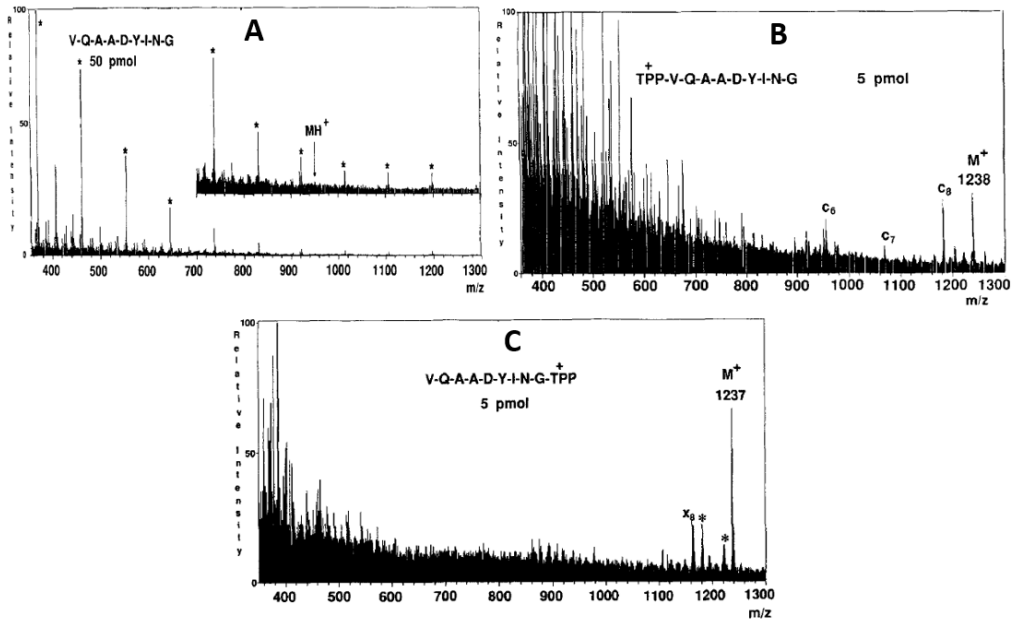


*Figure 73. (**A**) Spectre de masse du peptide natif (50 pM). (**B**) Spectre de masse du peptide marqué en postion C-terminale par le **TPP** (5 pM). (**C**) Spectre de masse du peptide marqué en postion N-terminale par le **TPP** (5 pM). Les spectres ont été réalisés à l'aide d'une source à bombardement atomique rapide (FAB). * : pics correspondants à la matrice glycérol. Les figures sont extraites et modifiées de l'article.*[344]

En effet, l'ion pseudo-moléculaire du peptide natif n'a pas pu être détecté lors de son analyse MS à partir d'une solution à 50 pM. En revanche, les peptides marqués en positions *N*- et *C*-terminales ont pu être très facilement détectés à partir de solution dix fois plus diluée (5 pM). L'emploi de **TMPP** comme amplificateur du signal MS a permis le marquage de nombreuses molécules de faibles poids moléculaires (< 500 g/mol) et leurs analyses grâce à

[344] Wagner, D. S.; Salari, A.; Gage, D. A.; Leykam, J.; Fetter, J.; Hollingsworthrth, R.; Watson, J. T. *Biol. Mass Spectrom.* **1991**, *20*, 419–425.

différentes sources d'ionisation (ESI, MALDI…).[345] Cette technique a permis d'abaisser très significativement les limites de détection et de quantifications de ces molécules, parfois difficilement détectables à faibles concentrations.[346]

De plus, la très grande stabilité des **TMPP** face à la fragmentation permet l'observation des ions moléculaires sans trop de difficultés et/ou d'étudier la fragmentation des analytes étudiés sans pour autant détruire la sonde **TMPP**, ce qui simplifie grandement les attributions de signaux. De même, la parfaite stabilité des **TMPP** fonctionnalisant divers métabolite en conditions d'HPLC en phase inverse a permis d'améliorer les conditions et les résultats des analyses HPLC (vitesse de gradient, résolution, formes des pics...).[345(b)] L'apport d'une masse importante (≥ 532 g/mol, correspondant à la masse de la phosphine de départ) par la sonde aux analytes légers permet d'atteindre des gammes de ratios *m/z* où la confusion avec des ions provenant de la matrice d'ionisation est plus difficile et où la résolution instrumentale est plus élevée.[345(c)] En effet, cette dernière n'est pas une valeur constante d'un système dispersif à l'autre, voire entre deux spectromètres similaires, et est parfois non-linéaire selon les valeurs de *m/z* des ions analysés.

D'autres types de sondes photo-activables ont vu le jour depuis les deux dernières décennies, notamment pour les sources MALDI dont la désorption et l'ionisation sont en partie réalisées par un laser puissant. La génération de cations trityliums par un rayonnement lumineux a ainsi pu être appliquée pour la détection de peptides,[347] d'oligonucléotides[348] et en protéomique.[349] L'activation de la sonde et sa détection permettent soit de détecter directement la biomolécule marquée (Schéma 105, **A**), ou bien indirectement grâce à un reporter chimique dont la masse est prédictible et spécifique de la biomolécule marquée grâce à la nature du groupement R (Schéma 105, **B**). La détection des glycanes cellulaires par MS est

---

[345] (a) Claereboudt, J.; Claeys, M.; Geise, H.; Gijbels, R.; Vertes, A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 798–812. (b) Leavens, W. J.; Lane, S. J.; Carr, R. M.; Lockie, A. M.; Waterhouse, I. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 433–441. (c) Lee, P. J.; Chen, W.; Gebler, J. C. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4888–4893.

[346] (a) Sadagopan, N.; Watson, J. T. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 107–119. (b) Woo, H.-K.; Go, E. P.; Hoang, L.; Trauger, S. A.; Bowen, B.; Siuzdak, G.; Northen, T. R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 1849–1855.

[347] Ustinov, A. V. *et al. Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 4593–4608.

[348] Bernard, P. L. Jr; Khan, S.; Korshun, V. A.; Southern, E. M.; Shchepinov, M. S. *Chem. Commun.* **2005**, *27*, 3466–3468.

[349] Lorey, M.; Adler, B.; Yan, H.; Soliymani, R.; Ekström, S.; Yli-Kauhaluoma, J.; Laurell, T.; Baumann, M. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 5255–5262.

difficile car ces biomolécules neutres sont peu ionisables. Or, la caractérisation des glycanes d'une cellule est indispensable pour connaître sa nature, pour l'étude de la chimiorésistance vis-à-vis d'un principe actif ou pour des traitements oncologiques. Ainsi, différentes lectines ont pu être fonctionnalisées par des sondes photo-clivables et dont la chaîne R permet la caractérisation de la lectine correspondante (Schéma 105, **C**).[350] En effet, ces protéines possèdent des affinités spécifiques avec certains glycanes et une fois la reconnaissance, l'association et les lavages effectués, le rayonnement laser de la source MALDI permet de générer les ions thiochromeniums hautement détectables à faibles concentrations. La ratio *m/z* ainsi mesuré permet de connaître directement la nature du glycane cellulaire.

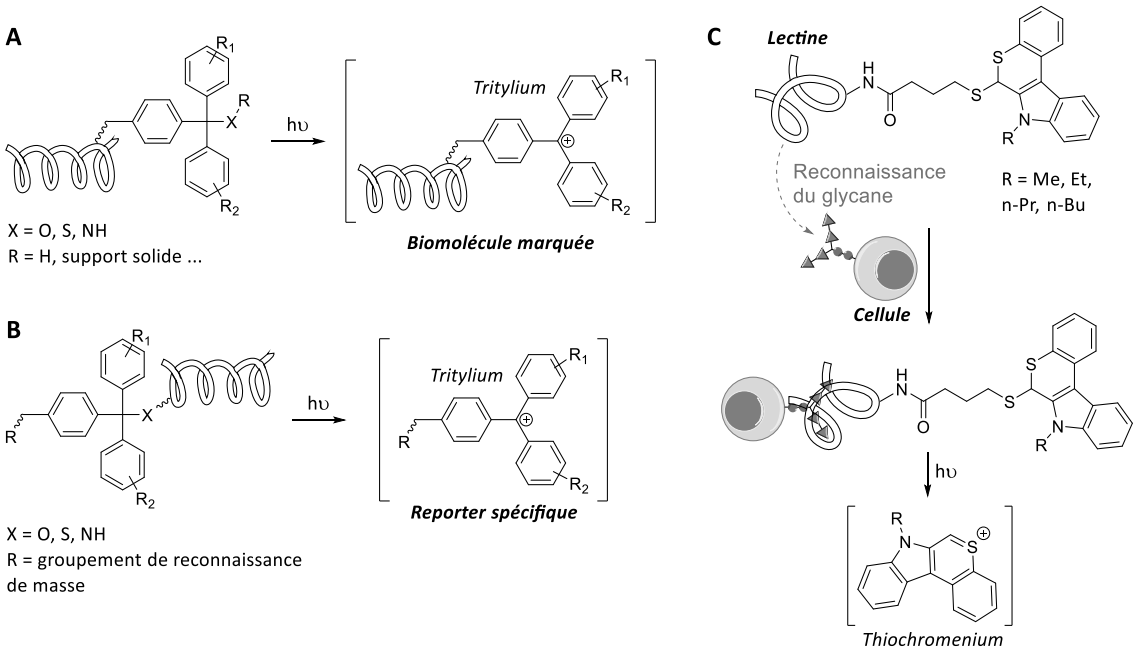


*Schéma 105. (**A**) Attache covalente stable de la sonde pour la détection directe de la biomolécule. (**B**) Attache clivable du reporter pour la détection indirecte de la biomolécule. (**C**) Emploi de reporters thiochromeniums photolabiles pour la détection spécifique de glycanes cellulaires.*

Par analogie aux sondes bromées et fluorescentes présentées précédemment, de nouvelles sondes permettant l'amplification du signal MS et possédant des propriétés d'émission de fluorescence sont apparues. En 2016, le groupe du Dr. Sabot a développé de nouvelles sondes biocompatibles présentant un motif coumarine fluorescent et une fonction phosphonium pour l'augmentation du signal MS (Schéma 106).[351]

[350] Han, J.; Huang, X.; Liu, H.; Xiong, C.; Nie, Z. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 10958–10962.

[351] Lizzul-Jurse, A.; Bailly, L.; Hubert-Roux, M.; Afonso, C.; Renard, P.-Y.; Sabot, C. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 7777–7791.

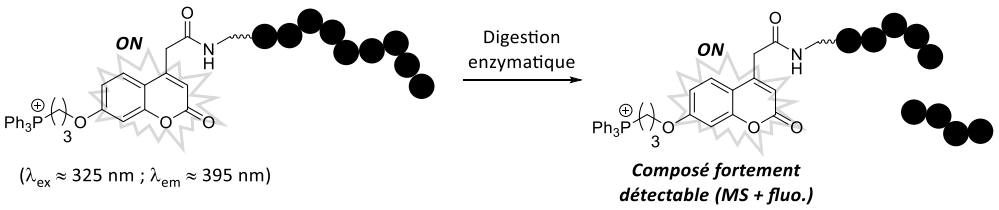


Schéma 106. Principe d'application des sondes bimodales (MS + fluo.) pour l'étude de digestion enzymatique de peptides et de protéines.

Ces travaux ont permis le double marquage de biomolécules (peptide et protéine) dans le but de faciliter l'interprétation des analyses LC-MS obtenues suite à la digestion enzymatique de ces composé grâce à l'augmentation du signal MS et aux propriétés de fluorescence. De plus, ces sondes ont présenté une bien meilleure hydrosolubilité que les coumarines plus classiques, ce qui est très avantageux pour le marquage en conditions physiologiques. Ces résultats préliminaires pourraient à terme trouver de nombreuses applications dans le domaine de la protéomique. De plus, diverses fonctions permettant de réaliser différentes réactions de BioCn ou de LB/C (alcyne vrai, amine, 5-éthoxyoxazole…) ont pu être incorporées à ces sondes ce qui permet une excellente modulation des conditions expérimentales de ligation et un choix plus important dans les partenaires réactifs. Malheureusement, ces composés sont accessibles *via* plusieurs étapes de synthèses et le marquage des biomolécules nécessite une étape de lavage et/ou de purification avant l'emploi des composés marqués.

Par ailleurs, il a pu être établi lors de cette étude que les ammoniums quartenaires ne possèdent pas la même détectabilité que leurs analogues phosphoniums. En effet, les analyses MS d'un mélange équimolaire de sonde phosphonium **98** et de son analogue ammonium quaternaire **99** indiquent clairement que l'intensité du signal correspondant à ce dernier est bien moindre (Figure 74). Ce phénomène a probablement pour origine une instabilité supérieure des ammoniums dans les conditions MS, ce qui conduit à une fragmentation non désirée plus importante au travers de la source et/ou du système dispersif.

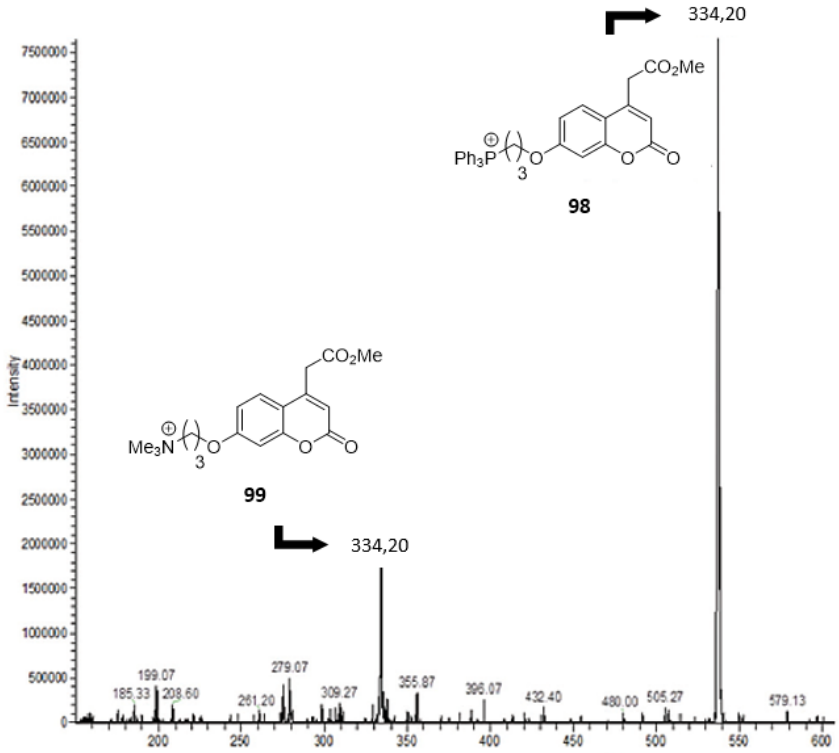


*Figure 74. Spectre de masse d'un mélange équimolaire d'ammonium quaternaire **99** et de son analogue phosphonium **98** (figure extraite et modifiée de l'article[351]).*

2.2. Pré-marquage des fragments réactifs par la fonction azoture

Grâce à sa petite taille et à sa bonne bioorthogonalité, la fonction azoture est biologiquement discrète, ce qui a ouvert de très nombreuses applications et opportunités en chemobiologie.[352] Par exemple, l'utilisation d'un sucre modifié *via* une fonction azoture sur une position n'influençant pas ses propriétés biologiques et biochimiques a conduit après incorporation métabolique du sucre modifié dans des glycanes. Cette fonctionnalisation par un reporter discret a ainsi permis d'étudier divers processus biologiques à l'échelle cellulaire grâce à des réactions bioorthogonales applicables de manière *in vivo* comme la SPAAC, présentée dans l'introduction de ce manuscrit, ou encore la ligation de Staudinger-Bertozzi (LSB) qui sera détaillée par la suite dans ce chapitre.

La modification d'une petite molécule d'intérêt thérapeutique par une fonction azoture n'est pas toujours synonyme d'une perte de son activité biologique comme cela a pu

[352] (a) Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Baskin, J. M.; Carrico, I. S.; Chang, P. V.; Ganguli, A. S.; Hangauer, M. J.; Lo, A.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *Meth. Enzymol.* **2006**; *415*, 230–250. (b) Zhang, X.; Zhang, Y. *Molecules* **2013**, *18*, 7145–7159. (c) Takayama, Y.; Kusamori, K.; Nishikawa, M. *Molecules* **2019**, *24*, 172–192. (d) Daughtry, J. L.; Cao, W.; Ye, J.; Baskin, J. M. *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 318–324.

être démontré par le groupe du Dr. Wagner, dans le but d'élaborer un système de « médicament et antidote ».[353] Un anticoagulant commercial, la Warfarin (**Wn**), a ainsi pu être modifié à l'aide d'une fonction azoture sur la chaîne latérale aromatique en fournissant l'analogue **WN_3** (Figure 75, **A**). Une activité relativement similaire vis-à-vis de la coagulation chez la souris a pu être observée entre la **Wn** de référence et l'analogue **WN_3**. De son côté, un agent de neutralisation **BCN-peg_6-OH** , très hydrosoluble grâce à sa chaîne PEG, peut réagir en milieu biologique avec les azotures organiques par réaction de SPAAC (Figure 75, **B**). Ainsi, la réaction entre la **WN_3** et le **BCN-peg_6-OH** permet la suppression de l'activité biologique en conduisant au composé **Wn-Tz-peg_6-OH** qui est très soluble en milieux aqueux, ce qui permet son élimination rapide de l'organisme par les reins et les urines (Figure 75, **C**).

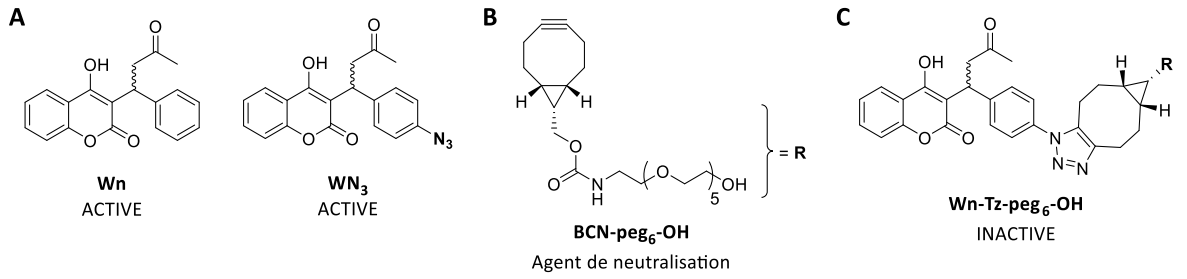


*Figure 75. (**A**) Structures de la Warfarin **Wn** et de l'analogue **WN_3**. (**B**) Structure de l'agent de neutralisation **BCN-peg_6-OH**. (**C**) Structure de la molécule neutralisée **Wn-Tz-peg_6-OH**.*

Pour le projet de pré-marquage des fragments réactifs en vues d'applications en KTGS pour la détection des ligands formés, la fonction azoture s'est donc naturellement imposée. Malgré le caractère discret de cette fonction, la fonctionnalisation des réactifs doit être réalisée de manière à provoquer le moins de gênes et de perturbation possible dans les interactions entre les fragments et la cible. Pour cela, les positions les plus éloignées des fonctions réactives et les régions moléculaires ne jouant pas de rôle de premier ordre dans les interactions avec la cible sont à privilégier. Dans le cadre de ce projet de pré-marquage et l'élaboration d'une preuve de principe, le ligand de l'AChE ***syn*-TZ2PIQ-A6**, qui a été identifié par KTGS grâce à la réaction de click et qui présente la structure chimique la plus simple d'accès, a été choisi comme modèle pour une fonctionnalisation par un azoture (Figure 76).[95] Ainsi, le groupement phényle présent sur la partie PIQ du ligand est apparue comme la région plus propice pour envisager une fonctionnalisation par un azoture sans pour autant risquer une modification très significative de l'activité biologique du composé. Finalement, la position

[353] Ursuegui, S.; Recher, M.; Krężel, W.; Wagner, A. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15242–15250.

para a été choisie pour réaliser cette modification comme le montre la structure du ligand ciblé **100**.

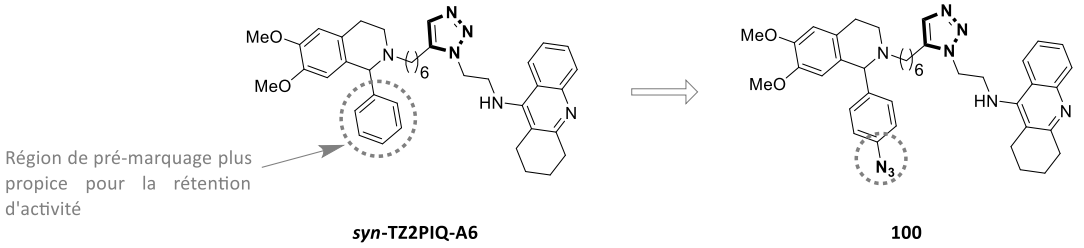


*Figure 76. Stratégie de pré-marquage du ligand modèle **syn-TZ2PIQ-A6** par un azoture et structure du ligand **100** associé.*

2.3. De la réaction de Staudinger à la ligation de Staudinger-Bertozzi

2.3.1. Réaction classique de Staudinger et ses intermédiaires associés

Découverte en 1919, la réaction de Staudinger entre un azoture organique et une phosphine conduit à l'amine et à l'oxyde de phosphine correspondants (Schéma 107).[354]

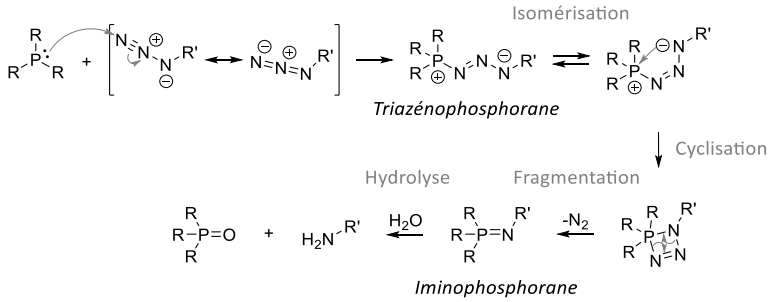


Schéma 107. Mécanisme réactionnel de la réaction de Staudinger classique.

Le mécanisme de la réaction se décompose en plusieurs étapes,[355] avec en premier lieu l'addition nucléophile de la phosphine sur l'azoture pour former le triazénophosphorane (ou triazaphosphadiène), le plus souvent de configuration *E*. L'isomérisation de ce composé en isomère *Z* permet la cyclisation du zwitterion, dont le cycle à quatre chaînons est relativement instable et se fragmente rapidement en libérant du diazote et un intermédiaire appelé iminophosphorane (ou phosphinimine). L'addition d'eau dans le milieu réactionnel permet finalement l'hydrolyse de ce dernier afin de former l'oxyde de phosphine et l'amine

[354] Staudinger, H.; Meyers, J. *Helv. Chim. Acta.* **1919**, *2*, 635–646.

[355] Tian, W. Q.; Wang, Y. A. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4299–4308.

correspondante. Il est intéressant de constater que l'ensemble des intermédiaires générés lors de la réaction ont été décrits, ou du moins proposés, dès la première publication de 1919.

Supposés instables pendant longtemps, les triazénophosphoranes et les iminophosphoranes ont finalement pu être isolés et analytiquement décrits[356] avant d'être employés en synthèse organique. Les triazénophosphoranes ont ainsi été formés en conditions anhydres par exemple la préparation d'hétérocycles azotés (Schéma 108, **A**)[357], de la coordination métallique[358] et pour la protection sélective d'azotures aromatiques, plus réactifs avec les phosphines enrichies en électrons, dont la déprotection est réalisée en conditions oxydantes à l'aide de soufre élémentaire S_8 (Schéma 108, **B**).[359]

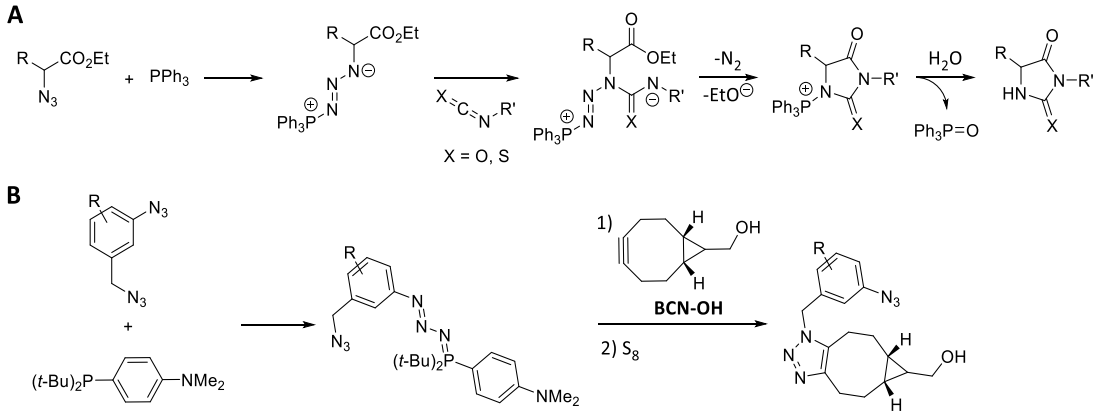


*Schéma 108. (**A**) Synthèse d'hétérocycles azotés à l'aide de triazénophosphoranes. (**B**) Protection sélective d'azotures aromatiques par formation de triazénophosphoranes.*

Les iminophosphoranes de leur côté ont été plus largement employés en synthèse organique.[360] Effectivement, ces composés sont notamment connus pour leur nucléophilie ce qui a permis de les employer dans la réaction d'*aza*-Wittig (Schéma 109). Cette stratégie a pu être employée pour la préparation de divers hétérocycles[360,361] et dans le cadre de réactions en cascade selon un processus en multi-composés.[362]

[356] Wilson, S. R.; Perez, J.; Pasternak, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1994–1997.

[357] Fresneda, P. M.; Castañeda, M.; Sanz, M. A.; Molina, P. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1655–1657.

[358] Bebbington, M. W. P.; Bourissou, D. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1248–1261.

[359] Meguro, T.; Yoshida, S.; Igawa, K.; Tomooka, K.; Hosoya, T. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 4126–4130.

[360] Palacios, F.; Alonso, C.; Aparicio, D.; Rubiales, G.; de los Santos, J. M. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 523–575.

[361] (a) Aubert, T.; Farnier, M.; Guilard, R. *Can. J. Chem.* **1990**, *68*, 842–851. (b) Alajarín, M.; Sánchez-Andrada, P.; López-Leonardo, C.; Álvarez, Á. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7617–7623.

[362] Ma, X.; Zhang, X.; Xie, G.; Awad, J. M.; Zhang, W. *Tet. Lett.* **2019**, *60*, 151127–151132.

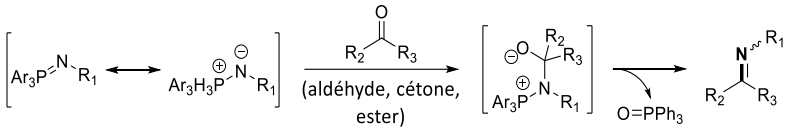


Schéma 109. Réaction d'aza-Wittig entre un iminophosphorane et différents dérivés carbonylés et carboxylés.

Aujourd'hui encore, l'emploi de ces fonctions en tant qu'intermédiaires de synthèse, de ligands pour métaux[363] ou encore comme organocatalyseurs[364] encourage le développement de nouvelles méthodologies de préparation d'iminophosphoranes stables et isolables par chromatographie. Par exemple, le groupe du Pr. McNally en 2018 a décrit une stratégie détournée de formation d'iminophosphoranes stables en faisant réagir de l'azoture de sodium et des TPP de pyridines et de pyrimidines à température élevée dans le DMSO (Schéma 110, **A**).[365] La formation d'un intermédiaire azoture aromatique a pu être détectée par analyse LC-MS et deux voies mécanistiques ont été proposées (Schéma 110, **B**).

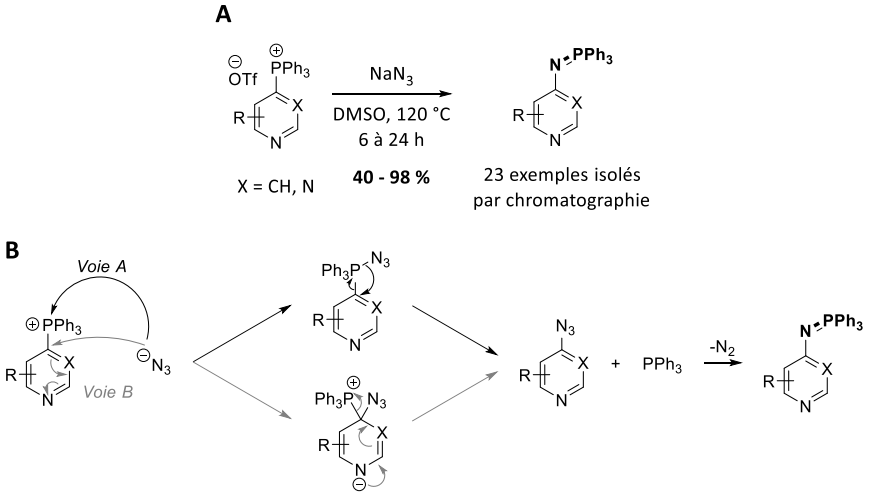


*Schéma 110. (**A**) Méthodologie générale de préparation d'iminophosphoranes stables. (**B**) Voies mécanistiques supposées.*

La voie A propose une addition de l'ion azoture sur le TPP suivie par un réarrangement qui permet la libération de la triphénylphosphine et de l'azoture. La voie B, privilégiée par les auteurs, repose sur un mécanisme de type S_NAr entre le TPP et l'anion azoture. Finalement, la triphénylphosphine et l'azoture organique réagissent selon un processus identique à celui

[363] (a) Stephan, D. W. *Organometallics* **2005**, *24*, 2548–2560. (b) Sun, R.; Wang, H.; Hu, J.; Zhao, J.; Zhang, H. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5954–5963.

[364] (a) Núñez, M. G.; Farley, A. J. M.; Dixon, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16348–16351. (b) Goldys, A. M.; Dixon, D. J. *Macromolecules* **2014**, *47*, 1277–1284. (c) Golec, J. C.; Carter, E. M.; Ward, J. W.; Whittingham, W. G.; Simón, L.; Paton, R. S.; Dixon, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 17417–17422.

[365] Patel, C.; Mohnike, M.; Hilton, M. C.; McNally, A. *Org. Lett.* **2018**, 20, 2607–2610.

présenté précédemment pour former l'iminophosphorane correspondant qui s'est avéré stable.

Plus récemment encore, le groupe du Pr. Budynina a décrit la préparation et l'emploi d'iminophosphoranes dans le cadre d'une cyclisation intramoléculaire d'*aza*-Wittig en présence de triphénylphosphine (Schéma 111).[366]

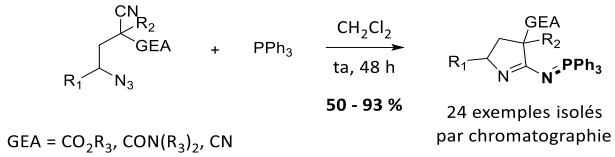


Schéma 111. Synthèse d'iminophosphoranes par réaction intramoléculaire d'aza-Wittig.

2.3.2. Modifications dans le cadre de la ligation bioorthogonale

La nucléophilie des iminophosphoranes a pu être exploitée en 2000, par le groupe du Pr. Bertozzi, qui est parvenu à modifier cette réaction de manière à pouvoir l'employer en milieux aqueux pour de la ligation bioorthogonale.[367] Ainsi, la ligation de Staudinger-Bertozzi (LSB) procède selon un processus très proche de la réaction classique, à ceci près que l'iminophosphorane généré intermédiairement est piégé par une réaction intramoléculaire avec un électrophile (fonction ester ici) située sur le cycle aromatique de l'aryle phosphine, en position ortho de l'atome de phosphore (Schéma 112).[368] Après hydrolyse, les deux unités de départ se trouvent liées grâce à la liaison amide formée et l'oxyde de phosphine correspondant demeure sur la molécule comme une fonction abiotique.

[366] Tukhtaev, H. B.; Ivanov, K. L.; Bezzubov, S. I.; Cheshkov, D. A.; Melnikov, M. Ya.; Budynina, E. M. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 1087–1092.

[367] Saxon, E.; Bertozzi, C. R. *Science* **2000**, *287*, 2007–2010.

[368] Lin, F. L.; Hoyt, H. M.; van Halbeek, H.; Bergman, R. G.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2686–2695.

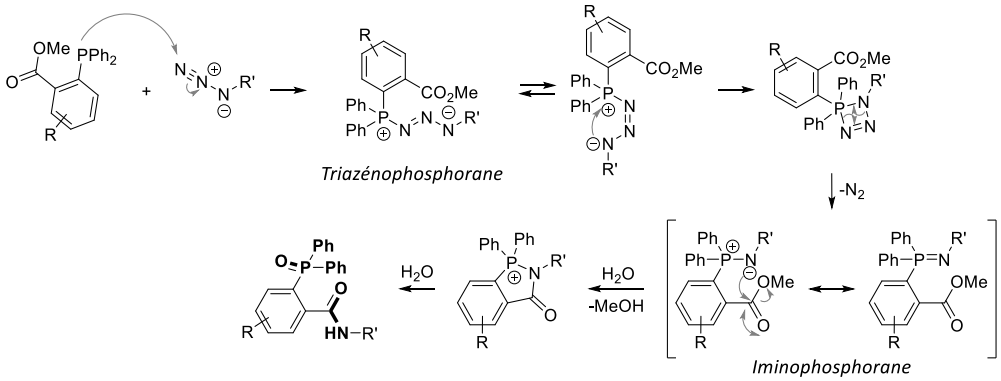


Schéma 112. Mécanisme réactionnel de la ligation bioorthogonale de Staudinger-Bertozzi.

Un mécanisme alternatif a également été proposé un peu plus tard. Il diverge sur la nature des espèces hydrolysables obtenues *in fine*, et semble être plus probable compte tenu des spectres RMN ^{31}P obtenus lors de la réaction (Schéma 113).[369]

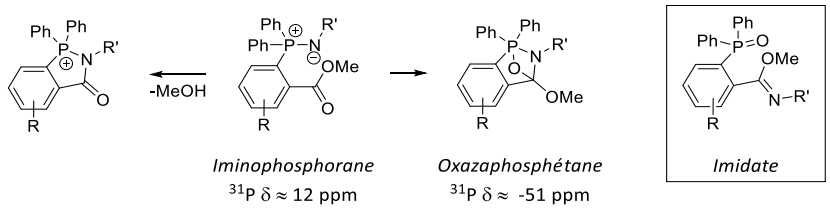


Schéma 113. Structures des intermédiaires hydrolysables formés à partir des iminophosphoranes.

En effet, parallèlement à la séquence d'addition-élimination réalisée par l'atome d'azote de l'iminophosphorane sur la fonction ester, la formation d'un oxazaphosphétane a pu être observée par RMN ^{31}P avec un signal vers -51 ppm, alors que les iminophosphoranes se trouvent plus généralement vers 4 – 12 ppm. Bien-sûr, l'hydrolyse de l'oxazaphosphétane conduit au même produit final mais cette observation a tout de même pu être mise à profit pour la préparation d'imidates (Schéma 113).[370]

Bien que cette réaction soit lente ($k_{obs} \approx 10^{-3}$ $M^{-1}.s^{-1}$),[368,371] sa bioorthogonalité et sa très grande tolérance fonctionnelle ont permis son emploi dans diverses applications[372] et

[369] Saxon, E.; Luchansky, S. J.; Hang, H. C.; Yu, C.; Lee, S. C.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14893–14902.

[370] Restituyo, J. A.; Comstock, L. R.; Petersen, S. G.; Stringfellow, T.; Rajski, S. R. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4357–4360.

[371] Leffler, J. E. ; Temple, R. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5235–5246.

[372] Pour des revues complètes sur le sujet, voir : (a) Köhn, M.; Breinbauer, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3106–3116. (b) van Berkel, S. S.; van Eldijk, M. B.; van Hest, J. C. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8806–8827. (c) Bednarek, C.; Wehl, I.; Jung, N.; Schepers, U.; Bräse, S. *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 4301–4354.

notamment en ingénierie cellulaire *in vivo*, à l'échelle cellulaire et du petit animal.[367,369,373] Cette ligation a également servi pour le marquage et des ligations bioorthogonales de diverses biomolécules[374] ou encore pour l'élaboration de nouvelles sondes pro-fluorescentes.[375]

Suite à leurs premiers travaux, les mêmes auteurs ont décrit une version « sans traces » de cette ligation en inversant la position du groupe partant sur l'électrophile piégeant l'iminophosphorane (Schéma 114, **A**).[376] Ainsi, la réduction et la fonctionnalisation séquentielles du partenaire azoture sont assurées par le partenaire phosphine, mais l'oxyde de phosphine formé est éliminé lors de l'hydrolyse finale. Pour cela, de nouvelles générations de phosphines facilement fonctionnalisables et dotées de linkers possédant des caractères nucléophuges ont été conçues (Schéma 114, **B**). Cette stratégie a permis des nombreuses ligations et fonctionnalisations de biomolécules[377] et la préparation de radiomarqueurs pour l'imagerie TEP.[378]

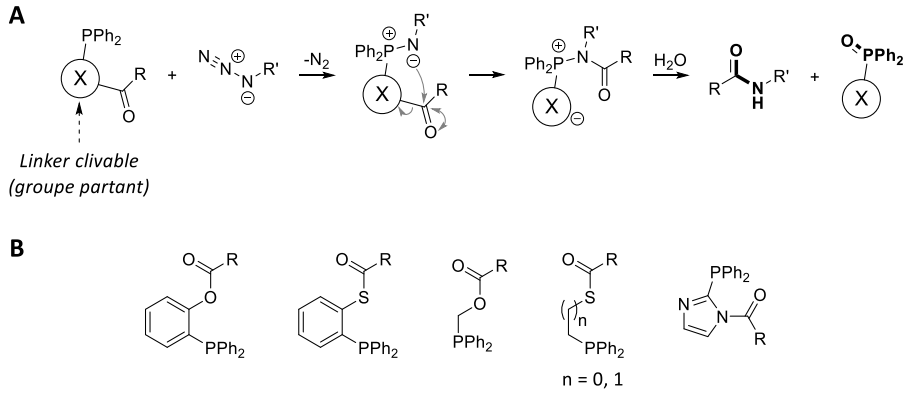


*Schéma 114. (**A**) Séquence réactionnelle de la ligation de Staudinger-Bertozzi « sans traces ». (**B**) Structures générales de phosphine à linkers clivables.*

[373] Saxon, E.; Bertozzi, C. R. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2001**, *17*, 1–23.

[374] (a) Kiick, K. L.; Saxon, E.; Tirrell, D. A.; Bertozzi, C. R. *PNAS* **2002**, *99*, 19–24. (b) Prescher, J. A. ; Dube, D. H. ; Bertozzi, C. R. *Nature*, **2004**, *430*, 873–877.

[375] (a) Lemieux, G. A.; de Graffenried, C. L.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4708–4709. (b) Pan, J. ; Downing, J. A. ; McHale, J. L. ; Xian, M. *Mol. BioSyst.* **2009**, *5*, 918–920. (c) Chakraborty, A.; Wang, D.; Ebright, Y. W.; Ebright, R. H. *Meth. Enzymol.* **2010**, *472*, 19–30.

[376] Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141–2143.

[377] (a) Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939–1941. (b) Liu, L. ; Hong, Z.-Y. ; Wong, C.-H. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 429–432. (c) Tam, A.; Soellner, M. B.; Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11421–11430. (d) Nisic, F.; Andreini, M.; Bernardi, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *33*, 5744–5751. (e) Schilling, C. I.; Jung, N.; Biskup, M.; Schepers, U.; Bräse, S. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4840–4871. (f) Wang, Z.-P. A.; Tian, C.-L.; Zheng, J.-S. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 107192–107199. (g) Wodtke, R.; König, J.; Pigorsch, A.; Köckerling, M.; Mamat, C. *Dyes Pigm.* **2015**, *113*, 263–273.

[378] Pretze, M.; Pietzsch, D.; Mamat, C. *Molecules* **2013**, *18*, 8618–8665.

2.4. Découverte et études d'iminophosphoranes stables comme amplificateurs de signaux MS

2.4.1. Premières observations MS

Les oxydes de phosphine sont bien connus des chimistes pour leur forte détectabilité, par exemple lors d'analyses LC-MS de bruts réactionnels. Dans le cadre de ce projet d'amplification de l'intensité des signaux MS, il a donc été supposé que la formation d'une telle fonction sur les ligands obtenus lors d'expériences de KTGS pourrait permettre une nette augmentation de la détectabilité de ces derniers lors des analyses par LC-MS. La réaction spontanée de LSB s'est donc trouvée en parfaite adéquation avec ce projet de pré-marquage par la fonction azoture (Schéma 115).

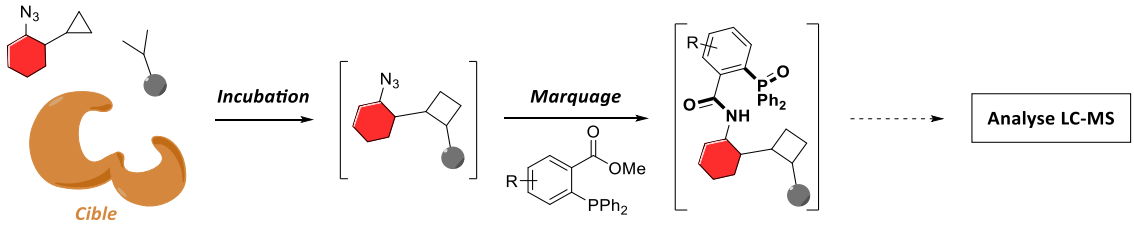


Schéma 115. Stratégie de d'amplification de l'intensité du signal MS par les oxydes de phosphine en KTGS.

Afin d'étayer cette hypothèse, l'amide **101** commercial a été choisi comme modèle afin de comparer sa réponse MS et avec celle d'un analogue **102** fonctionnalisé par un oxyde de phosphine (Figure 77).

*Figure 77. Structures des molécules modèles **101** et **102**.*

L'acide 2-(diphénylphosphaneyl)benzoïque commercial a donc été estérifiée selon la méthode de Steglish afin d'obtenir la phosphine **103**, susceptible de réagir selon le processus de la LSB, avec 84 % de rendement (Schéma 116).

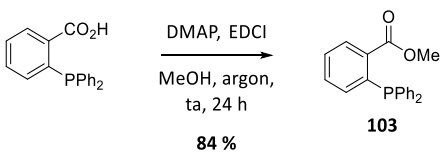


*Schéma 116. Synthèse de la phosphine **103** par estérification de Steglish.*

Finalement, l'oxyde de phosphine **102** a été obtenu avec un rendement de 50 % *via* la réaction de LSB entre la phosphine **103** et l'azoture de phényle dans un mélange équivolumique de THF et d'eau (Schéma 117).

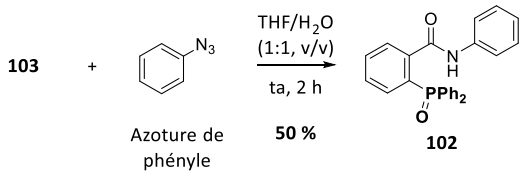


*Schéma 117. Préparation du composé **102** par réaction de LSB.*

Lors de la réaction, un suivi par analyse TLC-MS du milieu réactionnel a fourni un résultat inattendu. En effet, un signal MS très intense a été observé et l'étude du spectre correspondant a révélé qu'il s'agissait principalement d'intermédiaires réactionnels fortement ionisables et du produit souhaité sous forme d'adduit sodique (Figure 78). Ainsi, il est apparu que l'iminophosphorane **104**, ou plus exactement sa forme aminophosphonium, était suffisamment stable pour être observé plusieurs minutes après son dépôt sur un gel de silice (plaque CCM) et après une désorption à l'aide d'un mélange EtOH/$AF_{aq.}$ 0,1% (acide formique aqueux 0,1%) pour par l'analyse MS.

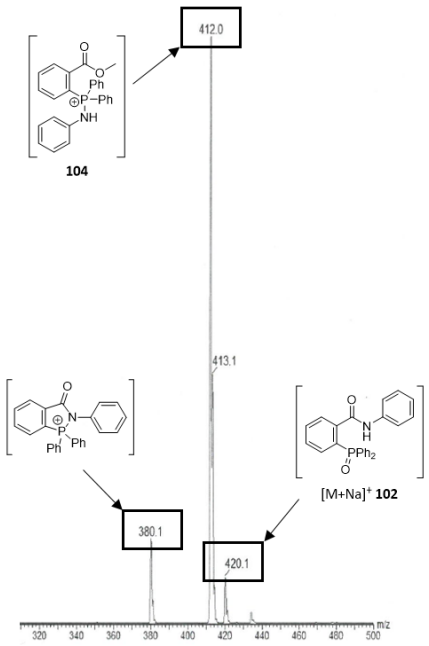
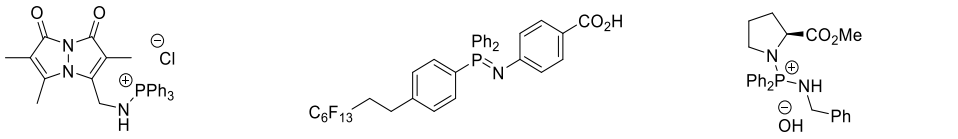


Figure 78. Spectre de masse obtenu par TLC-MS du brut réactionnel.

A la fois intrigués par cette première observation et encouragés par la forte réponse MS et l'apparente stabilité de l'intermédiaire iminophosphorane (observé sous la forme

protonée aminophosphonium), cette espèce a donc suscité notre intérêt en tant que potentiel amplificateur original de signal MS et ceci en lieu et place des oxydes phosphines. Une recherche bibliographique a donc été réalisée concernant la stabilité générale des iminophosphoranes et en particulier dans les milieux aqueux. Il s'est avéré que des exemples d'iminophosphoranes **105** et d'aminophosphoniums (**106** et **107**) ont pu être décris dans la littérature comme étant stables en milieux aqueux[379] ou qu'une température plus élevée (>> 37 °C) était nécessaire pour les hydrolyser en oxyde de phosphine et en amine correspondant selon la dernière étape de la réaction classique de Staudinger (Figure 79).[380]



105
Chlorhydrate stable
en milieux aqueux

106
Observé par RMN ^{31}P et LC-MS
(éluant : MeCN/$TFA_{aq.}$ 0,1 %)
Hydrolyse pour T > 50 °C

107
Isolé sous forme de sels d'hydroxyde
Hydrolyse pour T > 50 °C

Figure 79. Exemples d'iminophosphorane et d'aminophosphoniums stables en milieux aqueux et hydrolysables uniquement par chauffage en milieux aqueux.

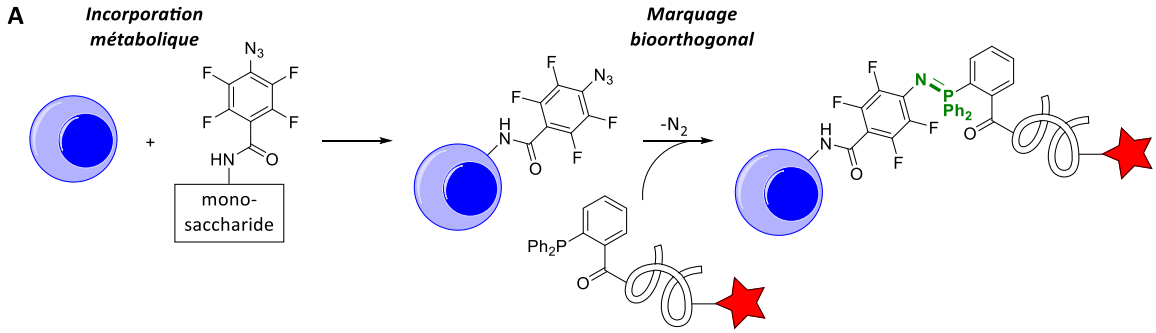
Ce projet de recherche étant centré sur le développement de nouvelles sondes moléculaires facilitant les analyses par LC-MS notamment, la caractérisation par LC-MS en conditions classiques d'éluants (MeCN/$TFA_{aq.}$ 0,1%, pH ≈ 1) et sans dégradation du composé **106** a été très encourageante quant à un hypothétique emploi des iminophosphoranes dans ce domaine.

De manière tout aussi surprenante, l'aminophosphonium **107** a été isolé avec l'anion hydroxyde comme contre-ion alors que ce dernier serait supposé pouvoir réaliser rapidement l'hydrolyse de ce composé selon la réaction classique de Staudinger.[381]

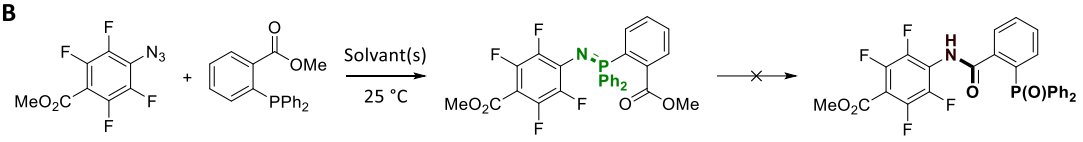
Il s'est finalement avéré qu'en 2017, une nouvelle ligation bioorthogonale de Staudinger « interrompue » entre des phosphines aromatiques et des azotures perfluorés (PFAAs) a été décrite et employée pour le marquage de membranes cellulaires (Schéma 118,

[379] Shalev, D. E.; Chiacchiera, S. M.; Radkowsky, A. E.; Kosower, E. M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1689–1701.
[380] (a) Lindsley, C. W.; Zhao, Z.; Newton, R. C.; Leister, W. H.; Strauss, K. A. *Tet. Lett.* **2002**, *43*, 4467–4470. (b) Park, C.-M.; Niu, W.; Liu, C.; Biggs, T. D.; Guo, J.; Xian, M. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4694–4697.
[381] Lukasak, B.; Morihiro, K.; Deiters, A. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1470–1476.

A).[382] En effet, après incorporation métabolique de monosaccharides fonctionnalisés par des azotures aromatiques perfluorés au sein des glycanes cellulaires, le marquage bioorthogonal des cellules a été effectué à l'aide d'une sonde possédant une phosphine aromatique. Le lien iminophosphorane ainsi obtenu s'est trouvé être tout à fait stable en conditions biologiques et chimiquement inerte.



B



108 **103** **109** **110**

Solvant(s)	k_{obs} ($M^{-1}.s^{-1}$)	*Rendement RMN (30 min)*
ACN-d_3	3,68 ± 0,03	91 %
ACN-d_3/D_2O (5:1, v/v)	6,5 ± 0,1	97 %
ACN-d_3/D_2O (1:1, v/v)	18,3 ± 0,7	97 %

*Schéma 118. (**A**) Marquage cellulaire bioorthogonal par ligation de PFAAs après incorporation métabolique du partenaire azoture. (**B**) Études cinétiques et de réactivité des iminophosphoranes obtenus par ligation de PFAAs.*

Les études cinétiques réalisées entre l'azoture **EstAzo4F** et la phosphine **103** ont permis d'établir que les milieux aqueux sont favorables vis-à-vis de la cinétique réactionnelle, qui peut atteindre des valeurs de constantes observées relativement élevée de 18,3 ± 0,7 $M^{-1}.s^{-1}$, et que les rendements observés par RMN étaient très bons (> 90 %) après seulement 30 minutes de réaction (Schéma 118, **B**). La réaction de PFAAs entre l'azoture **108** et la phosphine **103** a conduit à l'iminophosphorane **109** dont la grande stabilité en milieux aqueux (> 35 jours) n'a pas permis l'observation du composé **110** susceptible de se former selon le processus de la LSB classique. De même, cette catégorie d'iminophosphoranes a révélé une absence de réactivité lorsque ces derniers étaient placés sous conditions de réaction d'*aza*-Wittig. Cette ligation a pu être employée par la suite pour la fonctionnalisation de protéines[383] et pour la

[382] Sundhoro, M.; Jeon, S.; Park, J.; Ramström, O.; Yan, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 12117–12121.
[383] Ma, D.; Kang, X.; Gao, Y.; Zhu, J.; Yi, L.; Xi, Z. *Tetrahedron* **2019**, *75*, 888–893.

préparation de réactifs hétérofonctionnels à réactivités modulables pour des applications en double ligations séquentielles et en « *click & release* ».[384]

De ces différentes observations et études, il en ressort plusieurs points cruciaux pour la stabilisation des iminophosphoranes en conditions aqueuses (Figure 80) :

- Les phosphines aromatiques permettent une meilleure stabilisation de l'iminophosphorane correspondant, surtout si les cycles aromatiques sont enrichis en électrons (substituants de type GDE), ce qui empêche l'addition d'eau sur l'atome de phosphore et l'hydrolyse de la fonction.[381]
- La diminution du p*K*a et l'appauvrissement électronique important de l'atome d'azote par délocalisation du doublet électronique libre (substituants de type GEA et/ou de type inductif attracteur) empêche plus ou moins fortement sa protonation et donc l'hydrolyse de la liaison P=N.[382]
- L'encombrement stérique global dans l'environnement proche de la liaison P=N permet de fortement ralentir l'hydrolyse de l'iminophosphorane.[381]

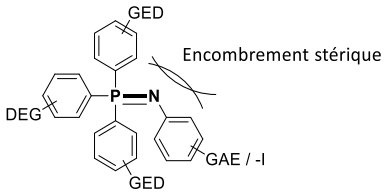


Figure 80. Paramètres modulables pour la stabilisation des iminophosphoranes dans les milieux aqueux.

2.4.2. Recherche d'un partenaire phosphine

Dans le but de former des iminophosphoranes stables en milieux aqueux tout en s'affranchissant de l'emploi d'azotures fortement appauvris en électrons comme dans le cas de la ligation PFAAs, la stabilisation du composé doit donc être assurée par le partenaire phosphine. De cette manière, les azotures organiques pouvant être marqués pour l'amplification MS auront une plus grande diversité structurale et cette méthode serait donc généralisable à un ensemble de fragments pré-marqués.

[384] Luo, W.; Luo, J.; Popik, V. V.; Workentin, M. S. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30*, 1140–1149.

Dans l'optique d'une étude préliminaire, un azoture modèle a donc été préparé et il a été décidé d'employer un azoture aromatique non volatil fonctionnalisé par une fonction amide situé en position *para*. Ainsi, la diazotation puis la substitution nucléophile aromatique par l'azoture de sodium de l'acide 4-aminobenzoïque a permis l'obtention de l'acide **111** avec 94 % de rendement, à partir de l'acide 4-aminobenzoïque (Schéma 119).

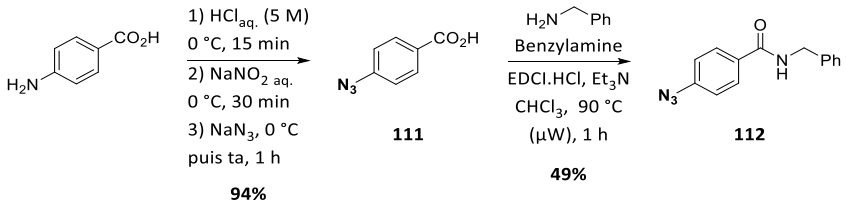


*Schéma 119. Synthèse en deux étapes de l'azoture modèle **112**.*

Suite à cela, la réaction d'amidation sous chauffage micro-ondes (µW) entre l'acide **111** et la benzylamine a permis l'obtention de l'azoture aromatique modèle **112** avec un rendement de 49%.[385]

Cinq phosphines aromatiques et commercialement disponibles ont ensuite été sélectionnées pour cette étude sur la formation, la stabilité et l'ionisation des iminophosphoranes correspondants (Figure 81). La triphénylphosphine **113** a été choisie pour servir de référence lors des études cinétiques pour la formation et l'hydrolyse des iminophosphoranes. Les phosphines enrichies en électrons **114**, **115** et **116** ont été choisies dans le but d'étudier l'influence des groupements donneurs méthoxy et de l'encombrement stérique sur la stabilisation des iminophosphoranes correspondants.

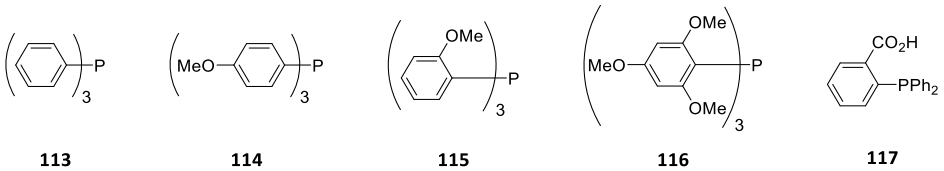


Figure 81. Phosphines aromatiques commerciales sélectionnées pour l'étude.

En ce qui concerne la phosphine **117**, il a été imaginé que la stabilisation interne des iminophosphoranes correspondants pouvait être assurée par l'acide carboxylique située en position *ortho* (Figure 82). En effet, la protonation partielle de l'atome d'azote conduirait à

[385] Hockey, S. C.; Barbante, G. J.; Francis, P. S.; Altimari, J. M.; Yoganantharajah, P.; Gibert, Y.; Henderson, L. C. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *109*, 305–313.

une forme de type phosphonium et dont les interactions ioniques avec la fonction carboxylate, accompagnée par la formation d'un cycle à cinq atomes, pourraient stabiliser le composé sous forme iminophosphorane.

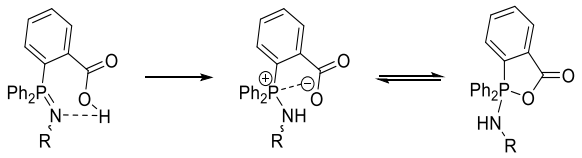


Figure 82. Modèle supposé de stabilisation interne d'iminophosphorane par la fonction acide carboxylique.

2.4.2.1. Étude de solubilité

En prévision des études cinétiques de formation et de stabilité des iminophosphoranes en milieux aqueux selon l'emploi des différentes phosphines, un système de solvant permettant la solubilisation des réactifs et produits formés a dû être recherché. Plusieurs systèmes ont donc été étudiés à l'aide des différents composés disponibles et il s'est finalement avéré que le meilleur compromis était un mélange de THF/MeOH/H_2O (2:1:1, v/v/v) (Tableau 13). Même si la phosphine **115** s'est montrée peu soluble dans ce système, la très bonne solubilité des autres composés étudiés dans un mélange composé à 25 % d'eau, soit 550 équivalents par rapport aux réactifs à une concentration de 0.025 M, a été suffisamment convaincante pour conserver ce système et ainsi écarter cette phosphine de l'étude.

Système de solvant	**112**	**113**	**Oxyde 113**	**114**	**115**	**116**	**117**
THF/MeOH/H_2O (2:1:1, v/v/v)	++	++	++	++	-	++	++

Conditions : Dissolution de chaque composé dans 1 ml de solvant(s) pour atteindre une concentration finale de 0.025 M.
Graduations relatives : ++ = très soluble ; + = soluble ; - = peu soluble ; -- = très insoluble

Tableau 13. Meilleur compromis de système de solvants organiques/aqueux par analyses qualitatives des solubilités.

2.4.2.2. Étude qualitative des cinétiques de formation d'iminophosphoranes

Afin de déterminer qualitativement la vitesse de formation des iminophosphoranes selon les différentes phosphines choisies, l'azoture modèle **112** a été solubilisé (C = 0.025 M, 1 éq.) dans le mélange de solvants THF/MeOH/H_2O (2:1:1) précédemment optimisé. Après homogénéisation, les phosphines **113**, **114**, **116** et **117** (1 éq.) ont été additionnées en une fois dans chaque milieu réactionnel et à température ambiante (Schéma 120). Les pourcentages

d'iminophosphoranes formés ont été calculés dans chaque cas par RMN $^{31}P\{H\}$ au cours du temps directement dans le mélange réactionnel, en comparant les ratios des signaux correspondant aux phosphines de départ, aux iminophosphoranes et aux oxydes de phosphines formés. Les iminophosphoranes sont des bases de Brønsted et leurs valeurs de p*K*a peuvent être variables selon la phosphine employée. Ainsi, à ce stade, leur état de protonation en conditions neutres n'était donc pas connu et ils ont donc été représentés ici sous la forme d'un équilibre entre les formes neutres iminophosphorane et protonées aminophosphonium.

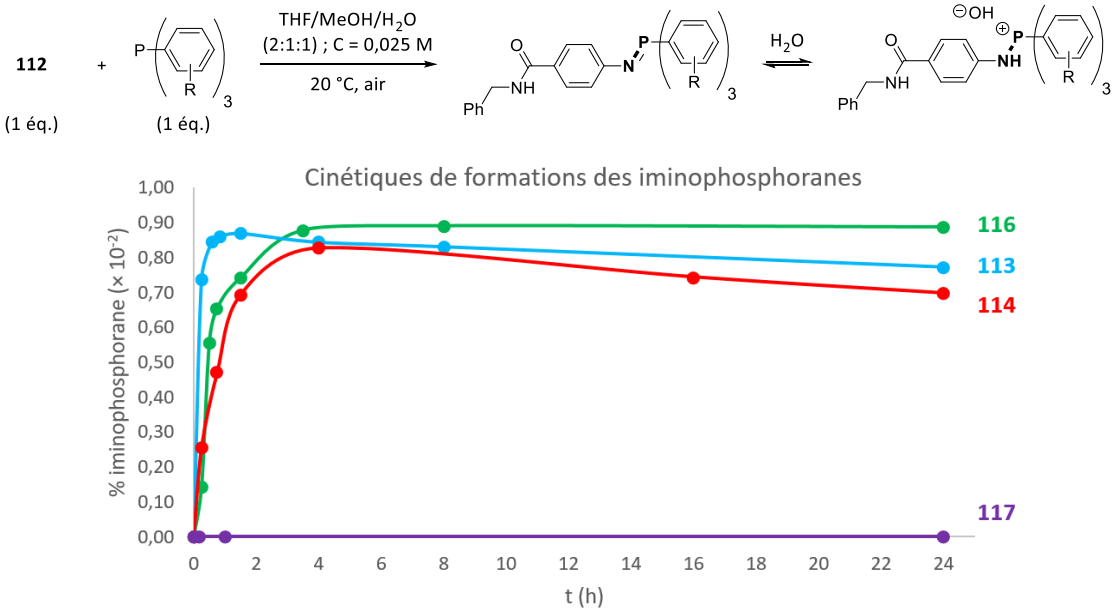


Schéma 120. Étude cinétique qualitative de formation d'iminophosphoranes en milieux organique/aqueux.

En premier lieu, l'iminophosphorane correspondant à la phosphine **117** n'a pas pu être observé car la réaction de Staudinger classique qui conduit à l'amine et à l'oxyde de triphénylphosphine correspondants a été totale en moins de 15 minutes dans ces conditions. Surpris par ce résultat, une recherche bibliographique plus approfondie a finalement confirmé que ce type de phosphine était particulièrement efficace pour la réduction des azotures en amines et elle a donc été immédiatement abandonnée.[386]

Concernant les trois autres phosphines, les formations relativement rapides des iminophosphoranes ont pu être constatées. Dans ces conditions de milieux aqueux non-

[386] (a) Saneyoshi, H.; Ochikubo, T.; Mashimo, T.; Hatano, K.; Ito, Y.; Abe, H. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 30–33. (b) Luo, J.; Liu, Q.; Morihiro, K.; Deiters, A. *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 1027–1034.

dégazés, l'oxydation naturelle des phosphines, en parallèle de la réaction, n'a pas permis l'obtention de conversions complètes (maximum de 90%) en iminophosphorane. Dans le cas des phosphines **113** et **114**, il a été observé que les iminophosphoranes correspondants étaient relativement instables du fait de leurs disparitions progressives au profit des oxydes de phosphines correspondants, provenant d'une hydrolyse de ces composés selon le processus classique de la réaction de Staudinger. En revanche, aucune hydrolyse n'a pu être constatée dans le cas de l'iminophosphorane formé à partir de la phosphine **116** ce qui prouve sa certaine stabilité en milieux aqueux.

Il est à noter que la formation des iminophosphoranes a été confirmée dans chaque cas par des analyses MS des milieux réactionnels grâce à l'observation des formes protonées aminophosphoniums et par RMN $^{31}P\{H\}$. Après deux heures de réaction, les conversions et ratios respectifs en iminophosphoranes pour les trois expériences ayant atteint des valeurs similaires de l'ordre de 80-90%, un mélange équivolumique des trois différents milieux réactionnels a été préparé afin de comparer en première approche les réponses MS des différents iminophosphoranes (Figure 83).[387] Ainsi, la meilleure réponse MS a été obtenue avec l'iminophosphorane **118** issu de la phosphine **116**, avec une intensité environ deux fois plus importante.

[387] Dilutions des trois milieux réactionnels dans un mélange MeCN/H_2O (1:1, v/v). Concentrations finales par rapport aux phosphines de départ : 5 µM.

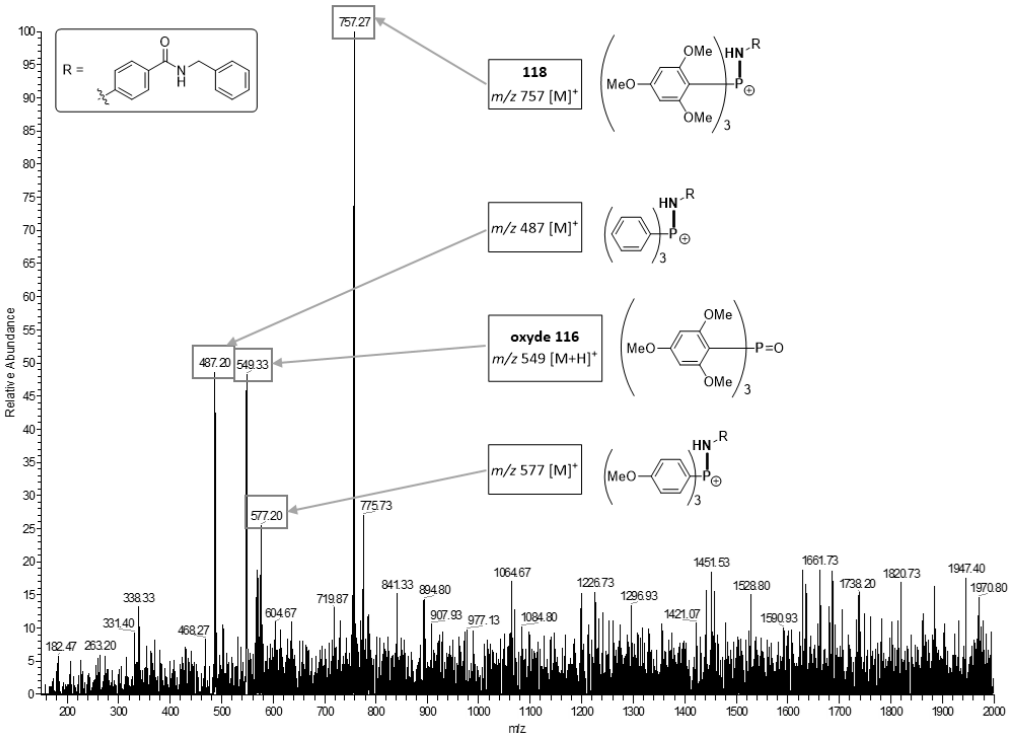


Figure 83. Spectre MS du mélange des trois milieux réactionnels (5 µM) après deux heures de réaction.

2.4.2.3. Étude de la stabilité des iminophosphoranes

Avant d'aller plus loin dans l'étude de ces nouveaux composés, la stabilité des iminophosphoranes lors des analyses et des purifications par HPLC a été étudiée. Pour cela, l'iminophosphorane modèle **118**, préparé selon la même procédure que lors des études cinétiques précédentes, et a été purifié par HPLC semi-préparative et isolé sous la forme d'un sel de TFA (aminophosphonium) après lyophilisation (Schéma 121, **A**). La parfaite stabilité de ce composé lors de son élution à l'aide d'éluant de type MeCN/$TFA_{aq.}$ 0,1% (pH ≈ 1) a donc permis son analyse et sa purification par HPLC sans aucune difficulté (Schéma 121, **B**). De plus, aucune décomposition ou dégradation particulière n'a pu être observée lors de la lyophilisation (≈ 30 heures) du produit, qui a été obtenu sous la forme d'une poudre blanche.

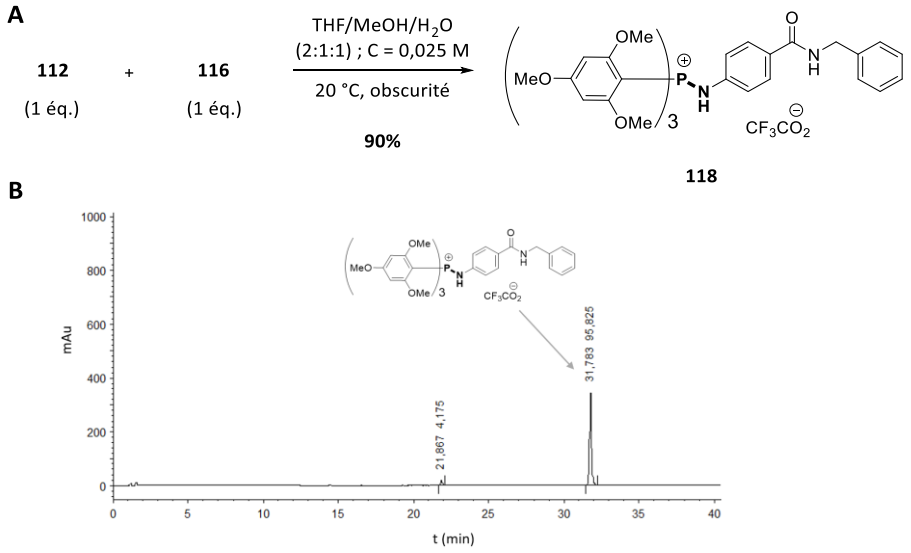


*Schéma 121. (**A**) Synthèse de l'iminophosphorane modèle **118**. (**B**) Chromatogramme du composé **118** isolé par HPLC semi-préparative.*

Aux regards de ces premières études qualitatives concluantes (détectabilité, stabilité HPLC et MS, isolement), la phosphine **116** a été conservée pour la suite de l'étude comme précurseur d'iminophosphoranes.

2.4.3. Synthèses de précurseurs azoture et exemplification structurale des iminophosphoranes

La diversité structurale des azotures pouvant générer des iminophosphoranes stables par réaction avec la phosphine **116** selon cette méthode simple a été entreprise. Pour cela, différents partenaires azotures ont dû être préparés à l'aide de différentes voies de synthèse.

2.4.3.1. Préparations à partir de précurseurs d'azotures

A – Préparation de précurseurs nitrés

Un premier exemple de composé nitré **119**, dérivé du très controversé phtalate DEHP,[388] a été préparé *via* une double estérification de Steglish entre l'acide 4-nitrophtalique et le 2-éthylhexan-1-ol (Schéma 122, **A**). Le faible rendement obtenu de 10 % peut s'expliquer d'une part par l'augmentation de l'encombrement stérique suite à la première estérification.

[388] (a) Ponzo, O. J.; Silvia, C. *Toxicology* **2013**, *311*, 41–51. (b) Muscogiuri, G.; Colao, A. *Arch. Toxicol.* **2017**, *91*, 1513-1517.

Ensuite, une dialkylation de la position benzylique du 2-nitro-9*H*-fluorène à l'aide du 1-bromobutane et de carbonate de césium a été effectuée et le produit désiré **120** a été isolé avec un rendement de 95 % (Schéma 122, **B**).[389]

Par ailleurs, la préparation d'un dérivé d'indanone a été imaginée en raison de leur récent emploi pour l'élaboration de sondes fluorescentes permettant le marquage spécifique des plaques β-amyloïques.[390] Le produit **121** a été obtenu avec un rendement de 79 % grâce à une condensation aldolique catalysée par le TBD entre le 4-nitrobenzaldéhyde et la 5,6-diméthoxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one (Schéma 122, **C**).[391]

La famille des 1,8-naphtalimides possède des propriétés de fluorescences qui ont pu être employées pour la détection spécifique d'ions métalliques[392] et de biothiols.[393] Le substrat **122** a donc été préparé par une condensation-crotonisation entre la 6-nitro-1*H*,3*H*-benzo[*de*]isochromene-1,3-dione et l'acide 3-aminopropanoïque selon une méthode décrite dans la littérature.[394]

Finalement, en vue de la préparation des fragments réactifs pré-marqués pour les expériences de KTGS, le tétrahydroisoquinoléine nitrée **124** a été synthétisée en deux étapes *via* la formation de l'imine **123**, suivie par la réaction de Pictet-Spengler en milieu acide, à chaud (Schéma 122, **D**).[395]

[389] Park, K. K.; Jung, H.; Lee, T.; Kang, S. K. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2010**, *31*, 984–988.

[390] Qiao, J.-P.; Gan, C.-S.; Wang, C.-W.; Ge, J.-F.; Nan, D.-D.; Pan, J.; Zhou, J.-N. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1652–1662.

[391] Cota, I.; Medina, F.; Sueiras, J. E.; Tichit, D. *Tetrahedron. Lett.* **2011**, *52*, 385–387.

[392] (a) Liu, D.; Zhu, H. ; Shi, J.; Deng, X.; Zhang, T.; Zhao, Y.; Qi, P.; Yang, G.; He, H. *Anal. Meth.* **2019**, *11*, 3150–3154. (b) Li, Z.; Chen, W.; Dong, L.; Song, Y.; Li, R.; Li, Q.; Qu, D.; Zhang, H.; Yang, Q.; Li, Y. A *New J. Chem.* **2020**, *44*, 3261–3267.

[393] Liu, T.; Huo, F.; Li, J.; Chao, J.; Zhang, Y.; Yin, C. *Sens. Act. B: Chemical* **2016**, *232*, 619–624.

[394] Yuan, D.; Brown, R. G.; Hepworth, J. D.; Alexiou, M. S.; Tyman, J. H. P. *J. Heterocyclic Chem.* **2008**, *45*, 397–404.

[395] Gao, M.; Kong, D.; Clearfield, A.; Zheng, Q.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2229–2233.

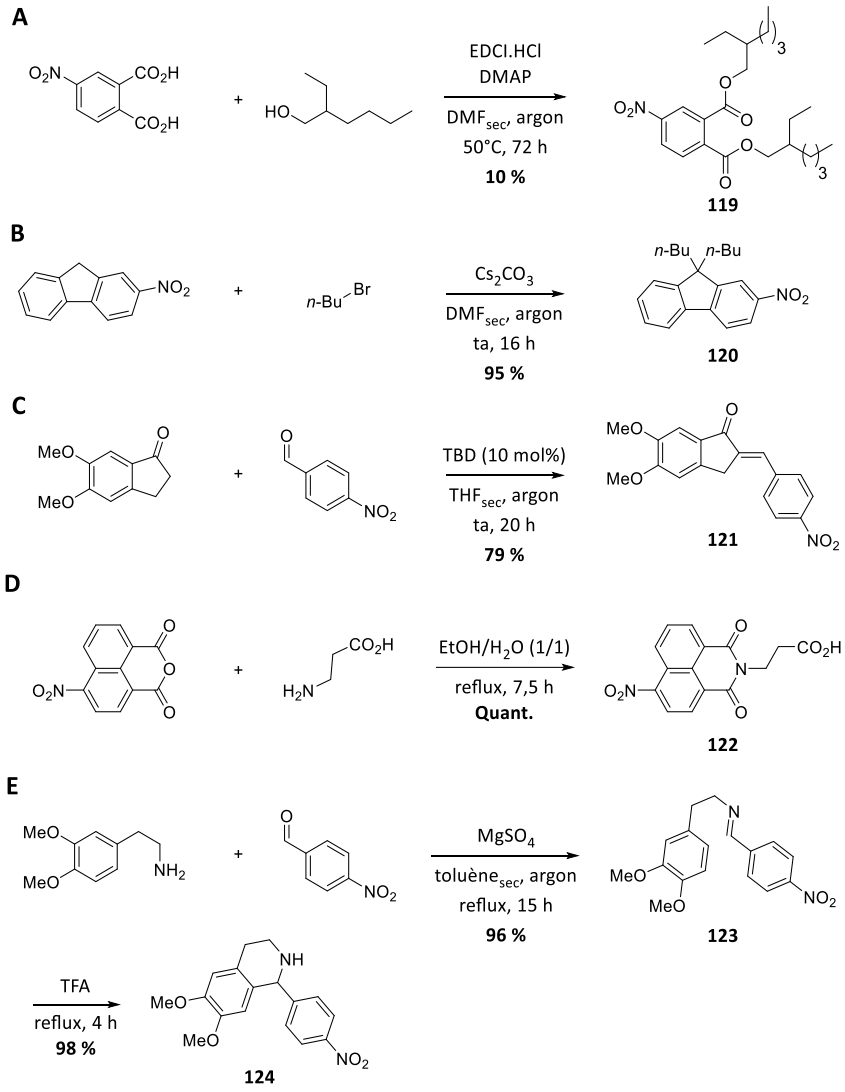


*Schéma 122. (**A**) Synthèse du 3-nitro-phtalate **119** dérivé du DEHP. (**B**) Dialkylation en position benzylique du 2-nitro-9H-fluorene. (**C**) Condensation-crotonisation intermoléculaire catalysée par le TBD. (**D**) Synthèse par condensation déshydratante du dérivé nitré d'1,8-naphtalimide **122**. (**E**) Préparation de la tétraisoquinoléine **124**.*

B – Réductions en anilines

Les précurseurs nitrés **119**, **120**, **124** et **122** ont ensuite été réduits en anilines par hydrogénations pallado-catalysées avec d'excellents rendements (Schéma 123).

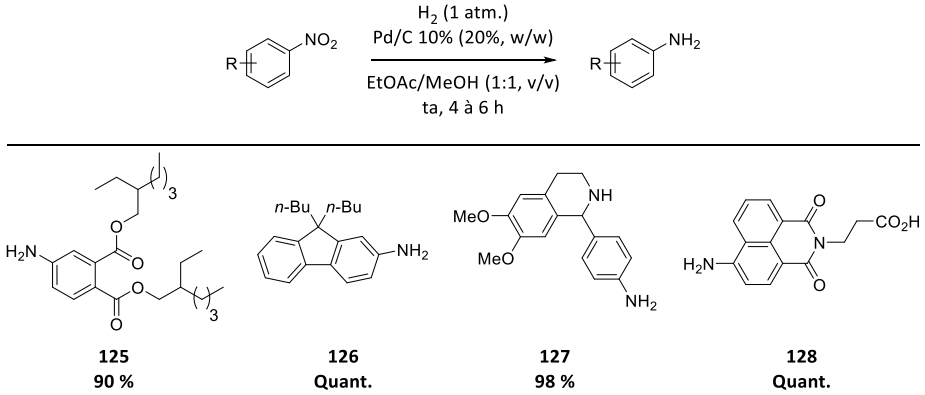


Schéma 123. Réduction de groupements nitros par hydrogénation pallado-catalysée.

Afin d'éviter la réduction parasite de la double liaison, le groupement nitro du composé **121** a pour sa part été réduit de manière plus sélective à l'aide de chlorure d'étain à chaud dans le MeOH pour conduire à l'aniline **129** (Schéma 124).

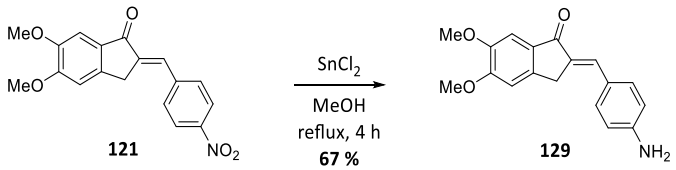


*Schéma 124. Préparation de l'aniline **129** par réduction du groupement nitro à l'aide de chlorure d'étain.*

C – Préparation d'autres précurseurs

La coumarine **130**, précurseur direct d'azido-coumarines,[396] a été préparée avec un faible rendement de 17% selon la méthode de Perkin, à partir du 2,4-dihydroxybenzaldéhyde et de la *N*-acétylglycine (Schéma 125).

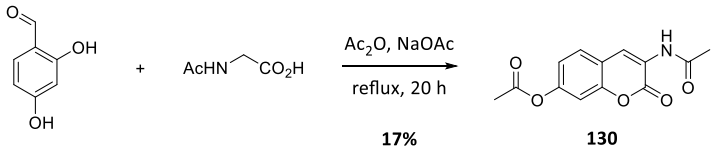


*Schéma 125. Synthèse de la coumarine **130** par la méthode de Perkin.*

Dans le but d'obtenir une exemplification pour la préparation d'iminophosphoranes hétéroaromatiques, il a été choisi d'employer un motif purine. Afin de pouvoir préparer le précurseur azoture dans un second temps par substitution nucléophile aromatique (S_NAr), une réaction de *N*-alkylation de la 6-chloro-9*H*-purine a d'abord été effectuée à l'aide du (3-

[396] Sivakumar, K.; Xie, F.; Cash, B. M.; Long, S.; Barnhill, H. N.; Wang, Q. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4603–4606.

bromopropyl)benzène (Schéma 126). Les analyses RMN du brut réactionnel ont montré la formation de deux isomères **131** et **131'** (ratio RMN = 82/18) et de plusieurs sous-produits non-identifiés. Finalement, seul l'isomère **131** a pu être isolé avec un rendement de 66%.[397]

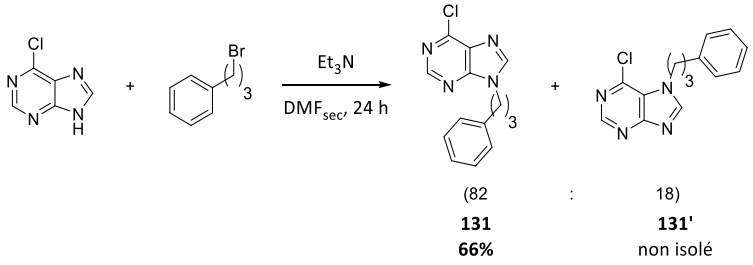


*Schéma 126. Préparation de la purine **131**.*

2.4.3.2. Préparation des azotures aromatiques

A – Préparation d'azotures aromatiques par réactions de diazotation et de substitution nucléophile aromatique

Pour les précurseurs anilines compatibles avec des conditions acides, leur conversion en azotures a été réalisée par une réaction de diazotation à froid, suivie d'une réaction de S_NAr à l'aide d'azoture de sodium (Schéma 127).[398]

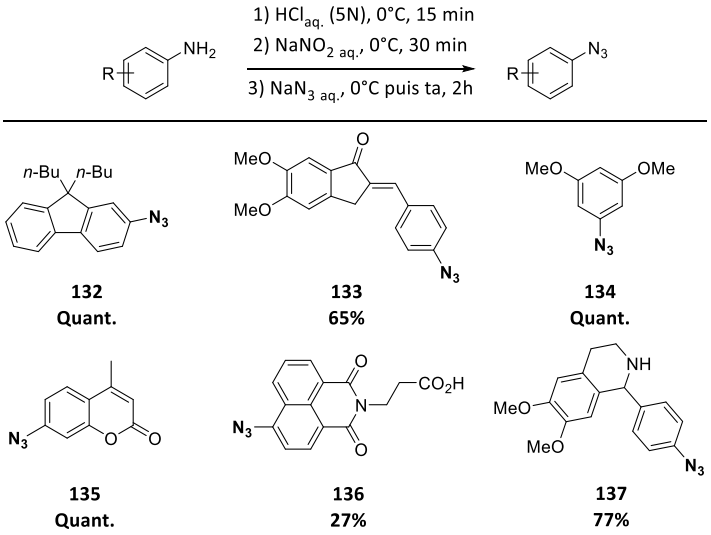


Schéma 127. Préparations des précurseurs azotures par réactions de diazotation et de substitution nucléophile aromatique.

Dans le cas de la coumarine **130**, une méthode réactionnelle *one-pot*, décrite dans la littérature,[394] a permis d'hydrolyser dans un premier temps les fonctions acétyles afin de

[397] Galante, E.; Schoultz, B. W.; Koepp, M.; Årstad, E. *Molecules* **2013**, *18*, 5335–5347.

[398] Liu, M.; Hou, Y.; Yin, W.; Zhou, S.; Qian, P.; Guo, Z.; Xu, L.; Zhao, Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *119*, 96–108.

déprotéger les fonctions phénol et amine, puis de réaliser dans un second temps les étapes de diazotation et de S_NAr après un retour à basse température (Schéma 128). La coumarine **95** a ainsi été obtenue avec un rendement de 56% grâce à cette stratégie simple à mettre en œuvre.

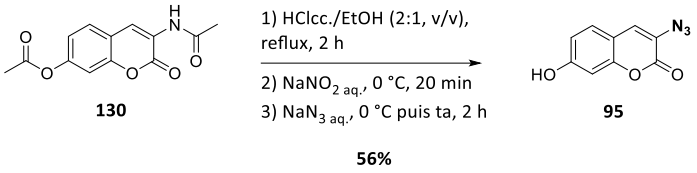


*Schéma 128. Synthèse de la coumarine **95**.*

Par analogie aux précédents travaux développés dans le groupe du Dr. Sabot pour le marquage de biomolécules fonctionnalisées,[351] une réaction de Williamson a été effectuée entre cette coumarine **95** et le bromure de propargyle dans le but d'étudier de potentielles réactions séquentielles (formation d'iminophosphorane puis CuAAC) pour un double marquage de fluorescence et d'amplification MS de diverse (bio)molécules (Schéma 129). La coumarine **138** a finalement été obtenue avec un faible rendement de 24%.

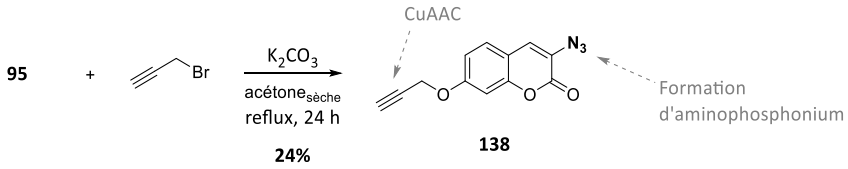


*Schéma 129. Préparation du précurseur **138** par réaction d'éthérification de Williamson.*

Concernant le dérivé amino-phtalate **125**, le risque d'hydrolyse des fonctions esters dans de telles conditions a conduit vers l'emploi une méthode plus douce de diazotationgrâce au tétrafluoroborate de nitrosonium en milieu neutre (Schéma 130). L'analogue du DEHP **139** a finalement été obtenu avec 76% de rendement.

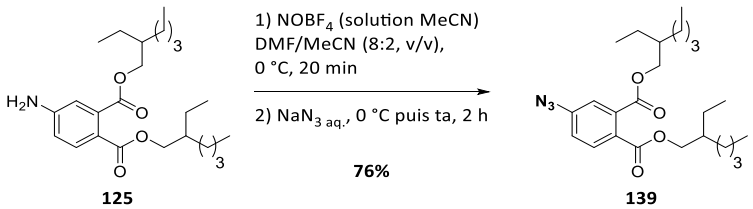


*Schéma 130. Préparation du dérivé de phtalate **139**.*

Toujours dans le cadre de la préparation des fragments réactifs pré-marqués pour les expériences de KTGS, l'alcyne **141** a été préparé par substitution nucléophile entre l'amine

137 et le tosylate **140**, lui-même obtenu par activation de l'alcool correspondant à l'aide du chlorure de tosyle (Schéma 131).

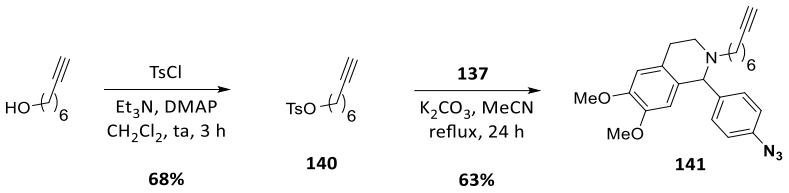


*Schéma 131. Synthèse de l'alcyne **141** pré-marqué par un azoture.*

B – Préparation d'azotures aromatiques par réactions de substitution nucléophile aromatique

Un premier essai de substitution nucléophile aromatique entre l'azoture de sodium et la 6-chloro-purine **131** synthétisée précédemment a été tenté à 80 °C (Schéma 132). Malheureusement, un mélange complexe et inséparable par chromatographie flash a été obtenu. De nouvelles tentatives à 60 °C, puis à 25 °C, ont été réalisées mais à nouveau un mélange de produits inséparables a été obtenu. Finalement, le produit désiré n'a pas pu être obtenu.

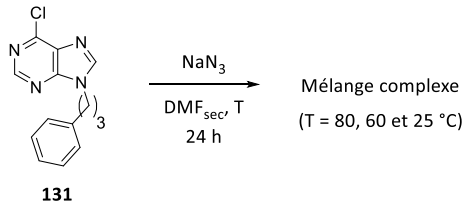


Schéma 132. Tentatives de préparation d'un précurseur azido-purine.

La préparation d'un modèle plus simple d'azoture hétérocyclique a été décidé et le choix s'est tourné vers la 4-chloro-quinoléine commerciale. La réaction de S_NAr par l'azoture de sodium a conduit au précurseur **142** avec 70% de rendement (Schéma 133).

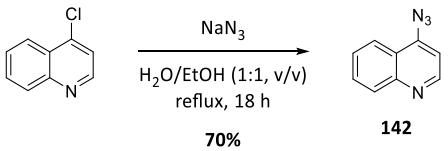


*Schéma 133. Préparation de la 4-azido-quinoléine **142**.*

C – Préparation d'azoture aliphatique par substitution nucléophile

Un unique exemple en série aliphatique, l'azoture **143**, a été préparé par substitution nucléophile entre l'azoture de sodium et le (3-bromopropyl)benzène dans le DMF à 50 °C (Schéma 134).

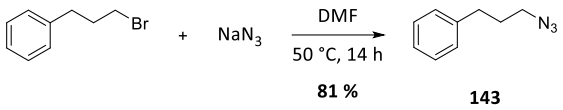
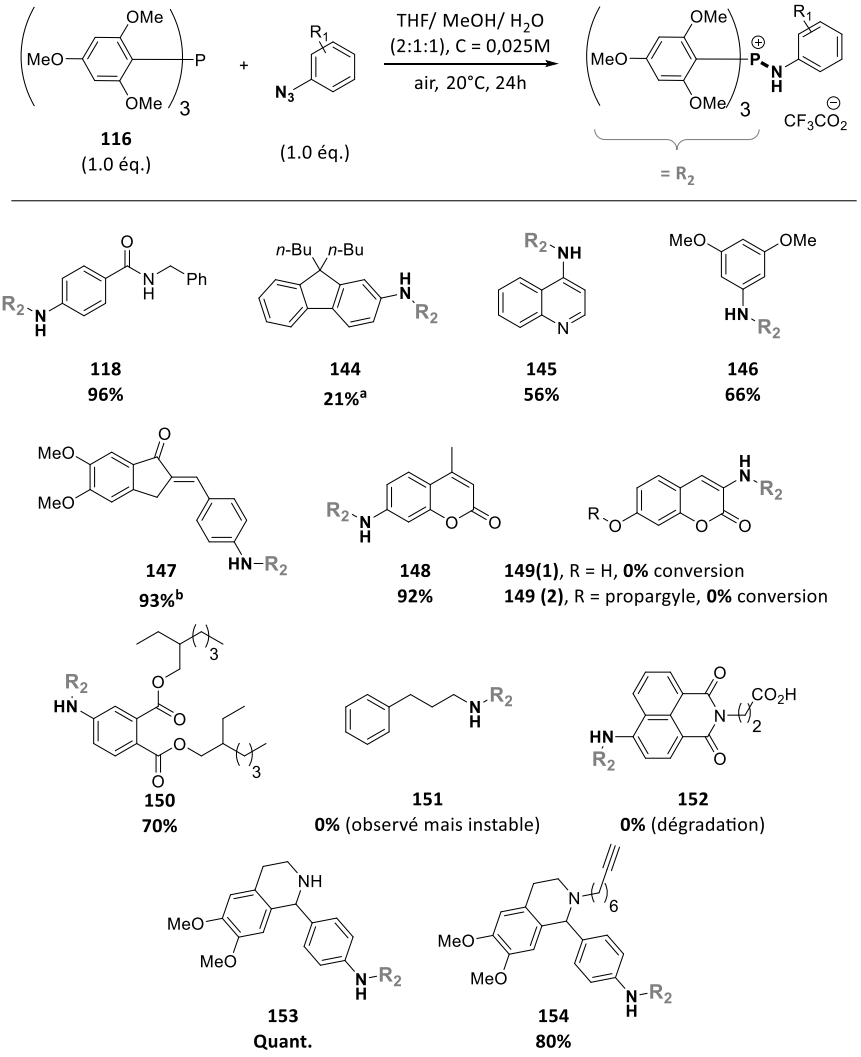


*Schéma 134. Préparation de l'azoture aliphatique **143**.*

2.4.3.3. Exemplification des aminophosphoniums

Une fois les différents partenaires azotures préparés, l'exemplification des aminophosphoniums a été entreprise selon la même procédure de synthèse que le modèle **118** et ces différents composés, sauf si précisé, ont tous été purifiés par HPLC semi-préparative ($MeCN/TFA_{aq.}$ 0,1%) puis lyophilisés et obtenus sous forme de sels de TFA (Schéma 135).

De manière générale, une majorité d'aminophosphoniums correspondants ont pu être isolés avec des rendements allant de moyens à excellents et une tolérance fonctionnelle plutôt correcte a pu être constatée (amide, cétone, ester, alcyne terminal, hétérocycle et amine secondaire). La synthèse de ces différents exemples a cependant mis en relief certaines limites vis-à-vis de la structure des azotures pouvant être employés dans cette réaction. En effet, les azotures très enrichis en électrons, donc peu électrophiles, ne permettent pas l'addition de la phosphine et donc la formation des aminophosphoniums correspondants comme le montre les exemples **149 (1)** et **(2)**. En revanche, les exemples **144**, **146**, **153** et **154** ont prouvé que la présence de groupements électroattracteurs permettant la délocalisation du doublet libre de l'atome d'azote n'était pas obligatoire, ce qui permet d'étendre cette stratégie à différentes variétés structurales. Enfin, l'exemple aliphatique **151** n'a pas pu être isolé en raison de son instabilité mais il a pu être observé par analyse MS du milieu réactionnel après six heures de réactions. Une nouvelle analyse après 24 heures de réaction n'a cependant pas permis d'observer à nouveau l'iminophosphorane et seule l'oxyde de **116** a pu être observée. Ainsi, la méthode présentée ici ne semble être malheureusement applicable que dans le cas des azotures aromatiques, ce qui permet tout de même la couverture d'une diversité chimique relativement étendue.



[a] Le composé a été purifié et lyophilisé à deux reprises. [b] Le composé n'a pas nécessité de purification et a été obtenu sous forme de sel d'hydroxyde après évaporation des solvants.

Schéma 135. Synthèses d'exemples d'aminophosphoniums stables.

De manière très satisfaisante, l'aminophosphonium **154** correspondant au fragment réactif employé en click *in situ* a été obtenu avec un rendement isolé de 80% ce qui laisse supposer une potentielle application en KTGS.

Cependant, avant d'aller plus loin dans la stratégie de pré-marquage, une étude plus complète des propriétés des iminophosphoranes a dû être entreprise afin de mieux appréhender ces nouvelles espèces chimiques.

2.4.4. Études approfondies des iminophosphoranes/aminophosphoniums

2.4.4.1. Études de stabilités

La stabilité en conditions physiologiques est primordiale pour qu'une sonde puisse être employée en KTGS. Ainsi, l'aminophosphonium modèle **118** a été soumis à différents tests de stabilité et de natures variées.

En premier lieu, ce composé a été placé à la lumière et à l'air sous forme de poudre lyophilisée et en solution dans un mélange MeOH/PBS pH 7,4 (2:8, v/v) pendant deux semaines. Dans les deux cas, le composé n'a présenté aucune dégradation notable selon les analyses HPLC et est resté parfaitement soluble en solution à 80% de PBS durant l'étude (Schéma 136, **A**). Ensuite, la stabilité de l'aminophosphonium **118** a été étudiée en présence d'une protéine modèle, l'albumine de sérum bovin (≈ 0,1 éq), ou BSA, pendant 24 heures à 37 °C dans du PBS pH 7,4 (Schéma 136, **B**) et en conditions réductrices en présence de GSH (16 éq.) dans les mêmes conditions (Schéma 136, **C**). Dans les deux cas, le composé **118** n'a présenté aucune dégradation particulière ce qui prouve sa très grande stabilité en conditions physiologiques et en présence de biomolécules. Qui plus est, ce composé a également été solubilisé dans un tampon basique à pH= 12,0 et n'a, à nouveau, présenté aucune dégradation après 36 heures à température ambiante (Schéma 136, **D**). Cette fonction est donc parfaitement stable sur une gamme de pH très large (1 ≤ pH ≤ 12), ce qui donne beaucoup de souplesse pour l'emploi de tampon variés pour les élutions par HPLC et/ou LC-MS.

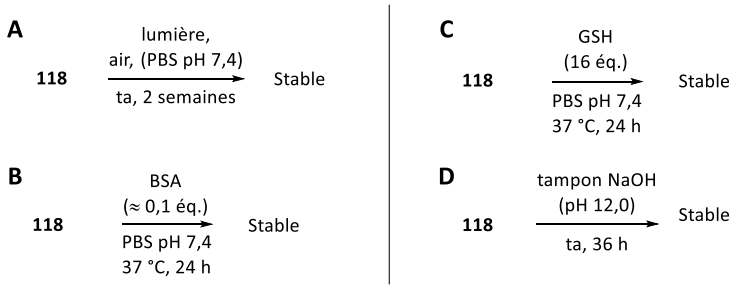


*Schéma 136. Études de la stabilité de l'iminophosphorane **118** (**A**) à la lumière, l'air et au PBS pH 7,4, (**B**) en présence de biomolécule (BSA), (**C**) en conditions réductrices (GSH) et (**D**) à pH basique.*

2.4.4.2. Détermination du p*K*a du couple aminophosphonium/iminophosphorane

La formation directe de l'aminophosphonium dans le milieu réactionnel aqueux, c'est-à-dire la forme protonée de l'iminophosphorane, est une donnée importante à connaitre car elle permet d'établir si les analyses MS peuvent être directement menées à partir du milieu

en question, ou si une étape de traitement par une solution acide est nécessaire. En effet, l'état de protonation de ces composés est déterminant pour leur détectabilité MS puisqu'il permet ou non l'obtention de la forme phosphonium. Ainsi, l'exemple **118** a été resynthétisé dans les mêmes conditions que précédemment, toutefois, en fin de réaction, les solvants ont simplement été évaporés afin de s'affranchir de l'étape de purification par HPLC semi-préparative, qui nécessite des conditions acides (MeCN/$TFA_{aq.}$ 0,1%). Une analyse du composé **118** brut par RMN ^{1}H dans un milieu aprotique (DMSO-d_6) a été réalisée (Figure 84). Le spectre obtenu a permis l'observation des deux protons labiles portés par les fonctions amide (triangle bleu, triplet à δ = 8,73 ppm) et aminophosphonium (disque vert, doublet à δ = 7,90 ppm), qui est donc bien présent sans un traitement acide. Cette expérience confirme donc que l'iminophosphorane formé lors de la réaction se protone en milieu neutre pour conduire directement, et totalement, à la forme aminophosphonium correspondante.

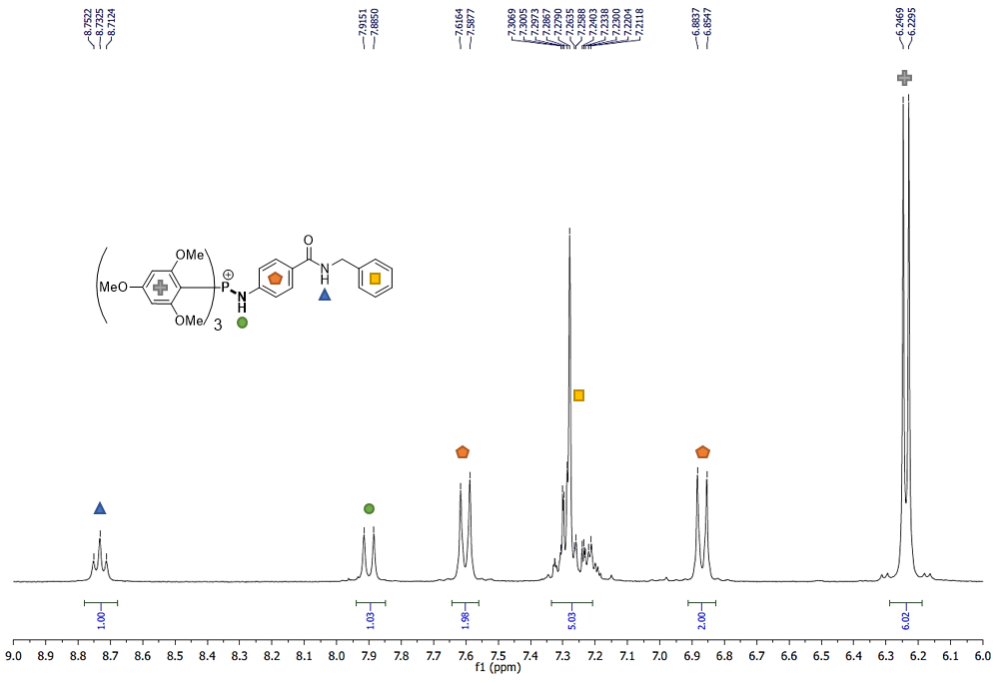


*Figure 84. Spectre RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) du composé **118** brut.*

La basicité des iminophosphoranes a été rapportée dans la littérature en déterminant les valeurs de p*K*a de différents iminophosphoranes dans des mélanges EtOH/H_2O (76:24, v/v) par spectroscopie et potentiométrie. Ainsi, une large gamme de p*K*a a pu être identifiée selon

les substituants dans l'environnement de la liaison P=N et même avec des valeurs dépassant des p*K*a de 11 (Figure 85).[399]

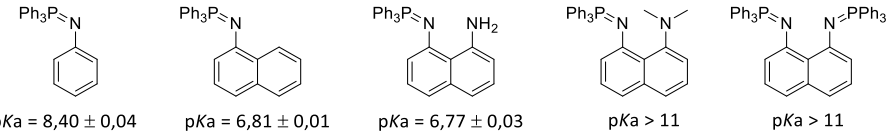


Figure 85. Mesures de valeurs de pKa de différents iminophosphoranes par spectroscopie et potentiométrie.

Dans le but d'obtenir une valeur précise du p*K*a dans notre cas particulier d'amino-tris(trimethoxyphényle)phosphonium, le dérivé **148** comportant un motif coumarine a été employé pour ses propriétés spectroscopiques d'absorption et d'émission de fluorescence, en anticipant que ses formes protonée et déprotonée auraient des propriétés photophysiques distinctes, permettant ainsi la détermination du p*K*a de ce couple acide-base.[400] Tout d'abord, la stabilité du composé en milieu très acide (pH ≈ 1) et très basique (pH = 13,2) a été vérifiée par HPLC afin d'établir une gamme de pH pour cette étude. Ainsi, à mesure que le pH de la solution contenant le composé **148** augmente, la bande d'absorption à 325 nm diminue alors qu'une bande d'absorption à 390 nm apparaît. Ces bandes d'absorption correspondent respectivement aux formes aminophosphonium et iminophosphorane en équilibre (Figure 86, **A**). Il est à noter qu'un point isobestique ($\lambda_{isob.}$ = 355 nm) entre les formes neutres et protonée a été identifié grâce à la superposition des spectres d'absorption réalisés à ces différentes valeurs de pH, ce qui signifie qu'à cette longueur d'onde, la valeur de l'absorbance reste constante quel que soit le pH de la solution. Ainsi, les spectres d'émissions de fluorescence ($\lambda_{ex} = \lambda_{isob.}$ = 355 nm) en fonction du pH ont également permis l'observation des deux formes protonée et neutre en raison d'une part de leur différence de longueurs d'émission de fluorescence ($\lambda_{em\ prot.}$ = 416 nm et $\lambda_{em\ neut.}$ = 487 nm), et d'autre part en raison d'une différence significative d'exaltation de fluorescence en faveur de la forme neutre iminophosphorane (Figure 86, **B**). Ces phénomènes sont bien connus et ont déjà été décrits à plusieurs reprises dans la littérature.[401] Finalement, la régression non-linéaire de Boltzmann entre les ratios de

[399] Laynez, J.; Menéndez, M.; Saiz Velasco, J. L.; L. Llamas-Saiz, A.; Foces-Foces, C.; Elguero, J.; Molina, P.; Alajarín, M.; Vidal, A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, *0*, 709–713.

[400] Mazi, W.; Adhikari, R.; Zhang, Y.; Xia, S.; Fang, M.; Luck, R. L.; Tajiri, M.; Tiwari, A.; Tanasova, M.; Liu, H. *Methods* **2019**, *168*, 40–50.

[401] (a) Xu, L.; Yue, F.; Shi, W.; Hui, Y.; Mi, H.; Ma, F.; Tian, Y.; Xie, Z. *Dyes Pigm.* **2013**, *99*, 822–828. (b) Shi, W.; Xu, L.; Xie, Z.; Chen, X. *Dyes Pigm.* **2016**, *133*, 406–414. (c) Hsia, L.-Y.; Chen, H.-N.; Chiang, C.-H.; Hung, M.-Y.; Wei, H.-K.; Luo, C.-W.; Kuo, M.-Y.; Luo, S.-Y.; Chu, C.-C. *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 9361–9366.

l'absorbance pour λ = 325 et 390 nm (A_{390}/A_{325}) et le pH a permis de déterminer une valeur de p*K*a de 13,5 ± 0,4 pour ce composé. Il est à noter que la même valeur de p*K*a de 13,5 a également pu être trouvée de manière analogue par la régression de Boltzmann entre les ratios d'intensités de fluorescence et le pH.

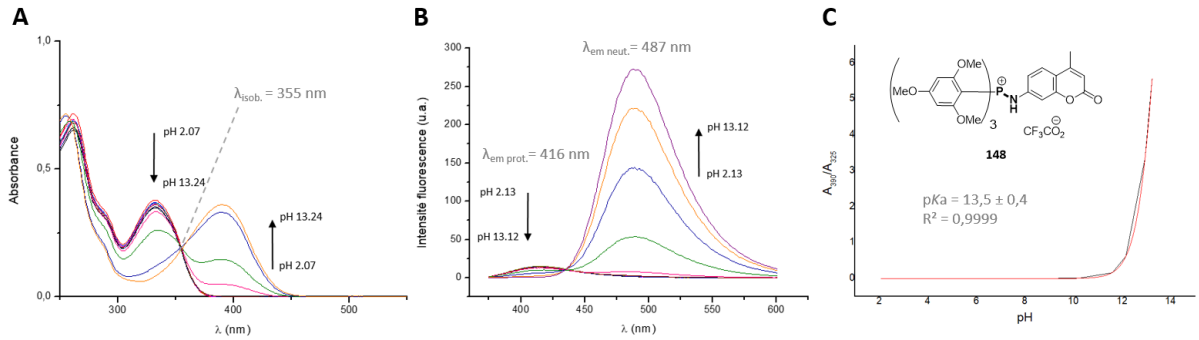


*Figure 86. (**A**) Superpositions des spectres UV-Vis en fonction du pH et recherche du point isobestique. (**B**) Superpositions des spectres d'émission de fluorescence en fonction du pH (λ_{ex} = 355 nm). (**C**) Régression de Boltzmann (violet) de la courbe expérimentale (bleu) de $A_{390nm} = f(pH)$ et détermination de la valeur du pKa.*

Ce résultat important a permis d'établir que même en présence d'un groupement électroattracteur comme une coumarine, le p*K*a de 13,5 ± 0,4 de l'iminophosphorane est suffisamment élevé afin de permettre sa protonation en conditions neutres et/ou physiologiques et donc « d'activer » spontanément sa forte détectabilité sous la forme d'aminophosphonium.

2.4.4.3. Limites de détection et de quantification analytiques par LC-MS

Afin d'estimer le gain de détectabilité grâce au marquage par les iminophosphoranes et de pouvoir juger de son efficacité pour des applications en KTGS, une comparaison des limites de détection (LDD)[402] et de quantification (LDQ)[403] a été effectuée entre les analogues modèles **118** (aminophosphonium), **155** (amide non-fonctionnalisé) et **112** (azoture) grâce à des analyses LC-MS par fragmentation ciblée (*Multiple Reaction Monitoring*, MRM) et qui est une méthode de détection quantitative (Figure 87). Ainsi, la LDD et la LDQ de l'azoture de référence **112** ont été repoussées avec des facteurs respectivement de 31 et 51 grâce au marquage par formation d'aminophosphonium. Ces écarts sont en revanche moindres vis-à-

[402] Limite de détection : Valeur de la plus petite concentration pour laquelle l'analyte puisse être détecté avec une incertitude acceptable par rapport au bruit de fond, sans pour autant pouvoir être quantifié avec précision.
[403] Limite de quantification : Valeur de la plus petite concentration pour laquelle l'analyte puisse être quantifiée avec une incertitude acceptable par rapport au bruit de fond.

vis de l'amide **155**, avec une augmentation de la détectabilité d'un facteur compris entre 2 et 3.

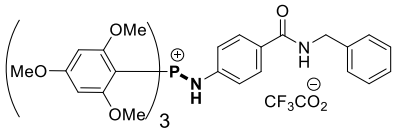
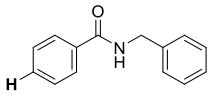
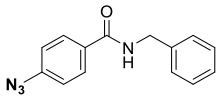
	 **118**	 **155**	 **112**
LDD	9,97 pM	28,1 pM	310 pM
LDQ	26,8 pM	68,1 pM	1370 pM

*Figure 87. LDD et LDQ des analogues **118**, **155** et **112** (Appareil : Waters Acquity ESI$^+$/TQ).*

Il est également intéressant de noter que les énergies de fragmentations employées pour l'analyse des transitions de l'aminophosphonium **118** ont été en moyenne de 74 eV, contre respectivement 13 et 25 eV pour les composés **112** et **155**. Ce paramètre indique que les aminophosphoniums nécessitent bien plus d'énergie pour se fragmenter et qu'ils sont donc particulièrement stables lors d'analyses LC-MS. De ce fait, les chances d'observer les ions correspondants sont donc importants ce qui pourrait limiter les faux négatifs en KTGS.

Les mesures de LDD et de LDQ ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse très performant (Appareil : Waters Acquity ESI/TQ) et les très grandes différences de détectabilité entre certains azotures et leurs analogues aminophosphoniums, *via* l'analyse MS à l'aide d'un appareil moins performant (Appareil : Finnigan LCQ Advantage MAX ESI/ion trap), se sont révélées exacerbées. En effet, des mélanges titrés en azotures (0,5 mM) et en aminophosphonium (0,5 µM) ont été analysées par introduction directe et sans fragmentation (Figure 88). Les signaux correspondants aux azotures, en fortes concentrations dans les mélanges, ne sont visibles que dans le bruit de fond alors que les analogues aminophosphoniums, mille fois moins concentrés, présentent des signaux MS très intenses ce qui démontre parfaitement l'intérêt de la méthode proposée. Cet outil présente donc l'avantage de pouvoir démocratiser l'accès à des études KTGS sans pour autant avoir accès à des appareils d'analyse très performants, mais au contraire, en utilisant un appareil de routine.

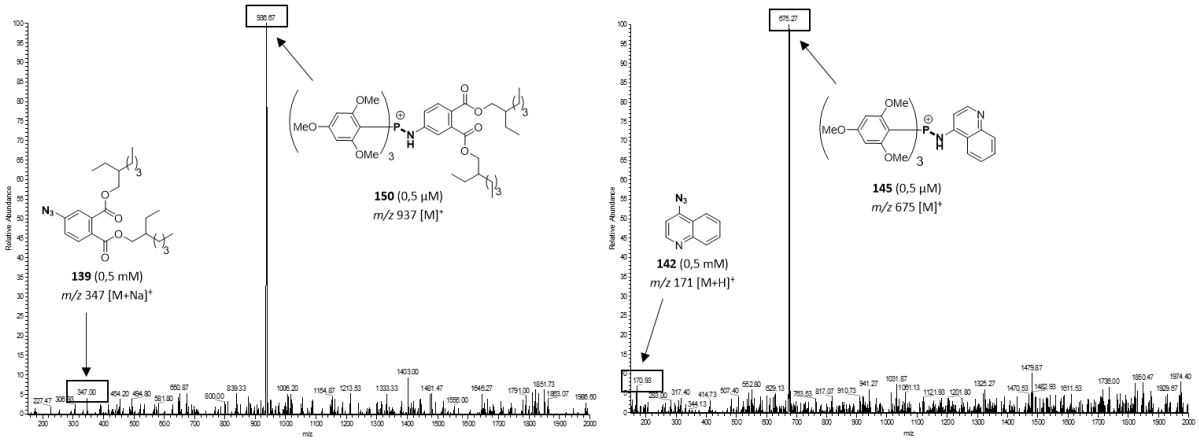


Figure 88. Exemples de spectres MS (Appareil : Finnigan LCQ Advantage MAX ESI⁺/ion trap) obtenus par analyses de mélanges d'azotures (0,5 mM) et d'aminophosphonium correspondants (0,5 µM) dans H_2O/MeCN (9:1, v/v).

2.4.4.4. Étude de marquage à basses concentrations

En KTGS, les quantités de ligands formés par la cible sont souvent très faibles (classiquement < 1 µM). Il est donc important de pouvoir réaliser le marquage de ces composés avec une conversion la plus élevée possible et dans un temps relativement court comparativement à la réaction de ligation catalysée par la cible (≤ 24 heures). Ainsi, des expériences de marquage de l'azoture modèle **112** à plus faibles concentrations ont été menées (Schéma 137).

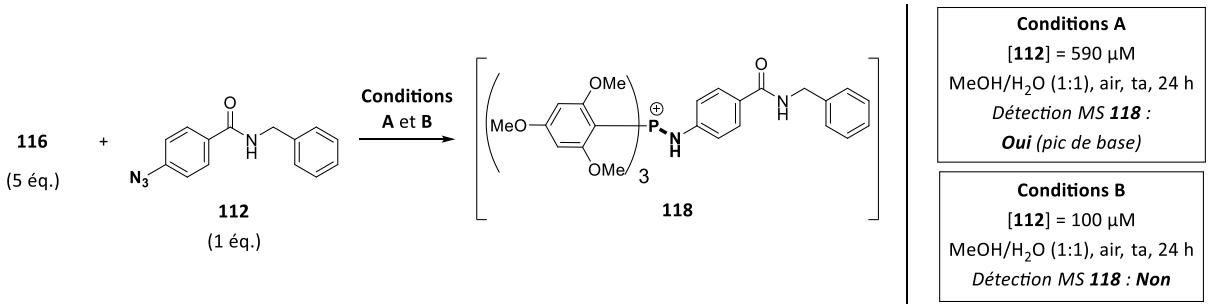


*Schéma 137. Étude de la vitesse de conversion de l'azoture modèle **112** (Appareil : Finnigan LCQ Advantage MAX ESI⁺/ion trap).*

Il s'est malheureusement avéré que lors des expériences avec des concentrations en analytes de l'ordre de 100 µM, une concentration bien supérieure à celle de ligands formés *in situ* en KTGS, l'aminophosphonium **118** n'était pas détectable par analyses MS. Ceci a laissé supposer que la réaction de formation du composé est donc bien trop lente dans ces conditions de dilution.

2.5. Préparation d'une nouvelle sonde de la classe des phosphoniums

Compte tenu des cinétiques de réaction trop lentes, les aminophosphoniums ont été écartés de ce projet de pré-marquage des fragments, une nouvelle ligation biocompatible a été envisagée avec le partenaire azoture. Pour cela, une sonde comportant un alcyne sous contrainte de cycle a été préparée en vue de l'établissement d'une preuve de concept pour l'augmentation artificielle de la détectabilité des ligands formés en KTGS. La réaction de SPAAC a finalement été privilégiée par rapport à la LSB et le bicyclononyne (**BCN**) a été choisi comme partenaire réactif. En effet, comparativement aux autres alcynes sous contrainte de cycle, les **BCN** possèdent deux atouts très avantageux, à savoir 1) leur réactivité relativement constante quelques soit la nature de l'azoture avec lequel ils réagissent (aromatique, aliphatique, stériquement encombré…) et 2) leur bonne solubilité en milieux aqueux.[404] Cette fois, un phosphonium classique de type **TMPP** comme fonction hautement détectable a été retenu. La phosphine **116** a néanmoins été conservée comme précurseur étant donné la très grande stabilité en milieux physiologique et à la fragmentation MS des phosphoniums correspondants. Concernant la fonction réactive vis-à-vis des azotures

2.5.1. Préparation d'un phosphonium fonctionnalisable

Conformément à la synthèse très simple décrite dans la littérature, [345(b)]le phosphonium **156** a été préparé avec un rendement de 36% à partir de la phosphine **116** et du bromhydrate de 3-bromopropan-1-amine (Schéma 138).

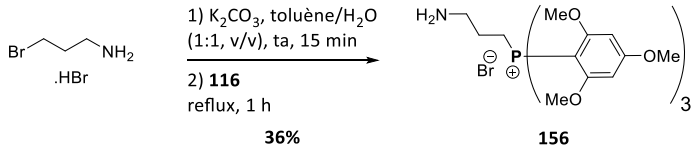


*Schéma 138. Synthèse du phosphonium **156** fonctionnalisable par son amine primaire.*

[404] (a) Dommerholt, J.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L. *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374*, 16–36. (b) Svatunek, D.; Houszka, N.; Hamlin, T. A.; Bickelhaupt, F. M.; Mikula, H. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 754–758.

2.5.2. Préparation de la fonction bicyclononyne

La synthèse de la fonction **BCN** a été entreprise suivant une procédure décrite dans la littérature (Schéma 139).[405]

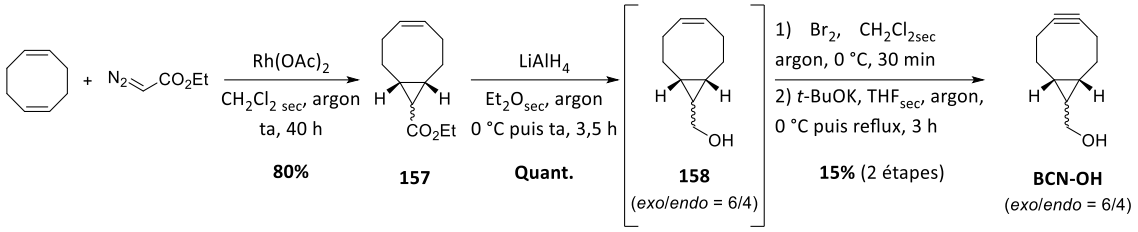


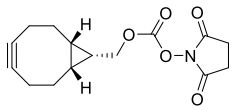
*Schéma 139. Synthèse en quatre étapes du **BCN-OH**.*

La première étape de cyclopropanation catalysée par le $Rh(OAc)_2$ entre le diazoacétate d'éthyle et le 1,5-cyclooctadiène a permis d'obtenir l'ester **157** avec un rendement de 80%. La réduction de ce dernier par $LiAlH_4$ a conduit quantitativement à l'alcool **158**, dont les isomères *exo* et *endo* n'ont pas pu être séparés et ont été obtenus en mélange avec un ratio respectif de 6/4. Finalement, le cyclooctyne **BCN-OH** a été obtenu avec un très faible rendement de 15% sur deux étapes, *via* une première réaction de dibromation de l'alcène **158** suivie d'une double élimination des atomes de bromes réalisée en milieu basique du composé dibromé obtenu intermédiairement. Le composé **BCN-OH** a également été isolé sous la forme d'un mélange d'isomères inséparables (*exo*/*endo* = 6/4). Deux difficultés majeures sont alors apparues face à cette synthèse :

- La crainte que la faible quantité de **BCN-OH** obtenue ne puisse permettre l'obtention du carbonate de NHS correspondant pour la fin de préparation de la sonde.
- Le dédoublement des pics lors des analyses LC-MS en raison de la formation de multiples isomères lors du marquage des ligands de KTGS.

En définitif, afin de gagner un temps précieux et de contourner le problème de la formation de multiples isomères, le réactif commercial **159** exclusivement sous la forme d'un isomère *endo* a été acheté pour la préparation de la sonde d'amplification MS (Figure 89).

[405] Dommerholt, J.; Schmidt, S.; Temming, R.; Hendriks, L. J. A.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; Lefeber, D. J.; Friedl, P.; van Delft, F. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422–9425.



159

*Figure 89. Structure du réactif commercial **159**.*

2.5.3. Synthèse de la sonde d'amplification MS

La formation d'un lien carbamate à partir des précurseurs carbonate **159** et amine **156** en conditions douces a permis d'obtenir la sonde réactive **160** avec 33% de rendement, suite à sa purification par HPLC semi-préparative et à sa lyophilisation (Schéma 140).

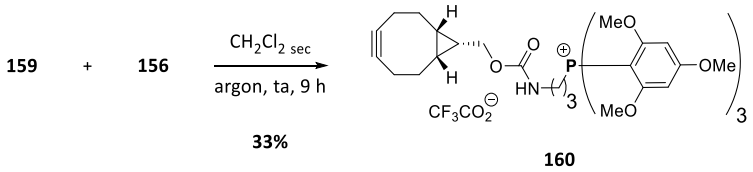


*Schéma 140. Synthèse de la sonde **160** d'amplification MS pour le marquage par réaction de SPAAC.*

2.5.4. Tests de réactivité et de détectabilité

Afin de vérifier l'efficacité du marquage, tant du point de vue de la conversion que de la réponse MS grâce à la fonction phosphonium, le composé modèle **161** a été synthétisé par réaction de SPAAC afin de servir comme référence et a été obtenu avec 59% de rendement (Schéma 141).

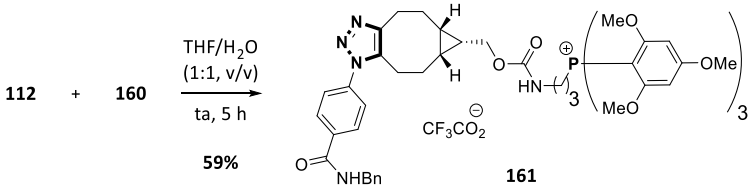


*Schéma 141. Synthèse du composé modèle **161** par réaction de SPAAC.*

Afin de comparer qualitativement la détectabilité du phosphonium **161** par rapport à l'aminophosphonium modèle **118**, dont les seuils de détectabilité et de quantification analytique sont désormais connus. Une solution équimolaire (5 µM) de ces deux composés a donc été préparée dans un mélange H_2O/MeCN (2:1, v/v) puis analysée par MS en introduction directe (Figure 90). Ainsi, à concentrations égales, les intensités relatives des signaux obtenus pour ces deux composés sont aisément comparables, même si le phosphonium semble être légèrement plus détectable que son analogue aminophosphonium.

Il est important de préciser que pour ce pH neutre, le composé **118** se trouve sous la forme protonée aminophosphonium hautement détectable grâce au p*K*a supérieur à 12 de cette fonction.

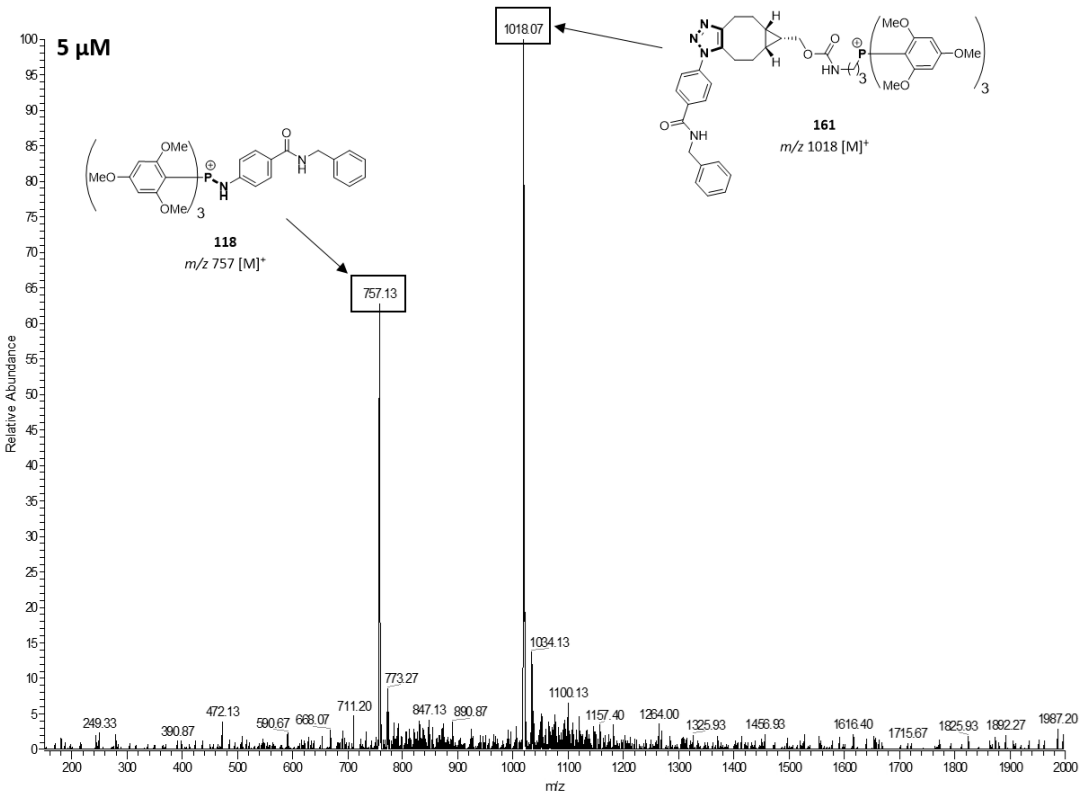


*Figure 90. Spectre MS (Appareil : Finnigan LCQ Advantage MAX ESI⁺/ion trap) d'un mélange équimolaire (5 µM) en aminophosphonium **118** et en phosphonium **161** dans MeCN/H_2O (1:2, v/v).*

De même, un complément d'étude a permis d'estimer que le ratio signal/bruit obtenu lors de l'analyse d'une solution à 1 µM en composé **161** était d'environ 10, ce qui est un excellent résultat pour des applications en augmentation du signal pour la KTGS.

Finalement, des essais de marquage pour des concentrations décroissantes en azoture modèle **112** ont été réalisés à l'aide de la sonde **160** (Schéma 142). Pour des concentrations en azoture de 1,13 mM et 100 µM, une conversion de 100% a pu être observée par HPLC après respectivement 6 et 24 heures. Le triazole **161** a pu ainsi être très facilement détecté par analyses MS suite à ces premiers marquages. Un test pour une concentration à 10 µM a donc été réalisé et même si le taux de conversion n'a pas pu être déterminé, le signal MS (introduction directe) très intense correspondant au triazole attendu a pu être observé après 24 heures, ce qui signifie que le marquage demeure efficace pour cette concentration. Il est d'ailleurs à noter que seuls cinq équivalents de sonde ont été employés lors de ces différents

tests, ce qui est relativement faible. Ainsi, dans le cas où le marquage s'avérait être trop lent en conditions de KTGS ([ligand] < 1 µM), il serait tout à fait envisageable d'employer 10 à 15 équivalents de sonde sans risquer de contaminer l'appareil.

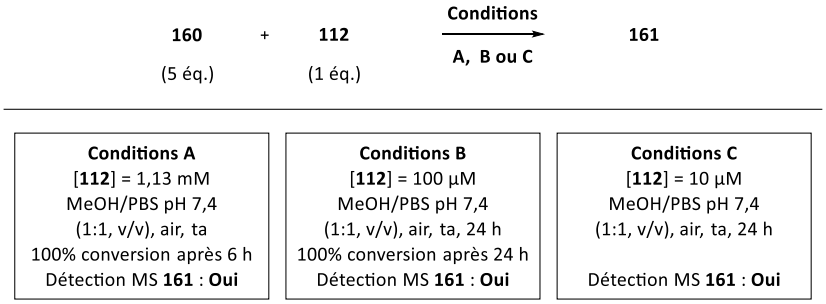


*Schéma 142. Étude de marquage à concentrations décroissantes en analyte azoture **112** par la sonde **160** (Appareil : Finnigan LCQ Advantage MAX ESI⁺/ion trap).*

Ce nouvel outil de marquage pour l'amplification MS ayant été optimisé et validé, son emploi dans le cadre du projet de pré-marquage des ligands de KTGS pour faciliter leur détection a donc pu être initié.

2.6. Synthèse des précurseurs et des ligands pour réaliser la KTGS en présence de l'AChE

2.6.1. Préparation des fragments précurseurs

2.6.1.1. Synthèse de la tacrine fonctionnalisée par un azoture

A titre de rappel, et toujours dans le cadre de la stratégie de pré-marquage en KTGS, le ligand de référence **syn-TZ2PIQ-A6** avait été choisi en raison de son accessibilité synthétique plus aisée et pour la possible modification d'une de ses positions aromatiques par une fonction azoture, conduisant ainsi au ligand pré-marqué **100** (Figure 76).[95] Pour cette preuve de principe, la réaction mise en jeu pour former le ligand au sein de l'AChE sera donc une cycloaddition de Huisgen, au même titre que la réaction de marquage du ligand formé par la sonde **160** qui sera une SPAAC. Bien entendu, cette étape va conduire au marquage non désiré du réactif en excès portant la fonction azoture impliquée dans la réaction de KTGS. Cela ne posera cependant pas de soucis de détection puisque les milieux réactionnels seront analysés par LC-MS, ce qui permettra la séparation des différents composés, et des transitions de fragmentations ciblées par MRM permettront d'être totalement sélectif des ions attendus. A

terme, cette stratégie de marquage pourra être employée en combinaison avec d'autres réactions décrites en KTGS comme l'addition de Michael entre un thiol et un acrylamide.

Pour commencer, la tacrine **164** fonctionnalisée par un azoture, qui est un motif commun aux deux ligands visés (référence et pré-marqué), a été préparée en quatre étapes (Schéma 143). La première d'entre-elles est une cyclodéshydratation promue par $POCl_3$ entre l'acide anthranilique et la cyclohexanone.[406] La tacrine chlorée **162**, obtenue avec un rendement de 57%, a ensuite été engagée dans une réaction de S_NAr avec le 2-aminoéthan-1-ol à 150 °C.[407] L'alcool **163** a été obtenu sous la forme d'un sel de chlorhydrate avec 67% de rendement. Finalement, le mésylate correspondant a été généré intermédiairement et a été directement employé dans la seconde phase de substitution nucléophile par l'azoture de sodium. Le tacrine **164** comportant la fonction azoture a été isolée avec 61% de rendement.

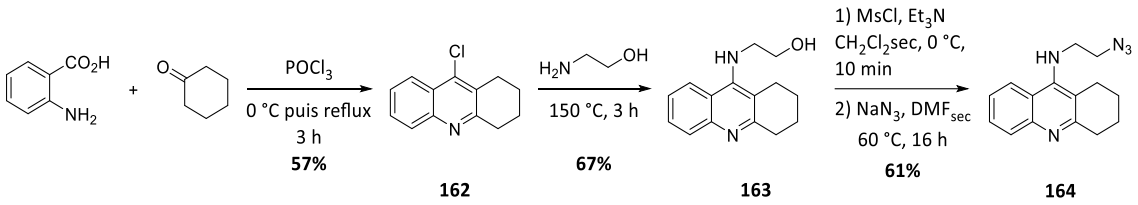


*Schéma 143. Synthèse en quatre étapes de la tacrine **164** fonctionnalisée par un azoture.*

2.6.1.2. Synthèse du partenaire PIQ fonctionnalisé par un alcyne terminal

Dans un premier temps, la viabilité de l'AChE à notre disposition pour réaliser les expériences de KTGS devait être vérifiée en réalisant la formation *in situ* du ligand ***syn*-TZ2PIQ-A6** décrit dans la littérature.[95] Ensuite, afin d'évaluer l'efficacité du marquage MS par la sonde phosphonium **160** afin d'augmenter la détectabilité des ligands formés en KTGS, la synthèse des ligands de référence, pré-marqué par un azoture et marqué par la sonde phosphonium a été anticipée.

Ainsi, le fragment PIQ de référence **166** a été réalisée selon la même procédure que son analogue **137** possédant la fonction azoture (Schéma 144).[395] L'amine **166** a été obtenue avec un rendement de 43% sur deux étapes *via* la formation de l'imine **165**, suivie par la réaction de Pictet-Spengler en milieu acide.

[406] Tripathi, R. P.; Verma, S. S.; Pandey, J.; Agarwal, K. C.; Chaturvedi, V.; Manju, Y. K.; Srivastva, A. K.; Gaikwad, A.; Sinha, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5144–5147.
[407] Hu, M.-K.; Lu, C.-F. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1815-1818.

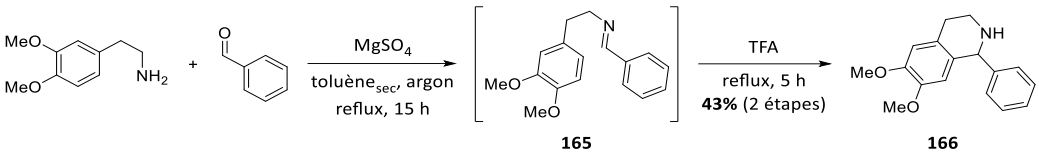


*Schéma 144. Synthèse en deux étapes de l'amine à motif PIQ **166**.*

De même, l'alcyne terminal **167** de référence a été obtenu avec un rendement de 70% par substitution nucléophile de l'amine **166** sur le tosylate **140** (Schéma 145).

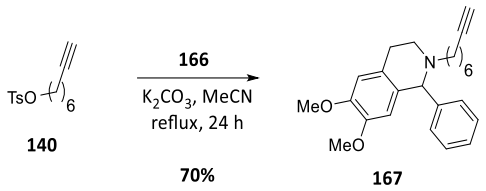


*Schéma 145. Préparation de l'alcyne terminal **167**.*

2.6.2. Préparation des ligands par voies chimiques

En amont des expériences de KTGS, la préparation des ligands de référence connus pour être formés par l'enzyme ont dû être effectuée par voie chimique classique.[95] En effet, la préparation de ces composés est indispensable afin qu'ils puissent servir de standards lors des analyses par LC-MS (études de fragmentations par transitions MRM et temps de rétention). De même, les mesures de leurs concentrations inhibitrices médianes (IC_{50}) vis-à-vis de l'AChE en amont des tests de KTGS sont cruciales afin de vérifier l'impact de la fonctionnalisation du ligand pré-marqué par un azoture.

2.6.2.1. Préparation des ligands 1,4-triazole (*trans*)

En premier lieu, l'obtention du ligand de référence ***trans*-TZ2PIQ-A6** a été tentée par réaction de CuAAC entre la tacrine **164** et l'alcyne **167** selon des conditions déjà employées par notre groupe de recherche (Schéma 146).[100]

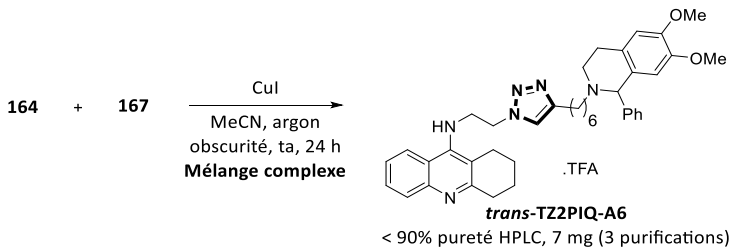


*Schéma 146. Préparation du ligand **trans-TZ2PIQ-A6** par réaction de CuAAC.*

Malheureusement, un mélange relativement complexe a été obtenu et le produit souhaité n'a pas pu être isolé en quantité suffisante par HPLC semi-préparative et avec une pureté HPLC inférieure à 90%.

Finalement, il a été décidé de préparer le 1,4-triazole **168** par réaction de CuAAC afin d'obtenir un intermédiaire commun aux deux ligands souhaités (référence et pré-marqué) et ainsi d'obtenir une meilleure convergence synthétique. Ainsi, la tacrine **164** a été mise en réaction en présence de l'oct-7-yn-1-ol selon le même protocole décrit ci-dessus et le triazole souhaité a été obtenu avec 37% de rendement (Schéma 147).

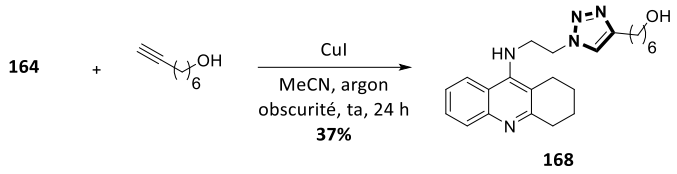


*Schéma 147. Synthèse du 1,4-triazole commun **168** par CuAAC.*

L'alcool **168** a ensuite été activé sous la forme d'un mésylate, qui une fois formé, a été parallèlement engagé dans des réactions de substitutions nucléophiles en présence des amines **166** ou **137** (Schéma 148).

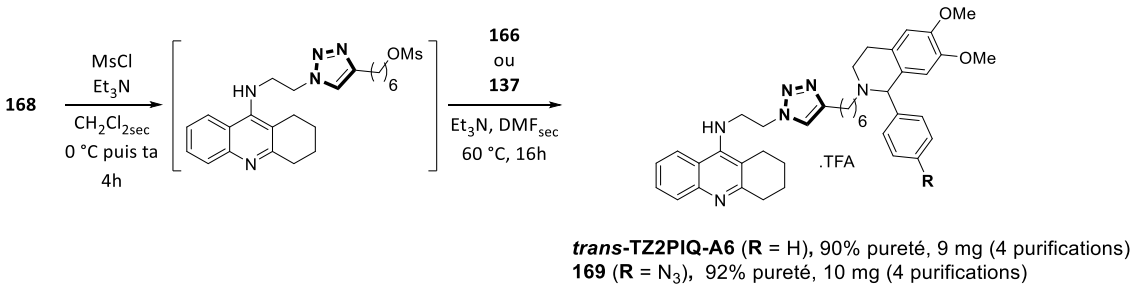


*Schéma 148. Préparation des ligands **trans-TZ2PIQ-A6** et **169** de la série des 1,4-triazoles.*

Dans les deux cas, ces réactions ont abouti à des mélanges complexes. Après quatre purifications et lyophilisations successives, les ligands ***trans*-TZ2PIQ-A6** et **169** n'ont pas pu être obtenus avec des puretés HPLC suffisantes (≥ 95%) afin de réaliser les mesures d'IC_{50} et les quantités finales de composés se sont avérées insuffisantes pour continuer les tentatives de purifications.

2.6.2.2. Préparation des ligands 1,5-triazole (*syn*)

Parallèlement à ces travaux, la préparation des ligands analogues 1,5-triazoles (*syn*) a été débutée. En premier lieu, l'obtention directe du ligand *syn* de référence ***syn*-TZ2PIQ-A6** a été tentée à l'aide d'une réaction de click catalysé par du ruthénium (RuAAC)[88] puis à l'aide du diéthylzinc[90] (Schéma 149).

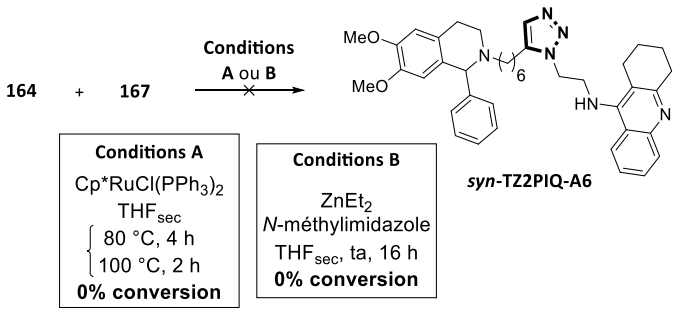


*Schéma 149. Tentatives de préparation du ligand **syn-TZ2PIQ-A6** par formation du linker 1,5-triazole.*

Ces deux types de conditions n'ont malheureusement pas permis d'observer la moindre conversion des réactifs de départ, ce qui a conduit à adopter une stratégie d'approche similaire à celle employée précédemment.

Ainsi, plusieurs tentatives de synthèse du 1,5-triazole **170** par RuAAC à l'aide de diverses sources de ruthénium se sont révélées infructueuses car aucune conversion des réactifs n'a pu être constatée (Schéma 150).

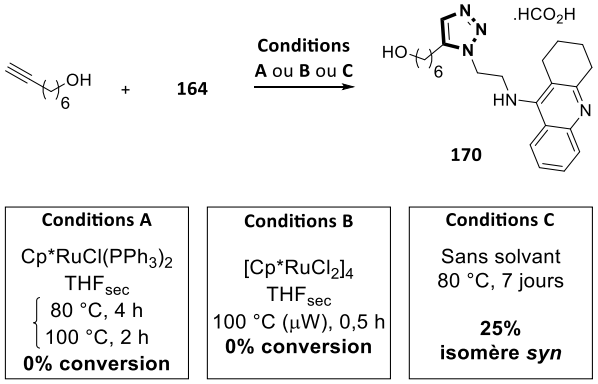


*Schéma 150. Préparation du 1,5-triazole commun **170** par activation thermique.*

Finalement, une activation thermique de l'azoture **164** et de l'oct-7-yn-1-ol sans solvant et durant sept jours a permis de générer un mélange d'isomères 1,4- et 1,5-triazoles correspondants, dans un ratio d'environ 1:1. La purification par HPLC semi-préparative du brut réactionnel a permis d'isoler le 1,5-triazole **170** avec un rendement de 25%.

Conformément aux premiers essais, l'alcool **170** a été activé par la formation du mésylate intermédiaire et a été mis en réaction avec les amines **166** ou **137** afin de former les ligands 1,5-triazoles ***syn*-TZ2PIQ-A6** de référence et **100** pré-marqué par un azoture (Schéma 151). Sans surprise, des mélanges complexes ont été encore une fois été obtenus dans chaque cas et les analyses MS des bruts réactionnels ont révélé que seul le ligand ***syn*-TZ2PIQ-A6** de référence était détectable, mais cependant inséparable par HPLC semi-préparative.

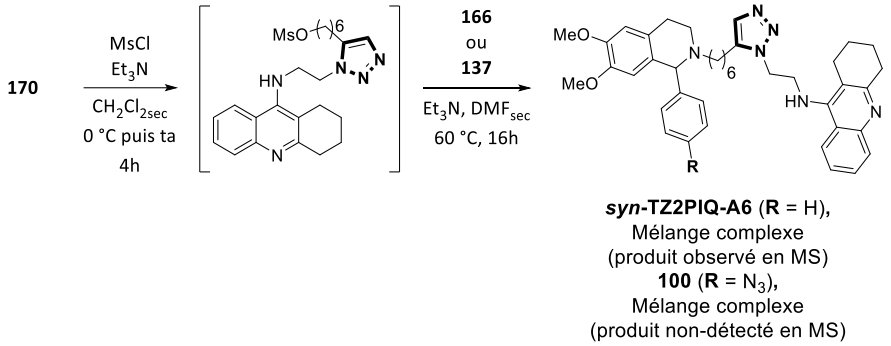


*Schéma 151. Tentatives de préparation des ligands **syn-TZ2PIQ-A6** et **100** de la série des 1,5-triazoles.*

Les ligands de référence et pré-marqués pour le projet d'amplification des signaux MS n'ont malheureusement pas pu être obtenus afin d'évaluer leurs IC_{50} vis-à-vis de l'AChE et pour l'établissement des références analytiques pour les expériences de KTGS. Bien que ce projet ait été stoppé pour le moment, ou tout du moins pour cette cible biologique dont les ligands associés ont été difficiles à préparer avec une pureté suffisante, la stratégie de pré-marquage des fragments pour l'augmentation artificielle de la détectabilité des ligands formés au sein d'une cible reste attractive. Elle devrait en effet pallier certaines limitations de la KTGS et son développement sera probablement poursuivi lors de prochains travaux.

Parallèlement à cette étude d'amplification des signaux MS, une stratégie séquentielle de « *Click & Fish* » impliquant la formation d'un motif pyrazolone a été étudiée et les résultats sont présentés ci-après.

III – Stratégie de « *Click & Fish* » : étude d'une séquence réactionnelle impliquant la formation d'un motif pyrazolone en vue de marquer spécifiquement le ligand formé *in situ*

La formation au sein de la cible d'une fonction chimique à la fois stable en milieu biologique (Schéma 152, **Réaction 1**), tout en présentant une certaine réactivité vis-à-vis de fonctions spécifiques, pourrait permettre l'élaboration de séquences réactionnelles chimiosélectives, dite de « double-click ». Effectivement, l'emploi d'une sonde pro-fluorescente pouvant réagir spécifiquement avec la première fonction formée par KTGS (Schéma 152, **Réaction 2**) pourrait permettre une nette augmentation de la détectabilité des ligands formés grâce à la forte sensibilité des techniques de détection de fluorescence (Schéma 152, **Réaction 2**). De plus, la transposition de cette nouvelle génération de criblage de KTGS pourrait être tout à fait transposable à des formats HTS grâce aux équipements robotisés actuels.

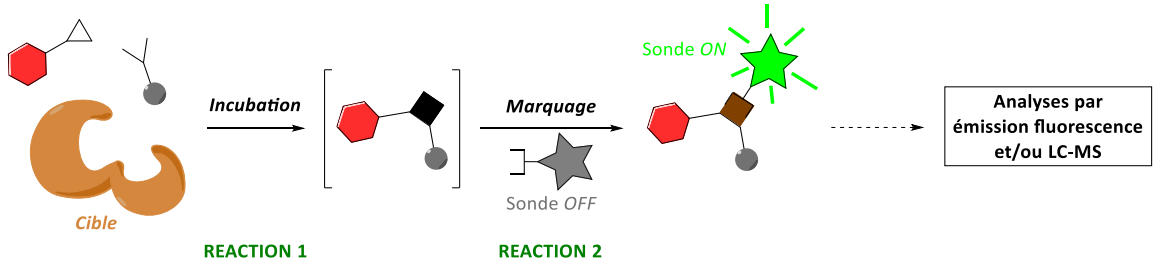


Schéma 152. Principe de l'approche visée de « double-click » entre le ligand et une sonde pro-fluorescente.

Suite à de récents travaux développés dans notre équipe, et qui seront présentés plus tard, la fonction pyrazolone a suscité un vif intérêt pour ce projet.

3.1. La fonction pyrazolone

3.1.1. Structure et généralités

Formées à partir d'un β-cétoester et d'une hydrazine, les pyrazol-5-ones, ou pyrazolones, sont des hétérocycles azotés à cinq atomes comprenant une fonction carbonyle et deux atomes d'azotes adjacents (Schéma 153, **A**).[408] La formation de ces composés est

[408] Gediz Erturk, A.; Omerustaoglu, H. *Molecules* **2020**, *25*, 900–920.

souvent réalisée dans des solvants polaires (alcools principalement) mais également dans des mélanges de solvants organique/aqueux. Le cycle pyrazolone a été employé dans l'élaboration de nombreuses molécules bioactives, comme l'Edaravone (Radicut®), un puissant antioxydant qui est prescrit comme agent anti-ischémique et contre le stress oxydant cérébral (Schéma 153, **B**).[409]

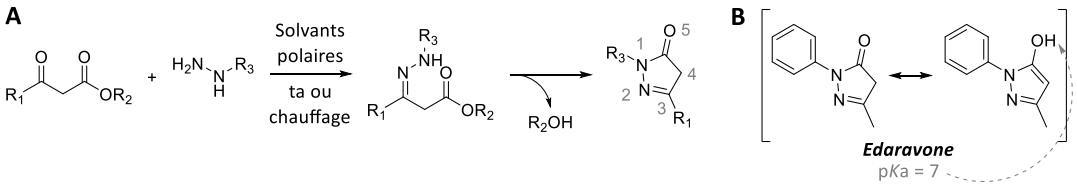


*Schéma 153. (**A**) Synthèse et structure générale des pyrazolones (**B**) Structure et valeur du pKa de l'Edaravone.*

Par ailleurs, les pyrazolones présentent certaines similarités avec les cycles triazoles du point de vue de leurs géométries, leurs dimensions et leurs densités électroniques. Un point important émerge également de ces comparaisons et qui se trouve être la « flexibilité » des deux systèmes pour la formation des cycles respectifs. En effet, la réaction de Huisgen confère une certaine marge de manœuvre au système puisque les isomères *syn* ou *anti* peuvent être formés selon l'agencement spatial préalable des fragments au sein de la cible biologique (Schéma 154, **A**).

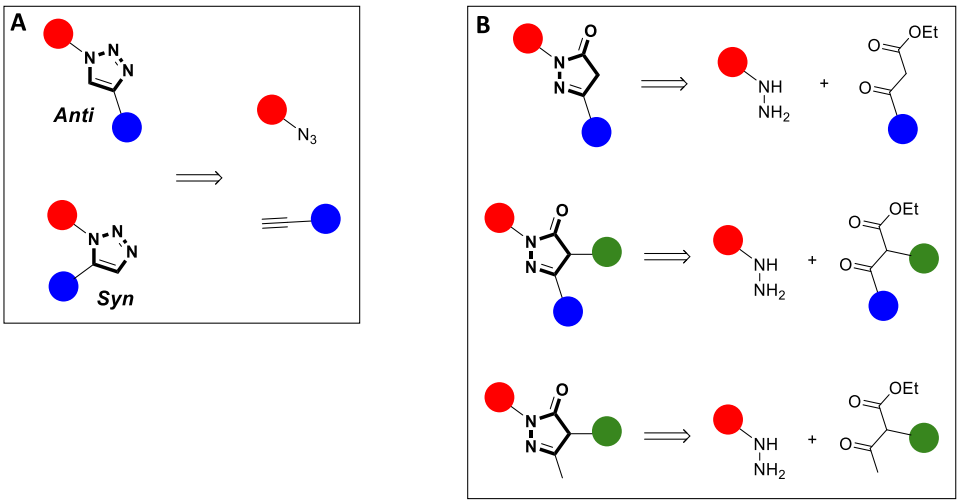


*Schéma 154. (**A**) Illustration de la « flexibilité » de la réaction de click en KTGS. (**B**) Illustration de la « flexibilité » de la formation de cycle pyrazolone grâce à la nature du partenaire β-cétoester.*

[409] (a) Watanabe, T.; Tahara, M.; Todo, S. *Card. Thera.* **2008**, *26*, 101–114. (b) Polkam, N. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 2562–2568.

De manière un peu différente, la formation des pyrazolones offre également un certain degré de liberté car l'emploi d'isomères de position pour le partenaire β-cétoester offre de nombreuses possibilités pour l'agencement spatial des fragments au sein de la cible et permet une meilleure occupation de l'espace puisque la pyrazolone peut, *in fine*, être substituée par deux ou trois groupements, ce qui n'est pas possible avec le motif triazole (Schéma 154, **B**).

3.1.2. Réactivité des pyrazolones

La valeur du p*K*a des pyrazolones est relativement basse, avec par exemple un p*K*a de 7 dans le cas de l'Edaravone (Schéma 153, **B**), ce qui conduit donc à avoir la coexistence des formes acide et basique (énolate) en conditions physiologiques. Cette particularité confère aux pyrazolones de très bonnes propriétés de nucléophilie en position C-4 et qui vont maintenant être décrites.

Les pyrazolones, et plus précisément les couples énol/énolate, présentent de nombreuses similitudes avec la réactivité des couples thiol/thiolate en terme de nucléophilie. En effet, cette famille chimique peut réagir avec des électrophiles de natures très variées comme les accepteurs de Michael (solvants organiques ou milieux aqueux),[410] les aldéhydes (milieux aqueux),[411] les ponts disulfures (solvants organiques),[412] les sels de diazoniums (solvants organiques polaires),[413] les nitrosos (solvants organiques polaires),[414] ou encore plus récemment, comme notre équipe l'a montré, les tétrazines (milieux aqueux)[415] (Schéma 155).

---

[410] (a) Elinson, M. N.; Sokolova, O. O.; Nasybullin, R. F. *Heterocyclic Commun.* **2010**, *22*, 1973–1976. (b) Zhang, Y.; Wu, S.; Wang, S.; Fang, K.; Dong, G.; Liu, N.; Miao, Z.; Yao, J.; Li, J.; Zhang, W.; Sheng, C.; Wang, W. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 2030–2037. (c) Lai, X.; Zha, G.; Liu, W.; Xu, Y.; Sun, P.; Xia, T.; Shen, Y. *Synlett* **2016**, *27*, 1983–1988. (d) Chen, X.; Zha, G.-F.; Bare, G. A. L.; Wang, S.-M.; Qin, H.-L. Adv. *Synth. Cat.* **2017**, *359*, 3254–3260.

[411] (a) Kudirka, R.; Barfield, R. M.; McFarland, J.; Albers, A. E.; de Hart, G. W.; Drake, P. M.; Holder, P. G.; Banas, S.; Jones, L. C.; Garofalo, A. W.; et al. *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 293–298. (b) J. Yu, D. Shen, H. Zhang, Z. Yin, *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 1016–1020.

[412] Liu, X.; Cui, H.; Yang, D.; Dai, S.; Zhang, T.; Sun, J.; Wei, W.; Wang, H. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 51830–51833.

[413] (a) Bianchini, R.; Bonanni, M.; Corsi, M.; Infantino, A. S. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 8636–8644. (b) Singh, A.; Choi, R.; Choi, B.; Koh, J. *Dyes Pigm.* **2012**, *95*, 580–586. (c) Gunkara, O. T.; Bagdatli, E.; Ocal, N. *J. Chem. Res.* **2013**, *37*, 227–231.

[414] (a) Kaya, U.; Chauhan, P.; Mahajan, S.; Deckers, K.; Valkonen, A.; Rissanen, K.; Enders, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 15358–15362. (b) Mahajan, S.; Chauhan, P.; Kaya, U.; Deckers, K.; Rissanen, K.; Enders, D. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 6633–6636.

[415] Renault, K.; Guillou, C.; Renard, P.-Y.; Sabot, C. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 388–396.

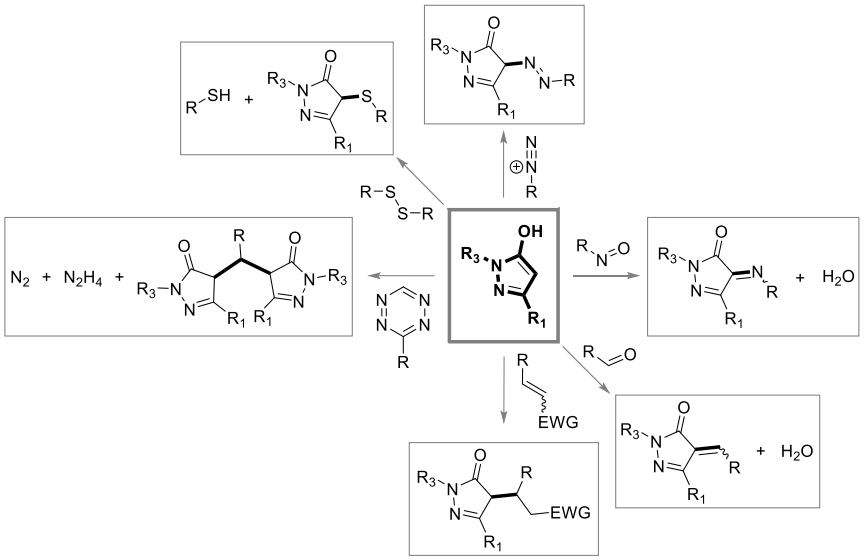


Schéma 155. Réactivité des pyrazolones avec divers électrophiles.

Finalement, les pyrazolones ont particulièrement attiré notre attention pour cette fonction dans le cadre du projet de « *Click & Fish* » en raisons de 1) leurs structures similaires à celle des triazoles, 2) leur flexibilité de formation, 3) leur stabilité en milieux biologiques et 4) leur réactivité en tant que nucléophiles.

Ainsi, la préparation dans un premier temps d'une molécule modèle comportant cette fonction a été entreprise pour les études préliminaires. L'emploi d'une molécule modèle dans le cadre des études préliminaires est toujours préférable afin d'éviter le gaspillage des ligands ciblés qui ont une très grande valeur ajoutée et tout en travaillant à l'aide de structures simple et généralistes.

3.1.3. Synthèse d'une pyrazolone modèle

Une pyrazolone modèle mimerait un ligand potentiellement formé au sein d'une cible biologique a été synthétisée. Pour cela, une hydrazine modèle a été obtenu en deux étapes à partir du (3-bromopropyl)benzène et du *tert*-butylcarbazate avec un rendement global de 80% (Schéma 156).

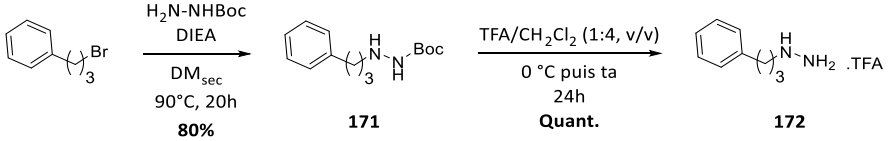


*Schéma 156. Préparation de l'hydrazine modèle **172**.*

Ensuite, la préparation du β-cétoester modèle **173** a été effectuée *via* l'alkylation du 3-oxobutanoate d'éthyle en position C-4 et grâce à la formation préalable du dianion correspondant selon une procédure séquentielle (Schéma 157).[416] Le composé **173** a finalement été obtenu avec 49% de rendement.

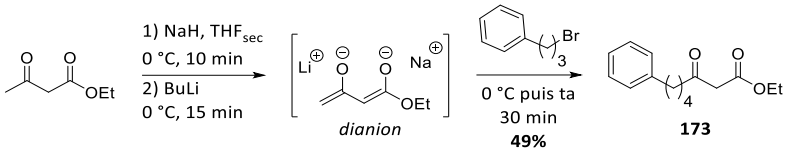


*Schéma 157.Préparation du β-cétoester modèle **173**.*

En définitif, afin de préparer d'une part la pyrazolone modèle **174**, mais également d'évaluer la réactivité des précurseurs **172** et **173** en milieux aqueux, ces derniers ont été mis en réaction dans un mélange EtOH/PBS pH 7,4 (2:1, v/v) à température ambiante (Schéma 158).

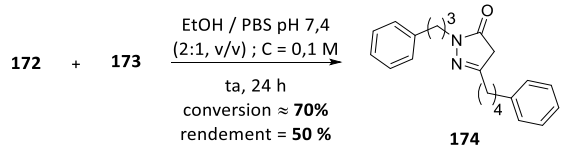


*Schéma 158. Synthèse en conditions aqueuses de la pyrazolone modèle **174**.*

Malgré des concentrations relativement élevées en réactifs (0,1 M) et une durée de mise en contact de 24 heures, le produit désiré a été isolé avec seulement 50% de rendement pour une conversion d'environ 70%. En effet, lorsqu'elles se trouvent protonées, les hydrazines voient leur stabilité augmenter au détriment de leur réactivité qui diminue fortement.

Par conséquent, les conditions douces employées en KTGS, combinées à la faible réactivité des partenaires hydrazines salifiées, devraient permettre d'obtenir des cinétiques suffisamment lentes afin d'observer sans ambiguïté les potentielles accélérations cinétiques en présence de la cible biologique.

[416] Huckin, S. N.; Weiler, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 1082–1087.

3.2. Recherche d'une fonction réactive complémentaire pour l'élaboration d'une sonde pro-fluorescente

Comme abordé lors du second chapitre, les sondes pro-fluorescentes sont des entités chimiques essentiellement constituées de deux parties distinctes : une unité fluorophore et une unité dite « quencher ». Cette dernière permet en effet, selon différents processus et mécanismes (photo)physiques (TeP, FRET, TBET, ICT, ESIPT…) suivant le type de fonction employée, conduire à l'extinction des propriétés de fluorescence du fluorophore. Dans le cas où le quencher est une fonction réactive, sa transformation chimique conduit généralement au recouvrement instantané des propriétés émissives de la sonde.

Un des objectifs pour ce projet a donc été de trouver une sonde pro-fluorescente pouvant réagir spécifiquement avec les pyrazolones, grâce à sa fonction chimique de type quencher, afin de permettre le recouvrement des propriétés émissives lors de la détection spécifique de la formation des ligands. Plusieurs sondes décrites dans la littérature ont ainsi pu être sélectionnées selon ces spécificités et comportent notamment comme fonctions réactives/quenchers des tétrazines (**Helios 400H**[417] et **S2**[418]), divers accepteurs de Michael (maléimide **S3**[419] et **S4**[420] ; nitro-alcène **S5**[421] ; pyrazolone conjuguée **S6**[422]) ou nitroso (**S7**)[423] (Figure 91).

[417] (a) Meimetis, L. G.; Carlson, J. C. T.; Giedt, R. J.; Kohler, R. H.; Weissleder, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7531–7534. (b) Brevet mondial n° : WO2014182704A2.

[418] Renault, K.; Guillou, C.; Renard, P.-Y.; Sabot, C. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 388–396.

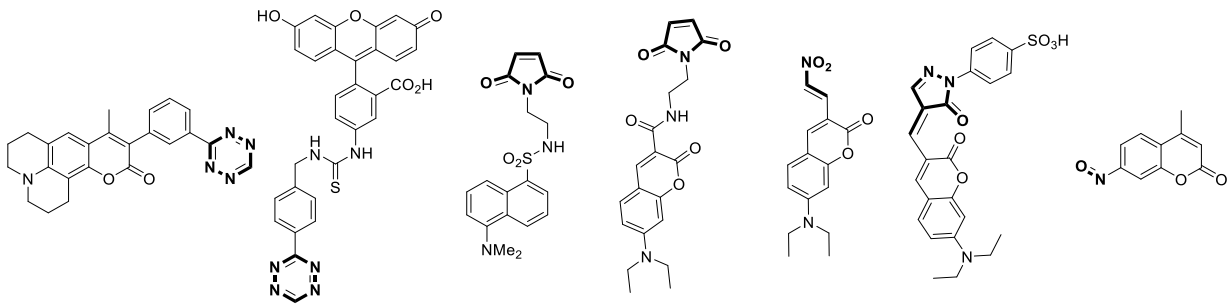
[419] Lossouarn, A.; Renault, K.; Bailly, L.; Frisby, A.; Nahenec-Martel, P. L.; Renard, P.-Y.; Sabot, C. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 3874–3887.

[420] Corrie, J. E. T.; Munasinghe, V. R. N.; Rettig, R. *J. Heterocycl. Chem.* **2000**, *31*, 1447–1455.

[421] (a) Kim, G.-J.; Kim, H.-J. *Tet. Lett.* **2010**, *51*, 185–187. (b) Sun, Y.-Q.; Chen, M.; Liu, J.; Lv, X.; Li, J.-F.; Guo, W. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 11029–11031.

[422] Renault, K.; Renard, P.-Y.; Sabot, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *2018*, 6494–6498.

[423] Renault, K.; Sabot, C.; Renard, P.-Y. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 7992–7996.



HELIOS 400H	S2	S3	S4	S5	S6	S7
λ_{abs} = 400 nm λ_{em} = 502 nm Exaltation : × 4000	λ_{abs} = 470 nm λ_{em} = 520 nm Exaltation : ∅	λ_{abs} = 330 nm λ_{em} = 560 nm Exaltation : × 31	λ_{abs} = 430 nm λ_{em} = 480 nm Exaltation : × 17	λ_{abs} = 410 nm λ_{em} = 480 nm Exaltation : ∅	λ_{abs} = 410 nm λ_{em} = 485 nm Exaltation : ∅	λ_{abs} = 330 nm λ_{em} = 454 nm Exaltation : × 193

Figure 91. Structures des sondes pro-fluorescentes retenues pour le projet. Ø : inconnue.

3.2.1. Synthèse

Seules les synthèses des sondes **HELIOS 400H** et **S7** ont dû être effectuées à partir des procédures décrites dans la littérature.

3.2.1.1. Préparation de la sonde **HELIOS 400H**[417(a)]

La tétrazine **HELIOS 400H** a été synthétisée en quatre étapes avec un rendement global inférieur à 1% (Schéma 159). En premier lieu, la coumarine **174** a été préparée par la réaction de Pechmann avec 51% de rendement en présence de chlorure de zinc. Il est à noter que l'efficacité de cette réaction est directement dépendante de la qualité de cet acide de Lewis, qui avant son emploi, doit impérativement être séché dans le $SOCl_2$ à reflux. Ensuite, une bromation en position C-3 de la coumarine à l'aide de NBS recristallisé a été effectuée et a fourni la coumarine bromée **175** avec un rendement 86%. Le couplage de Suzuki entre l'acide (3-cyanophényl)boronique et le composé **175** a finalement permis l'obtention du précurseur nitrile **176** de manière efficace, avec 94% de rendement. En définitif, la formation du cycle tétrazine s'est révélée être l'étape la plus complexe à différents points de vue. En effet, la méthodologie de synthèse décrite dans la littérature a dû être réadaptée en augmentant notamment les quantités des différents réactifs (multiplication par trois) et de l'acide de Lewis (multiplication par six). De plus, la durée de réaction a été rallongée de 15 heures à sept jours en raison de la diminution de la température de 60 à 45 °C afin de réduire les risques d'explosion en raison de la formation parallèle de la 1,2,4,5-tétrazine (gaz explosif).

Finalement, après deux purifications successives, la sonde **HELIOS 400H** a été obtenue avec un rendement de 2%.

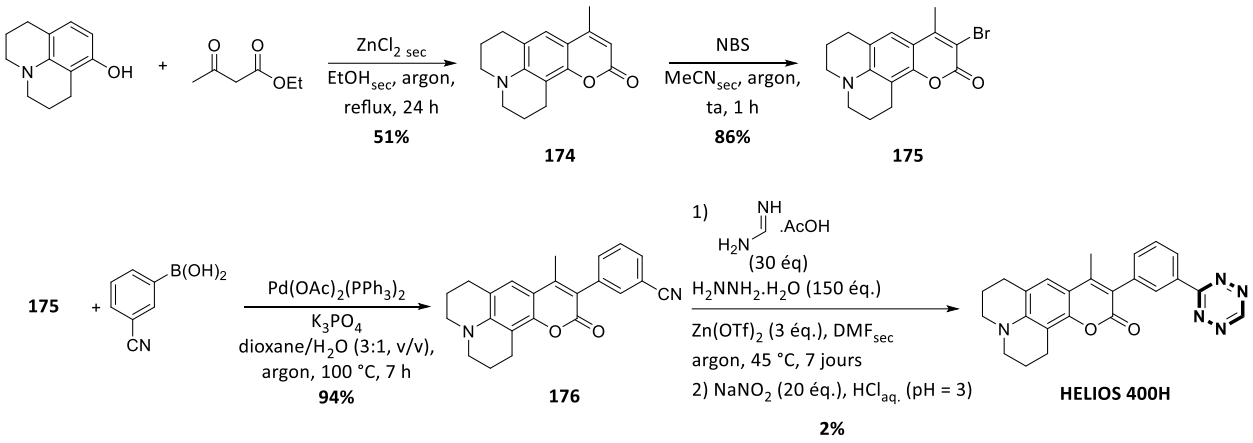


*Schéma 159. Synthèse en quatre étapes de la sonde **HELIOS 400H**.*

3.2.1.2. Préparation de la sonde **S7**[423]

La sonde **S7**, développée en 2015 par le groupe du Dr. Sabot pour la détection spécifique du sulfure d'hydrogène H_2S,[423] est accessible en une seule étape par oxydation de la 4-méthyl-7-aminocoumarine commerciale par l'Oxone® en milieu biphasique et a donc été préparée avec un rendement de 61% (Schéma 160).

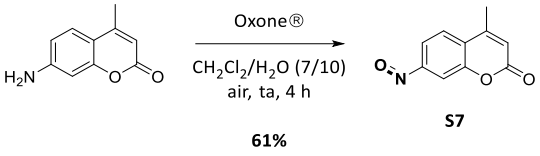


*Schéma 160. Synthèse de la sonde **S7**.*

3.2.2. Étude comparative des différentes sondes pro-fluorescentes

Le choix d'une des sondes sélectionnées en vue d'études plus approfondies pour la détection des ligands s'est basé sur trois critères :

- L'émission de fluorescence résiduelle de la sonde, c'est-à-dire l'efficacité d'extinction par le quencher et sa pureté chimique. La sonde étant employée en excès afin de détecter de faibles concentrations de pyrazolones, il est nécessaire que son émission de fluorescence résiduelle soit la plus faible possible pour des concentrations comprises entre 10 et 50 µM au moins.

- Afin d'éviter les résultats faux-positifs, la sonde doit présenter la plus grande stabilité dans l'environnement de la KTGS. Sa vitesse d'hydrolyse non-spécifique doit donc être la plus lente possible avec les molécules d'eau ou bien en présence de biomolécules et/ou des fragments réactifs (hydrazine et β-cétoester).
- La réactivité spécifique de la sonde vis-à-vis des pyrazolones, très diluées dans le milieu d'étude, doit être la rapide possible afin de pouvoir détecter la plus infime quantité de ligand potentiellement formée et d'éviter les résultats faux-négatifs qui invalideraient le criblage par KTGS.

Afin d'évaluer ces différents paramètres pour chaque sonde, leurs spectres d'émission ont été mesurés pour une concentration initiale de 50 µM et des suivis cinétiques de déclenchements ont été menés en présence de différents réactifs et produits pyrazolones susmentionnés (Schéma 161). Deux réactions de contrôle ont été menées avec ou sans lysozyme, cette protéine peu couteuse mimant la cible biologique. En effet, les chaînes latérales nucléophiles portées par les résidus des protéines peuvent être à l'origine d'un déclenchement non souhaité des sondes pro-fluorescentes. Par ailleurs, il a été décidé d'employer le lysozyme humain comme modèle de biomolécule car l'AChE est une enzyme très couteuse et disponible en faible quantité.

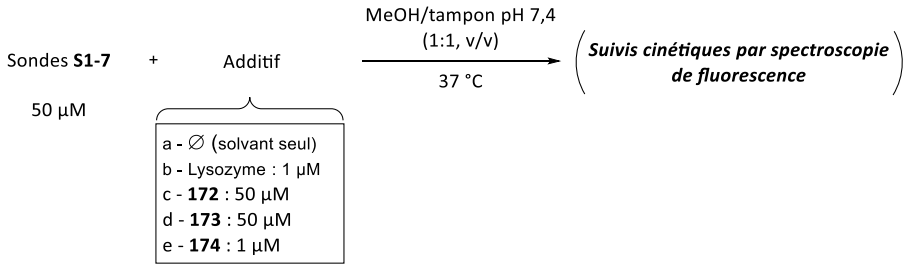


Schéma 161. Conditions expérimentales des études qualitatives des sondes par déclenchement de fluorescence.

Des conditions très proches de celles employées en KTGS (concentrations des réactifs et ligand modèle, température, pH…) ont été choisies afin d'observer le comportement des sondes en « situations réelles ». Il est cependant à noter que 50% du volume de solvant est composé de méthanol, ce qui correspond à l'étape de traitement classique de KTGS afin de dénaturer la cible et de décomplexer les ligands de leurs cibles biologiques.

Les résultats qualitatifs obtenus lors de cette première étude ont été résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 14). Les différentes pentes de courbes cinétiques ainsi obtenues

ont été comparées afin de déterminer si les résultats étaient en adéquation avec les critères fixés. Ainsi, une émission de fluorescence résiduelle trop importante a pu être détectée avec les sondes **HELIOS 400H** et **S2**, y compris pour des concentrations de 5 µM. Ce paramètre a donc exclu leur emploi pour ce projet, même si les études concernant leurs hydrolyses non-spécifiques et de la réactivité de l'**HELIOS 400H** vis-à-vis des pyrazolone ont donné de bons résultats. Par ailleurs, la forte insolubilité de la sonde **S5** a également conduit à son abandon. Les sondes **S3**, **S4** et **S6** ont également été mises de côté en raison de leurs mauvais résultats vis-à-vis de leurs leur hydrolyses non-spécifiques et des réactivités de ces sondes avec les pyrazolones. Finalement, les résultats les plus probants ont été obtenus avec la sonde nitroso **S7** et qui a donc été sélectionnée pour la suite de l'étude, même si la nature du produit formé n'a pas encore été déterminée.

Sondes	**HELIOS 400H**	**S2**	**S3**	**S4**	**S5**	**S6**	**S7**
EFR	N	N	O	O	I	O	O
HNS	O	O	N	N	I	N	O
RSP	O	N	N	N	I	N	O

O : convient au critère fixé ; N : ne convient pas au critère fixé ; I : insoluble. EFR : Émission de fluorescence résiduelle. ; HNS : Hydrolyse non-spécifique. ; RSP : Réactivité spécifique avec les pyrazolones.

Tableau 14. Résultats qualitatifs des études préliminaires pour la sélection d'une sonde.

3.2.3. Tests complémentaires

La concentration de la sonde lors de la phase de marquage post-KTGS est apparue comme un paramètre critique et à étudier en priorité afin de valider sa viabilité pour le projet. En effet, une concentration relativement élevée en sonde va d'une part favoriser les probabilités de rencontres avec les ligands formés dans les milieux fortement dilués, ce qui va permettre un marquage et une conversion bien supérieurs. En même temps, une concentration trop importante en sonde peut conduire à divers effets néfastes en terme d'émission de fluorescence en raison d'une absorbance lumineuse trop importante du milieu réactionnel. On peut par exemple citer parmi ces effets des phénomènes de filtres en excitation (absorption du rayonnement d'excitation) et en émission (réabsorption du rayonnement d'émission), possiblement additionnés à des effets d'inhibition par des phénomènes de FRET intermoléculaire (proximité moléculaire de 10 à 15 nm) ou encore par

la formation d'excimères (collision de deux molécules dans leurs états excités). Un compromis a donc dû être trouvé afin d'obtenir dans le même temps une vitesse de réaction entre les pyrazolones et la sonde suffisamment élevée, tout en permettant l'obtention d'une émission de fluorescence la plus élevée possible.

Afin d'éviter les différents effets inhibiteurs de fluorescence cités ci-dessus, l'absorbance du milieu doit être comprise de manière empirique et idéale entre 0,1 et 0,25 après introduction du fluorophore. Ainsi, une courbe de calibration indiquant l'absorbance en fonction de la concentration en sonde **S7** a été réalisée (Figure 92). D'après la courbe obtenue, une concentration en sonde **S7** comprise entre 10 et 20 µM permet l'obtention d'une valeur d'absorbance située entre 0,13 et 0,29 ce qui correspond bien au critère d'efficacité de fluorescence fixé. Il a donc été décidé de réaliser les premiers essais de déclenchements pour une concentration de 15 µM en sonde **S7**.

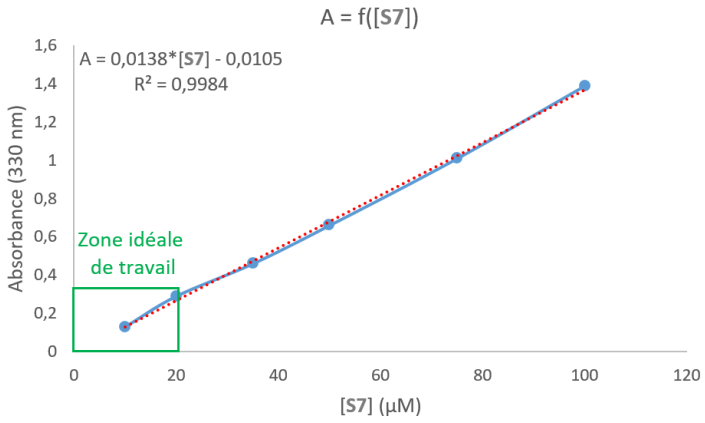


*Figure 92. Courbe de calibration entre l'absorbance et la concentration en sonde **S7** (λ = 330 nm).*

L'efficacité du marquage a finalement pu être évaluée expérimentalement grâce à la comparaison des intensités relatives de fluorescence obtenues en fonction de la concentration en sonde **S7** (15 ou 100 µM) et de la concentration en pyrazolone modèle (1 ou 0 µM) après 24 heures d'incubation à 37 °C (Schéma 162).

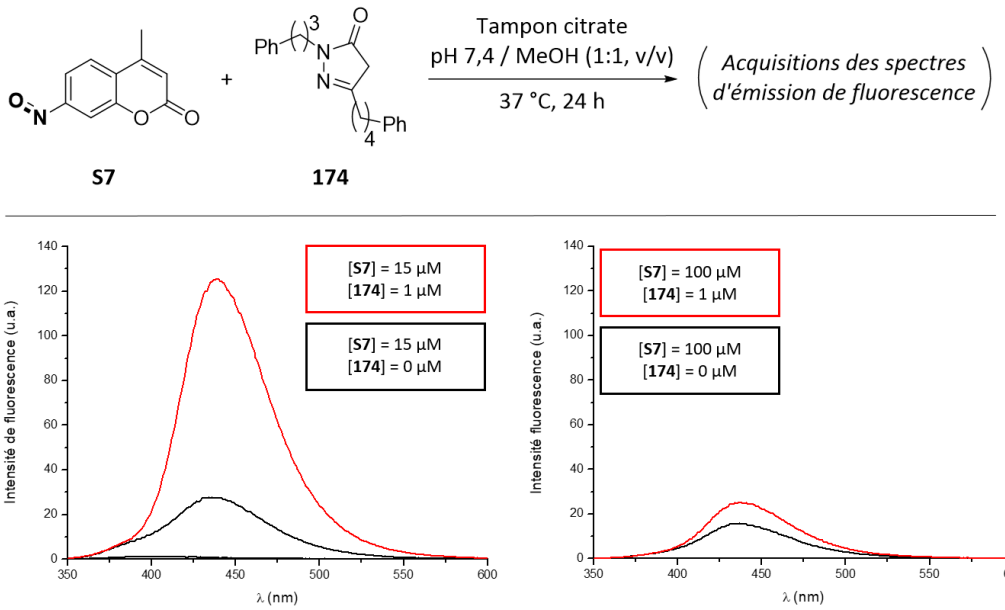


*Schéma 162. Comparaison de l'efficacité de détection de la pyrazolone **174** en fonction de la concentration en sonde **S7**.*

Finalement, le déclenchement de fluorescence qui a été obtenu pour une concentration de 15 µM en sonde a permis l'obtention de très bons résultats, avec des facteurs d'exaltations d'environ cinq entre l'hydrolyse non-spécifique de la sonde (0 µM en pyrazolone) et le marquage spécifique (1 µM en pyrazolone), ce qui est suffisamment significatif pour un premier essai. Sans surprise, aucune différence significative n'a pu être observée pour une concentration de 100 µM en sonde, que ce soit en présence ou non de la pyrazolone modèle. Ces résultats encourageants devront maintenant conduire vers une optimisation plus fine des conditions opératoires (concentrations de travail, temps d'incubation…).

3.3. Préparation des fragments réactifs pour la KTGS

En parallèle des études préliminaires pour l'étape de marquage des ligands, la préparation des fragments réactifs en vue d'établir une preuve de concept quant à l'éligibilité de la formation du cycle pyrazolone en KTGS a été entreprise. Conformément au projet précédent d'amplification du signal MS, une structure du ligand **177**, analogue du ***syn*-TZ2PIQ-A6** de référence, a été proposé afin de débuter ces travaux (Schéma 163). En raison de l'activité d'estérase de la cible biologique, il est préférable que la fonction β-cétoester soit portée par le partenaire PIQ (inhibiteur du SPA) afin d'éviter les risques d'hydrolyse de cette

fonction dans le site d'acylation de l'AChE situé au fond de la gorge. Il a par conséquent été choisi de fonctionnaliser le partenaire tacrine par la fonction hydrazine.

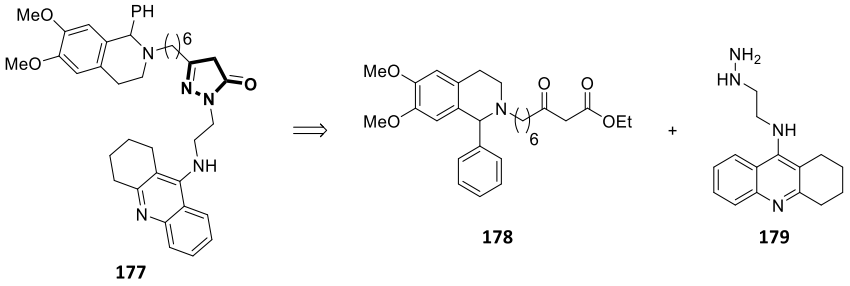


*Schéma 163. Structure du ligand visé **177** et des fragments réactifs précurseurs **178** et **179**.*

*3.3.1. Préparation du partenaire tacrine-hydrazine **179***

Par analogie à la préparation du partenaire tacrine de référence fonctionnalisée par un azoture **164**, l'obtention directe du fragment réactif **179** a été tentée par activation de l'alcool **163** par formation du mésylate, puis par substitution nucléophile à l'aide du monochlorhydrate d'hydrazine (Schéma 164).[407]

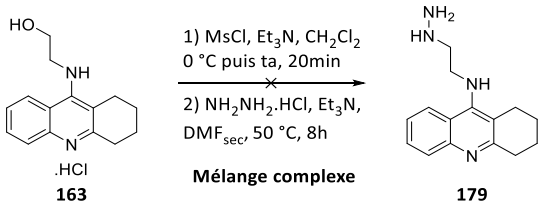


*Schéma 164. Tentative de préparation directe du fragment réactif **179**.*

Malheureusement, un mélange complexe a été obtenu et le produit souhaité n'a pas pu être détecté par analyse MS du brut réactionnel.

Dans le but de pouvoir conserver cette stratégie et de pouvoir isoler l'intermédiaire alcool activé, le remplacement du groupement partant mésylate par un groupement tosylate a donc été effectué et le composé **180** a été obtenu intermédiairement avec 55% de rendement (Schéma 165).[424] De plus, le monochlorhydrate d'hydrazine a également été remplacé par le *tert*-butylcarbazate lors de la substitution nucléophile afin de limiter la

[424] Xie, S.-S.; Wang, X.; Jiang, N.; Yu, W.; Wang, K. D. G.; Lan, J.-S.; Li, Z.-R.; Kong, L.-Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *95*, 153–165.

réaction de dimérisation éventuelle, mais une nouvelle fois, un mélange complexe a de nouveau été obtenu.

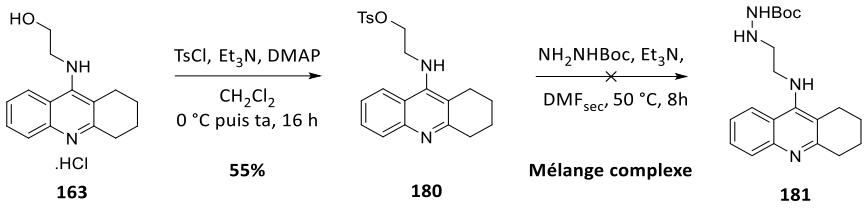


*Schéma 165. Tentative de préparation du précurseur **181** en deux étapes.*

Suite à ces premiers essais infructueux, une autre rétrosynthèse a été imaginée afin d'accéder au composé **179** en quatre étapes (Schéma 166). Il a donc été prévu en première étape une réaction de S_NAr entre la tacrine chlorée **162** et le 2,2-diméthoxyéthan-1-amine afin d'accéder à l'acétal **183**, dont la déprotection en milieu acide conduirait à l'aldéhyde **182** correspondant. Une amination réductrice entre ce dernier et le *tert*-butylcarbazate a ensuite été imaginée afin d'obtenir le précurseur **181**, dont la simple déprotection du groupement Boc conduirait au fragment réactif **179**.

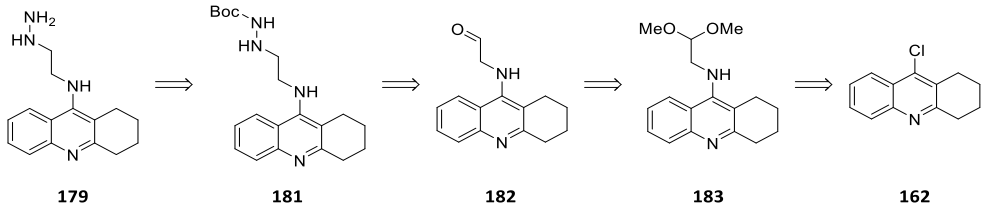


*Schéma 166. Analyse rétro-synthétique du composé **179**.*

La préparation de l'acétal **183** a donc été tentée par activation thermique classique et sans solvant, mais des mélanges complexes ont été obtenus dans chaque cas et probablement en raison du chauffage sur une période prolongée (Schéma 167).

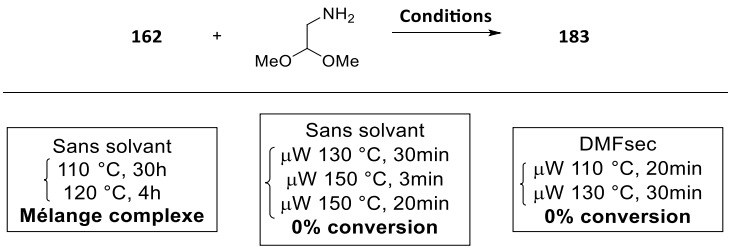


*Schéma 167. Essais de préparation de l'acétal **183**.*

Des activations thermiques par micro-ondes ont donc été explorées afin de réduire les temps de réactions et de pouvoir limiter la dégradation. Différentes températures et

conditions de solvant (avec ou sans) ont donc été testées et, bien qu'aucune dégradation n'ait pu être constatée, aucune conversion des réactifs n'a pu cependant être détectée.

La préparation du fragment réactif **179** s'est donc révélée plus complexe que prévue et d'autres stratégies d'approches ont donc été imaginées, mais n'ont pas encore pu être testées pour ce précurseur.

*3.3.2. Préparation du partenaire PIQ comprenant un motif β-cétoester **178***

Concernant la préparation du partenaire **178**, deux principales voies rétro-synthétiques **A** et **B** ont été imaginées (Schéma 168).

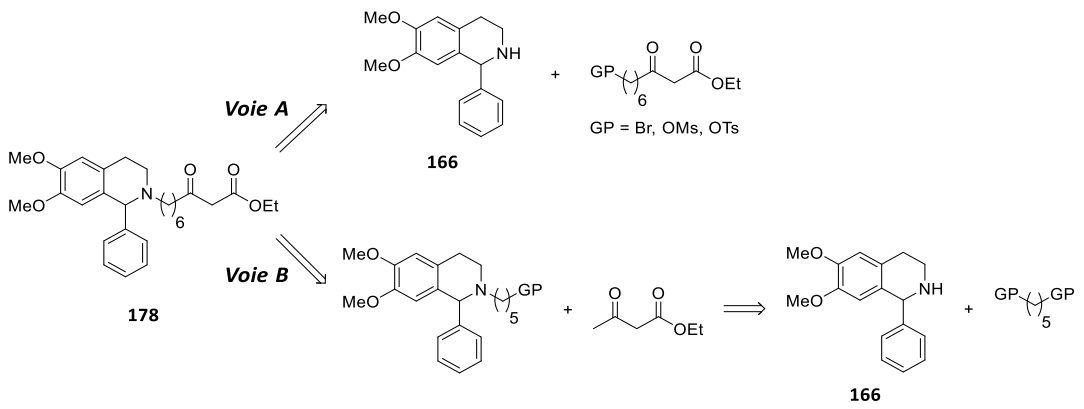


*Schéma 168. Analyses rétro-synthétiques du composés **178** selon les voies A et B. GP : groupe partant.*

La voie **A** repose sur la préparation d'un β-cétoester fonctionnalisé par un groupement partant (GP) afin d'effectuer une substitution nucléophile à l'aide de l'amine **166**. La voie **B** quant à elle prévoit une incorporation d'un GP en bout de chaîne sur le partenaire PIQ afin de réaliser également une substitution nucléophile à l'aide du dianion généré à partir du 3-oxobutanoate d'éthyle.

3.3.2.1. Exploration de la voie **A**

Un premier β-cétoester **184**, fonctionnalisé par un atome de brome en position *C*-9, a été obtenu avec 39% de rendement *via* l'alkylation en position *C*-4 du 3-oxobutanoate d'éthyle par le 1,5-dibromopentane (Schéma 169).

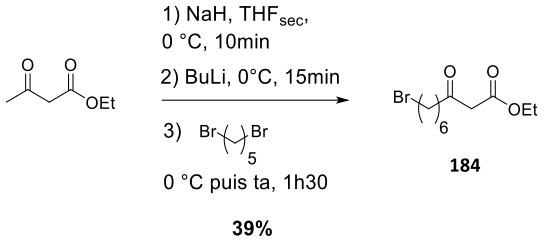


*Schéma 169. Préparation du β-cétoester **184**.*

L'obtention directe du fragment réactif **178** a alors été tentée par substitution nucléophile de l'amine **166** sur le composé bromé **184** en présence de carbonate de potassium comme base faible (Schéma 170, **A**). Après 16 heures de réaction à 80 °C et le traitement aqueux afin d'éliminer les potentielles traces d'iminium formées, l'analyse du brut réactionnel a permis l'observation de 14% de conversion en produit désiré et sans dégradation. Souhaitant augmenter la nucléophilie de l'amine **166**, cette dernière a donc été déprotonée en premier lieu par de l'hydrure de sodium avant l'addition d'une solution de du dérivé bromé **184** dans le milieu (Schéma 170, **B**). Cette fois, une conversion de 25% a pu être observée en produit désiré, mais d'autres sous-produits ont pu également être observés.

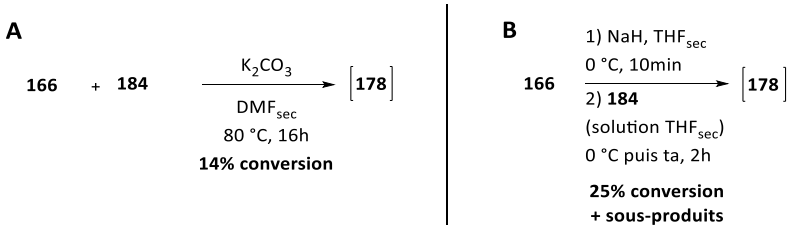


*Schéma 170. (**A**) Substitution nucléophile en présence d'une base faible. (**B**) Substitution nucléophile en présence d'une base forte.*

Aux vues de ces premiers résultats peu engageants, la voie de synthèse **A** a donc été abandonnée afin de concentrer les efforts sur la voie **B**.

3.3.2.2. Exploration de la voie **B**

La synthèse de l'alcool **186** a été réalisée en deux étapes, avec en premier lieu la préparation du tosylate **185**, obtenu avec 59% de rendement, puis l'étape de substitution nucléophile par l'amine **166** a permis d'obtenir le précurseur désiré avec un rendement de 65% (Schéma 171).

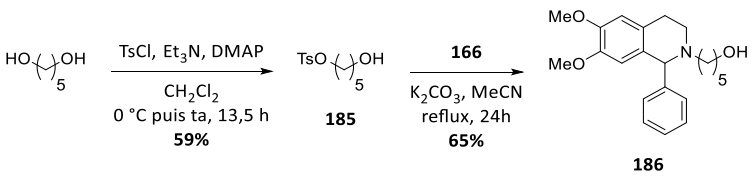


*Schéma 171. Préparation de l'alcool précurseur **186**.*

Une réaction d'Appel a ensuite été effectuée à partir de l'alcool **186** afin d'obtenir son analogue bromé **187** (Schéma 172). Le composé désiré n'a malheureusement pas pu être obtenu car la présence de traces d'acide bromhydrique dans le milieu a conduit à la formation de multiples produits de déméthylation, observés par RMN ^{1}H et analyses MS du brut réactionnel.

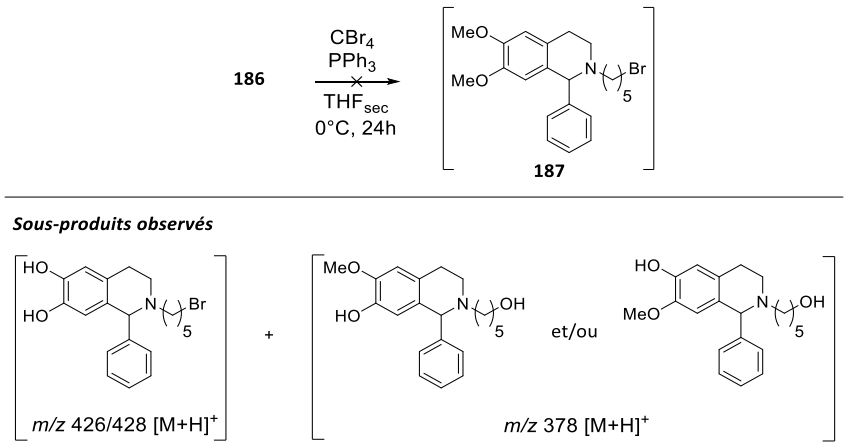


*Schéma 172. Réaction d'Appel sur le précurseur **186** et structures supposées des sous-produits formés.*

La synthèse du fragment réactif **178** a alors été explorée en préparant en parallèle le mésylate **188** intermédiaire et le dianion du 3-oxobutanoate d'éthyle avant de les mettre en réaction (Schéma 174). Une fois encore, un mélange complexe a été formé et le produit souhaité n'a malheureusement pas pu être obtenu.

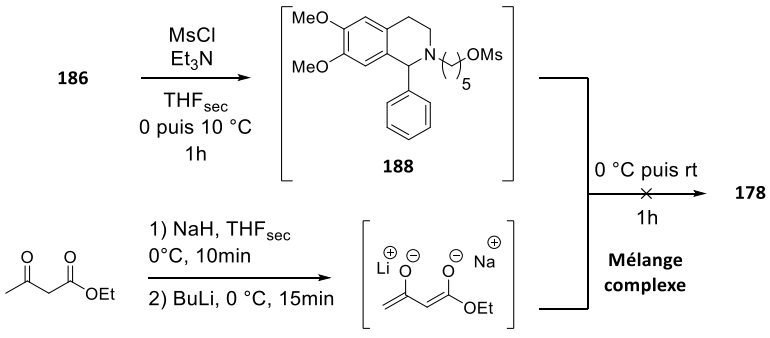


*Schéma 173. Essai de préparation du fragment réactif **178** par activations parallèles des réactifs.*

IV – Conclusion

En définitif, le projet de pré-marquage des fragments réactifs pour l'amplification du signal MS en KTGS a conduit au développement et à l'étude d'une nouvelle génération d'aminophosphoniums stables en conditions physiologiques à partir de la phosphine **TtrisMeOP** commerciale. Plusieurs exemples ont pu ainsi être synthétisés et les études de stabilité de ces composés ont permis de déterminer que ces structures étaient totalement viables pour les conditions employées en KTGS (tampon aqueux, pH, température, présence de biomolécules…). La protonation naturelle de ces aminophosphoniums en conditions physiologiques, fournissant la forme phosphonium hautement détectable sans traitement préalable, a pu être établie en mesurant la valeur du p*K*a d'un des exemples (≈ 13,5). Malheureusement, la trop faible vitesse de formation de ces composés n'a pas permis d'envisager une quelconque application en KTGS pour l'augmentation de la détectabilité des ligands en LC-MS.

En conséquence, une sonde plus classique comportant un groupement phosphonium et un motif bicyclononyne comme fonction réactive a donc été préparée. Les premiers tests de réactivité lors du marquage d'azotures à basses concentrations par réaction de SPAAC et de détectabilité MS ont été concluants pour des applications en KTGS.

Par ailleurs, malgré les efforts fournis afin de mener à bien la synthèse des ligands de référence dans le cadre de ce projet, ces derniers n'ont pas pu être obtenus en quantités suffisantes et avec des puretés HPLC inférieures à 95%, même après de multiples étapes de purifications. Les mesures de leurs IC_{50} vis-à-vis de l'AChE n'ont donc pas pu être effectuées et les expériences de KTGS n'ont pas pu être réalisées.

Parallèlement à ces travaux, le développement de nouvelles réactions séquentielles en KTGS, dites de « Click & Fish », a été initié afin de pouvoir dans un premier temps former les ligands au sein de la cible thérapeutique, puis de les marquer spécifiquement à l'aide de sondes chimiques réactives dans le but de faciliter leur détection par spectroscopie de fluorescence.

Pour cela, la formation de pyrazolone comme nouvelle réaction de KTGS a été imaginée conjointement avec la recherche de fonctions capables de réagir avec ce motif dans

une deuxième réaction. Finalement, une 7-nitroso—4-méthylcoumarine, développée par le groupe du Dr. Sabot en 2015, a permis l'obtention des meilleurs résultats pour la détection spécifique de la fonction pyrazolone grâce à son exaltation de fluorescence. Des tests complémentaires doivent maintenant être effectués afin de confirmer ces résultats (spécificité fonctionnelle, cinétique de réaction et d'hydrolyse, limites de détection…). Il est à noter que pendant la rédaction de ce manuscrit, le couple hydrazine/β-cétoester a été décrit pour la première fois en ligation chimiosélective pour la dérivatisation de peptides,[425] ce qui confirme sa biocompatibilité pour la KTGS. Plus récemment, les réactions hydrazine/β-cétoester puis pyrazolone/aldéhyde/thiol ont été employées en bioconjugaison pour de la construction séquentielle d'édifices peptidiques.[426]

Comme précédemment, la préparation des fragments réactifs (hydrazine et β-cétoester) en vue de la préparation du ligand de référence et de premiers tests en KTGS a été entreprise. Encore une fois, de nombreuses difficultés synthétiques ont été rencontrées et les composés souhaités n'ont pas pu être obtenus, ce qui a mis le projet à l'arrêt, même si ces stratégies demeurent prometteuses. A ce propos, quelques perspectives concernant ces projets seront décrites dans la dernière partie de ce manuscrit.

En raison des multiples difficultés rencontrées lors des phases de synthèses des ligands de référence et/ou des fragments réactifs, un changement de cible thérapeutique a finalement été décidé afin de faciliter la préparation de ces derniers et d'accéder plus rapidement au validations, ou non, des preuves de principes.

Ainsi, l'AChE a été mise de côté pour ces différents projets au profit de l'anhydrase carbonique II (CA II), dont la structure des ligands décrit en KTGS présentent des structures chimiques plus facilement accessibles. Cette cible thérapeutique va donc être le sujet principal du chapitre suivant. A l'occasion de ce changement, il a également été décidé de développer une nouvelle réaction éligible en KTGS afin d'apporter une nouvelle contribution dans ce domaine. Grâce à une étude bibliographique approfondie portant sur la réaction de thiol-yne en bioconjugaison et aux connaissances acquises par l'équipe du Dr. Sabot en réactivité des

[425] Mailig, M.; Hymel, D.; Liu, F. *Org. Lett.* **2020**, *22*, 6677–6681.
[426] Mailig, M.; Liu, F. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 7252–7259.

thiols, cette réaction a donc suscité un grand intérêt pour ce nouveau projet qui va être présenté dans le chapitre suivant.

CHAPITRE IV

ÉVALUATION DE LA RÉACTION DE THIOL-YNE EN KTGS ET ÉTUDE DE NOUVEAUX LIGANDS FLUORESCENTS PHOTOISOMÉRISABLES

La recherche de nouvelles réactions éligibles en KTGS reste encore aujourd'hui un réel défi dans ce domaine, même si leur nombre a considérablement augmenté ces trois dernières années. Par ailleurs, la nécessité d'employer des fonctions biocompatibles, de petites dimensions et peu réactives en l'absence de la cible thérapeutique ne laisse qu'un choix très restreint et peu de marge de manœuvre pour ce type de développement. Cependant, une étude de la bibliographie a mis en lumière que la réaction de thiol-yne avait été employée en bioconjugaison à de multiples reprises et qu'elle pouvait être cinétiquement promue par des effets de promiscuité au sein d'enzymes. Ainsi, il est apparu que cette réaction semblait bien répondre aux critères stricts de la KTGS.

Afin d'étudier l'éligibilité de cette réaction, l'anhydrase carbonique II (CA II) a été choisie comme cible thérapeutique en raison des nombreux travaux de KTGS qui ont été réalisés à l'aide de cette enzyme et pour son implication dans diverses pathologies, dont la maladie d'Alzheimer.

Dans une première partie, la structure et les utilisations thérapeutiques de la CA II seront présentées. Ensuite, une étude bibliographique portant sur la réaction de thiol-yne et de son emploi en bioconjugaison sera effectuée.

Dans la première partie résultats de ce chapitre, l'utilisation de la réaction de thiol-yne sera évaluée afin d'établir une première preuve de principe de son utilisation en KTGS. Ensuite, une étude des propriétés biologique du ligand identifié par KTGS sera réalisée ainsi qu'une étude de ses propriétés photophysiques en termes de fluorescence et de photoisomérisation, deux propriétés mises en évidence lors de ces travaux.

I – L'anhydrase carbonique II

1.1. Généralités

1.1.1. Occurrences biologiques et fonctions des anhydrases carboniques[427]

La famille des anhydrases carboniques (CA) appartient à la classe enzymatique des lyases. Elles sont ubiquitaires chez l'ensemble des êtres vivants et sont considérées comme faisant partie des plus anciennes enzymes des règnes végétal et animal, avec pour origine probable l'apparition de la respiration cellulaire.[428] Ces métalloenzymes contiennent dans la majorité des cas des ions métalliques de zinc, de fer et/ou de cobalt, et sont divisées en sept familles (α, β, γ, δ, ζ, η et θ) dont le codage génétique n'est pas assuré par les mêmes familles de gènes.[429] Chez les vertébrés par exemple, il s'agit de la famille α-CA qui est exclusivement produite, mais cette dernière est également présente chez différentes bactéries, algues ou plantes à feuilles. Les α-CA sont des enzymes monomériques et se divisent en 16 isozymes distinctes et différenciables par leurs taux d'expression, leurs activités catalytiques, leur distributions dans les tissus et leur localisation à l'échelle cellulaire (Figure 93).[430]

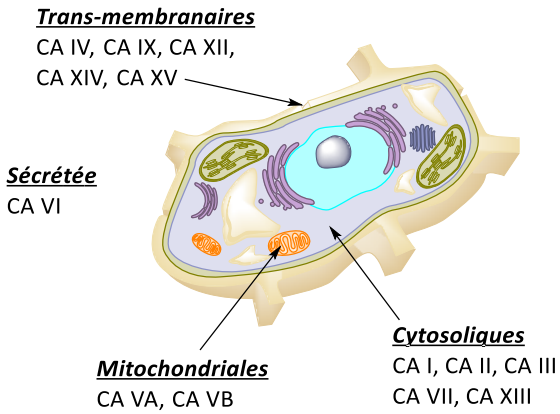


Figure 93. Répartition physiologique de la famille des α-CA à l'échelle cellulaire.

Sur les 16 isozymes confirmées que comprend cette famille, seulement 13 d'entre-elles ont pu être caractérisées au niveau de leur activité catalytique dans le processus de respiration biologique. En effet, les α-CA permettent la conversion du CO_2 en ions bicarbonates par une

[427] Nocentini, A.; Donald, W. A.; Supuran, C. T. Chapter 8 - Human Carbonic Anhydrases: Tissue Distribution, Physiological Role, and Druggability. In *Carbonic Anhydrases*; Supuran, C. T., Nocentini, A., Eds.; Academic Press, 2019. pp 151–185.

[428] Smith, K. S.; Jakubzick, C.; Whittam, T. S.; Ferry, J. G. *PNAS* **1999**, *96*, 15184–15189.

[429] Supuran, C. T.; Capasso, C. *Metabolites* **2017**, *7*, 56–75.

[430] Alterio, V.; Di Fiore, A.; D'Ambrosio, K.; Supuran, C. T.; De Simone, G. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4421–4468.

réaction d'hydratation et ceci de manière réversible (Schéma 174). Elles possèdent également d'autres rôles physiologiques importants comme la régulation du pH, l'homéostasie du CO_2, la sécrétion de divers électrolytes au niveaux des muscles et des organes, le transport de métabolites, la biosynthèse ou encore la résorption osseuse.[431]

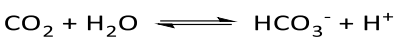


Schéma 174. Conversion réversible du CO_2 en ion bicarbonate par les α-CA.

Parmi ces différentes isozymes, la CA II (EC : 4.2.1.1) a été particulièrement étudiée comme cible thérapeutique depuis les années 50 et continue aujourd'hui à susciter un réel intérêt pour les chercheurs en chimie médicinale.

1.1.2. Structure de la CAII et mécanisme d'action

Chez l'humain, la *h*CA II est codée par le chromosome 8 et est constituée d'environ 260 résidus d'aminoacides, ce qui lui confère une masse d'environ 29 à 30 kDa.[432] Dans l'espace, cette enzyme globulaire se présente sous la forme d'un « œuf » en raison de ses dimensions spatiales qui sont de l'ordre de 50 × 40 × 40 $Å^3$. La CA II (quelle que soit l'espèce animale considérée) est parfaitement hydrosoluble et possède une très bonne stabilité au niveau de sa structure tertiaire.[433]

Bien qu'elle soit ubiquitaire dans l'ensemble des organes et tissus, la CA II est particulièrement exprimée dans le cytosol des érythrocytes, où elle peut pleinement jouer son rôle dans la conversion et le transport du CO_2.[434]

Globalement, la structure du site catalytique de la CA II bovine (*b*CA II) diffère peu de la *h*CA II. De ce fait, la *b*CA II est donc un excellent modèle d'étude, même si il existe quelques disparités structurales en périphérie de l'enzyme, possédant tout de même 79,5% de similarité avec la *h*CA II (Figure 94, **A** et **B**).[435]. De plus, la *b*CA II est peu couteuse et est très facilement

[431] Lopez, M.; Vu, H.; Wang, C. K.; Wolf, M. G.; Groenhof, G.; Innocenti, A.; Supuran, C. T.; Poulsen, S.-A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18452–18462.

[432] Hammarström, P.; Persson, M.; Freskgård, P.-O.; Mårtensson, L.-G.; Andersson, D.; Jonsson, B.-H.; Carlsson, U. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 32897–32903.

[433] Supuran, C. T. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 2023–2032.

[434] Aggarwal, M.; Boone, C. D.; Kondeti, B.; McKenna, R. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* **2013**, *28*, 267–277.

[435] (a) Nyman, P.-O.; Lindskog, S. *Biochim. Biophys. Acta.* **1964**, *85*, 141–151. (b) Saito, R.; Sato, T.; Ikai, A.; Tanaka, N. *Acta. Cryst.* **2004**, *60*, 792–795.

accessible car c'est un sous-produit de l'industrie de transformation des produits issus des bovins. Au centre de l'enzyme, vers le site actif contenant un ion zinc (II) et dont la fonction sera décrite un peu plus tard, se trouvent plusieurs feuillets β antiparallèles qui forment une région relativement ordonnée, elle-même entourée de quelques hélices α et de chaînes flexibles situées vers l'extérieur de la structure. Ces caractéristiques sont communes chez les différentes isoformes de la famille α-CA.

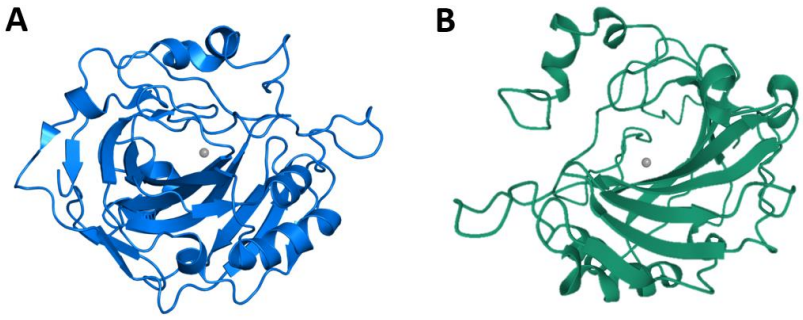


*Figure 94. (**A**) Structure de la* b*CA II obtenue par DRX (code PDB : 1V9E). (**B**) Structure de la* h*CA II obtenue par DRX (code PDB : 1CA2). Les sphères grises représentent l'ion zinc (II).*

Le site actif est accessible *via* une cavité conique assez large (≈ 12 Å) et profonde (≈ 13 Å) pour un volume interne d'environ 280 Å^3. Cette cavité se divise en deux surfaces internes distinctes : une paroi hydrophobe (surface rouge : Ile91, Phe131, Val121, Val135, Leu141, Val143, Leu198, Pro202, Leu204, Val207, Trp209)[436] et une paroi hydrophile (surface bleue : Asn62, His64, Asn67 et Gln92) diamétralement opposées (Figure 95, **A**).[430]

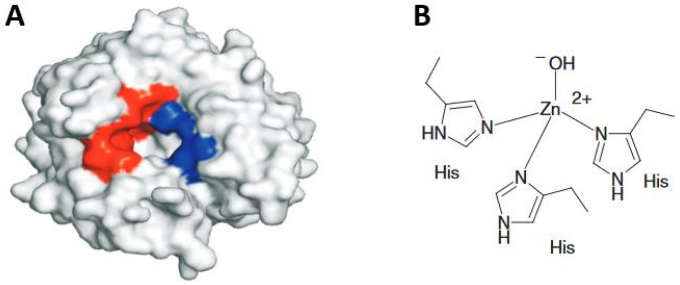


*Figure 95. (**A**) Représentation tridimensionnelle de la surface d'exposition au solvant de la* h*CA II et de l'entrée du site actif (figure extraite de la revue[430]). (**B**) Coordination de l'ion zinc (II) catalytique pour les α-, γ- et δ-CA (figure extraite et modifiée de la revue[433]).*

Ce caractère amphiphile particulier permet la création d'un « sens de circulation » précis au sein du site actif, comparable à une chaîne de production, avec un accès spécifique

[436] Dans le cas où cela n'est pas précisé, la numérotation des résidus de la chaîne protéique correspond à la *h*CAII.

pour les molécules de CO_2 (région hydrophobe) et de même pour les ions bicarbonates (région hydrophile).

L'ion zinc (II), ou Zn^{2+}, joue un rôle de cofacteur vis-à-vis de l'enzyme lors de l'hydratation réversible du CO_2. Il se trouve tout au fond du site catalytique, où trois chaines latérales imidazoles de résidus histidines et une molécule d'eau (sous forme d'ion hydroxyde) assurent sa coordination tétraédrique (Figure 95, **B**). Le microenvironnement formé par le Zn^{2+} et par le site catalytique, plus particulièrement les résidus Glu106 et Thr199, permettent l'établissement de différentes interactions conduisant en définitif à la diminution du p*K*a pour le couple H_2O/HO^- de 14 (dans le solvant aqueux) à environ 6,8. Ce paramètre augmente donc également de manière significative le caractère nucléophile de l'ion hydroxyde et donc la réactivité de l'enzyme.[431]

Le site actif de la CA II est situé à l'exact frontière des régions hydrophiles et hydrophobes et comprend plusieurs molécules d'eau, en plus de l'ion hydroxyde coordonné à l'ion Zn^{2+}, notamment dans la région hydrophile. Ces dernières interagissent avec les chaînes latérales des résidus d'acides aminés afin de conserver une certaine architecture spatiale et de faciliter l'évacuation des ions bicarbonates (Schéma 175, **A**). Plus important encore, une de ces molécules d'eau se trouvent à proximité de la région hydrophobe et est appelée « *deep water* », en raison de sa position très proche de cette zone hydrophobe.[437] Cette dernière joue un rôle capital dans le mécanisme d'hydratation puisqu'elle permet en grande partie l'activation du CO_2 *via* l'établissement d'une liaison hydrogène avec un des atomes d'oxygène et donc l'augmentation de l'électrophilie du CO_2. Cet effet est également combiné à celui des résidus Glu106 et Thr199 de la chaîne protéique qui interagissent également avec le CO_2 et peuvent être qualifiés de dyade catalytique. De plus, une petite cavité hydrophobe, située dans ce même environnement, permet d'une part la « séquestration » de la molécule de CO_2, mais également sa parfaite orientation vers le complexe Zn^{2+}/HO^- afin d'adopter une géométrie très proche de celle de l'état de transition (cercle pointillée noir).[437,438] Finalement, le mécanisme d'hydratation en lui-même est relativement simple puisqu'il s'agit d'une addition nucléophile de l'ion hydroxyde sur l'atome de carbone du CO_2, suivie par l'évacuation

[437] Sjöblom, B.; Polentarutti, M.; Djinović-Carugo, K. *PNAS* **2009**, *106*, 10609–10613.

[438] Domsic, J. F.; Avvaru, B. S.; Kim, C. U.; Gruner, S. M.; Agbandje-McKenna, M.; Silverman, D. N.; McKenna, R. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 30766–30771.

de l'ion bicarbonate formé et de divers transferts de protons, permettant le retour à l'état initial de l'enzyme (Schéma 175, **B**).[439] Il est cependant intéressant de noter que la présence de l'ion Zn^{2+} n'a aucun effet sur les interactions, l'activation et la disposition spatiale du CO_2,[440] ce qui confirme que ces effets sont seulement induits par la chaîne protéique et par la molécule d'eau « *deep water* ».

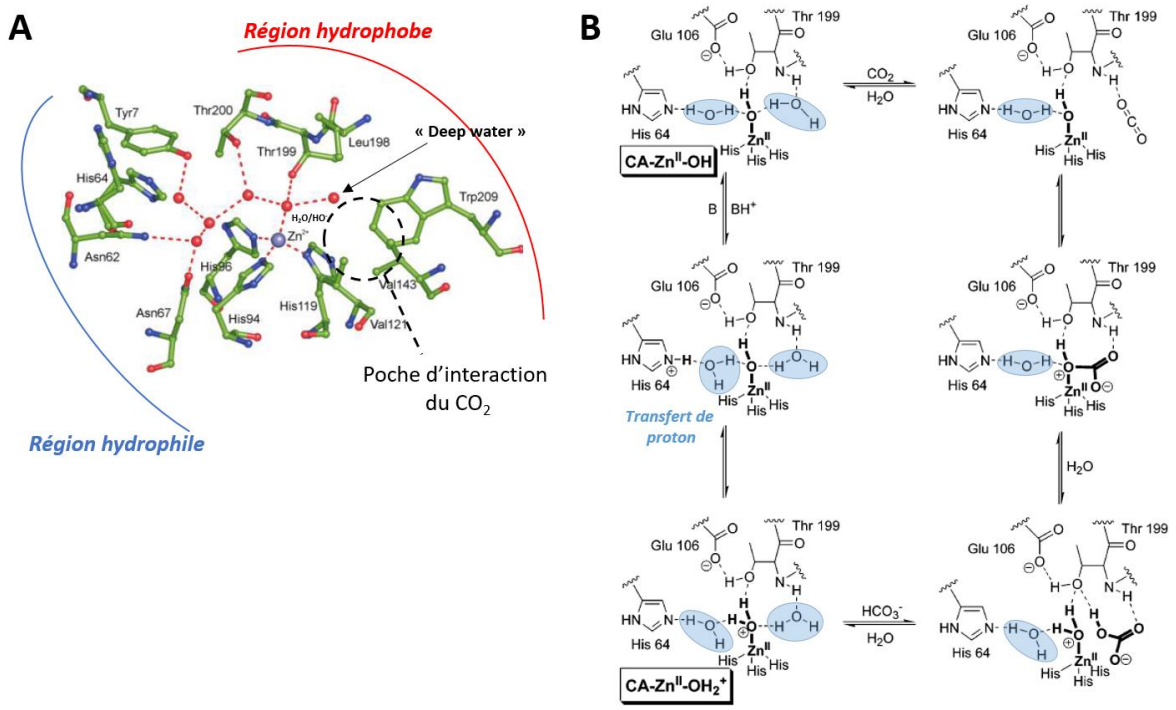


Schéma 175. (A) Modélisation du site actif de la hCA II *(Figure extraite et modifiée de la revue*[430]*). Les lignes pointillées rouges représentent les interactions (ioniques, liaisons hydrogènes…). Les sphères rouges symbolisent les molécules d'eau. (**B**) Mécanisme d'hydratation du CO_2 dans le site actif de la* hCA II *(Schéma extrait et modifié de la revue*[439]*). Les surfaces bleutées mettent en évidence les molécules d'eau du site actif.*

La réversibilité de cette réaction d'hydratation est indispensable afin de moduler les concentrations en CO_2 dissous et dont l'excès peut être néfaste pour les membranes cellulaires, mais également en ions bicarbonates dont la concentration est susceptible de faire varier le pH physiologique et donc de perturber le fonctionnement des cellules.[433] La rapidité de ce processus est très variable selon l'isoforme de CA et l'espèce animale considérées. Cependant, sur l'ensemble des enzymes connues à ce jour, la CA II possède une des plus fortes activités catalytiques avec en moyenne une constante cinétique de catalyse $k_{cat} \approx 10^6$ s^{-1}.[434,441]

[439] Krishnamurthy, V. M.; Kaufman, G. K.; Urbach, A. R.; Gitlin, I.; Gudiksen, K. L.; Weibel, D. B.; Whitesides, G. M. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 946–1051.

[440] Domsic, J. F.; McKenna, R. *Bioch. Biophys. Acta.* **2010**, *1804*, 326–331.

[441] Leaf, D. E.; Goldfarb, D. S. *J. App. Physiol.* **2007**, *102*, 1313–1322.

En comparaison, la vitesse d'hydratation naturelle du CO_2 en conditions physiologiques et sans catalyseur est comprise entre 0,030 et 0,15 s^{-1}, ce qui démontre la puissance de cette enzyme pour convertir à de telles vitesses une molécule aussi stable que le CO_2.

Ainsi, la CA II est une enzyme de première ordre dans le fonctionnement des êtres vivants, mais cette fonction et cette ubiquité ont pu être corrélées avec de nombreuses pathologies.

1.2. Implications et rôles des α-CA dans diverses pathologies[442]

La localisation spécifique ou l'ubiquité des 16 isoformes de la famille des α-CA dans les différents organes et tissus engendre une myriade de réponses biologiques selon de nombreux processus. Ainsi, l'inhibition simultanée de plusieurs isoformes peut conduire à de multiples effets physiologiques et dont la nature peut être très variée. De ce fait, les α-CA sont donc devenues au fil des décennies des cibles privilégiées afin de lutter efficacement contre diverses pathologies. De nombreux inhibiteurs des CA (CAIs) ont été commercialisés mais souffrent cependant de faibles sélectivités vis-à-vis des différentes isoformes et provoquent donc de nombreux effets secondaires indésirables. Ce point sera traité un peu plus loin dans ce chapitre. Cependant, leur emploi a permis de nombreuses études sur l'implication des α-CA, et plus particulièrement de la CA II, dans de nombreuses maladies ainsi que leurs traitements correspondants.

1.2.1. Premières applications thérapeutiques

1.2.1.1. Les CAIs comme diurétiques

Les CA sont très abondantes dans les reins et y jouent trois rôles importants : 1) l'homéostasie acido-basique, 2) la réabsorption des ions bicarbonates et 3) la production des ions ammoniums NH_4^+. L'inhibition des isoformes présentes dans ces organes et en périphérie (CA II-IV-XII-XIV) provoque l'augmentation de la concentration en ions bicarbonates dans les urines en remplaçant peu à peu les ions chlorures comme contre-ions vis-à-vis des cations Na^+ et K^+. Ainsi, les urines augmentent en volume et deviennent beaucoup plus alcalines, ce qui

[442] Supuran, C. T. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 168–181.

provoque une diurèse forcée et parfois indispensable lors de certaines infections, ou pour l'élimination de toxines par les reins.[443]

1.2.1.2. Le traitement du glaucome[444]

Le glaucome oculaire est caractérisé par une dégénérescence du nerf optique et conduisant malheureusement à une perte progressive de la vision chez les patients. A l'échelle mondiale, cette pathologie touche environ 67 millions de personnes aujourd'hui. Une des méthodes les plus efficaces afin de lutter contre ce phénomène est la diminution de la pression intraoculaire (PIO) afin de protéger les fibres nerveuses et la rétine. L'inhibition de la CA II, en combinaison avec d'autres cibles, est devenue un traitement classique de deuxième ligne pour cette pathologie, car cela permet une diminution de la production en ions carbonates et donc de la formation d'humeur aqueuse interne.[445] Il en résulte finalement une baisse significative de la PIO et donc des dégâts physiologiques associés.[446]

1.2.1.3. Traitement du mal des montagnes et de la haute altitude

La haute altitude peut engendrer de nombreuses complications physiologiques comme des œdèmes pulmonaires et cérébraux mais également déclencher le mal des montagnes dans 75% des cas à partir de 4500 m.[447] Une des causes provoquant ces symptômes, et la plus mise en avant à ce jour, est l'état d'hypoxie physiologique provoquée par le manque de dioxygène à ces altitudes (environ 11% de dioxygène dans l'air à 4500m au lieu de 20% au niveau de la mer). Même si les mécanismes biologiques résultants de l'inhibition de la CA II par des CAIs demeurent relativement méconnus car complexes, une amélioration très nette de la ventilation et l'oxygénation *via* un traitement préventif avec de

[443] (a) Kyllonen, M. S. et al. *J. Histochem. Cytochem.* **2003**, *51*, 1217–1224. (b) Splendiani, G.; Condo, S. *Ital. Nefrol.* **2006**, *23*, S74–S76.

[444] Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*; Frost, S. C., McKenna, R., Eds.; Subcellular Biochemistry; Springer Netherlands : Dordrecht ; 2014; pp 349–359.

[445] (a) Zhang, K.; Zhang, L.; Weinreb, R. N. *Nat. Rev.* **2012**, *11*, 541–559. (b) Ghorai, S.; Pulya, S.; Ghosh, K.; Panda, P.; Ghosh, B.; Gayen, S. *Bioorg. Chem.* **2020**, *95*, 103557–103591.

[446] Mishra, C. B.; Kumari, S.; Angeli, A.; Monti, S. M.; Buonanno, M.; Tiwari, M.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 2456–2469.

[447] Leaf, D. E.; Goldfarb, D. S. *J. App. Physiol.* **2007**, *102*, 1313–1322.

tels inhibiteurs permet d'éviter ces complications parfois graves et notamment pour les populations vivant en hautes montagnes (Cordillère des Andes, Tibet…).[448]

1.2.1.4. Implications de la CA II dans la croissance tumorale

Le développement « classique » des cellules s'effectue de manière régulée et continue dans l'organisme, ce qui n'est en revanche pas le cas des cellules cancéreuses. En effet, leur vitesse de croissance peut dans de nombreux cas, et suivant diverses raisons, perdre toute régulation. Normalement, l'angiogenèse permet de fournir un afflux suffisant en nutriments et en oxygène aux cellules afin d'assurer leur fonctionnement et leur développement *via* leur catabolisme naturel. Dans le cas des cellules tumorales, la croissance anarchique et très rapide de ces dernières est particulièrement énergivore et la balance nécessaire entre le développement de ces cellules et l'angiogenèse environnante est rompue.[449] Un environnement hypoxique apparait donc assez rapidement et le besoin énergétique de la tumeur conduit à ce qu'elle adopte un nouveau mode de catabolisme par fermentation, afin de subvenir à ses besoins. Ainsi, la glycolyse anaérobique devient la principale source énergétique des cellules cancéreuses. Ce type de catabolisme conduit à la formation de grandes quantités de pyruvates, qui se réduisent par la suite en lactates, mais également de CO_2.[449] Afin d'éviter une « suffocation » cellulaire, qui conduirait à l'apoptose des cellules, l'évacuation de ces déchets est donc assurée par une myriade d'enzyme et de transporteurs protéiques. Parmi ces biomolécules, les CA II (cytosol) et CA IX-XII (transmembranaires) permettent la transformation puis l'évacuation du CO_2 vers l'extérieur de la cellule sous forme d'ions carbonates. Parallèlement, l'exocytose des lactates est quant à elle assurée par les transporteurs de monocarboxylate également transmembranaires. Des études ont également permis d'établir que la CA II était impliquée dans ce processus en tant que relais de proton lors de l'exocytose.[450] Ces deux modes d'évacuations des déchets produits pas le catabolisme anaérobique vont avoir deux conséquences importantes[451] : 1) le microenvironnement autour de la tumeur va voir ainsi son pH diminuer (pH ≈ 6,5 – 7,0) en raison de l'augmentation anormale de la concentration extérieure en acide lactique et 2) le cytosol des cellules

[448] Swenson, E. R.; Teppema, L. J. *J. App. Physiol.* **2007**, *102*, 1305–1307.

[449] Bongaerts, G.; Wagener, T. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 412–412.

[450] Noor, S. I.; Jamali, S.; Ames, S.; Langer, S.; Deitmer, J. W.; Becker, H. M. *eLife* **2018**, *7*, e35176.

[451] Neri, D.; Supuran, C. T. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 767–777.

cancéreuse va devenir plus alcalin (pH ≥ 7,4) du fait de l'augmentation de la concentration interne en ions carbonates. Là où des cellules saines entreraient directement en phase d'apoptose dans de telles conditions, les cellules cancéreuses trouvent un milieu favorable dans ce type d'environnement, ce qui permet leur survie et leur prolifération. Ce déséquilibre acido-basique interne et externe peut provoquer à terme une augmentation de « l'agressivité » de la tumeur, une diffusion métastasique importante et surtout une forte diminution de l'efficacité des thérapies et traitements.[452]

L'inhibition des différentes α-CA, dont la CA II, est donc devenue une stratégie très attrayante car elle permettrait d'une part la suppression de ces phénomènes de dérèglement du pH (interne et externe), mais également le retardement de l'exocytose des lactates. Ces deux effets combinés conduiraient ainsi à la suffocation puis l'apoptose cellulaire des cellules tumorales et donc au ralentissement de la croissance tumorale.[451,453]

Par ailleurs, la CA II étant surexprimée dans de nombreux types de tissus cancéreux,[454] son emploi en tant que biomarqueur (plasma sanguin) pour la détection de cancers est de plus en plus exploré, notamment pour les tumeurs gastro-intestinales,[455] colorectales et pulmonaires.[456]

1.2.1.5. Lutte contre l'obésité

Les isoformes CA VA et CA VB sont présentes exclusivement dans les mitochondries et participent à de nombreux processus de biosynthèse, notamment la lipogenèse, et souvent grâce à l'assistance de la CA II cytosolique.[457] Bien qu'aucune explication concrète n'ait pu être formulée, il a pu être observé lors de traitements de diverses pathologies à l'aide de CAIs que cela entrainait également une perte de poids chez les patients atteints d'obésité.[458] Cet effet

[452] Ebbsen, P. *et al. J. Enz. Inh. Med. Chem.* **2009**, *24*, 1–39.

[453] Pastorek, J.; Pastorekova, S.; Zatovicova, M. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 685–698.

[454] Leppilampi, M. *et al. Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 2240-2245.

[455] Parkkila, S. et al. *Mod. Path.* **2010**, *23*, 743-750

[456] (a) Mokhtari, R. B.; Kumar, S.; Islam, S. S.; Yazdanpanah, M.; Adeli, K.; Cutz, E.; Yeger, H. *BMC Cancer* **2013**, *13*, 378. b) Zhou, Y.; Mokhtari, R. B.; Pan, J.; Cutz, E.; Yeger, H. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2014**, *52*, 183–192.

[457] Supuran, C. T. *Exp. Opin. Ther. Pat.* **2003**, *13*, 1545–1550.

[458] Picard, F. *et al. Obesity Res.* **2000**, *8*, 656–663.

secondaire de modifications métaboliques, engendrées par l'absorption de CAIs, est donc devenu une nouvelle voie d'exploration pour le traitement de l'obésité.[459]

1.2.1.6. Traitement de l'épilepsie

Plusieurs isoformes de la famille des α-CA, et plus particulièrement la CA II, sont très exprimées dans les cellules du SNC, du SNP et neuronales.[460] Ces enzymes participent notamment au développement du cerveau et une déficience en CA II serait potentiellement une des origines de la calcification cérébrale et de retardements mentaux. Bien que leur rôle principal soit de convertir de manière réversible le couple CO_2/HCO_3^- pour la respiration cellulaire et le maintien du pH, elles possèdent également des interactions avec les transporteurs membranaires pour les échanges anioniques du couple Cl^-/HCO_3^- et cationiques du couple Na^+ (extracellulaires)/H^+ (intracellulaires), mais également avec les co-transporteurs des ions Na^+ et HCO_3^-. Il a pu être établit que le dérèglement ponctuel des concentrations en électrolytes et les variations du pH extracellulaires dans le SNC et le SNP étaient en grande partie responsables des crises épileptiques.[461] Ainsi, la modulation de l'activité des différentes isoformes d'α-CA et surtout celle de la CA II est donc relativement restreinte mais tout de même salutaire afin d'éviter, ou à minima, de diminuer les crises.[462]

1.2.2. La CA II : une cible de plus en plus privilégiée contre la maladie d'Alzheimer[463]

Lors du chapitre précédent, il avait été décrit que la maladie neurodégénérative d'Alzheimer (MA) était la forme de démence la plus répandue chez l'Homme et que le nombre de patients était en constante augmentation à l'échelle mondiale, au même titre que les coûts financiers engendrés. Malheureusement, la science n'a toujours pas pu fournir de réponse

[459] Gadde, K. M. *et al. JAMA* **2003**, *289*, 1820–1825.

[460] Kida, E.; Palminiello, S.; Golabek, A. A.; Walus, M.; Wierzba-Bobrowicz, T.; Rabe, A.; Albertini, G.; Wisniewski, K. E. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2006**, *65*, 664–674.

[461] (a) Bonnet, U.; Wiemann, M.; Bingmann, D. *Brain Res.* **1998**, *796*, 161–170. (b) Xiong, Z.-Q.; Saggau, P.; Stringer, J. L. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 1290-1296.

[462] (a) Simone, G. D.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74*, 317–321. (b) Hen, N.; Bialer, M.; Yagen, B.; Maresca, A.; Aggarwal, M.; Robbins, A. H.; McKenna, R.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3977–3981. (c) Mishra, C. B.; Kumari, S.; Angeli, A.; Monti, S. M.; Buonanno, M.; Tiwari, M.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 2456–2469.

[463] Provensi, G.; Carta, F.; Nocentini, A.; Supuran, C. T.; Casamenti, F.; Passani, M. B.; Fossati, S. A. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4724–4741.

quant à l'origine exacte de cette pathologie et aucun nouveau traitement préventif et/ou curatif efficace n'a pu encore être mis sur le marché. Les hypothèses cholinergiques et de la cascade amyloïde ont effectivement été les voies préférentiellement ciblées depuis plusieurs décennies, mais les traitements palliatifs qui ont pu être proposés sur le marché (mémantine et trois inhibiteurs de l'AChE, le donépézil, la galantamine et la rivastigmine) s'avèrent inefficaces au long terme et sans aucune propriété curative.

Comme expliqué un peu plus tôt, plusieurs isoformes de la famille des α-CA sont exprimées dans le SNC, le SNP et le cerveau. Leur implication dans la régulation du pH intra- et extracellulaire, ainsi que dans les endo- et exocytoses d'électrolytes, a pu être largement démontrée.

Bien que des études aient confirmé que l'inhibition des α-CA pouvait conduire à certaines formes d'amnésies,[463] la régulation de l'activité de ces enzymes permet cependant une légère acidose *via* l'accumulation d'acide carbonique extracellulaire,[464] ce qui conduit à une vasodilatation et une augmentation du flux sanguin dans le cerveau.[465] Ce paramètre a un double effet sur : 1) l'augmentation de l'activité neuronale et des capacités cognitives des patients grâce à une meilleure oxygénation cellulaire[466] et 2) une augmentation des capacités d'élimination de déchets toxiques, tels que les peptides solubles Aβ ou les protéines Tau hyperphosphorylées, en grande partie responsables de la mortalité neuronale et la perte de capacités cognitives.[467] Ce type d'acidose cérébrale, provoquée par l'inhibition de la CA II principalement, peut en revanche engendrer en parallèle des oxydations et des agrégations protéiques plus importantes et donc conduire à des disfonctionnements physiologiques multiples.[468]

Par ailleurs, la surexpression de la CA II a pu être caractérisée chez les patients atteints de la MA,[468] et plus majoritairement au niveau de l'Hippocampe, une zone particulièrement

[464] Bickler, P. E.; Litt, L.; Banville, D. L.; Severinghaus, J. W. *J. App. Physiol.* **1988**, *65*, 422–427.

[465] Grossmann, W. M.; Koeberle, B. *CED* **2000**, *10*, 65–69.

[466] Aamand, R.; Skewes, J.; Møller, A.; Fago, A.; Roepstorff, A. *Neuropharmacol.***2011**, *61*, 900–908.

[467] Tarasoff-Conway, J. M. *et al. Nat. Rev. Neurol.* **2015**, *11*, 457–470.

[468] Sultana, R.; Boyd-Kimball, D.; Poon, H. F.; Cai, J.; Pierce, W. M.; Klein, J. B.; Merchant, M.; Markesbery, W. R.; Butterfield, D. A. *Neurobiol. Aging* **2006**, *27*, 1564–1576.

atteinte lors de la formation des plaques amyloïdes[469] et au sein des mitochondries.[470] De plus, les taux de CA II dans le plasma sanguin des patients atteints de la MA est significativement plus important que chez les personnes saines, ce qui va probablement conduire cette enzyme à devenir un biomarqueur pour cette maladie, au même titre que pour les cancers mentionnés précédemment.[471] Par ailleurs, les analyses de la composition protéique des plaques amyloïdes a permis d'y observer de fortes concentrations en CA II, qui est aujourd'hui suspectée de favoriser l'agrégation de ces plaques toxiques, au même titre que l'AChE. Plusieurs études récentes ont d'ailleurs établi une corrélation entre la formation de plaques amyloïdes et le disfonctionnement mitochondrial.[472] Même si les mécanismes demeurent encore flous, il a pu être observé une dépolarisation jusqu'à 60% du potentiel électrique ($\Delta\Psi$) de la membrane mitochondriale, impliquant directement la survie des cellules neuronales. En effet, la forte diminution du $\Delta\Psi$ occasionne une perméabilité membranaire et permet plus facilement le passage des molécules de H_2O_2 vers le cytosol et donc la production d'espèces oxygénée réactives (ROS) pouvant dénaturer un grand nombre de biomolécules et les mitochondries elles-mêmes.[473] Cette porosité membranaire conduit également à la libération et à l'activation importantes de composés pré-apoptotiques, comme les cytochromes C (CytC) et la famille des caspases, conduisant à des réactions en chaîne aboutissant à la mort des cellules neuronales.[474]

Il a finalement pu être confirmé que l'emploi de CAIs pourrait avoir de réels effets bénéfiques afin de contrer le disfonctionnement mitochondrial (Figure 96).

[469] Drummond, E.; Nayak, S.; Faustin, A.; Pires, G.; Hickman, R. A.; Askenazi, M.; Cohen, M.; Haldiman, T.; Kim, C.; Han, X.; Shao, Y.; Safar, J. G.; Ueberheide, B.; Wisniewski, T. *Act Neuropathol.* **2017**, *133*, 933–954.

[470] Pollard, A.; Shephard, F.; Freed, J.; Liddell, S.; Chakrabarti, L. *Aging* **2016**, *8*, 2425–2436.

[471] Jang, B. G.; Yun, S.-M.; Ahn, K.; Song, J. H.; Jo, S. A.; Kim, Y.-Y.; Kim, D. K.; Park, M. H.; Han, C.; Koh, Y. H. *J. Alzheimer's Dis.* **2010**, *21*, 939–945.

[472] Fossati, S.; Giannoni, P.; Solesio, M. E.; Cocklin, S. L.; Cabrera, E.; Ghiso, J.; Rostagno, A. *Neurobiol. Dis.* **2016**, *86*, 29–40.

[473] (a) Dickinson, B. C.; Srikun, D.; Chang, C. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 50–56. (b) Wen, Y.-H.; Lin, J.-N.; Wu, R.-S.; Yu, S.-H.; Hsu, C.-J.; Tseng, G.-F.; Wu, H.-P. *Molecules* **2020**, *25*, 3070–3085.

[474] MacDougall, G.; Anderton, R. S.; Trimble, A.; Mastaglia, F. L.; Knuckey, N. W.; Meloni, B. P. *Molecules* **2020**, *25*, 2977–2994.

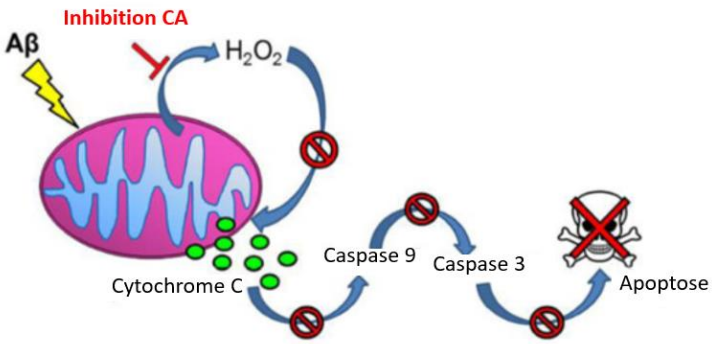


Figure 96. Principaux effets de l'inhibition des CA sur l'apoptose mitochondriale des cellules neuronales (figure extraite et modifiée de l'article[472]*).*

En effet, l'inhibition de la CA II surexprimée conduit à une meilleure régulation de son activité catalytique contribuant au maintien du pH physiologique et de sa participation avec les transporteurs dans les processus d'endo- et d'exocytose. Ces deux paramètres semblent d'ailleurs critiques quant à la formation d'agrégats de peptides Aβ et de plaques amyloïdes, en partie responsables de la dépolarisation de la membrane mitochondriale.[475] De plus, la baisse de production en bicarbonate par hydratation du CO_2 conduit à la limitation du cycle de Krebs et donc de la chaîne de transferts électroniques. De ce fait, la production de H_2O_2 est à nouveau régulée, ce qui limite le stress oxydant cellulaire et l'activation des voies apoptotiques mitochondriales.

En conclusion, cette nouvelle voie d'étude portant sur l'inhibition des α-CA pour la lutte contre la MA, et notamment de la CA II, semble donner un second souffle pour le développement de nouveaux traitements de cette maladie. En effet, la possibilité d'accroître l'évacuation des déchets toxiques (peptides Aβ, protéines Tau…), couplée à l'augmentation de l'activité et de la protection des cellules neuronales *via* une meilleure oxygénation et la sauvegarde des mitochondries, pourraient potentiellement conduire à de premiers traitements préventifs, voire même curatifs, de la MA.

1.3. Développement et structures d'inhibiteurs

Le véritable engouement de la chimie médicinale pour la famille des α-CA, en raison de leur implication très vaste dans la santé humaine, est encore aujourd'hui un véritable moteur pour le développement de nouveaux inhibiteurs.

[475] Solesio, M. E.; Peixoto, P. M.; Debure, L.; Madamba, S. M.; de Leon, M. J.; Wisniewski, T.; Pavlov, E. V.; Fossati, S. *Aging Cell* **2018**, *17*, e12787.

1.3.1. Les inhibiteurs commerciaux

Depuis les trois dernières décennies, plusieurs inhibiteurs de CA ont été approuvés par la FDA et mis sur le marché (Figure 97).[442,476]

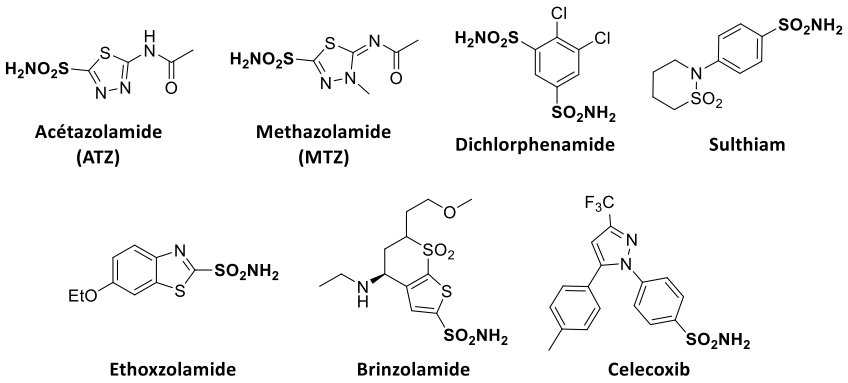


Figure 97. Exemples d'inhibiteurs commerciaux de la famille des CA.

Comme le montre parfaitement les structures de ces composés, la fonction sulfonamide (pKa ≈ 7,2 – 8)[477] est constamment employée lors du design des inhibiteurs de CA. En effet, comparativement à d'autres fonctions chimiques permettant ce type de coordination, les sulfonamides permettent l'inhibition de l'activité enzymatique en établissant un complexe avec l'ion Zn^{2+} dont la géométrie et les interactions avec les résidus de la chaîne protéique sont très semblables à l'état de transition obtenu lors de l'hydratation du CO_2 en bicarbonate (Figure 98).[431,476]

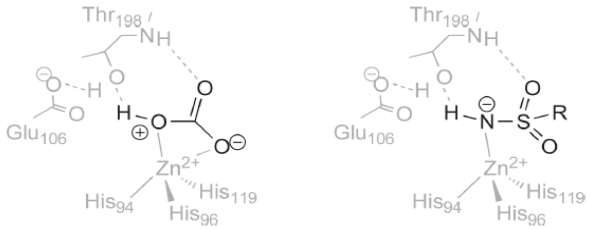


Figure 98. Propriétés de mimétisme de l'état de transition naturel par les sulfonamides.

Malgré la récente mise en lumière d'une corrélation entre l'apparition de pathologies cutanées et l'absorption de principes actifs contenant des fonctions sulfonamides,[478] le recours à ces fonctions pour l'élaboration de nouveaux inhibiteurs de CA reste un véritable

[476] Martin, D. P.; Hann, Z. S.; Cohen, S. M. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 12207–12215.

[477] Francis, S. A. M.; Taylor-Wells, J.; Gross, A. D.; Bloomquist, J. R. *Insects* **2017**, *8*, 2–10.

[478] Shah, F.; Bell, I. M. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 7447–7457.

atout. En effet, la coordination de l'ion Zn^{2+} avec la fonction sulfonamide est généralement une des principales interactions des ligands avec l'enzyme et est majoritairement responsable de l'inhibition de l'activité enzymatique.

Malheureusement, ces différents inhibiteurs commerciaux ne possèdent que de très faibles spécificités selon les différentes isoformes des α-CA. Ainsi, l'inhibition non-sélective de ces enzymes ubiquitaires au long terme conduit à l'apparition de multiples effets indésirables parfois néfastes voire même toxiques.[442] De plus, la distribution biologique des inhibiteurs serait inégale et inadaptée en raison de l'occurrence et de l'expression inégales des différentes isoformes. En effet, la CA II est la plus exprimée des α-CA chez les vertébrés et son omniprésence dans les tissus conduirait à la « séquestration » des inhibiteurs libres qui ne seraient alors plus en mesure d'inhiber l'isoforme ciblée.[479]

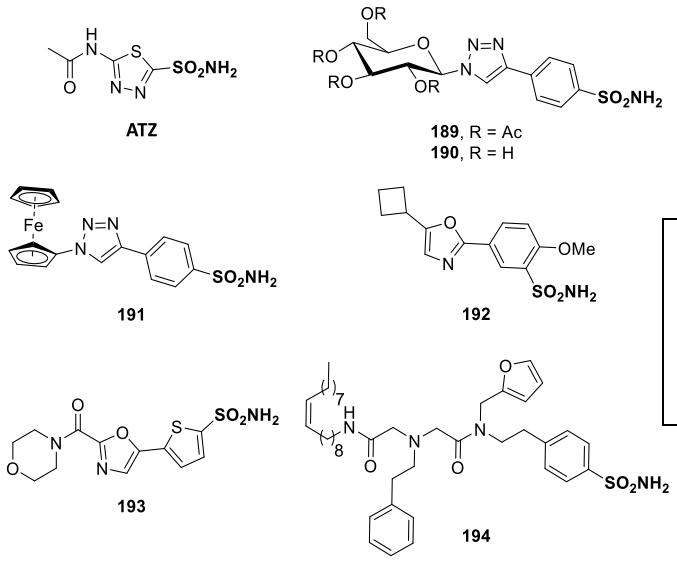
1.3.2. Développement d'inhibiteurs sélectifs d'isoformes

Face à ces difficultés pour le moins délicates à résoudre, la recherche et le design de nouveaux inhibiteurs plus sélectifs des isoformes ciblées sont devenus quasiment systématiques depuis les deux dernières décennies.

La principale stratégie vise à exploiter la double propriété de polarité du site actif afin d'y établir des interactions spécifiques avec l'isoforme visée, tout en essayant de défavoriser celles avec le reste de la famille des α-CA. Quelques exemples d'inhibiteurs sélectifs décrits dans la littératures, accompagnés par leurs activités biologiques vis-à-vis de différentes α-CA, sont représentés ci-dessous (Figure 99).[480]

[479] Lomelino, C. L.; Supuran, C. T.; McKenna, R. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1150–1163.

[480] Pour des exemples récents de la littérature, voir : (a) Lopez, M.; Salmon, A. J.; Supuran, C. T.; Poulsen, S.-A. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 3277–3287. (b) Krasavin, M.; Korsakov, M.; Dorogov, M.; Tuccinardi, T.; Dedeoglu, N.; Supuran, C. T. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *101*, 334–347. (c) Swain, B.; Angeli, A.; Angapelly, S.; Thacker, P. S.; Singh, P.; Supuran, C. T.; Arifuddin, M. *J. Enz. Inh. Med. Chem.* **2019**, *34*, 1199–1209. (d) Bonardi, A.; Nocentini, A.; Bua, S.; Combs, J.; Lomelino, C.; Andring, J.; Lucarini, L.; Sgambellone, S.; Masini, E.; McKenna, R.; Gratteri, P.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 7422–7444.



	K_i (nM)			
	*h*CA I	*h*CA II	*h*CA IX	*h*CA XII
ATZ	250	12	74	**5,7**
189	4400	**9,1**	120	n.r.
190	**9,4**	380	89	n.r.
191	3900	**80**	**85**	n.r.
192	6110	58,2	**3,1**	62,8
193	22,5	**0,02**	36,4	30,3
194	737,9	132	1807,1	**5,5**

Figure 99. Structures et activités d'inhibiteurs sélectifs d'isoformes. n.r. = non renseignée.

1.3.3. Découvertes de ligands de la CAII par KTGS

Le faible coût et la très grande accessibilité de la *b*CA II ont conduit à son emploi fréquent en tant qu'enzyme modèle lors de criblages par KTGS à la place de la *h*CA II. Comme décrit au cours du premier chapitre, la *b*CA II a permis la découverte de nouveaux inhibiteurs *via* l'utilisation de réactions de substitutions nucléophiles entre un thiol et des chlorures d'alkyle (Figure 100, **A**),[146] et par réaction de click entre des alcynes terminaux et des azotures (Figure 100, **B**).[104]

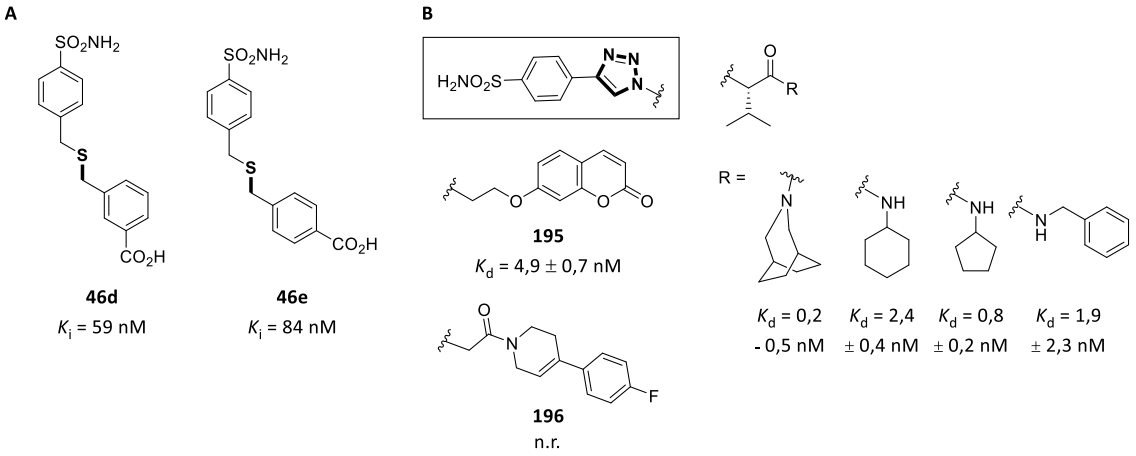


*Figure 100. Structures et activités biologiques de quelques ligands découverts par (**A**) réaction de substitution nucléophile et par (**B**) réaction de click.*

Plusieurs preuves de principes visant à améliorer la stratégie de KTGS ont d'ailleurs été menées *via* l'emploi de cette cible, notamment pour l'optimisation de circuits micro-fluidiques

à haut-débit ou pour l'utilisation de lysats cellulaires afin d'éviter l'emploi de cible isolée. Par ailleurs, la surexpression de la CA II dans de nombreux cancers s'est imposée comme un vrai atout pour le radiomarquage de tumeurs *via* la tomographie à émission de positron (TEP). Ainsi, le design de nouveaux ligands fluorés « froids » (^{19}F) a été réalisé à l'aide de la KTGS, ce qui a finalement conduit à la préparation des analogues radiomarqués « chauds » (^{18}F) et à l'obtention d'images *in vivo* permettant de localiser les tumeurs (Figure 101).[481]

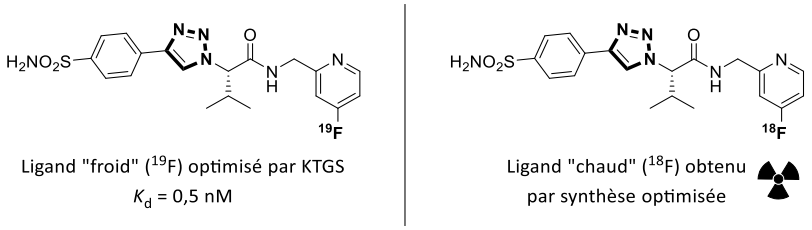


Figure 101. Structures et activités des inhibiteurs analogues « froid » et « chaud » de la CA II.

Aux vues des multiples preuves de principes fructueuses en KTGS et des diverses applications thérapeutiques qu'offre la CA II, cette cible a donc été choisie pour le développement de nouvelles réactions de KTGS.

II – Évaluation de la réaction de thiol-yne en KTGS

2.1. La réaction de thiol-yne : généralités

2.1.1. Préparations classiques d'éthers de thiovinyle

2.1.1.1. Emploi de catalyseurs, et d'acides de Lewis métalliques et de bases organiques ou minérales

La fonction éther de thiovinyle est très généralement formée *via* une réaction de thiol-yne à partir d'un thiol et d'un alcyne terminal à l'aide de divers catalyseurs ou acides de Lewis métalliques, et/ou en présence de bases organiques et inorganiques.[482] La formation de ces fonctions éthers de thiovinyle peut conduire à différents régioisomères du type Markovnikov

[481] Mocharla, V. P.; Walsh, J. C.; Padgett, H. C.; Su, H.; Fueger, B.; Weber, W. A.; Czernin, J.; Kolb, H. C. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 43–48.

[482] Pour des revues portant sur ce sujet, voir : (a) Kondo, T.; Mitsudo, T.-A. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 3205–3220. (b) Castarlenas, R.; Di Giuseppe, A.; Pérez-Torrente, J. J.; Oro, L. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 211–222. (c) Orlov, N. V. *ChemistryOpen* **2015**, *4*, 682–697.

(MK) ou anti-Markovnikov (AMK), avec dans ce dernier cas de figure la possible formation des stéréoisomères *Z* et *E* (Schéma 176).

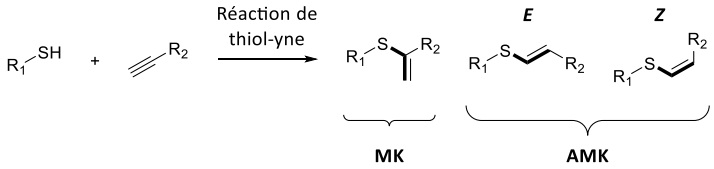


Schéma 176. Régio- et stéréoisomères de configuration possiblement formés lors d'une réaction de thiol-yne.

L'utilisation de catalyseurs et/ou conditions spécifiques (solvant, additifs…) impliquant des mécanismes réactionnels variés est donc conditionnée selon les besoins de régio- et de stéréosélectivité. Le tableau ci-dessous regroupe quelques exemples variés et non-exhaustifs des conditions employées pour la synthèse d'éthers de thiovinyle (Tableau 15).

Les bases minérales et organiques conduisent en général à l'obtention des régioisomères AMK. Cependant, la stéréosélectivité de la réaction de thiol-yne dans ces conditions est fortement influencée par nature de la base (Entrées 1, 2 et 4, Tableau 15) ou du solvant employé (Entrées 2 et 3, Tableau 15). Par ailleurs, la nature des thiols peut induire un contrôle de la régiosélectivité de la réaction de thiol-yne comme dans le cas de l'acide de Lewis $In(OTf)_3$ (Entrées 5 et 6, Tableau 15). Il est à noter que dans le cas des thiols aromatiques et aliphatiques, la stéréosélectivité est variable car intrinsèquement dépendante de la nature des substrats. Par ailleurs, l'emploi des métaux de transitions comme catalyseurs offre de nombreuses possibilités en termes de régiosélectivité (Entrées 7 à 11, Tableau 15). De même, lorsque les éthers de thiovinyle de type AMK sont obtenus, le contrôle de la stéréosélectivité peut être assuré par l'emploi d'additifs, au-delà du type de métaux ou des ligands employés (Entrées 8 à 9, Tableau 15).

	Entrée	Thiol	Alcyne	Catalyseur / Base	Additif / Solvant	Ratios MK / AMK (*Z*/*E*)
Base minérale et organique	1[483]	Alk−SH	≡—Ar	Ø / Cs_2CO_3	TEMPO / DMSO	0 / 100 (85/15)
	2[484]	Alk−SH	≡—GEA	Ø / Et_3N	Ø / $CDCl_3$	0 / 100 (3/97)
	3[484]	Alk−SH	≡—GEA	Ø / Et_3N	Ø / MeCN	0 / 100 (98/2)
	4[484]	Alk−SH	≡—GEA	Ø / DBU	Ø / $CDCl_3$	0 / 100 (80/20)
Acide de Lewis	5[485]	Het−SH	≡—Ar	$In(OTf)_3$ / Ø	Ø / toluène	100 / 0
	6[485]	Ar/Alk−SH	≡—Ar	$In(OTf)_3$ / Ø	Ø / toluène	0 / 100 (variable)
Métal de transition	7[486]	Ar/Alk−SH	≡—Ar	$Mn(OAc)_3.2H_2O$ / Ø	Ø / AcOH	0 / 100 (20/80)
	8[487]	Ar/Alk−SH	≡—Ar	CuI / K_2CO_3	1 atm CO_2 / DMSO	0 / 100 (90/10)
	9[487]	Ar/Alk−SH	≡—Ar	CuI / K_2CO_3	1 atm Ar / DMSO	0 / 100 (20/80)

[483] Kondoh, A.; Takami, K.; Yorimitsu, H.; Oshima, K. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6468–6473.

[484] Truong, V. X.; Dove, A. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *125*, 4226–4230.

[485] Sarma, R.; Rajesh, N.; Prajapati, D. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4014–4016.

[486] Nguyen, V.-H.; Nishino, H.; Kajikawa, S.; Kurosawa, K. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 11445–11460.

[487] Riduan, S. N.;Ying, J. Y.; Zhang, Y. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1780–1783.

	10[488]	Ar−SH	≡—Alk	$Pd(OAc)_2$ / Ø	Ø / THF	100 / 0
	11[489]	Alk−SH	≡—Ar/Het/Alk	$Tp^*Rh(PPh_3)_2$ / Ø	Ø / toluène+DCE	100 / 0

Alk = Alkyl ; Ar = Aromatique ; Ar/Het = Aromatique et hétéroaromatique ; Het = hétéroaromatique ; GEA = Groupement électroattracteur. Les ratios (*Z*/*E*) indiquent les tendances moyennes.

Tableau 15. Exemples de conditions expérimentales pour l'obtention régio- et stéréosélectives d'éthers de thiovinyle

[488] Bäckvall, J.-E.; Ericsson, A. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5850–5851.

[489] Yang, J.; Sabarre, A.; Fraser, L. R.; Patrick, B. O. Love, J. A. *J. Org. Chem.* **2008**, *74*, 182–187.

2.1.1.2. Méthodes de synthèse par voies radicalaire

Bien que la réaction de thiol-yne dans sa version radicalaire soit en moyenne trois fois plus lente que son analogue thiol-ène, elle a pu trouver de très nombreuses applications et notamment pour la préparation de matériaux organiques, d'hydrogels ou encore de macromolécules de diverses natures, bien que le contrôle de la stéréochimie soit impossible à réaliser dans ces conditions (Schéma 177).[490]

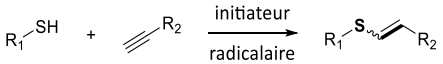


Schéma 177. Réaction de thiol-yne dans sa version radicalaire.

Le mécanisme réactionnel de la réaction de thiol-yne radicalaire ressemble énormément à son analogue de thiol-ène, avec une première étape de formation de radicaux thyiles grâce à l'emploi d'initiateurs radicalaires, permettant d'initier la formation des premiers éthers de thiovinyle (Schéma 178).[491]

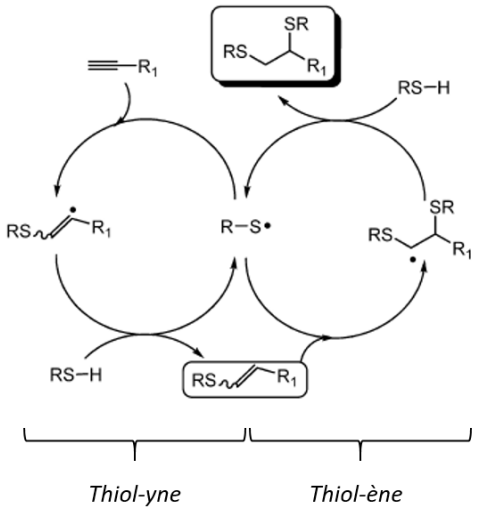


Schéma 178. Fonctionnalisation radicalaire en cascade d'un alcyne terminal (schéma extrait et modifié de la revue[491(a)]*).*

La réaction de thiol-yne peut ensuite s'entretenir par formation continue de radicaux thyiles. Cependant, les éthers de thiovinyle ainsi formés sont susceptibles de pouvoir réagir avec ces derniers selon un processus propre aux réactions de thiol-ène, ce qui peut en faire dans certains cas être considérée comme une réaction parasite. Cette seconde réaction est

[490] Lowe, A. B.; Hoyle, C. E.; Bowman, C. N. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 4745–4750.

[491] (a) Hoyle, C. E.; Lowe, A. B.; Bowman, C. N. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *38*, 1355–1387. (b) Lowe, A. *Polymer* **2014**, *55*, 5517–5549.

d'autant plus favorisée que sa constante cinétique est supérieure à celle de la thiol-yne et donc difficilement évitable, même avec une quantité stœchiométrique de thiol dans le milieu.

Dans la littérature, l'AIBN (activation thermique) et le DPAP (ou DMPA, photoactivation) sont les initiateurs de radicaux les plus souvent rencontrés pour l'activation de réactions thiol-yne et de thiol-ène *via* la formations des radicaux thiyles (Schéma 179).[492]

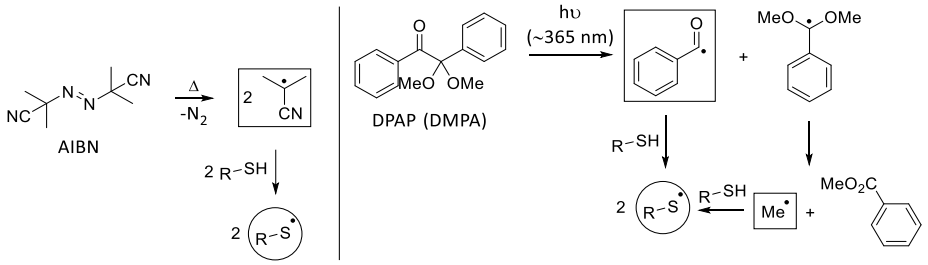


Schéma 179. Méthodes d'initiations par activation thermique (AIBN) et lumineuse (DPAP) pour la génération de radicaux thiyles.

2.1.2. La thiol-yne en bioconjugaison

En raison de sa biocompatibilité (milieux aqueux, pH, sels…), la réaction de thiol-yne a pu également être employée en bioconjugaison depuis quelques années, *via* diverses stratégies.

2.1.2.1. Alcynes terminaux non-activés par un groupement électroattracteur GEA

Les alcynes terminaux non-activés par des GEA sont utilisés pour la fonctionnalisation (Schéma 180, **A**)[493] et la macrocyclisation (Schéma 180, **B**)[494] de biomolécules selon une voie radicalaire et par photoactivation.

---

[492] Pour quelques références relativement récentes sur le sujet, voir : (a) Pötzsch, R.; Komber, H.; Stahl, B. C.; Hawker, C. J.; Voit, B. I. *Macromol. Rapid Commun.* **2013**, *34*, 1772–1778. (b) Lowe, A. B. *Polymer* **2014**, *55*, 5517–5549. (c) Enríquez, A.; González-Vadillo, A. Ma.; Martínez-Montero, I.; Bruña, S.; Leemans, L.; Cuadrado, I. *Organometallics* **2014**, *33*, 7307–7317. (d) Cook, A. B.; Barbey, R.; Burns, J. A.; Perrier, S. *Macromolecules* **2016**, *49*, 1296-1304.

[493] Conte, M. L.; Staderini, S.; Marra, A.; Sanchez-Navarro, M.; Davis, B. G.; Dondoni, A. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 11086–11088.

[494] (a) Tian, Y.; Li, J.; Zhao, H.; Zeng, X.; Wang, D.; Liu, Q.; Niu, X.; Huang, X.; Xu, N.; Li, Z. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 3325–3330. (b) Wang, Y.; Bruno, B. J.; Cornillie, S.; Nogieira, J. M.; Chen, D.; Cheatham III, T. E.; Lim, C. S.; Chou, D. H.-C. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 7087–7092.

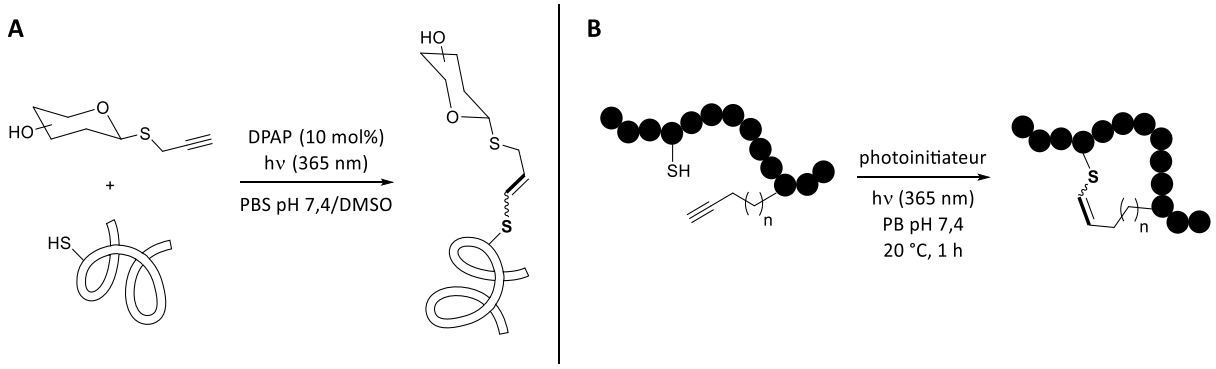


*Schéma 180. (**A**) Fonctionnalisation et (**B**) macrocyclisation de biomolécules par réaction de thiol-yne radicalaire photoactivée.*

A nouveau, le DPAP est le photoinitiateur de radicaux le plus employé en raison de sa très bonne compatibilité avec les milieux aqueux et en présence de biomolécules.[495] Son activation douce et rapide par la lumière permet en effet de s'affranchir d'une activation thermique comme dans le cas de l'AIBN et donc d'éviter la dénaturation des biomolécules employées. Comme expliqué précédemment, les liens éthers de thiovinyle ainsi formés sont de type AMK mais sont obtenus sous la forme de mélanges d'isomères *Z* et *E* sans réelle possibilité de contrôler la stéréochimie.

Cette stratégie de fonctionnalisation présente cependant le risque qu'une seconde fonctionnalisation non-désirée par réaction de thiol-ène entre un radical thyile et une fonction éther de thiovinyle tout juste formée (Schéma 178). Ce cas de réaction parasite survient le plus souvent lors de la phase de propagation de la réaction, et plus particulièrement lorsque le partenaire thiol se trouve en excès dans le milieu par rapport à l'alcyne terminal.[496] Par ailleurs, des réactions parasites d'oxydations (obtention d'éthers de sulfinyle) de et/ou de formations de liaisons entre biomolécules (rupture homolytique et reformation de ponts disulfures) peuvent survenir de manière aléatoire. Toutefois, ce type de réactivité peut également être exploité afin d'effectuer des doubles fonctionnalisations de biomolécules.[497]

[495] Lázár, L.; Csávás, M.; Hadházi, Á.; Herczeg, M.; Tóth, M.; Somsák, L.; Barna, T.; Herczegh, P.; Borbás, A. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 5339–5350.

[496] Minozzi, M.; Monesi, A.; Nanni, D.; Spagnolo, P.; Marchetti, N.; Massi, A. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 450–459.

[497] Li, Y.; Pan, M.; Li, Y.; Huang, Y.; Guo, Q. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2624–2629.

2.1.2.2. Alcynes terminaux activés par un groupement électroattracteur

L'emploi d'alcynes terminaux électroniquement appauvris comme électrophiles vis-à-vis des résidus cystéines, portés par des biomolécules, est une méthode relativement récente de bioconjugaison avec les résidus Cys. Bien que ce type de réaction soit en réalité une addition de Michael, elle peut cependant être classée dans la catégorie des réactions de type thiol-yne. Par exemple, la fonctionnalisation d'alcyne par des fonctions phosphonamidates a permis la fonctionnalisation de protéines (Schéma 181, **A**) et la préparation d'immunoconjugués anti-cancéreux (Schéma 181, **B**).[498] Les constantes réactionnelles pour ce type de ligation ont pu être estimées comme étant environ égales 0,6 $M^{-1}.s^{-1}$, ce qui est tout à fait acceptable en bioconjugaison.

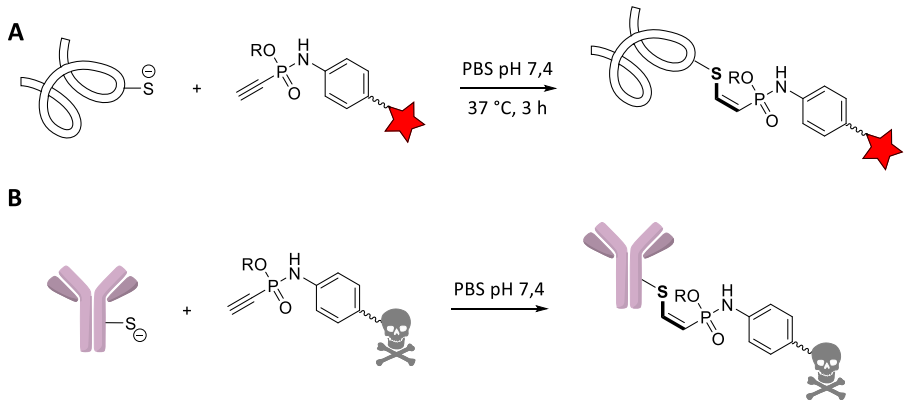


*Schéma 181. (**A**) Marquage de protéine. (**B**) Préparation d'immunoconjugusé.*

Dans un esprit tout à fait similaire, l'emploi de propynamides comme électrophiles s'est également avéré efficace pour la préparation de bioconjugués et avec des constantes réactionnelles de l'ordre de 0,1 $M^{-1}.s^{-1}$ (Schéma 182).[499]

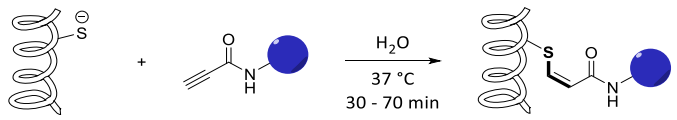


Schéma 182. Emploi de propynamides comme électrophiles en bioconjugaison.

Dans les différents cas présentés ci-dessus, les ions thiolates sont les « réels » nucléophiles lors de la réaction. Concernant la cystéine, le p*K*a de sa fonction thiol est

[498] Kasper, M.-A. *et al.* (a) *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 1–7. (b) *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 11625–11630. (c) *ChemBioChem* **2019**, *21*, 113–119.

[499] (a) Shiu, H.-Y.; Chan, T.-C.; Ho, C.-M.; Liu, Y.; Wong, M.-K.; Che, C.-M. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3839–3850. (b) Petit, E.; Bosch, L.; Costa, A. M.; Vilarrasa, J. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 11170–11176.

d'environ 8,2 et sa valeur peut être comprise entre 7,4 et 9,1 dans le cas de résidus au sein de chaînes protéiques.[500] Ainsi, à pH physiologique ou légèrement alcalin, la forme thiolate de ces résidus est générée et peut alors réagir dans la réaction de thiol-yne.

Par ailleurs, il est intéressant de constater que les liens éthers de thiovinyle ainsi obtenus sont tous de configuration *Z*. En effet, de plus anciens travaux portant sur des additions de Michael ont permis de comprendre certains phénomènes conduisant à l'un ou à l'autre des isomères.[501] Ce mécanisme passe en premier lieu par la formation du carbanion cinétique, de configuration préférentiellement *anti*, en raison de la demande énergétique moins élevée au niveau de l'état de transition (Schéma 183).[502]

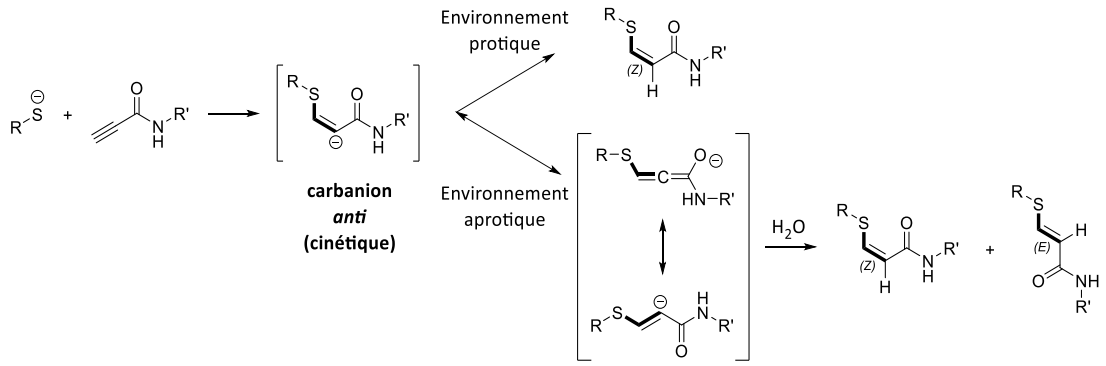


Schéma 183. Stéréosélectivité de l'addition de thiol en fonction de la proticité de l'environnement réactionnel.

En présence de solvants protiques, ces carbanions se voient à la fois stabilisés et ils sont en même temps rapidement protonés, ce qui permet la formation sélective de l'isomère *Z*. En revanche, dans un environnement aprotique, la délocalisation de la charge négative conduit à un équilibre entre les carbanions *anti*, *syn* et allénique, dont l'hydrolyse finale aboutit à un mélange d'isomères souvent plus riche en isomère *E*.

Plus récemment encore, l'emploi de propargylsulfonium comme fonction électrophile a également permis la fonctionnalisation de diverses protéines et la macrocyclisation de peptides grâce à la formation d'éthers de thiovinyles de type MK (Schéma 184).[503]

[500] Awoonor-Williams, E.; Rowley, C. N. *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *12*, 4662–4673.
[501] Crisp, G. T.; Millan, M. J. (a) *Tetrahedron* **1998**, *54*, 637–648. (b) *Tetrahedron* **1998**, *54*, 649–666.
[502] Houk, K. N.; Strozier, R. W.; Rozeboom, M. D.; Nagase, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 323–325.
[503] Hou, Z.; Wang, D.; Li, Y.; Zhao, R.; Wan, C.; Ma, Y.; Lian, C.; Yin, F.; Li, Z. *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 1698–1705.

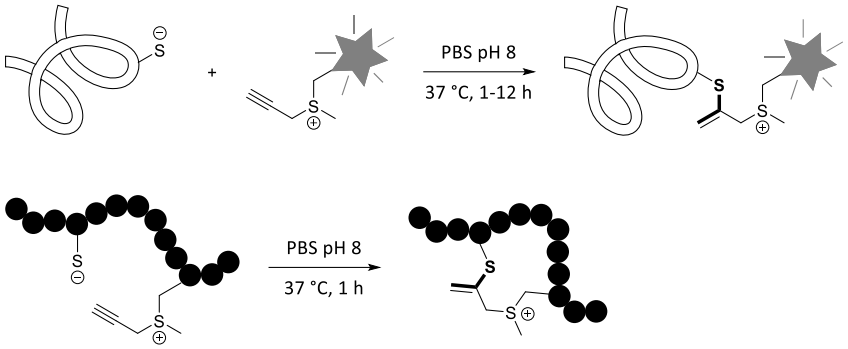


Schéma 184. Emploi de propargylsulfonium pour la fonctionnalisation de protéines et la macrocyclisation de peptides.

Dans ce cas, la régiosélectivité de l'addition du thiol sur l'alcyne terminal est gouvernée par le pH légèrement basique qui permet la génération d'une forme allénique (allénylsulfonium) majoritaire (Schéma 185).[504] L'addition nucléophile de l'ion thiolate a donc lieu sur l'atome de carbone le plus électrophile de l'allène formé et conduit, après hydrolyse du zwitterion intermédiaire, à l'éther de thiovinyle de type MK avec une régiosélectivité totale.

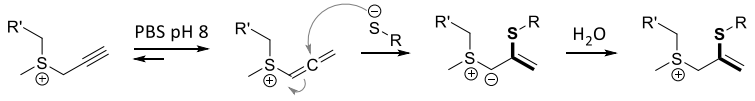


Schéma 185. Mécanisme de la réaction de thiol-yne via *la génération d'un allénylsulfonium.*

Ces réactifs allèniques ont été également employés sous la forme d'allènamides en bioconjugaison, ce qui s'est avéré très efficace pour la ligation de protéines, de peptides ou dans le cadre de macrocyclisations peptidiques avec des constantes cinétiques de l'ordre de 16 à 30 $M^{-1}.s^{-1}$ (Schéma 186).[505] En effet, ces allènamides présentent de très bonnes stabilités en milieux acides (TFA) ou aqueux et ne réagissent pas avec divers nucléophiles comme les amines et les alcools, ce qui permet une très bonne chimiosélectivité vis-à-vis des thiols. De plus, la fonction éther de thiovinyle de type MK reste intacte et détectable après des digestions trypsiques, ce qui facilite l'interprétation des analyses.

[504] (a) Bothwell, I. R.; Islam, K.; Chen, Y.; Zheng, W.; Blum, G.; Deng, H.; Luo, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 14905–14912. (b) Jia, P.; Zhang, Q.; Jin, H.; Huang, Y. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 412–415.

[505] (a) Abbas, A.; Xing, B.; Loh, T.-P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7491–7494. (b) Jafari, M. R.; Lakusta, J.; Lundgren, R. J.; Derda, R. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 509–514. (c) Cameron, A. J.; Harris, P. W. R.; Brimble, M. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 18054-18061.

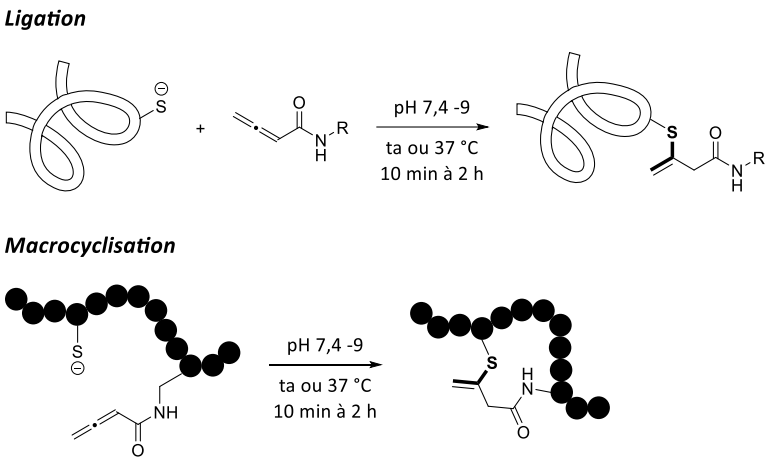
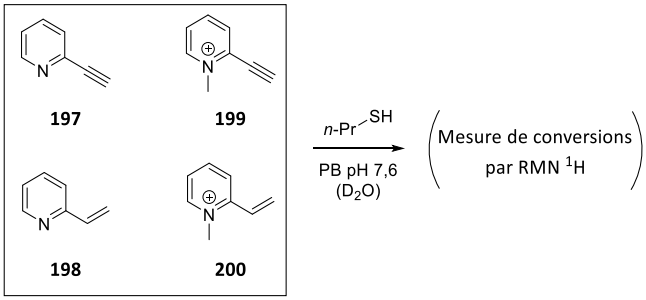


Schéma 186. Ligation et macrocyclisation de protéines et de peptides par addition de biothiols sur des allènamides.

En 2019, le groupe du Pr. Bernardes s'est intéressé aux pyridines comme groupement électroattracteur afin d'activer les fonctions alcynes terminales pour la fonctionnalisation des chaînes latérales de résidus cystéines (Schéma 187, **A**).[506] Il est à noter que les auteurs ont employé le 1-propanethiol comme modèle simple de ces résidus cystéines afin de se rapprocher le plus possible des conditions expérimentales, et ont consolidé leurs études par des calculs théoriques en utilisant le méthanethiol. Les pourcentages de conversions observés dans chaque cas par les auteurs ont permis d'établir que le caractère électroattracteur du noyau pyridine seul n'était pas suffisant afin d'obtenir des vitesses réactionnelles optimales pour de la bioconjugaison (Schéma 187, **B**).

A



B

	Conversion (%)		
Electrophile	4 min	1 h	24 h
197	0	0	6
198	0	10	62
199	84	99	99
200	83	99	99

*Schéma 187. (**A**) Structures des électrophiles étudiés et conditions opératoires. (**B**) Conversion des électrophiles dans le temps.*

En effet, la 2-éthynylpyridine **197** s'est avérée être le moins réactif des électrophiles testés, avec seulement 6% de conversion après 24 heures, suivie par la 2-vinylpyridine **198**

[506] Matos, M. J.; Navo, C. D.; Hakala, T.; Ferhati, X.; Guerreiro, A.; Hartmann, D.; Bernardim, B.; Saar, K. L.; Compañón, I.; Corzana, F.; Knowles, T. P. J.; Jiménez-Osés, G.; Bernardes, G. J. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 6640–6644.

avec 62% de conversion. En revanche, l'activation du noyau pyridine par formation de *N*-méthylpyridiniums correspondants a permis l'obtention d'excellents taux de conversions en seulement quatre minutes et avec des conversions tout à fait semblables, que ce soit à l'aide de la fonction alcyne terminal (**199**) ou vinyle (**200**).

Néanmoins, afin de s'affranchir des risques de double addition de biothiols et de la potentielle obtention d'isomères lors de l'étape de fonctionnalisation de biomolécules, les auteurs ont finalement préféré employer des dérivés du 2-vinyl-*N*-méthylpyridinium pour la préparation d'immunoconjugués en utilisant les ponts disulfures d'anticorps clivés de façon ménagée (Schéma 188).

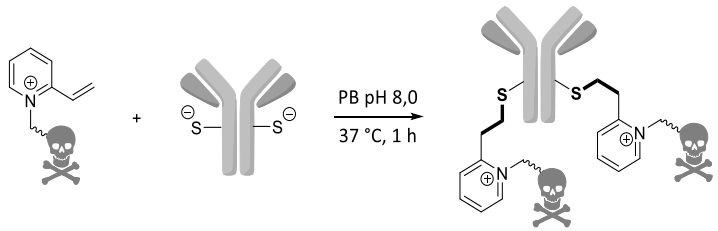


Schéma 188. Exemple de fonctionnalisation chimiosélective de résidus cystéines pour la préparation d'immunoconjugués.

Cependant, ces travaux ont parfaitement illustré le fait que les alcynes terminaux électroniquement appauvris ne présentent pas nécessairement une forte réactivité vis-à-vis des thiols en conditions physiologiques, comme les alcynes terminaux non-activés.

2.1.2.3. Réaction de thiol-yne par effet « *template* »

Les ubiquitines (Ub) sont des protéines de petites dimensions (76 résidus d'acides aminés) et leur omniprésence à l'échelle cellulaire permet le marquage covalent et post-traductionnel d'autres protéines à éliminer par les protéasomes grâce à leur partie *C*-terminale.[507] Ce processus biochimique est essentiel dans le fonctionnement cellulaire comme par exemple lors de la transcription des gènes, la réparation de l'ADN, l'apoptose ou encore l'endocytose.[508]

Le marquage et la fonctionnalisation de ces protéines essentielles ont été réalisé à de nombreuses reprises afin de comprendre leurs interactions avec d'autres protéines et leurs mécanismes d'action cellulaires lors de la formation de chaînes protéiques appelées

[507] Tanaka, K.; Suzuki, T.; Hattori, N.; Mizuno, Y. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2004**, *1695*, 235–247.
[508] Ikeda, F.; Dikic, I. *EMBO Rep.* **2008**, *9*, 536–542.

polyUb.[509] Pour cela, la réaction de click entre des azotures et des alcynes terminaux a le plus souvent été employée du fait des petites dimensions et de la bioorthogonalité de ces fonctions.

En 2013, des travaux indépendants des Prs. Mootz et Ovaa ont cependant conduit à des résultats inattendus lors des études d'interactions protéines-protéines avec l'enzyme de désubiquitination (DUB), une protéase à cystéine permettant le « recyclage » des Ub fonctionnalisant les protéines avant leur dégradation par les protéasomes [510]. En effet, cette dernière a été mise en contact avec des Ub ou des enzymes SUMO[511] dont la partie C-terminale avait été fonctionnalisée par des groupements propargyle. L'objectif initial était de pouvoir marquer le complexe protéique formé par réaction de CuAAC afin de pouvoir l'étudier. Les auteurs ont cependant observé la formation d'un lien covalent entre ces protéines, ainsi que la complète inhibition de l'activité enzymatique de la DUB. Les analyses par MS post-digestion, par électrophorèse et par mesure de densité électronique des cristaux du complexe DUB-Ub ont permis d'établir que la fonction thiol du résidu cystéine catalytique de la DUB avait réagi sur l'alcyne terminal de l'Ub, conduisant à la formation d'un lien stable éther de thiovinyle de type MK (Schéma 189).

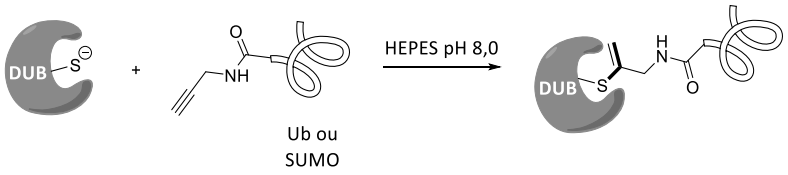


Schéma 189. Inhibition irréversible de la DUB par formation d'une liaison éther de thiovinyle stable.

Les alcynes terminaux non-activés étant réputés inertes en conditions physiologiques,[512] cette ligation inattendue a conduit les auteurs à étudier avec attention le mécanisme réactionnel afin de comprendre cette réactivité accrue. Ainsi, l'addition

[509] Pour quelques exemples relativement récents, voir : (a) Eger, S.; Scheffner, M.; Marx, A.; Rubini, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *46*, 16337–16339. (b) Sommer, S.; Weikart, N. D.; Brockmeyer, A.; Janning, P.; Mootz, H. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9888–9892. (c) Weikart, N. D.; Sommer, S.; Mootz, H. D. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 296–298.

[510] (a) Sommer, S.; Weikart, N. D.; Linne, U.; Mootz, H. D. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 2511–2517. (b) Ekkebus, R.; van Kasteren, S. I.; Kulathu, Y.; Scholten, A.; Berlin, I.; Geurink, P. P.; de Jong, A.; Goerdayal, S.; Neefjes, J.; Heck, A. J. R.; Komander, D.; Ovaa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2867–2870.

[511] SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) : famille de protéines structuralement proches des ubiquitines et possédant des fonctions analogues.

[512] Uhlig, N.; Li, C.-J. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1241–1249.

d'inhibiteurs de radicaux (NO ou ascorbate de sodium) ou la mise dans l'obscurité totale du milieu réactionnel n'a en rien inhibé cette réaction de thiol-yne, ce qui exclue un mécanisme radicalaire. De plus, étant donnée la parfaite régiosélectivité de cette réaction de thiol-yne en faveur de l'isomère MK et de l'emploi d'un pH légèrement alcalin (pH = 8,0), il n'est pas exclu que la formation équilibrée d'un allène comme intermédiaire électrophile soit à l'origine de cette réactivité et qu'un mécanisme purement ionique soit donc impliqué.

Ensuite, les auteurs ont pu établir que les fortes interactions entre ces enzymes et qu'en particulier l'entrée de la partie *C*-terminale des protéines Ub ou SUMO dans le site catalytique de la DUB ont joué un rôle central dans cette réaction de thiol-yne. En effet, la reconnaissance de la partie *C*-terminale de l'Ub ou de la SUMO par la DUB a permis le rapprochement des fonctions réactives et donc l'établissement de la liaison thiovinyle éther selon un effet « *template* » par effet de promiscuité. Bien que le groupe du Pr. Mootz ait démontré à l'aide d'enzymes mutantes que la triade catalytique de la DUB n'avait pas de rôle particulier lors de la réaction,[510(a)] il a pu cependant être établi que la chaîne protéique, et en particulier le trou oxyanionique, permettait l'activation des fonctions alcyne et thiol une fois proches dans l'espace, *via* la stabilisation des intermédiaires formés (Schéma 190).[513] En effet, la structure de l'anion thiovinylique présente des similarités structurales avec l'intermédiaire anionique et tétraédrique formé lors de l'hydrolyse enzymatique des liaisons amides, et dont la stabilisation est assurée par les résidus du « trous oxyanioniques » de l'enzyme environnants.

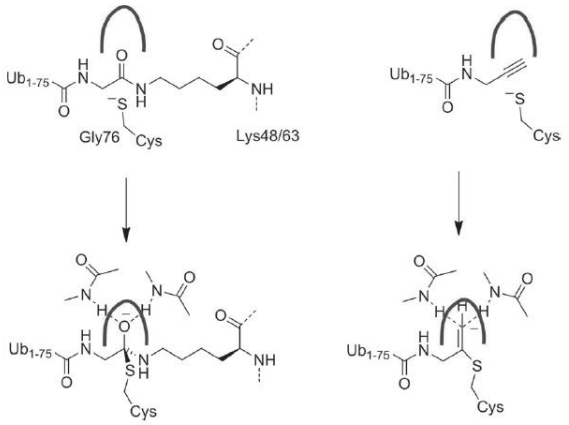


Schéma 190. Comparaison des modèles d'interactions stabilisantes des intermédiaires oxyanion et anion thiovinylique (schéma extrait de l'article[513]). La ligne continue noire symbolise un trou oxyanionique.

[513] Arkona, C.; Rademann, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8210–8212.

Le groupe du Pr. Ovaa a quant à lui a pu démontrer que seuls les alcynes terminaux peu encombrés permettaient l'obtention d'une telle réactivité, même si la fonction alcène a permis l'obtention d'une très légère conversion et que la distance entre les fonctions amide et alcyne n'impactait que la cinétique de la ligation (Figure 102).[510(b)]

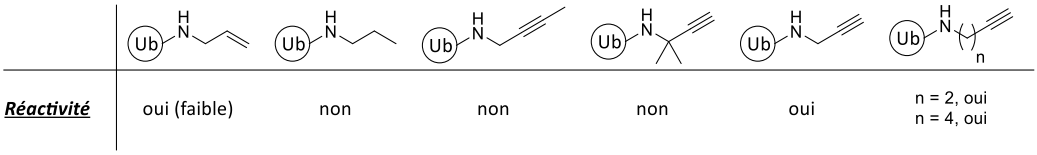


Figure 102. Réactivité des électrophiles en fonction de leur structure et de leur nature.

Finalement, ces auteurs ont réussi à généraliser cette méthode d'inhibition irréversible de protéases à cystéine en réalisant à nouveau une réaction de thiol-yne spécifique entre la caspase 1 et un inhibiteur peptidique modifié par une groupement propargyle.

Plus récemment, le groupe du Pr. Ovaa s'est ensuite intéressé à la cathépsine K (CatK), une protéase à cystéine impliquée dans certaines pathologies osseuses comme l'ostéoporose,[514] afin d'évaluer la viabilité de cette stratégie pour le design d'une nouvelle génération d'inhibiteurs suicides beaucoup plus sélectifs.[515] L'odanacatib (**ODN**) est un inhibiteur irréversible bien connu de la CatK et a été modifié par un groupement propargyle (**ODN-Prop**) afin de tester sa réactivité vis-à-vis du résidu cystéine catalytique de la CatK (Schéma 191). La formation d'une liaison éther de thiovinyle a à nouveau pu être confirmée par l'étude du cristal obtenu et par mesure de l'activité enzymatique, ce qui a permis d'étendre ce concept d'inhibition irréversible par réaction de thiol-yne à des petits inhibiteurs moléculaires. Par ailleurs, l'incubation de cet alcyne terminal en présence d'excès de biothiols, tels que la cystéine ou le GSH, n'a pas permis d'observer de la moindre conversion en éthers de thiovinyle correspondants. Ces expériences ont apporté la confirmation que la mise en promiscuité des fonctions *via* les interactions ligand-enzyme et l'effet *template* fourni par cette dernière étaient bel et bien les seuls moteurs permettant l'obtention de ces réactivités.

[514] Turk, V.; Stoka, V.; Vasiljeva, O.; Renko, M.; Sun, T.; Turk, B.; Turk, D. *Biochim. Biophys. Acta Prot. Proteom.* **2012**, *1824*, 68–88.

[515] Mons, E.; Jansen, I. D. C.; Loboda, J.; van Doodewaerd, B. R.; Hermans, J.; Verdoes, M.; van Boeckel, C. A. A.; van Veelen, P. A.; Turk, B.; Turk, D.; Ovaa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 3507–3514.

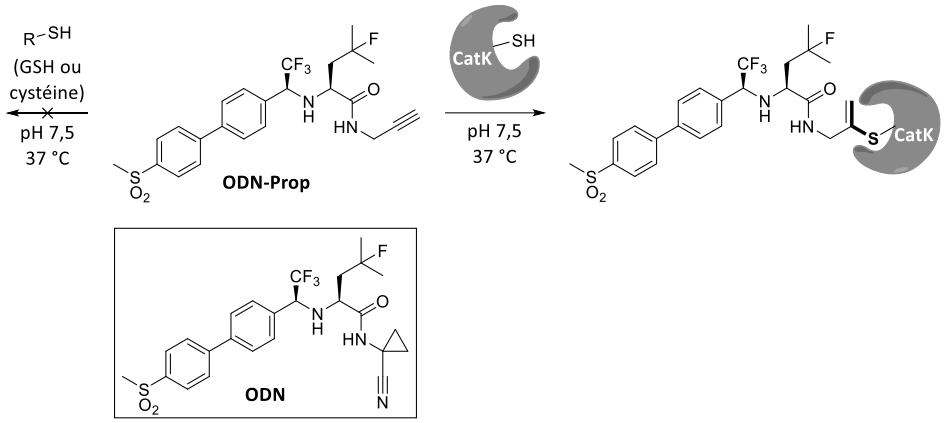


*Schéma 191. Inhibition irréversible de la CatK par réaction de thiol-yne avec l'**ODN-Prop** et vérification de la spécificité.*

Les alcynes terminaux inactivés sont ainsi devenus de nouvelles fonctions électrophiles très intéressantes pour la recherche de nouveaux mécanismes d'inhibition irréversible et cibler des protéases à cystéines, principalement grâce aux interactions uniques que ces enzymes peuvent avoir avec d'autres (bio)molécules et par la formation d'un environnement propice pour l'activation de ces fonctions. A terme, cette nouvelle stratégie pourrait permettre d'une part de diminuer de façon effective la toxicité des ligands électrophiles lors de leur administration *in vivo* mais également d'augmenter leur efficacité grâce à leur spécificité.[516]

Réunies, ces différentes observations et conclusions entrent en parfaite adéquation avec les prérequis de la KTGS qui, pour rappel, nécessite une réaction lente en l'absence de cible biologique, cette dernière permettant une mise en promiscuité des fonctions réactives *via* un effet *template* conduisant à une accélération cinétique nette de la ligation.

2.2. Objectifs du projet

Le développement de nouvelles réactions éligibles en KTGS a connu un véritable essor depuis les trois dernières années, ce qui a amené leur nombre à 15 en 2020 (Schéma 19, Chapitre I). Cependant, face à la diversité des cibles biologiques, tant sur leur nature que sur les spécificités (topologie, dynamique, stabilité, conditions expérimentales d'utilisation…) et à

[516] Schwöbel, J. A. H.; Koleva, Y. K.; Enoch, S. J.; Bajot, F.; Hewitt, M.; Madden, J. C.; Roberts, D. W.; Schultz, T. W.; Cronin, M. T. D. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 2562−2596.

la constante croissance de l'espace chimique, la découverte de nouvelles réactions au service de cette stratégie reste un défi scientifique pour l'innovation en KTGS.

L'étude bibliographique réalisée précédemment a mis en relief la potentielle éligibilité de la réaction de thiol-yne en synthèse par la cible en raison de son apparent respect apparent des différents critères imposés par cette stratégie *via* l'emploi de thiols et d'alcynes terminaux.

De ce fait, il a été décidé d'étudier cette réaction en employant comme cible modèle la *b*CA II afin d'établir une première preuve de concept et ainsi d'apporter une nouvelle contribution scientifique pour proposer de nouvelles réaction éligibles en KTGS (Schéma 192).

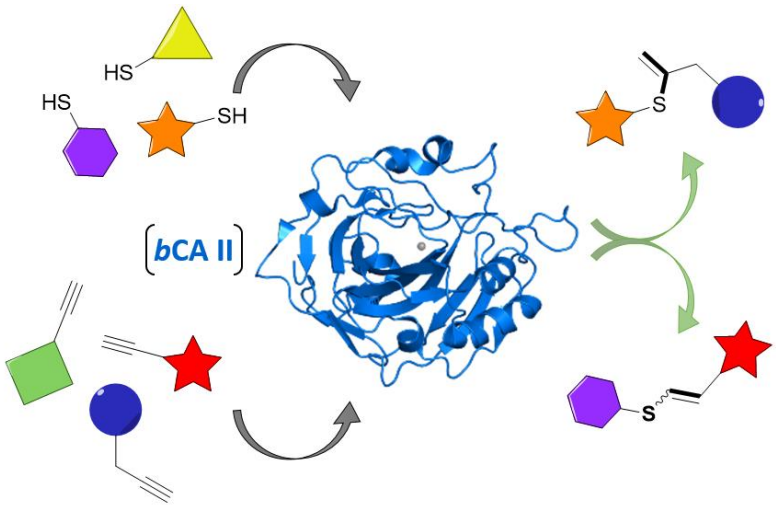


Schéma 192. Principe général de la réaction de thiol-yne catalysée par la b*CA II en KTGS.*

2.3. Vérification de la viabilité de la cible et de la reproductibilité de la littérature

En amont de l'étude de la réaction de thiol-yne en KTGS, deux vérifications ont impérativement dû être effectuées, à savoir : 1) la viabilité de la cible *b*CA II commerciale[517] à disposition afin de s'assurer de sa capacité à catalyser des réactions *in situ* et 2) la reproductibilité des expériences décrites dans la littérature, montrant notre capacité à prendre en main cette stratégie et les méthodes analytiques associées.

[517] Anhydrase carbonique II d'érythrocytes bovins (poudre lyophilisée, > 95% SDS-PAGE) ; CAS : 9001-03-0 ; Référence fournisseur (Merck-Sigma-Aldrich) : **C2624**

2.3.1. Synthèse de fragments réactifs et de ligands de référence

Des fragments réactifs et des ligands décrits dans la littérature en KTGS ont donc été sélectionnés afin de servir de référence.[104,153,158] Ainsi, les ligands **196** et **195** ont été retenus en raison de leurs simplicités structurales et de la facilité d'accès des fragments réactifs correspondants (Schéma 193).

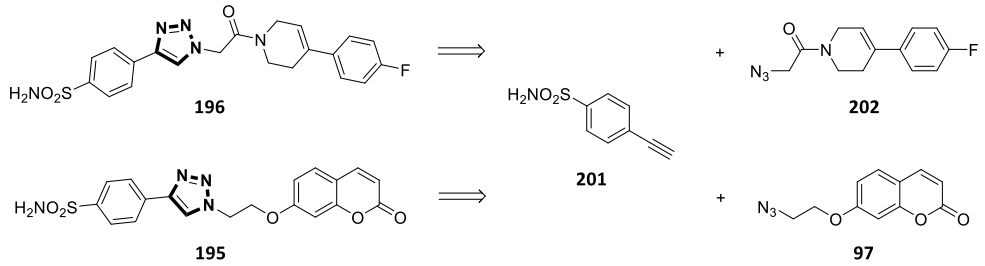


Schéma 193. Structures des ligands et fragments réactifs de référence en KTGS pour la b*CA II.*

2.3.1.1. Préparation des partenaires azotures

Bien que l'azoture **202** ait été employé avec succès en KTGS dans la littérature, sa préparation n'a en revanche pas été décrite. Une voie de synthèse pour ce composé a donc été imaginée en quatre étapes à partir du bromure de (4-fluorophényl)magnésium et de la *N*-Boc-4-pipéridone (Schéma 194).

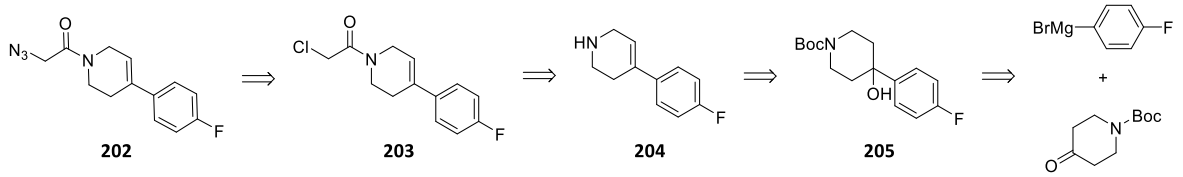


*Schéma 194. Voie rétro-synthétique du fragment réactif **202**.*

La préparation de l'alcool **205** a donc été réalisée en suivant une méthode décrite dans la littérature, par addition nucléophile du bromure de (4-fluorophényl)magnésium sur la *N*-Boc-4-pipéridone, pour obtenir le produit souhaité avec 34% de rendement (Schéma 195).[518] Toutefois, les réactions de déshydratation de l'alcool et de déprotection de la fonction amine réalisées *one pot* n'ont malheureusement pas permis d'obtenir l'amine **204**, mais uniquement des mélanges complexes.

[518] Toscani, A.; Risi, C.; Black, G. W.; Brown, N. L.; Shaaban, A.; Turner, N. J.; Castagnolo, D. *ACS Catal.* **2018**, *8*, 8781−8787.

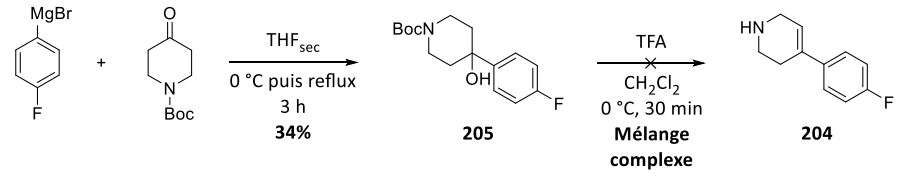


*Schéma 195. Préparations de l'alcool **205** et de l'amine **204**.*

Face à cette première difficulté, la synthèse de l'azoture **97** de référence comportant le motif coumarine a donc été entreprise. Il a été obtenue en deux étapes avec un rendement global de 32% (Schéma 196).[519]

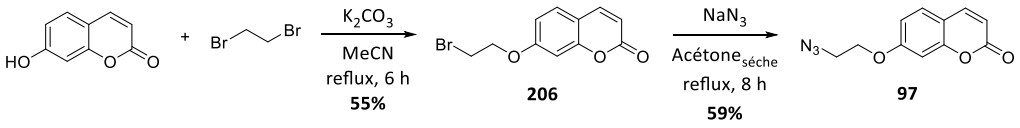


*Schéma 196. Synthèse de l'azoture **97** de référence.*

2.3.1.2. Préparation du partenaire alcyne

Parallèlement à la préparation du partenaire azoture, celle de l'alcyne terminaux **201** de référence a été réalisée en trois étapes (Schéma 197).

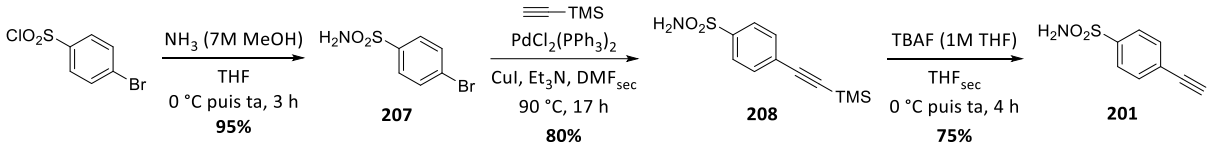


*Schéma 197. Préparation en trois étapes de l'alcynes terminal **201** de référence.*

La première étape de formation de la sulfonamide **207** à partir du chlorure de 4-bromobenzènesulfonyle en présence d'une solution d'ammoniac (7 N) dans le méthanol a permis d'obtenir ce composé avec 95% de rendement. Ce dernier a ensuite été engagé dans un couplage pallado-catalysé de Sonogashira, en présence triméthylsilylacétylène, ce qui a fourni l'alcyne protégé **208** avec un rendement de 80%. Finalement, la déprotection du groupement TMS par le TBAF a permis l'obtention avec 75% de rendement du fragment réactif **201**.

[519] Duan, Y.-C.; Ma, Y.-C.; Zhang, E.; Shi, X.-J.; Wang, M.-M.; Ye, X.-W.; Liu, H.-M. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 11−19.

2.3.1.3. Préparation du ligand de référence

Une fois les fragments réactifs de références obtenus, la préparation du ligand triazole **195** a été entreprise par réaction de CuAAC (Schéma 198).

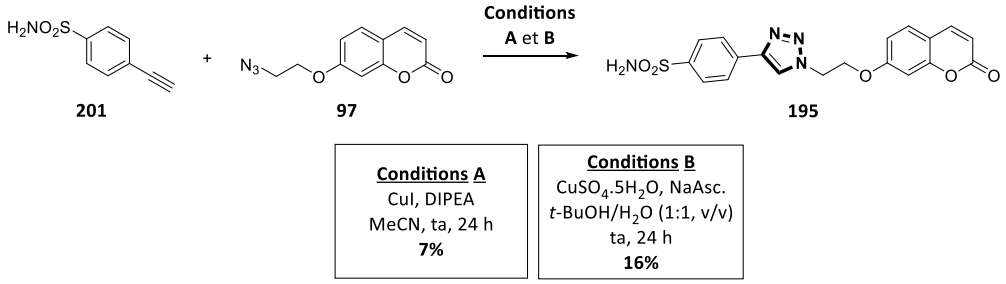


*Schéma 198. Préparation du ligand triazole **195** de référence.*

Lors de la première tentative, selon les conditions **A**, le ligand **191** a été obtenu avec un rendement très faible de 7%. L'emploi des conditions **B** a finalement permis d'obtenir le composé souhaité en quantités suffisantes mais avec encore une fois un rendement relativement faible de 16%. La fonction sulfonamide permettant effectivement la très bonne coordination des ions Zn^{2+}, il est très probable que les catalyseurs de Cu(I) et Cu(II) forment des complexes avec cette fonction, empêchant de ce fait la catalyse de la réaction de CuAAC.

2.3.2. Détermination de la viabilité de la cible et de la reproductibilité de la littérature

Une fois le ligand et les fragments réactifs de référence à disposition, la viabilité de la *b*CA II et la reproductibilité des résultats décrits dans la littérature ont été testée dans les conditions décrites de la littérature afin de prendre en main cette nouvelle cible thérapeutique.[104,153,158] L'azoture **97** et l'alcyne **201** ont donc été incubés en conditions physiologiques pendant une semaine selon trois expériences différentes (Schéma 199) :

1) **Conditions A** : absence de la cible thérapeutique afin de contrôler que la réaction est spécifiquement promue par cette dernière (nom d'expérience : Blanc)

2) **Conditions B** : présence de la cible et d'un excès d'inhibiteur commercial (**ATZ**) afin de contrôler que la réaction survient bien dans le site actif de la cible (nom d'expérience : ATZ).

3) **Conditions C** : présence de la cible thérapeutique uniquement pour promouvoir la KTGS (nom d'expérience : Enzyme).

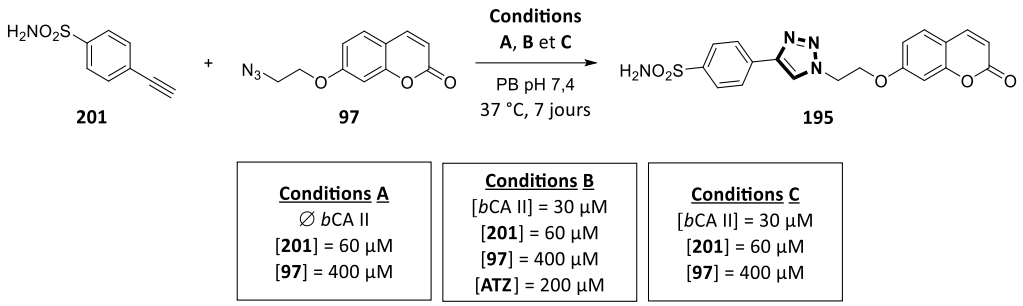


Schéma 199. Conditions expérimentales des expériences de KTGS de référence.

Les analyses des différents milieux réactionnels par LC-MS (transitions MRM) a permis de confirmer l'accélération cinétique de la réaction de click grâce à la *b*CA II à disposition *via* la comparaison des flux ioniques obtenus et caractéristiques du ligand **195** (Figure 103). Il est à noter que la quantité de ligand formé dans l'expérience « ATZ » est bien supérieure à celle dans le « Blanc », ce qui semble indiquer que la concentration en ATZ utilisée n'était pas suffisante pour totalement saturer les sites catalytiques enzymes présentes dans le milieu.

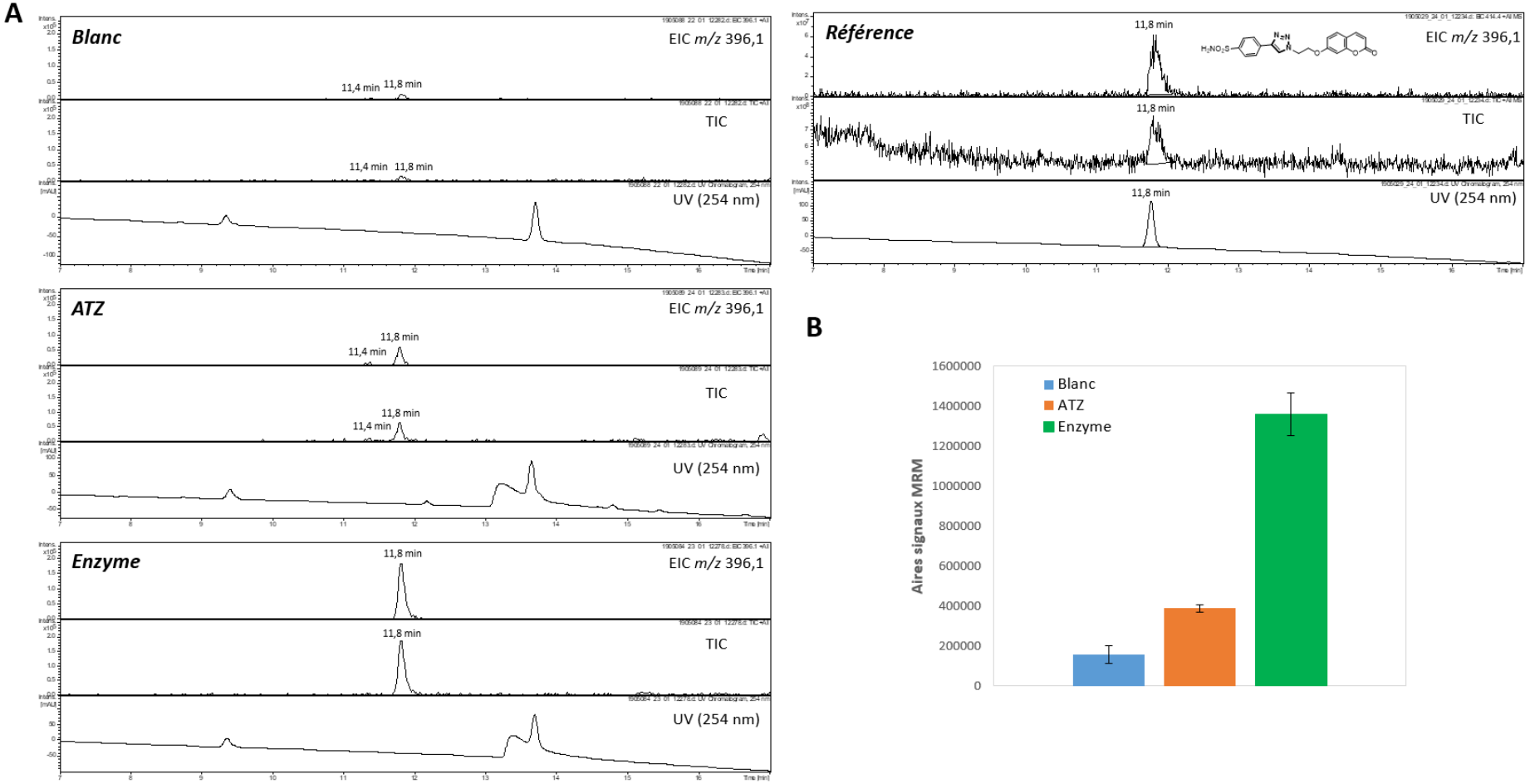


*Figure 103. (**A**) Résultats des analyses LC-MS (MRM) des trois types de réactions et de la référence synthétisée du ligand **195**. (**B**) Aires des signaux obtenus via les transitions MRM (EIC m/z 396,1) pour les trois expériences de formation du ligand de référence **195** (les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types des trois résultats obtenus via un triplicata des analyses).*

Finalement, la viabilité du lot de *b*CA II et la méthodologie d'expérience ont donc pu être validées. Dans le but de conserver un maximum de reproductibilité et de fiabilité pour le développement de la réaction de thiol-yne en KTGS, il a donc été choisi de conserver en première approche ces paramètres expérimentaux afin de maximiser les chances de succès (type de tampon aqueux, concentrations en réactifs et en cible, température…).

2.4. Étude de la réaction de thiol-yne : de la méthodologie à la KTGS

2.4.1. Préparation de librairies chimiques

En amont de la synthèse des librairies chimiques pour les criblages de KTGS, des structures générales de ligands potentiels comprenant des liens éthers de thiovinyle ont été imaginées. N'ayant malheureusement pas à disposition l'ensemble des outils de modélisations tridimensionnelles adaptés à la CA II permettant de comparer le docking potentiel de ces structures générales au sein du site actif de l'enzyme avec celui des ligands connus, une comparaison qualitative a été réalisée. Pour cela, quatre points de corrélation ont été définis afin de comparer les distances interatomiques entre les structures des ligands potentiels et celles de référence : 1) fonction sulfonamide, 2) premier cycle aromatique, 3) fonction formée *in situ* et 4) second cycle aromatique/hétéroaromatique (Figure 104).

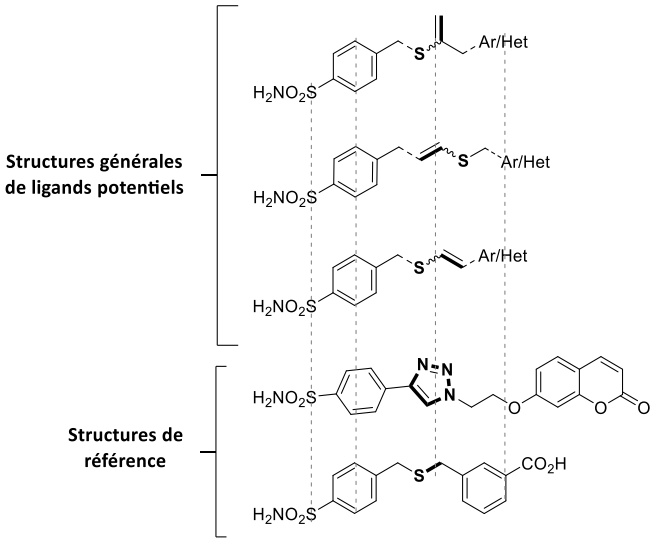


Figure 104. Corrélation et comparaison des structures de ligands potentiels avec celles des ligands de référence.

De manière générale, l'ensemble de ces structures de ligands potentiels possède une bonne cohérence en terme de distance entre chaque point de corrélation avec les structures de référence. Cette simple comparaison qualitative a donc permis d'établir un profil type de

ligands dont la formation *in situ* par réaction de thiol-yne serait adapté à la topologie du site actif de la *b*CA II.

La synthèse (ou l'achat pour les dérivés commerciaux) de ces divers fragments réactifs ont donc été entrepris afin de constituer une petite librairie chimique.

2.4.2.1. Sélections et préparations des partenaires thiols

Par analogie aux travaux du Pr. Huc, qui avait employé le thiol **44** comme nucléophile lors de son étude,[146] ce dernier a été préparé en trois étapes à partir du chlorure de 4-(bromométhyl)benzènesulfonyl (Schéma 200).

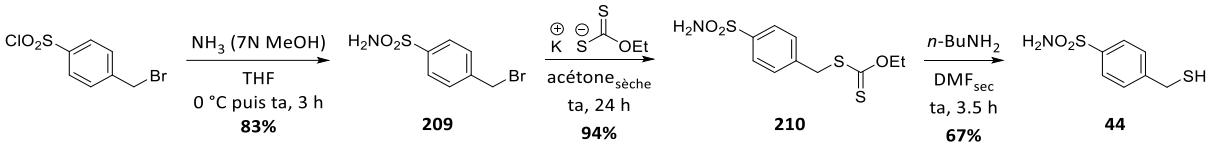


*Schéma 200. Synthèse du thiol **44** en trois étapes.*

L'addition d'ammoniac en solution dans le MeOH a permis d'obtenir la sulfonamide **209** avec 83% de rendement. Pour la préparation d'un précurseur du thiol **44**, la formation d'une fonction thiocarbonate, par substitution nucléophile entre le xanthate de potassium et le composé **210**, a été préférée par rapport à la formation d'une fonction thioester à partir de l'acide thio-acétique, qui est un produit toxique, volatil, nauséabond et difficilement manipulable. Le thiocarbonate **210** a donc été facilement obtenu avec un très bon rendement de 94%. Finalement, la déprotection de la fonction thiol par la *n*-butylamine a permis d'obtenir avec un rendement de 67% le thiol **44**.

De façon très similaire, le thiol **213** comportant un motif coumarine a également été préparée en trois étapes, avec en premier lieu une bromation radicalaire en position benzylique de la 7-méthyl-coumarine par une réaction de Wolh-Ziegler (Schéma 201).

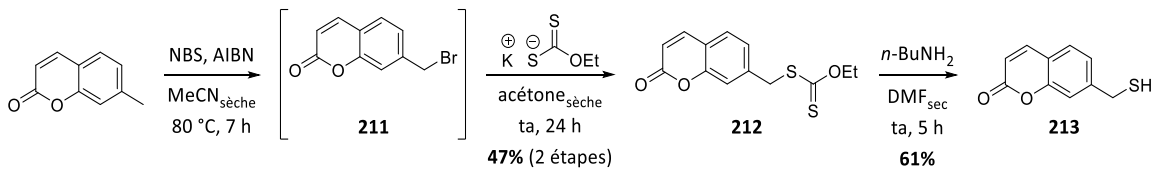
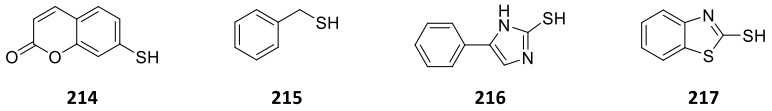


*Schéma 201. Synthèse en trois étapes du thiol **213**.*

Parallèlement, quatre autres thiols **214**-**217** commerciaux ont également été sélectionnés comme partenaires pour le criblage (Figure 105).



214 **215** **216** **217**

*Figure 105. Structures des thiols commerciaux **214**-**217** sélectionnés pour le criblage.*

2.4.2.2. Sélections et préparations des partenaires alcynes terminaux

Plusieurs approches synthétiques ont permis d'accéder rapidement à une petite librairie d'alcynes terminaux. Les exemples **218**, **219** et **220** ont donc été préparés par réaction d'amidation entre la propargylamine et les acides carboxyliques correspondants *via* une activation préalable à l'aide du réactif de couplage EDCI.HCl (Schéma 202).

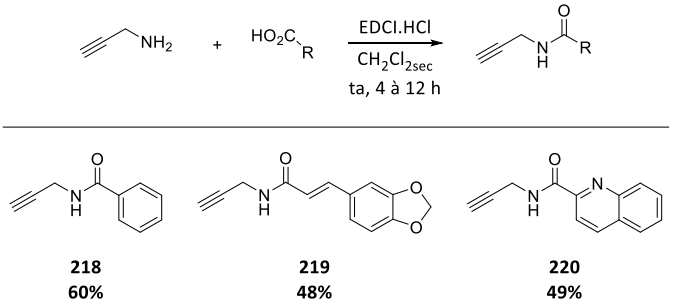


*Schéma 202. Préparation des alcynes terminaux **218**, **219** et **220** par réaction d'amidation à l'aide de l'EDCI.HCl.*

Par ailleurs, un couplage de Sonogashira entre le triméthylsilylacétylène et le 2-bromonaphthalène, suivi par l'étape de déprotection de l'alcyne terminal correspondant, ont permis l'obtention du composé **222** avec 31% de rendement sur deux étapes (Schéma 203).[520]

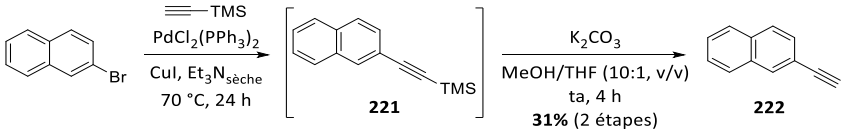


*Schéma 203. Préparation en deux étapes successives de l'alcyne terminal **222**.*

De manière très similaire, le partenaire coumarine **225** a été obtenu en trois étapes avec un rendement global de 71% et selon des procédures décrites dans la littérature (Schéma 204).[177]

[520] Zhang, S.; Ibrahim, J. J.; Yang, Y. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 6265−6269.

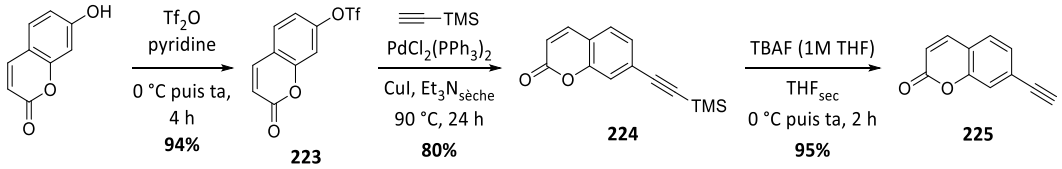


*Schéma 204. Préparation en trois étapes de l'alcyne **225**.*

Par analogie aux premiers criblages par KTGS à l'aide de la *b*CA II et aux structures des hits identifiés lors de ces travaux,[104,158] il a été décidé de préparer des alcynes terminaux dérivés d'acides aminés comme partenaires de KTGS afin d'exploiter au mieux les propriétés amphiphiles du site actif de l'enzyme et de maximiser les chances d'obtenir un hit pour la preuve de concept.

En premier lieu, l'amide **226** a été obtenu avec 85% de rendement après une réaction d'amidation entre la benzylamine et la *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*L*-valine, dont la déprotection finale de son groupement Boc a conduit à l'amine précurseur **227** avec un très bon rendement de 90% (Schéma 205, **A**).

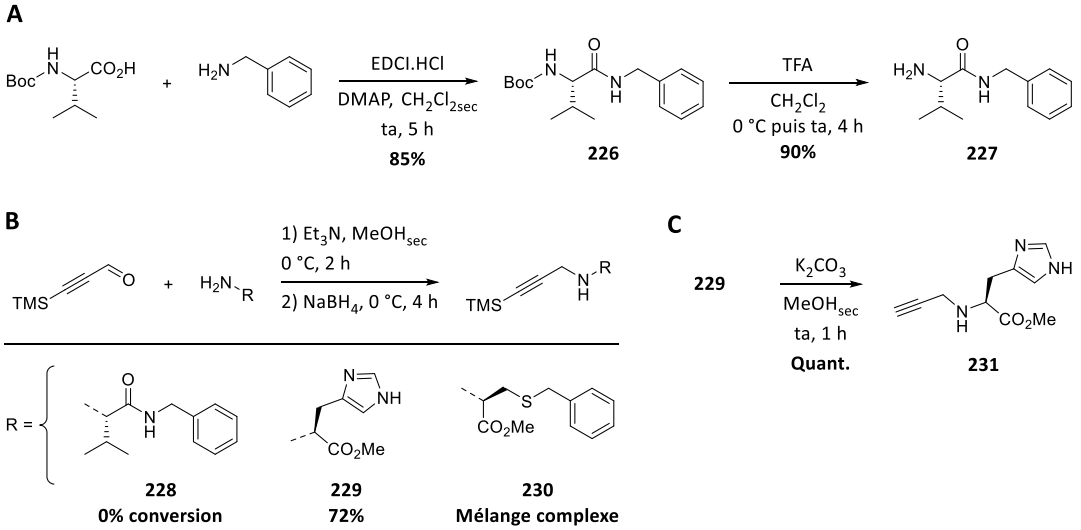


*Schéma 205. (**A**) Synthèse du précurseur amine **227**. (**B**) Préparations de précurseurs d'alcynes terminaux dérivés d'acides aminés par réaction d'amination réductrice. (**C**) Synthèse de l'alcyne terminal **231** par déprotection du groupement TMS.*

La réaction d'amination réductrice entre le 3-(triméthylsilyl)-2-propynal et trois précurseurs amines a ensuite été plus mitigée en terme de résultats (Schéma 205, **B**).[521] En effet, seul le composé **229** a pu être obtenu avec un bon rendement de 72%. Aucune

[521] O'Toole, T. M.; Graham, K. J.; Jones, N. *Tet. Lett.* **2017**, *58*, 1230−1232

conversion n'a pu être observée lors de la tentative de formation de l'alcyne **228** et un mélange complexe a été obtenu dans le cas du composé **230**.

Finalement, la déprotection du précurseur **229** de son groupement TMS a conduit quantitativement à l'alcyne terminal **231** dérivé de l'histidine (Schéma 205, **C**).

La coordination naturelle de l'ion Zn^{2+} catalytique au sein de l'enzyme par ses trois résidus d'histidines (His93, His95 et His118) a guidé le choix de la préparation du partenaire **231**. En effet, la possible coordination du cycle imidazole de ce partenaire alcyne avec l'ion Zn^{2+} pourrait aboutir à l'emploi de cette fonction selon un processus « bio-inspiré » et permettrait de remplacer la traditionnelle fonction sulfonamide tout en augmentant l'espace chimique à explorer (Figure 106).

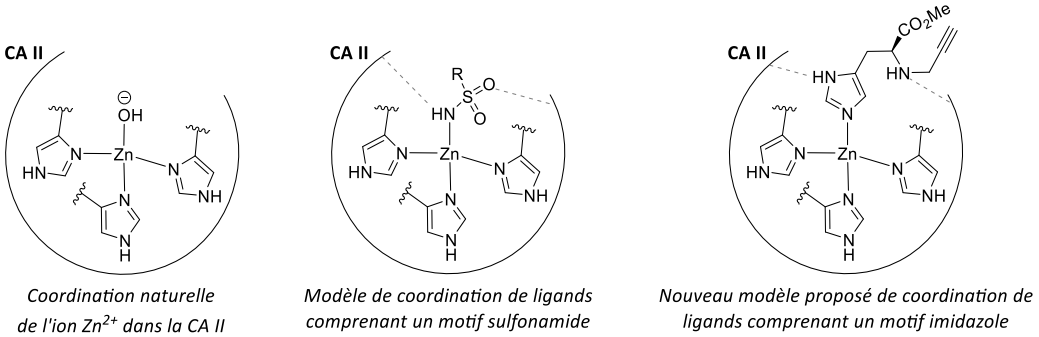


*Figure 106. Comparaison des modèles de coordination de l'ion Zn^{2+} catalytique avec l'anion hydroxide (forme native), des ligands comprenant des motifs sulfonamide, et le motif proposé imidazole **231**.*

Parallèlement, le partenaire **232** a pu être préparé avec 87% de rendement *via* une simple réaction d'éthérification de Williamson entre le bromure de propargyle et la 7-hydroxycoumarine (Schéma 206).[522]

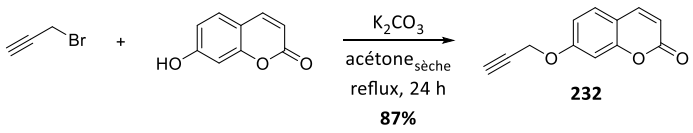
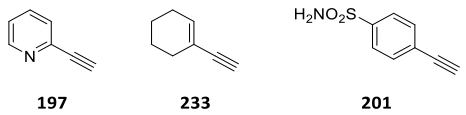


*Schéma 206. Préparation du partenaire **232** par réaction de Williamson.*

Enfin, deux alcynes commerciaux **197** et **233** ont aussi été sélectionnés, au même titre que l'alcyne de référence **201** dont la synthèse a été présentée un peu plus tôt (Figure 107).

[522] Pal, K. B.; Mahanti, M.; Huang, X.; Persson, S.; Sundin, A. P.; Zetterberg, F. R.; Oredsson, S.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 6295–6305.



197 **233** **201**

*Figure 107. Structure des alcynes commerciaux **197** et **233** et de référence **201** sélectionnés.*

2.4.2. Optimisation de la réaction de thiol-yne pour la préparation des références synthétiques

Afin de gagner en rapidité et en efficacité, il a été décidé de mener le criblage de manière séquentielle, en effectuant les tâches dans l'ordre suivant (Schéma 207, **A**) : 1) synthèse des références chimiques avec obtentions des bruts réactionnels ; 2) contrôle de la présence des produits ciblés puis optimisation des méthodes analytiques (LC-MS et transitions MRM) à partir des bruts réactionnels ; 3) lancement des expériences de KTGS en tests binaires.

Concernant la préparation des composés de référence, une méthodologie de synthèse permettant la préparation de différents isomères potentiellement formés lors des expériences de KTGS a donc été recherchée. Les premiers essais de réactions de thiol-yne entre le thiol de référence **44** et l'alcyne terminal non-activé **218** *via* l'emploi de catalyseurs métalliques se sont révélés infructueux car aucune conversion en produit souhaité n'a pu être détectée (Schéma 207, **B**).[482] En effet, la présence des fonctions sulfonamide et thiol a très probablement inhibé l'activité catalytique de ces différents catalyseurs et a donc empêché la formation des composés visés. Par ailleurs, il est à noter que les méthodes d'activation par voie radicalaire (DPAP, AIBN…) mentionnées précédemment n'ont pas été utilisées, car elles ne permettent pas d'accéder à la formation des éthers de thiovinyles de type MK.

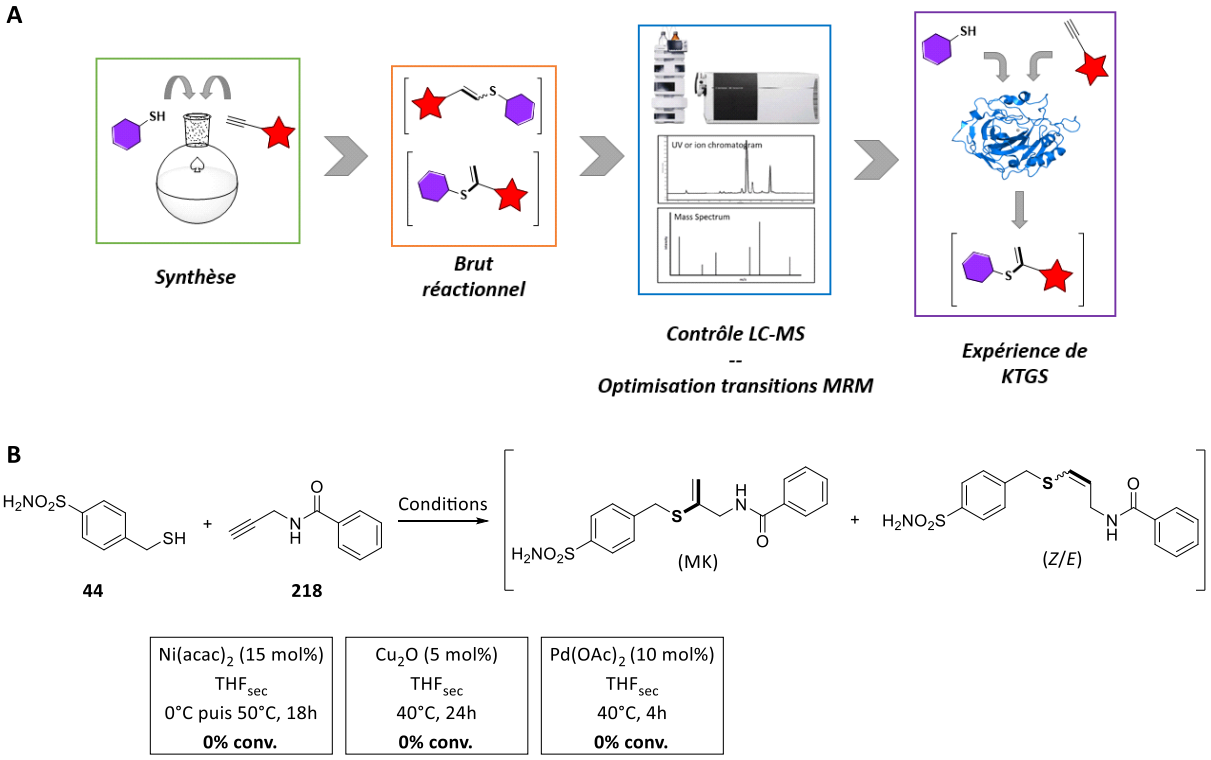


*Schéma 207. (**A**) Principe de la méthode de criblage rapide appliquée à la KTGS. (**B**) Recherche de conditions expérimentales permettant la formation des références moléculaires par chimie combinatoire.*

Face à la nécessité d'obtenir les références synthétiques comportant à la fois les isomères de types MK et AMK (voire les isomères de configuration *Z* et *E*) en prévision des criblages par KTGS, une méthodologie de préparation de ces composés a donc été entreprise en conditions basiques afin de contourner l'emploi de catalyseurs métalliques, peu adaptés à nos structures chélatantes.

Les références moléculaires **234** et **235** ont donc été obtenues avec des rendements globaux de 40% et 87% (mélanges d'isomères *Z* et *E*) par réaction du thiol **44** avec respectivement la 2-éthynylpyridine **197** et la 7-éthynylcoumarine **225** en présence de DBU (Schéma 208).

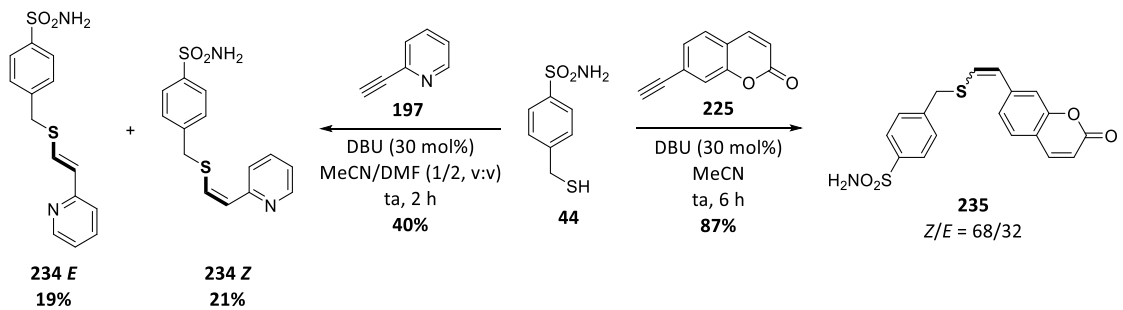


*Schéma 208. Préparation des références chimiques **234** et **235**.*

Il est à noter que l'isomère *Z* est majoritairement formé dans les deux cas, ce qui est cohérent avec les exemples de formation d'éthers de thiovinyle en milieux polaires recensés dans la littérature. Concernant les isomères **234** ***Z*** et **234** ***E***, ces derniers ont pu être isolés séparément par collecte de deux fractions pures sur trois, ce qui explique les faibles rendements finaux obtenus en produits purs, et l'obtention d'un ratio *Z*/*E* apparent d'environ 1 (contre 67/33 dans le brut réactionnel). De leurs côtés, les isomères du composés **235** ont été isolés sous la forme d'un mélange inséparable (*Z*/*E* = 68/32).

Concernant les alcynes aliphatiques et/ou peu activés, une première tentative de réaction entre le thiol de référence **44** et l'alcyne **218** en présence de DBU dans l'acétonitrile a permis l'observation de 7% de conversion en isomères souhaités MK/*Z*/*E* (1/0,73/0), ce qui est un bon point de départ pour une optimisation des conditions (Schéma 209, **A,** *Conditions A*). Ensuite, une activation thermique (100 °C, irradiations aux micro-ondes) dans un milieu réactionnel similaire a été réalisée afin d'étudier son impact sur la vitesse de conversion. Cette fois, une conversion de 30% (MK/*Z*/*E*, 1/1/0) a été obtenue, ce qui a indiqué l'importance du chauffage pour l'augmentation de la réactivité (Schéma 209, **A,** *Conditions B*). Parallèlement à ces essais dans l'acétonitrile, l'emploi d'un solvant polaire protique, l'*i*-PrOH, à température ambiante a conduit à une conversion de 12% (MK/Z/*E*, 0,9/1/0), ce qui a mis en évidence un effet bénéfique, même faible, de la proticité du milieu lors de la réaction (Schéma 209, **A,** *Conditions C*). En effet, le caractère à la fois polaire et protique de ce solvant permet probablement l'augmentation de la réactivité des fonctions, mais également la stabilisation des intermédiaires anioniques et leur rapide protonation. Ces premiers tests ont finalement conduit à une optimisation des conditions expérimentales qui était nécessaire afin d'obtenir les références synthétiques en quantités suffisantes. Cette optimisation a été réalisée en employant le benzylmercaptan commercial comme thiol modèle afin d'économiser le thiol de référence **44** car il requière plusieurs étapes de synthèse. Une méthode relativement simple d'obtention des différents isomères possiblement formés au sein de l'enzyme a donc été trouvée avec une conversion maximum de 76% (MK/*Z*/*E*, 0,69/1/0,06), ce qui est largement suffisant pour les analyses des bruts réactionnels et les optimisations des paramètres analytiques par LC-MS/MRM (Schéma 209, **B**).

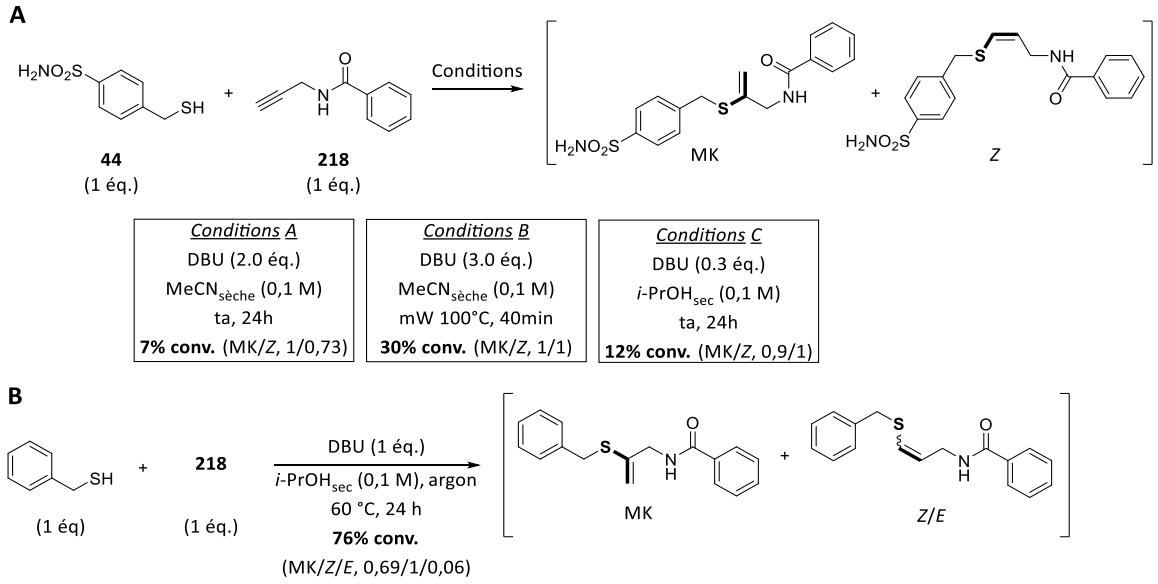


*Schéma 209. (**A**) Tests d'optimisation de la réaction de thiol-yne en présence de DBU. (**B**) Résultat optimisé de la réaction de thiol-yne promue par le DBU.*

Lors de cette étude, la dimérisation complète du phénylméthanethiol résiduel est apparue comme étant potentiellement un des facteurs limitants lors de la réaction. Ceci a d'ailleurs été confirmé *via* l'obtention de manière quantitative du pont disulfure **236** en l'absence d'un alcyne (Schéma 210, **A**).

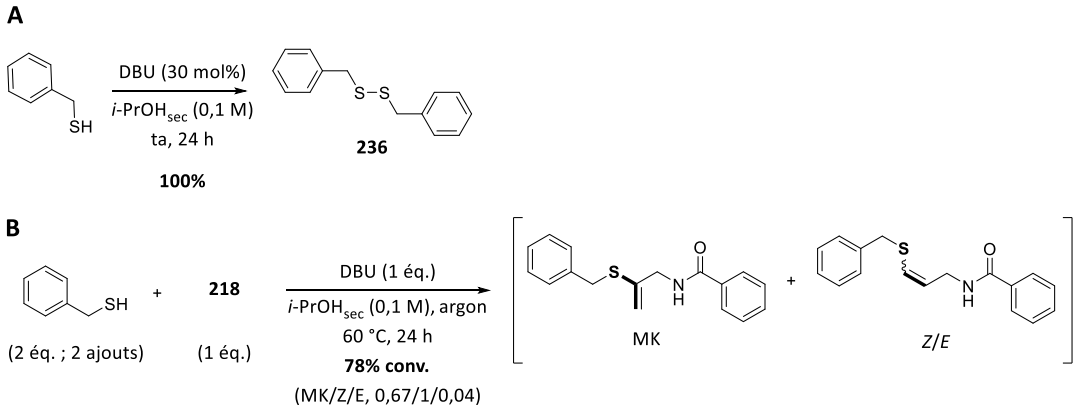


*Schéma 210. (**A**) Dimérisation du benzylmercaptan en conditions basiques. (**B**) Étude de l'influence d'un excès de thiol en deux ajouts sur les conditions optimisées.*

Pour limiter les effets de cette réaction secondaire, il a été envisager d'utiliser un excès de thiol. L'introduction en deux temps de deux équivalents de benzylmercaptan n'a cependant pas permis d'améliorer la conversion du partenaire alcyne terminal et n'a pas non plus significativement modifié les ratios d'isomères par rapport aux conditions optimisées (Schéma 210, **B**). Ce résultat n'a donc pas permis d'expliquer la raison pour laquelle des conversions incomplètes des réactifs ont pu être observées lors des optimisations réactionnelles.

2.4.3. Criblage de KTGS par la réaction de thiol-yne

Le criblage par la réaction de thiol-yne en KTGS a finalement été entrepris à l'aide de la *b*CA II. Afin de maximiser les chances de succès, des conditions expérimentales tout à fait similaires à celles rencontrées dans la littérature et employées précédemment lors du contrôle de viabilité de la cible ont donc été choisies (Schéma 211).[481,104] De même, les expériences de contrôle (« Blanc » et « ATZ ») dans les mêmes conditions ont été menées en parallèle des expériences de KTGS « réelles » (*« Enzyme »*) afin de vérifier que la réaction soit : 1) spécifiquement promue par la *b*CA II et 2) que la formation du ligand ait bien lieu au sein du site actif de l'enzyme. Dans le cas des thiols non-commerciaux (**44** et **213**), ces derniers ont été déprotégés de leur forme thiocarbonate puis purifiés le jour même, juste avant d'être engagés dans les réactions de thiol-yne et/ou des expériences de KTGS. La pureté des thiols commerciaux a quant à elle été contrôlée avant de débuter les expériences de KTGS. Afin d'éliminer toute potentielle photoactivation et donc formation parasite de ligands selon une voie radicalaire, les expériences ont été menées dans l'obscurité par incubation dans un four thermostaté à 37 °C et dans des Eppendorfs noirs (opacité de 100%).

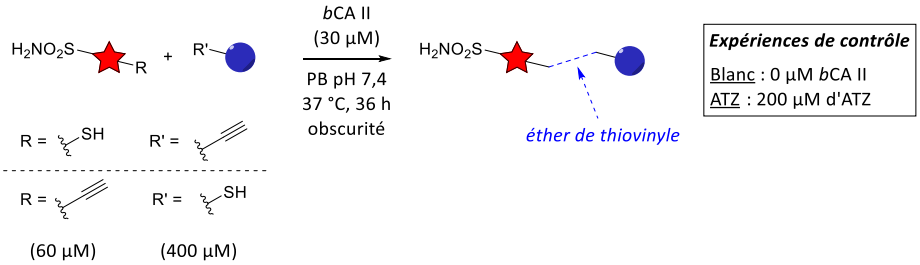
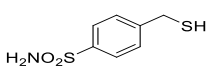
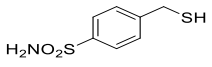
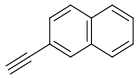
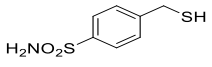
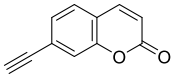
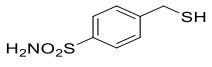
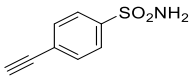
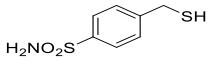
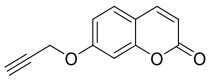
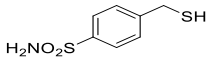
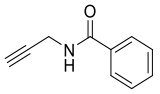
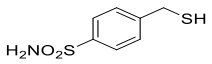
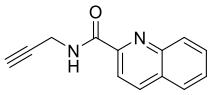
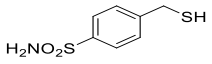
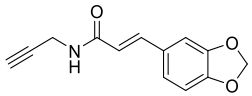
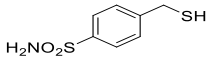
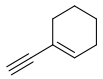
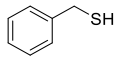
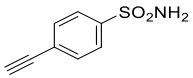
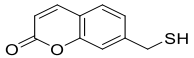
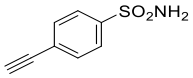
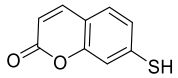
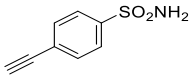
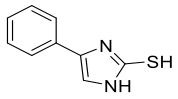
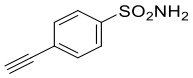
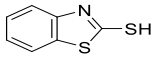
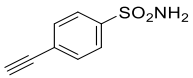
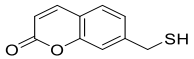
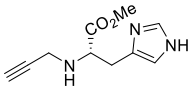


Schéma 211. Conditions expérimentales du criblage de KTGS par la réaction de thiol-yne et des expériences de contrôle.

Le tableau suivant regroupe les différentes combinaisons de thiols et d'alcynes terminaux qui ont pu être testées dans un premier temps par synthèse des références chimiques, puis par expérience de KTGS suivant le format présenté dans le schéma 207 **A** ci-dessus (Tableau 16).

Entrée	Thiols	Alcynes	Synthèse et détection des références synthétiques	Détection de hit par KTGS
1			• Synthèse : Méthode B • Détection des produits par RMN et/ou LC-MS : oui • Transition LC-MS/MRM (ESI+) : *m/z* 307,1 → 136,1	Négatif
2			• Synthèse : Méthode A • Détection des produits par RMN et/ou LC-MS : oui • Transition LC-MS/MRM (ESI+) : *m/z* 356,1 → 275,1	Négatif
3			• Synthèse : Méthode B • Détection des produits par RMN et/ou LC-MS : oui • Transition LC-MS/MRM (ESI+) : *m/z* 374.4 → 357.1	**Positif**
4			• Synthèse : Méthode A • Détection des produits par RMN et/ou LC-MS : oui • Transition LC-MS/MRM (ESI-) : *m/z* 383,1 → 212,9	Négatif
5			• Synthèse : Méthode A • Détection des produits par RMN et/ou LC-MS : oui • Transition LC-MS/MRM (ESI+) : *m/z* 404,1 → 387,1	Négatif
6			• Synthèse : Méthode A • Détection des produits par RMN et/ou LC-MS : oui • Transition LC-MS/MRM (ESI+) : *m/z* 363,1 → 242,1	Négatif

7			• Synthèse : Méthode A • Détection des produits par RMN et/ou LC-MS : oui • Transition LC-MS/MRM (ESI+) : *m/z* 414,3 → 185,1	Négatif
8			• Synthèse : Méthode A • Détection des produits par RMN et/ou LC-MS : oui • Transition LC-MS/MRM (ESI-) : *m/z* 431,1 → 340,1	Négatif
9			• Synthèse : Méthode A • Détection des produits par RMN et/ou LC-MS : non • Transition LC-MS/MRM : non	Non testé
10			• Synthèse : Méthode A • Détection des produits par RMN et/ou LC-MS : oui • Transition LC-MS/MRM (ESI+) : *m/z* 295,1 → 261,1	Négatif
11			• Synthèse : Méthode A • Détection des produits par RMN et/ou LC-MS : non • Transition LC-MS/MRM : non	Non testé
12			• Synthèse : Méthode A ; **Produit instable (oxydation)** • Détection des produits par RMN et/ou LC-MS : non • Transition LC-MS/MRM (ESI+ et ESI-) : non	Non testé

13			• Synthèse : Méthode A • Détection des produits par RMN et/ou LC-MS : oui • Transition LC-MS/MRM (ESI+) : *m/z* 358,1 → 277,1	Négatif
14			• Synthèse : Méthode A • Détection des produits par RMN et/ou LC-MS : oui • Transition LC-MS/MRM (ESI+) : *m/z* 349,1 → 268,1	Négatif
15			• Synthèse : Méthode A • Détection des produits par RMN et/ou LC-MS : non • Transition LC-MS/MRM : non	Non testé

Méthode A : DBU (1 éq.), *i*-PrOH, 60 °C, 24 h.
Méthode B : DBU (0,3 éq.), MeCN, ta, 2 à 3 h.

Tableau 16. Résultats obtenus suivant les différentes combinaisons de partenaires thiols et alcynes terminaux testées.

En premier lieu, des combinaisons entre le thiol de référence **44** et différents alcynes aromatiques (Entrées 1 à 4, Tableau 16) ou aliphatiques (Entrées 5 à 9, Tableau 16) ont été imaginées. De manières analogues, diverses combinaisons employant l'alcyne de référence **201** en présence de différents thiols aliphatiques (Entrées 10 et 11, Tableau 16) et aromatiques (Entrées 12 à 14, Tableau 16) ont également été prévues. Finalement, une combinaison permettant de tester la modification de la fonction chélatante de l'ion Zn^{2+} par la fonction imidazole de l'alcyne **231** a été imaginée (Entrée 15, Tableau 16).

Sur les 15 combinaisons initialement prévues, 11 ont pu être conduites en KTGS après l'obtention des références synthétiques. Parmi elles, seule la combinaison du thiol de référence **44** et de la 7-éthynylcoumarine **225** a permis l'obtention d'un résultat positif en présence de la cible biologique (Entrée 4, Tableau 16). En effet, la comparaison des aires des signaux obtenus lors des analyses par LC-MS/MRM des différentes expériences (Blanc, ATZ et Enzyme) ont permis de confirmer l'accélération cinétique de la formation d'un des deux isomères par la *b*CA II (Figure 108). Concernant l'expérience de contrôle « ATZ », la quantité de ligand formée est nettement supérieure à celle présente dans l'expérience « Blanc », ce qui semble indiquer que le site actif de l'enzyme n'était pas totalement saturé par les molécules d'ATZ en raison d'une concentration visiblement insuffisamment élevée. Cet effet avait pu également être observé lors de l'étude de viabilité de la *b*CA II grâce à la réaction click de référence (Figure 103). Cependant, l'accélération cinétique dans l'expérience « Enzyme » est tout à fait nette par rapport à celles de contrôle et permet de confirmer le hit sans ambiguïté.

Par ailleurs, la comparaison avec les analyses de la référence synthétique **235** (« Référence ») a permis d'établir que l'isomère de géométrie *Z* a été très majoritairement formé dans l'ensemble de ces expériences. Il est à noter qu'une étude de fragmentation a permis d'établir que l'isomère *E* se fragmentait moins facilement que son analogue *Z* suivant la transition *m/z* 374,1 → 357,1 et qu'un facteur correctif (× 2) devait être appliqué à son aire MRM mesurée afin, d'obtenir une valeur corrigée cohérente.

L'isomère *Z*, qui d'après les résultats obtenus lors de sa préparation sans la cible biologique semble être le composé cinétique (obtenu à température ambiante et en milieu polaire protique), parait donc être également formé de manière préférentielle par la *b*CA II

d'après les analyses LC-MS (Figure 108). Ceci expliquerait l'apparente sélectivité pour cet isomère lors de sa formation au sein de la cible qui permet un contrôle cinétique de la réaction. Cependant, les états de transitions dans un solvant et dans une protéine peuvent être très différents du point de vue des énergies d'activation et/ou des chemins réactionnels. Afin de mieux appréhender ce système, des calculs DFT des énergies d'activation pour la formation de l'isomère *Z* et *E* dans l'enzyme ainsi que le calcul des énergies de stabilisation des complexes *b*CA II-isomère *Z* et *b*CA II-isomère *E* seraient nécessaires.

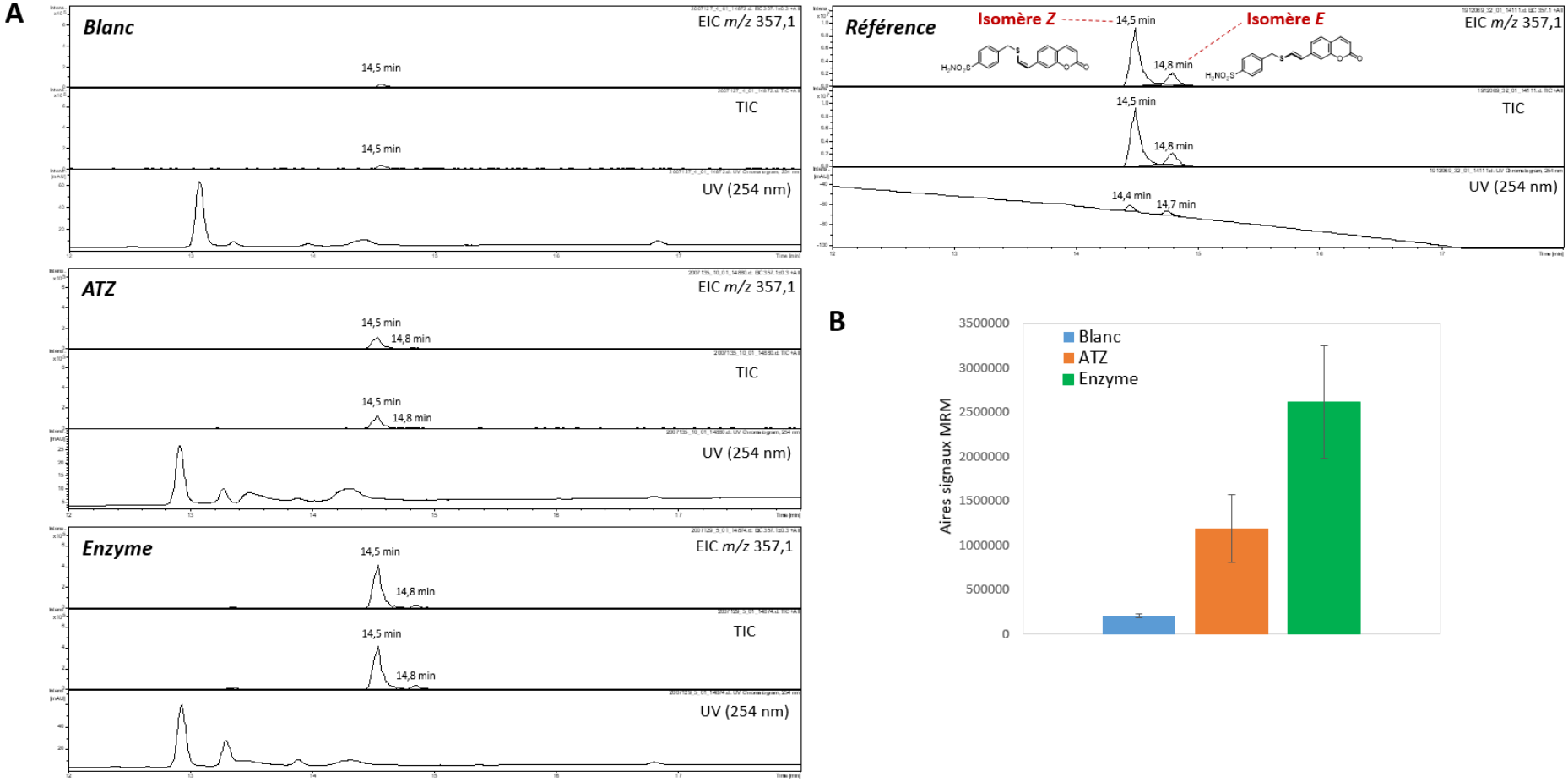


*Figure 108. (**A**) Résultats des analyses par LC-MS des trois types de réactions (**B**) Aires des signaux obtenus en transitions MRM (EIC m/z 357,1) pour les trois expériences réalisées en triplicats indépendants (les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types des trois résultats indépendants obtenus pour chaque type de réaction).*

En support de ce premier criblage et des différentes expériences (KTGS et contrôles), il a été décidé de vérifier l'influence de la fonction sulfonamide sur la capacité de la *b*CA II à promouvoir cette réaction. Ainsi, le composé **237** qui ne possède pas de fonction sulfonamide a été préparé en suivant les mêmes conditions que le ligand **237** et le produit brut a été obtenu avec un ratio *Z*/*E* = 57/43 (Schéma 212).

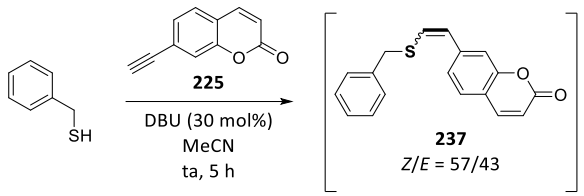


*Schéma 212. Préparation de l'éther de thiovinyle **237**.*

Une fois cette référence synthétique à disposition, les expériences de KTGS (« Blanc », « ATZ » et « Enzyme ») ont été réalisées à l'aide de ces deux réactifs et dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (Tableau 17).

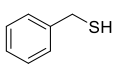
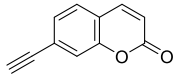
		• Synthèse : Méthode B • Détection des produits par RMN et/ou LC-MS : oui • Transition LC-MS/MRM (ESI+) : *m/z* 295,1 → 261,1	Négatif

*Tableau 17. Résultat de l'expérience de KTGS entre le benzylmercaptan et l'alcyne **225**.*

Finalement, aucune accélération cinétique de la formation du composé **237** n'a pu être observée avec ces deux ligands grâce à la *b*CA II. Il est donc clairement mis en évidence que la présence de la fonction sulfonamide sur l'un des deux réactifs est indispensable afin d'assurer la mise promiscuité des fonctions thiol et alcyne au sein du site actif et donc de promouvoir la réaction *in situ*. En effet, l'affinité de cette fonction pour l'ion Zn^{2+} situé au fond du site actif permet l'ancrage non-covalent d'un des fragments à la cible et augmente significativement son temps de séjour au sein de cette dernière. Ceci augmente fortement la probabilité de rencontre avec le deuxième réactif, si celui-ci présente une certaine affinité avec la région située vers la sortie du site actif. D'autre part, il est important de rappeler que les deux

fonctions réactives, thiols et alcyne, doivent être convenablement positionnées l'une par rapport à l'autre en termes de distance et de géométrie d'approche pour pouvoir réagir.

Par ailleurs, afin de vérifier la robustesse de l'approche et de manière analogue aux travaux du Pr. Ovaa,[515] la réactivité non-spécifique de la 7-éthynylcoumarine **225** en présence d'une concentration plus importante de biothiols (2 mM) a été évaluée dans le but de confirmer l'effet *template* observé en présence de l'enzyme (Schéma 213). Ainsi, l'alcyne **225** a été incubé en présence d'un excès de GSH (5 éq.) dans des concentrations nettement plus concentrées que celles utilisées en KTGS. Après 48 heures, aucune réaction de thiol-yne n'a pu être observée par analyse HPLC du milieu réactionnel. Cette expérience de contrôle a donc confirmé que l'effet de promiscuité fourni par la cible biologique a bel et bien promu la réaction en le thiol référence **44** et de la 7-éthynylcoumarine **225**.

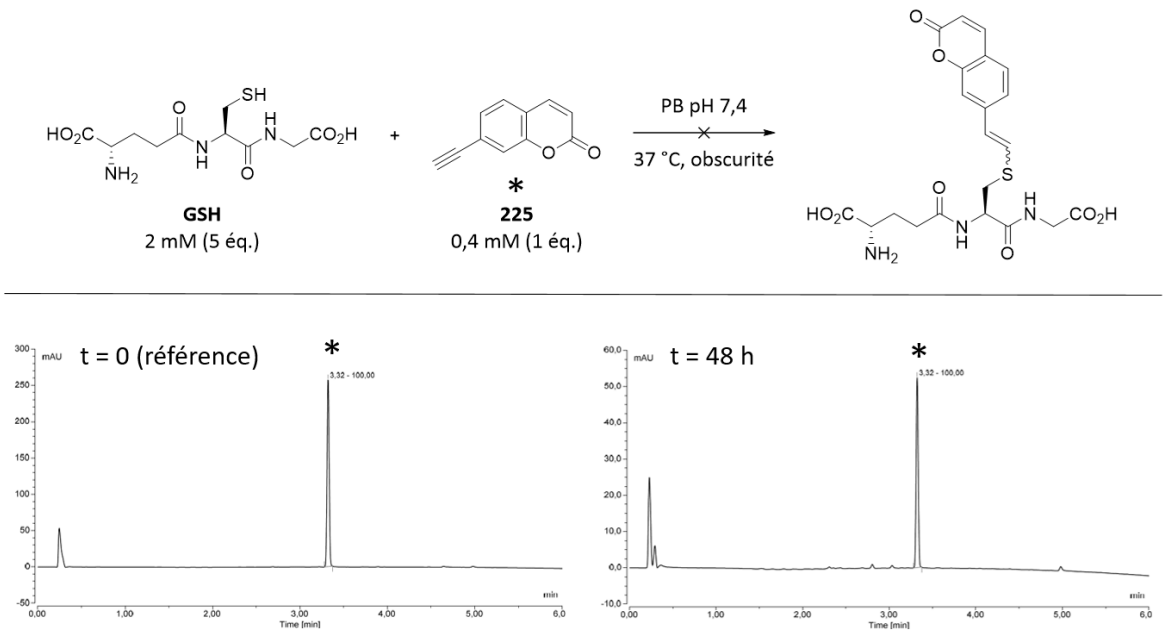


*Schéma 213. Étude la réactivité non-spécifique de la 7-éthynylcoumarine **225** en présence de GSH ($\lambda_{détection}$ = 254 nm).*

Suite à la découverte de ce nouveau type de ligand de la *b*CA II par KTGS, il a été décidé d'évaluer la stabilité en conditions physiologiques de ce composé et également d'étudier l'importance du lien éther de thiovinyle vis-à-vis des propriétés biologiques.

2.4.4. Étude de stabilité en milieux physiologique des ligands de KTGS et d'un analogue thioéther

Les liens éthers de thiovinyle formés lors de travaux en bioconjugaison ont été décrit comme totalement stables en milieux physiologiques et y compris lors de digestions trypsiques.[505] Ces paramètres de stabilité chimique et de non-réversibilité de la réaction sont effectivement très importants en KTGS, comme cela a pu déjà être mentionné au cours du chapitre II, notamment afin d'éviter les faux-négatifs.

Afin d'évaluer la stabilité du ligand **235** (*Z*/*E* = 69/31) en conditions physiologiques, et notamment en présence de biothiols intracellulaires (Cys et Hcy ~10^2 µM et GSH ~mM),[523] ce dernier a été incubé en présence d'un excès de NAC comme premier exemple de biothiol pendant quatre jours et demi selon les conditions présentées ci-dessous (Schéma 214).

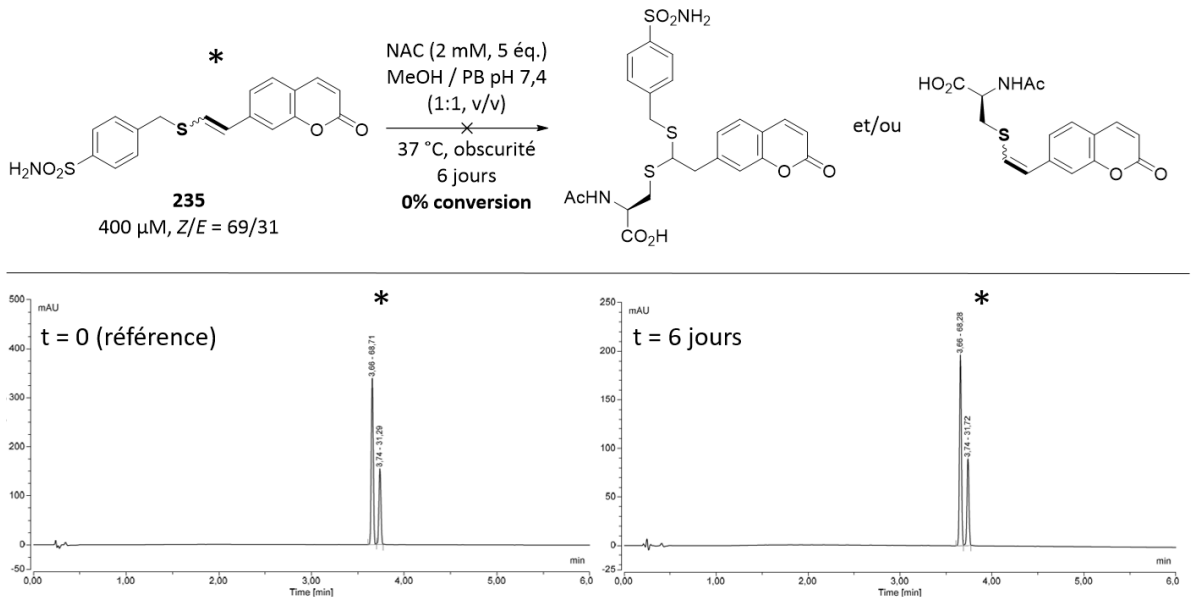


Schéma 214. Étude de la stabilité du lien éther de thiovinyle en conditions physiologiques avec un excès de NAC ($\lambda_{détection}$ = 330 nm).

Un premier produit résultant d'une addition de la NAC sur le ligand **235** avait été imaginé comme potentiellement observable au cours de cette expérience. Ce type de réaction avait pu être observé entre un alcyne terminal fonctionnalisé par un hétérocycle appauvri en électrons et l'acétyl-*L*-cystéinate de méthyle, en présence de DABCO dans le DMF, c'est-à-dire

[523] Li, S.-S.; Guan, Q.-Y.; Zheng, M.; Wang, Y.-Q.; Ye, D.; Kang, B.; Xu, J.-J.; Chen, H.-Y. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 7582–7587.

en conditions organiques plus dures que celles employées ici.[524] De plus, un second produit avait également été anticipé suivant un mécanisme d'addition de la NAC puis d'élimination du thiol **44**, se résumant à un échange de thiol. Lors de cette expérience, les analyses HPLC n'ont pas révélé la formation de nouveaux composés possédant des traces spectrales propres aux coumarines ($\lambda_{détection}$ = 330 nm), ce qui éliminé les deux hypothèses formulées ci-dessus.

Parallèlement, l'incubation en présence d'un excès de GSH (5 éq.) durant six jours et dans les mêmes conditions expérimentales du composé **235** (*Z*/*E* = 69/31) n'a pas permis d'observer une quelconque dégradation ou une addition de thiol comme observé précédemment avec la NAC.

Afin d'aller un peu plus loin dans cette étude de stabilité, le ligand **235** (*Z*/*E* ≈ 70/30) a été incubé dans du plasma sanguin humain à 37 °C et dans l'obscurité pendant trois jours (Schéma 215).

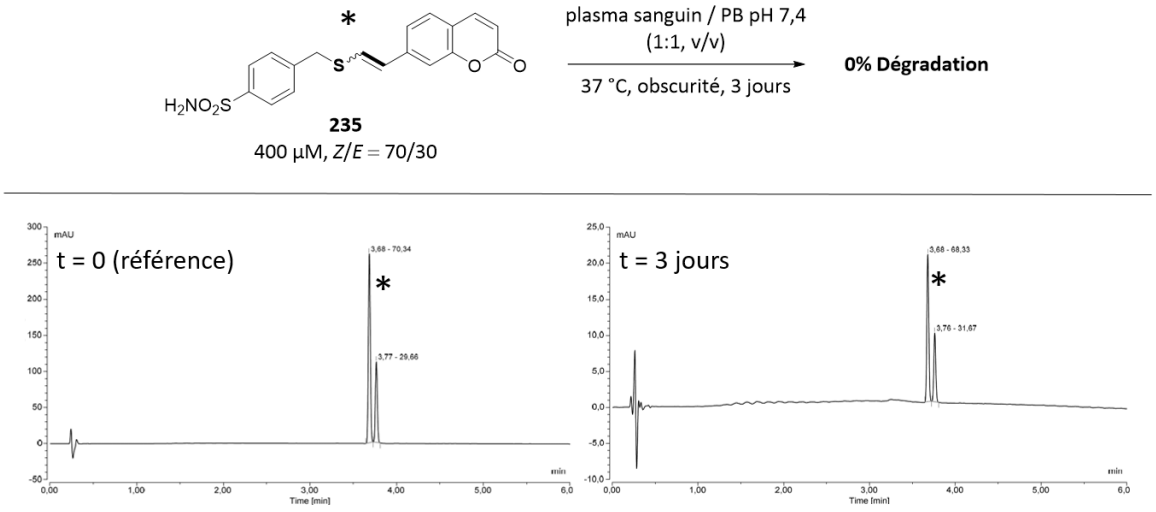


*Schéma 215. Étude de la stabilité du ligand **235** dans du plasma sanguin humain ($\lambda_{détection}$ = 350 nm).*

De manière très satisfaisante, aucune dégradation du composé n'a pu être observée, que ce soit pour une détection à λ = 350 nm ou à λ = 254 nm grâce au suivi des traces spectrales du motif coumarine. Des analyses complémentaires sreont cependant à effectuer afin de confirmer ces premiers résultats.

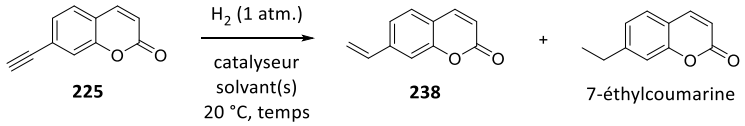
D'après ces premiers résultats, la réaction d'addition est donc dépendante de la structure du thiol. Ces résultats laissent présager la tendance suivante : les thiols faiblement

[524] Lebraud, H. *et al. Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 141–148.

encombrés comme celui de la NAC semblent pouvoir s'additionner sur le ligand dans des conditions physiologiques, bien que ce processus soit visiblement lent. En revanche, des thiols plus encombrés comme celui du GSH et des protéines ne semblent pas présenter de réactivité vis-à-vis du ligand. Des études complémentaires seront toutefois nécessaires pour confirmer cette tendance, car les valeurs de p*K*a des couples thiol/thiolate sont variables d'un biothiol à l'autre.[422]

Par analogie aux travaux du Pr. Rademann concernant le rôle des liens formés dans l'activité biologique,[131,139] il a donc été décidé d'étudier l'importance de la fonction éther de thiovinyle vis-à-vis de l'activité inhibitrice du ligand avec la *b*CA II. Pour cela, il a été choisi d'étudier un composé analogue du ligand découvert par KTGS et électroniquement saturé, c'est-à-dire comportant un motif thioéther structuralement bien plus flexible. La préparation de cet analogue **239** a donc débutée par une petite optimisation des conditions expérimentales de réduction de la fonction alcyne du fragment **225** en alcène **238** (Schéma 216, **A**). Afin d'effectuer cette hydrogénation pallado-catalysée, des premiers tests ont été effectués à l'aide de palladium sur sulfate de baryum (Pd-$BaSO_4$), mais malheureusement une réduction totale ou du moins très majoritaire de l'alcyne **225** en 7-éthylcoumarine a été observée. Le catalyseur de Lindlar (Pd/Pb-$CaCO_3$) a donc été employé afin de poursuivre cette optimisation. L'alcène **238** a pu être obtenu majoritairement (66/33) par rapport à la 7-éthylcoumarine grâce à ce catalyseur. Afin d'augmenter encore en sélectivité, il a été décidé de supprimer le caractère protique du solvant en échangeant le mélange MeOH/*i*-PrOH (1:1, v/v) par du THF. Dans ces conditions, le ratio **238**/7-éthylcoumarine est alors monté à 75/25 et avec une totale conversion de l'alcyne **225**. Afin d'accroitre encore davantage la proportion finale en alcène **238**, l'influence du temps de réaction a donc été étudié. Après 30 minutes, une conversion de 78% pour un ratio de 96/4 en faveur de l'alcène **238** a été obtenue. Finalement, le meilleur compromis entre conversion et ratio **238**/7-éthylcoumarine a été atteint pour 45 minutes de réaction. L'alcène **238** a pu être isolé mais il s'est montré relativement instable, même lors de son stockage à -25 °C. Ce dernier a donc été rapidement employé pour la préparation de l'analogue thioéther **239** et qui a été obtenu avec 16% de rendement (schéma 216, **B**).

A



Catalyseur	*Solvant(s)*	*temps*	*conversion*[a]	*ratio*[a] ***238***/*7-éthylcoumarine*
Pd/-$BaSO_4$	MeOH	2 h	100%	0/100
Pd/-$BaSO_4$	MeOH/*i*-PrOH (1:1)	2 h	100%	15/85
Pd/Pb-$CaCO_3$	MeOH/*i*-PrOH (1:1)	2,5 h	100%	66/33
Pd/Pb-$CaCO_3$	THF	1,5 h	100%	75/25
Pd/Pb-$CaCO_3$	THF	30 min	78%	96/4
Pd/Pb-$CaCO_3$	THF	45 min	100%	90/10

[a] Déterminés par RMN ^{1}H.

B

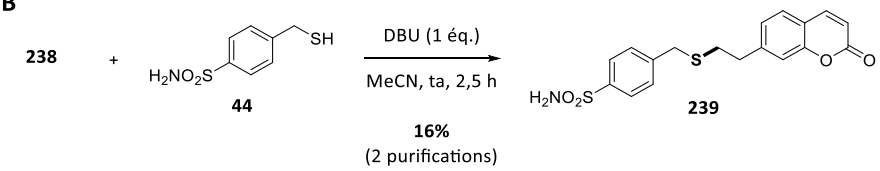


*Schéma 216. (**A**) Optimisation de la synthèse de l'alcène **238**. (**B**) Préparation de l'analogue saturé thioéther **239**.*

Afin de comparer la stabilité de l'analogue thioéther **239** avec celle du ligand thiovinyle éther **235**, ce dernier a également été incubé comme précédemment en présence de GSH (2 mM, 5 éq.) pendant trois jours dans l'obscurité et à 37 °C (Schéma 217). Aucune dégradation n'a pu être constatée dans ces conditions.

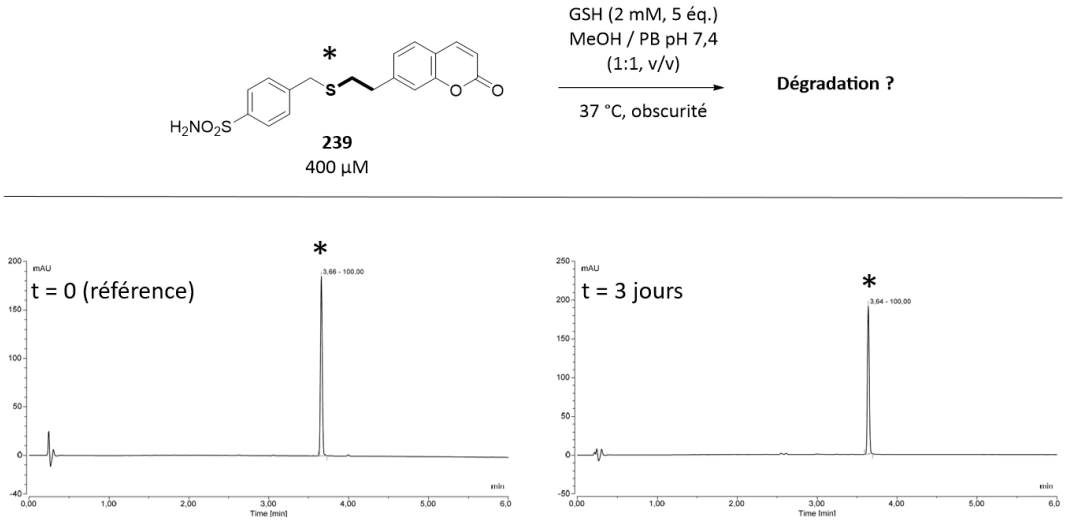


*Schéma 217. Étude de la stabilité du thioéther **239** en présence de GSH en conditions physiologiques ($\lambda_{détection}$ = 330 nm).*

Cependant, lors de l'incubation de cet analogue thioéther **239** dans du plasma sanguin humain, selon la même procédure que celle décrite précédemment, une dégradation du composé a pu être observée avec environ 6% de conversion (Schéma 218, **A**). L'analyse du milieu réactionnel par LC-MS a permis d'identifier le produit de dégradation, qui s'est avéré

être le sulfoxyde correspondant avec un signal MS à *m/z* 392,1 $[M+H]^+$ (Schéma 218, **B**). Bien que cette oxydation soit relativement faible dans ces conditions biologiques, elle n'avait pas pu être observée avec le ligand **235**, très probablement grâce à la délocalisation électronique des doublets non-liants de l'atome de soufre vers le motif coumarine conjugué.

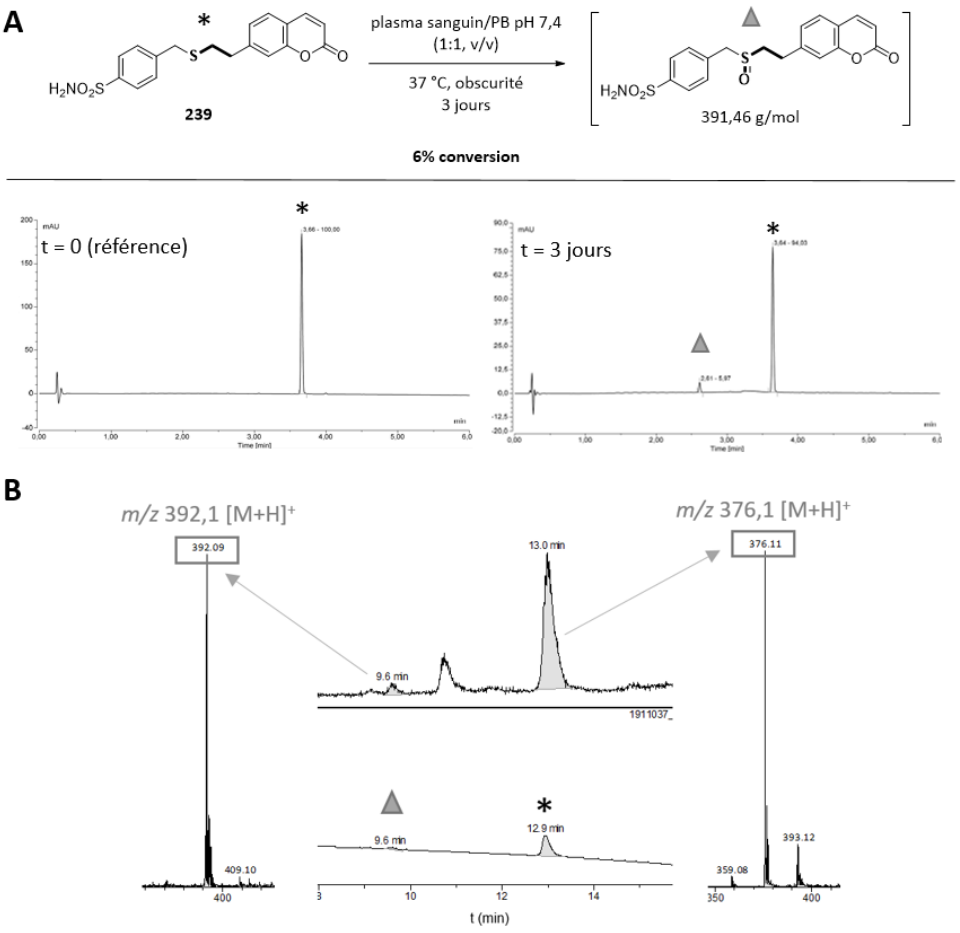


*Schéma 218. (**A**) Étude de la stabilité de l'analogue thioéther **239** dans le plasma sanguin humain (λ = 330 nm). (**B**) Analyse LC-MS du milieu réactionnel post-traitement ($\lambda_{détection}$ = 254 nm).*

2.4.5. Mesure des valeurs d'IC_{50}

Grâce au mode de fonctionnement de leur site actif et au mécanisme impliqué lors de l'hydratation du CO_2, les CA possèdent une certaine activité d'estérases, qui est cependant environ 10^5 fois inférieure à leur activité de lyases.[431] Cette propriété est particulièrement avantageuse afin de pouvoir mesurer l'activité biologique de ligands vis-à-vis de ces cibles, comme par exemple les IC_{50}. En effet, ces dernières sont souvent mesurées *via* la méthode de

Pocker et Stone grâce à l'acétate de 4-nitrophényle (PNPA) qui joue le rôle de substrat.[525] Le PNPA est incolore mais le 4-nitrophénolate (p*K*a 7,14) qui est produit lors de l'hydrolyse enzymatique présente une coloration jaune intense, qui permet un suivi de la vitesse d'hydrolyse par la cible biologique en mesurant l'absorbance du milieu à 348 nm (Schéma 219).

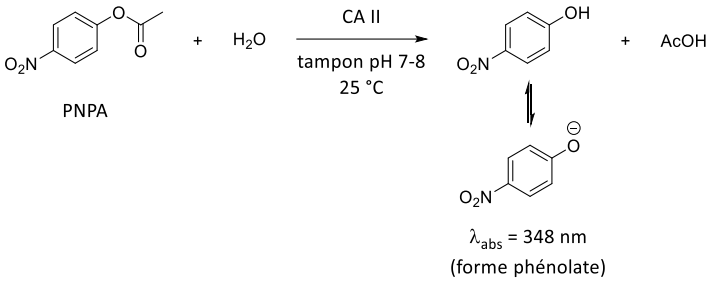


Schéma 219. Hydrolyse du PNPA par la CA II employée pour la mesure d'IC_{50} par la méthode de Pocker et Stone.

Afin de pouvoir les étudier plus en détails, les isomères *Z* et *E* du ligand **235** ont dû être séparés par chromatographie semi-préparative en phase inverse (Figure 109, **A**). Il est à noter qu'une très bonne corrélation a pu être trouvée entre les ratios *Z*/*E* mesurés par RMN ^{1}H et par HPLC (λ = 350 nm) (Figure 109, **B**).

[525] Pocker, Y.; Stone, J. T. *Biochemistry* **1967**, *6*, 668–678.

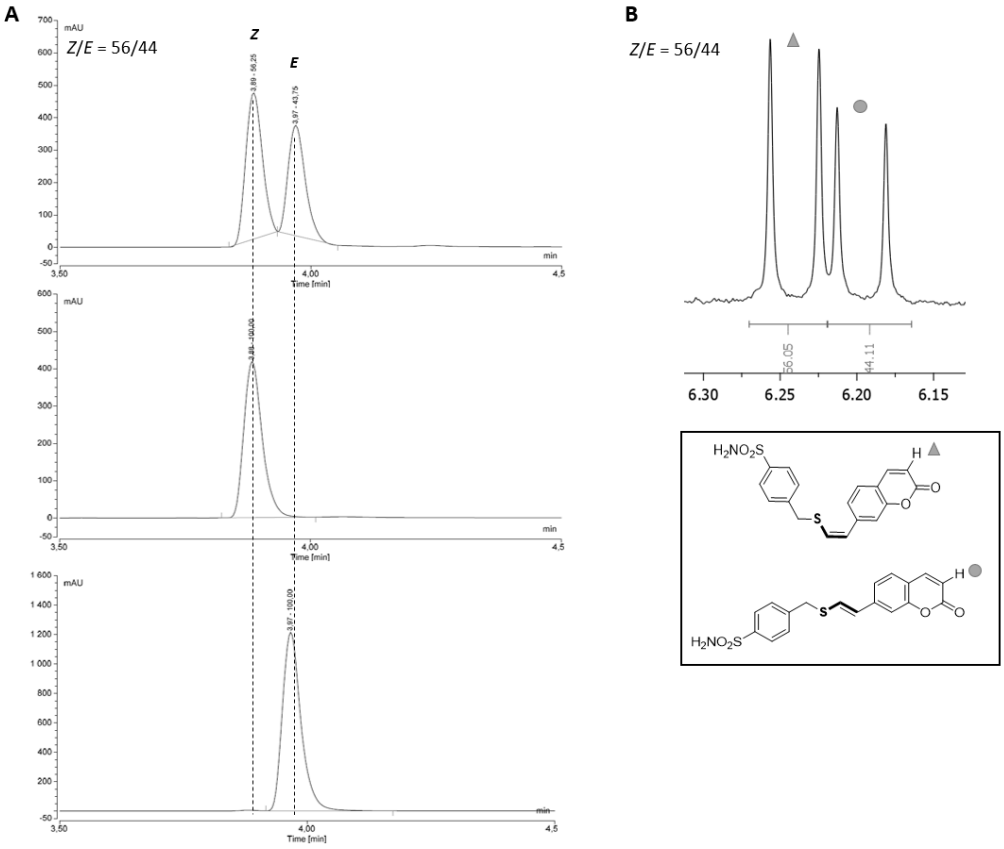


*Figure 109. (**A**) Chromatogrammes des isomères Z et E en mélange et séparés (λ = 350 nm). (**B**) Vérification des corrélations RMN ^{1}H (300 MHz, acetone-d_6) et HPLC ($\lambda_{détection}$ = 350 nm) pour le calcul des ratios Z/E.*

La méthode cinétique de Pocker et Stone, qui est relativement simple à mettre en œuvre, a donc été employée afin de mesurer les IC_{50} des divers ligands et réactifs étudiés afin de les comparer avec l'ATZ de référence (Figure 110).

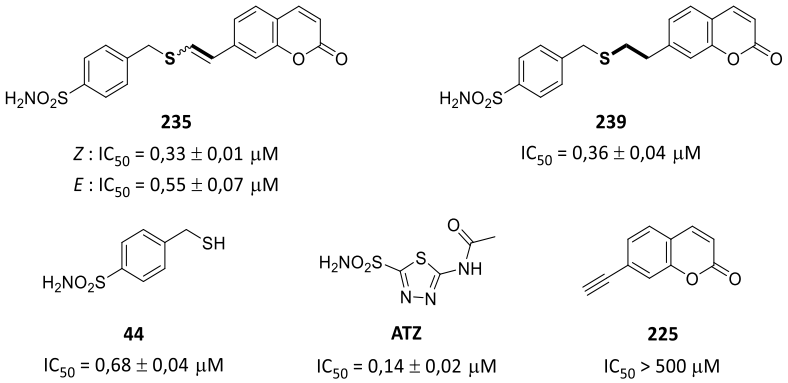


Figure 110. Valeurs des IC_{50} mesurées par la méthode de Pocker et Stone.

Ainsi, les isomères *Z* et *E* du ligand **235** ne possèdent pas de différence d'activité très significative, avec tout juste un rapport de deux en terme de valeurs d'IC_{50}, et se trouvent être de l'ordre de grandeur de celle de la référence, l'ATZ. Par ailleurs, même si l'alcyne **225** n'a

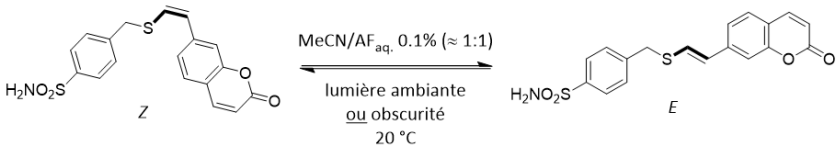
pas présenté de quelconque capacité à inhiber l'enzyme en dessous de 500 µM,[526] le partenaire thiol **44** présente une IC_{50} peu éloignée du ligand **235** mais ceci est suffisant pour constater un effet additif sur l'activité *via* la formation d'un lien covalent entre les partenaires **225** et **44**.

Parallèlement, il s'est avéré que le ligand aliphatique **239** possédait une activité tout à fait comparable à celles des ligands **235** *Z* et *E*, quoique plus proche du ligand *Z*. Ce résultat semble donc indiquer que soit la rigidité du lien éther de thiovinyle ne joue pas de rôle prépondérant vis-à-vis des interactions ligand-*b*CA II et n'influence donc pas l'activité des composés, ou bien que la flexibilité du lien thioéther permet au composé l'adoption d'une conformation proche de celle de l'isomère *Z* puisqu'ils ont des activités inhibitrices très proches.

Lors de la première tentative de séparation des isomères *Z* et *E* du ligand **235** par HPLC semi-préparative en phase inverse, un phénomène inattendu a pu être observé grâce au contrôle qualité des différentes fractions obtenues. En effet, une photoisomérisation du type *Z*→*E* a été constatée lorsque l'échantillon en solution (MeCN/AF 0,1% ≈ 1:1,v/v) était exposé à la lumière blanche de la pièce, contrairement à celui qui était conservé dans l'obscurité (Schéma 220). Après 14 heures d'exposition à la lumière blanche ambiante du laboratoire, un équilibre photo-stationnaire semble avoir été atteint avec environ 17% d'isomère *Z* contre 97% au départ (t = 0), ce qui conduit à une efficacité de photoisomérisation de 80%. En effet, ce pourcentage est atteint après 20 h d'exposition environs, et reste constant jusqu'au terme des 72 heures d'expérience. Au contraire, l'échantillon conservé en parallèle dans l'obscurité totale n'a pas permis l'observation de la moindre isomérisation, ce qui montre que la lumière est le facteur responsable de ce phénomène.

De plus, une émission de fluorescence a pu être observée par irradiation de ces échantillons sous la lampe UV (λ = 365 nm), ce qui nous a conduits à d'orienter la suite de ce projet vers l'étude des propriétés spectrales et de photoisomérisation de ces nouveaux composés.

[526] La faible solubilité du produit dans le tampon aqueux pour des concentrations > 500 µM n'a pas permis son étude pour de plus fortes concentrations.



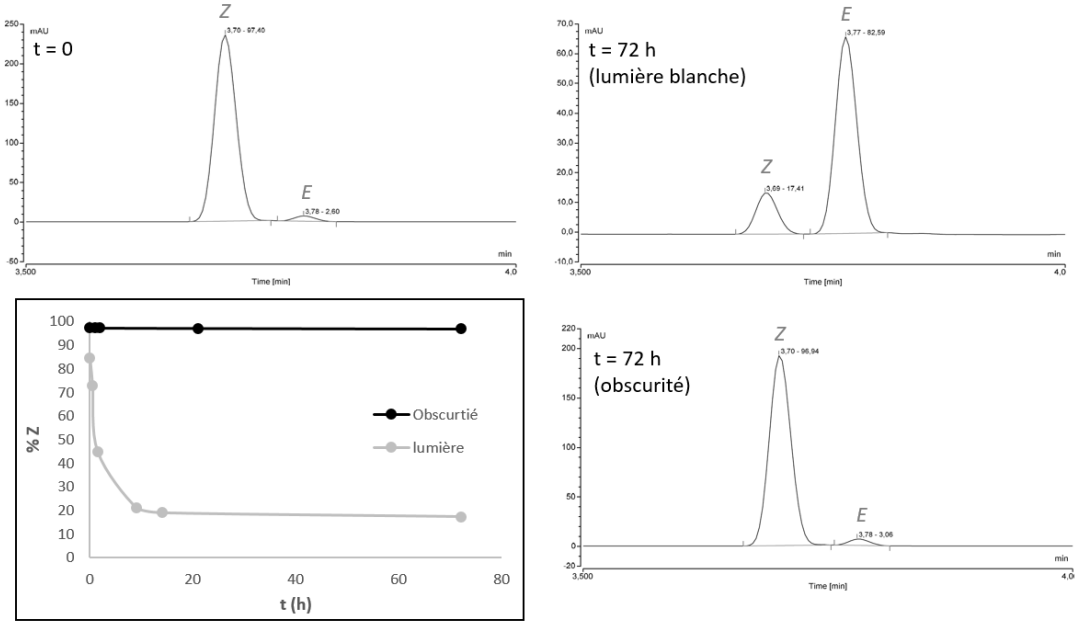


*Schéma 220. Première observation du phénomène de photoisomérisation Z→E du ligand **235** à la lumière blanche et suivis cinétiques ($\lambda_{détection}$ = 350 nm).*

III – Études des propriétés de photoisomérisation et de fluorescence des ligands de KTGS

3.1. La photoisomérisation

3.1.1. Définition et rappels

La photoisomérisation est un processus d'isomérisation qui est induit par une photoexcitation et peut être réversible ou non. Ces propriétés de photoisomérisation peuvent avoir des rôles biologiques très importants, comme par exemple dans le cas du rétinal (vitamine A) dont le mécanisme de photoisomérisation est directement impliqué dans la vision (Figure 111). En effet, en présence de la protéine rhodopsine et d'un flux lumineux incident, le *cis*-rétinal s'isomérise en *trans*-rétinal ce qui permet la transmission de l'information lumineuse vers le cerveau. Ensuite, une cascade enzymatique permet de reformer le *cis*-rétinal afin d'entamer un nouveau cycle de la vision.[527]

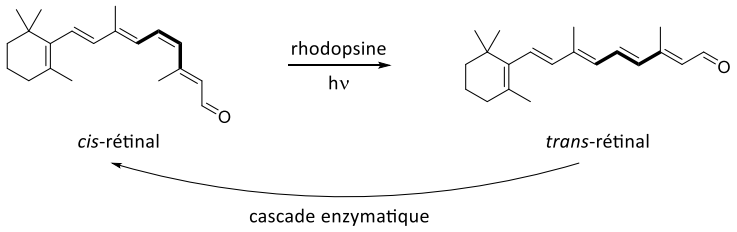


Figure 111. Mécanismes d'isomérisation du rétinal impliqués dans le cycle de la vision.

Les applications scientifiques pour ces composés photoisomérisables et souvent bio-inspirés sont très vastes et gagnent en intérêt d'année en année, particulièrement dans les domaines des machines moléculaires[528] et du design de composés à activités biologiques photo-contrôlables.[529] Le nombre annuel d'articles et de brevets comportant le terme « *photoisomerization* » a d'ailleurs augmenté de manière quasi-constante de 1980 à aujourd'hui comme le montre le graphique ci-dessous (Figure 112).[530]

[527] Moiseyev, G.; Chen, Y.; Takahashi, Y.; Wu, B. X.; Ma, J.-X. *PNAS,* **2005**, *102*, 12413–12418.

[528] Aprahamian, I. *ACS Cent. Sci.* **2020**. 6, 347–358.

[529] (a) Lerch, M. M.; Hansen, M. J.; van Dam, G. M.; Szymanski, W.; Feringa, B. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10978–10999. (b) Szymański, W.; Beierle, J. M.; Kistemaker, H. A. V.; Velema, W. A.; Feringa, B. L. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6114–6178. (c) Komarov, I. V.; Afonin, S.; Babii, O.; Schober, T.; Ulrich, A. S. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 11245–11254.

[530] Données extraites de SciFinder^n par recherche du terme « *photoisomerization* » entre 1980 et 2019.

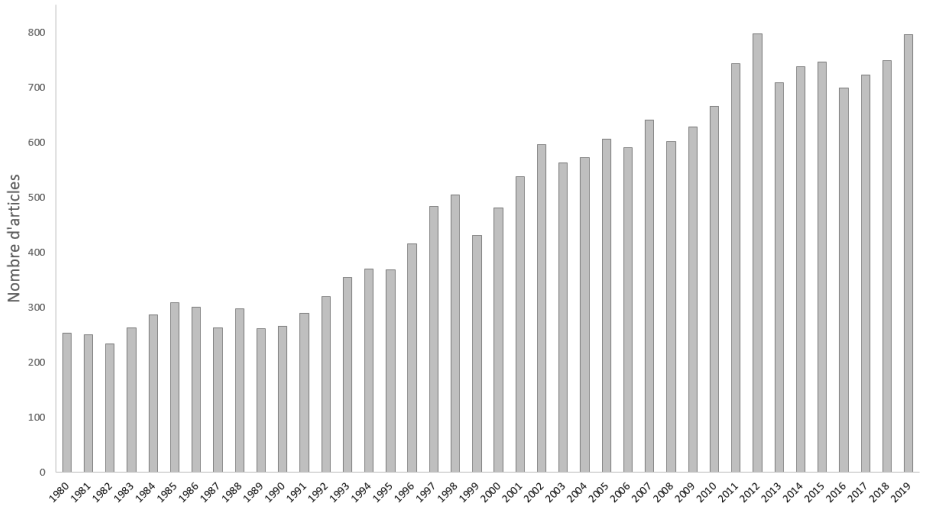


Figure 112. Nombre annuel d'articles et de brevet comportant le terme « photoisomerization *» entre 1980 et 2019.*[530]

3.1.2. Les principales fonctions chimiques photoisomérisables

Le nombre de fonctions chimiques possédant des propriétés de photoisomérisation est relativement restreint et se répartissent selon deux classes majoritaires, à savoir les réactions d'ouverture-fermeture de cycles et les conversions du type *cis*-*trans* (*Z*-*E*).

Pour la classe des composés à ouverture-fermeture de cycles, il existe principalement les familles des spiropyranes[531] et des diaryléthènes[532] (Schéma 221, **A**). Concernant la classe des isomérisations *cis*/*trans*, cette dernière se réparti sur trois grandes familles que sont les stilbènes[533], les azobenzènes[534] et les alcènes polysubstitués et activés[535] (Schéma 221, **B**). Dans certains cas rencontrés avec différentes familles, l'activation lumineuse ne permet pas d'isomériser un des isomères et une activation thermique est parfois nécessaire. Cette classe de photoisomérisation se rapprochant le plus des thiovinyles éthers obtenus en KTGS, quelques rappels théoriques simples vont être introduis à l'aide du cas des azobenzènes, qui est la classe de composés photoisomérisables la plus étudiée, et qui permettront d'étayer les résultats présentés plus loin dans ce chapitre.

---

[531] Kortekaas, L.; Browne, W. R. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 3406–3424.

[532] Waldeck, D. H. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 415–436.

[533] Irie, M. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1685–1716.

[534] Bandara, H. M. D.; Burdette, S. C. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1809–1825.

[535] Kornman, C. T.; Li, L.; Weldeab, A. O.; Ghiviriga, I.; Abboud, K. A.; Castellano, R. K. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 10190–10197.

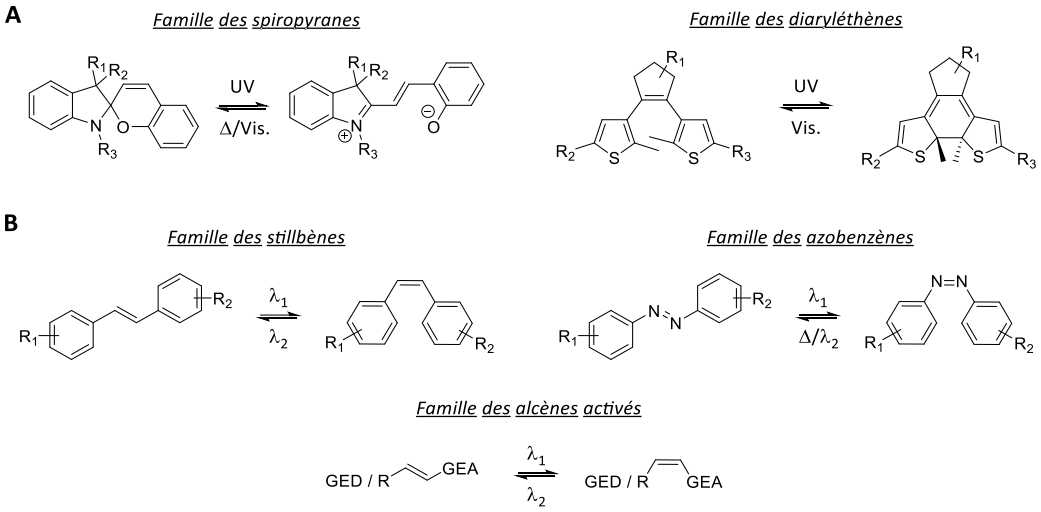


*Schéma 221. (**A**) Structures générales des familles des spiropyranes et des diaryléthènes. (**B**) Structures générales des familles des stilbènes, des azobenzènes et des alcènes activés.*

3.1.3. Principe général de photoisomérisation des azobenzènes

Les mécanismes de photoisomérisation des azobenzènes ont été très étudiés et ces phénomènes photophysiques sont aujourd'hui très bien appréhendés.[534]

De manière très générale, la photoisomérisation des azobenzènes survient grâce à l'excitation lumineuse à des longueurs d'ondes bien précises et qui correspondent à différents types de transitions énergétiques (Schéma 222, **A**).[536] Ainsi, lorsque la photo-excitation du composé est réalisée avec la bande d'absorbance correspondante à la transition π→π* d'énergie plus élevée, une isomérisation *E*→*Z* est généralement observée de manière majoritaire.[536] A l'inverse, l'activation thermique et dans l'obscurité permet dans de nombreux cas une isomérisation de type *Z*→*E* plus stable thermodynamiquement. De leur côté, les transitions de plus basses énergies n→π* permettent également la photoisomérisation de ces composés généralement *Z*→*E*. Si ces bandes d'absorption se recouvrent, l'isomérisation à cette longueur d'onde peut aboutir à un état d'équilibre dit « photo-stationnaire » et est souvent irréversible, sauf éventuellement par activation thermique ou photo-excitation des transitions π→π*. Cet équilibre va directement dépendre des valeurs respectives des coefficients d'extinction molaire (ε) des deux isomères pour la

[536] Knie, C.; Utecht, M.; Zhao, F.; Kulla, H.; Kovalenko, S.; Brouwer, A. M.; Saalfrank, P.; Hecht, S.; Bléger, D. *Chem. Eur. J.* **2014**, *10*, 16492–16501.

longueur d'onde employée.[534] En somme, l'isomère absorbant le plus la lumière à cette longueur d'onde sera donc celui qui s'isomérisera le plus facilement jusqu'à atteindre l'équilibre photo-stationnaire. Les transitions n→π* se trouvent être les plus intéressantes à étudiées car : 1) les longueurs d'ondes correspondantes se trouvent souvent dans le domaine du visible, ce qui permet des applications en biologie et l'emploi de sources lumineuses moins nocives (contrairement aux UV) et 2) la modulation structurale des azobenzènes permet une modification énergétique des états excités pour chacun des isomères, ce qui se traduit par une modification des longueurs d'ondes correspondantes aux transitions n→π* respectives des deux composés.[536,537] De cette manière, l'irradiation des composés à des longueurs d'ondes données permet l'obtention de mélanges enrichis en l'un ou l'autre des isomères et qui sera d'autant plus efficace si les longueurs d'ondes d'absorbances maximales des deux composés sont éloignées (Schéma 222, **B**). Il a par ailleurs pu être démontré que la fonctionnalisation des positions *ortho* des azobenzènes avec des atomes de fluor permettait d'augmenter la thermo-stabilité des isomères *cis*.[538]

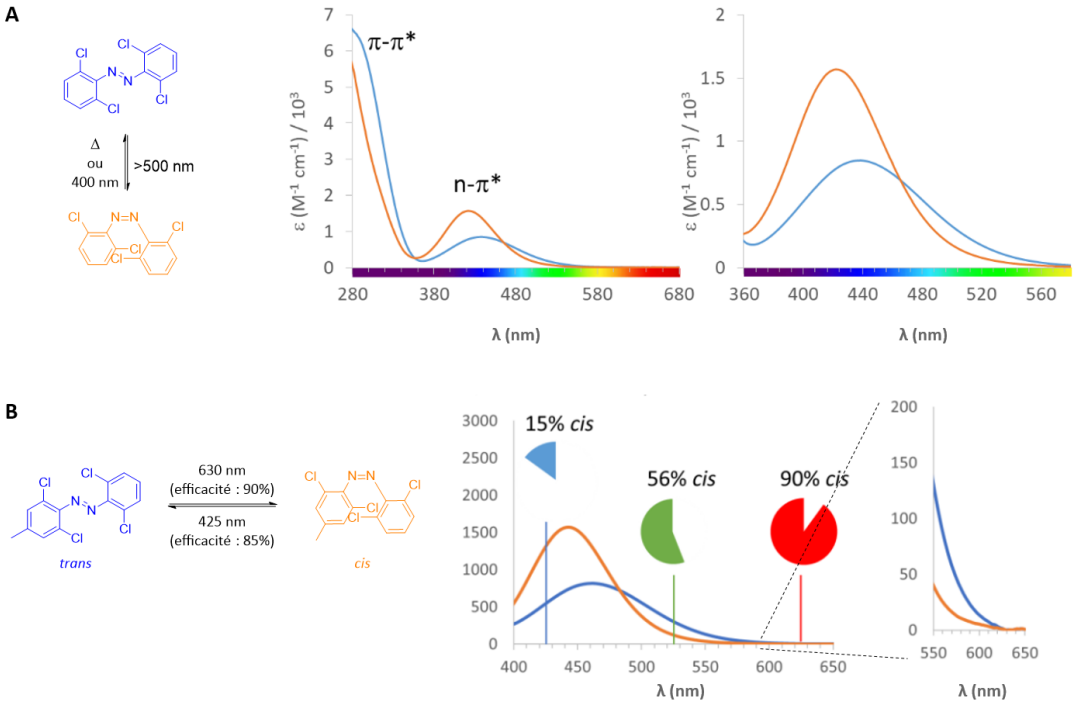


*Schéma 222. (**A**) Exemple d'un couple d'isomères cis/trans d'azobenzènes avec recouvrement des transitions n→π*. (**B**) Exemple de séparation des transitions n→π* par modulation structurale de des azobenzènes et équilibres photo-stationnaires associés. (Schémas extraits et modifiés de l'articles[537]).*

[537] Lameijer, L. N.; Budzak, S.; Simeth, N. A.; Hansen, M. J.; Feringa, B. L.; Jacquemin, D.; Szymanski, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 21663–21670.

[538] Liu, X.-M.; Jin, X.-Y.; Zhang, Z.-X.; Wang, J.; Bai, F.-Q. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 11580–11588.

3.1.4. Application au design de nouveaux ligands de la CA II à activité modulable par photoisomérisation

En 2008, le Pr. König et son équipe ont développé un inhibiteur de la *h*CA II comportant un motif diaryléthène permettant un photo-contrôle de l'activité biologique du ligand grâce à sa modification structurale (Schéma 223).[539] En effet, le ligand **240** de forme « ouverte » et plus flexible possède une bien meilleure constante inhibitrice vis-à-vis de la *h*CA II (K_i = 0,005 µM, IC_{50} = 0,008 µM) que son isomère plus rigide **241** de forme « fermée » (K_i = 0,3 µM, IC_{50} = 0,40 µM). Cette différence très significative de l'activité s'explique par la modification de la distance entre la fonction sulfonamide qui permet la coordination de l'ion Zn^{2+} catalytique et la fonction iminodiacétate de cuivre (II), permettant la coordination de chaînes latérales imidazoles de résidus histidines à l'entrée du site actif. Les auteurs ont ainsi pu démontrer l'efficacité de cette type de photoisomérisation afin de réguler l'activité de la *h*CA II grâce à la lumière.

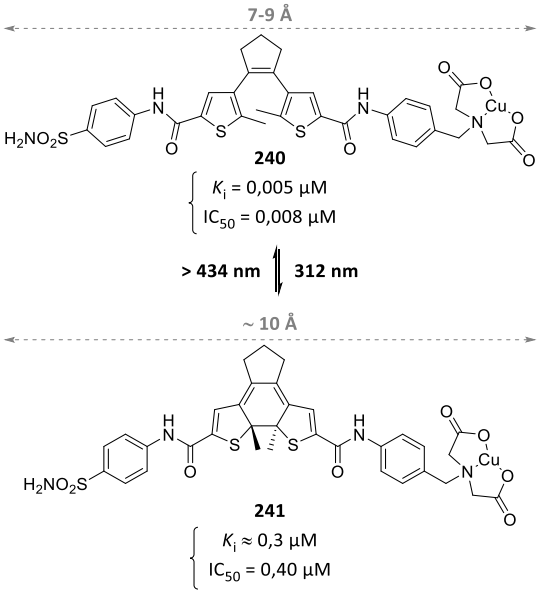


*Schéma 223. Relation structure-activité des ligands **240** et **241** vis-à-vis de la* h*CA II.*

La même année, l'équipe du Pr. Trauner a employé une stratégie de *tethering* permettant l'attache covalente sur la *b*CA II d'un inhibiteur présentant ici un motif azobenzène (Schéma 224).[540] Bien que le passage de l'isomère *trans* à *cis* ne permette qu'une

[539] Vomasta, D.; Högner, C.; Branda, N. R.; König, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7644–7647.

[540] Harvey, J. H.; Trauner, D. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 191–193.

augmentation de l'activité enzymatique d'un facteur deux, cette preuve de principe a ouvert de nouvelles voies d'études.

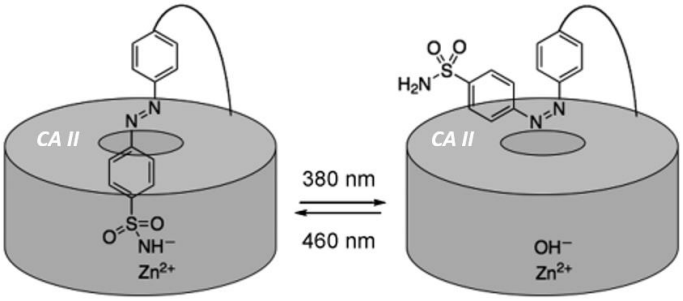
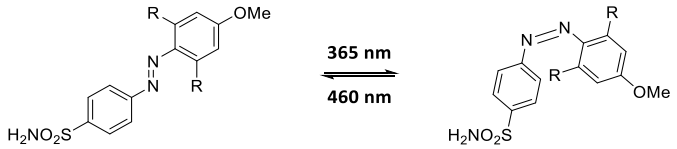


Schéma 224. Photo-contrôle de l'activité de la CA II par tethering d'un inhibiteur possédant une fonction azobenzène (schéma extrait et modifié de l'article[540]).

Plus récemment, le groupe du Pr. Que a développé de nouvelles générations d'inhibiteurs réversibles de la CA II et dont la photo-modulation de leurs activités biologiques a à nouveau été assurée par des motifs azobenzènes (Schéma 225).[541] Grâce à la grande différence d'activité biologique des isomères *trans* et *cis* des deux séries, un photo-contrôle de des ligands ***t*-CAP1** ou ***t*-** et ***c*-CAP2** a permis aux auteurs de réguler le pH cytosolique de cellules vivantes grâce à l'inhibition de la CA II.



R = H, ***t*-CAP1**
(IC_{50} = 0,293 µM)
R = OMe, ***t*-CAP2**
(IC_{50} = 0,688 nM)

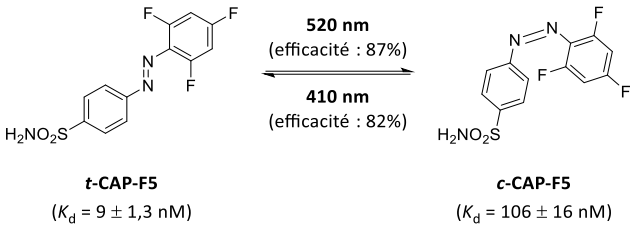
R = H, ***c*-CAP1**
(IC_{50} = 1,46 µM)
R = OMe, ***c*-CAP2**
(IC_{50} = 1,28 µM)

*Schéma 225. Structures et activités des ligands photoisomérisables **t-CAP1** ou **CAP2** et **c-CAP1** ou **CAP2**.*

Suite à ces premiers résultats encourageants, la même équipe a réalisé une optimisation structurale de ces inhibiteurs en substituant certaines positions par des atomes de fluor, conduisant ainsi aux inhibiteurs ***t*-CAP-F5** et ***c*-CAP-F5** (Schéma 226).[542]

[541] Aggarwal, K.; Banik, M.; Medellin, B.; Que, E. L. *Biochemistry* **2019**, *58*, 48–53.

[542] Aggarwal, K.; Kuka, T. P.; Banik, M.; Medellin, B. P.; Ngo, C. Q.; Xie, D.; Fernandes, Y.; Dangerfield, T. L.; Ye, E.; Bouley, B.; Johnson, K. A.; Zhang, Y. J.; Eberhart, J. K.; Que, E. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 14522–14531.



***t*-CAP-F5**
(K_d = 9 ± 1,3 nM)

***c*-CAP-F5**
(K_d = 106 ± 16 nM)

*Schéma 226. Structures et activités des ligands photoisomérisables **t-CAP-F5** et **c-CAP-F5**.*

Cette modification structurale a permis à la fois de déplacer les longueurs d'ondes d'absorption des transitions n→π* dans le domaine du visible, mais également de suffisamment les séparer afin d'obtenir des efficacités d'isomérisation > 80% dans les deux cas (*trans*→*cis* ou *cis*→*trans*) lors des illuminations aux longueurs d'ondes spécifiques. Des tests de photo-contrôle de l'activité de la CA II ont pu être réalisés avec succès grâce au composé **CAP-F5** de manière *in vitro* (CA II seule), *in celluli* (cellules HeLA) et *in vivo* (embryons de poissons zèbres), ce qui ouvre de nombreuses perspectives pour la lutte contre le cancer grâce au contrôle du pH intracellulaire.

Ces différents travaux récents et l'intérêt croissant pour les composés photoisomérisables ont donc encouragé une étude plus approfondie des propriétés de photoisomérisation des ligands **235**.

*3.1.5. Étude de la photoisomérisation des ligands **235***

3.1.5.1. Acquisitions des spectres UV

La première observation de la photoisomérisation du ligand **235**, et plus particulièrement de l'isomère *Z*, avait eu lieu par illumination des échantillons à la lumière ambiante du laboratoire (lumière blanche). Afin de bien comprendre le fonctionnement du processus de photoisomérisation, un spectre UV visible a donc été réalisé pour les deux isomères dans du PB pH 7,4, qui était le tampon employé lors des expériences de KTGS (Figure 113).

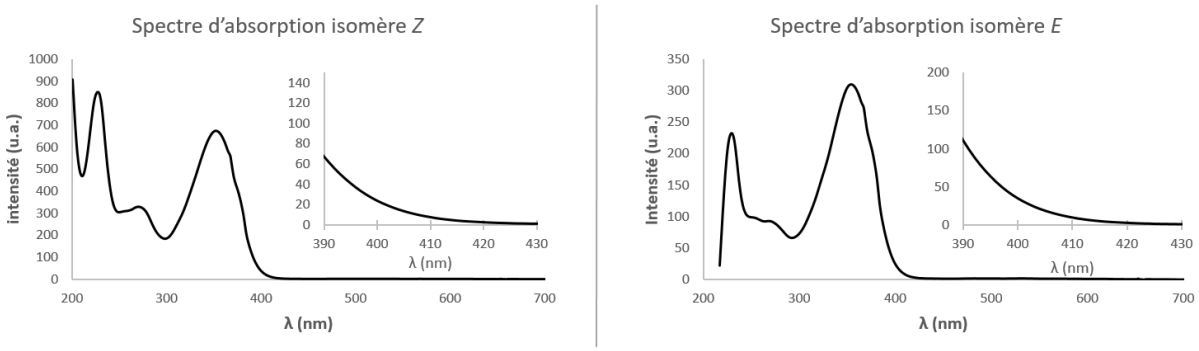


*Figure 113. Spectres UV des isomères **235** Z et E avec agrandissement de la région 390-430 nm.*

Les spectres obtenus pour les deux isomères sont en tout point semblable, avec une large bande d'absorption centrée sur λ ≈ 350 nm et s'étalant dans le domaine du visible jusqu'à environ 425 nm. Contrairement aux azobenzènes présentés précédemment, l'attribution des transitions π→π* et n→π* aux différents bandes d'absorption n'est pas immédiate.

Pour la suite de l'étude concernant cette photoisomérisation, plusieurs paramètres ont été étudiés afin de bien comprendre le fonctionnement de ce phénomène.

3.1.5.2. Effet du solvant

La nature du milieu dans lequel se trouve un composé photoisomérisable impacte directement la cinétique de l'isomérisation de ce dernier, mais également l'état photo-stationnaire final (ratio final des deux isomères).[543] Ainsi, le ligand **235** (*Z*) a été solubilisé dans différents solvants (400 µM) et les échantillons ont été exposés à la lumière ambiante d'une lampe basse consommation commerciale L'isomérisation de l'isomère *Z* a été suivie par HPLC pour chaque expérience (Figure 114). Ainsi, ce sont dans les solvants polaires et protiques, comme le méthanol et l'eau, que la cinétique de photoisomérisation est la plus rapide, avec probablement l'atteinte d'un équilibres photo-stationnaire plus appauvri en isomère *Z*.

[543] Dünnebacke, T.; Kalathil, K. K.; Wiest, J.; Albuquerque, R. Q.; Fernandez, G. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 10405–10413.

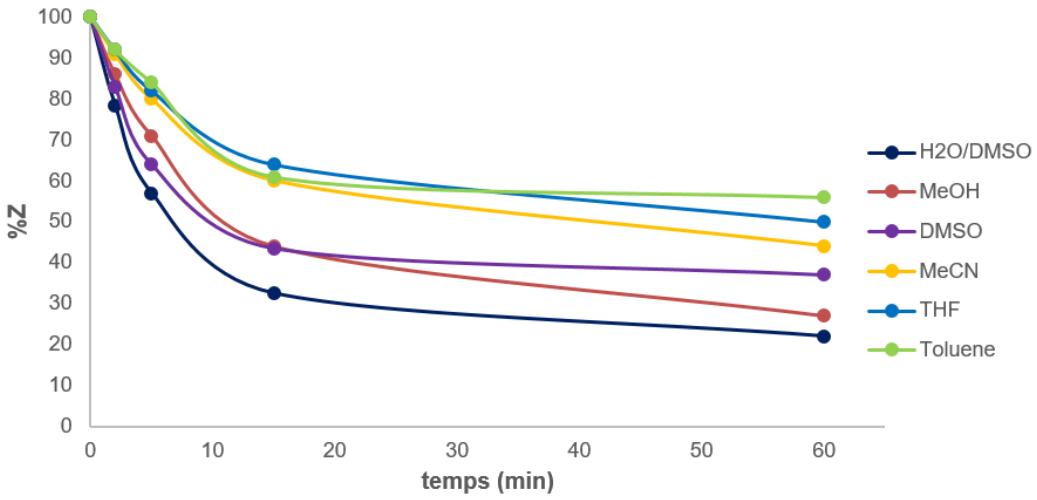


Figure 114. Étude de l'effet du solvant sur la cinétique de photoisomérisation du ligand ***235*** *(Z). ($\lambda_{détection}$ = 350 nm)*

De rares travaux concernant l'influence de la polarité du solvant sur les constantes cinétiques de photoisomérisation *cis*→*trans* de la famille des azobenzènes ont été reportés dans la littérature.[544] Il s'avère que les interactions polaires entre le composé photoisomérisable et le solvant peuvent conduire à trois différents types d'activation, à savoir : (i) une diminution de l'énergie d'activation en conservant les niveaux d'énergie moléculaires, (ii) en modifiant les niveaux d'énergies du composé en provoquant une diminution de l'énergie d'activation ou (iii) en modifiant à la fois les niveaux d'énergie des composés et les énergies d'activation associées (Figure 115).[545] Quel que soit le modèle énergétique de la photoisomérisation, la vitesse de ce processus est donc considérablement accrue en milieu polaire. Il est également à noter que d'autres paramètres comme la viscosité ou la friction du solvant peuvent influencer la vitesse de l'isomérisation en limitant par exemple la liberté de rotation des différentes composantes autour des liaisons de la molécule dans son état excité.[546] Même si les mécanismes régissant les phénomènes de photoisomérisation sont encore à l'étude, le système H_2O/DMSO (1:1, v/v) est apparu comme le plus efficace en termes de cinétique d'isomérisation et d'état photo-stationnaire. Par ailleurs, il s'apparente le plus à des conditions « physiologiques » dont les applications seraient les plus intéressantes dans le cadre de cette étude. Pour cela, il a donc été choisi de conserver ce mélange de solvants pour la suite de l'étude.

[544] Smith, S.; Bou-Abdallah, F. *J. Thermodyn. Catal.* **2017**, *8*, 1–6.
[545] Joshi, N. K.; Fuyuki, M.; Wada, A. *J. Phys. Chem.* **2014**, *118*, 1891–1899.
[546] Serra, F.; Terentjev, E. M. *Macromolecules* **2008**, *41*, 981–986.

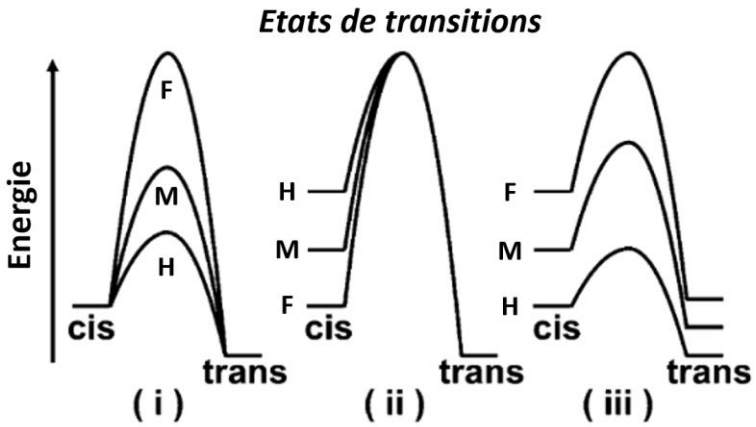


Figure 115. Modèles énergétiques d'activations de la photoisomérisation suivant la polarité du milieu (H : haute polarité ; M : moyenne polarité ; F : faible polarité). (Figure extraite et modifiée de l'article[545]). Les trois modèles correspondent à ceux énoncés dans le texte, à savoir : (i) diminution de l'énergie d'activation en conservant les niveaux d'énergie moléculaire de chaque isomère, (ii) modification des niveaux d'énergies du composé provoquant une diminution de l'énergie d'activation ou (iii) modification à la fois des niveaux d'énergie des composés et des énergies d'activation associées.

3.1.5.3. Choix de la source lumineuse et de la température

Le choix de la source lumineuse à employer a été effectué en priorité en testant trois sources : les néons du laboratoire (lumière blanche), une lampe basse consommation commerciale (lumière blanche) et une bandelette de DEL (bande passante : 425 -500 nm centrée sur 450 nm) de couleur bleue. Le suivi de l'isomérisation par HPLC a clairement démontré que les néons étaient du point de vue de la cinétique d'isomérisation moins efficaces que les deux autres sources (Figure 116, **A**). Concernant la DEL, le profil cinétique de photoisomérisation est très semblable à celui de la lampe basse consommation, mais cependant, une apparition de sous-produits de dégradation a pu être observée ce qui a éliminé d'office cette source lumineuse. Finalement, le meilleur compromis s'est trouvé être la lampe basse consommation.

Ensuite, l'influence de la température sur la vitesse de photoisomérisation a été brièvement étudiée (Figure 116, **B**). Même si à 37 °C une cinétique d'isomérisation légèrement plus rapide a pu être observée, les contraintes techniques associées ont finalement conduit à réaliser les expériences à 20 °C.

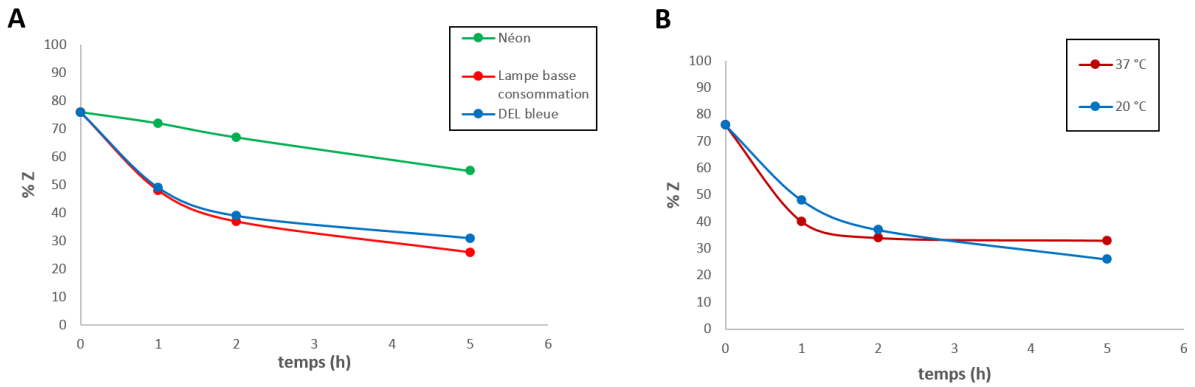


*Figure 116. (**A**) Comparaison de la cinétique de photoisomérisation du ligand **235** à l'aide de différentes sources lumineuses. (**B**) Étude de l'influence de la température sur la vitesse de photoisomérisation. ($\lambda_{détection}$ = 350 nm)*

3.1.5.4. Contrôle de la dégradation du ligand sous irradiation lumineuse

Bien qu'aucune dégradation notable du ligand **235** (2,68 mM) n'ait pu être observée lors de l'illumination avec la lampe basse consommation, ce phénomène peut cependant être beaucoup plus visible à plus basses concentrations. Pour cela, une solution dix fois plus diluée du ligand **235** (*Z*/*E* = 68/32 ; 268 µM) a été illuminée et le milieu a été analysé par HPLC à intervalles réguliers en ajoutant une quantité constante de coumarine comme référence externe dans les aliquots. Le ratio des aires de pics HPLC entre la coumarine et les isomères (*Z*+*E*) ont donc été reportés en fonction du temps (Figure 117). L'obtention d'un ratio coumarine/(*Z*+*E*) constant dans le temps a donc confirmé qu'aucune dégradation significative était observée lors de la photoisomérisation du ligand **235**.

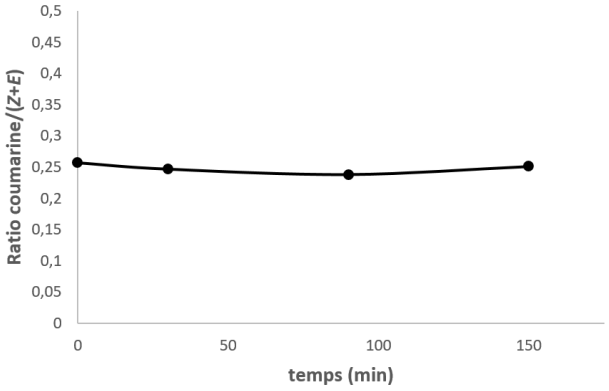


*Figure 117. Contrôle de dégradation du ligand **235** soumis à l'illumination de la lampe basse consommation par étalonnage externe avec la coumarine. ($\lambda_{détection}$ = 320 nm)*

L'ensemble des vérifications nécessaires pour l'étude étant terminé, une étude plus fine de la photoisomérisation du ligand **235** a donc été entreprise en conservant les différents paramètres choisis précédemment (solvant, source lumineuse et température).

3.1.5.5. Effet des longueurs d'ondes d'excitation

Afin de s'assurer du rôle de la bande d'absorption large et centrée sur 350 nm observée pour les isomères *Z* et *E* vis-à-vis de la photoisomérisation *Z*→*E*, une étude sur l'influence des longueurs d'ondes employées a été entreprise. Pour cela, une illumination de cinq minutes a été réalisée sur des échantillons identiques d'isomère *Z* en solution (H_2O/DMSO, 1:1, v/v ; 268 µM) en employant diverses méthodes d'illumination (Figure 118, **A**).[547]

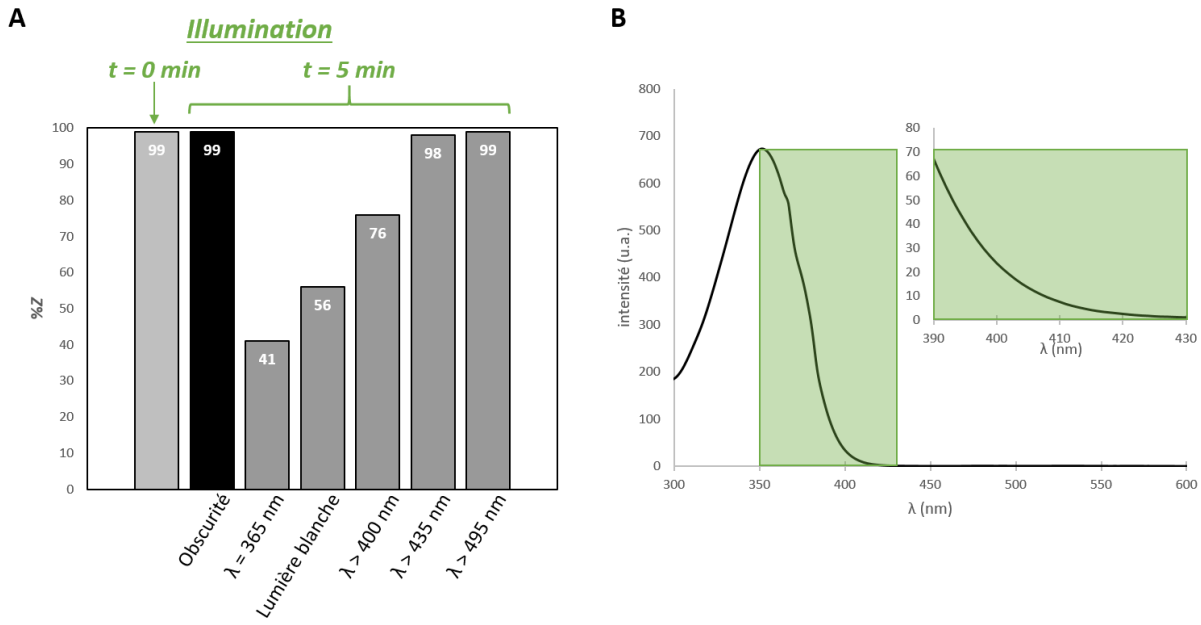


*Figure 118. (**A**) Étude de l'effet des longueurs d'ondes employées sur la photoisomérisation de l'isomère **235** Z en solution. (**B**) Agrandissement du spectre UV-Vis. de l'isomère Z (300-600 nm) et gamme confirmée de longueurs d'ondes responsables de la photoisomérisation Z→E (surface verte).*

Comme précédemment, aucune photoisomérisation n'a pu être observée dans l'obscurité totale. En revanche, l'illumination centrée sur 365 nm (bande passante : 350 – 400 nm) grâce à la lampe de photo-catalyse a conduit à une isomérisation de 58% de l'isomère Z en cinq minutes, contre 43% par exposition à la lumière blanche. Ensuite, l'emploi des filtres passe-haut (> 400, 435 et 495 nm) a permis de confirmer que la gamme de longueurs située

[547] « Obscurité » : emploi d'un pilulier entouré d'une feuille d'aluminium. « λ = 365 nm » : lampe de photo-catalyse HepatoChem® + filtre noir (opacité = 90%). « Lumière blanche » : lampe basse consommation nue. « λ > 400 ou 435 ou 495 nm » : lampe basse consommation + filtre de longueurs d'ondes passe-haut.

entre 400 et 435 nm permettait également de photoisomériser le composé. Cependant, ce phénomène s'estompe au-delà de ces valeurs dans le domaine du visible. Ces expériences ont donc permis d'établir avec une certaine précision la gamme de longueurs d'ondes à partir de 350 nm permettant la photoisomérisation de l'isomère *Z* (Figure 118, **B**).

Un écart d'isomérisation de 20% entre l'illumination avec la lumière blanche et le filtre > 400 nm a cependant été constaté lors de ces expériences, ce qui n'a pas semblé cohérent étant donné que le filtre passe-haut de 400 nm est censé transmettre la même gamme de longueurs d'onde que ce que peut fournir la lampe (Figure 118, **A**). Toutefois, il se peut que l'intensité lumineuse transmise par la lampe soit un peu atténuée par le filtre passe-haut.

Par ailleurs, l'acquisition du spectre d'émission de la lampe basse consommation employée (mesure réalisée à l'aide du spectrophotomètre de fluorescence) a révélé la présence de bandes d'émissions relativement faibles en intensités situées dans le domaine UV, vers 360 nm (Figure 119). Ainsi, les deux gammes d'émission (surfaces vertes) de la lampe sont très certainement à l'origine de la photoisomérisation du composé *Z* lorsque la lampe est « nue ». Ceci explique également que la filtration lumineuse en dessous de 400 nm fasse décroitre significativement le taux d'isomérisation, d'autant plus que cette gamme corresponde quasiment au maxima d'absorption de la molécule.

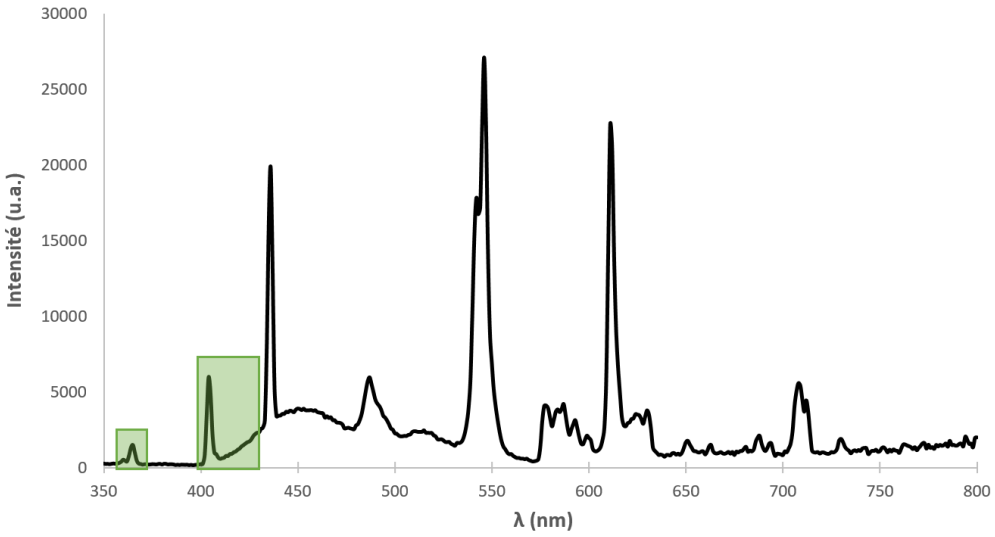


Figure 119. Spectre d'émission non-filtré de la lampe basse consommation commerciale.

3.1.5.6. Suivi cinétique de la photoisomérisation et effet de la concentration

Grâce à l'étude préliminaires des différents paramètres expérimentaux, un suivi de la cinétique de photoisomérisation de l'isomère *Z* pur en solution (H_2O/DMSO, 1:1, v/v ; 268 µM) a été réalisé afin d'estimer la cinétique du phénomène par illumination avec la lampe « nue » (Figure 120, **A**). Ainsi, une isomérisation *Z*→*E* relativement rapide a pu être observée avec l'atteinte d'un équilibre photo-stationnaire après 20 minutes, correspondant à une proportion *Z*/*E* = 17/83. A titre de comparaison, des travaux relativement récents portant sur la photoisomérisation de stilbènes ont décrit l'atteinte de l'équilibre photo-stationnaire après plus de 60 minutes d'illumination.[548] Parallèlement, aucune isomérisation n'a pu être observée comme précédemment lorsque la solution a été conservée dans l'obscurité totale à température ambiante. L'absorbance de la solution étant directement proportionnelle à la concentration en analyte, l'effet de ce paramètre sur la vitesse d'isomérisation a donc été étudié en illuminant pendant cinq minutes quatre solutions de concentrations différentes (Figure 120, **B**). Ainsi, la vitesse de photoisomérisation de l'isomère *Z* est en effet significativement réduite lorsque sa concentration en solution est plus élevée. Il est donc facilement imaginable que pour des concentrations encore plus faibles (quelques µM à dizaines de µM), l'équilibre photo-stationnaire pourrait être atteint en moins de cinq minutes d'illumination à la lumière du visible.

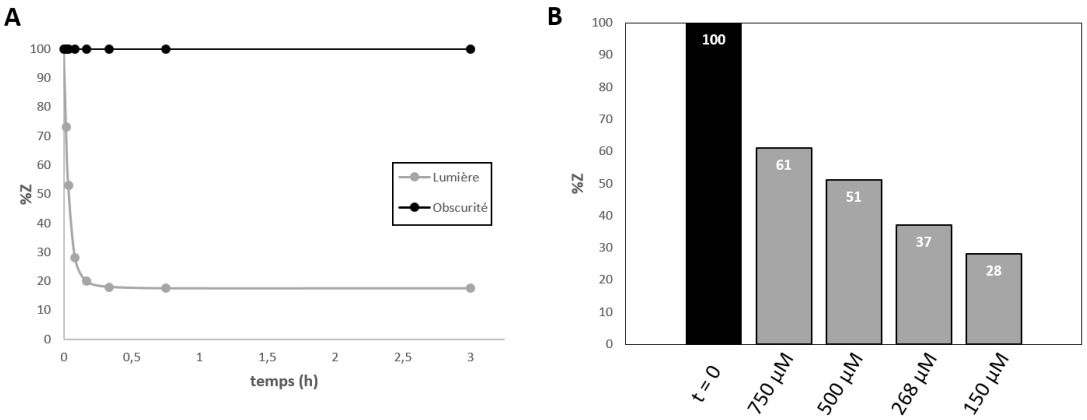


*Figure 120. (**A**) Suivis cinétiques de la photoisomérisation (lumière blanche ou obscurité) de l'isomère **235** Z pur (268 µM) dans un mélange H_2O/DMSO (1:1, v/v). (**B**) Étude de l'influence de la concentration sur la vitesse de photoisomérisation de l'isomère Z pur dans un mélange H_2O/DMSO (1:1, v/v) après 5 minutes d'illumination avec la lampe basse consommation commerciale. ($\lambda_{détection}$ = 350 nm)*

[548] (a) Bejarano, F.; Alcon, I.; Crivillers, N.; Mas-Torrent, M.; Bromley, S. T.; Veciana, J.; Rovira, C. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 15278–15283. (b) Mishra, S.; Awashi, P.; Singh, J.; Gupta, R. K.; Singh, V.; Kant, R.; Jeet, R.; Gowsami, D.; Goel, A. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 3669–3678.

Bien que les différents essais d'isomérisation du ligand de géométrie *E* pur aient été infructueux *via* l'illumination avec la lampe basse consommation, un essai a tout de même été réalisé en illuminant deux solutions des isomères *Z* et *E* (H_2O/DMSO, 1:1, v/v ; 268 µM) à l'aide de la lampe centrée sur 365 nm et équipée d'un filtre lumineux (opacité = 90%) afin de comparer les résultats. Une isomérisation partielle a alors pu être observée dans les deux cas grâce à un suivi par HPLC (Figure 121). En comparant les courbes cinétiques obtenues pour les isomères *Z* et *E*, il apparaît très clairement qu'un équilibre photo-stationnaire identique est atteint (≈ 20% isomère *Z*). Ceci laisse donc supposer que la barrière énergétique entre les deux isomères est relativement élevée mais pas impossible à franchir à l'état excité. Ainsi, une optimisation structurale pourrait permettre l'amplification de ce phénomène et conduire à un potentiel photo-contrôle de l'isomérisation pour des applications en photo-pharmacologie.

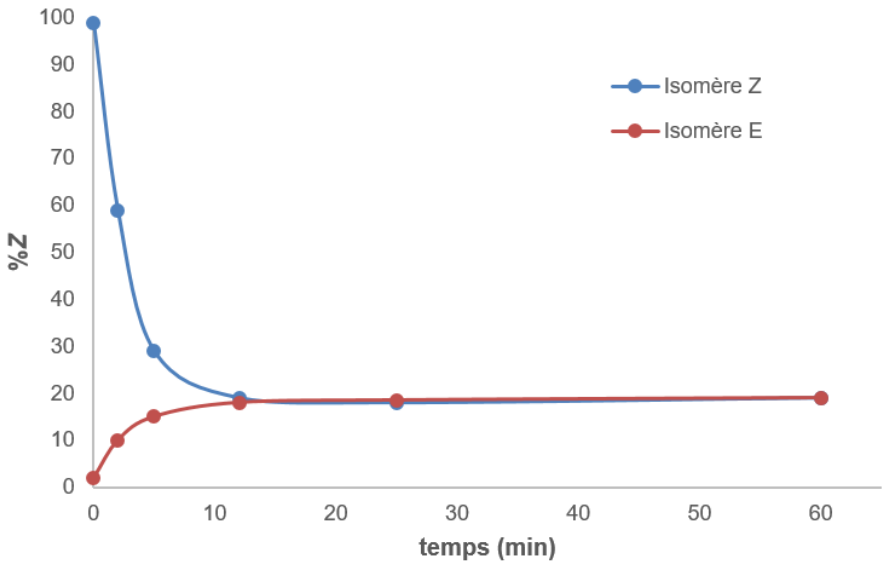


*Figure 121. Suivi cinétique de la photoisomérisation (365 nm + filtre lumineux opacité = 90%) des isomères **235** E et Z purs (268 µM) dans un mélange H_2O/DMSO (1:1, v/v). ($\lambda_{détection}$ = 350 nm)*

3.1.5.7. Test de réversibilité par activation thermique

Comme décrit un peu plus tôt, l'activation thermique est parfois la seule possibilité afin d'obtenir une réversibilité d'isomérisation. L'illumination n'ayant permis d'obtenir qu'une réversibilité médiocre, une activation thermique a donc été testée à l'aide d'un mélange d'isomères **235** (*Z*/*E* = 69/31). Pour cela, le ligand a dans un premier temps été solubilisé dans un mélange D_2O/DMSO-d_6 (1:3, v/v ; 14,7 mM) et la solution a été illuminée pendant deux

heures (lumière blanche), ce qui a conduit à un ratio *Z*/*E* = 44/56 avant de débuter les expériences de chauffages (Figure 122). Cependant, que ce soit après deux heures et demie à 60 °C ou après deux heures à 80 °C dans l'obscurité, le ratio *Z*/*E* est resté constant. Ce résultat peut être interprété de trois façons : 1) la température n'est pas assez élevée pour franchir la barrière énergétique d'interconversion, 2) le système de solvant utilisé n'est pas adapté pour ce type d'isomérisation thermique, ou 3) ce type d'isomérisation n'est pas envisageable par voie thermique car la barrière d'activation est trop élevée.

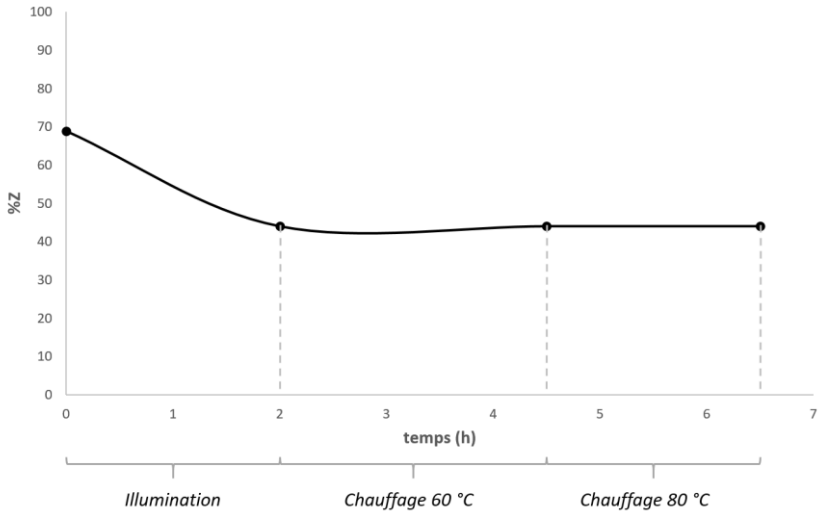


Figure 122. Suivi des essais d'isomérisation thermique par RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6).

Des calculs théoriques en cours de réalisation par l'équipe du Pr. Laurent Joubert (Université de Rouen) devraient permettre de modéliser les niveaux d'énergie des isomères et les états de transition à l'état fondamental et excité. Ces résultats devraient permettre l'orientation des futures expériences vers des structures plus adaptées afin d'avoir des efficacités et des sélectivités de photoisomérisation plus importantes.

3.2. Étude des propriétés de fluorescence des ligands 235

Comme expliqué précédemment, les ligands **235** *Z* et *E* se sont avérés être fluorescent et ces propriétés spectrales ont donc été étudiées plus en détail.

*3.2.1. Caractérisations spectroscopiques des ligands **235** Z et E*

Pour commencer, les spectres d'absorption, d'excitation et d'émission des deux isomères *Z* et *E* ont été réalisé dans le PBS pH 7,4 (Figure 123). La très bonne superposition de

la bande d'excitation avec celle d'absorption centrée sur 350 nm permet de confirmer que cette dernière est donc responsable à la fois de la photoisomérisation et de l'émission de fluorescence. Par ailleurs, les bandes d'émission des deux isomères sont quant à elles identiques et se trouvent dans le domaine visible à λ_{em} = 510 nm.

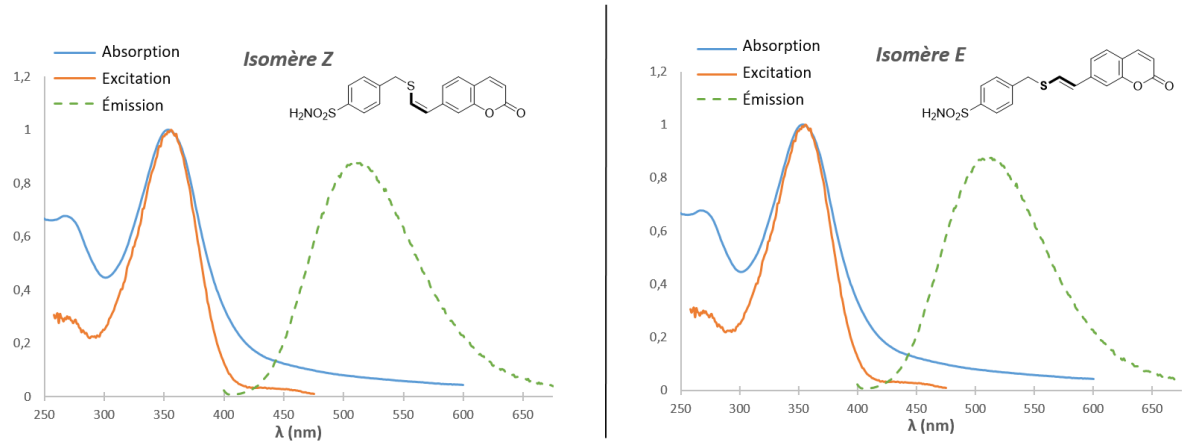


*Figure 123. Spectres normalisés d'absorption, d'excitation (λ_{em} = 510 nm) et d'émission (λ_{ex} = 350 nm) des ligands **235** Z et E dans le PBS pH 7,4 à 25 °C.*

La 7–hydroxycoumarine (7-HCE) a finalement été choisie comme référence en raison de ses propriétés spectrales proches des ligands **235**. Ainsi, le déplacement de Stokes (δ_{Stokes}), le rendement quantique (Φ_F), le coefficient d'extinction molaire (ε) et la brillance ont pu être déterminés pour chacun des deux isomères (Tableau 18).

Composé	**λ_{max} (nm)**	**λ_{em} (nm)**	**δ_{Stokes} (nm)**	**Φ_F (%)** [a]	**ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)**	**Brillance ($M^{-1}.cm^{-1}$)** [d]
Isomère *Z*	350	510	155	50	5264 [b]	2632
Isomère *E*	350	510	155	22	10410 [b]	2290
7-HCE	362	452	90	76	13000 [c]	9880

[a] Mesuré à 25 °C dans le PBS pH 7,4 (λ_{ex} = 360 nm). [b] Mesuré à 25 °C dans le PBS pH 7,4 (λ = 350 nm). [c] Mesuré à 25 °C dans le PBS pH 7,4 (λ = 320 nm). [d] Brillance = $\Phi_F \times \varepsilon$.

*Tableau 18. Propriétés photophysiques des ligands **235** Z et E et de la référence 7-HCE (extraites de la littérature).*[549]

Les résultats obtenus ont mis en lumière une différence notable de rendement quantique entre les deux ligands, avec un rapport d'environ deux en faveur de l'isomère *Z*. Par

[549] Setsukinai, K.-i; Urano, Y.; Kikuchi, K.; Higuchi, T.; Nagano, T. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2000**, *2*, 2453–2457.

ailleurs, bien que ces deux composés soient des fluorophores moins efficaces que la référence 7-HCE en termes de rendement quantique, de coefficient d'extinction molaire et de brillance, la fonction donneuse éther de thiovinyle de ces deux ligands semble permettre l'obtention d'un déplacement de Stokes plus important que la 7-HCE.

Les effets de solvatochromie sur l'absorption et l'émission des isomères ont ensuite été explorés à l'aide de huit solvants de natures très différentes, allant d'apolaires à polaires protiques (Figure 124, **A**).

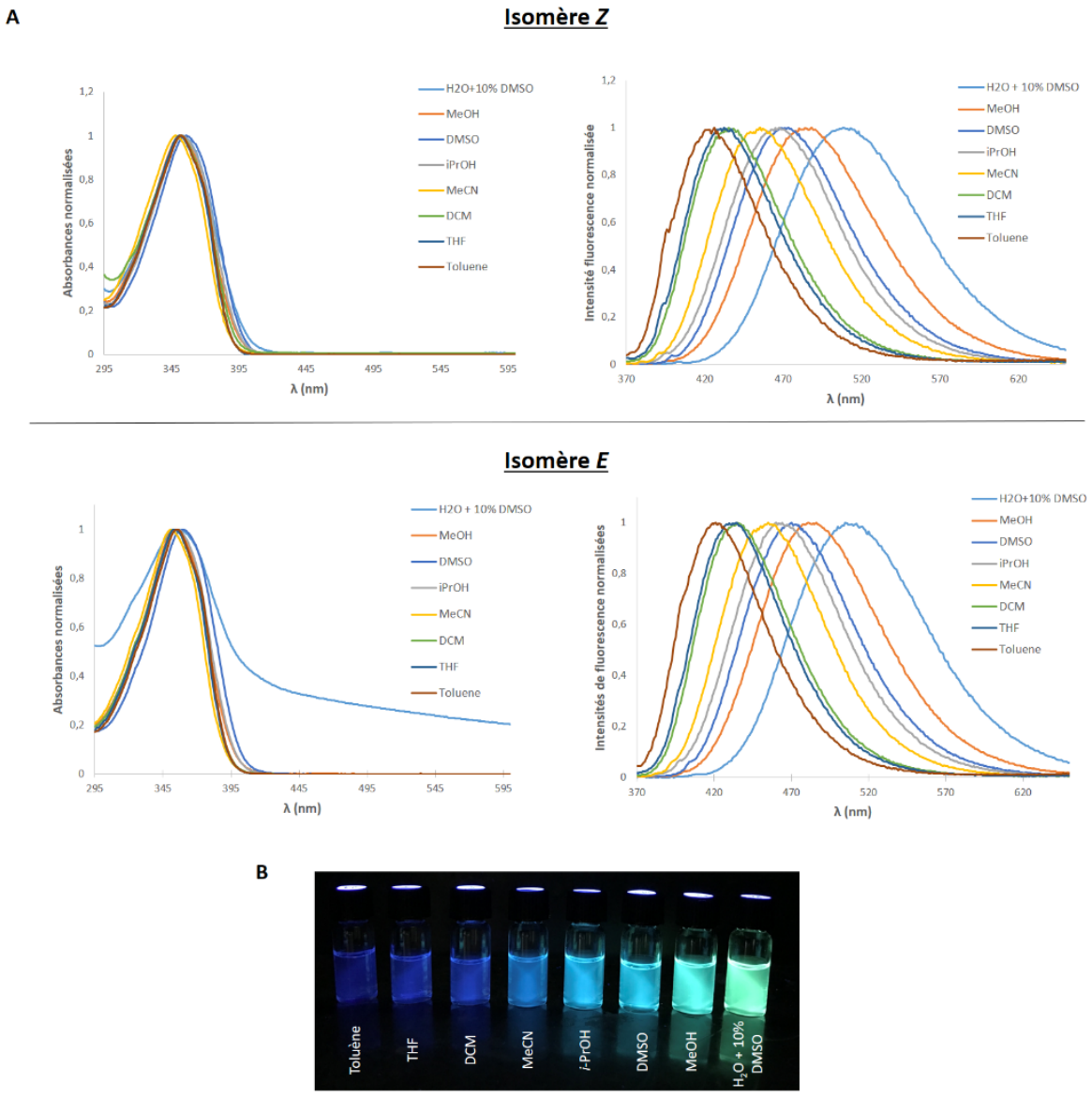


*Figure 124. (**A**) Étude de la solvatochromie en absorption et en émission des isomères **235** Z et E (spectres normalisés). (**B**) Photographie de solutions de l'isomère **235** E (10 µM) dans les huit solvants étudiés (illumination : λ = 365 nm).*

Les résultats obtenus lors de cette étude ont été totalement homogènes pour les deux isomères. Aucun phénomène de solvatochromie notable en absorption n'a pu être observé,

contrairement à l'émission de fluorescence. En effet, un solvatochromisme positif (augmentation de la longueur d'onde d'émission lorsque la polarité du solvant augmente) a pu être observé avec un écart de 90 nm entre les deux extrêmes, c'est-à-dire le toluène (λ_{em} = 420 nm) et le mélange H_2O + 10% DMSO (λ_{em} = 510 nm). Ce phénomène est d'ailleurs très visuel à l'œil nu par irradiation à 365 nm de différentes solutions de l'isomère *E* dans les solvants étudiés (Figure 124, **B**).

Généralement, le transfert de charge interne (TCI) qui survient à l'état excité entre la fonction donneuse vers la fonction accepteuse d'un fluorophore conduit à la formation d'un moment dipolaire plus ou moins intense selon la nature de ces fonctions et l'étendu du système conjugué. Si la sphère de solvatation autour de ce composé est polaire et permet l'établissement de liaisons hydrogènes avec l'espèce zwitterionique intermédiaire, sa réorganisation autour de la molécule va permettre une stabilisation de son état excité S_2 de Franck-Condon vers un niveau excité S_1 de plus faible énergie (Figure 125). Finalement, le retour à l'état fondamental S_0 (ΔE_1) par relaxation peut se faire par exemple de manière radiative *via* une émission de fluorescence. Au contraire, dans le cas d'un solvant apolaire, la réorganisation de la sphère de solvatation autour de la molécule dans son état excité S_2 n'est pas possible, ou du moins pas suffisamment rapide, ce qui conduit à une relaxation vers l'état S_0 directement à partir de l'état S_2 de Franck-Condon (ΔE_2). Ce phénomène de stabilisation entre les différents solvants peut être observée en réalisant les spectres d'absorption et/ou d'émissions des composés. Si une solvatochromie positive est détectée ($\lambda_{2\ em} < \lambda_{1\ em}$ si $\Delta E_2 > \Delta E_1$), alors cela confirme bien la stabilisation de l'intermédiaire zwitterionique à fort moment dipolaire grâce au solvant polaire. Les ligands **235** *Z* et *E* se trouvent donc bien dans ce cas de figure d'après les spectres d'émissions obtenus précédement.

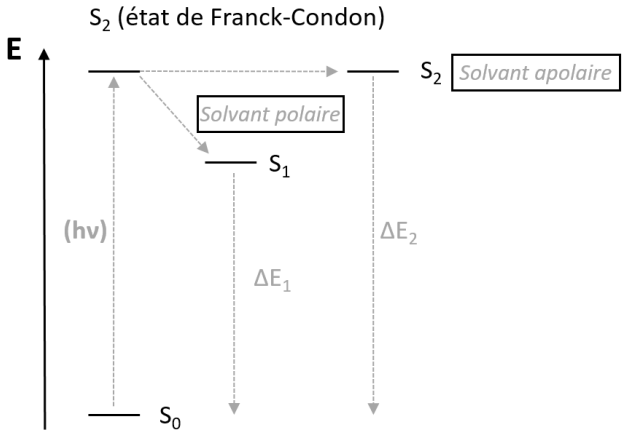


Figure 125. Modèle énergétique de stabilisation de l'état excité de Franck-Condon.

La recherche et le développement de sondes fluorescentes pour l'études des milieux biologiques notamment, a connu un essor très important durant la dernière décennie et la famille des coumarines a été très largement employées pour ce type d'application.[550] Ces composés sont la plupart du temps fonctionnalisées par des groupements donneurs en position 7 et des groupements accepteurs en position 3 (Figure 126).[551] De même, la position 4 a également été très employée afin de moduler les propriétés de fluorescence et/ou afin de fonctionnaliser la sonde. Enfin, les coumarines « classiques » comportent un groupement accepteur de type lactone, situé en positions 1 et 2, mais des modifications de cette fonction ont également pu être décrites pour la modulation des propriétés spectrales.

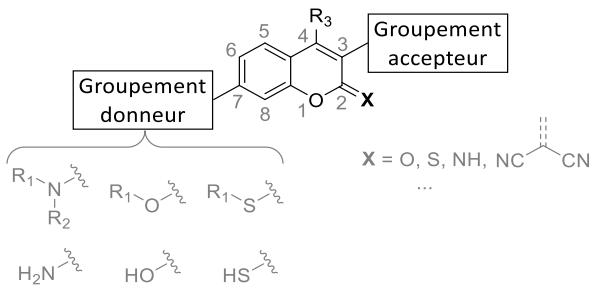


Figure 126. Structure et fonctionnalisation générale du motif coumarine pour l'élaboration de sondes fluorescentes.

La modification et la recherche de nouvelles fonctionnalisations sur les positions 2, 3 et 4, c'est-à-dire du côté accepteur de la molécule, ont fait l'objet d'un développement plus important, alors que le nombre et la nature des groupements donneurs en position 7 demeure encore à ce jour relativement restreints. Ainsi, la fonction éther de thiovinyle pourrait devenir

[550] Cao, D.; Liu, Z.; Verwilst, P.; Koo, S.; Jangjili, P.; Kim, J. S.; Lin, W. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 10403–10519.
[551] Sun, X.-Y.; Liu, T.; Sun, J.; Wang, X.-J. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 10826–10847.

une nouvelle alternative grâce à ses propriétés de fluorescence tout à fait intéressantes et à son apparente stabilité en conditions biologiques.

Afin de tirer profit des propriétés d'émission de fluorescence des ligands **235**, la recherche d'une application permettant de valoriser le caractère inhibiteur et fluorescent de ces composés a donc été entreprise.

*3.2.2. Emploi des ligands **235** Z et E comme sonde iFRET de la bCA II*

Le développement de sondes fluorescentes spécifiques de protéines comme la CA II a connu un réel intérêt pour des applications en bio-imagerie par exemple. Différentes sondes ont ainsi pu être développées récemment, certaines reposant sur des activations de fluorescence *via* une restriction rotationnelle au sein de la CA II (**S-CAII-1**)[552] ou d'autres (**S-CAII-2** et **S-CAII-**3) par modification de l'environnement de type hydrophile (solvant) → hydrophobe (cavité enzymatique de la CA II)[553] (Figure 137).

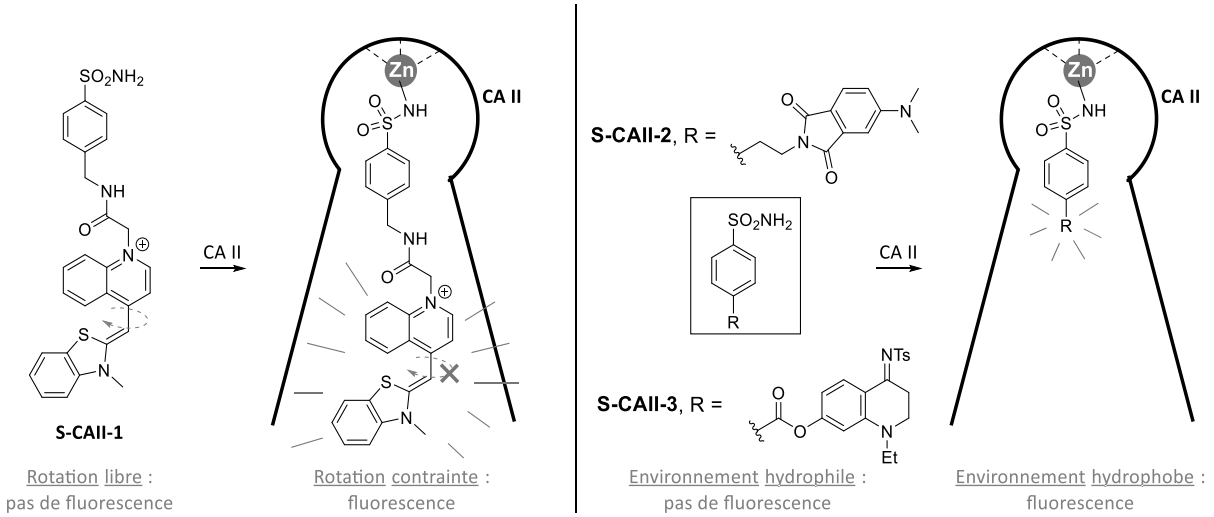


Figure 127. Structures et modes d'activation des propriétés de fluorescence de récentes sondes à CA II.

D'autre part, les propriétés de fluorescence des protéines possédant au moins un résidu tryptophane (Trp, λ_{ex} = 280 nm, λ_{em} ≈ 305 à 355 nm selon protéine)[554] ont pu être

[552] Lai, H.-P.; Gao, R.-C.; Huang, C.-L.; Chen, I.-C.; Tan, K.-T. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 16197–16200.

[553] (a) Metha, R.; Qureshi, M. H.; Purchal, M. K.; Greer, S. M.; Gong, S.; Hgo, C.; Que, E. L. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 5442-5445. (b) Chou, C.-H.; Wu, C.-Y.; Chen, C.-L.; Kao, Y.-C.; Chen, H.-Y.; Lin, P.-C. *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 11307-11310.

[554] Vivian, J. T.; Callis, P. R. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2093–2109.

utilisées afin de de développer de nouvelles sondes spécifiques des protéines ciblées grâce à des phénomènes de FRET intrinsèques (iFRET).[555] Ainsi, la protéine ciblée va jouer le rôle du fluorophore donneur (FD) et le ligand se trouvant en son sein de fluorophore accepteur (FA). En effet, pour que le iFRET puisse fonctionner, la distance séparant le FD et le FA ne doit pas excéder 10 nm, sachant que plus cette dernière est courte et plus le phénomène sera amplifié.[556] Par ailleurs, il est également nécessaire que le recouvrement FD/FA entre la longueur d'émission du FD et la longueur d'absorption du FA soit le plus important possible afin d'assurer un transfert d'énergie suffisamment efficace (Figure 138).[557] Ceci implique donc que la longueur d'onde d'absorption du FA soit relativement basse, c'est-à-dire vers 350 nm. De plus, si le FA possède un déplacement de Stokes assez important, cela va limiter les phénomènes de réabsorption du flux d'émission et donc favoriser l'intensité de fluorescence observable.

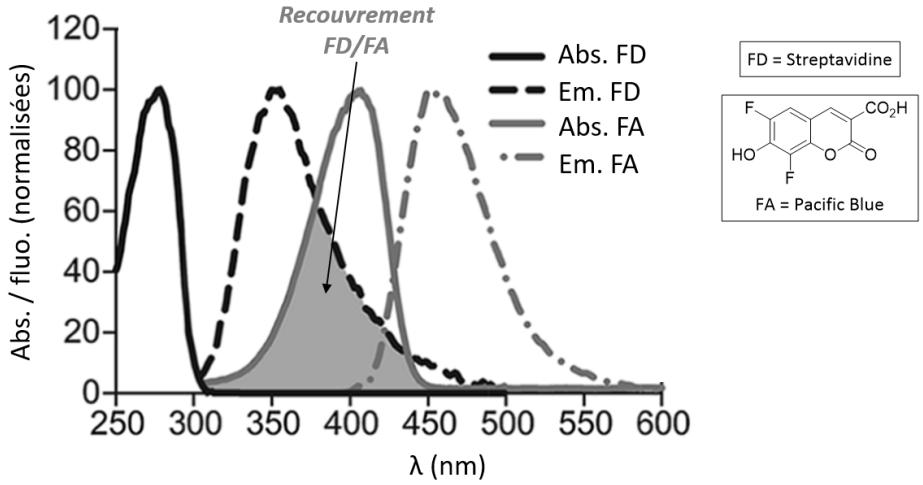


Figure 128. Superposition des spectres d'absorption et d'émission de la streptavidine (FD) et du Pacific Blue (FA) dans un système iFRET (Figure extraite et modifiée de l'article[557]).

Des composés comprenant le motif dansyl (λ_{ex} = 330 nm, λ_{em} = 560 nm) ont été fréquemment employées comme sondes iFRET avec la *b*CA II (λ_{ex} = 280 nm, λ_{em} = 310-330 nm) et notamment pour l'étude des interactions d'autres ligands en compétition.[541] Il est donc clairement apparu que le ligand **235** découvert par KTGS possédait un profil spectral (λ_{ex} = 350 nm, λ_{em} = 510 nm) et une interaction avec la *b*CA II tout à fait adaptés pour réaliser du iFRET.

[555] Ghisaidoobe, A. B. T.; Chung, S. J. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 22518–22538.

[556] Kim, J. H.; Sumranjit, J.; Kang, H. J.; Chung, S. J. *Mol. BioSyst.* **2014**, *10*, 30–33.

[557] Lee, M. M.; Peterson, B. R. *ACS Omega* **2016**, *1*, 1266–1276.

La superposition des spectres d'émission (λ_{ex} = 280 nm) obtenus lors des expériences de iFRET entre la *b*CA II (2,5 µM) et ligand **235** (*Z*/*E* = 69/31 ; 1 µM) ont permis de confirmer que ce phénomène photo-physique avait bien lieu entre ces deux partenaires, même si une fluorescence résiduelle du ligand seul a pu être constatée (Figure 129, **A**). En effet, l'augmentation d'un facteur quatre de l'intensité de fluorescence du ligand en présence de la *b*CA II (courbe orange *vs.* courbe verte), avec en parallèle une diminution de l'intensité de fluorescence de la protéine (courbe orange *vs.* courbe violette) sont caractéristiques du iFRET. Par ailleurs, l'ajout d'ATZ (100 µM) comme inhibiteur compétitif dans le milieu a permis de supprimer cet effet de iFRET et un retour à l'intensité de fluorescence basale du ligand **235** a pu être observée (courbe orange *vs.* courbe bleue). Ceci prouve bien que l'interaction du ligand dans le site actif de l'enzyme permet le iFRET. Cette interaction est également visible grâce à un décalage de la longueur d'onde d'émission du ligand de 510 à 495 nm, ce qui correspond bien à un changement de la polarité environnante (cavité enzymatique) autour du ligand. Cet effet est en adéquation avec le solvatochromisme positif observé précédemment. Par ailleurs, il est à noter qu'un recouvrement total de l'émission de fluorescence de l'enzyme n'a pas pu être observé même après suppression du iFRET (courbe bleue *vs.* courbe violette). En fait, l'ATZ possède une bande d'absorption centrée sur 262 nm et s'étalant jusqu'à environ 300 nm. Il est donc possible que le large excès d'ATZ puisse en partie absorber le rayonnement à 280 nm et donc inhiber l'émission de la *b*CA II en empêchant son excitation lumineuse.

L'efficacité (E_{FRET}) du transfert d'énergie *via* le mécanisme de iFRET entre le ligand et l'enzyme a pu être mesurée grâce aux intensités de fluorescence de la *b*CA II seule en solution (I_{FD}, courbe violette) et en présence d'une quantité au moins stœchiométrique du ligand (I_{FDA}, courbes orange et rouge), afin de saturer l'ensemble des sites actifs dans le milieu (Figure 129, **B**). La valeur de l'E_{FRET} se calcule alors simplement *via* la formule $E_{FRET} = 1-(I_{FDA}/I_{FD})$.[557] La quasi-parfaite superposition des spectres d'émission de la *b*CA II à 330 nm pour des concentrations de 2 µM (1 éq.) et 4 µM (2 éq.) en ligand (courbes orange et rouge, Figure 129 **B**) indique une saturation totale des sites actifs des enzymes en solution. Ainsi, des E_{FRET} de 85 et 86% ont été trouvées respectivement *via* les deux expériences, ce qui est relativement élevé par rapport à

d'autres cas rencontrés dans la littérature et dont les valeurs se trouvent généralement comprises entre 10 et 50% avec d'autres protéines.[556,557,558]

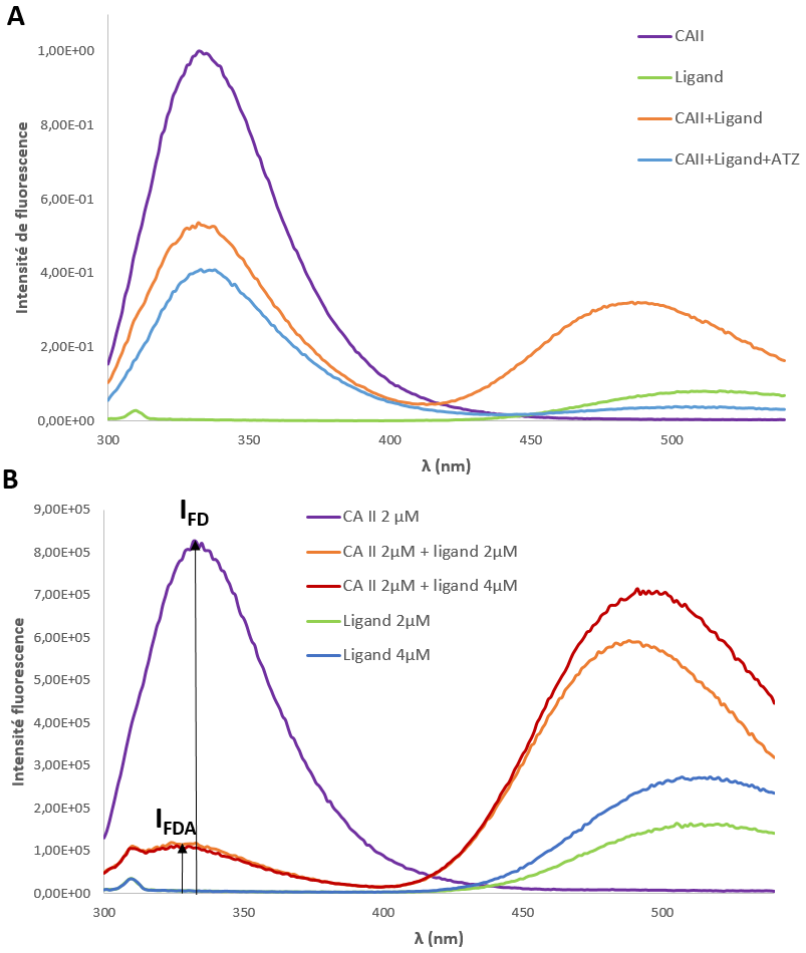


*Figure 129. (**A**) Expérience de iFRET entre la CA II (2,5 µM) et le ligand **235** (Z/E = 69/31 ; 1 µM) dans le PB pH 7,4 (λ_{ex} = 280 nm). (**B**) Mesure de l'efficacité du iFRET entre la CA II (2 µM) et le ligand **235** (Z/E = 69/31 ; 2 ou 4 µM) dans le PB pH 7,4 (λ_{ex} = 280 nm).*

Suite à ces premiers résultats très encourageants, la spécificité du iFRET entre la *b*CA II et le ligand a dû être vérifiée en incubant ce dernier avec d'autres protéines de natures variées et possédant des résidus tryptophanes.[553(b)] Le tableau suivant indique le nom et l'origine, l'abréviation, la classe ou la famille et le nombre de résidus tryptophanes de chaque protéine sélectionnée pour le test de spécificité (Tableau 19).

[558] Kang, H. J.; Kim, J. H.; Chung, S. J. *Biosens. Bioelec.* **2015**, *67*, 413–418.

Nom	Abréviation	Classe ou famille	Résidus tryptophanes
Anhydrase carbonique II (bovin)	*b*CA II	Lyase	7
Carboxylestérase (porcin)	*p*CE	Estérase	12
Lysozyme (œuf)	LYZ	Hydrolase	6
Albumine de sérum (bovin)	BSA	Albumine	3
Concanavaline A (haricot sabre)	ConA	Lectine	4
Papaïne (papaye)	/	Protéase	7

Tableau 19. Description des protéines sélectionnées pour les tests de spécificité.

Le ligand **235** *Z* (1 µM) a ainsi été incubé pendant 15 minutes dans le noir et à 25 °C en présence de chaque protéine (2,5 µM) dans du PB pH 7,4 avant de réaliser les spectres d'émission suivant le même protocole que précédemment en iFRET (λ_{ex} = 280 nm). Dans chaque cas, le ratio des intensités de fluorescence mesurées en présence de protéine (**F**) et du ligand seul en solution ($\mathbf{F_0}$) ont été reportés ci-dessous (Figure 130). Chaque expérience a été répétée trois fois pour les diverses protéines et les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type des trois mesures correspondantes. Finalement, cette expérience a permis de confirmer la spécificité du iFRET entre le ligand **235** *Z* et la *b*CA II grâce à un ratio $\mathbf{F/F_0} \approx 6$, contre ≈ 2 pour la BSA (interactions hydrophobes non-spécifiques) et environ 1 pour les autres protéines. De plus, le décalage de la bande d'émission du ligand de 510 à 495 nm a à nouveau été observé en présence de la *b*CA II, ce qui n'a en revanche pas été le cas pour les autres protéines, et ce qui confirme l'interaction entre le ligand et le site actif de l'enzyme.

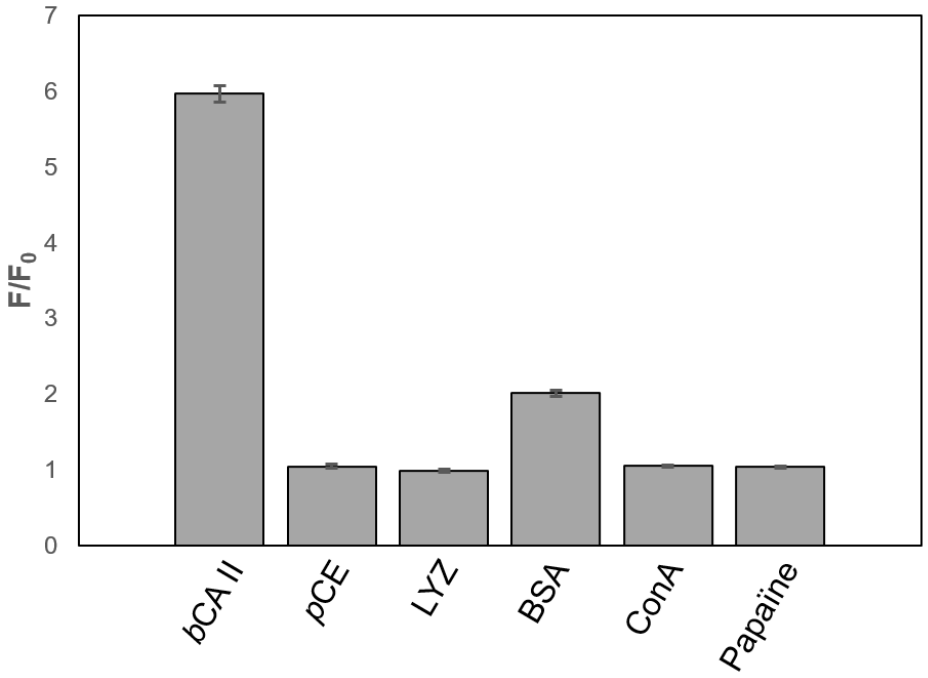


*Figure 130. Étude la spécificité de l'iFRET entre le ligand **235** (Z) et la* b*CA II vis-à-vis de diverses protéines. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type de trois expériences indépendantes.*

IV – Conclusion

Les études présentées au cours de ce chapitre ont donc permis de confirmer l'éligibilité de la réaction de thiol-yne entre des partenaires thiol et alcyne terminal en KTGS grâce à l'établissement d'une première preuve de principe en employant la *b*CA II comme enzyme modèle.

Ces résultats ont ainsi abouti à la découverte d'un nouveau ligand de la *b*CA II comportant un motif éther de thiovinyle de configuration *Z*. L'activité inhibitrice de chacun des deux isomères *Z* et *E* a pu être déterminée et s'est révélée être quelque peu moins importante que celle de l'ATZ, un composé référence pour cette enzyme. Il y aurait également un très léger effet additif sur l'activité biologique issu de la formation du lien covalent entre les deux fragments de départ, même si la liaison éther de thiovinyle ainsi formée n'apporte pas de contribution significative à l'activité du ligand.

Par ailleurs, des propriétés de photoisomérisation du ligand **235** formé en KTGS ont également été identifiées, avec une bonne efficacité de photoisomérisation de *Z*→*E* (approximativement de 80%). D'autre part, des résultats préliminaires montrent que la

photoisomérisation serait réversible (*E*→*Z*) mais de manière moins efficace. Des études théoriques sont actuellement en cours afin de comprendre les résultats expérimentaux observés, et de proposer des composés photoisomérisables plus efficaces et réversibles dans cette nouvelles famille d'éthers de thiovinyle.

Enfin, une étude spectroscopique de ces nouveaux ligands *Z* et *E* a mis en évidence des propriétés d'émission de fluorescence qui ont pu être caractérisées et étudiées. Il est apparu que ces composés possédaient des caractéristiques intéressantes pour être utilisés comme sondes de iFRET permettant la détection spécifique de protéines ciblées, ce qui a pu être confirmé à l'aide de diverses expériences de spécificité du site actif de la *b*CA II et de sélectivité vis-à-vis d'autres protéines.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Les travaux de thèse qui ont été présentés au cours de ce manuscrit s'articulent autour du développement de nouvelles stratégies permettant de répondre à différentes limitations rémanentes en KTGS, à savoir 1) le développement de nouvelles réactions compatibles avec cette stratégie et 2) l'augmentation de la détectabilité des ligands potentiellement formés afin d'éviter les faux négatifs et/ou d'accélérer les processus de criblages, parfois longs, en permettant une détection plus rapide des composés d'intérêts.

Ainsi, après avoir présenté l'état des lieux des stratégies de criblages par fragments (Chapitre I), la première partie des travaux de cette thèse (chapitre II) repose sur l'étude de réactions de cycloadditions de Diels-Alder (CDA) entre les maléimides et les diènes biocompatibles. L'objectif de cette étude était double, car il s'agissait premièrement de compléter certaines connaissances manquantes dans la bibliographie concernant cette classe de réaction chimiosélective utilisée pour la construction (bio)moléculaires, notamment en termes de cinétiques réactionnelles et de stabilité des conjugués. Ces résultats ont permis d'établir un classement par réactivité des différents diènes étudiés, ainsi que d'évaluer la réversibilité des cycloadduits en conditions physiologiques ainsi que leur stabilité dans du plasma sanguin. Sur les sept composés modèles préparés, un seul s'est montré réversible (cycloadduit du furane) et seulement deux ont été partiellement hydrolysés par incubation dans le plasma sanguin humain. Le deuxième objectif était d'identifier de potentiels candidats parmi les diènes étudiés pour des applications en KTGS, notamment pour la stratégie de réactions séquentielles « Click & Fish » afin de former le ligand au sein de la cible, puis de le marquer spécifiquement à l'aide d'une sonde pro-fluorescente comportant un motif tétrazine (Schéma 227).

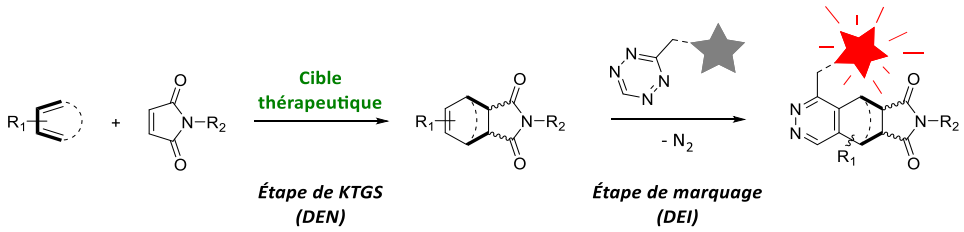


Schéma 227. « Click & Fish » : séquence réactionnelle de CDA permettant l'assemblage du ligand en présence de la cible et puis le marquage de ce dernier par un fluorophore.

Bien que les études préalables de notre équipe pour l'étape de marquage aient conduit à des résultats très satisfaisants, en particulier pour la réactivité séquentielle, l'étude des diènes biocompatibles présentée dans ce manuscrit n'a pas permis d'identifier de candidat

idéal. En effet, les critères évalués comme importants pour la KTGS, à savoir la taille des dienes, la cinétique des réactions de Diels-Alder, leur réversibilité et la stabilité des cycloadduits correspondants ont finalement conduit à écarter tous les dienes étudiés. Cependant, la publication des résultats obtenus dans le journal *Organic & Biomolecular Chemistry* a permis de les valoriser dans le domaine de la ligation chimiosélective, qui trouve de nombreuses applications dans les biotechnologies, la chimie bioorganique ou encore la science des matériaux et des polymères.

Au cours du chapitre III, et toujours dans le cadre de la stratégie de « Click & Fish », une autre séquence réactionnelle biocompatible a été imaginée pour améliorer la détection de *hit* obtenu en KTGS. Elle repose sur une première réaction de formation d'un motif pyrazolone qui serait catalysée par l'AChE (Etape de KTGS, Schéma 228, **A**), dont la nucléophilie peut être rapprochée de celle des thiols. La pyrazolone serait formée à partir de fragments β-cétoester et hydrazine, et l'enzyme cible AChE a été déjà été employées à plusieurs reprises en KTGS, notamment pour la lutte contre la maladie d'Alzheimer. La seconde réaction de marquage des pyrazolones potentiellement formées nous a amené à rechercher une sonde pro-fluorescente capable de réagir spécifiquement avec les pyrazolones grâce à une fonction à fois électrophile et permettant de désactiver de l'émission de fluorescence du fluorophore. Finalement, les meilleurs résultats de déclenchement de fluorescence ont été obtenus avec la 4-méthyl-7-nitroso-2*H*-chromen-2-one **S7** qui avait été développée en 2015 par notre équipe pour la détection spécifique du sulfure d'hydrogène (Schéma 228, **B**).[423]

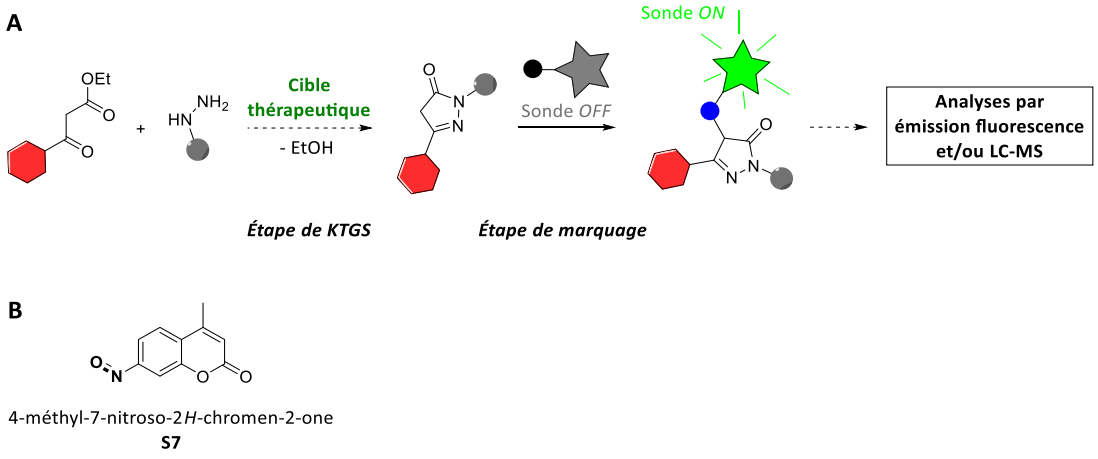


*Schéma 228. (**A**) Principe de l'approche de « Click & Fish »* via *la formation* in situ *d'un cycle pyrazolone suivi par une étape de marquage spécifique du ligand formé par une sonde pro-fluorescente. (**B**) Structure de la sonde **S7**.*

Toutefois, la synthèse des réactifs β-cétoester et hydrazine destinés à être employés lors des expériences de KTGS s'est avérée relativement complexe et ces composés n'ont pas pu être obtenus, ce qui n'a pas permis de réaliser la preuve de concept en KTGS pour cette stratégie, principalement à cause de la complexité structurale qu'impose la cible choisie, l'AChE. Ces travaux nous ont cependant permis d'établir une stratégie qui pourra faire l'objet d'une étude ultérieure au laboratoire en utilisant une cible biologique moins exigeante en terme de structure des ligands, à savoir par exemple la CA II. En effet, deux β-cétoesters possédant des fonctions sulfonamides (**240** et **241**) et possédant potentiellement une affinité pour la *b*CA II ont pu être préparés, ce qui a terme pourrait permettre une étude d'éligibilité de la formation de pyrazolone en KTGS, puis de tenter le marquage fluorescent des *hits* grâce à la sonde **S7** afin d'obtenir la séquence réactionnelle complète (Schéma 229).

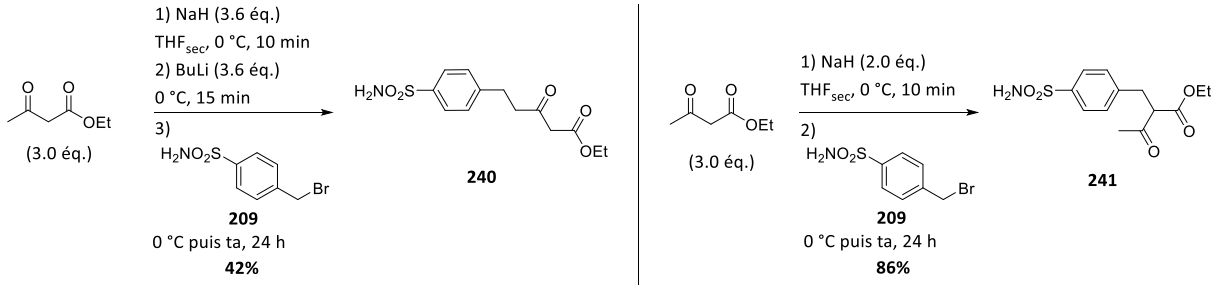


Schéma 229. Synthèses de β-cétoesters en prévision d'une future preuve de concept de « Click & Fish » grâce à la b*CA II.*

Alternativement, une stratégie de pré-marquage a également été mise en place, dont la finalité est également d'augmenter la détectabilité des ligands formés *via* un marquage par un marqueur de masse, en cohérence avec la stratégie de « Click & Fish ». Pour cela, l'un des fragments réactifs a été fonctionnalisé par une petite fonction chimique discrète (azoture) afin de minimiser son impact sur l'affinité globale du fragment. Une fois la réaction de formation du ligand catalysée par la cible biologique réalisée, l'idée était de pouvoir incorporer un marqueur de masse sur la fonction discrète par formation d'un ion phosphonium et ainsi d'augmenter la détectabilité des produits formés par spectrométrie de masse. Cette étude a permis de découvrir que les aminophosphoniums formés en conditions douces (compatibles avec la KTGS) à partir d'azotures aromatiques et d'une phosphine commerciale, la *tris*(2,4,6-triméthoxyphényl)phopshine, étaient des marqueurs de masses particulièrement stables et efficaces en terme de détection (Schéma 230). Bien que cette approche ait été exemplifiée avec neuf azotures aromatiques différents, la faible vitesse de formation des

aminophosphoniums s'est avérée insuffisante pour pouvoir être utilisée dans les conditions de dilution imposées par la KTGS.

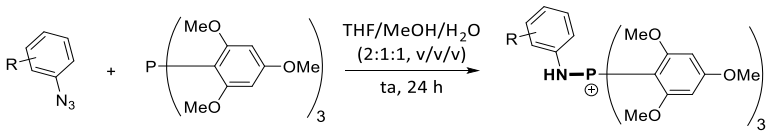


Schéma 230. Pré-marquage : méthode de formation d'aminophosphoniums stables développée lors des travaux de thèse.

Bien que les aminophosphoniums aient été écartés de ce projet de pré-marquage, une autre sonde comprenant un motif phosphonium hautement détectable par analyse MS et un motif bicyclononyne permettant de réagir sélectivement et plus rapidement avec les azotures (réaction de SPAAC) a été préparée (Figure 131). Les premiers tests de marquage et de détection à basses concentrations ont été fructueux. Malheureusement, aucune preuve de principe en KTGS n'a pu être encore effectuée, car l'obtention des ligands de référence de l'AChE pré-marqués par un azoture s'est révélée difficile, principalement au niveau des purifications des différents produits synthétisés.

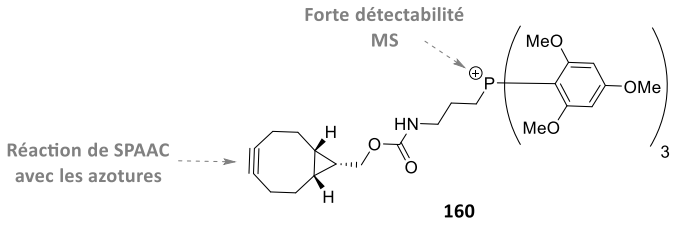


*Figure 131. Structure de la sonde **160** préparée dans le cadre de la stratégie de pré-marquage par une fonction azoture.*

Afin de palier les difficultés synthétiques qui ont été rencontrées au cours de la première partie de ce projet de thèse, un changement de cible thérapeutique serait s'est avéré souhaitable, comme pour la stratégie « Click & Fish » mentionnée précédemment, afin d'avoir un accès plus rapide et plus facile aux fragments réactifs. En effet, les ligands décrits en KTGS avec la *b*CA II sont structuralement bien plus simples que ceux de l'AChE. L'introduction d'une fonction azoture sur un fragment connu dans la bibliographie peut être imaginée, afin de réaliser le marquage du ligand correspondant grâce à la sonde **160** et de pouvoir comparer l'efficacité de la détection MS (Schéma 231).

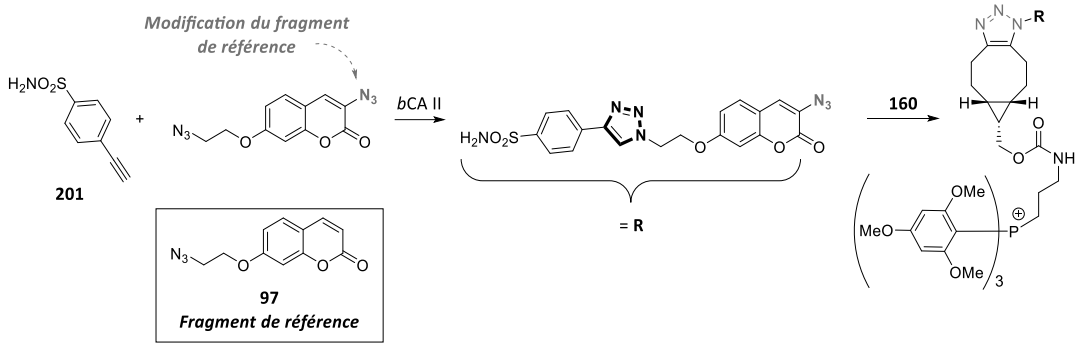


Schéma 231. Proposition de modification d'un fragment de référence pour l'élaboration d'une preuve de principe pour le projet de pré-marquage grâce à la b*CA II.*

Finalement, le dernier chapitre (IV) de cette thèse a abouti sur la découverte d'une nouvelle réaction éligible en KTGS, la réaction de thiol-yne, en employant la *b*CA II comme cible thérapeutique modèle. Ainsi, un nouveau ligand possédant un lien éther de thiovinyle a pu être identifié au cour du criblage et l'étude de stabilité en conditions physiologiques de ce composé est encore en étude au laboratoire. Les deux isomères de ce composé possèdent des activités inhibitrices proches de celle du composé de référence commercial (**ATZ**) vis-à-vis de la *b*CA II. Par ailleurs, des propriétés de photoisomérisation, dont les conditions de réversibilité sont en cours de finalisation, ont pu être mises en évidences avec ces nouveaux ligands. De même, des propriétés d'émission de fluorescence ont pu être observées et mises à profits dans des expériences de iFRET en présence de la *b*CA II. Une collaboration avec l'équipe du Pr. Laurent Joubert (Université de Rouen-Normandie) a été récemment été initiée dans le but d'étudier et d'expliquer les phénomènes de photoisomérisation et de fluorescence de ces nouveaux ligands grâce à des calculs théoriques de DFT, et de les appliquer à cette nouvelle classe de composés photoisomérisables.

Ces différents résultats ont soulevé plusieurs questions fondamentales sur la KTGS, et ont ouvert la voie sur de multiples perspectives pour de nouveaux projets :

1) Le contrôle de l'activité biologique grâce à la photoisomérisation a connu de multiples développements comme abordé dans le chapitre IV. En effet, la « géométrie » d'une molécule, ou plus globalement d'un système (bio)moléculaire, peut être contrôlée de manière spatiale et temporelle par un stimulus lumineux, permettant *in fine* le contrôle de tout un ensemble de processus biologiques. Or, il a également été très récemment décrit que l'encapsulation (confinement spatial) d'azobenzènes dans des « cages » organiques permettait d'abaisser la vitesse du processus de photoisomérisation, notamment en raison de

l'augmentation de la durée de vie de l'état excité S1 *via* une restriction de la mobilité rotationnelle au sein de la molécule et par la création de nouveaux chemins de relaxation vers l'état fondamental S_0.[559] Ce ralentissement de la photoisomérisation par effet *template* peut ainsi avoir une véritable incidence sur la cinétique d'isomérisation du système étudié et devenir à terme un facteur cinétiquement limitant. Il serait intéressant de vérifier si un tel effet de restriction de la photoisomérisation pourrait être induit par la présence de la *b*CA II en solution avec le ligand *Z*. Pour cela, une étude de la photoisomérisation de ce ligand en présence de la *b*CA II a été réalisée au laboratoire. Bien que les résultats préliminaires (non décrits dans le manuscrit) soient non fructueux, alternativement, la durée de vie de l'état excité avec et sans l'enzyme (non réalisable au laboratoire sur nos composés) permettrait de conclure quant à l'influence de cette dernière sur le processus de photoisomérisation.

2) L'emploi de matériels biologiques bruts (cellules, fluides biologiques …) comme source directe de cibles thérapeutiques est en plein essor dans le domaine de la KTGS (voir en chapitre I d'introduction générale). Ainsi, les résultats positifs obtenus lors des expériences d'iFRET entre la *b*CA II et de ses ligands éthers de thiovinyle ont conduit à imaginer un nouveau mode de détection spécifique de la formation de ces composés en KTGS *via* l'emploi de cette technique, qui semble dotée d'une bonne sensibilité (Schéma 232). En effet, cette stratégie pourrait être compatible avec des expériences de criblages menées *in cellulo* et dans des formats HTS. Une preuve de principe pourrait effectivement être réalisée à l'aide d'érythrocytes bovins (cellule entière ou en lysat cellulaire) comme source biologique de *b*CA II, cette dernière étant particulièrement exprimée dans le cytosol des hématies. Après incubation des partenaires thiol **44** et alcyne terminal **225** en présence de la source biologique de *b*CA II, l'emploi d'un rayonnement d'excitation (λ_{ex} = 280 nm) pourrait permettre de visualiser les rayonnements d'émissions des protéines (λ_{em} = 310 – 450 nm) et surtout celui du ligand **235** (λ_{em} = 495 – 510 nm) dans le cas où celui-ci se serait formé au sein de la *b*CA II et y serait complexé. Cette stratégie éliminerait au passage l'émission de fluorescence résiduelle des ligands formés en solution ou non complexés. Par ailleurs, il a pu être déterminé que la très faible émission de fluorescence de la coumarine **225** (λ_{em} = 385) se trouvait confondue avec celles de la *b*CA II pour une excitation à λ_{ex} = 280 nm, ce qui limiterait les interférences avec le ligand lors de la détection de ce dernier par iFRET. Parallèlement, une

[559] Otolski, C. J.; Raj, A. M.; Ramamurthy, V.; Elles, C. G. *Chem. Sci.* **2020**, 11, 9513–9523.

expérience de contrôle pourrait être effectuée afin de s'assurer que la *b*CA II soit bien à l'origine de la formation du ligand. Pour cela, un excès d'ATZ pourrait être additionné dans le milieu avant l'incubation des réactifs, ce qui empêcherait ces derniers d'accéder au site actif de l'enzyme, saturé en ATZ, et donc de conduire à la formation du ligand **235**. De cette manière, l'émission de fluorescence du ligand (λ_{em} = 495 – 510 nm) par iFRET ne devrait alors pas être détectée.

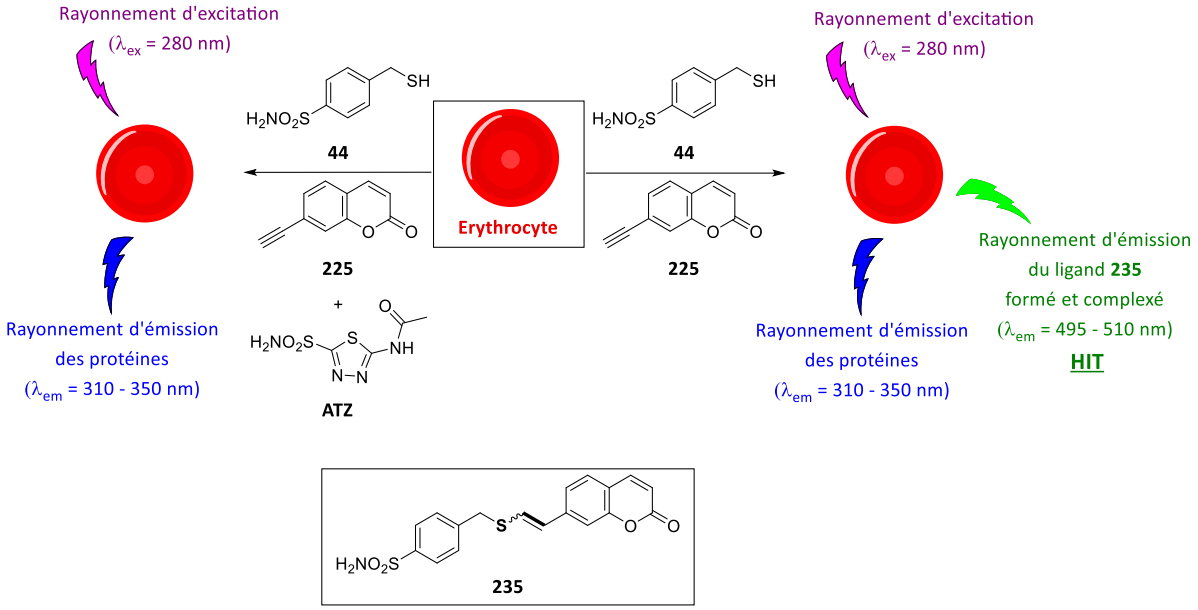


Schéma 232. Principe d'expérience de KTGS à l'aide d'érythrocytes bovins comme source de bCA II *avec une détection de hit* via *une émission de fluorescence survenant par iFRET.*

3) L'emploi de thiols en KTGS peut être fortement limité en raison de l'instabilité bien connue de ces composés en milieu biologique, qui sont sensibles à l'oxydation en présence d'oxygène en solution qui conduit à la formation des ponts disulfures correspondants. En 2014, notre équipe avait développé une cascade enzymatique en employant les propriétés estérase de l'AChE afin d'hydrolyser un thioester et de libérer le partenaire thiol *in situ*, ce dernier pouvant alors réaliser l'addition de Michael sur un acrylamide par effet *template* de l'enzyme. Dans la continuité de cette stratégie, un système coopératif à deux enzymes a cette fois été imaginé afin de compenser les propriétés quasi-nulles d'estérase de la *b*CA II vis-à-vis du dithiocarbonate **210** et du thioester **242** (Schéma 233). Sur l'ensemble des biomolécules testées, les estérases AChE et carboxylestérase porcine se sont avérées être les plus efficaces afin de libérer rapidement le thiol **44** *via* l'hydrolyse du thioester **242**. Cependant, aucun résultat probant n'a pu encore être obtenu en KTGS avec ce système coopératif et une étude plus approfondie doit être réalisée, notamment pour optimiser les concentrations relatives

des deux enzymes nécessaires pour réaliser chacune des deux transformations. A terme, si l'efficacité de cette stratégie en conditions *in vitro* était démontrée, des applications pourraient être envisagées à partir de matrices biologiques brutes complexes comme source de cibles thérapeutiques, la déprotection du thiol pouvant être assurée par diverses estérases ubiquitaires présentes dans le milieu cellulaire par exemple.

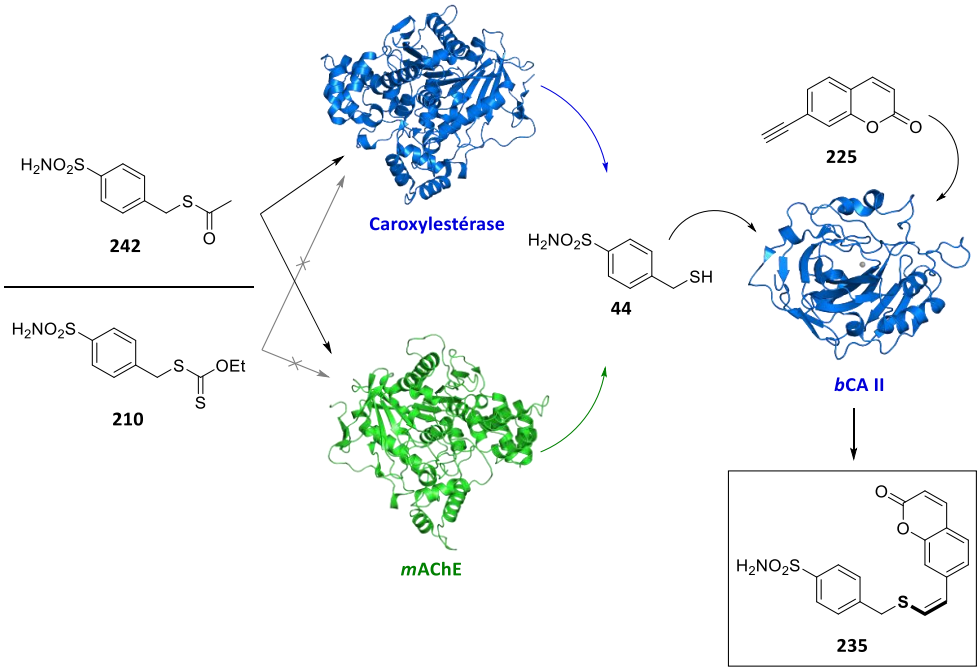


Schéma 233. Principe d'un système coopératif bi-enzymatique permettant la libération in situ *du partenaire thiol avant son emploi pour la formation du ligand par la cible thérapeutique.*

4) La modulation des propriétés de fluorescence (longueurs d'onde d'excitation et d'émission, déplacement de Stokes) des ligands **235** *Z* et *E* a également été envisagée *via* un design de la partie fluorophore des composés, et plus précisément au niveau des groupements accepteurs. Grâce aux corrélations des propriétés spectroscopiques du ligand **235** avec la série des 7-hydroxycoumarines sélectionnées, les structures de divers composés comprenant un motif éther de thiovinyle comme groupement électrodonneur ont été imaginées afin de mener cette étude de modulation des propriétés photophysiques (Figure 132). Ces modifications pourraient notamment permettre un décalage des longueurs d'absorption dans le domaine du visible et d'émission au-delà de 500 nm, ce qui serait un outil précieux pour l'étude de milieux biologiques par exemple. D'autre part, des modifications réalisées sur le noyau phényle de la coumarine sur les positions 6 et/ou 8, voire par un changement de fluorophore, permettraient peut-être de dissocier les propriétés spectrales des deux isomères

(notamment les transitions π→π*), et ainsi avoir un contrôle réversible et efficace de la photoisomérisation. Des travaux *in silico* à ce sujet sont à l'étude avec l'équipe du Pr. Joubert.

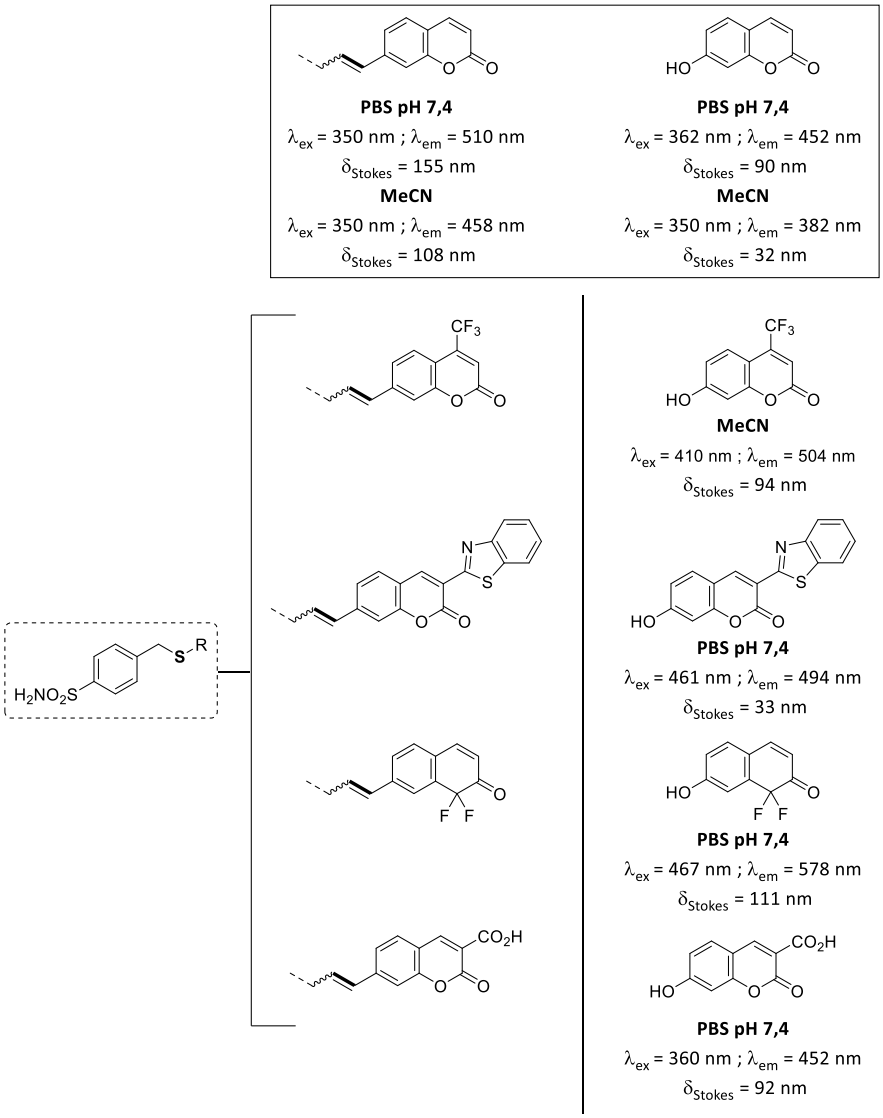


Figure 132. Exemples de structures de fluorophores imaginées pour la modulation des propriétés photophysiques des éthers de thiovinyle par corrélation avec les composés de références.

5) Les conditions relativement douces de formation des liens éthers de thiovinyle (0,3 éq. DBU, MeCN, ta, 3 h) comme dans le cas du ligand **235** se sont révélées relativement proches des conditions employées pour la synthèse de peptides sur résine (DIPEA, DMF, ta…). Il pourrait donc être intéressant de vérifier que ce type de conditions soient compatibles pour la formation de ces fonctions éthers de thiovinyle. Dans l'affirmatif, cette réaction pourrait être employée en bioconjugaison pour le marquage ou la fonctionnalisation de peptides possédant des résidus cystéines (Schéma 234). Dans le cas où ces fonctions éthers de thiovinyle s'avéreraient stables dans les conditions de libération du peptide de la phase solide,

généralement dures (TFA), cette synthèse pourrait être appliquée directement en phase solide (résine) ce qui offrirait un gain de temps substantiel pour la préparation de ces composés. Par ailleurs, ce type de sonde présente l'avantage d'être un système très optimisé car relativement compact, avec un poids moléculaire modéré et le lien éther de thiovinyle faisant à la fois office de lien covalent entre les deux partenaires et de fonction électro-donneuse pour le système fluororescent.

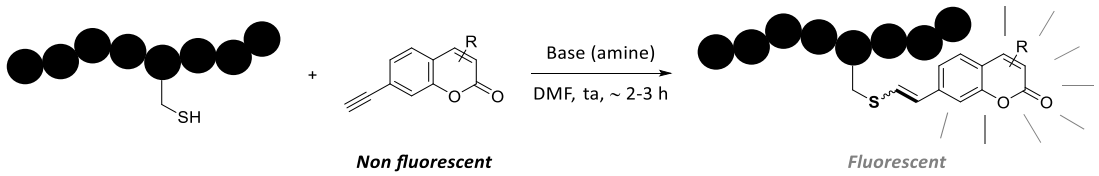


Schéma 234. Principe de fonctionnalisation de peptide à l'aide de la chaîne latérale de résidus cystéines.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

1. General remarks

Unless otherwise stated, all chemicals were used as received from commercial sources without further purification and were purchased from suppliers such as Merk-Sigma-Aldrich®, Alfa Aesar, Acros Organics, Interchim, Strem, etc. Et_3N and DIPEA were distilled over KOH and CaH_2, respectively. Solvents, unless otherwise stated, were purchased in reagent grade or HPLC grade and used as received. Dry solvents were obtained following standard procedures: DMF was purchased as dry solvent from Fisher Scientific and stored over molecular sieve 3 Å ; THF was distilled over Na/benzophenone ; CH_2Cl_2, MeCN, toluene and Et_2O were obtained from MB SPS-800 apparatus from MBRAUN ; *i*-PrOH, MeOH and acetone were stored for 24 hours (minimum) over molecular sieves (3 or 4 Å according to the solvent) prior to use . For non-aqueous reactions, flasks were dried under by heating with a thermal cleaner under vacuum. Cold bath (-78 °C) were prepared by cooling acetone with dry ice. Aqueous buffers such as PBS (pH 7.4, 0.1 M), Tris (pH 7.6, 0.05 M), PB (pH 7.4, 0.25 M) and aq. mobile phases for HPLC were prepared with water that was purified by means of a MilliQ system (purified to 18.2 MΩ cm). TFA (Alfa Aesar) and FA (Fisher Scientific or Acros Organics) for mobile phases were purchased in HPLC grade. For LC-MS analyses, ultra-pure water (Alfa Aesar, LC-MS quality) was employed for the preparation of mobile phases. All reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) and/or RP-HPLC. TLC were carried out on Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminum sheets. Visualization of spots was performed under a UV lamp at λ = 254 or 365 nm, and/or staining with a $KMnO_4$ solution/K_2CO_3 + 5% NaOH, developed with heat. Flash column chromatography purifications were performed manually on silica gel (40–63 μm) under pressurized air flow.

2. Instruments and methods

^1H, ^{13}C spectra were recorded on 300 MHz Bruker FT-NMR machine operating at ambient probe temperature. The solvent resonance was used as the internal standard for ^1H-NMR ($CDCl_3$ at 7.26 ppm ; acetonitrile-d_3 at 1.94 ppm ; acetone-d_6 at 2.05 ppm ; methanol-d_4 at 3.31 ppm ; DMSO-d_6 at 2.50) and ^{13}C-NMR ($CDCl_3$ at 77.0 ppm ;

acetonitrile-d_3 at 1.3 ppm ; acetone-d_6 at 29.8 ppm ; methanol-d_4 at 49.0 ppm ; DMSO-d_6 at 39.5). Chemical shift (δ) were quoted in parts per million (ppm). Coupling constants (J) were quoted in Hertz (Hz). The following abbreviations were used to give the multiplicity of the NMR signals: s: singlet, bs: broad singlet, d: doublet, t: triplet, dd: doublet of doublet, dt: doublet of triplet…

High Resolution Mass spectrometry (HRMS) was performed with a Waters Micromass LCT Premier XE® equipped with an orthogonal acceleration time-of-flight (oa-TOF) and an electrospray source in positive or negative mode.

Infrared (IR) spectra were recorded with a universal ATR accessory on a Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR spectrum 100 spectrometer. Bond vibration frequencies are expressed in reciprocal centimetre (cm^{-1}).

Melting points were recorded on a LEICA VMHB Kofler system at atmospheric pressure and without correction.

UV-Vis spectroscopy was performed on a Agilent Cary 60 UV-Vis® at 20 or 25 °C. Fluorescence spectroscopic studies (emission/excitation spectra and time course) were performed on a Varian Cary Eclipse® spectrophotometer or a Horiba Scientific Fluorolog® spectrophotometer, equipped with a Hamamatsu photomultiplier tube R13456 and a xenon 450 W illuminator, using a quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, 10 × 4 mm, pathlength 10 mm, chamber volume 3.5 mL or 1.4 mL). Excitation/emission spectra were recorded at 20, 25 or 37 °C. Fluorescence quantum yields (Φ_F) were measured at 25 °C by a relative method using 7-hydroxycoumarin (Φ_F = 0.76 in PBS pH 7.4 0.1 M) as standard (S). The following equation was used to determine the relative fluorescence quantum yield, where A is the absorbance (in the range of 0.01-0.1 A.U.), F is the area under the emission curve, n is the refractive index of the solvents (1.337 for PBS at 25 °C) used in measurements, and the subscripts s and x represent standard and unknown, respectively.

$$\Phi_F(x) = (A_S/A_X)(F_X/F_S)(n_X/n_S)^2\Phi_F(s)$$

The microwave reactions were performed with a Monowave 300 from Anton Paar apparatus using a G10 or a G30 vial as reaction vessel.

For *b*CA II inhibition assay, the inhibitory activity (IC_{50}) was evaluated spectrophotometrically using a SPARK® Tecan apparatus and 96 well microplates (Eppendorf). PNPA was recrystallized from EtOH prior to use and was stored at -25 °C.

Unless otherwise stated, a dedicated oven was employed for every incubation experiments at 37 °C.

3. Analytical and purification HPLC systems

Analytical systems

System A: RP-HPLC analyses were performed with a Thermo Scientific Ultimate® 3000 RS instrument, equipped with a diode array detector (DAD-3000RS) and temperature of the column compartment was fixed at 25 °C. Injection volume was 1 or 2 µL. A Thermo Fisher Hypersyl GOLD® column (1.9 µm, 2.1 × 50 mm) was used with a binary solvent system composed of MeCN and 0.1% aq. formic acid (aq. FA, pH 2) as eluents (linear gradient from 5 to 100% MeCN over 6 min; 100% MeCN for 1.5 min; linear gradient from 100 to 5% MeCN over 1.5 min ; 5% MeCN for 2 min) at a flow rate of 0.600 mL/min.

System B: RP-HPLC analyses were performed with a Thermo Scientific Ultimate® 3000 RS instrument, equipped with a diode array detector (DAD-3000RS) and temperature of the column compartment was fixed at 25 °C. Injection volume was 1 or 2 µL. An Agilent SB-C18® column (1.8 µm, 2.1 × 50 mm) equipped with a Phenomenex AJO-9000® pre-column, was used with a binary solvent system composed of MeCN and 0.1% aq. formic acid (aq. FA, pH 2) as eluents (linear gradient from 5 to 100% MeCN over 6 min; 100% MeCN for 1.5 min; linear gradient from 100 to 5% MeCN over 1.5 min ; 5% MeCN for 2 min) at a flow rate of 0.600 mL/min.

System C: RP-HPLC analyses were performed with a Thermo Electron Surveyvor® instruments, equipped with a PDA detector. A Thermo Fisher Hypersyl GOLD® column (5 µm, 2.1 × 100 mm) was used with a binary solvent system composed of MeCN and 0.1% aq. TFA (aq. TFA, pH 1) as eluents (0% MeCN for 5 min, linear gradient from 0 to 100% MeCN over 45 min; 100% MeCN for 10 min; linear gradient from 100 to 0% MeCN over 1 min and 0% MeCN for 10 min) at a flow rate of 0.250 mL/min. Injection volume was 5 to 15 µL.

System D: RP-HPLC-MS analysis were performed on a Agilent 1200 Series® and Bruker HCT ultra® instruments, equipped with a Thermo Fisher Accucore® C18 column (2.6 µM, 2.1 × 150 mm). Temperature was maintained to 22 °C. Injection volume was 4 µL.

UV detector (set at 254 nm) was coupled with a low-resolution MS detector (ESI/ion trap). Solvent system was composed of MeCN and 0.1% aq. formic acid (aq. FA, pH 2) as eluents (5% MeCN for 1 min, linear gradient from 5 to 100% MeCN over 14 min; 100% MeCN for 3 min; linear gradient from 100 to 5% MeCN over 1 min; 5% MeCN for 11 min) at a flow rate of 0.300 mL/min.

System E: RP-HPLC-MS analysis were performed on a Agilent 1200 Series® and Bruker HCT ultra® instruments, equipped with a Thermo Fisher Hypersil GOLD® column (3 µM, 2.1 × 100 mm). Temperature was maintained to 22 °C. Injection volume was 4 µL. UV detector (set at 254 nm) was coupled with a low-resolution MS detector (ESI/ion trap). Solvent system was composed of MeCN and 0.1% aq. formic acid (aq. FA, pH 2) as eluents (5% MeCN for 2 min, linear gradient from 5 to 69% MeCN over 16 min; 69%, linear gradient from 69 to 5% MeCN over 1 min; 5% MeCN for 8 min) at a flow rate of 0.400 mL/min.

Purification systems

System F: Semi-preparative RP-HPLC were performed with an Interchim PuriFlash® 4250 instument equipped with a UV-visible detector, and a Hypersil Gold® column (5 µm, 250 × 20 mm) with MeCN and 0.1% aq. FA as eluents (5% MeCN for 5 min, 5 to 100% MeCN over 48 min) at a flow rate of 18 mL/min.

System G: Semi-preparative RP-HPLC were performed with an Interchim PuriFlash® 4250 instument equipped with a UV-visible detector, and a Hypersil Gold® column (5 µm, 250 × 30 mm) with MeCN and 0.1% aq. FA as eluents (5% MeCN for 5 min, 5 to 100% MeCN over 63 min) at a flow rate of 40 mL/min.

System H: Semi-preparative RP-HPLC were performed with a Thermo Scientific SpectraSYSTEM SCM1000/P4000 equipped with a UV-visible detector, and a Varian Kromasil C18 column (10 µm, 21.2 x 250 mm) with MeCN and 0.1% aq. TFA as eluents (0% MeCN for 5 min, linear gradient from 0 to 100% MeCN over 100 min) at a flow rate of 18 mL/min.

System I: Semi-preparative RP-HPLC were performed with a Interchim PuriFlash® 4250 instument equipped with a UV-visible detector, and a Thermo Scientific Polar Advantage II column (5 µm, 250 × 201.1 mm) with MeCN and 0.1% aq. FA as eluents (from 40% to 70% MeCN over 30 min) at a flow rate of 16 mL/min.

<u>REMARK 1</u>:

Compound descriptions are classified according to the ordre of their appearance in the manuscript.

<u>REMARK 2</u>:

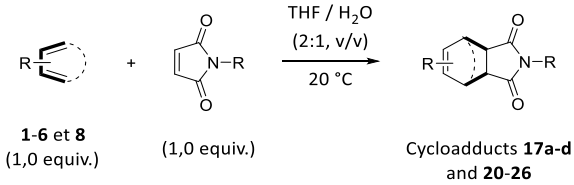
References in this experimental section are independant from the manuscript.

4. Procedures and molecular description for Chapter II

For Diels-Alder reaction in aqueous media (not buffered), MilliQ H_2O was used in the solvents system. Human blood plasma was furnished by the Centre Hospitalier Universitaire de Rouen and was collected under medical conditions and supervisions from unknown donors. (<u>CAUTION!</u> Human blood plasma is a biological substance that must be handled with care by trained personnel. Vials, needles, pipettes, etc. must be considered and treated as biological wastes).

Some compounds were synthesized by Dr. Kévin Renault and are indicated with a star symbol (*).

<u>General procedure for Diels-Alder reaction (GP-CDA)</u>:



To a solution of diene (1.0 equiv.) in THF/H_2O (1:1, v/v) in a round bottom flask was added a solution of corresponding maleimide in THF (1.0 equiv.) and the reactionnal mixture was stirred at room temperature until completion (hours to days according to diene). The resulting proportion of solvents was THF/H_2O (2:1, v/v). After completion, the reactionnal mixture was diluted with water and extracted with EtOAc (× 3). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The corresponding crude cycloadducts were purified according to specified procedure.

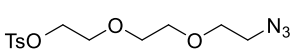
General procedure for the study of retro-Diels-Alder reaction of conjugates 85-91 under physiological conditions:

500 µL of a stock solution of the conjugate **85**-**91** (2 mg of corresponding conjugate in 1 mL of iPrOH), were added to a 1 mL Eppendorf containing *N*-acetylcysteine (10 equiv.) in PBS pH 7.4 (500 µL). Then, the mixture was incubated at 37 °C for 24 h. Aliquots for LC-MS analyses were prepared as follows: to the reaction mixture (100 µL) were added *i*-PrOH (50 µL) and H_2O (50 µL). Thioether **92** was only detected if maleimide **82** was formed from a retro-Diels-Alder process, and subsequently trapped by *N*-acetylcysteine through a thia-Michael addition. All aliquots were stored at -25 °C pending LC-MS analyses (System D).

General procedure for the study of conjugates 85-91 in human blood plasma (HBP):

50 µL of a stock solution of the conjugate **85**-**91** (1 mg of corresponding conjugate in a solution of 100 µL of DMSO/*i*-PrOH, 1:1, v:v) were added to an 2 mL Eppendorf containing HBP (500 µL). Then, the mixture was incubated at 37 °C for 24 h. The mixture (500 µL) was diluted with EtOH (500 µL, HPLC quality) which led to the formation of a precipitate. The mixture was centrifuged for 30 min at 11 000 rotations/min. Then, the supernatant was withdrawn with a syringe and filtered through an HPLC filter (porosity: 0.45 µm). Blank from HBP were prepared following the same procedure without Diels-Alder product. All aliquots were stored at -25°C pending LC-MS analyses (System D).

2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate – 70



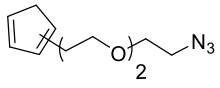
$C_{13}H_{19}N_3O_5S$
MW 329,37

To a solution of 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethanol (2.5 g, 14.3 mmol, 2 equiv.) in dry acetonitrile (20 mL), were successively added Et_3N (8.47 mL, 62.7 mmol, 4.4 equiv.) and TsCl (1.36 g, 7.1 mmol, 1.0 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. After completion, a saturated solution of NH_4OH was poured onto the reaction mixture, followed by brine. The aqueous layer was extracted with EtOAc (× 3). The combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$, and evaporated under vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 90:10, v/v) to provide the desired product (2.32 g, 7.03 mmol, 99% yield) as a yellow oil.

NMR analysis is in accordance with literature data.[1]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.82 – 7.76 (m, 2H), 7.37 – 7.30 (m, 2H), 4.19 – 4.13 (m, 2H), 3.73 – 3.66 (m, 2H), 3.66 – 3.61 (m, 2H), 3.60 (s, 4H), 3.40 – 3.33 (m, 2H), 2.44 (s, 3H).

1-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl)cyclopenta-1,3-diene and 2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl)cyclopenta-1,3-diene - 60



$C_{11}H_{17}N_3O_2$
MW 223,28

To a solution of freshly distilled cyclopentadiene (380 µL, 4.56 mmol, 3 equiv.) in dry THF (5 mL) cooled at 0 °C, under argon atmosphere, was added sodium hydride (60% w/w in mineral oil, 182 mg, 4.56 mmol, 3 equiv.) in one portion into the reaction mixture, which became rapidly dark red. After 15 min, the homogenous mixture was cooled at -78 °C, and a solution of 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate **70** (500 mg, 1.52 mmol, 1 equiv.) in dry THF (5 mL) was introduced dropwise to the mixture. After stirring at – 78 °C for 1 h, the reaction mixture was allowed to warm to 0 °C over 2 h. After completion, the mixture was filtered through a pad of celite and the precipitate was washed four times with EtOAc and DCM. The filtrate was concentrated under vacuum to give a brown solid, which was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 90:10, v/v) to provide the desired product (227 mg, 0.95 mmol, 67% yield) as a light yellow oil.

Two inseparable isomers were observed by NMR in a 1:1 ratio and are reported below:

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 6.44 (ddq, *J* = 12.0, 3.1, 1.5 Hz, 3H), 6.27 (ddd, *J* = 5.3, 2.7, 1.4 Hz, 1H), 6.24 – 6.19 (m, 1H), 6.11 – 6.05 (m, 1H), 3.71 – 3.59 (m, 16H), 3.38 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H), 2.94 (dtd, *J* = 4.2, 2.9, 1.5 Hz, 4H), 2.94 (dtd, *J* = 4.2, 2.9, 1.5 Hz, 4H), 2.75 – 2.63 (m, 4H), 1.66 (s, 1H), 1.34 – 1.18 (m, 1H).

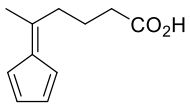
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 146.0, 143.6, 134.7, 133.8, 132.4, 131.1, 127.7, 127.4, 77.5, 77.1, 76.7, 71.3, 70.8, 70.7, 70.3, 70.2, 70.1, 50.7, 43.8, 41.4, 31.0, 30.3.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 2924, 2865, 2099, 1745, 1709, 1442, 1346, 1284, 1110, 928, 811.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{11}H_{21}N_4O_2$ $[M+H]^+$: 241.1665 ; found : 241.1664.

[1] Eising, S.; Lelivelt, F.; Bonger, K. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016***, 55*, 12243–12247.

5-(cyclopenta-2,4-dien-1-ylidene)hexanoic acid – 61



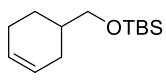
$C_{11}H_{14}O_2$
MW 178,23

To a solution of freshly distilled cyclopentadiene (1 mL, 12.5 mmol, 2.5 equiv.) in MeOH (5 mL) under agron atmosphere was added 5-oxohexanoic acid (0.6 mL, 5 mmol, 1 equiv.). Then, a solution of pyrolidine (42 µL, 0.5 mmol, 0.1 equiv.) in Et_3N (0.98 mL, 7.25 mmol, 1.45 equiv.) was added to the medium within 10 min. and the reactional mixture was stirred at room temperature overnight. After completion, the mixture was quenched by dilution with EtOAc and MeOH was evaporated under vacuum. Remanining organic layer was washed (× 3) with a solution of $HCl_{aq.}$ (6 M)/brine (1:1, v/v) and brine (× 3), and was dried over $MgSO_4$. Solvent was evaporated under vacuum to afford a crude product which was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 90:10 and 80:20 v/v) to provide the desired product (350 mg, 1.96 mmol, 39% yield) as a yellow solid.

NMR analysis is in accordance with literature data.[2]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 11.33 (bs, 1H), 6.58 – 6.40 (m, 4H), 2.64 – 2.54 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.40 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.02 – 1.85 (dt, *J* = 7.5, 7.5 Hz, 2H).

***tert*-butyl(cyclohex-3-en-1-ylmethoxy)dimethylsilane – 71**



$C_{13}H_{26}OSi$
MW 226,43

To a solution of cyclohex-3-en-1-ylmethanol (2.00 g, 17.8 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (8 mL) under argon atmosphere, was added imidazole (2.43 g, 35.7 mmol, 2 equiv.). The reaction mixture was cooled to 0 °C and then, *tert*-butyldimethylsilyl chloride (3.23 g, 21.4 mmol, 1.2 equiv.) was added. After 5 min, the reaction was allowed to warm to room temperature and was stirred for 1 h. After completion, the reaction was quenched with water (80 mL) and the resulting mixture was extracted with Et_2O (3 × 40 mL). The combined organic layer was washed with water and brine and was dried over $MgSO_4$, and evaporated under vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane) to provide the desired compound (3.65 g, 16.1 mmol, 95% yield) as a colorless liquid.

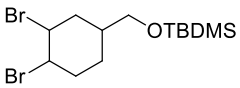
NMR analysis is in accordance with literature data.[3]

[2] Coşkun, N.; Erden, I. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 8607 – 8614.

[3] Steven, V.; Graham, D. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3781–3787.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 5.67 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 3.49 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 3.47 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 2.13 – 1.98 (m, 3H), 1.84 – 1.64 (m, 3H), 1.32 – 1.16 (m, 1H), 0.89 (s, 9H), 0.04 (s, 6H).

<u>*tert*-butyl((3,4-dibromocyclohexyl)methoxy)dimethylsilane – 72</u>



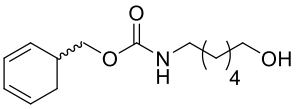
$C_{13}H_{26}Br_2OSi$
MW 386,24

To a solution of tert-butyl(cyclohex-3-en-1-ylmethoxy)dimethylsilane **71** (500 mg, 2.2 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (5 mL), cooled to 0 °C under argon atmosphere, was added $NaHCO_3$ (185 mg, 2.2 mmol, 1.0 equiv.). A solution of bromine (0.12 mL g, 2.42 mmol, 1.2 equiv.) in DCM (3 mL) was added dropwise at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 2 h after the addition of bromine solution. Then, reaction was quenched with a mixture of saturated aqueous solutions of $Na_2S_2O_3$ and Na_2CO_3 (1:1, v/v). The resulting mixture was extracted with EtOAc (× 3). The combined organic layer dried over $MgSO_4$, and evaporated under vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 95:5, v/v)) to provide the desired compound (270 mg, 0.70 mmol, 32% yield) as a light yellow oil.

NMR analysis is in accordance with literature data.[3]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 4.75 – 4.69 (m, 1H), 4.69 – 4.63 (m, 1H), 3.48 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.56 – 2.34 (m, 1H), 2.28 – 2.12 (m, 1H), 2.07 (dddd, *J* = 9.1, 6.7, 3.2, 1.4 Hz, 1H), 2.01 – 1.86 (m, 2H), 1.68 – 1.54 (m, 2H), 0.90 (s, 9H), 0.05 (m, 6H).

<u>cyclohexa-2,4-dien-1-ylmethyl (6-hydroxyhexyl)carbamate – 62</u>



$C_{14}H_{23}NO_3$
MW 253,34

To a solution of tert-butyl((3,4-dibromocyclohexyl)methoxy)dimethylsilane **72** (685 mg, 1.77 mmol, 1 equiv.) in dry THF (25 mL), at room temperature and under argon atmosphere, was added Aliquat 336 (0.02 mL, 0.035 mmol, 0.02 equiv.). *t*BuOK (436 mg, 3.89 mmol, 2.2 equiv.) was rapidly added in one portion to the mixture, which was stirred for 3 h. After, completion, the reaction was quenched with water and saturated aqueous solution of NH_4Cl. The resulting mixture was extracted with EtOAc (2 × 30 mL). The combined organic layer dried over $MgSO_4$, and evaporated under vacuum. The crude product was partially purified by a rapid flash-column chromatography (silica gel,

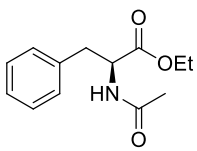
cyclohexane) and a light yellow oil was obtained, which was directly engaged in the next step. To a solution of tert-butyl(cyclohexa-2,4-dien-1-ylmethoxy)dimethylsilane (≈ 1.77 mmol, 1 equiv.) in dry methanol (10 mL), at 0 °C and under argon atmosphere, was added acetyl chloride (0.02 mL, 0.27 mmol, 0.15 equiv.). After 30 min, the solvent was evaporated under vacuum. The crude product was partially purified by a rapid flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 8:2, v/v) and a light yellow oil was obtained, which was in part directly engaged in the next step. To a solution of cyclohexa-2,4-dien-1-ylmethanol (255 mg, 2.32 mmol, 1.0 equiv.) in dry MeCN (8 mL) under argon atmosphere and room temperature, was added *di*(1H-imidazol-1-yl)methanone (451 mg, 2.78 mmol, 1.2 equiv.). The reaction was stirred for 1 h at room temperature. After that time, 6-aminohexan-1-ol (326 mg, 2.78 mmol, 1.2 equiv.) was added and the reaction was stirred overnight. After completion, the solvent was removed by vacuum. The crude residue was dissolved in DCM (20 mL) and was washed with H_2O (2 × 20 mL), then brine (20 mL). The organic layer was dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 60:40, v/v) to provide the desired racemic product (56 mg, 0.22 mmol, 49% yield) as a white solid.

<u>Note</u>: Aromatized analog was observed by ^{1}H NMR (6%) but was inseparable from the title compound by flash-column chromatography, RP-HPLC (Systems A and B) or recrystallization in water.

NMR analysis is in accordance with literature data.[3]

^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ_H 6.19 (bs, 1H), 6.00 – 5.60 (m, 4H), 4.01 – 3.85 (m, 2H), 3.58 – 3.47 (m, 2H), 3.11 (dd, *J* = 13.0, 6.9 Hz, 2H), 2.68 – 2.48 (m, 1H), 2.30 – 2.16 (m, 2H), 1.60 – 1.25 (m, 8H).

<u>(*S*)-ethyl 2-acetamido-3-phenylpropanoate – 73</u>



$C_{13}H_{17}NO_3$
MW 235,28

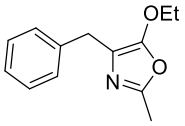
To a solution of phenylalanine (1.48 g, 9 mmol, 1.0 equiv.) in EtOH (15 mL) was added thionyl chloride (0.99 mL, 13.5 mmol, 1.5 equiv.) at 0 °C. After addition, the mixture was relfuxed for 5 h and after that time, solvent and residual thionyl chloride were removed by vacuum. The residual solid was then tritured with Et_2O and the solid was filtered with a Büchner and was

washed again with Et_2O. The intermediary ester was obtained (2.00 g, mmol, 97% yield) as a white solid. Next, it was dissolved in THF (30 mL) and the mixture was cooled to 0 °C. Et_3N (2.67 mL, 19.2 mmol, 2.2 equiv.) was added and acetic anhydride (1 mL, 10.5 mmol, 1.2 equiv.) was added dropwise. The mixture was stirred for 1 h at 0 °C and 4 h at room temperature. After completion, the reaction was quenched with a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ and extracted with EtOAc (× 3). The combined organic layers was washed with brine, dried with $MgSO_4$ and solvents were removed under vacuum. The crude product was filtered through a plug of silica gel using EtOAc and the desired product (1.984 g, 8.43 mmol, 97% yield) was obtained as a white solid.

NMR analysis is in accordance with literature data.[4]

^{1}H NMR (300 MHz, MeOD) δ_H 7.32 – 7.29 (m, 2H), 7.26 – 7.20 (m, 3H), 4.65 (dd, *J* = 8.7, 6.1 Hz, 1H), 4.15 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.15 (dd, *J* = 13.8, 6.1 Hz, 1H), 2.98 (dd, *J* = 13.8, 8.7 Hz, 1H), 1.94 (s, 3H), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

4-benzyl-5-ethoxy-2-methyloxazole – 67



$C_{13}H_{15}NO_2$
MW 217,26

To a solution of (S)-ethyl 2-acetamido-3-phenylpropanoate (1.00 g, 4.25 mmol, 1 equiv.) in dry toluene (10 mL), was added $POCl_3$ (0.61 mL, 6.38 mmol, 1.5 equiv.). The mixture was heated at 80 °C for 3 h. After completion, the reaction mixture was cooled to room temperature and poured onto a cold saturated aqueous solution of $NaHCO_3$. The aqueous layer was extracted with EtOAc (× 2). The combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$, and evaporated under vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 70:30, v/v) to provide the desired product (691 mg, 3.18 mmol, 75 % yield) as a yellow oil.

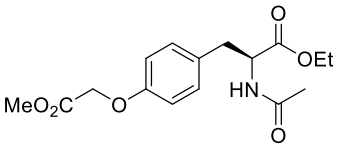
NMR analysis is in accordance with literature data.[5]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.32 – 7.13 (m, 5H), 4.07 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.71 (s, 2H), 2.30 (s, 3H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

[4] Tobisu, M.; Yamakawa, K.; Shimasaki, T.; Chatani, N. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2946–2948.

[5] Sabot, C.; Oueis, E.; Brune, X.; Renard, P.-Y. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 768–770.

(*) ethyl (*S*)-2-acetamido-3-(4-(2-methoxy-2-oxoethoxy)phenyl)propanoate – 74



$C_{16}H_{21}NO_6$
MW 323,35

To a solution of ethyl acetyl-L-tyrosinate (1.454 g, 6.2 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (7.2 mL), was added K_2CO_3 (1.5 g, 12.4 mmol, 2 equiv.). The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min, then methyl 2-iodoacetate (1.17 mL, 12.4 mmol, 2 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. The solution was diluted with EtOAc and the resulting solution was washed with water (× 5), dried over $MgSO_4$, and evaporated under vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 50:50, v/v) to provide the desired compound (1.095 g, 3.39 mmol, 61% yield) as a white powder.

m.p. = 56 °C

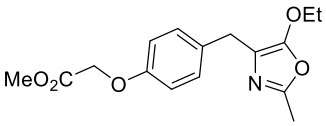
^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.02 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.82 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 5.94 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.81 (dt, *J* = 7.8, 5.8 Hz, 1H), 4.60 (s, 2H), 4.16 (tt, *J* = 7.2, 3.7 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.06 (dd, *J* = 5.7, 1.8 Hz, 2H), 1.98 (s, 3H), 1.24 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 171.7, 169.7, 169.3, 156.8, 130.3, 129.2, 114.5, 65.2, 61.3, 53.2, 52.1, 36.9, 22.9, 14.0.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3312, 1736, 1635, 1514, 1374, 1294, 1225, 1198, 1138, 1077, 1006, 862.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{16}H_{22}NO_6$ $[M+H]^+$: 324.1447 ; found : 324.1459.

(*) methyl 2-(4-((5-ethoxy-2-methyloxazol-4-yl)methyl)phenoxy)acetate – 75



$C_{16}H_{19}NO_5$
MW 305,33

To a solution of ethyl (*S*)-2-acetamido-3-(4-(2-methoxy-2-oxoethoxy)phenyl)propanoate **74** (500 g, 1.54 mmol, 1 equiv.) in dry toluene (5 mL), was added $POCl_3$ (187 mL, 2.01 mmol, 1.3 equiv.). The resulting reaction mixture was stirred at 80 °C for 4.5 h. After completion, the solution was added dropwise to a solution of aq. $NaHCO_{3\ sat.}$, and the resulting mixture was extracted with EtOAc (× 3). The combined organic layers were dried over MgSO4, and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 50:50, v/v) to provide the desired compound (454.2 mg, 1.49 mmol, 97% yield) as a pale yellow oil.

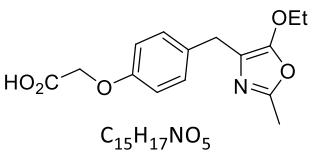
^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.17 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.87 – 6.78 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 4.59 (d, *J* = 0.9 Hz, 2H), 4.07 (qd, *J* = 7.1, 1.2 Hz, 2H), 3.79 (d, *J* = 1.4 Hz, 3H), 3.63 (s, 2H), 2.29 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H), 1.31 (td, *J* = 7.1, 1.2 Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 169.61, 156.38, 153.98, 152.55, 132.97, 129.71, 115.96, 114.74, 70.47, 65.59, 52.28, 30.16, 15.11, 14.40.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 2993, 2955, 1760, 1669, 1612, 1586, 1510, 1438, 1375, 1348, 1269, 1204, 1176, 1085, 1022, 953, 909.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{16}H_{20}NO_5$ $[M+H]^+$: 306.1341 ; found :306.1341.

(*) 2-(4-((5-ethoxy-2-methyloxazol-4-yl)methyl)phenoxy)acetic acid – 68



$C_{15}H_{17}NO_5$
MW 291,30

To a solution of methyl 2-(4-((5-ethoxy-2-methyloxazol-4-yl)methyl)phenoxy)acetate **75** (200 mg, 0.644 mmol, 1 equiv.) in THF (6 mL), were successively added deionized water (0.91 mL) and LiOH (31 mg, 1.31 mmol, 2 equiv.). The resulting reaction mixture was stirred at 70 °C for 3 h. After completion, the reaction mixture was cooled to room temperature and glacial AcOH was added (150 mL, 2.62 mmol, 4 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The solution was then diluted with deionized water and extracted with EtOAc (× 3), and the combined organic layers were dried over $MgSO_4$, and solvent were removed by vacuum. The crude product was co-evaporated several times with toluene (× 5) to reach the desired compound (137 mg, 0.47 mmol, 72% yield) as a colorless oil.

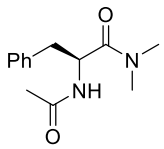
^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 11.43 (s, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.85 – 6.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.53 (s, 2H), 4.09 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.65 (s, 2H), 2.33 (s, 3H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 171.94, 156.59, 153.94, 153.64, 132.15, 129.69, 115.42, 114.69, 70.76, 65.47, 29.32, 15.06, 13.85.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 2927, 2507, 1739, 1673, 1612, 1583, 1510, 1440, 1375, 1250, 1207, 1177, 1112, 1078, 1013, 976, 909.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{15}H_{16}NO_5$ $[M+H]^+$: 290.1028 ; found : 290.1033.

(*S*)-2-acetamido-N,N-dimethyl-3-phenylpropanamide – 76



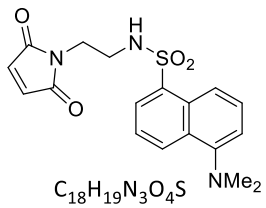
$C_{13}H_{18}N_2O_2$
MWe 234,30

To a solution of acetyl-L-phenylalanine (500 mg, 2.41 mmol, 1 equiv.) in DMF (24 mL) was added TSTU (800 mg, 2.66 mmol, 1.1 equiv.) and the mixture was stirred for 15 min at room temperature. Then, dimethylamine hydrochloride (393 mg, 4.82 mmol, 2 equiv.) and DIPEA (0.84 mL, 4.82 mmol, 2 equiv.) were added successively into the reactional mixture. After completion, the reaction was quenched with H_2O and was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine (× 4), dried over $MgSO_4$ and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, DCM/EtOAc as gradient from 10:0 to 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5 and 0:10, v/v) to provide the desired compound (178 mg, 0.76 mmol, 32% yield) as a white powder.

NMR analysis is in accordance with literature data.[6]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.35 – 7.07 (m, 5H), 6.44 (bs, 1H), 5.14 (td, *J* = 8.3, 5.7 Hz, 1H), 3.02 (dd, *J* = 13.1, 5.6 Hz, 1H), 2.97 (dd, *J* = 13.1, 5.9 Hz, 1H), 2.86 (s, 3H), 2.61 (s, 3H), 1.98 (s, 3H).

(*) 5-(dimethylamino)-N-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl)naphthalene-1-sulfonamide – 79



$C_{18}H_{19}N_3O_4S$
MW 373,43

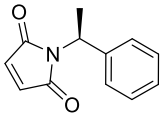
To a solution of 1-(2-amino-ethyl)-pyrrole-2,5-dione hydrochloride (113 mg, 0.81 mmol, 2.2 equiv.) and dansyl chloride (100 mg, 0.37 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (6 mL) was added DIPEA (142 µL, 0.82 mmol, 2.2 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. After completion, the reaction was poured onto water and the aqueous layer was extracted with DCM (× 3). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, DCM/EtOAc 90:10, v/v) to provide the desired compound (97 mg, 0.26 mmol, 70 % yield) as an amorphous yellow solid.

[6] Siodłak, D.; Broda, M. A.; Rzeszotarska, B.; Dybała, I.; Kozioł, A. E.; *J. Peptide Sci.* **2003**, *9*, 64–74.

NMR analysis is in accordance with literature data.[7]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 8.51 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.24 – 8.15 (m, 2H), 7.53 (ddd, *J* = 10.1, 8.6, 7.5 Hz, 2H), 7.17 (dd, *J* = 7.6, 0.6 Hz, 1H), 6.34 (s, 2H), 5.07 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 3.53 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.16 (dd, *J* = 11.5, 6.0 Hz, 2H), 2.88 (s, 6H).

(*S*)-1-(1-phenylethyl)-1H-pyrrole-2,5-dione – 82



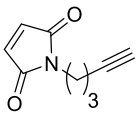
$C_{12}H_{11}NO_2$
MW 201,23

To a solution of *(R)*-1-phenylethanol (500 mg, 4.09 mmol, 1 equiv.) in dry THF (15 mL) and under argon atmosphere, cooled to 0 °C, were successively added PPh_3 (1.180 g, 4.5 mmol, 1.1 equiv.) and di*iso*propyl azodicarboxylate (0.88 mL, 4.5 mmol, 1.2 equiv.). The reaction was stirred for 15 min at 0 °C, then 1H-pyrrole-2,5-dione (597 mg, 6.14 mmol, 1.5 equiv.) was introduced into the reaction mixture, which was stirred for 30 min at 0 °C, and overnight at room temperature. After completion, the solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 90:10, v/v) to provide the desired compound (278 mg, 1.38 mmol, 34% yield) as a yellow oil.

NMR analysis is in accordance with literature data.[8]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.43 – 7.37 (m, 2H), 7.34 – 7.21 (m, 3H), 6.61 (s, 2H), 5.34 (q, *J* = 7.4 Hz, 1H), 1.81 (d, *J* = 7.4 Hz, 3H).

1-(pent-4-yn-1-yl)-1*H*-pyrrole-2,5-dione – 83



$C_9H_9NO_2$
MW 163,18

To a solution of pent-4-yn-1-ol (980 mg, 10.1 mmol, 1 equiv.) and under argon atmosphere were successively added PPh_3 (2.65 g, 10.1 mmol, 1 equiv.) and di*iso*propyl azodicarboxylate (1.98 mL, 10.1 mmol, 1 equiv.). The reaction was stirred for 15 min at room temperature, then 1*H*-pyrrole-2,5-dione (980 mg, 10.1 mmol, 1 equiv.) was introduced into the mixture, which was refluxed for 24 h. After completion, the solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 95:5,

[7] Araújo, A. D. de; Palomo, J. M.; Cramer, J.; Seitz, O.; Alexandrov, K.; Waldmann, H. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6095–6109.

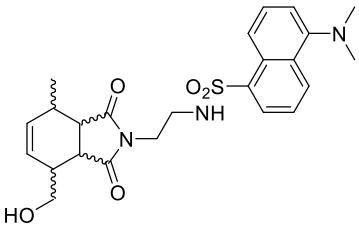
[8] Tokioka, K.; Masuda, S.; Fujii, T.; Hata, Y.; Yamamoto, Y. *Tetrahedron Asym.* **1997**, *8*, 101–107.

90:10, 80:20 and 70:30, v/v) to provide the desired compound (1.01 g, 6.2 mmol, 61% yield) as a light yellow solid.

NMR analysis is in accordance with literature data.[9]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 6.70 (s, 2H), 3.63 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.21 (td, *J* = 7.0, 2.6 Hz, 2H), 1.96 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 1.83 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H).

<u>Cycloadduct 84a</u>



$C_{24}H_{29}N_3O_5S$
MW 471,57

This compound was prepared according to GP-CDA. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, DCM/EtOAc as gradient from 10:0 to 9:1, 8:2 and 5:5, v/v) to provide the desired compound (22 mg, 0.047 mmol, 86% yield) as an amorphous light yellow solid.

R*f* (DCM/EtOAc, 5/5) = 0.20

Two stereoisomers were observed by NMR in a ratio 1/1.

^{1}H NMR (300 MHz, MeOD) δ_H 8.56 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.26 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.14 (dd, *J* = 7.3, 1.2 Hz, 1H), 7.63 – 7.52 (m, 2H), 7.29 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.69 (dt, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H), 5.61 (dt, *J* = 9.2, 2.9 Hz, 1H), 3.97 (dd, *J* = 11.1, 6.9 Hz, 1H), 3.86 (dd, *J* = 11.0, 8.1 Hz, 1H), 3.39 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.97 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.95 – 2.90 (m, 1H), 2.88 (s, 6H), 2.73 (dd, *J* = 8.4, 7.0 Hz, 1H), 2.41–2.30 (m, 2H), 1.34 (d, *J* = 7.4 Hz, 3H), 1.31 – 1.24 (m, 1H).

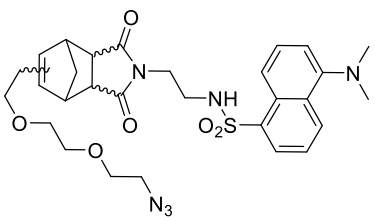
^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ_C 179.6, 179.2, 153.2, 136.8, 135.8, 131.2, 130.8, 130.3, 129.2, 124.4, 120.6, 116.5, 63.4, 46.2, 45.8, 43.8, 40.8, 40.1, 38.9, 32.2, 17.1.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3451, 3284, 2926, 2851, 1767, 1684, 1588, 1573, 1403, 1327, 1141, 975, 945, 789.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{24}H_{30}N_3O_5S$ $[M+H]^+$: 472.1906 ; found : 472.1895.

[9] Ourailidou, M. E.; Dockerty, P.; Witte, M.; Poelarends, G. J.; Dekker, F. J. *Org. Biomol. Chem.* **2015**,*13*, 3648–3653.

Cycloadduct 84b



$C_{29}H_{36}N_6O_6S$
MW 596,70

This compound was prepared according to GP-CDA. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, DCM/EtOAc as gradient from 10:0 to 9:1 and 8:2, v/v) to provide the desired compound (22 mg, 0.037 mmol, 92% yield) as a dark yellow foam.

R*f* (DCM/EtOAc, 8/2) = 0.28

At least two stereoisomers were observed by NMR in a ratio 1/0.83.

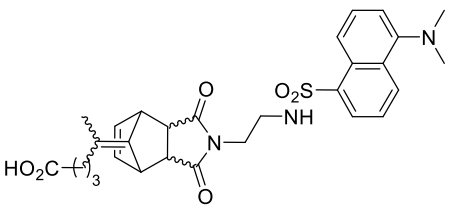
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 8.52 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 8.25 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.20 (ddd, *J* = 7.3, 3.4, 1.2 Hz, 2H), 7.59 (dd, *J* = 8.5, 7.7 Hz, 1.9H), 7.55 – 7.46 (m, 2.1H), 7.17 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 5.93 (dd, *J* = 5.7, 3.0 Hz, 0.8H), 5.80 (d, *J* = 5.6 Hz, 0.8H), 5.64 –5.50 (m, 1H), 5.38 – 5.30 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 5.11 (d, *J* = 5.6 Hz, 0.9H), 3.70 – 3.57 (m, 11H), 3.57 – 3.42 (m, 8H), 3.41 – 3.33 (m, 8H), 3.25 – 3.18 (m, 2H), 3.16 – 3.11 (m, 1H), 3.09 – 2.96 (m, 5H), 2.94 (dd, *J* = 2.8, 1.5 Hz, 2H), 2.87 (s, 11H), 2.36 – 2.02 (m, 5.9H), 1.74 – 1.64 (m, 2.7H), 1.41 (t, *J* = 9.4 Hz, 3H), 1.29 – 1.24 (m, 1.8H), 1.21 (t, *J* = 7.0 Hz, 1.9H), 1.14 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 0.92 – 0.77 (m, 2.9H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 178.3, 177.8, 177.7, 177.4, 152.0, 152.0, 146.9, 137.8, 134.5, 134.4, 134.2, 130.4, 130.4, 129.9, 129.9, 129.8, 129.4, 129.4, 128.4, 128.4, 126.3, 123.3, 119.0, 118.9, 115.2, 70.7, 70.5, 70.1, 70.0, 70.0, 69.9, 69.0, 68.7, 56.7, 55.7, 52.1, 50.7, 50.7, 48.9, 48.1, 47.3, 46.9, 45.7, 45.4, 45.2, 44.7, 41.9, 41.7, 37.5, 37.2, 31.1, 30.6, 29.7.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3276, 2925, 2868, 2100, 1769, 1692, 1588, 1574, 1396, 1329, 1143, 909, 790, 727.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{29}H_{36}N_6O_6S$ $[M+H]^+$: 597.2495 ; found: 597.2493.

Cycloadduct 84c



$C_{29}H_{33}N_3O_6S$
MW 551.66

This compound was prepared according to GP-CDA. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, DCM/EtOAc/MeOH as gradient from 10:0:0 to 9:1:0, 8:2:0, 7:3:0 and 5:4:1, v/v) to provide the desired compound (29 mg, 0.053 mmol, 91% yield) as a sticky yellow oil.

R*f* (DCM/EtOAc, 5/5) = 0.17

Two stereoisomers were observed by NMR in a ratio 1/1.

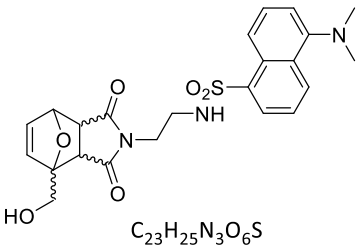
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 8.52 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.30 – 8.13 (m, 2H), 7.65 – 7.45 (m, 2H), 7.19 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.12 – 6.01 (m, 2H), 5.22 (bs, 1H), 3.76 – 3.63 (m, 2H), 3.40 (overlaped triplet, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.03 (dd, *J* = 11.4, 5.8 Hz, 2H), 2.98 – 2.89 (m, 1H), 2.85 (s, 6H, overlaped with multiplet at 2.84 ppm), 2.84 (m, 1H, overlaped with singlet at 2.85 ppm), 2.29 (overlaped triplet, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.70 (dt, *J* = 7.2, 7.2 Hz, 2H), 1.54 (s, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 178.4, 177.4, 177.3, 151.9, 148.7, 134.8, 134.7, 134.4, 130.4, 129.8, 129.4, 128.5, 123.3, 119.0, 118.96, 115.3, 113.9, 45.4, 45.1, 44.8, 44.4, 44.2, 41.6, 37.5, 32.9, 32.6, 22.6, 16.9.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3268, 2927, 2858, 2794, 2253, 1770, 1689, 1589, 1575, 1397, 1324, 1143, 909, 728.

HRMS (ESI-) Calculated for $C_{29}H_{34}N_3O_6S$ $[M+H]^+$: 552.2168 ; found : 552.2166.

<u>Cycloadduct 84d</u>



$C_{23}H_{25}N_3O_6S$
MW 471,53

This compound was prepared according to GP-CDA. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, DCM/MeOH as gradient from 100:0 to 99:1 and 98:2, v/v) to provide the desired compound (21 mg, 0.045 mmol, 82% yield) as an amorphous light yellow solid.

R*f* (DCM/EtOAc, 5/5) = 0.12

Two stereoisomers were observed by NMR in a ratio 1/0.34.

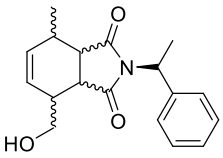
^{1}H NMR (300 MHz, MeOD) δ_H 8.61 – 8.51 (m, 1.4H), 8.27 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.26 (d, *J* = 8.7 Hz, 0.35H), 8.15 (dd, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 1.34H), 7.64 – 7.51 (m, 2.75H), 7.29 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 7.7 Hz, 0.36H), 6.52 – 6.46 (m, 0.67H), 6.35 (dd, *J* = 5.8, 1.6 Hz, 1H), 6.22 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 5.14 (dd, *J* = 5.5, 1.6 Hz, 1H), 5.03 (d, *J* = 1.0 Hz, 0.34H), 4.86 (s, 8H), 4.15 – 3.95 (m, 2.48H), 3.80 (d, *J* = 12.8 Hz, 0.33H), 3.45 (t, *J* = 6.5 Hz, 0.84H), 3.35 (s, 2.77H), 3.25 (dd, *J* = 7.6, 5.5 Hz, 1.35H), 3.06 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 3.05 (d, *J* = 6.1 Hz, 0.66H), 2.96 (t, *J* = 6.1 Hz, 2.25H), 2.88 (s, 6H), 2.86 (s, 2H), 2.60 (d, *J* = 6.4 Hz, 0.34H), 2.52 (d, *J* = 6.5 Hz, 0.34H).

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ_C 178.0, 176.9, 176.8, 176.6, 153.3, 138.8, 138.0, 136.7, 136.6, 136.2, 131.3, 131.26, 130.8, 130.77, 130.4, 130.35, 129.2, 124.4, 120.6, 116.6, 93.5, 92.9, 82.1, 80.4, 61.5, 60.8, 51.5, 46.7, 45.8, 40.9, 40.7, 39.4, 38.9.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3483, 3290, 2921, 2828, 1692, 1398, 1323, 1141, 789.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{23}H_{26}N_3O_6S$ $[M+H]^+$: 472.1542 ; found : 472.1541.

Cycloadduct 85



$C_{18}H_{21}NO_3$
MW 299,36

This compound was prepared according to GP-CDA. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 90:10, 80:20 and 70:30 v/v) to provide the desired compound (59 mg, 0.20 mmol, 79 % yield) as a pale yellow oil.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 5/5) = 0.22

Two stereoisomers were observed by NMR in a ratio 1/1.

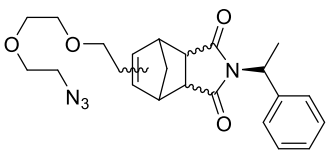
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.37 – 7.19 (m, 10H), 5.82 – 5.54 (m, 4H), 5.35 (q, *J* = 7.2Hz, 1H), 5.35 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.05 – 3.85 (m, 3H), 3.76 (t, *J* = 10.5 Hz, 1H), 3.28 (dd, *J* = 15.9, 7.4 Hz, 1H), 3.16 (bs, 1H), 3.00 (ddd, *J* = 8.6, 6.2, 5.0 Hz, 2H), 2.62 – 2.49 (m, 2H), 2.49 – 2.32 (m, 2H), 1.72 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.71 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.48 (d, *J* = 7.4 Hz, 3H), 1.43 (d, *J* = 7.4 Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 178.8, 178.7, 177.3, 177.2, 139.2, 139.2, 135.2, 135.2, 128.4, 128.3, 128.2, 128.2, 127.6, 127.5, 127.1, 127.1, 62.7, 62.7, 49.8, 44.7, 44.6, 42.6, 42.4, 38.2, 31.2, 16.7, 16.7, 16.5, 16.4.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{18}H_{22}NO_3$ $[M+H]^+$: 300.1600 ; found : 300.1609.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3437, 3090, 3065, 3034, 2969, 2934, 2878, 2847, 1764, 1687, 1452, 1363, 1225, 1189, 912, 727, 694.

Cycloadduct 86



$C_{24}H_{32}N_4O_4$
MW 426.51

This compound was prepared according to GP-CDA. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 90:10, 80:20 and

70:30, v/v) to provide the title compound (65 mg, 0.15 mmol, 90 % yield) as a white foam.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 5/5) = 0.52

At least four stereoisomers were observed by HPLC and confirmed by NMR in a ratio 0.95/0.7/1/1.

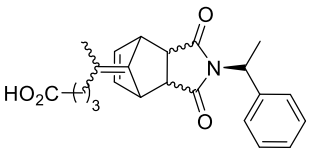
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.43 – 7.34 (m, 10H), 7.33 – 7.26 (m, 9H), 7.25 – 7.18 (m, 6H), 5.98 (dd, *J* = 5.6, 2.9 Hz, 1H), 5.89 – 5.81 (m, 2H), 5.70 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 5.60 – 5.55 (m, 1.7H), 5.50 (s, 1H), 5.23 (dd, *J* = 14.5, 7.6 Hz, 4.4H), 3.69 – 3.56 (m, 29.5H), 3.56 – 3.47 (m, 7.4H), 3.41 – 3.33 (m, 11.4H), 3.31 – 3.16 (m, 18.9H), 3.01 (dd, *J* = 7.3, 6.1 Hz, 2.2H), 2.42 – 2.26 (m,2.5H), 2.26 – 2.10 (m, 4.3H), 1.97 – 1.83 (m, 3.8H), 1.72 – 1.64 (m, 20.5H), 1.49 – 1.42 (m, 5.2H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 177.8, 177.7, 177.4, 177.4, 177.2, 177.2, 177.1, 177.1, 146.8, 146.7, 139.9, 139.6, 139.5, 137.8, 137.7, 134.1, 134.0, 128.2, 128.1, 128.0, 127.8, 127.6, 127.6, 127.5, 127.5, 126.5, 126.5, 70.6, 70.6, 70.0, 69.9, 69.9, 69.9, 69.0, 68.9, 68.7, 57.0, 56.9, 55.5, 55.5, 52.2, 50.6, 50.1, 49.6, 49.6, 49.5, 48.3, 47.9, 47.8, 46.9, 46.8, 46.6, 46.6, 45.5, 45.3, 45.3, 45.0, 45.0, 31.1, 31.1, 30.8, 30.4, 16.8, 16.3, 16.2, 16.0.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 2941, 2968, 2100, 1694, 1453, 1354, 1188, 1113, 913, 728, 698.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{23}H_{29}N_4O_4$ $[M+H]^+$: 425.2189 ; found : 421.2180.

<u>Cycloadduct 87</u>



$C_{23}H_{25}NO_4$
MW 379,46

This compound was prepared according to GP-CDA The crude product was purified twice by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 90:10, 80:20, 70:30 and 60:40, v/v) to provide the desired compound (72 mg, 0.19 mmol, 76% yield) as a colorless oil.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 6/4) = 0.16

Two stereoisomers were observed by NMR in a ratio 1/1.

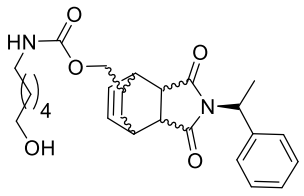
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 8.67 (bs, 1H), 7.40 – 7.33 (m, 2H), 7.33 – 7.23 (m, 3H), 6.17 – 6.09 (m, 1H), 6.02 – 5.94 (m, 1H), 5.26 (q, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.83 – 3.69 (m, 2H), 3.17 – 3.05 (m, 2H), 2.24 (overlaped triplet, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.97 (overlaped triplet, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.69 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H, overlaped with signal at 1.68 ppm), 1.68 (dt, *J* = 7.3, 7.3 Hz, 2H, overlaped with signal at 1.69 ppm), 1.55 (overlaped singlet, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C. 179.1, 177.0, 176.9, 148.7, 139.4, 134.6, 134.6, 134.5, 128.1, 127.6, 113.6, 50.0, 44.76, 44.72, 44.70, 44.66, 44.52, 44.46, 44.41, 44.35, 32.94, 32.60, 22.6, 16.9, 16.4.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 2939, 1766, 1693, 1378, 1354, 1219, 1188, 911, 835, 768, 729, 698.

HRMS (ESI-) Calculated for $C_{23}H_{24}NO_4$ $[M-H]^-$: 378.1705 ; found : 378.1703.

<u>Cycloadduct 88</u>



$C_{26}H_{34}N_2O_5$
MW 454,56

This compound was prepared according to GP-CDA. The crude product was purified twice by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 90:10, 80:20, 70:30 and 60:40, v/v) to provide the desired compound (48 mg, 0.11 mmol, 70% yield) as a white foam.

R*f* (EtOAc) = 0.49

Two stereoisomers were observed by NMR in a ratio 1/1.

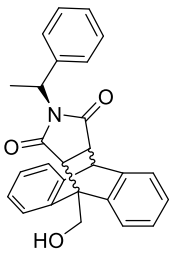
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.38 – 7.18 (m, 5H), 6.20 – 5.82 (m, 2H), 5.36 – 5.22 (m, 1H), 4.81 – 4.54 (m, 1H), 3.81 (dd, *J* = 10.8, 5.8 Hz, 1H), 3.62 (td, *J* = 6.5, 1.4 Hz, 2H), 3.59 – 3.47 (m, 1H), 3.25 – 3.03 (m, 4H), 2.86 – 2.67 (m, 2H), 2.18 – 1.96 (m, 1H), 1.94 – 1.74 (m, 1H), 1.68 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.61 – 1.44 (m, 4H), 1.44 – 1.27 (m, 5H), 1.27 – 1.17 (m, 1H), 0.98 – 0.70 (m, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 178.4, 178.4, 178.21, 156.4, 139.4, 133.0, 132.8, 130.1, 129.9, 128.1, 127.5, 127.4, 66.9, 62.6, 49.9, 43.8, 43.8, 43.4, 43.3, 40. 8, 35.9, 33.5, 32.5, 32.0, 29.9, 27.8, 27.8, 26.3, 25.3, 16.4, 16.4.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3358, 2931, 2860, 1687, 1528, 1453, 1361, 1234, 1190, 1056, 1024, 698.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{26}H_{35}N_2O_5$ $[M+H]^+$: 455.2546; found : 455.2538.

Cycloadduct 89



$C_{27}H_{23}NO_3$
MW 409,48

This compound was prepared according to GP-CDA. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 50:50, v/v) to provide the desired compound (56 mg, 0.14 mmol, 54 % yield) as a colorless solid.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 5/5) = 0.52

Two stereoisomers were observed by NMR in a ratio 0.8/1.

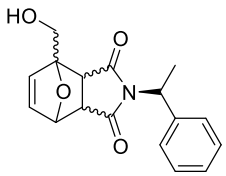
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.61 (dd, *J* = 5.2, 3.6 Hz, 1.7H), 7.40 – 7.30 (m, 2.7H), 7.29 – 7.26 (m, 1.1H), 7.26- 7.22 (m, 2.4H) 7.21 – 7.09 (m, 13.4H), 6.99 – 6.91 (m, 2H), 6.90 – 6.82 (m, 1.6H), 5.13 (dt, *J* = 12.8, 6.7 Hz, 1.3H), 5.07 – 4.84 (m, 4.2H), 4.76 (d, *J* = 3.3 Hz, 0.8H), 4.73 (d, *J* = 2.9 Hz, 0.9H), 3.35 – 3.20 (m, 3.6H), 2.70 (t, *J* = 6.3 Hz, 1.1H), 2.67 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 1.31 (d, *J* = 7.3 Hz, 2.4H), 1.24 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 176.7, 176.6, 176.5, 176.4, 142.2, 142.2, 142.2, 139.3, 139.3, 139.0, 138.5, 138.5, 128.2, 127.3, 127.2, 126.9, 126.8, 126.8, 126.7, 126.5, 126.4, 125.2, 123.9, 123.9, 123.2, 123.2, 122.3, 60.2, 60.1, 49.6, 49.5, 49.3, 49.3, 47.4, 47.4, 45.6, 45.5, 45.5, 15.84, 15.7.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3448, 3065, 3031, 2969, 2941, 1688, 1457, 1359, 1221, 1195, 907, 728, 696.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{27}H_{24}NO_4$ $[M+H]^+$.: 410.1756 ; found : 410.1757.

Cycloadduct 90



$C_{17}H_{17}NO_4$
MW 299,32

This compound was prepared according to GP-CDA. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 70:30 and finally 50:50, v/v) to provide the desired compound (60 mg, 0.20 mmol, 80 % yield) as a colorless oil.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 5/5) = 0.18

Three stereoisomers were observed by NMR in a ratio 0.7/1/1.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.41 – 7.27 (m, 13.2H), 6.60 (dd, *J* = 5.7, 1.5 Hz, 0.7H), 6.55 – 6.50 (m, 0.7H), 6.28 (dd, *J* = 5.8, 1.7 Hz, 1H), 6.20 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 6.12 (dd, *J* = 5.8, 1.7 Hz, 1H),

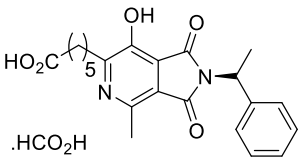
6.02 (d, *J* = 5.8 Hz, 0.9H), 5.39 (q, *J* = 7.3 Hz, 0.9H), 5.30 – 5.15 (m, 4.8H), 4.29 – 4.06 (m, 5.4H), 4.03 – 3.83 (m, 1.4H), 3.58 (dd, *J* = 7.8, 5.4 Hz, 1.9H), 3.32 (dd, *J* = 7.8, 1.7 Hz, 2H), 2.95 (dd, *J* = 6.6, 1.0 Hz, 0.8H), 2.92 – 2.89 (m, 0.8H), 2.76 (dt, *J* = 28.2, 7 Hz, 1H), 2.12 – 2.02 (m, 2H), 1.80 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.70 (d, *J* = 7.6 Hz, 5.7H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 175.9, 175.8, 175.7, 175.7, 175.1, 175.0, 174.6, 170.6, 167.7, 142.4, 140.2, 139.0, 138.9, 138.9, 138.8, 138.4, 138.3, 136.9, 136.8, 135.3, 135.2, 134.6, 134.5, 133.9, 132.4, 130.8, 128.4, 128.4, 128.31, 128.1, 128.1, 127.8, 127.6, 127.6, 127.5, 127.1, 127.0, 126.9, 110.3, 107.6, 92.2, 92.2, 91.5, 91.4, 81.0, 80.7, 79.6, 79.6, 68.1, 67.9, 61.3, 61.3, 60.7, 60.5, 57.3, 50.3, 50.1, 50.1, 49.6, 49.6, 47.7, 47.7, 47.5, 47.47, 45.6, 45.5, 38.6, 30.3, 29.6, 28.8, 25.5, 23.7, 22.9, 17.6, 16.4, 15.9, 15.9, 14.0, 10.9.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3449, 2925, 2857, 1691, 1378, 1356, 1219, 1188, 1025, 983, 969, 730, 697.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{17}H_{18}NO_4$ $[M+H]^+$.: 300.1236 ; found : 300.1240.

<u>Cycloadduct 91</u>



$C_{23}H_{26}N_2O_7$
MW 442,47

This compound was prepared according to GP-CDA and TFA (19 µL, 0.25 mmol, 1 equiv.) was also added into the reactional mixture. The crude product was purified by RP-HPLC (System F) and fractions were collected and lyophilized to provide the desired compound (61 mg, 0.12 mmol, 48 % yield) as a yellow powder.

R*f* (EtOAc) = 0.17

One stereoisomer was observed by NMR.

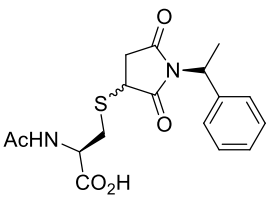
^{1}H NMR (300 MHz, CD_3CN) δ_H 7.47 – 7.23 (m, 5H), 5.49 (q, *J* = 7.4 Hz, 1H), 2.89 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.66 (s, 3H), 2.27 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.85 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.72 (dd, *J* = 15.1, 7.7 Hz, 2H), 1.66 – 1.54 (m, 2H), 1.47 – 1.34 (m, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN) δ_C 176.2, 168.8, 160.4, 146.8, 146.5, 141.7, 129.6, 128.7, 128.1, 122.8, 122.1, 118.6, 50.5, 34.5, 32.7, 29.7, 28.7, 25.6, 19.5, 17.9.

HRMS (ESI-) Calculated for $C_{22}H_{23}N_2O_5$ $[M-H]^-$: 395.1607 ; found : 395.1617.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3375, 2941, 2865, 1699, 1393, 1335, 1197, 1146, 1061, 759, 698.

Thia-Michael adduct 92



$C_{17}H_{20}N_2O_5S$
MW 364,42

To a solution of 19 (25 mg, 0.12 mmol, 1.0 equiv) in a solution of MeCN/PBS pH 7.4 (1 mL, 1:1, v/v) was added *N*-acetylcysteine (23 mg, 0.14 mmol, 1.2 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was then diluted with water and the aqueous layer extracted with EtOAc (× 2). The combined organic layers were dried over MgSO4, and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified twice by RP-HPLC (System F) and fractions were collected and lyophilized to provide the desired compound (20 mg, 0.055 mmol, 46 % yield) as a lyophilized white powder.

Two stereoisomers were observed by NMR in a ratio 1/1.

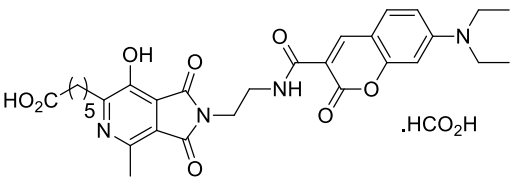
^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ_H 7.42 – 7.20 (m, 10H), 5.37 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 4.71 (dd, *J* = 9.1, 4.4 Hz, 1H), 4.64 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.94 (t, *J* = 3.6 Hz, 1H), 3.91 (t, *J* = 3.6 Hz, 1H), 3.51 (dd, *J* = 13.9, 4.4 Hz, 1H), 3.24 – 3.17 (m, 2H), 3.17 – 3.10 (m, 2H), 2.91 (dd, *J* = 13.9, 9.2 Hz, 1H), 2.50 (dd, *J* = 18.6, 3.9 Hz, 1H), 2.38 (dd, *J* = 18.6, 3.6 Hz, 1H), 2.00 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.79 (d, *J* = 0.8 Hz, 3H), 1.77 (d, *J* = 0.8 Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ_C 178.5, 178.3, 176.6, 176.5, 173.4, 173.4, 173.3, 141.0, 141.0, 129.4, 129.4, 128.6, 128.2, 128.1, 53.7, 52.9, 51.6, 51.5, 41.3, 39.9, 37.1, 36.6, 34.3, 34.1, 22.4, 16.9, 16.8 .

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3342, 3276, 2985, 2941, 2106, 1695, 1538, 1362, 1219, 1183, 765, 698.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{17}H_{21}N_2O_5S$ $[M+H]^+$: 365.1171 ; found : 365.1165.

Cycloadduct 93



$C_{31}H_{36}N_4O_{10}$
MW 624,64

This compound was prepared according to GP-CDA but TFA (3 µL, 0.043 mmol, 1.1 equiv.) was also added into the reaction mixture. The crude product was purified by RP-HPLC (System F) and fractions were collected and lyophilized to provide the desired compound (12 mg, 0.019 mmol, 49 % yield) as a yellow powder.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H 11.95 (bs, 1H), 8.74 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 8.57 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.79 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1H), 6.60 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 3.76 – 3.65 (m, 2H), 3.58 – 3.50 (m, 2H), 3.48 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H), 2.81 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.58 (s, 3H), 2.20 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.69 – 1.57 (m, 2H), 1.56 – 1.46 (m, 2H), 1.42 – 1.31 (m, 2H), 1.14 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H).

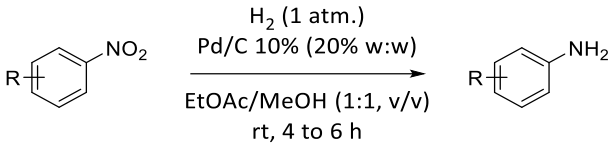
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C 174.5, 168.0, 162.8, 161.3, 157.2, 152.4, 147.6, 131.5, 120.4, 110.1, 109.4, 107.6, 95.9, 44.3, 37.6, 37.4, 33.6, 32.1, 28.4, 27.3, 24.3, 19.6, 12.3

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3330, 2976, 2927, 2858, 1708, 1617, 1581, 1514, 1402, 1352, 1227, 1189, 1134, 910, 795.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{30}H_{35}N_4O_8$ $[M+H]^+$: 579.2455 ; found : 579.2453

5. Procedures and molecular description for Chapter III

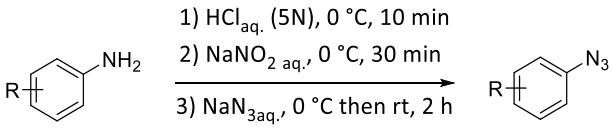
General procedure for nitro group reduction (GP-NGR):



Unless otherwise stated, all nitro group were reduced following a modified procedure from the literature.[10]

A solution of the nitro aromatic compound was prepared in EtOAc/MeOH (1:1, v:v ; 0.1 to 0.2M according to the solubility) was degassed by nitrogen bubbling for 10 min. Then, Pd/C (20% w:w) was added to the stirred mixture and the system was degassed again with nitrogen for 10-15 min. Nitrogen atmosphere was then replaced by hydrogen atmosphere and the mixture was vigorously stirred for 4 to 6 h at rt. After completion, hydrogen was purged with nitrogen and the reaction mixture was filtered through a plug of celite using EtOAc, and filtrate was concentrated under vacuum. Otherwise stated, the desired product was engaged in the next step without futher purification.

General procedure for the preparation of azide compounds (GP-PAC):



Unless otherwise stated, all nitro group were reduced following a modified procedure from the literature.[10]

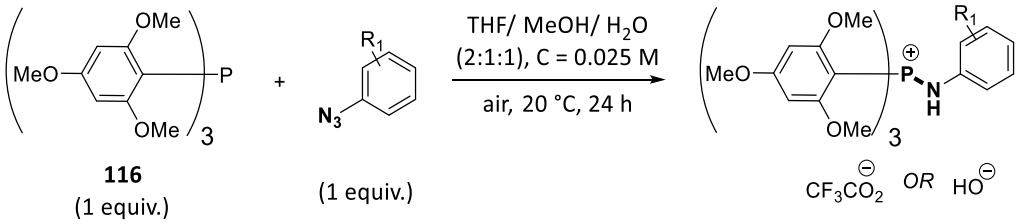
A solution of aniline was prepared in aq. HCl (5 N) and the mixture was cooled to 0°C and stirred for 10min. In the case of poor solubility, THF or dioxane (33% v:v) was added to the reaction. Then, $NaNO_2$ (1.6 equiv.), dissolved in a minimum of water (few mL), was slowly added (dropwise) to the reaction. The open flask reaction was stirred at 0°C for 30 min. Then,

[10] Chiba, K.; Asanuma, M.; Ishikawa, M.; Hashimoto, Y.; Dodo, K.; Sodeoka, M.; Yamaguchi, T. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 8751–8754.

NaN_3 (1.2 equiv.), dissolved in a minimum of water (few mL), was added slowly (dropwise) to the reaction. The open flask reaction was stirred at 0°C for 30 min. After this time, the reaction was allowed to warm to room temperature for an additional 1.5 h. After completion, the mixture was poured onto a cold solution of saturated aq. $NaHCO_3$ and extracted with EtOAc (x 2). The combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$ and the solvent was removed by vacuum. Otherwise stated, the desired product was engaged in the next step without futher purification.

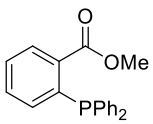
(CAUTION! Organic azides can be sensitive to light. Flasks were protected from light with aluminium sheet. NaN_3 is a toxic reagent and must be handled with care by trained people.)

General procedure for the synthesis of aminophosphoniums (GP-SA):



To a solution of the aromatic azide (0.1 mmol, 1 equiv.) in a solution of THF/MeOH/H_2O (2:1:1, v/v/v ; 0.025M) was added phosphine **116** (53 mg, 0.1 mmol, 1 equiv.) in one portion. A yellow color appeared after few minutes and decreased during the reaction. The mixture was stirred for 24 h under air atmosphere and room temperature. After completion (monitored by HPLC), solvents were removed by vacuum and, unless otherwise stated, the desired aminophosphonium was purified by RP-HPLC, lyophilized and obtained as salts.

methyl 2-(diphenylphosphaneyl)benzoate – 103



$C_{20}H_{17}O_2P$
MW 320,33

2-(diphenylphosphaneyl)benzoic acid (400 mg, 1.31 mmol, 1 equiv.) was dissolved in dry MeOH (10 mL) and DMAP (158 mg, 1.31 mmol, 1 equiv.) and EDCI.HCl (752 mg, 3.92 mmol, 3 equiv.) were successively added into the mixture under argon atmosphere. The reaction was stirred for 22 h at room temperature. After completion, the reaction was poured onto an aqueous solution of HCl (1

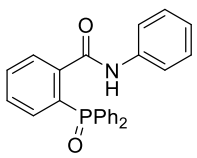
N) and extracted with DCM (x 2). The combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and the filtrate was concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 95:5, v/v). to provide the desired compound (347 mg, 1.08 mmol, 83% yield) as a white solid.

NMR analyses are in accordance with literature data.[11]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 8.09 – 8.01 (m, 1H), 7.43 – 7.35 (m, 2H), 7.35 – 7.27 (m, 9H), 6.97 – 6.89 (m, 1H), 3.74 (s, 3H).

^{31}P NMR {H} (121 MHz, $CDCl_3$) δ_P -4.3.

2-(diphenylphosphoryl)-*N*-phenylbenzamide – 102



$C_{25}H_{20}NO_2P$
MW 397,41

Azidobenzene (0.5 M in MeTHF, 1.24 mL, 0.62 mmol, 1 equiv.) was diluted in THF/H_2O (4.9 mL, 1:1, v/v) and phosphine **103** (200 mg, 0.62 mmol, 1 equiv.) was added into the reaction mixture. The reaction was stirred for 2 h at room temperature and under air atmosphere. After completion, the reaction mixture was extracted with EtOAc (x 2) and the combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 1:1, v/v) to provide the desired compound (122 mg, 0.31 mmol, 50% yield) as a white solid.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 1/1)= 0.22

m.p. = 86 – 87°C

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 10.53 (s, 1H), 8.08 (ddd, *J* = 7.8, 4.1, 1.0 Hz, 1H), 7.74 – 7.58 (m, 5H), 7.55 – 7.32 (m, 9H), 7.25 – 7.17 (m, 2H), 7.12 (ddd, *J* = 14.4, 7.7, 0.9 Hz, 1H), 7.03 (tt, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 165.4 (d, *J* = 3.8 Hz), 141.3 (d, *J* = 8.3 Hz), 137.9 (s, 1C), 133.2 (d, *J* = 11.9 Hz), 132.8 (d, *J* = 2.5 Hz), 132.4 (d, *J* = 2.8 Hz), 132.2 (d, *J* = 9.3 Hz), 131.54 (d, *J* = 10.0 Hz), 130.4 (d, *J* = 105.7 Hz) 130.1 (d, *J* = 11.9 Hz), 129.6 (d, *J* = 97.9 Hz), 128.7 (d, *J* = 12.4 Hz), 128.5 (s, 1C), 124.1 (s, 1C), 120.1 (s, 1C).

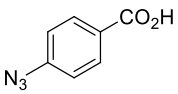
^{31}P NMR {H} (121 MHz, $CDCl_3$) δ_P 35.4.

[11] Reis, A.; Dehe, D.; Farsadpour, S.; Munstein, I.; Sun, Y.; Thiel, W. R. *New J. Chem.* **2011**, *35*, 2488-2495.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3053, 1652, 1598, 1542, 1493, 1439, 1326, 1178, 1127, 998, 887, 751, 717, 690.

MS (ESI+) *m/z* (%) : 420 (100) $[M+Na]^+$.

4-azidobenzoic acid – 111



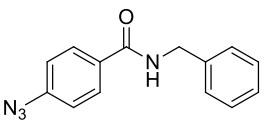
$C_7H_5N_3O_2$
MW 163,13

This compound was prepared according to GP-PAC. The desired product (2.23 g, 13.7 mmol, 94% yield) was obtained as yellow crystals. (CAUTION! The reaction produces a large amount of foam)

NMR analysis is in accordance with literature data.[12]

^{1}H NMR (300 MHz, MeOD) δ_H 8.12 – 8.02 (m, 2H), 7.23 – 7.13 (m, 2H).

4-azido-*N*-benzylbenzamide – 112



$C_{14}H_{12}N_4O$
MW 252,27

A solution of 4-azidobenzoic acid (200 mg, 1.23 mmol, 1.0 equiv.) was prepared in dry $CHCl_3$ (6.2 mL, 0.2M) under argon. Then, EDCI.HCl (260 mg, 1.35 mmol, 1.1 equiv.) was added and the reaction was stirred for 10min. Then, benzylamine (0.15 mL, 1.35 mmol, 1.1 equiv.) and Et_3N (0.19 mL, 1.35 mmol, 1.1 equiv.) were introduced into the reactional mixture, which was heated to 90 °C under micro-wave irradiations for 1 h. After completion, the reaction was cooled to rt and was diluted with $CHCl_3$. The organic layer was successively washed with water (x 3), $NaHCO_3$ 50% (x 1), brine (x 1), HCl (4N) (x 2) and brine (x 1) and was dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 9:1, v/v) to provide the desired compound (151 mg, 0.60 mmol, 49% yield) as a white solid.

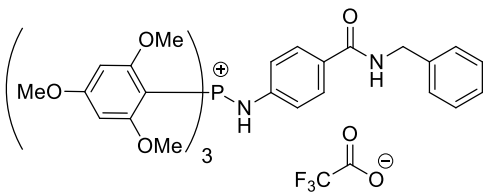
NMR analysis is in accordance with literature data.[13]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.86 – 7.74 (m, 2H), 7.41 – 7.27 (m, 5H), 7.12 – 7.00 (m, 2H), 6.34 (bs, 1H), 4.64 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H).

[12] Grimes, K. D.; Gupte, A.; Aldrich, C. C. *Synthesis,* **2010**, *2010*, 1441–1448.

[13] Hockey, S. C.; Barbante, G. J.; Francis, P. S.; Altimari, J. M.; Yoganantharajah, P.; Gibert, Y.; Henderson, L. C. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *109*, 305–313.

Aminophosphium 118



$C_{43}H_{46}F_3N_2O_{12}P$
MW 870,80

This compound was prepared according to GP-SA. The crude product was purified by RP-HPLC (System H) and fractions were collected and lyophilized to provide the desired compound (86 mg, 0.099 mmol, 96% yield) as a white powder.

^{1}H NMR (300 MHz, CD_3CN) δ_H 7.57 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.37 – 7.20 (m, 5H), 6.86 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.18 (d, *J* = 5.2 Hz, 6H), 4.50 (s, 2H), 3.85 (s, 9H), 3.55 (s, 18H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN) δ_C 167.4 (d, *J* = 1.4 Hz), 165.4 (d, *J* = 1.8 Hz), 145.0, 140.6, 129.6, 128.5 (d, *J* = 2.7 Hz), 128.1, 120.8 (d, *J* = 7.9 Hz), 118.5, 95.9, 94.2, 92.1 (d, *J* = 7.7 Hz), 56.9, 56.6, 44.1.

^{31}P NMR {H} (121 MHz, CD_3CN) δ_P 14.9.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ_H 8.73 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.34 – 7.19 (m, 5H), 6.87 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.24 (d, *J* = 5.2 Hz, 6H), 4.40 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.83 (s, 9H), 3.52 (s, 18H).

^{31}P NMR {H} (121 MHz, DMSO) δ_P 12.7.

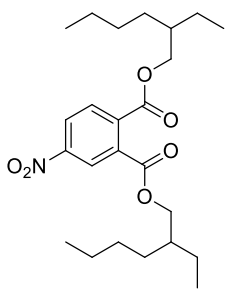
IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3336, 2943, 1690, 1595, 1575, 1506, 1456, 1412, 1229, 1161, 1206, 1124, 1097, 1027, 951, 919, 813.

MS (ESI+) *m/z* (%) : 757 (100) $[M]^+$.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{41}H_{46}N_2O_{10}P$ $[M]^+$: 757.2890 ; found : 757.2881.

HPLC System C R_t = 31.8 min (96% purity)

bis(2-ethylheptyl) 4-nitrophthalate – 119



$C_{24}H_{37}NO_6$
MW 435.55

A solution of 4-nitrophthalic acid (412 mg, 2.0 mmol, 1 equiv.) was prepared in dry DMF (10 mL) under agron atmosphere. 2-Ethylhexan-1-ol (1.25 mL, 8.0 mmol, 4 equiv.) was added, followed by DMAP (50 mg, 0.4 mmol, 0.2 equiv.) and EDCI.HCl (1.00 g, 5.2 mmol, 2.6 equiv.). The mixture was heated to 50 °C and stirred for 72 h. After that time, the reaction was poured onto a solution of H_2O/brine (1:1, v/v) and extracted with EtOAc (x 3). The combined organic layer were washed with a solution of Na_2CO_3 50% (x 1), with brine (x 1), dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude

product was purified by silica gel flash column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 95:5, v/v) to provide the desired compound (85 mg, 0.195 mmol, 10% yield) as a colorless oil.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 95/5) = 0.15

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 8.59 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.39 (dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.33 – 4.19 (m, 4H), 1.71 (dq, *J* = 12.7, 6.2 Hz, 2H), 1.49 – 1.19 (m, 18H), 1.00 – 0.78 (m, 14H).

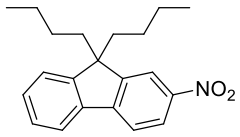
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 166.4, 165.1, 148.7, 138.5, 133.2, 129.9, 125.9, 124.3, 69.0, 68.9, 38.7, 38.6, 30.3, 30.3, 28.9, 28.9, 23.7, 23.7, 22.9, 14.0, 10.9.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 2959, 2930, 2861, 1730, 1533, 1462, 1350, 1268, 1128, 1112, 1062, 955, 854, 773, 736.

MS (ESI+) *m/z* (%) : 458.3 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{24}H_{41}N_2O_6$ $[M+NH_4]^+$.: 453,2965; found :.453.2953.

9,9-dibutyl-2-nitro-9*H*-fluorene – 120



$C_{21}H_{25}NO_2$
MW 323,43

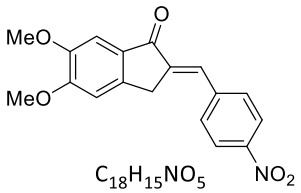
To a solution of 2-nitro-9*H*-fluorene (528 mg, 2.5 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (12.5 mL) under argon atmosphere was added 1-bromobutane (0.81 mL, 7.5 mmol, 3 equiv.). Then, anhydrous Cs_2CO_3 (2.443 g, 7.5 mmol, 3.0 equiv.) was added and the reaction was stirred for 16 h at room temperature. After completion, the mixture was filtered and the filtrate was poured onto solution of H_2O/brine (1:1, v/v) and extracted with EtOAC (x 2). The combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The desired product (768 mg, 2.37 mmol, 95%) was obtained without further purification as a yellow oil

NMR analysis is in accordance with literature data.[14]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 8.26 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.82 – 7.75 (m, 2H), 7.47 – 7.35 (m, 3H), 2.09 – 1.95 (m, 4H), 1.16 – 1.00 (m, 4H), 0.64 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H), 0.62 – 0.46 (m, 4H).

[14] Park, K. K.; Park, J. W.; Hamilton, A. D. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4225–4232.

(*E*)-5,6-dimethoxy-2-(4-nitrobenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one – 121



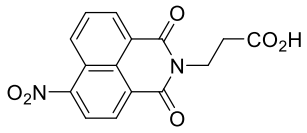
$C_{18}H_{15}NO_5$
MW 325,32

To a solution of 5,6-dimethoxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one (192 mg, 1.0 mmol, 1 equiv.) in dry THF (5 mL) under argon atmosphere was added 4-nitrobenzaldehyde (181 mg, 1.2 mmol, 1.2 equiv.). Then, TBD (14 mg, 0.10 mmol, 0.1 equiv.). The mixture, which became dark brown after few minutes, was stirred at room temperature for 5 h. After completion, the solvent were removed by vacuum. The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 10:0 to 8:2, and 5:5, v/v) to provide the desired compound (256 mg, 0.787 mmol, 79% yield) as a dark yellow solid.

NMR analysis is in accordance with literature data.[15]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 8.33 – 8.27 (m, 2H), 7.78 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.61 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 4.02 (s, 3H), 4.00 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 3.96 (s, 3H).

3-(6-nitro-1,3-dioxo-1*H*-benzo[*de*]isoquinolin-2(3*H*)-yl)propanoic acid – 122



$C_{15}H_{10}N_2O_6$
MW 314,25

To a solution of 6-nitro-1*H*,3*H*-benzo[*de*]isochromene-1,3-dione (1.0 g, 4.12 mmol, 1 equiv.) in a solution of EtOH/H_2O (18 mL, 2:1, v/v) was added 3-aminopropanoic acid (440 mg, 4.94 mmol, 1.2 equiv.). The reaction was refluxed for 7 h and after completion, the reaction was cooled and poured onto an aqueous solution of HCl (2 N). A precipitate appeared and was filtered, washed with H_2O (x 2) and Et_2O (x 3). The resulting solid was dried under vacuum and the desired product (1.17 g, 3.72 mmol, 90% yield) was obtained as a green powder without further purification.

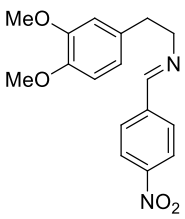
NMR analysis is in accordance with literature data.[16]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 9.52 – 9.42 (m, 1H), 9.42 – 9.31 (m, 2H), 9.22 (ddd, *J* = 7.7, 3.1, 1.1 Hz, 1H), 8.86 – 8.65 (m, 1H), 5.06 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 3.40 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H).

[15] Qiao, J.-P.; Gan, C.-S.; Wang, C.-W.; Ge, J.-F.; Nan, D.-D.; Pan, J.; Zhou, J.-N. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1652–1662.

[16] Zeng, Y.-S.; Gao, R.-C.; Wu, T.-W.; Cho, C.; Tan, K.-T. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 1872–1879.

(*E*)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-(4-nitrobenzylidene)ethanamine – 123



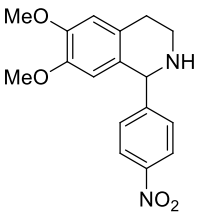
$C_{17}H_{18}N_2O_4$
MW 314,34

To a solution of 2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethan-1-amine (0.92 mL, 5.47 mmol, 1 equiv.) in toluene (150 mL) was added 4-nitrobenzaldehyde (827 mg, 5.47 mmol, 1 equiv.) and MS 4Å. The reaction was refluxed for 20 h and after completion, the reaction was cooled and filtered. Solvent was removed by vacuum and the desired product (1.642 g, 5.22 mmol, 96% yield) was obtained as an orange powder.

NMR analysis is in accordance with literature data.[17]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 8.28 – 8.21 (m, 1H), 8.17-8.19 (m, 1H), 7.89 – 7.82 (m, 1H), 6.80-6.72 (m, 3H), 3.90(dt, *J* = 6.9, 1.2 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 2.98 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H).

6,7-dimethoxy-1-(4-nitrophenyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline – 124



$C_{17}H_{18}N_2O_4$
MW 314,34

(*E*)-*N*-(3,4-dimethoxyphenethyl)-1-(4-nitrophenyl)methanimine **123** (1.642 g, 5.22 mmol) was dissolved in pure TFA (20 mL) and the mixture was refluxed for 4 h. After completion, the reaction was cooled to room temperature and was slowly poured onto a cold saturated soltion of aqueous $NaHCO_3$ and extracted with DCM (x 2). The combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The desired product (1.60 g, 5.09 mmol, 98% yield) was obtained without further purification as a white powder.

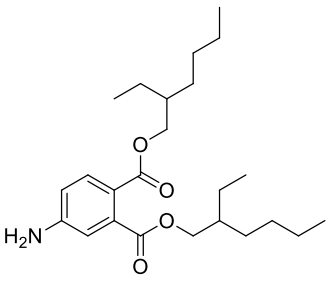
NMR analysis is in accordance with literature data.[18]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 8.21 – 8.14 (m, 1H), 7.49 – 7.40 (m, 1H), 6.65 (s, 1H), 6.15 (s, 1H), 5.14 (s, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.23 – 3.11 (m, 1H), 3.02 – 3.10 (m, 1H), 3.00 – 2.85 (m, 1H), 2.76 (dt, *J* = 16.0, 4.9 Hz, 1H), 1.89 (bs, 1H).

[17] Youn, S. W. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2521–2523.

[18] Gao, M.; Kong, D.; Clearfield, A.; Zheng, Q.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2229–2233.

bis(2-ethylhexyl) 4-aminophthalate – 125



$C_{24}H_{39}NO_4$
MW 405,57

This compound was prepared according to GP-NGR from bis(2-ethylheptyl) 4-nitrophthalate **119** (115mg, 0.26 mmol, 1 equiv). The desired product (94 mg, 0.22 mmol, 90% yield) was obtained without further purification as pale yellow oil.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 8/2) = 0.20

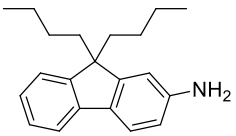
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.70 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.71 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.67 (dd, *J* = 8.3, 2.4 Hz, 1H), 4.26 – 4.16 (m, 2H), 4.17 – 4.08 (m, 4H), 1.75 – 1.62 (m, 2H), 1.48 – 1.17 (m, 17H), 0.95 – 0.77 (m, 12H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 169.5, 166.2, 149.9, 136.8, 131.6, 118.5, 114.7, 113.3, 68.1, 67.3, 38.7, 38.5, 30.3, 28.8, 28.8, 23.7, 22.9, 22.9, 14.0, 14.0, 10.9, 10.8.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3476, 3382, 2959, 2929, 1707, 1626, 1602, 1461, 1335, 1276, 1255, 1125, 1065, 782, 731.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{24}H_{40}NO_4$ $[M+H]^+$: 406,2957; found : 406.2951.

9,9-dibutyl-9*H*-fluoren-2-amine – 126



$C_{21}H_{27}N$
MW 293,45

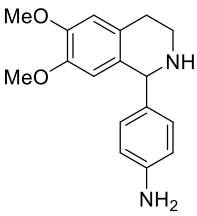
This compound was prepared according to GP-NGR from 9,9-dibutyl-2-nitro-9*H*-fluorene **120** (760 mg, 2.35 mmol, 1 equiv). The desired product (688 mg, 2.34 mmol, 99% yield) was obtained without futher purification as a pale yellow oil.

NMR analysis is in accordance with literature data.[19]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.57 – 7.51 (m, 1H), 7.51 – 7.44 (m, 1H), 7.30 – 7.22 (m, 3H), 7.22 – 7.14 (m, 1H), 6.66 (s, 1H), 6.64 (dd, *J* = 7.33, 2.2 Hz, 1H), 3.74 (bs, 2H), 1.98 – 1.75 (m, 4H), 1.13 – 0.97 (m, 4H), 0.73 – 0.50 (m, 10H).

[19] Koh Park, K.-H.; Jung, H.-M.; Lee, T.-W.; Kang, S.-K. *Bull. Kor. Chem. Soc.* **2010**, *31*, 984–988.

4-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl)aniline – 127



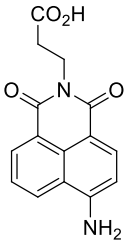
$C_{17}H_{20}N_2O_2$
MW 284,35

This compound was prepared according to GP-NGR from 6,7-dimethoxy-1-(4-nitrophenyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline **124** (800 mg, 2.54 mmol, 1 equiv). The desired product (716 mg, 2.52 mmol, 98% yield) was obtained without futher purification as a beige solid.

NMR analysis is in accordance with literature data.[20]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.07 – 6.99 (m, 2H), 6.63 (dt, *J* = 5.3, 2.9 Hz, 3H), 6.28 (s, 1H), 4.94 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), 3.21 (dt, *J* = 11.7, 5.1 Hz, 1H), 3.08 – 2.97 (m, 1H), 2.97 – 2.84 (m, 1H), 2.72 (dt, *J* = 15.9, 4.7 Hz, 1H), 1.80 (bs, 2H).

3-(6-amino-1,3-dioxo-1*H*-benzo[*de*]isoquinolin-2(3*H*)-yl)propanoic acid – 128



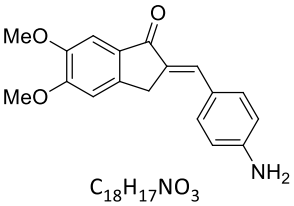
$C_{15}H_{12}N_2O_4$
MW 284,27

This compound was prepared according to GP-NGR from 3-(6-nitro-1,3-dioxo-1*H*-benzo[*de*]isoquinolin-2(3*H*)-yl)propanoic acid **122** (1 g, 3.18 mmol, 1 equiv). The desired product (901 mg, 3.17 mmol, 99% yield) was obtained without futher purification as an orange powder.

NMR analysis is in accordance with literature data.[21]

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H 8.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.42 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.70 – 7.59 (m, 1H), 7.44 (bs, 2H), 6.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.24 – 4.11 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.52 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, collapsed with DMSO-d_6 signal).

(*E*)-2-(4-aminobenzylidene)-5,6-dimethoxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one – 129



$C_{18}H_{17}NO_3$
MW 295,33

To a solution of (*E*)-5,6-dimethoxy-2-(4-nitrobenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one **121** (256 mg, 0.79 mmol, 1 equiv.) in MeOH (16 mL) was added $SnCl_2$ (1.50 g, 7.9 mmol, 10 equiv.). The reaction was refluxed and stirred for 4 h. After completion, the solvent was removed by vacuum. The residue was dissolved in EtOAc and a solution of aqueous NaOH (1 N) was added. The aqueous layer was extracted with EtOAc (x 3)

[20] Ivanov, I.; Nikolova, S.; Statkova-Abeghe, S.; *Heterocycles* **2006**, *68*, 369-374.

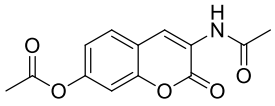
[21] Zeng, Y.-S.; Gao, R.-C.; Wu, T.-W.; Cho, C.; Tan, K.-T. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 1872–1879.

and combined organic layers were washed with brine (x 2), dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 5:5 to 0:10, v/v) to provide the desired compound (157 mg, 0.53 mmol, 67% yield) as a dark yellow solid.

NMR analysis is in accordance with literature data.[14]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.52 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.51 – 7.48 (m, 2H), 7.34 (s, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.74 – 6.70 (m, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.91 (d, *J* = 1.2 Hz, 2H).

3-acetamido-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl acetate – 130



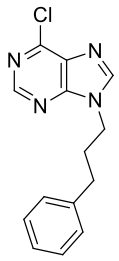
$C_{13}H_{11}NO_5$
MW 261,23

This compound was synthesized according to a known procedure and was obtained as a fibrous beige solid (1.79 g, 6.85 mmol, 17% yield).[22]

NMR analysis is in accordance with literature data.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 8.67 (s, 1H), 8.05 (bs, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.15 – 7.02 (m, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.23 (s, 3H).

6-chloro-9-(3-phenylpropyl)-9*H*-purine – 131



$C_{14}H_{13}ClN_4$
MW 272,73

To a solution of 6-chloro-9*H*-purine (250 mg, 1.6 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (16 mL) were added (3-bromopropyl)benzene (0.52 mL, 3.52 mmol, 2.2 equiv.) and Et_3N (0.27 mL, 1.92 mmol, 1.2 equiv.). The reaction was stirred for 19 h at room temperature. Then, the reaction was poured onto a solution of H_2O/brine (1:1, v/v) and was extracted with EtOAc (x 1). The organic layer was washed with brine (x 3), dried over $MgSO_4$ and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (silica gel, DCM/EtOAc as gradient from 10:0 to 9:1, 8:2 and 7:3, v/v) to provide the desired compound (289 mg, 1.06 mmol, 66% yield) as a light yellow solid.

R*f* (DCM/EtOAc, 7/3) = 0.35

m.p. = 66 °C

[22] Glowacka, P. C.; Maindron, N.; Stephenson, G. R.; Romieu, A.; Renard, P.-Y.; da Silva Emery, F. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 4991-4996.

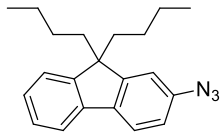
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 8.63 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.21 – 7.12 (m, 2H), 7.10 – 7.03 (m, 3H), 4.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.58 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.28 – 2.14 (m, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 151.5, 151.4, 150.4, 144.9, 139.4, 131.2, 128.2, 127.9, 126.0, 43.6, 32.3, 30.5.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3057, 3019, 2948, 2922, 2855, 1598, 1564, 1496, 1447, 1405, 1334, 1180, 939, 856, 737, 710, 696, 643.

MS (ESI+) *m/z* (%) : 272.2 (100) $[M+H]^+$.

2-azido-9,9-dibutyl-9*H*-fluorene – 132



$C_{21}H_{25}N_3$
MW 319,44

This compound was prepared according to GP-PAC from 9,9-dibutyl-9*H*-fluoren-2-amine **126** (200 mg, 0.68 mmol, 1 equiv). The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 99:1, 8:2 and 98:2, v/v) to provide the desired compound (217 mg, 0.68 mmol, 99% yield) as a yellow oil.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 98/2) = 0.55

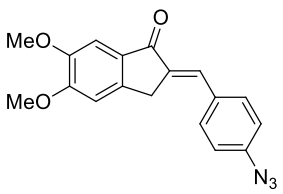
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.70 – 7.61 (m, 2H), 7.37 – 7.28 (m, 3H), 7.04 – 6.96 (m, 4H), 2.05 – 1.86 (m, 4H), 1.16 – 1.01 (m, 4H), 0.68 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H), 0.65 – 0.52 (m, 4H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 152.8, 150.4, 140.3, 138.7, 138.4, 127.0, 126.9, 122.8, 120.7, 119.4, 117.7, 113.6, 55.1, 40.2, 25.9, 23.0, 13.8.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 2956, 2929, 2859, 2099, 1609, 1580, 1450, 1288, 1135, 907, 818, 772, 734.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{21}H_{25}N_3$ $[M]^{+\bullet}$: 319.2048 ; found : 319.2052.

(*E*)-2-(4-azidobenzylidene)-5,6-dimethoxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one – 133



$C_{18}H_{15}N_3O_3$
MW 321,33

This compound was prepared according to GP-PAC from (*E*)-2-(4-aminobenzylidene)-5,6-dimethoxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one **129** (192 mg, 0.65 mmol, 1 equiv). The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as

gradient from 7:3 to 5:5, v/v) to provide the desired compound (136 mg, 0.42 mmol, 65% yield) as a yellow solid.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 5/5) = 0.28

m.p. = 165°C

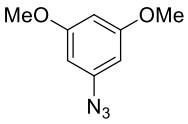
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.66 – 7.58 (m, 2H), 7.52 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.10 – 7.04 (m, 2H), 6.96 (s, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.91 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 192.9, 155.4, 149.6, 144.6, 141.0, 134.9, 132.3, 132.0, 131.2, 131.0, 119.4, 107.1, 105.0, 56.3, 56.1, 32.1.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3040, 2395, 2254, 2113, 1679, 1631, 1597, 1500, 1471, 1421, 1303, 1256, 1091, 1003, 859, 780.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{18}H_{16}N_3O_3$ $[M+H]^+$: 322.1192; found : 322.1189.

1-azido-3,5-dimethoxybenzene – 134



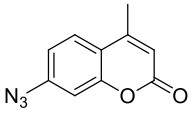
$C_8H_9N_3O_2$
MW 179,18

This compound was prepared according to GP-PAC from 3,5-dimethoxyaniline (305 mg, 2.0 mmol, 1 equiv.). The desired compound (340 mg, 1.9 mmol, 95% yield) was obtained as a dark yellow solid without further purification.

NMR analysis is in accordance with literature data.[23]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 6.25 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.19 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 3.78 (s, 6H).

7-azido-4-methyl-2*H*-chromen-2-one – 135



$C_{10}H_7N_3O_2$
MW 201,18

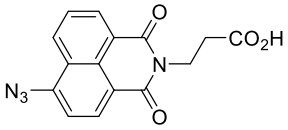
This compound was prepared according to GP-PAC from 7-amino-4-methyl-2*H*-chromen-2-one (500 mg, 2.86 mmol, 1.0 equiv). The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from7:3 to 5:5, v/v) to provide the desired compound (574 mg, 3.2 mmol, 99% yield) as a yellow solid.

[23] Yamamoto, K.; Bruun, T.; Kim, J. Y.; Zhang, L.; Lautens, M. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 2644–2647.

NMR analysis are in accordance with literature data.[24]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.59 – 7.53 (m, 1H), 6.98 – 6.91 (m, 2H), 6.22 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 2.41 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H).

3-(6-azido-1,3-dioxo-1*H*-benzo[*de*]isoquinolin-2(3*H*)-yl)propanoic acid – 136



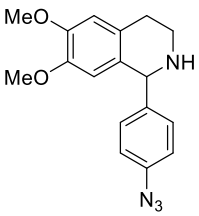
$C_{15}H_{10}N_4O_4$
MW 310,27

This compound was prepared according to GP-PAC from 3-(6-amino-1,3-dioxo-1*H*-benzo[*de*]isoquinolin-2(3*H*)-yl)propanoic acid **128** (65 mg, 0.23 mmol, 1 equiv). The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 6:4, v/v) to provide the desired compound (19 mg, 0.062 mmol, 27% yield) as a dark green solid.

NMR analysis are in accordance with literature data.[21]

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H 8.53 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.49 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.43 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.87 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.22 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.59 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H).

1-(4-azidophenyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline – 137



$C_{17}H_{18}N_4O_2$
MW 310,3504

This compound was prepared according to GP-PAC from 4-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl)aniline **127** (693 mg, 2.4 mmol, 1 equiv). The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (silica gel, EtOAc/Et_3N as a gradient from 100:0 to 99:1, v/v) to provide the desired compound (576 mg, 1.86 mmol, 77% yield) as a beige solid.

R*f* (EtOAc/Et_3N, 99/1) = 0.21

m.p. = 99 – 101°C

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.30 – 7.21 (m, 1H), 7.04 – 6.94 (m, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.22 (s, 1H), 5.03 (s, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), 3.27 – 3.14 (dt, *J* = 12.0, 5.3 Hz, 1H), 3.10 – 2.86 (m, 1H), 2.74 (dt, *J* = 15.8, 4.7 Hz, 1H), 1.88 (bs, 1H).

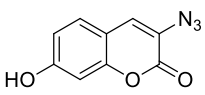
[24] Ast, S.; Rutledge, P. J.; Todd, M. H. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, *2012*, 5611–5615.

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 147.7, 147.1, 141.7, 139.0, 130.3, 129.5, 127.6, 118.9, 111.5, 110.8, 60.8, 55.8, 55.8, 41.9, 29.2.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3255, 2798, 2402, 2115, 1508, 1282, 1254, 1217, 1112 ; 1041, 964, 855, 843, 831, 761.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{17}H_{19}N_4O_2$ $[M+H]^+$: 311.1503 ; found : 311.1509.

3-azido-7-hydroxy-2*H*-chromen-2-one – 95



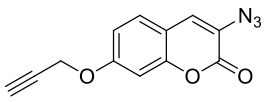
$C_9H_5N_3O_3$
MW 203,15

This compound was prepared according to a known procedure from 3-acetamido-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl acetate **130** (1.60 g, 6.1 mmol, 1 equiv.).[25] The desired compound was obtained (698 mg, 3.44 mmol, 56% yield) as brown solid without further purification.

NMR analysis is in accordance with literature data.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H 10.55 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.48 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H).

3-azido-7-(prop-2-yn-1-yloxy)-2*H*-chromen-2-one – 138



$C_{12}H_7N_3O_3$
MW 241,20

To as solution of 3-azido-7-hydroxy-2*H*-chromen-2-one **95** (203 mg, 1.0 mmol, 1 equiv.) in dry acetone (20 mL) was added propargyle bromide (0.11 mL, 1.4 mmol, 1.4 equiv.) and K_2CO_3 (250 mg, 1.8 mmol, 1.8 equiv.). The reaction was refluxed for 24 h. Then, the reaction was filtered and acetone was evaporated. Residue was dissolved in EtOAc and the organic layer was washed with H_2O (x 1), dried over $MgSO_4$ and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 10:0 to 9:1 and 8:2, v/v) to provide the desired compound (59 mg, 0.24 mmol, 24% yield) as a fibrous orange solid.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 9/1) = 0.23

m.p = 114 - 115°C

[25] Sivakumar, K.; Xie, F.; Cash, B. M.; Long, S.; Barnhill, H. N.; Wang, Q. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4603–4606.

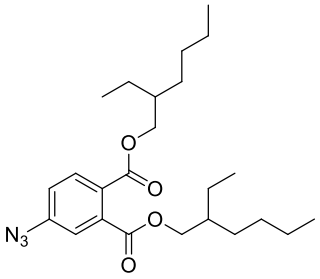
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.34 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.98 – 6.98 (m, 2H), 4.76 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 2.58 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 206.9, 159.3, 157.3, 152.5, 128.0, 126.1, 123.4, 113.5, 113.1, 101.7, 76.4, 56.0.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3276, 2917, 2853, 2107, 1691, 1601, 1481, 1258, 1156, 1024, 914, 832, 737.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{12}H_8N_3O_3$ $[M+H]^+$.: 242.0566 ; found : 242.0566.

<u>bis(2-ethylhexyl) 4-azidophthalate – 139</u>



$C_{24}H_{37}N_3O_4$
MW 431,57

A solution of bis(2-ethylhexyl) 4-aminophthalate **125** (90 mg, 0.22 mmol, 1 equiv.) in a solution of DMF/MeCN (2.2 mL, 2:8, v/v) under argon atmosphere was prepared and cooled to 0 °C. Then, $NOBF_4$ (30.4 mg, 0.26 mmol, 1.2 equiv.) in MeCN (1 mL) was added dropwise to the reaction mixture and the resulting solution was stirred for 15 min at 0 °C. Then, NaN_3 (16.9 mg, 0.29 mmol, 1.2 equiv.) in H_2O (1mL) was added dropwise at 0 °C and the mixture was stirred for 4.5 h at room temperature. After completion, the reaction was diluted with DCM and organic layer was washed with H_2O (x 2), dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 95:5, v/v) to provide the desired compound (72 mg, 0.17 mmol, 76% yield) as a yellow oil.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 95/5) = 0.49

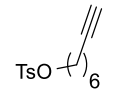
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.78 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.13 (dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 4.28 – 4.13 (m, 4H), 1.74 – 1.59 (m, 2H), 1.46 – 1.19 (m, 17H), 0.98 – 0.80 (m, 12H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 167.5, 166.2, 143.4, 135.6, 131.1, 127.4, 120.5, 118.9, 68.5, 68.1, 38.7, 38.6, 30.3, 30.3, 28.9, 28.9, 23.7, 22.9, 14.0, 10.9.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 2959, 2930, 2861, 2113, 1724, 1602, 1466, 1260, 1119, 1062, 959, 839, 771.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{24}H_{38}N_3O_4$ $[M+H]^+$: 432.2862; found : 432.2850.

oct-7-yn-1-yl 4-methylbenzenesulfonate – 140



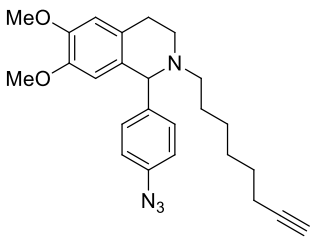
$C_{15}H_{20}O_3S$
MW 280,38

To a solution of oct-7-yn-1-ol (400 mg, 3.2 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (10 mL) at 0 °C and under argon atmosphere was added Et_3N (0.57 mL, 3.8 mmol, 1.2 equiv.) and DMAP (98 mg, 0.8 mmol, 0.25 equiv.). Then, 4-methylbenzenesulfonyl chloride (732 mg, 3.8 mmol, 1.2 equiv.) was added in one portion and the reaction was stirred at 0 °C for 1 h and at room temperature for 2 h. After completion, the reaction was quenched with H_2O, extracted with DCM (x 2), dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 95:5 and 90:10, v/v) to provide the desired compound (615 mg, 2.19 mmol, 68% yield) as a colorless oil.

NMR analysis is in accordance with literature data.[26]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.83 – 7.75 (m, 2H), 7.38 – 7.30 (m, 2H), 4.02 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.45 (s, 3H), 2.14 (td, *J* = 6.9, 2.6 Hz, 2H), 1.92 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 1.70 – 1.59 (m, 2H), 1.49 (m, 2H), 1.39 – 1.25 (m, 4H).

1-(4-azidophenyl)-6,7-dimethoxy-2-(oct-7-yn-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline – 141



$C_{25}H_{30}N_4O_2$
MW 418.53

A solution of 1-(4-azidophenyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline **137** (248 mg, 0.80 mmol, 1.0 equiv.) and oct-7-yn-1-yl 4-methylbenzenesulfonate **140** (280 mg, 1.0 mmol, 1.25 equiv.) was prepared in dry MeCN (10 mL) under argon atmosphere. Then, anhydrous K_2CO_3 (332 mg, 2.4 mmol, 3.0 equiv.) was introduced into the mixture and the reaction was refluxed for 24 h. After completion, the reaction mixture was cooled to room temperature and was filtered. The filtrate was diluted with H_2O and extracted with EtOAc (x 2). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 90:10 to 85:15 and 80:20, v/v) to provide the desired compound (211 mg, 0.50 mmol, 63% yield) as a light yellow solid.

[26] Fang, F.; Vogel, M.; Hines, J. V.; Bergmeier, S. C. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 3080–3091.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 8/2) = 0.35

m.p = 71 – 72°C

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.26 – 7.18 (m, 2H), 7.00 – 6.92 (m, 2H), 6.60 (s, 1H), 6.14 (s, 1H), 4.46 (s, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 3.13 (dt, *J* = 11.5, 4.9 Hz, 1H), 3.03 – 2.89 (m, 1H), 2.75 (dt, *J* = 16.1, 4.4 Hz, 1H), 2.62 – 2.40 (m, 2H), 2.33 – 2.22 (m, 1H), 2.14 (td, *J* = 7.1, 2.6 Hz, 2H), 1.92 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.47 (dt, *J* = 14.3, 7.1 Hz, 4H), 1.37 – 1.10 (m, 5H).

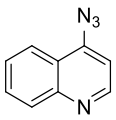
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 147.4, 147.1, 141.4, 138.6, 130.9, 129.9, 127.0, 118.7, 111.6, 110.9, 84.7, 68.1, 67.4, 55.8, 54.0, 46.8, 28.6, 28.4, 28.2, 26.7, 26.6, 18.3.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3295, 2932, 2858, 2115, 2079, 1514, 1503, 1463, 1285, 1252, 1221, 1130, 1099, 1015, 838, 770, 730, 630.

MS (ESI+) *m/z* (%) : 419 (100) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{25}H_{31}N_4O_2$ $[M+H]^+$: 419.2442 ; found : 419.2453.

4-azidoquinoline – 142



$C_9H_6N_4$
MW 170,17

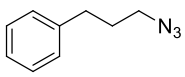
To a solution of 4-chloroquinoline (380 mg, 2.23 mmol, 1.0 equiv.) in EtOH/H_2O (11.5 mL, 1:1, v/v) in a sealed tube was added NaN_3 (605 mg, 9.3 mmol, 4.0 equiv.). The reaction mixture was refluxed for 18 h. After completion, the reaction was cooled down to room temperature and diluted with H_2O. EtOH was removed by vacuum and aqueous layer was extracted with EtOAc (x 2). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 80:20, v/v) to provide the desired compound as a white solid (278 mg, 1.63 mmol, 70% yield).

NMR analysis is in accordance with literature data.[27]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 8.83 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 8.13 – 7.96 (m, 2H), 7.75 (ddd, *J* = 8.4, 6.9, 1.4 Hz, 1H), 7.54 (ddd, *J* = 8.2, 6.9, 1.1 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H).

[27] Mantoani, S. P.; Chierrito, T. P. C.; Vilela, A. F. L.; Cardoso, C. L.; Martínez, A.; Carvalho, I. *Molecules* **2016**, *21*, 193.

(3-azidopropyl)benzene – 143



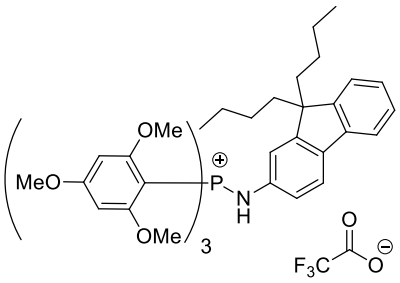
$C_9H_{11}N_3$
MW 161,20

This compound was synthesized according to a known procedure from (3-bromopropyl)benzene (0.30 mL, 2 mmol, 1 equiv.).[28] The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 95:5, v/v) to provide the desired compound (261 mg, 1.62 mmol, 81% yield) as a colorless oil.

NMR analysis is in accordance with literature data.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.36 – 7.29 (m, 2H), 7.25 – 7.17 (m, 3H), 3.30 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.72(t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.98 – 1.88 (m, 2H).

Aminophosphium 144



$C_{50}H_{59}F_3NO_{11}P$
MW 937,97

This compound was prepared according to GP-SA. The crude product was purified twice by RP-HPLC (System H) and fractions were collected and lyophilized to provide the desired compound (20 mg, 0.021 mmol, 21% yield) as a white powder.

^{1}H NMR (300 MHz, CD_3CN) δ_H 7.60 (dd, *J* = 6.5, 1.0 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.33 – 7.18 (m, 3H), 6.90 (dd, *J* = 8.1, 2.1 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.28 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 6.18 (d, *J* = 5.2 Hz, 6H), 3.83 (s, 9H), 3.56 (s, 18H), 1.86 – 1.77 (m, 2H), 1.67 – 1.55 (m, 2H), 1.04 – 0.90 (m, 4H), 0.59 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H), 0.36 – 0.19 (m, 4H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN) δ_C 166.1 (d, *J*= 1.8 Hz), 165.0 (d, *J*= 1.8 Hz), 151.5, 151.0, 141.8, 140.7, 135.9, 127.7, 127.1, 123.6, 120.9 (d, *J*= 10.3 Hz), 120.3 (d, *J*= 1.0 Hz), 119.7, 118.1, 115.7 (d, *J*= 6.7 Hz), 95.9, 94.2, 91.7 (d, *J*= 7.7 Hz), 56.6, 56.3, 55.4, 40.7, 26.8, 23.6, 14.1.

^{31}P NMR {H} (121 MHz, CD_3CN) δ_P 14.3.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 2928, 2842, 1684, 1577, 1455, 1411, 1338, 1208, 1128, 1098, 952, 814.

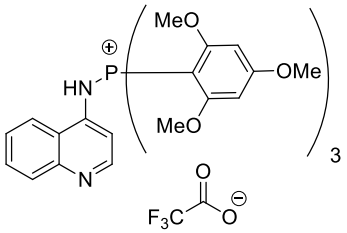
MS (ESI+) *m/z* (%) : 824 (100) $[M]^+$.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{48}H_{59}NO_9P$ $[M]^+$: 824.3927 ; found : 824.3930.

HPLC System C R_t = 39.3 min (purity 98%).

[28] Colombano, G. *et al. J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 616–623.

Aminophosphium 145



$C_{38}H_{40}F_3N_2O_{11}P$
MW 788,70

This compound was prepared according to GP-SA. The crude product was purified by RP-HPLC (System H) and fractions were collected and lyophilized to provide the desired compound (44 mg, 0.056 mmol, 56% yield) as a white powder.

^{1}H NMR (300 MHz, CD_3CN) δ_H 8.61 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 8.29 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 8.04 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.84 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 6.25 (d, *J* = 5.5 Hz, 6H), 3.89 (s, 9H), 3.56 (s, 18H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN) δ_C 168.2 (d, *J* = 1.3 Hz), 165.4 (d, *J* = 2.0 Hz), 154.4, 143.9, 140.3, 135.0, 129.5, 123.4, 122.6, 118.3, 108.6 (d, *J* = 7.3 Hz), 92.4 (d, *J* = 7.8 Hz), 92.0 (d, *J* = 128.1 Hz), 57.1, 56.8.

^{31}P NMR {H} (121 MHz, CD_3CN) δ_P 18.5.

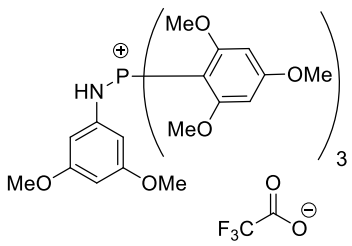
IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 2947, 2842, 1685, 1598, 1578, 1470, 1414, 1337, 1209, 1163, 1099, 815, 705.

MS (ESI+) *m/z* (%) : 675 (100) $[M]^+$.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{36}H_{40}N_2O_9P$ $[M]^+$: 675.2471 ; found : . 675.2475.

HPLC System C R_t = 26.1 min (purity 99%).

Aminophosphium 146



$C_{37}H_{43}F_3NO_{13}P$
MW 797,71

This compound was prepared according to GP-SA. The crude product was purified by RP-HPLC (System H) and fractions were collected and lyophilized to provide the desired compound (53 mg, 0.066 mmol, 66% yield) as a white powder.

^{1}H NMR (300 MHz, CD_3CN) δ_H 6.20 (d, *J* = 5.2 Hz, 6H), 6.05 (s, 3H), 3.86 (s, 9H), 3.58 (s, 6H), 3.57 (s, 18H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN) δ_C 167.1, 165.1, 161.6, 143.2, 118.3, 100.1 (d, *J* = 8.3 Hz), 95.7, 95.4, 94.5, 91.5 (d, *J* = 7.8 Hz), 56.8, 56.5, 55.8.

^{31}P NMR {H} (121 MHz, CD_3CN) δ_P 14.8.

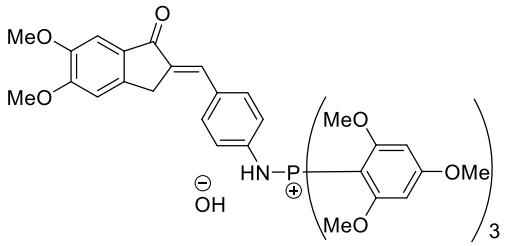
IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 2943, 2843, 1741, 1694, 1595, 1575, 1456, 1411, 1337, 1203, 1124, 1096, 812, 704.

MS (ESI+) *m/z* (%) : 684 (100) $[M]^+$.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{35}H_{43}NO_{11}P$ $[M]^+$: 684.2574 ; found : 684.2568.

HPLC System C R_t = 31.7 min (purity 98%).

Aminophosphium 147



$C_{45}H_{50}NO_{13}P$
MW 843,86

This compound was prepared according to GP-SA. However, the desired compound (81 mg, 0.096 mmol, 93% yield) was obtained as a red powder without further purification.

^{1}H NMR (300 MHz, MeOD) δ_H 7.46 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.39 (s, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 7.00 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.25 (d, *J* = 5.2 Hz, 6H), 3.93 (s, 3H), 3.86 (s, 4H), 3.85 (s, 9H), 3.80 (s, 2H), 3.58 (s, 18H), 3.50 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ_C 195.1, 167.1 (d, *J* = 1.2 Hz), 165.5 (d, *J* = 1.7 Hz), 165.0 (d, *J* = 1.7 Hz), 156.9, 150.9, 148.7, 146.9, 134.3, 133.1, 132.6, 131.7, 127.6, 121.64, 121.5 (d, *J* = 1.1 Hz), 108.7, 105.5, 98.4, 96.7, 91.8 (d, *J* = 7.3 Hz), 57.0, 56.4, 56.3, 56.1, 33.3.

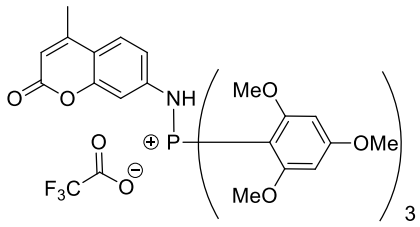
^{31}P NMR {H} (121 MHz, MeOD) δ_P 12.6.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 2939, 1597, 1501, 1457, 1410, 1337, 1300, 1228, 1207, 1128, 1094, 951, 812.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{45}H_{49}NO_{12}P$ $[M+H]^+$: 826.2292 ; found : 826.2291.

HPLC System C R_t = 32.7 min (purity 97%).

Aminophosphium 148



$C_{39}H_{41}F_3NO_{13}P$
MW 819,71

This compound was prepared according to GP-SA. The crude product was purified by RP-HPLC (System H) and fractions were collected and lyophilized to provide the desired compound (81 mg, 0.092 mmol, 92% yield) as a white powder.

^{1}H NMR (300 MHz, CD_3CN) δ_H 7.45 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.81 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 6.70 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.21 (d, *J* = 5.3 Hz, 6H), 6.09 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 3.86 (s, 9H), 3.57 (s, 19H), 2.34 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN) δ_C 167.4 (d, *J* = 1.3 Hz), 165.3 (d, *J* = 1.9 Hz), 161.5, 154.9, 145.6, 125.9, 118.3, 117.3 (d, *J* = 8.4 Hz), 115.0, 112.8, 107.4 (d, *J* = 8.2 Hz), 95.2, 93.5, 92.0 (d, *J* = 7.7 Hz), 56.8, 56.6, 18.6.

^{31}P NMR {H} (121 MHz, CD_3CN) δ_P 14.9.

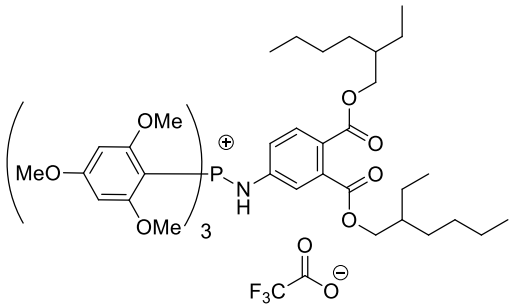
IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3003, 2974, 2944, 1711, 1598, 1577, 1460, 1413, 1230, 1208, 1162, 1128, 1099, 919, 814, 706.

MS (ESI+) *m/z* (%) : 706 (100) $[M]^+$.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{37}H_{41}NO_{11}P$ $[M]^+$: 706.2417 ; found : 706.2433.

HPLC System C R_t = 30.7 min (purity 93%).

Aminophosphium 150



$C_{53}H_{71}F_3NO_{15}P$
MW 1050,10

This compound was prepared according to GP-SA. The crude product was purified by RP-HPLC (System H) and fractions were collected and lyophilized to provide the desired compound (74 mg, 0.069 mmol, 70% yield) as a yellow oil.

^{1}H NMR (300 MHz, CD_3CN) δ_H 7.58 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.99 (bs, 1H), 6.78 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.20 (d, *J* = 5.3 Hz, 6H), 4.17 – 4.04 (m, 4H), 3.86 (s, 9H), 3.57 (s, 18H), 1.71 – 1.64 (m, 2H), 1.42 – 1.20 (m 16H), 0.98 – 0.81 (m, *J* = 7.4, 4.6 Hz, 12H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN) δ_C 169.0, 167.4 (d, *J* = 1.3 Hz), 165.2 (d, *J* = 1.8 Hz), 145.2, 135.3, 130.8, 124.2, 122.3 (d, *J* = 8.5 Hz), 120.2 (d, *J* = 7.7 Hz), 118.3, 95.1, 93.4, 92.0 (d, *J* = 7.6 Hz), 68.5 (d, *J* = 14.1 Hz), 56.8, 56.6, 39.6 (d, *J* = 6.5 Hz), 31.1 (d, *J* = 4.8 Hz), 29.7, 24.5 (d, *J* = 2.3 Hz), 23.7 (d, *J* = 1.4 Hz), 14.4 (d, *J* = 2.7 Hz), 11.3 (d, *J* = 1.4 Hz).

^{31}P NMR {H} (121 MHz, CD_3CN) δ_P 15.2.

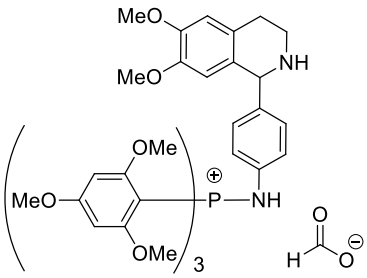
IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3003, 2960, 2934, 2875, 2857, 1715, 1689, 1597, 1576, 1458, 1412, 1274, 1125, 1098, 813, 797, 704.

MS (ESI+) *m/z* (%) : 936 (100) $[M]^+$.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{51}H_{71}NO_{13}P$ $[M]^+$: 936.4663 ; found : 936.4691.

HPLC System C R_t = 43.1 min (purity 98%).

<u>Aminophosphium 153</u>



$C_{27}H_{31}N_2O_7P$
MW 526,52

This compound was prepared according to GP-SA. The crude product was purified by RP-HPLC (System G) and fractions were collected and lyophilized to provide the desired compound (52 mg, 0.099 mmol, 99% yield) as a white powder.

^{1}H NMR (300 MHz, CD_3CN) δ_H 8.43 (s, 1H), 6.96 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.77 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.66 (s, 1H), 6.19 (dd, *J* = 5.3, 1.4 Hz, 1H), 6.15 (d, *J* = 5.2 Hz, 3H), 6.09 (s, 1H), 4.83 (s, 1H), 3.83 (s, 5H), 3.75 (s, 2H), 3.53 (s, 9H), 3.49 (s, 2H), 3.13 – 3.02 (m, 1H), 2.82 (dddd, *J* = 7.4, 5.8, 4.2, 3.0 Hz, 1H), 2.68 – 2.56 (m, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN) δ_C 167.0 (d, *J* = 1.4 Hz), 165.1 (d, *J* = 1.8 Hz), 148.8, 148.1, 140.2, 131.4, 129.7, 128.8, 122.4, 122.3 (d, *J* = 7.5 Hz), 113.0, 112.2, 96.4, 94.8, 91.9 (d, *J* = 7.8 Hz), 61.5, 56.8, 56.5, 56.3 (d, *J* = 3.1 Hz), 42.7, 29.6.

^{31}P NMR {H} (121 MHz, CD_3CN) δ_P 15.5.

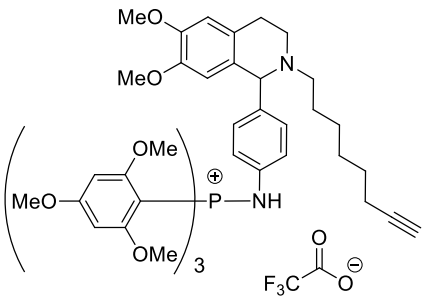
IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 2941, 2837, 1601, 1577, 1457, 1413, 1338, 1231, 1208, 1127, 1098, 814.

MS (ESI+) *m/z* (%) : 815 (100) $[M]^+$.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{52}H_{64}N_2O_{11}P$ $[M]^+$: 923.4248 ; found : 923.4265.

HPLC System C R_t = 3.49 min (purity 99%)

Aminophosphium 154



$C_{54}H_{64}F_3N_2O_{13}P$
MW 1037,06

This compound was prepared according to GP-SA. The crude product was purified by RP-HPLC (System H) and fractions were collected and lyophilized to provide the desired compound (84 mg, 0.099 mmol, 99% yield) as a white powder.

^{1}H NMR (300 MHz, CD_3CN) δ_H 7.08 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.85 – 6.76 (m, 3H), 6.35 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 6.15 (d, *J* = 5.2 Hz, 6H), 5.33 (s, 1H), 3.83 (s, 9H), 3.79 (s, 3H), 3.52 (s, 18H), 3.50 (s, 3H), 3.15 – 2.90 (m, 4H), 2.21 – 2.12 (m, 3H), 1.83 – 1.63 (m, 3H), 1.55 – 1.09 (m, 8H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN) δ_C 167.2 (d, *J* = 1.4 Hz), 165.2 (d, *J* = 1.8 Hz), 161.0, 160.6, 150.3, 149.2, 142.9, 131.5, 129.9, 125.2, 124.1, 121.7 (d, *J* = 7.9 Hz), 112.3, 112.1, 95.9, 94.3, 92.0 (d, *J* = 7.7 Hz), 85.4, 69.8, 66.8, 56.8, 56.5, 56.4, 56.3, 53.6, 46.7, 46.6, 28.8 (d, *J* = 8.5 Hz), 26.8, 24.4, 23.7, 18.6.

^{31}P NMR {H} (121 MHz, CD_3CN) δ_P 15.2.

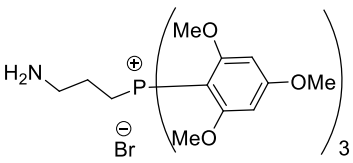
IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3345, 2948, 2849, 1677, 1597, 1577, 1458, 1412, 1230, 1122, 1097, 1027, 813, 798.

MS (ESI+) *m/z* (%) : 923 (100) $[M]^+$.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{52}H_{64}N_2O_{11}P$ $[M]^+$: 923.4248 ; found : 923.4265.

HPLC System C R_t = 29.7 min (purity 99%).

(3-aminopropyl)tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide – 156



$C_{30}H_{41}BrNO_9P$
MW 670,53

This compound was synthesized according to a known procedure and the desired compound (698 mg, 1.04 mmol, 36% yield) was obtained as a white powder without further purification.[29]

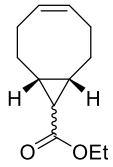
NMR analyses are in accordance with literature data.

[29] Leavens, W. J.; Lane, S. J.; Carr, R. M.; Lockie, A. M.; Waterhouse, I. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 433–441.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H 6.29 (d, *J* = 4.6 Hz, 6H), 3.84 (s, 9H), 3.57 (s, 18H), 3.00 – 2.96 (m, 2H), 2.56 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.33 – 1.25 (m, 2H).

^{31}P NMR {H} (121 MHz, DMSO-d_6) δ_P 6.5.

(*Z*)-ethyl bicyclo[6.1.0]non-4-ene-9-carboxylate– 157



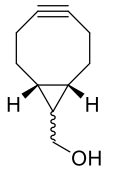
$C_{12}H_{18}O_2$
MW 194,27
(*exo*/*endo* = 62/38)

This compound was synthesized according to a known procedure and the desired compound (1.353 g, 6.96 mmol, 80% yield) was obtained as a colorless sticky oil.[30]

NMR analysis is in accordance with literature data. Diastereoisomers *endo* (38%) and *exo* (62%) were obtained as an inseparable mixture.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 5.70 – 5.52 (m, 2H$_{endo}$ and 2H$_{exo}$), 4.11 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H$_{exo}$), 4.10 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H$_{endo}$), 2.58 – 2.39 (m, 2H$_{endo}$), 2.39 – 1.95 (m, 4H$_{endo}$ and 6H$_{exo}$), 1.86 – 1.75 (m, 2H$_{endo}$), 1.70 (t, *J* = 8.8 Hz, 1H$_{endo}$), 1.63 – 1.32 (m, 2H$_{endo}$ and 4H$_{exo}$), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H$_{endo}$), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H$_{exo}$), 1.18 (t, *J* = 4.4 Hz, 1H$_{exo}$).

((1R,8S)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)methanol– BCN-OH



$C_{10}H_{14}O$
MW 150,22
(*exo*/*endo* = 6/4)

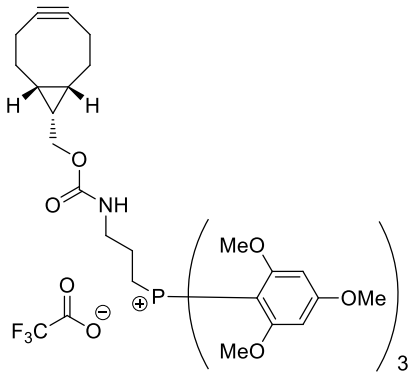
This compound was synthesized according to a known procedure and the desired compound (68 mg, 0.45 mmol, 15% yield) was obtained as a colorless oil.[30]

NMR analysis is in accordance with literature data. Diastereoisomers *endo* (40%) and *exo* (60%) were obtained as an inseparable mixture.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 3.72 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H$_{endo}$), 3.55 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H$_{exo}$), 2.46 – 2.32 (m, 2H$_{endo}$, 2H$_{exo}$), 2.33 – 2.09 (m, 6H$_{endo}$, 6H$_{exo}$), 1.72 – 1.51 (m, 2H$_{endo}$, 1H$_{exo}$), 1.44 – 1.29 (m, 1H$_{endo}$, 2H$_{exo}$), 0.99 – 0.86 (m, 2H$_{endo}$), 0.75 – 0.59 (m, 3H*exo*).

[30] Dommerholt, J.; Schmidt, S.; Temming, R.; Hendriks, L. J. A.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; Lefeber, D. J.; Friedl, P.; van Delft, F. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422–9425.

Phosphonium 160



$C_{43}H_{53}F_3NO_{13}P$
MW 879,85

To a solution of carbonate **159** (15 mg, 0.051 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (1 mL) under argon atmosphere, (3-aminopropyl)tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide **156** (40 mg, 0.060 mmol, 1.2 equiv.) was added in one portion and the reaction was stirred for 9 h. After completion, the solvent was removed by vacuum and the crude product was purified by RP-HPLC (System H) and fractions were collected and lyophilized to provide the desired compound (15 mg, 0.017 mmol, 33% yield) as a white powder.

^{1}H NMR (300 MHz, CD_3CN) δ_H 6.22 (d, *J* = 4.7 Hz, 6H), 5.59 (bs, 1H), 4.07 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 3.85 (s, 9H), 3.58 (s, 18H), 3.13 – 2.91 (m, 4H), 2.30 – 2.05 (m, 6H), 1.56 – 1.25 (m, 4H), 1.27 (p, *J* = 8.6 Hz, 1H), 0.96 – 0.79 (m, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN) δ_C 166.7 (d, *J* = 1.6 Hz), 164.9 (d, *J* = 1.3 Hz), 118.3, 99.7, 93.9, 92.5, 92.2 (d, *J* = 7.0 Hz), 63.0, 56.8, 56.5, 41.9 (d, *J* = 23.3 Hz), 29.8, 27.1, 25.9, 21.8, 20.9, 18.7.

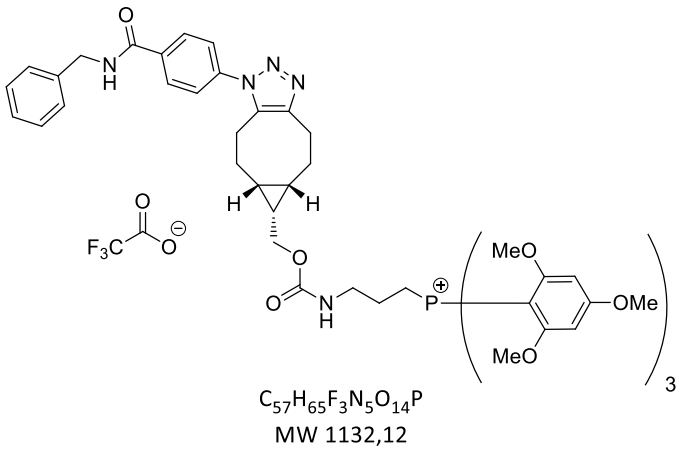
^{31}P NMR {H} (121 MHz, CD_3CN) δ_P 5.8.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 2985, 2947, 2842, 1695, 1599, 1579, 1459, 1413, 1229, 1208, 1127, 1097, 814.

MS (ESI+) *m/z* (%) : 766 (100) $[M]^+$.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{41}H_{53}NO_{11}P$ $[M]^+$: 766.3356 ; found : 766.3371.

Phosphonium 161



$C_{57}H_{65}F_3N_5O_{14}P$
MW 1132,12

To a solution of phosphonium **160** (5 mg, 6 µmol, 1.0 equiv.) in THF/H_2O (200 µL, 2:1, v/v) was added 4-azido-*N*-benzylbenzamide **112** (2.3 mg, 9 µmol, 1.5 equiv.) in one portion and the reaction was stirred at room temperature for 5 h. Then, THF was evaporated and the crude product was purified by RP-HPLC (System H) and fractions were collected and lyophilized to provide the desired compound (4 mg, 3.5 µmol, 59% yield) as a white powder.

^{1}H NMR (300 MHz, CD_3CN) δ_H 8.02 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.41 – 7.24 (m, 5H), 6.20 (d, *J* = 4.6 Hz, 6H), 5.57 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 4.58 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 4.07 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 3.84 (s, 9H), 3.57 (s, 18H), 3.18 – 2.77 (m, 8H), 2.72 – 2.58 (m, 2H), 1.66 – 1.51 (m, 2H), 1.49 – 1.38 (m, 2H), 1.15 (s, 1H), 1.19 – 1.08 (m, 1H), 1.07 – 0.94 (m, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3CN) δ_C 166.8, 166.7, 164.9, 157.7, 140.4, 140.0, 136.5, 135.7, 129.4 (d, *J* = 6.8 Hz), 128.5, 128.0, 126.7, 118.3, 93.7, 92.7, 92.2 (d, *J* = 6.4 Hz), 63.0, 56.8, 56.5, 44.1, 42.0 (d, *J* = 24.1 Hz), 27.1, 26.4, 25.9, 24.0, 23.5, 23.0, 20.7, 20.4, 18.8.

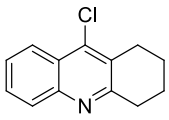
^{31}P NMR {H} (121 MHz, CD_3CN) δ_P 5.8.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3299, 2948, 2842, 1692, 1598, 1580, 1463, 1414, 1338, 1231, 1207, 1127, 1097, 952, 920, 815, 720.

MS (ESI+) *m/z* (%) : 1018 (100) $[M]^+$.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{55}H_{65}N_5O_{14}P$ $[M]^+$: 1018.4367; found :1018.4381.

9-chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridine – 162



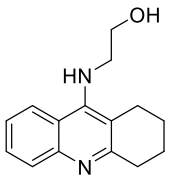
$C_{13}H_{12}ClN$
MW 217,69

This compound was synthesized according to a known procedure and the desired compound (4.54 g, 20.86 mmol, 57% yield) was obtained as a dark red solid.[31]

NMR analysis is in accordance with literature data.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 8.16 (dd, *J* = 8.4, 1.0 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.66 (ddd, *J* = 8.4, 6.9, 1.4 Hz, 1H), 7.53 (ddd, *J* = 8.2, 6.9, 1.2 Hz, 1H), 3.12 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.02 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 1.98 – 1.90 (m, 4H).

2-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)ethanol – 163



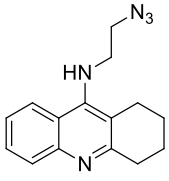
$C_{15}H_{18}N_2O$
MW 242,32

This compound was synthesized according to a known procedure and the desired compound (456 mg, 1.88 mmol, 67% yield) was obtained as a white solid.[32]

NMR analysis is in accordance with literature data.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.94 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J* = 6.9, 1.1 Hz, 1H), 7.35 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.53 (bs, 1H), 3.85 – 3.77 (m, 1H), 3.69 - 3.61 (m, 1H), 3.16 – 3.07 (m, 1H), 2.89 – 2.80 (m, 1H), 1.97 – 1.78 (m, 4H).

***N*-(2-azidoethyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine – 164**



$C_{15}H_{17}N_5$
MW 267,33

To a suspension of 9-chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridine **163** (316 mg, 1.3 mmol, 1.0 equiv.) in dry DCM (6.5 mL) under argon atmosphere was added Et_3N (0.22 mL, 1.56 mmol, 1.2 equiv.) and the solution was cooled to 0 °C. Then, methanesulfonyl chloride (0.11 mL, 1.43 mmol, 1.1 equiv.) was added dropwise and the reaction was stirred at room temperature for 10 min. After completion, the solvent was removed by vacuum and the crude product was engaged in the next step. The crude product was dissolved in DMF (6.5 mL) under argon atmosphere and NaN_3 (338 mg, 5.2 mmol, 4.0 equiv.) was added into the reaction mixture. The reaction was heated to 60 °C

[31] Hu, M.-K.; Wu, L.-J.; Hsiao, G.; Yen, M.-H. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2277–2282.

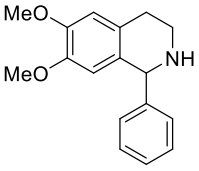
[32] Li, S.-Y. *et al. Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *69*, 632–646.

overnight. After completion, the reaction was poured onto a solution of H_2O/brine (1:1, v/v) and was extracted with EtOAc (x 1). The organic layer was washed with brine (x 3), dried over $MgSO_4$ and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (silica gel, DCM/MeOH as gradient from 100:0 to 98:2 and 95:5, v/v) to provide the desired compound (211 mg, 0.79 mmol, 61% yield) as a dark yellow solid.

NMR analysis is in accordance with literature data.[33]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.92 (ddd, *J* = 8.3, 2.9, 0.8 Hz, 2H), 7.62 – 7.52 (m, 1H), 7.39 (ddd, *J* = 8.3, 6.8, 1.2 Hz, 1H), 4.25 (bs, 1H), 3.66 – 3.54 (m, 2H), 3.54 – 3.42 (m, 2H), 3.15 – 2.99 (m, 2H), 2.83 – 2.67 (m, 2H), 1.99 – 1.85 (m, 4H).

<u>6,7-dimethoxy-1-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline – 166</u>



$C_{17}H_{19}NO_2$
MW 269,34

To a solution of 2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethan-1-amine (18.7 mL, 110.4 mmol, 1 equiv.) in toluene (250 mL) was added benzaldehyde (12.3 mL, 121.4 mmol, 1.1 equiv.) and MS 4Å. The reaction was refluxed for 24 h and after completion, the reaction was cooled and filtered. Solvent was removed by vacuum and the corresponding imine was directly engaged in the next step. For this, the crude imine was dissolved in TFA (150 mL) and the reaction was refluxed for 4 h. After completion, the reaction was cooled to room temperature and was slowly poured onto a cold saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ and extracted with DCM (x 2). The combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was tritured with cold Et_2O, filtered, rinced with cold Et_2O and dried by vacuum. The desired product (12.66 g, 47.0 mmol, 43% yield) was obtained without further purification as a white powder.

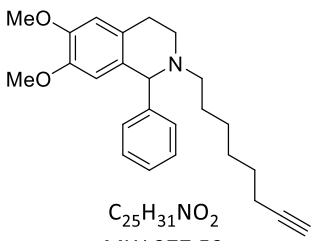
NMR analysis is in accordance with literature data.[34]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.38 – 7.22 (m, 5H), 6.63 (s, 1H), 6.21 (s, 1H), 5.14 (s, 1H), 4.87 (bs, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.25 – 3.12 (m, 1H), 3.11 – 2.93 (m, 2H), 2.85 – 2.70 (m, 1H).

[33] Oukoloff, K. *et al. Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *168*, 58–77.

[34] Awuah, E.; Carpetta, A. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 5627–5634.

6,7-dimethoxy-2-(oct-7-yn-1-yl)-1-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline – 167



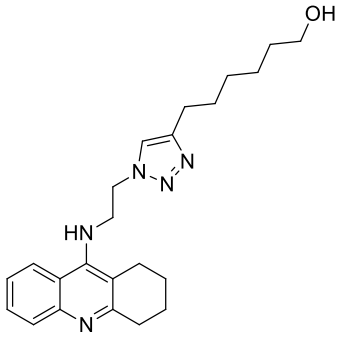
$C_{25}H_{31}NO_2$
MW 377,52

A solution of 6,7-dimethoxy-1-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline **166** (215 mg, 0.80 mmol, 1.0 equiv.) and oct-7-yn-1-yl 4-methylbenzenesulfonate **140** (240 mg, 0.86 mmol, 1.1 equiv.) was prepared in dry MeCN (16 mL) under argon atmosphere. Then, anhydrous K_2CO_3 (332 mg, 2.4 mmol, 3.0 equiv.) was introduced into the mixture and the reaction was refluxed for 24 h. After completion, the reaction was cooled to room temperature and was filtered. The filtrate was diluted with H_2O and extracted with EtOAc (x 2). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 10:0 to 9:1 and 8:2, v/v) to provide the desired compound (210 mg, 0.57 mmol, 70% yield) as a white solid.

NMR analysis is in accordance with literature data.[35]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.34 – 7.17 (m, 5H), 6.60 (s, 1H), 6.18 (s, 1H), 4.48 (s, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.15 (dt, *J* = 11.6, 5.1 Hz, 1H), 3.05 – 2.89 (m, 1H), 2.77 (dt, *J* = 16.0, 4.5 Hz, 1H), 2.63 – 2.43 (m, 2H), 2.36 – 2.22 (m, 1H), 2.14 (td, *J* = 7.1, 2.6 Hz, 2H), 1.92 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.58 – 1.39 (m, 4H), 1.39 – 1.05 (m, 6H).

6-(1-(2-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)ethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)hexan-1-ol – 168



$C_{23}H_{31}N_5O$
MW 393,53

To a solution of oct-7-yn-1-ol (88 mg, 0.70 mmol, 1 equiv.) in dry MeCN (3.5 mL) under argon atmosphere were added Et_3N (95 µL, 0.70 mmol, 1 equiv.) and *N*-(2-azidoethyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine **164** (185 mg, 0.70 mmol, 1 equiv.). Then, CuI (27 mg, 0.14 mmol, 0.2 equiv.) was added and the reaction was stirred at room temperature for 24 h. After that time, MeCN was removed by vacuum and crude product was purified by silica gel flash column chromatography (silica gel,

[35] Krasiński, A.; Radić, Z.; Manetsch, R.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6686–6692.

EtOAc/MeOH as gradient from 100:0 to 95:5, 90/10 and 8:2, v/v) to provide the desired compound (102 mg, 0.26 mmol, 37% yield) as a yellow oil.

R*f* (EtOAc/MeOH, 9/1) = 0.10

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.90 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.53 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 8.3, 7.0 Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 4.80 (bs, 1H), 4.57 – 4.39 (m, 2H), 4.07 – 3.90 (m, 2H), 3.61 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.13 – 2.90 (m, 4H), 2.66 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.61 – 2.53 (m, 2H), 1.93 – 1.79 (m, 4H), 1.69 – 1.44 (m, 4H), 1.44 – 1.12 (m, 3H).

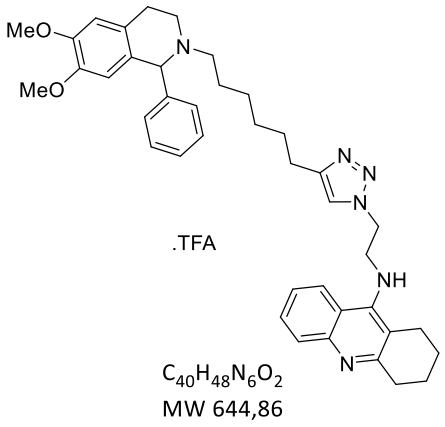
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 158.0, 149.8, 148.7, 146.1, 128.8, 127.7, 124.4, 122.3, 121.5, 119.9, 117.1, 77.2, 62.6, 50.4, 47.9, 33.1, 32.5, 29.2, 28.7, 25.3, 25.3, 24.7, 22.7, 22.4.

IR (neat) γmax (cm^{-1}) 3320, 2929, 2857, 1582, 1563, 1498, 1456, 1408, 1353, 1143, 1052, 940, 803, 764.

MS (ESI+) *m/z* (%) : 394 (100) $[M+H]^+$, 416 (40) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{23}H_{31}N_5O$ $[M+H]^+$: 394.2602 ; found : 394.2601.

<u>*N*-(2-(4-(6-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1*H*)-yl)hexyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine – *trans*-TZ2OIQ-A6</u>



$C_{40}H_{48}N_6O_2$
MW 644,86

To a solution of 6-(1-(2-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)hexan-1-ol **168** (150 mg, 0.38 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (3.5 mL) under argon atmosphere was added Et_3N (0.11 mL, 0.84 mmol, 2.2 equiv.). Then, the reaction was cooled to 0 °C and methanesulfonyl chloride (36 µL, 0.46 mmol, 1.2 equiv.) was added dropwise and the reaction was stirred for 10 min at 0 °C and for 50 min at room temperature. After that time, solvent and remaining Et_3N were evaporated under vacuum. The crude product was then dissolved in dry MeCN (14 mL) under argon atmosphere. 6,7-Dimethoxy-1-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline **166** (130 mg, 0.42 mmol, 1.1 equiv.) and anhydrous K_2CO_3 (79 mg, 0.57 mmol, 1.5 equiv.) were added into the mixture, which was stirred at 50 °C overnight. Then, the reaction was filtered and MeCN was evaporated. The crude product was purified (x

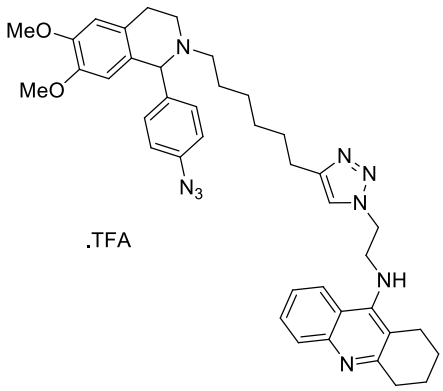
4) by RP-HPLC (System H) and fractions were collected and lyophilized to provide the desired compound (9 mg, 0.014 mmol, 4% yield) as a white powder.

NMR analysis is in accordance with literature data.[35]

^{1}H NMR (300 MHz, methanol-d_4) δ_H 8.27 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.90 – 7.84 (m, 1H), 7.76 (dd, *J* = 8.5, 0.9 Hz, 1H), 7.65 – 7.56 (m, 2H), 7.453 – 7.45 (m, 3H), 7.40 – 7.31 (m, 2H), 6.91 (s, 1H), 6.32 (s, 1H), 5.73 (bs, 1H), 4.75 (dd, *J* = 6.5, 4.5 Hz, 2H), 4.45 (dd, *J* = 6.3, 4.7 Hz, 2H), 4.14 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.74 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.59 (s, 3H), 3.27 – 3.20 (m, 1H), 3.10 – 2.95 (m, 3H), 2.81 – 2.71 (m, 1H), 2.70 – 2.60 (m, 2H), 2.54 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.01 – 1.88 (m, 6H), 1.62 – 1.45 (m, 2H), 1.40 – 1.24 (m, 4H).

HPLC System C R_t = 20.4 min (90% purity).

N-(2-(4-(6-(1-(4-azidophenyl)-6,7-dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)hexyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine – 169



$C_{42}H_{48}F_3N_9O_4$
MW 799,88

To a solution of 6-(1-(2-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)hexan-1-ol **168** (183 mg, 0.46 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (4.6 mL) under argon atmosphere was added Et_3N (0.13 mL, 0.95 mmol, 2.2 equiv.). Then, the reaction was cooled to 0 °C and methanesulfonyl chloride (43 µL, 0.55 mmol, 1.2 equiv.) was added dropwise and the reaction was stirred for 10 min at 0 °C and for 50 min at room temperature. After that time, solvent and remaining Et_3N were evaporated under vacuum. The crude product was then dissolved in dry MeCN (14 mL) under argon atmosphere. 1-(4-azidophenyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline **137** (158 mg, 0.51 mmol, 1.1 equiv.) and anhydrous K_2CO_3 (97 mg, 0.7 mmol, 1.5 equiv.) were added into the mixture, which was stirred at 50 °C overnight. Then, the reaction was filtered and MeCN was evaporated. The crude product was purified (x 4) by RP-HPLC (System H) and fractions were collected and lyophilized to provide the desired compound (10 mg, 0.027 mmol, 6% yield) as a white powder.

^{1}H NMR (300 MHz, CD_3CN) δ_H 8.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.93 (dd, *J* = 8.5, 0.8 Hz, 1H), 7.84 – 7.71 (m, 1H), 7.52 (ddd, *J* = 8.4, 7.0, 1.1 Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.09 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.83 (s, 1H), 6.70 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 6.29 (s, 1H), 5.54 (bs, 1H), 4.72 – 4.56 (m, 2H), 4.34 (dd, *J* = 11.0, 5.8 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.56 (s, 3H), 3.45 – 3.29 (m, 1H), 3.29 – 3.08 (m, 2H), 3.06 – 2.87 (m, 4H), 2.57 – 2.45 (m, 6H), 1.85 (t, *J* = 3.1 Hz, 4H), 1.80 – 1.63 (m, 2H), 1.41 (p, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.29 – 1.07 (m, 4H).

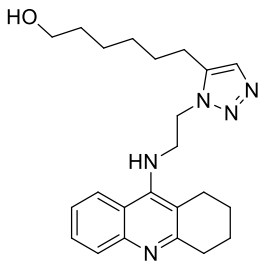
^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN) δ_C 157.6, 153.0, 150.5, 149.4, 148.9, 142.6, 139.3, 133.8, 126.5, 125.6, 125.0, 123.1, 120.6, 120.3, 118.4, 117.1, 114.0, 112.2, 56.5, 56.4, 54.0, 50.7, 48.7, 29.7, 29.0, 28.9, 26.9, 25.7, 24.7, 24.4, 22.5, 21.4.

IR (neat) γmax (cm^{-1}) 3288, 2946, 2872, 2119, 1669, 1588, 1518, 1174, 1121, 798, 718.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{40}H_{48}N_9O_2$ $[M+H]^+$: 686.3930 ; found : 686.3931.

HPLC System C R_t = 21.7 min (92% purity).

6-(1-(2-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)ethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-5-yl)hexan-1-ol formate – 170



.HCO_2H

$C_{24}H_{33}N_5O_3$

MW 439,55

A solution of oct-7-yn-1-ol (103 mg, 0.39 mmol, 1 equiv.) and *N*-(2-azidoethyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine **164** (59 mg, 0.47 mmol, 1.2 equiv.) in MeOH was first prepared. Then, MeOH was removed by vacuum so as to get a sticky reaction mixture which was heated to 80 °C for 7 days. After that time, the crude product was purified firstly by silica gel flash column chromatography (silica gel, DCM/MeOH as gradient from 100:0 to 96:4 and 90/10, v/v). Then, isomers *syn* and *anti* were separated by RP-HPLC (System G) and fractions were collected and lyophilized to provide the desired compound (43 mg, 0.098 mmol, 25% yield) as a yellow oil.

R*f* (DCM/MeOH, 9/1) = 0.10

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 8.78 (bs, 1H), 7.94 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.89 (d, = 8.4 Hz, 1H), 7.49 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.30 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.66 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 4.20 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.59 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.07 – 2.97 (m, 2H), 2.63 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.53 – 2.45 (m, 2H), 1.86 – 1.73 (m, 4H), 1.57 – 1.41 (m, 4H), 1.38 – 1.17 (m, 4H).

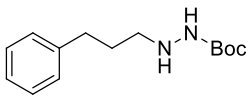
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 168.6, 154.3, 153.3, 148.6, 141.0, 130.7, 124.9, 123.2, 122.9, 122.0, 117.7, 113.8, 62.4, 50.0, 47.6, 32.5, 29.9, 29.2, 28.6, 25.3, 25.3, 24.6, 22.2, 21.2.

IR (neat) γmax (cm^{-1}) 3281, 3131, 3072, 2931, 2857, 2776, 2673, 1650, 1584, 1519, 1334, 1047, 914, 760, 729.

MS (ESI+) *m/z* (%) : 394 (100) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{23}H_{32}N_5O$ $[M+H]^+$: 394.2607 ; found : 394.2605.

***tert*-butyl 2-(3-phenylpropyl)hydrazinecarboxylate – 171**



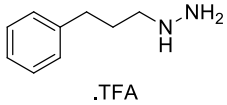
$C_{14}H_{22}N_2O_2$
MW 250,34

To a solution of (3-bromopropyl)benzene (0.91 mL, 6.0 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (10 mL) under argon atmosphere were added DIEA (2.1 mL, 12 mmol, 2 equiv.) and *tert*-butylcarbazate (3.96 g, 30 mmol, 5 equiv.). The tube was sealed and the reaction was heated to 90 °C overnight. The reaction was then cooled to room temperature and was diluted with EtOAc. The organic layer was washed with brine (x 3), dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 9:1 to 8:2, 7:3 and 5:5, v/v) to provide the desired compound (1.2 g, 4.79 mmol, 81% yield) as a pale yellow oil.

NMR analysis is in accordance with literature data.[36]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.34 – 7.06 (m, 5H), 6.07 (bs, 1H), 2.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.68 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H), 1.86 – 1.72 (m, 2H), 1.46 (s, 9H).

2-(3-phenylpropyl)hydrazin-1-ium 2,2,2-trifluoroacetate – 172



.TFA

$C_{11}H_{15}F_3N_2O_2$
MW 264,24

To a solution of *tert*-butyl 2-(3-phenylpropyl)hydrazinecarboxylate **171** (1.2 g, 4.79 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (6 mL) cooled to 0 °C was slowly added TFA (2 mL). After 10 min, the reaction was warmed to room temperature and was stirred for 20 h. After completion, solvent and excess of TFA were removed by vacuum to provide the desired compound (1.26 g, 4.79 mmol, quant.) as a yellow oil.

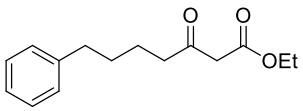
NMR analysis is in accordance with literature data.[37]

[36] Matunas, R.; Lai J., A.; Lee C. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 6298-6308.

[37] Prusevich, P. *et al. ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1284–1293.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.33 – 7.07 (m, 5H), 3.12 – 2.98 (m, 2H), 2.65 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.05 – 1.91 (m, 2H).

Ethyl 3-*oxo*-7-phenylheptanoate – 173



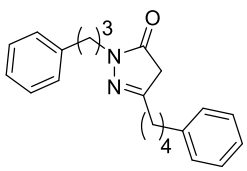
$C_{15}H_{20}O_3$
MW 248,32

To a solution of ethyl 3-oxobutanoate (0.50 mL, 5.0 mmol, 1 equiv.) in dry THF (12.5 mL) under argon atmosphere and to cooled to 0 °C was added NaH (60% w/w, 144 mg, 6.0 mmol, 1.2 equiv.). The reaction was stirred at 0 °C for 10 min. Then, a solution of *n*-BuLi in THF (2.26 M, 2.32 mL, 5.25 mmol, 1.1 equiv.) was added dropwise at 0 °C. The mixture became yellow after a few minutes and the reaction was stirred for 15 min. After that time, a solution of (3-bromopropyl)benzene (0.86 mL, 5.5 mmol, 1.1 equiv.) in dry THF (6 mL) was slowly added to the reaction at 0 °C. After 5 min, the reaction was warmed to room temperature and stirred for 30 min. Then, the reaction was poured onto a cold saturated solution of NH_4Cl and extracted with EtOAc (x 2). The combined organic layers were washed with H_2O, dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 100:0 to 95:5 and 90:10, v/v) to provide the desired compound (605 mg, 2.44 mmol, 49% yield) as a pale yellow oil.

NMR analysis is in accordance with literature data.[38]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.34 – 7.06 (m, 5H), 4.19 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.41 (s, 2H), 2.73 – 2.45 (m, 4H), 1.70 – 1.56 (m, 4H), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

3-(4-phenylbutyl)-1-(3-phenylpropyl)-1*H*-pyrazol-5(4*H*)-one – 174



$C_{22}H_{26}N_2O$
MW 334,45

To a solution of 2-(3-phenylpropyl)hydrazin-1-ium 2,2,2-trifluoroacetate **172** (114 mg, 0.46 mmol, 1.2 equiv.) in a solution of EtOH/PBS pH 7.4 (2.67 mL, 1:1, v/v) was added a solution of ethyl 3-*oxo*-7-phenylheptanoate **173** in EtOH (1.33 mL). The final ratio of solvent system was EtOH/PBS pH 7.4 (2:1, v/v). The reaction was stirred at room

[38] Tang, S.; Xie, X.; Wang, X.; He, L.; Xu, K.; She, X. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 8234–8240.

temperature for 24 h. After that time, the reactional mixture was diluted with H_2O and EtOH was evaporated under vacuum. Aqueous layer was extracted with EtOAc (x 2). The combined organic layers were washed with H_2O, dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 100:0 to 8:2, 7:3 and 6/4, v/v) to provide the desired compound (61 mg, 0.18 mmol, 50% yield) as a beige solid.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 1/1) = 0.18

m.p. = 110 °C

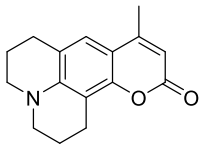
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.36 – 7.05 (m, 10H), 3.68 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.09 (s, 2H), 2.66 (dd, *J* = 11.4, 4.3 Hz, 4H), 2.40 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.02 (dt, *J* = 14.6, 7.4 Hz, 2H), 1.73 – 1.50 (m, 4H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 172.0, 159.0, 141.8, 141.3, 128.4, 128.3, 128.3, 125.8, 43.6, 40.2, 35.4, 33.0, 30.9, 30.8, 29.7, 26.1.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3084, 3025, 2940, 2860, 1538, 1497, 1345, 1253, 1233, 1192, 1078, 752, 708, 699.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{22}H_{27}N_2O$ $[M+H]^+$: 335.2123 ; found : 335.2119.

9-methyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*,11*H*-pyrano[2,3-*f*]pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-11-one – 174



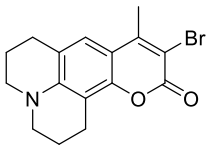
$C_{16}H_{17}NO_2$
MW 255,32

To a solution of 2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*-pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-8-ol (500 mg, 2.7 mmol, 1 equiv.) in dry EtOH (8 mL) under argon atmosphere was added ethyl 3-oxobutanoate (0.38 mL, 2.97 mmol, 1.1 equiv.) and anhydrous $ZnCl_2$ (442 mg, 3.24 mmol, 1.2 equiv.). The tube was sealed and the reaction was reflux overnight. After that time, the reaction was cooled to room temperature and poured onto a solution of aqueous HCl (0.5 M). Aqueous layer was extracted with DCM (x 2). The combined organic layers were washed with H_2O (x 3), dried over $MgSO_4$ and solvent were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1, 8:2 and 5/5, v/v) to provide the desired compound (353 mg, 1.38 mmol, 51% yield) as a yellow solid.

NMR analysis is in accordance with literature data.[39]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 6.97 (s, 1H), 5.89 (s, 1H), 3.24 (dd, *J* = 11.7, 6.5 Hz, 4H), 2.88 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.77 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.02 – 1.90 (m, 4H).

10-bromo-9-methyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*,11*H*-pyrano[2,3-*f*]pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-11-one – 175



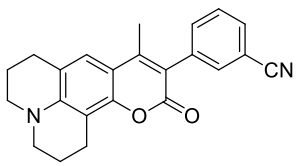
$C_{16}H_{16}BrNO_2$
MW 334,21

To a solution of 9-methyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*,11*H*-pyrano[2,3-*f*]pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-11-one **174** (360 mg, 1.41 mmol, 1 equiv.) in dry MeCN (12 mL) under argon atmosphere was added a solution of NBS (301 mg, 1.69 mmol, 1.2 equiv.) in dry MeCN (4 mL). The reaction was stirred for 1.5 h. After that time, MeCN was evaporated and crude product was dissolved in DCM. Organic layer was washed with aqueous solutions of Na_2CO_3 50% (x 1), saturated $Na_2S_2O_3$ (x 1), brine (x 1) and dried over $MgSO_4$ and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 100:0 to 85:5 and 7:3, v/v) to provide the desired compound (407 mg, 1.22 mmol, 86% yield) as a yellow solid.

NMR analysis is in accordance with literature data.[39]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.01 (s, 1H), 3.31 – 3.18 (m, 4H), 2.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.78 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.49 (s, 3H), 2.03 – 1.89 (m, 4H).

3-(9-methyl-11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahydro-1*H*-pyrano[2,3-*f*]pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-10-yl)benzonitrile – 176



$C_{23}H_{20}N_2O_2$
MW 356,42

10-bromo-9-methyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*,11*H*-pyrano[2,3-*f*]pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-11-one **175** (200 mg, 0.60 mmol, 1 equiv.) and (3-cyanophenyl)boronic acid (176 mg, 1.20 mmol, 2 equiv.) were introduced into a sealed round bottom flask under argon atmosphere. These compound were dissolved in dioxane (5.3 mL and H_2O (2 mL) with a final ratio dioxane/H_2O (3:1, v/v). The solution was degased by argon

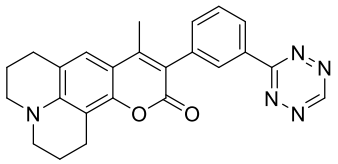
[39] Meimetis, L. G.; Carlson, J. C. T.; Giedt, R. J.; Kohler, R. H.; Weissleder, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7531–7534.

bubbling for 10 min. Then, K_3PO_4 (245 mg, 1.8 mmol, 3 equiv.) and $Pd(OAc)_2(PPh_3)_2$ (48 mg, 0.06 mmol, 0.1 equiv.) were successively added into the reaction mixture, which was degased by argon bubbling for 10 more. Then, flask was sealed and the reaction was heated to 100 °C for 8 h. After that time, the reaction was filtered through a pad of celite (elution with EtOAc) and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1, 8:2 and 7:3, v/v) to provide the desired compound (200 mg, 0.56 mmol, 94% yield) as a yellow solid.

NMR analysis is in accordance with literature data.[39]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.65 – 7.47 (m, 4H), 7.06 (s, 1H), 3.28 (dd, *J* = 11.5, 5.8 Hz, 4H), 2.93 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.80 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.06 – 1.92 (m, 4H).

HELIOS 400H



$C_{24}H_{21}N_5O_2$
MW 411,47

3-(9-Methyl-11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahydro-1*H*-pyrano[2,3-*f*]pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-10-yl)benzonitrile **176** (100 mg, 0.28 mmol, 1 equiv.) was introduced into a dry sealed round bottom flask under argon atmosphere and was dissolved in dry DMF (0.24 mL). Then, formamidine acetate (875 mg, 8.4 mmol, 30 equiv.), $Zn(OTf)_2$ (153 mg, 0.42 mmol, 1.5 equiv.) and hydrazine monohydrate (1.32 mL, 42 mmol, 150 equiv.) were successively added into the mixture, which was gased by argon bubbling for 10 min. Then, the flask was sealed and the reaction was heated to 45 °C. After 4 days, $Zn(OTf)_2$ (153 mg, 0.42 mmol, 1.5 equiv.) was added again and the reaction was heated again to 45 °C for 3 additional days. After this week of reaction, a solution of $NaNO_2$ (386 mg, 5.6 mmol, 20 equiv.) in H_2O (20 mL) was prepared and the reaction was poured onto this solution. The pH was then adjusted to 3 with a solution of aqueous HCl (1 M) and the mixture was stirred for 15 min. The coloration, which was initially orange, became pink after that time. The crude product was purified firstly on a preparative TLC plate (toluene/EtOAc 98:2, v/v), which was eluted four times. Desired portion of silica was preleaved and compound was eluted from the silica with a solvent mixture (DCM/EtOAc/MeOH, 5:4:1, v/v/v). A final purification step was accomplished on a preparative TLC plate (DCM/EtOAc 9:1, v/v). Desired portion of silica was preleaved and product was eluted from silica with a solvent mixture (DCM/EtOAc/MeOH,

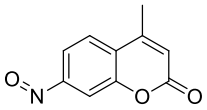
5:4:1, v/v/v) to provide the desired compound (7 mg, 0.017 mmol, 2% yield over 4 batches) as a dark red powder.

(CAUTION! 1,2,4,5-tetrazine is also produced during the reaction. This pink compound is volatile and may be explosive. Do not start this reaction on large scales.)

NMR analysis is in accordance with literature data.[39]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 10.21 (s, 1H), 8.61 (dt, *J* = 7.8, 1.5 1H), 8.58 – 8.53 (m, 1H), 7.67 (dt, *J* = 7.2, 0.5 Hz, 1H), 7.61 (dt, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1H), 7.08 (s, 1H), 3.25 (q, *J* = 6.9 Hz, 4H), 2.94 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.79 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.26 (s, 3H), 1.96 (quin, *J* = 5.7 Hz, 4H).

4-methyl-7-nitroso-2H-chromen-2-one – S7



$C_{10}H_7NO_3$
MW 189,17

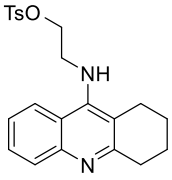
This compound was prepared according to a known procedure.[40]

The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1 and 8:2, v/v) to provide the desired compound (40 mg, 0.21 mmol, 61% yield) as a green solid.

NMR analysis is in accordance with literature data.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.88 – 7.84 (m, 2H), 7.78 (dd, *J* = 1.5, 0.7 Hz, 1H), 6.48 (q, *J* = 1.3 Hz, 1H), 2.52 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H).

2-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)ethyl 4-methylbenzenesulfonate – 180



$C_{22}H_{24}N_2O_3S$
MW 396,51

This compound was synthesized according to a known procedure and the desired compound (213 mg, 0.54 mmol, 55% yield) was obtained as a brown solid.[41]

NMR analysis is in accordance with literature data.

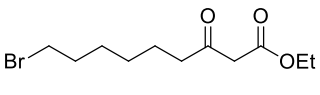
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.90 – 7.86 (m, 1H), 7.82 – 7.76 (m, 1H), 7.69 – 7.62 (m, 2H), 7.50 (ddd, *J* = 8.3, 5.4, 1.2 Hz, 1H), 7.32 – 7.25 (m, 1H), 7.25 – 7.18 (m, 2H), 4.52

[40] Renault, K.; Sabot, C.; Renard, P.-Y. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 7992–7996.

[41] Xie, S.-S.; Wang, X.; Jiang, N.; Yu, W.; Wang, K. D. G.; Lan, J.-S.; Li, Z.-R.; Kong, L.-Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *95*, 153–165.

(t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.29 (bs, 1H), 4.09 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.79 – 3.62 (m, 2H), 3.01 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.60 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.91 – 1.73 (m, 5H).

ethyl 9-bromo-3-oxononanoate – 184



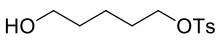
$C_{11}H_{19}BrO_3$
MW 279,17

To a solution of ethyl 3-oxobutanoate (1.98 mL, 20 mmol, 1 equiv.) in dry THF (50 mL) under argon atmosphere and to cooled to 0 °C was added NaH (60% w/w, 960 mg, 26 mmol, 1.2 equiv.). The reaction was stirred at 0 °C for 10 min. Then, a solution of *n*-BuLi in THF (2.20 M, 10 mL, 22 mmol, 1.1 equiv.) was added dropwise at 0 °C. The mixture became yellow after few minutes and the reaction was stirred for 15 min. After that time, a solution of 1,5-dibromopentane (5.4 mL, 40 mmol, 2 equiv.) in dry THF (10 mL) was slowly added to the reaction at 0 °C. After 5 min, the reaction was warmed to room temperature and stirred for 30 min. Then, the reaction was poured onto a cold saturated aqueous solution of NH_4Cl. and extracted with Et_2O (x 2). The combined organic layers were washed with brine (x 2), dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 100:0 to 95:5 and 90:10, v/v) to provide the desired compound (2.16 g, 7.74 mmol, 39% yield) as a yellow oil.

NMR analysis is in accordance with literature data.[42] Equilibrium between ketone and corresponding enol forms was observed by NMR, in a ratio 9/1 respectively.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 12.10 (s, 0.1H), 4.96 (s, 0.1H), 4.18 – (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.42 (s, 1.5H), 3.38 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.54 (t, *J* = 7.3 Hz, 1.6H), 2.19 (t, *J* = 7.5 Hz, 0.2H), 1.85 (quin, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.60 (quin, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.51 – 1.38 (m, 2H), 1.37 – 1.19 (m, 2H), 1.27 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

5-hydroxypentyl 4-methylbenzenesulfonate – 185



$C_{12}H_{18}O_4S$
MW 258,33

To a solution of pentane-1,5-diol (5.0 g, 48 mmol, 2 equiv.) in dry DCM (80 mL) under argon atmosphere were added Et_3N (6.52 mL, 48 mmol, 2 equiv.) and DMAP (293 mg, 2.4 mmol, 0.1 equiv.). The mixture was cooled to 0 °C

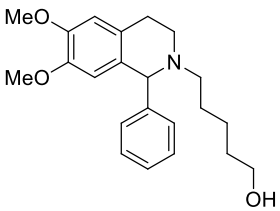
[42] Zhao, M.-X.; Wang, M.-X.; Yu, C.-Y.; Huang, Z.-T.; Fleet, G. W. J. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 997–1000.

and 4-methylbenzenesulfonyl chloride (4.576 g, 24 mmol, 1 equiv.) was added in one portion. After 10 min, the reaction was warmed to room temperature and was stirred for 4 h. The reaction was quenched with H_2O and DCM was evaporated under vacuum. Aqueous layer was extracted with EtOAc (x 2). The combined organic layers were washed with brine (x 1), dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1, 8:2, 7:3 and 6:4, v/v) to provide the desired compound (3.66 g, 14.16 mmol, 59% yield) as a colorless oil.

NMR analysis is in accordance with literature data.[43]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.81 – 7.73 (m, 2H), 7.38 – 7.30 (m, 2H), 4.01 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.60 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.44 (s, 3H), 1.74 – 1.62 (m, 2H), 1.58 – 1.45 (m, 2H), 1.45 – 1.32 (m, 2H).

5-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1*H*)-yl)pentan-1-ol – 186



$C_{22}H_{29}NO_3$
MW 355,47

A solution of 6,7-dimethoxy-1-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline **166** (207 mg, 0.77 mmol, 1 equiv.) and 5-hydroxypentyl 4-methylbenzenesulfonate **185** (200 mg, 0.77 mmol, 1 equiv.) was prepared in dry MeCN (7.7 mL) under argon atmosphere. Then, anhydrous K_2CO_3 (213 mg, 1.54 mmol, 2.0 equiv.) was introduced into the mixture and the reaction was refluxed for 16 h. After completion, the reaction was cooled to room temperature and filtered. Et_2O was added to the filtrate and a precipitate appeared. The corresponding solid was filtered and washed with Et_2O. The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 10:0 to 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5 and 3:7, v/v) to provide the desired compound (210 mg, 0.57 mmol, 70% yield) as a clear yellow solid.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 3/7) = 0.30

m.p. = 91 °C

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.34 – 7.18 (m, 5H), 6.60 (s, 1H), 6.17 (s, 1H), 4.48 (s, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.57 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.15 (dt, *J* = 11.6, 5.1 Hz, 1H), 3.06 – 2.90 (m, 1H),

[43] Fujihara, R.; Nakata, K. *Chem. Select* **2019**, *4*, 75–77.

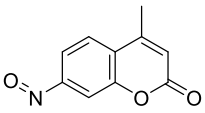
2.77 (dt, *J* = 16.0, 4.5 Hz, 1H), 2.62 – 2.44 (m, 2H), 2.31 (dt, *J* = 12.8, 6.6 Hz, 1H), 1.57 – 1.40 (m, 4H), 1.34 – 1.22 (m, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 147.3, 147.0, 144.1, 130.1, 129.6, 128.0, 127.0, 126.9, 111.7, 110.8, 68.0, 62.8, 55.7, 55.7, 54.0, 46.8, 32.4, 28.1, 26.4, 23.3.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3268, 3082, 3062, 2929, 2859, 1609, 1515, 1455, 1249, 1134, 1016, 806, 743, 694.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{22}H_{30}NO_3$ $[M+H]^+$: 356.2226 ; found : 356.2224.

<u>Time-dependent fluorescence intensity increase of probe S7 in the presence of various additives</u>:

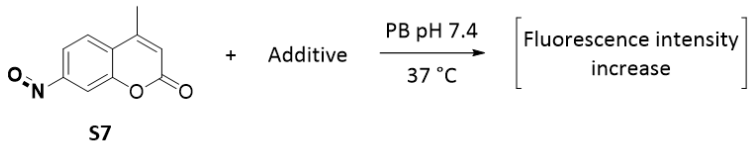


S7

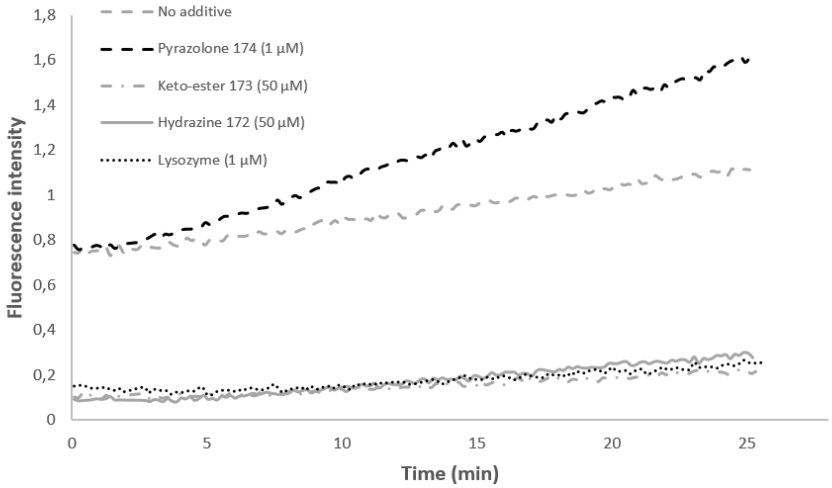
Time course of fluorescence increase of probe **S7** (50 µM) was measured with each additive (tested independently) in a solution of MeOH/PB pH 7.4 (1:1, v/v) at 37 °C for 25 minutes (λ_{ex} = 330 nm ; λ_{em}= 454 nm). Final volume was 3 mL for each experiment.

Stock solutions of probe **S7** and additives were prepared in MeOH (except for lysozyme which was prepared in PB pH 7.4 250 mM). Reactional mixture for each additive was prepared as follows : 1) stock solution of **S7** was diluted in a solution of MeOH/PB pH 7.4 in the fluorescence cell, 2) Additive was added with a homogeneization of the medium and 3) time course fluorescence was started. The following table summarizes the different concentration and the volume which was preleved for every component and solvents.

Additive	**$V_{additive}$ (µL)**	**$C_{additive}$ (µM)**	**V_{S7} (µL) / C_{S7} (µM)**	**$V_{MeOH/PB\ pH\ 7.4}$ (µL)**
ø	0	0	28 / 50	1472 / 1500
174	500	50	28 / 50	972 / 1500
173	500	50	28 / 50	972 / 1500
172	500	50	28 / 50	972 / 1500
Lysozyme	500	1	28 / 50	1472 / 1000


+ Additive
PB pH 7.4
37 °C
Fluorescence intensity increase

S7


No additive
Pyrazolone 174 (1 µM)
Keto-ester 173 (50 µM)
Hydrazine 172 (50 µM)
Lysozyme (1 µM)
Fluorescence intensity
Time (min)
0
0,2
0,4
0,6
0,8
1
1,2
1,4
1,6
1,8
0
5
10
15
20
25

6. Procedures and molecular description for Chapter IV

General procedure for KTGS experiments:

All the KTGS experiments were performed according to the following representative procedure.

Stock solutions of thiol **44** (1 mg/mL in DMSO, 4.92 mM), alkyne **225** (6 mg/mL in DMSO, 35.6 mM) and **ATZ** (5 mg/mL in DMSO, 22.5 mM) were first prepared, followed by a solution of *b*CA II (2 mg/mL in PB pH 7.4 250 mM, 60 µM). The order of introduction of buffer and stock solutions were as follows: 1) PB pH 7.4 250 mM ; 2) *b*CA II for « ATZ » and « Enzyme » experiments ; 2) DMSO for « Blank » and « *b*CA II » experiments ; 3) ATZ for « ATZ » experiment (incubation at room temperature for 2 min) ; 4) thiol **44** (incubation at room temperature for 2 min) ; 5) alkyne **225**.

Volumes of buffer and stock solutions which were preleved for each experiment were as follows (final volume = 1000 µL ; 3% v/v of DMSO maximum):

Experiment	**V PB pH 7.4 (µL)**	**V *b*CA II (µL)**	**DMSO (µL)**	**V ATZ (µL)**	**V 44 (µL)**	**V 225 (µL)**
« Blank »	968	/	9	/	12	11
« ATZ »	468	500	/	9	12	11
« *b*CA II »	468	500	9	/	12	11

Final concentrations were as follows:

Experiment	***b*CA II (µM)**	**ATZ (µM)**	**44 (µM)**	**225 (µM)**
Blank	0	0	60	400
ATZ	30	200	60	400
Enzyme	30	0	60	400

After the preparation of each solution, the eppendorfs were closed and solutions were gently homogenized before their incubation at 37 °C for 36 h. Every 12 h, the solutions were gently homogenized. After incubation, 500 µL of each solution were preleved and diluted in a solution of MeCN/MeOH (500 µL, 1:1, v/v, HPLC quality) and were vortexed (30 sec) for denaturing the protein and precipitating inorganic salts. The resulting solutions were decanted for 15 min. Then, solutions were preveled with a 1 mL disposable syringe and filtered with a HPLC filter (porosity = 0.45 µm). Finally, resulting solutions were analyzed by LC-MS/MRM (System E).

General procedure for *b*CA II inhibition assay: This procedure was done in triplicate for every compound tested.

- Preparation of first stock solutions:
  - S1(*b*CA II): 60 µM (2 mg/mL) in Tris buffer (pH 7.6, 50 mM)
  - S1(PNPA): 120 mM (21.8 mg/mL) in DMSO
  - S1(Ligand): 1 mM in DMSO
- Preparation of second stock solutions:
  - S2(*b*CA II): dilution of S1(*b*CA II) in Tris buffer (pH 7.6, 50 mM) so as to reach a final concentration of 6 µM
  - S2(PNPA): dilution of S1(PNPA) in Tris buffer (pH 7.6, 50 mM) so as to reach a final concentration of 6 mM
  - Ligand: a concentration range was prepared by diluting S1(Ligand) in Tris buffer (pH 7.6, 50 mM) so as to reach the desired concentration of these stock solutions (highest concentration = x 100 lowest concentration)
- Preparation of 96-well plate:

The 96-well plate was prerared as follows : 1) Tris buffer pH 7.6 ; 2) S2(Ligand) ; 3) S2(*b*CA II)

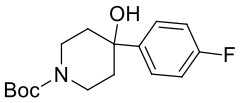
	Tris buffer pH 7.6	**S2(ligand)**	**S2(*b*CA II)**
Volume (µL)	60	10	10

- Incubation, injection and activity measurement

The solutions in th 96-well plate were incubated at 25 °C for 10 min. Then, S2(PNPA) was added into the solutions with an automatic injector (20 µL). Absorbance of every solution was

then automatically measured for 20 min (1 point/minute) at $\lambda_{abs.}$ = 348 nm. IC_{50} was then determined using *Origin8*® software.

<u>*tert*-butyl 4-(4-fluorophenyl)-4-hydroxypiperidine-1-carboxylate – 205</u>



$C_{16}H_{22}FNO_3$
MW 295,35

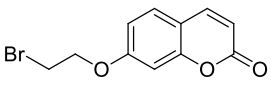
To a solution of 1-Boc-4-piperidone (500 mg, 2.51 mmol, 1 equiv.) in dry THF (30 mL) under argon atmosphere was added a solution of (4-fluorophenyl)magnesium bromide (1 M in THF, 3 mL, 3.0 mmol, 1.2 equiv.) at 0 °C. After 15 min, the reaction was warmed to room temperature and was finally refluxed for 4.5 h.After that time, the reaction was quenched with H_2O and extracted with EtOAc (x 2). The combined organic layers were washed with brine (x 1), dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1, and 8:2, v/v) to provide the desired compound (294 mg, 1 mmol, 34% yield) as a colorless oil.

NMR analyses are in accordance with literature data.[44]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.46 – 7.38 (m, 2H), 7.05 – 6.95 (m, 2H), 3.99 (d, *J* = 11.5 Hz, 2H), 3.21 (t, *J* = 12.1 Hz, 1H), 2.07 (bs, 1H), 1.93 (td, *J* = 13.3, 4.3 Hz, 2H), 1.70 (dd, *J* = 14.1, 2.4 Hz, 2H), 1.45 (s, 9H).

^{19}F NMR {H} (282 MHz, $CDCl_3$) δ_F -115.87.

<u>7-(2-bromoethoxy)-2*H*-chromen-2-one – 206</u>



$C_{11}H_9BrO_3$
MW 269,09

This compound was synthesized according to a known procedure.[45] The desired compound (1.806 g, 6.71 mmol, 55% yield) as a white powder without further purification.

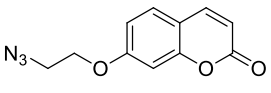
NMR analysis is in accordance with literature data.[45]

[44] Toscani, A.; Risi, C.; Black, G. W.; Brown, N. L.; Shaaban, A.; Turner, N. J.; Castagnolo, D. *ACS Catalysis* **2018**, *8*, 8781-8787.

[45] Yang, X.; Wedajo, W.; Yamada, Y.; Dahlroth, S.-L.; Neo, J. J.-L.; Dick, T.; Chui, W.-K. *Eur. J. Med.l Chem.* **2018**, *144*, 262–276.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.68 – 7.60 (m, 1H), 7.43 – 7.36 (m, 1H), 6.86 (dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.27 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 4.35 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.67 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H).

7-(2-azidoethoxy)-2*H*-chromen-2-one – 97



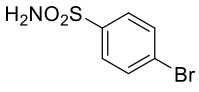
$C_{11}H_9N_3O_3$
MW 231,21

To a solution of 7-(2-bromoethoxy)-2*H*-chromen-2-one **206** (1.806 g, 6.71 mmol, 1 equiv.) in acetone (60 mL) was added a solution of NaN_3 (871 mg, 13.4 mmol, 2.0 equiv.) in H_2O (10 mL). The reaction was refluxed for 8 h. Then, the solution was cooled to room temperature, and diluted with H_2O. Then, acetone was removed by vacuum. Aqueous layer was extracted with EtOAc (x 3). The combined organic layers were washed with brine (x 1), dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/DCM/EtOAc as a gradient from 5:4:0 to 5:4:1, v/v/v) to provide the desired compound (919 mg, 3.97 mmol, 59% yield) as a white solid.

NMR analysis is in accordance with literature data.[45]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.64 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.88 (dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.28 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 4.21 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.66 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H).

4-bromobenzenesulfonamide – 207



$C_6H_6BrNO_2S$
MW 236,08

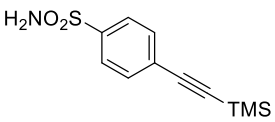
To a solution of 4-bromobenzenesulfonyl chloride (3.0 g, 11.76 mmol, 1 equiv.) in THF (40 mL) at 0 °C was slowly added a solution of ammonia (7 N in MeOH, 6 mL, 44.4 mmol, 3.8 equiv.). Then, reaction was warmed to room temperature and was stirred for 4 h. After that time, solvents were removed by vacuum. The residue was dissolved in EtOAc and filtered through a pad of celite (elution with EtOAc). Solvent was removed by vacuum and the desired compound (2.636 g, 11.17 mmol, 95% yield) as colorless solid.

NMR analysis is in accordance with literature data.[46]

[46] Feng, J.-B.; Wu, X.-F. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 6951–6954.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H 7.86 – 7.79 (m, 2H), 7.78 – 7.71 (m, 2H), 4.48 (bs, 2H).

4-((trimethylsilyl)ethynyl)benzenesulfonamide – 208



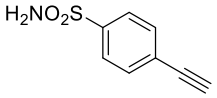
$C_{11}H_{15}NO_2SSi$
MW 253,39

In a dry sealed tube under argon atmosphere was introduced 4-bromobenzenesulfonamide **207** (1.0 g, 4.24 mmol, 1 equiv.) which was dissolved in dry DMF (16 mL). Then, dry Et_3N (3.45 mL, 25.4 mmol, 6 equiv.) was added to the solution, which was degased by argon bubbling for 5 min. Then, CuI (162 mg, 0.85 mmol, 0.2 equiv.) and $PdCl_2(PPh3)_2$ (295 mg, 0.42 mmol, 0.1 equiv.) were added and the solution was degased by argon bubbling for 5 min. Then, ethynyltrimethylsilane (1.78 mL, 12.7 mmol, 3.0 equiv.) was added and the flask was sealed. The reaction was heated to 90 °C overnight. Reaction was cooled to room temperature and the reaction was filtered through a pad of celite (elution with EtOAc). Organic layer was washed with brine (x 4), dried over $MgSO_4$ and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1 and 8:2, v/v/v) to provide the desired compound (858 mg, 3.39 mmol, 80% yield) as a yellow powder.

NMR analysis is in accordance with literature data.[47]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.97 – 7.73 (m, 2H), 7.68 – 7.47 (m, 2H), 4.87 (bs, 1H), 4.82 (bs, 1H), 0.27 (s, 9H).

4-ethynylbenzenesulfonamide – 201



$C_8H_7NO_2S$
MW 181,21

To a solution of 4-((trimethylsilyl)ethynyl)benzenesulfonamide **208** (429 mg, 1.69 mmol, 1 equiv.) in dry THF (6 mL) under argon atmosphere was slowly added at 0 °C a solution of TBAF (1 M in THF, 3.38 mL, 3.38 mmol, 2 equiv.). The reaction was stirred at 0 °C for 1 h and at room temperature for 3 h. After completion, the reaction was quenched with H_2O and extracted with EtOAc (x 2). The combined organic layers were washed with H_2O, dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica

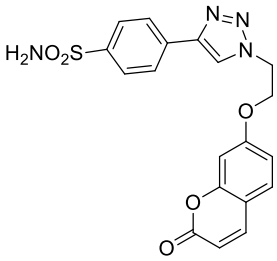
[47] Roscales, S.; Bechmann, N.; Weiss, D. H.; Köckerling, M.; Pietzsch, J.; Kniess, T. *Med. Chem. Commun.* **2018**, *8*, 534–544.

gel, cyclohexane/ EtOAc as a gradient from 100:0 to 85:15 and 70/30, v/v) to provide the desired compound (230 mg, 1.27 mmol, 75% yield) as a fibrous yellow solid.

NMR analysis is in accordance with literature data.[47]

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$) δ_H 7.83 – 7.75 (m, 2H), 7.70 – 7.60 (m, 2H), 7.45 (bs, 2H), 4.44 (s, 1H). 7.64 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.88 (dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.28 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 4.24 – 4.14 (m, 2H), 3.71 – 3.61 (m, 2H).

4-(1-(2-((2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy)ethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)benzenesulfonamide – 195



$C_{19}H_{16}N_4O_5S$
MW 412,42

To a solution of 4-ethynylbenzenesulfonamide **201** (100 mg, 0.55 mmol, 1 equiv.) and 7-(2-azidoethoxy)-2*H*-chromen-2-one **97** (127 mg, 0.55 mmol, 1 equiv.) in a solution of H_2O/*t*-BuOH (6 mL, 1:1, v/v) were added $CuSO_4.5H_2O$ (14 mg, 0.055 mmol, 0.1 equiv.) and sodium ascorbate (22 mg, 0.11 mmol, 0.2 equiv.). The reaction was protected from light and was stirred at room temperature for 24 h. Then, $CuSO_4.5H_2O$ (14 mg, 0.055 mmol, 0.1 equiv.) and sodium ascorbate (22 mg, 0.11 mmol, 0.2 equiv.) were added again and the reaction was stirred for an additional 24 h. The reaction was diluted with H_2O and extracted with DCM (x 1) and EtOAc (x 1). The combined organic layers were washed with brine (x 1), dried over $MgSO_4$ and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 5:5 to 0:10, v/v) to provide the desired compound (37 mg, 0.09 mmol, 16% yield) as a yellow powder.

R*f* (EtOAc) = 0.31

m.p. = 220 – 222 °C

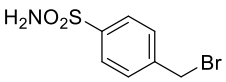
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$) δ_H 8.82 (s, 1H), 8.11 – 8.03 (m, 2H), 7.97 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.93 – 7.83 (m, 2H), 7.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.39 (bs, 2H), 7.06 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.97 (dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 6.32 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 4.93 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H), 4.60 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d$_6$) δ_C 161.4, 160.7, 155.7, 145.7, 144.7, 143.6, 134.3, 130.0, 126.9, 125.9, 123.6, 113.3, 113.3, 113.21 102.0, 67.2, 49.6.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3331, 3133, 2919, 2853, 2502, 1783, 1607, 1233, 1157, 1124, 839, 751.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{19}H_{17}N_4O_5S$ $[M+H]^+$: 413.0920; found : 413.0908.

4-(bromomethyl)benzenesulfonamide – 209



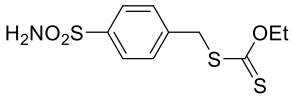
$C_7H_8BrNO_2S$
MW 250,11

To a solution of 4-(bromomethyl)benzenesulfonyl chloride (2.7 g, 10 mmol, 1 equiv.) in THF (40 mL) at 0 °C was slowly added a solution of ammonia (7 N in MeOH, 5.7 mL, 40 mmol, 4 equiv.). Then, reaction was warmed to room temperature and was stirred for 4 h. After that time, solvents were removed by vacuum. The crude residue was dissolved in EtOAc and celite was added to prepare a solid deposit for purification and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, v/v) to provide the desired compound (2.08 g, 8.32 mmol, 83% yield) as a white powder.

NMR analysis is in accordance with literature data.[48]

^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ_H 7.92 – 7.83 (m, 2H), 7.70 – 7.61 (m, 2H), 6.60 (bs, 2H), 4.71 (s, 2H).

***O*-ethyl S-4-sulfamoylbenzyl carbonodithioate – 210**



$C_{10}H_{13}NO_3S_3$
MW 291,41

To a solution of 4-(bromomethyl)benzenesulfonamide **209** (100 mg, 0.40 mmol, 1 equiv.) in dry acetone (2 mL) under argon atmosphere was added in one portion potassium ethyl xanthate (128 mg, 0.80 mmol, 2 equiv.). The reaction was stirred at room temperature for 24 h. After that time, the reaction was filtered and celite was added to the filtrate so as to prepare the solid deposit for the purification. Solvent was removed by vacuum and the crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1, 8:2 and 7:3, v/v) to provide the desired compound (110 mg, 0.28 mmol, 94% yield) as a white powder.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 6:4) = 0.29

m.p. = 125 – 126 °C

^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ_H 7.91 – 7.82 (m, 2H), 7.68 – 7.58 (m, 2H), 6.56 (bs, 2H), 4.67 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.51 (s, 2H), 1.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

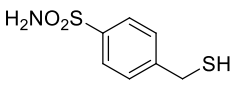
^{13}C NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ_C 214.2, 144.2, 141.9, 130.4, 127.2, 71.3, 39.7, 13.9.

[48] Hu, X.; Sun, J.; Wang, H.-G.; Manetsch, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13820–13821.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3356, 3255, 2921, 2448, 1567, 1402, 1324, 1310, 1212, 1144, 1092, 1044, 917, 863, 840, 826.

HRMS (ESI-) Calculated for $C_{10}H_{12}NO_3S_3$ $[M-H]^-$: 289.9979 ; found : 289.9976.

4-(mercaptomethyl)benzenesulfonamide – 44



$C_7H_9NO_2S_2$
MW 203,28

To a solution of *O*-ethyl *S*-4-sulfamoylbenzyl carbonodithioate **210** (200 mg, 0.686 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (5 mL) under argon atmosphere was added *n*-butylamine (81 µL, 0.823 mmol, 1.2 equiv). The reaction was stirred for 4 h at room temperature. After completion, the reaction was poured onto a solution of brine brine and pH was adjusted to 3 from a solution of aqueous HCl (6 N). The aqueous layer was then extracted with EtOAc (x 1). The organic layer was washed with brine (x 3), dried over $MgSO_4$ and celite was added to the filtrate so as to prepare the solid deposit for the purification. Solvent was removed by vacuum and the crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, DCM/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1 and 8:2, v/v) to provide the desired compound (94 mg, 0.46 mmol, 67% yield) as a white powder.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 5:5) = 0.35

m.p. = 137 – 138 °C

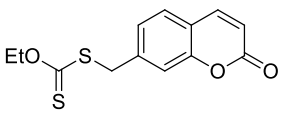
^{1}H NMR (300 MHz, MeOD) δ_H 7.88 – 7.77 (m, 2H), 7.54 – 7.46 (m, 2H), 3.79 (s, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ_C 147.8, 143.4, 129.7, 127.5, 28.6.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3358, 3256, 1566, 1410, 1324, 1309, 1168, 1145, 1092, 916, 845.

HRMS (ESI-) Calculated for $C_7H_8NO_3S_2$ $[M-H]^-$: 201.9996 ; found : 201.9992.

***O*-ethyl S-((2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)methyl) carbonodithioate – 212**



$C_{13}H_{12}O_3S_2$
MW 280,36

To a solution of 7-methyl-2*H*-chromen-2-one (320 mg, 2 mmol, 1 equiv.) in dry MeCN (20 mL) under argon atmosphere in a dry sealed flask were added NBS (427 mg, 2.4 mmol, 1.2 equiv.) and AIBN (33 mg, 0.2 mmol, 0.1 equiv.). The flask was sealed and the reaction was heated to 80 °C for 3 h. After that time, solvent was removed by vacuum and organic residu was dissolved in EtOAc. The organic layer was washed with brine (x 1), dried over $MgSO_4$ and

solvent was removed by vacuum. ^{1}H NMR analysis of the crude product indicated a conversion of 76%. The crude product was then dissolved in dry acetone (14 mL) under argon atmosphere and potassium ethyl xanthate (128 mg, 0.80 mmol, 2 equiv.) was added in one portion. The reaction was stirred at room temperature for 8 h. After that time, the reaction was filtered and celite was added to the filtrate so as to prepare the solid deposit for the purification. The solvent was removed by vacuum and the crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1 and 8:2, v/v) to provide the desired compound (261 mg, 0.93 mmol, 47% yield over two steps) as an organge powder.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 8:2) = 0.24

m.p. = 84 – 86 °C

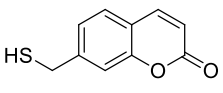
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.68 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.29 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 6.40 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 4.66 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.43 (s, 2H), 1.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 212.9, 160.5, 153.9, 142.9, 140.9, 127.9, 125.1, 118.0, 117.1, 116.5, 70.4, 39.6, 13.0.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3082, 2968, 2914, 1754, 1728, 1618, 1246, 1221, 1108, 1041, 895, 853, 839.

HRMS (CI+) Calculated for $C_{13}H_{13}O_3S_2$ $[M+H]^+$: 281.0306 ; found : 281.0298.

7-(mercaptomethyl)-2*H*-chromen-2-one – 213



$C_{10}H_8O_2S$
MW 192,23

To a solution of *O*-ethyl S-((2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)methyl) carbonodithioate **212** (50 mg, 0.18 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (1.8 mL) under argon atmosphere was added *n*-butylamine (20 µL, 0.20 mmol, 1.1 equiv). The reaction was stirred for 5 h at room temperature. After completion, the reaction was poured onto a solution of brine and pH was adjusted to 3 from an aqueous solution of HCl (6 N). Aqueous layer was then extracted with EtOAc (x 1). The organic layer was washed with brine (x 3), dried over $MgSO_4$ and celite was added to the filtrate so as to prepare the solid deposit for the purification. Solvent was removed by vacuum and the crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel,

cyclohexane/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1 and 8:2, v/v) to provide the desired compound (21 mg, 0.11 mmol, 61% yield) as a white powder.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 6:4) = 0.33

m.p. = 123 - 124 °C

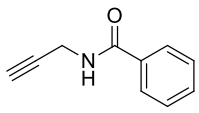
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.68 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.33 – 7.22 (m, 2H), 6.40 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 3.80 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 1.83 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 160.6, 154.2, 145.8, 143.0, 128.1, 124.4, 117.7, 116.4, 116.2, 28.7.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 2923, 2851, 1710, 1619, 1398, 1226, 1192, 1123, 1100, 993, 892, 841, 816.

HRMS (CI+) Calculated for $C_{10}H_9O_2S$ $[M+H]^+$: 193.0323 ; found : 193.0322.

<u>*N*-(prop-2-yn-1-yl)benzamide – 218</u>



$C_{10}H_9NO$
MW 159,18

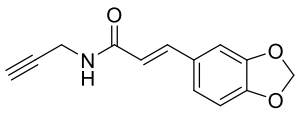
To a solution of benzoic acid (2.015 g, 16.5 mmol, 1.1 equiv.) in dry DCM (40 mL) under argon atmosphere was added EDCI.HCl (3.162 g, 16.5 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 10 min and prop-2-yn-1-amine (0.96 mL, 15 mmol, 1 equiv.) was added into the mixture. After stirring for 4 h at room temperature, the reaction was quenched with H_2O and extracted with DCM (x 2). The combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum.The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1 and 8:2, v/v) to provide the desired compound (1.433 g, 9.0 mmol, 60% yield) as a white powder.

NMR analysis is in accordance with literature data.[49]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.92 – 7.67 (m, 2H), 7.60 – 7.32 (m, 3H), 6.40 (bs, 1H), 4.23 (dd, *J* = 5.3, 2.5 Hz, 2H), 2.29 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H).

[49] Wipf, P.; Aoyama, Y.; Benedum, T. E. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3593–3595.

(*E*)-3-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-*N*-(prop-2-yn-1-yl)acrylamide – 219



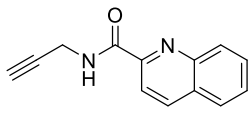
$C_{13}H_{11}NO_3$
MW 229,24

To a solution of (*E*)-3-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)acrylic acid (250 mg, 1.3 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (10 mL) under argon atmosphere was added EDCI.HCl (274 mg, 1.43 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 10 min and prop-2-yn-1-amine (0.1 mL, 1.56 mmol, 1.2 equiv.) was added into the mixture. The reaction was stirred for 3.5 h and was quenched with H_2O and extracted with DCM (x 2). The combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum.The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1, 8:2 and 7:3, v/v) to provide the desired compound (143 mg, 0.62 mmol, 48% yield) as a beige solid.

NMR analysis is in accordance with literature data.[50]

^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ_H 7.48 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.07 (dd, *J* = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.54 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 6.05 (s, 2H), 4.10 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H), 2.66 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H).

***N*-(prop-2-yn-1-yl)quinoline-2-carboxamide – 220**



$C_{13}H_{10}N_2O$
MW 210,23

To a solution of quinoline-2-carboxylic acid (225 mg, 1.3 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (10 mL) under argon atmosphere was added EDCI.HCl (274 mg, 1.43 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 10 min and prop-2-yn-1-amine (0.1 mL, 1.56 mmol, 1.2 equiv.) was added into the mixture. The reaction was stirred for 3.5 h and was quenched with H_2O and extracted with DCM (x 2). The combined organic layers were washed with brine (x 1), dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum.The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1, 8:2 and 7:3, v/v) to provide the desired compound (133 mg, 0.63 mmol, 49% yield) as a beige solid.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 5:5) = 0.50

[50] M. B. Tomas, T. C. Shiao, P. T. Nguyen, S. Bourgault, R. Roy, *Pharm Chem J* **2018**, *51*, 995–1004.

m.p. = 135 - 136 °C

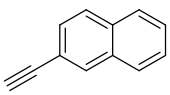
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 8.42 (bs, 1H), 8.33 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.29 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.12 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.89 (dd, *J* = 8.2, 0.8 Hz, 1H), 7.78 (ddd, *J* = 8.5, 6.9, 1.5 Hz, 1H), 7.63 (ddd, *J* = 8.1, 6.9, 1.2 Hz, 1H), 4.36 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 4.34 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 2.31 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 164.2, 149.1, 146.4, 137.5, 130.1, 129.6, 129.3, 128.0, 127.7, 118.7, 79.5, 71.5, 29.2.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3381, 3221, 1750, 1715, 1661, 1518, 1496, 1423, 1163, 1045, 956, 845, 796, 772.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{13}H_{11}N_2O$ $[M+H]^+$: 211.0871 ; found : 211.0872.

2-ethynylnaphthalene – 222



$C_{12}H_8$
MW 152,19

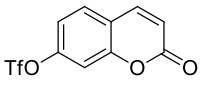
In a dry sealed tube under argon atmosphere was introduced 2-bromonaphthalene (414 mg, 2 mmol, 1 equiv.) which was dissolved in dry Et_3N (3 mL). The solution was degased by argon bubbling for 5 min. Then, CuI (57 mg, 0.3 mmol, 0.15 equiv.) and $PdCl_2(PPh3)_2$ (140 mg, 0.2 mmol, 0.1 equiv.) were added and the solution was degased by argon bubbling for 5 min. Then, ethynyltrimethylsilane (0.30 mL, 2.2 mmol, 1.1 equiv.) was added and the tube was sealed. The reaction was heated to 70 °C for 24 h. Reaction was cooled to room temperature and the reaction was filtered through a pad of silica (elution with EtOAc). The organic layer was washed with brine (x 1), dried over $MgSO_4$ and solvent was removed by vacuum. The crude product was then dissolved in a solution of MeOH/THF (10:1, v/v) and K_2CO_3 (1.11 g, 8 mmol, 4 equiv.) was added in one portion at room temperature. The reaction was stirred for 4 h. After completion, the reaction was filtered and solvents were removed by vacuum. The crude product was dissolved in EtOAc. The organic layer was washed with brine (x 1), dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum.The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane) to provide the desired compound (93 mg, 0.61 mmol, 31% yield over two steps) as a yellow solid.

NMR analysis is in accordance with literature data.[51]

[51] Uji, H.; Ogawa, J.; Itabashi, K.; Imai, T.; Kimura, S. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 12483–12486.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 8.03 (s, 1H), 7.85 – 7.70 (m, 3H), 7.53 (dd, *J* = 8.5, 1.6 Hz, 1H), 7.52 – 7.44 (m, 2H), 3.16 (s, 1H).

2-oxo-2*H*-chromen-7-yl trifluoromethanesulfonate – 223



$C_{10}H_5F_3O_5S$
MW 294,20

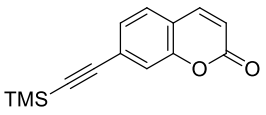
To a solution of 7-hydroxy-2*H*-chromen-2-one (1.50 g, 9.25 mmol, 1 equiv.) in dry pyridine (40 mL) under argon atmosphere was added dropwise Tf_2O (2.91 mL, 10.18 mmol, 1.1 equiv.) at 0 °C. The reaction was stirred for 1 h at 0 °C and at room temperature for 3 h. After completion, the reaction was poured onto a solution of aqueous HCl (1.5 N) and was extracted with EtOAc (x 2). The combined organic layers were washed with H_2O (x 2), brine (x 1), dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum.The crude product was purified by a filtration through a pad of silica to provide the desired compound (2.69 g, 9.16 mmol, 99% yield) as an orange criystalline solid.

NMR analyses are in accordance with literature data.[52]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.72 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.23 (dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H).

^{19}F NMR (282 MHz, $CDCl_3$) δ_F -72.5.

7-((trimethylsilyl)ethynyl)-2*H*-chromen-2-one – 224



$C_{14}H_{14}O_2Si$
MW 242,35

In a dry sealed flask under argon atmosphere was introduced 2-oxo-2*H*-chromen-7-yl trifluoromethanesulfonate **223** (500 mg, 1.7 mmol, 1 equiv.) which was dissolved in dry Et_3N (15 mL). The solution was degased by argon bubbling for 5 min. Then, CuI (65 mg, 0.34 mmol, 0.2 equiv.) and $PdCl_2(PPh3)_2$ (119 mg, 0.17 mmol, 0.1 equiv.) were added and the solution was degased by argon bubbling for 5 min. Then, ethynyltrimethylsilane (0.35 mL, 2.55 mmol, 1.5 equiv.) was added and the flask was sealed. The reaction was heated to 90 °C for 20 h. Reaction was cooled to room temperature and was diluted with EtOAc and was filtered through a pad of silica (elution with EtOAc). The organic layer was washed with brine (x 2), dried over $MgSO_4$

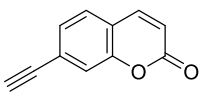
[52] Wenlei, Z.; Chapin, B. M.; Yoshizawa, A.; Wang, H.-C.; Hodge, S. A.; James, T. D.; Anslyne, E. V.; Fossey, J. S. *Org. Chem. Front.* **2016**, *3*, 918–928.

and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 10:0 to 95:5, 9:1 and 8:2, v/v) to provide the desired compound (330 mg, 1.36 mmol, 80% yield) as a yellow solid.

NMR analysis is in accordance with literature data.[52]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.66 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 7.42 – 7.31 (m, 3H), 6.42 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 0.27 (s, 9H).

7-ethynyl-2*H*-chromen-2-one – 225



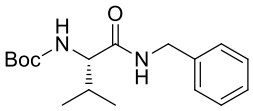
$C_{11}H_6O_2$
MW 170,17

To a solution of 7-((trimethylsilyl)ethynyl)-2*H*-chromen-2-one **224** (150 mg, 0.62 mmol, 1 equiv.) in dry THF (3.6 mL) under argon atmosphere was added dropwise TBAF (1 M in THF, 1.24 ML, 1.24 mmol, 2 equiv.) at 0 °C. The mixture became instantly black. The reaction was stirred at 0 °C for 5 min and then at room temperature for 3 h. After completion, the reaction was quenched with H_2O and was extracted with EtOAc (x 1). The organic layer was washed with brine (x 1), dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1 and 8:2, v/v) to provide the desired compound (102 mg, 0.6 mmol, 95% yield) as a yellow solid.

NMR analysis is in accordance with literature data.[52]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.68 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.46 – 7.34 (m, 3H), 6.43 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 3.25 (s, 1H).

(*S*)-*tert*-butyl (1-(benzylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)carbamate – 226



$C_{17}H_{26}N_2O_3$
MW 306,40

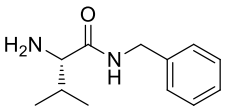
To a solution of (*tert*-butoxycarbonyl)-*L*-valine (1.00 g, 4.6 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (23 mL) under argon atmosphere was added EDCI.HCl (928 mg, 4.84 mmol, 1.05 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 10 min and benzylamine (0.28 mL, 5.06 mmol, 1.1 equiv.) was added into the mixture. The reaction was stirred for 4.5 h and was quenched with H_2O and extracted with DCM (x 1). The combined organic layers were washed with brine (x 2), dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum.The crude product was purified by

flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1 and 8:2 , v/v) to provide the desired compound (1.197 g, 3.91 mmol, 85% yield) as a white solid.

NMR analysis is in accordance with literature data.[53]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.36 – 7.19 (m, 5H), 6.40 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 5.18 – 4.91 (m, 1H), 4.53 – 4.33 (m, 1H), 3.92 (dd, *J* = 8.7, 6.3 Hz, 1H), 2.26 – 2.05 (m, 1H), 1.41 (s, 9H), 0.96 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.91 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H).

(*S*)-2-amino-*N*-benzyl-3-methylbutanamide – 227



$C_{12}H_{18}N_2O$
MW 206,28

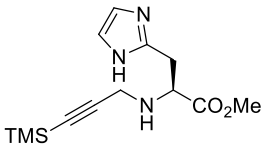
To a solution of (*S*)-*tert*-butyl (1-(benzylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)carbamate **226** (300 mg, 0.98 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (4 mL) at 0 °C was added TFA (1 mL). After few minutes, the reaction was warmed to room temperature and was stirred for 5 h. Then, solvent and TFA were evaporated under vacuum and the crude product was dissolved in EtOAc. The organic layer was poored onto cold saturated aqueous solution of Na_2CO_3 and the mixture was extracted with EtOAc (x 2). The combined organic layers were washed with H_2O (x 1), dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The desired compound (182 mg, 0.88 mmol, 90% yield) was obtained as a yellow oil without further purification.

NMR analysis is in accordance with literature data.[54]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.63 (bs, 1H), 7.39 – 7.19 (m, 5H), 4.58 – 4.30 (m, 2H), 3.29 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 2.36 (dtd, *J* = 13.9, 6.9, 3.8 Hz, 1H), 1.47 (s, 2H), 1.00 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.84 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H).

[53] de Castro, P. P.; Rimulo, I. M. R.; de Almeida, A. M.; Diniz, R.; Amarante, G. W. *ACS Omega* **2017**, *2*, 2967–2976.
[54] Sabatini, M. T.; Boulton, L. T.; Sheppard, T. D. *Science Adv.* **2017**, *3*, e1701028.

(*S*)-methyl 3-(1*H*-imidazol-4-yl)-2-((3-(trimethylsilyl)prop-2-yn-1-yl)amino)propanoate – 229



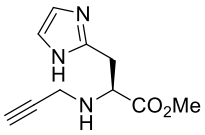
$C_{13}H_{21}N_3O_2Si$
MW 279,41

This compound was synthesized accordind to a known procedure.[55] The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, DCM/MeOH as a gradient from 100:0 to 99:1, 98:2, 97:3, 96:4 and 95:5 , v/v) to provide the desired compound (437 mg, 1.56 mmol, 72% yield) as a yellow sticky oil.

NMR analysis is in accordance with literature data.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.53 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 3.73 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.69 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.51 (d, *J* = 17.1 Hz, 1H), 3.42 (d, *J* = 17.1 Hz, 1H), 3.05 (dd, *J* = 15.0, 4.5 Hz, 1H), 2.91 (dd, *J* = 15.1, 7.5 Hz, 1H), 0.13 (s, 9H).

(*S*)-methyl 3-(1*H*-imidazol-2-yl)-2-(prop-2-yn-1-ylamino)propanoate – 231



$C_{10}H_{13}N_3O_2$
MW 207,23

To a solution of (*S*)-methyl 3-(1*H*-imidazol-4-yl)-2-((3-(trimethylsilyl)prop-2-yn-1-yl)amino)propanoate **229** (220 mg, 0.78 mmol, 1 equiv.) in dry MeOH under argon atmosphere was added K_2CO_3 (162 mg, 1.17 mmol, 1.5 equiv.) in one portion. The reaction was stirred at room temperature for 1 h and was quenched by dilution with EtOAc. The mixture was filtered through a pad of silica (elution with DCM/EtOAc/MeOH, 4:5:1, v/v/v) and solvents were removed by vacuum. The desired compound (160 mg, 0.77 mmol, 99% yield) was obtained as a yellow oil without further purification.

R*f* (DCM/MeOH, 9:1) = 0.23

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.54 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 3.80 – 3.73 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.51 (dd, *J* = 17.0, 2.5 Hz, 1H), 3.42 (dd, *J* = 17.0, 2.4 Hz, 1H), 3.05 (dd, *J* = 15.0, 4.6 Hz, 1H), 2.92 (dd, *J* = 15.1, 7.4 Hz, 1H), 2.20 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H).

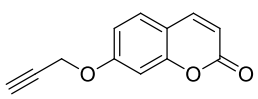
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 174.1, 135.0, 132.3, 118.8, 81.0, 72.0, 59.7, 52.0., 36.6, 29.9.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3284, 2953, 1729, 1567, 1436, 1206, 1174, 991, 826, 764, 731.

HRMS (CI+) Calculated for $C_{10}H_{14}N_3O_2$ $[M+H]^+$: 208.1086 ; found : 208.1093.

[55] O'Toole, T. M.; Graham, K. J.; Jones, T. N. *Tet. Lett.* **2017**, *58*, 1230–1232.

7-(prop-2-yn-1-yloxy)-2*H*-chromen-2-one – 232



$C_{12}H_8O_3$
MW 200,19

To a solution of 7-hydroxy-2*H*-chromen-2-one (1.0 g, 6.2 mmol, 1 equiv.) in dry acetone (60 mL) under argon atmosphere were added anhydrous K_2CO_3 (1.71 g, 12.4 mmol, 2 equiv.) and 3-bromoprop-1-yne (0.85 mL, 11.2 mmol, 1.8 equiv.). The reaction was refluxed for 24 h. After that time, the acetone was removed by vacuum and the resulting solid was dried under vacuum. The solid was then washed with hot H_2O (100 °C) and was filtered and tritured with H_2O (x 3). Then, the solid was washed with cyclohexane/Et_2O (1:1, v/v, x 3) and dried under vacuum. The desired compound (1.08 g, 5.39 mmol, 87% yield) was obtained as a white powder without further purification.

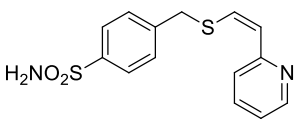
NMR analysis is in accordance with literature data.[56]

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.64 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.95 – 6.89 (m, 2H), 6.28 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 4.76 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 2.57 (dd, *J* = 3.5, 1.3 Hz, 1H).

(*Z*)-4-(((2-(pyridin-2-yl)vinyl)thio)methyl)benzenesulfonamide – 234 *Z* and (*E*)-4-(((2-(pyridin-2-yl)vinyl)thio)methyl)benzenesulfonamide – 234 *E*

To a solution of 4-(mercaptomethyl)benzenesulfonamide **44** (100 mg, 0.49 mmol, 1 equiv.) in dry MeCN (1 mL) under argon atmosphere was added a solution of 2-ethynylpyridine **197** (50.5 mg, 0.49 mmol, 1 equiv.) in dry MeCN (2 mL). The flask was protected from light and DBU (22 µL, 0.15 mmol, 0.3 equiv.) was added. The reaction was stirred at room temperature for 2.5 h. Then, reaction was quenched with H_2O and extracted with EtOAc (x 2). The combined organic layers were washed with brine (x 1), dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum.The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, DCM/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1 and 8:2 , v/v) to provide the desired isomer *Z* (32 mg, 0.10 mmol, 21% yield) as a pale yellow solid and isomer *E* (28 mg, 0.10 mmol, 19% yield) as a crystalline yellow solid.

[56] Pal, K. B.; Mahanti, M.; Huang, X.; Persson, S.; Sundin, A. P.; Zetterberg, F. R.; Oredsson, S.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 6295–6305.



$C_{14}H_{14}N_2O_2S_2$
MW 306,40

R*f* (DCM/EtOAc, 9:1) = 0.21

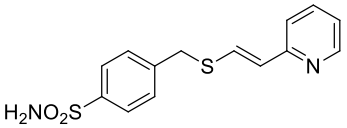
m.p. = 169 – 167 °C

^{1}H NMR (300 MHz, CD_3CN/MeOD, 4:2, v/v) δ_H 8.51 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.73 – 7.60 (m, 1H), 7.53 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.26 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.09 (dd, *J* = 6.5, 5.2 Hz, 1H), 6.66 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 4.02 (s, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN/MeOD, 4:2, v/v) δ_C 157.1, 149.7, 145.3, 143.5, 137.7, 134.1, 130.9, 127.7, 124.8, 124.4, 122.2, 40.4.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3272, 2920, 2435, 1592, 1546, 1474, 1426, 1308, 1149, 1094, 865, 800.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{14}H_{15}N_2O_2S_2$ $[M+H]^+$: 307.0575 ; found : 307.0583.



$C_{14}H_{14}N_2O_2S_2$
MW 306,40

R*f* (DCM/EtOAc, 9:1) = 0.07

m.p. = 148 – 150 °C

^{1}H NMR (300 MHz, CD_3CN/MeOD, 2:4, v/v) δ_H 8.44 – 8.39 (m, 1H), 7.92 – 7.84 (m, 2H), 7.72 (dt, *J* = 7.8, 3.9 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.42 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.18 (ddd, *J* = 7.4, 4.9, 1.0 Hz, 1H), 6.56 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 4.22 (s, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN/MeOD, 2:4, v/v) δ_C 155.9, 150.0, 143.7, 143.7, 138.6, 131.9, 131.0, 130.5, 127.4, 127.2, 126.3, 122.9, 122.2, 36.7.

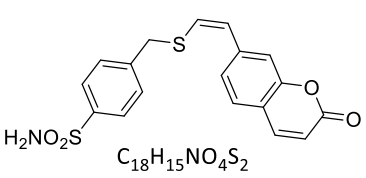
IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 2985, 2903, 1600, 1564, 1475, 1405, 1315, 1156, 932, 761, 674.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{14}H_{15}N_2O_2S_2$ $[M+H]^+$: 307.0575 ; found : 307.0565.

(*Z*)-4-(((2-(2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)vinyl)thio)methyl)benzenesulfonamide – 235 *Z* and (*E*)-4-(((2-(2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)vinyl)thio)methyl)benzenesulfonamide – 235 *E*

To a solution of 4-(mercaptomethyl)benzenesulfonamide **44** (60 mg, 0.29 mmol, 1 equiv.) in dry MeCN (3 mL) under argon atmosphere was added 7-ethynyl-2*H*-chromen-2-one **225** (57 mg, 0.33 mmol, 1.1 equiv.). The flask was protected from light and DBU (13.5 µL, 0.09 mmol, 0.3 equiv.) was added. The reaction was stirred at room temperature for 2.5 h. Then, reaction was quenched with H_2O and extracted with EtOAc (x 2). The combined organic layers were washed with brine (x 1), dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified firstly by flash-column chromatography (silica gel, DCM/EtOAc as a gradient from 100:0 to 98:2, 95:5 and 90/10, v/v) to provide the desired isomers *Z* and *E* (93

mg, 0.25 mmol, 87% yield) as a mixture. Then, both isomers were separated by RP-HPLC (System I) and fractions were collected and lyophilized. (CAUTION! Every steps described above were performed under light protection)



$C_{18}H_{15}NO_4S_2$
MW 373,44

R*f* (DCM/EtOAc, 9:1) = 0.21

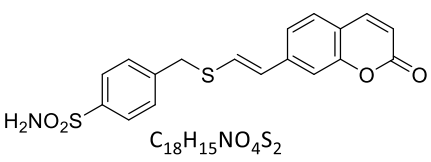
m.p. = (amorphous solid)

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H 8.02 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.68 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.44 – 7.35 (m, 2H), 7.33 (bs, 2H), 6.77 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 6.56 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 6.45 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 4.26 (s, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C 160.0, 153.6, 143.8, 142.9, 142.4, 140.2, 130.9, 129.4, 128.4, 126.0, 124.6, 123.8, 117.2, 115.7, 115.0, 37.7.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) From a mixture *Z*/*E* = 69/31: 3047, 2535, 2412, 1724, 1705, 1617, 1537, 1299, 1134, 949, 835, 751.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{18}H_{19}N_2O_4S_2$ $[M+NH_4]^+$: 391.0786 ; found : 391.0783.



$C_{18}H_{15}NO_4S_2$
MW 373,44

R*f* (DCM/EtOAc, 9:1) = 0.21

m.p. = 159 – 160 °C

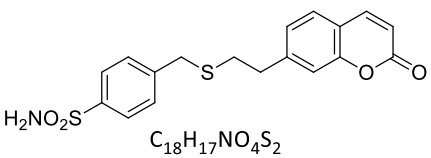
^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ_H 7.91 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.39 – 7.25 (m, 3H), 6.63 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 6.52 (bs, 2H), 6.33 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 4.27 (s, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, acetone -d_6) δ_C 160.8, 155.6, 144.2, 144.0, 143.3, 141.7, 130.2, 130.1, 129.4, 127.3, 126.1, 122.6, 118.6, 116.2, 113.4, 36.7.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) From a mixture *Z*/*E* = 69/31: 3047, 2535, 2412, 1724, 1705, 1617, 1537, 1299, 1134, 949, 835, 751.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{18}H_{19}N_2O_4S_2$ $[M+NH_4]^+$: 391.0786 ; found : 391.0783.

4-(((2-(7-oxo-7,8-dihydronaphthalen-2-yl)ethyl)thio)methyl)benzenesulfonamide – 239



$C_{18}H_{17}NO_4S_2$
MW 375.46

To a solution of 7-ethynyl-2*H*-chromen-2-one **225** (100 mg, 0.59 mmol, 1 equiv.) in THF (7 mL) under nitrogen atmosphere was added Pd/Pb-$CaCO_3$ (9 mg). The nitrogen atmosphere was replaced by hydrogen and the reaction was stirred for 45 min. Hydrogen was then purged by nitrogen and the mixture was filtered through a pad of celite (elution with EtOAc) and solvents were removed by vacuum. The crude product was then dissolved in dry MeCN (5.9 mL) under argon atmosphere. 4-(mercaptomethyl)benzenesulfonamide **44** (120 mg, 0.59 mmol, 1 equiv.) and DBU (88 µL, 0.59 mmol, 1 equiv.) were successively added to the mixture and the reaction was stirred for 2 h at room temperature. The reaction was quenched with brine and extracted with EtOAc (x 3). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum.The crude product was purified twice by flash-column chromatography (silica gel, DCM/EtOAc as a gradient from 10:0 to 95:5 and 9:1 , v/v) to provide the desired compound (36 mg, 0.096 mmol, 16% yield) as a pale yellow solid.

R*f* (DCM/EtOAc, 95:5) = 0.28

m.p. = 142 – 143 °C

^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d$_6$) δ_H 7.94 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 7.89 – 7.81 (m, 2H), 7.62 – 7.57 (m, 1H), 7.57 – 7.52 (m, 2H), 7.25 – 7.15 (m, 2H), 6.54 (bs, 1H), 6.36 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 3.89 (s, 2H), 3.00 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.82 – 2.74 (m, 3H).

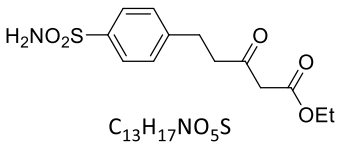
^{13}C NMR (75 MHz, acetone-d$_6$) δ_C 160.8, 155.1, 146.4, 144.4, 144.3, 144.3, 143.7, 143.7, 130.2, 129.1, 127.1, 125.8, 118.2, 117.2, 116.5, 36.2, 35.9, 32.9.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3309, 3236, 2924, 2433, 1711, 1699, 1617, 1325, 1311, 1164, 889, 851, 834, 708, 674.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{18}H_{18}NO_4S_2$ $[M+H]^+$: 376.0677 ; found : 376.0664.

7. Procedures and molecular description for General Conclusion and Perspectives

Ethyl 3-oxo-5-(4-sulfamoylphenyl)pentanoate – 240



$C_{13}H_{17}NO_5S$
MW 299,34

To a solution of ethyl 3-oxobutanoate (0.24 mL, 2.4 mmol, 3 equiv.) in dry THF (8 mL) under argon atmosphere and cooled to 0 °C was added NaH (60% w/w, 115 mg, 2.88 mmol, 3.6 equiv.). The reaction was stirred at 0 °C for 10 min. Then, a solution of *n*-BuLi in THF (2.5 M, 1.15 mL, 2.88 mmol, 3.6 equiv.) was added dropwise at 0 °C. The mixture became yellow after few minutes and the reaction was stirred for 15 min. After that time, a solution of 4-(bromomethyl)benzenesulfonamide **209** (200 mg, 0.80 mmol, 1 equiv.) in dry THF (4 mL) was slowly added to the reaction at 0 °C. After 5 min, the reaction was warmed to room temperature and was stirred for 24 h. Then, the reaction was quenched with H_2O, poured onto a cold saturated solution of NH_4Cl and extracted with EtOAc (x 2). The combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1, 8:2, 7:3 and 6:4, v/v) to provide the desired compound (102 mg, 0.34 mmol, 42% yield) as a pale yellow solid.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 5:5) = 0.21

m.p. = 96 – 97 °C

Equilibrium between ketone and corresponding enol forms was observed by NMR, in a ratio 96/4 respectively. Only ketone form is described below.

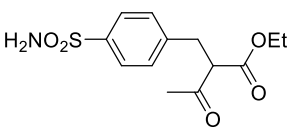
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.87 – 7.80 (m, 2H), 7.37 – 7.31 (m, 2H), 4.76 (bs, 2H), 4.18 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.43 (s, 2H), 3.07 – 2.95 (m, 2H), 2.95 – 2.83 (m, 2H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 201.2, 167.0, 146.1, 139.9, 129.1, 126.7, 61.5, 49.3, 43.7, 29.0, 14.1.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3349, 3249, 1723, 1702, 1334, 1311, 1247, 1152, 1092, 894, 841, 814.

HRMS (ESI-) Calculated for $C_{13}H_{16}NO_5S$ $[M-H]^-$: 298.0749 ; found : 298.0743.

Ethyl 3-oxo-2-(4-sulfamoylbenzyl)butanoate – 241



$C_{13}H_{17}NO_5S$
MW 299,34

To a solution of ethyl 3-oxobutanoate (0.48 mL, 4.8 mmol, 3 equiv.) in dry THF (8 mL) under argon atmosphere and cooled to 0 °C was added NaH (60% w/w, 140 mg, 3.5 mmol, 2.2 equiv.). The reaction was stirred at 0 °C for 10 min. Then, 4-(bromomethyl)benzenesulfonamide **209** (400 mg, 1.6 mmol, 1 equiv.) was added in one portion to the reaction at 0 °C. After 5 min, the reaction was warmed to room temperature and was stirred for 24 h. Then, the reaction was quenched with H_2O, poured onto a cold saturated solution of NH_4Cl and extracted with EtOAc (x 2). The combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1, 8:2, 7:3 and 6:4, v/v) to provide the desired compound (411 mg, 1.37 mmol, 86% yield) as a pale yellow solid.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 5:5) = 0.21

m.p. = 81 °C

Equilibrium between ketone and corresponding enol forms was observed by NMR, in a ratio 90/10 respectively. Only ketone form is described below.

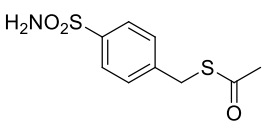
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.87 – 7.79 (m, 2H), 7.38 – 7.30 (m, 2H), 4.79 (bs, 2H), 4.24 – 4.06 (m, 2H), 3.77 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.29 – 3.15 (m, 2H), 2.23 (s, 3H), 1.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 201.9, 168.7, 143.5, 140.4, 129.5, 126.5, 61.8, 60.5, 33.3, 29.5, 13.9.

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3354, 3258, 1727, 1700, 1323, 1217, 1155, 1094, 1015, 890, 820.

HRMS (ESI-) Calculated for $C_{13}H_{16}NO_5S$ $[M-H]^-$: 298.0749 ; found : 298.0740.

***S*-4-sulfamoylbenzyl ethanethioate – 242**



$C_9H_{11}NO_3S_2$
MW 245,32

To a solution of *O*-ethyl *S*-4-sulfamoylbenzyl carbonodithioate **210** (250 mg, 0.86 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (8.5 mL) under argon atmosphere was added *n*-butylamine (90 µL, 0.95 mmol, 1.1 equiv). The reaction was stirred for 4 h at room temperature. After completion, Et_3N (0.13 mL, 0.95 mmol, 1.1 equiv.) and Ac_2O (90 µL, 0.95 mmol, 1.1 equiv.) were successively added

into the reaction which was stirred for 1 h. Then, the reaction was diluted with EtOAc. The mixture was poured onto a solution of brine and pH was adjusted to 3 from a solution of aqueous HCl (6 N) and extracted with EtOAc (x 2). The combined organic layers were washed with H_2O (x 3), dried over $MgSO_4$ and solvents were removed with vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1, 8:2 and 7:3, v/v) to provide the desired compound (109 mg, 0.44 mmol, 52% yield) as a colorless crystalline solide.

R*f* (cyclohexane/EtOAc, 5:5) = 0.31

m.p. = 140 - 141 °C

^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ_H 7.89 – 7.73 (m, 2H), 7.54 – 7.45 (m, 2H), 6.54 (bs, 2H), 4.20 (s, 2H), 2.35 (s, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ_C 194.8, 143.9, 143.7, 130.1, 127.2, 33.0, 30.2 (overlaped with acetone-d_6 signal).

IR (neat) γ_{max} (cm^{-1}) 3352, 3252, 3113, 1687, 1567, 1413, 1325, 1311, 1145, 1134, 1093, 919, 844.

HRMS (ESI-) Calculated for $C_9H_{10}NO_3S_2$ $[M-H]^-$: 244.0102 ; found : 244.0099.

Résumé

La synthèse contrôlée par la cible sous contrôle cinétique (*Kinetic Target-Guided Synthesis*, KTGS) est une stratégie d'approche par fragments, où la cible biologique est directement employée afin d'assembler son propre ligand *via* une réaction biocompatible et irréversible. Bien que prometteuse pour la découverte de nouvelles molécules biologiquement actives, il existe toujours différentes limitations inhérentes à cette technique comme la formation de très faibles quantités de ligands, pouvant conduire à des faux négatifs lors des analyses, ou encore le nombre limité de réactions éligibles en KTGS, ne permettant pas une couverture optimale de l'espace chimique. Afin de répondre à ces différentes limitations, deux approches principales ont été imaginées en tant qu'objectifs de ces travaux. La première stratégie consiste à élaborer une séquence réactionnelle permettant d'une part de former le ligand au sein de la cible, et d'autre part de réaliser son marquage afin d'augmenter sa détectabilité par spectrométrie de masse ou par émission de fluorescence. Le second objectif est d'étudier l'éligibilité de diverses réactions biocompatibles (réactions de Diels-Alder et de thiol-yne) pour des applications en KTGS afin de compléter l'éventail de réactions applicables.

Mots clés : synthèse contrôlée par la cible, découverte de molécules biologiquement actives, réaction de Diels-Alder, réaction de thiol-yne, réaction biocompatible, marquage moléculaire, inhibiteur enzymatique.

Abstract

The kinetic target-guided synthesis (KTGS) is a fragment-based strategy which involves the biological target for the assembly of its own ligand *via* a biocompatible and irreversible reaction. Although promising for the discovery of new biologically active molecules, this approach is still suffering from various limitations, namely the very low quantities of ligand which are formed during the experiments, which may afford false-negative results during analyses, or the limited range of applicable reactions in KTGS, which do not allow an optimal covering of the chemical space. In order to address these issues, two main approaches were envisioned as goals of this thesis work. The first one is the development of new reactional sequences, allowing at first the formation of the ligand within the target, and then its labelling so as to increase its detectability by mass spectrometry analysis or by fluorescence emission. The second goal was to study the eligibility of various biocompatible reactions (Diels-Alder and thiol-yne reactions) for KTGS application so as to complete the range of available reactions.

Key words: Target-guided synthesis, drug discovery, Diels-Alder reaction, thiol-yne reaction, biocompatible reaction, molecular labelling, enzymatic inhibitor.