



Modification sélective de protéines en milieu biologique par réaction de Suzuki-Miyaura nanocatalysée

Arnaud Peramo

► To cite this version:

Arnaud Peramo. Modification sélective de protéines en milieu biologique par réaction de Suzuki-Miyaura nanocatalysée. Pharmacie galénique. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS600 . tel-03908943

HAL Id: tel-03908943

<https://theses.hal.science/tel-03908943>

Submitted on 21 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.

Modification sélective de protéines en milieu biologique par réaction de Suzuki-Miyaura nanocatalysée

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris Sud

École doctorale n°569 INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU
FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ : Pharmacotechnie et Biopharmacie

Thèse présentée et soutenue à Chatenay-Malabry, 20 décembre, par

Arnaud Péramo

Composition du Jury :

Professeur Jean-Pierre Mahy, Université Paris Saclay, Université Paris Sud, Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay, CNRS UMR 8182	Président du Jury
Docteur Michelle Salmain, Institut de Chimie Moléculaire, Sorbonne Université, CNRS UMR 8232	Rapporteur
Raphaël Rodriguez, Institut Curie, CNRS UMR3666–INSERM U1143	Rapporteur
Docteur Dominique Lesuisse, Sanofi	Examineur
Professeur Patrick Couvreur, Université Paris Saclay, Université Paris Sud, Institut Galien, CNRS UMR 8612	Directeur de la thèse
Docteur Didier Desmaële, Université Paris Saclay, Université Paris Sud, Institut Galien, CNRS UMR 8612	Co-directeur de la thèse

Titre : Modification sélective de protéines en milieu biologique par réaction de Suzuki-Miyaura nanocatalysée

Mots clés : Palladium, Nanoparticules, Réaction Suzuki-Miyaura, Thyroglobuline, Analyse Protéomique

Résumé: Les nanotechnologies ont ouvert de nouvelles perspectives pour l'administration ciblée des médicaments. Les approches actuelles en nanomédecine sont basées sur l'encapsulation d'un principe actif dans un nano-vecteur. Nous proposons dans ce travail l'utilisation de nanoparticules non plus pour adresser un médicament encapsulé vers sa cible, mais pour manipuler une protéine d'intérêt en milieu biologique, ce qui constitue une nouvelle stratégie thérapeutique. Avec cet objectif, nous avons identifié une formulation de nanoparticules de palladium, stable, non toxique et dotée d'un pouvoir catalytique remarquable de la réaction de Suzuki-Miyaura. Ce nano-catalyseur permet, en utilisant un dérivé du bore approprié, de greffer des résidus aromatiques sur des acides aminés halogénés dans un tampon phosphate à température et pH physiologiques. En parallèle, la formulation sous forme de nanoparticules de calixarenes fonctionnalisés par des complexes carbéniques du palladium a été également étudiée. Ce nano-réacteur permet d'effectuer dans l'eau et à température ambiante une réaction d'arylation d'acides aminés halogénés de manière très efficace.

Nous montrons qu'il est possible grâce à ces nanoparticules de modifier sélectivement par une liaison covalente, la thyroglobuline, une protéine naturelle halogénée, impliquée dans la maladie de Basedow et dans certains cancers de la thyroïde. L'absence de modèle cellulaire exprimant la protéine nous a conduit à tester la réaction dans un homogénat d'organe provenant de l'exérèse chirurgicale de la thyroïde chez un patient de la maladie de Basedow. Le couplage de la thyroglobuline par réaction de Suzuki-Miyaura a pu être détecté par analyse protéomique grâce au marquage par un cycle aromatique simple, et par western blot à l'aide d'une sonde biotine autorisant une détection par immuno-essai. En conclusion, la thèse apporte la démonstration de la formation sélective d'une liaison C-C sur une protéine par des nanoparticules de palladium dans un milieu biologique complexe et en conditions physiologiques. Ces résultats pourraient ouvrir la voie à de nouvelles options thérapeutiques permettant de contrôler le taux de thyroglobuline dans le cas d'une dérégulation hormonale.

Title : Selective modification of a protein in biological media by nanocatalyzed Suzuki-Miyaura reaction

Keywords : Palladium, Nanoparticles, Suzuki-Miyaura reaction, Thyroglobuline, Proteomic Analysis

Nanotechnology has opened up new perspectives for targeted drug delivery in the treatment of severe diseases. Current approaches in nanomedicine are based on the encapsulation of an active drug in a nanocarrier. In the present study, we have used nanoparticles not to address an encapsulated drug to a target tissue, but for manipulating a protein of interest in a complex biological medium. With this aim, we have identified a stable, non-toxic palladium nanoparticle formulation, embedding a remarkable catalytic activity on the Suzuki-Miyaura reaction. This nano-catalyst allows by using an appropriate boron derivative to couple aromatic residues onto halogenated amino acids in a phosphate buffer at physiological pH. By the same way, the formulation as nanoparticles of calixarene derivatives functionalized with palladium carbene complexes was studied. This new nano-reactor allowed similarly the arylation reaction of halogenated amino acids in water and at ambient temperature in a very efficient manner.

We showed that it is possible, thanks to these nanoparticles, to modify selectively by a covalent bond the thyroglobulin, a halogenated natural protein, implicated in Graves' disease and in certain thyroid cancers. The absence of a protein-expressing cellular model led us to test the reaction in an organ homogenate from surgical thyroid excision from a Graves' disease patient. The coupling of thyroglobulin by Suzuki-Miyaura reaction was detected by proteomic analysis by labeling with a simple aromatic ring and by western blotting using a biotin probe allowing detection by immunoassay. In conclusion, the study undertaken in the thesis has shown the selective formation of a CC bond onto a natural protein in a complex biological medium and under physiological conditions, by using palladium nanoparticles. This result paves the way for new therapeutic perspectives to control the level of thyroglobulin in the case of hormonal dysregulation.

Ce manuscrit est dédié à mon grand-père Pierre Simon

Remerciements

Ce manuscrit de thèse est le résultat de quatre années de travail effectuées à l'institut Galien Paris Sud, sous la direction du Pr Patrick Couvreur et du Dr Didier Desmaële au sein de l'équipe « Nanomédicaments pour le traitement de maladies graves ». Au fur et à mesure de ce projet à l'interface entre la chimie, la biologie et formulation, un grand nombre de personnes ont participé directement ou indirectement à la réalisation de ce projet, en collaborant, en participant à la mise au point des expériences, en donnant des conseils ou également pour leurs soutiens lors des périodes où rien ne fonctionne. Cette partie leur est dédiée.

Tout d'abord, je tiens à remercier la Dr Michelle Salmain, et le Dr Raphael Rodriguez qui ont accepté d'être les rapporteurs de mon travail et d'y avoir consacré un temps précieux.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Dr Dominique Lesuisse pour avoir accepté un jeune chimiste en apprentissage dans son équipe, avoir soutenu ma candidature pour une thèse dans l'équipe de Patrick Couvreur et pour l'intérêt qu'elle porte à mon travail en acceptant de participer à mon jury de thèse en tant qu'examinatrice.

Je remercie Pr Jean-Pierre Mahy pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse en tant que président.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance, et adresser mes remerciements les plus sincères à mon directeur de thèse, Pr Patrick Couvreur pour la confiance qu'il m'a accordée pendant toutes ces années, sa disponibilité, son écoute, et pour m'avoir secouru à juste titre par moment, ce qui m'a permis de progresser et d'aboutir à ce travail.

Merci ne suffirait pas à exprimer ma gratitude à mon codirecteur de thèse le Dr Didier Desmaële pour sa gentillesse, ses conseils, sa patience, sa disponibilité et son soutien sans faille tout au long de ces 4 années. Sans son temps précieux et son expérience, ce manuscrit n'aurait pas une forme aussi aboutie. J'ai également beaucoup appris humainement et culturellement, avec lui au cours de nombreuses discussions sur l'histoire, la politique, etc. Ce fut un réel plaisir de vous avoir comme encadrant.

Un grand merci également au Dr Anaëlle Dumas pour avoir été à l'origine de ce projet de thèse passionnant, et pour ses conseils.

Au Dr Hynt Remita et à Mme Mireille Benoît, merci pour cette collaboration. Grâce leur aide lors de la préparation de nanoparticules de palladium par radiolyse nous avons pu « sauver ce projet de thèse ».

Au Dr Corinne Dupuy et aux membres de son équipe le Dr Ruy Andrade Louzzada et M. Raphael Corre, un grand merci pour les échanges qui m'ont permis de mieux comprendre les processus biologiques impliqués dans production de la Thyroglobuline, la culture de thyrocytes et la transfection de cellules.

Au Dr Benoît Lambert, merci pour les échantillons de goitre thyroïdien. Sans eux nous n'aurions pu tester la toxicité du palladium, et préparer le broyat qui a permis d'apporter la preuve de concept.

Au Pr Jacques Young, merci d'avoir permis ces collaborations avec l'équipe du Dr Dupuy et avec le Dr Lambert qui ont grandement participé à la réussite de ce projet de thèse, ainsi que nos échanges lors de réunion.

Je souhaiterais remercier particulièrement Stéphanie Yen-Nicolaï pour son aide précieuse, ces conseils, son temps et son implication dans ce projet. C'était un plaisir d'apprendre et de collaborer avec elle. J'en profite pour remercier Lydie Correia de la Plateforme de protéomique de l'INRA qui s'est occupé de nos échantillons.

Pour un chimiste réalisé, cultiver des cellules, tester la toxicité, réaliser des gels ne fait pas partie des gestes de base appris pendant le cursus. C'est pourquoi j'exprime mes plus sincères remerciements à Stéphanie Denis, et Juliette Vergneau pour avoir été extrêmement patiente, pédagogue et de bon conseil. J'ajoute également à ces remerciements Julie Mougin et P. Beaunier du Laboratoire de Réactivité de Surface (UMR CNRS 7197, Sorbonne Université, F-75005) pour les images TEM et Cryo-TEM des nanoparticules.

J'adresse également mes remerciements les plus sincères à Simona Mura qui a également beaucoup participé à faire de moi un meilleur chercheur et un meilleur biologiste. J'ai beaucoup apprécié nos échanges et avoir pu apporter mon aide à ses projets.

Il y aurait pu y avoir un évènement catastrophique au cours de cette thèse... mais grâce à Kevin agent de la SNCF ainsi qu'au service des objets trouvés de la gare de Bordeaux St-Jean j'ai pu retrouver mon ordinateur, sans quoi 3 mois de données non sauvegardés sur un cloud ou disque dur externe auraient été perdus. Un grand merci à eux pour leurs compréhensions et leurs honnêtetés.

Réaliser ma thèse à l'institut Galien a été une véritable chance et pour cela je souhaite remercier les membres permanents de l'équipe 5 et 7 pour leurs échanges enrichissants et particulièrement Pr Elias Fattal directeur de l'unité pour m'avoir permis de réaliser ma thèse à l'institut Galien, et pour sa sympathie, et avoir créer un laboratoire où l'ambiance est très agréable.

Le doctorat est aussi fait de rencontre et je souhaite remercier mes collègues doctorant et amis, Dr Joahna Tran, Carlos Rodriguez, Dr Julien Massiot, Raul Diaz, Fédérica Costamagna, Dr Giampiero Lazzari, Marion Quaillet, Romain Bursini, Eleonore Coppens, et tous les autres doctorants pour leurs solidarités, leurs bonnes humeurs et leurs esprits festifs. C'était un véritable plaisir d'avoir fait votre rencontre et de partager des moments avec vous. J'adresse un remerciement particulier à Flavio Dormont pour son amitié, m'avoir associé à ses projets ambitieux, c'est un réel plaisir d'avoir fait ta rencontre.

À mes partenaires du D3-3eme étage Pr Christian Cavé, Sandrine Gouazou merci pour les bons moments passés, vos conseils et votre aide et les pauses café. J'adresse un remerciement particulier à Alexandra Pastor, pour sa joie de vivre, son soutien inflexible, et pour avoir été partenaire de galère... tout le monde souhaiterait avoir des collègues aussi sympathiques.

Je n'oublie pas de remercier les membres de mon équipe de baseball, c'était toujours un plaisir de venir évacuer mon stress avec vous.

Je souhaiterais remercier les enseignants et encadrants qui ont su transmettre leur passion pour la science, la chimie, et la recherche c'est également grâce à eux si j'ai trouvé ma voie. Tout

d'abord merci à M Friteaux professeur de physique-chimie (Collège) et Mme Cavin professeur de chimie générale (Bac STL) qui ont supporté ma curiosité. Merci à Christian Bruno de m'avoir fait visiter son laboratoire au lycée et m'avoir fait découvrir le monde de la recherche. Un grand merci à l'équipe pédagogique de l'IUT de chimie du Mans et particulièrement le Dr Jean-Claude Granguillot et le Dr Stephane Guillarme qui m'ont transmis leurs passions pour la chimie organique et pour avoir soutenu ma candidature pour un stage et une alternance à Sanofi je n'en serai pas là sans eux. Un grand merci également à André Malanda pour avoir été un mentor exceptionnel lors de mon alternance et pour m'avoir encouragé à continuer en master. Enfin merci à Diana Over pour m'avoir permis de rattraper un retard colossal en chimie de coordination et m'avoir soutenue pendant ma recherche pour un stage au Canada ainsi qu'en master.

Je n'oublie pas mes proches et tout particulièrement ma compagne Emmy Vu, qui illumine ma vie, qui m'a supporté pendant cette aventure de vie dans les bons moments comme dans les mauvais, elle a été un soutien sans faille. Merci à toi mon amour. Je remercie également ma sœur, mes cousins, mes grands-parents et ma belle-famille pour leurs soutiens et leurs encouragements et avoir supporté les exposés scientifiques lors des repas de famille.

Enfin, je remercie mes parents, ils ont été d'un soutien continu moral et financier tout au long de mes études, ils n'ont pas cessé de m'encourager, je leur dois tout.

Sommaire

Glossaire.....	9
Avant-propos	11
Chapitre 1 : Les nanoparticules de métaux de transition pour la catalyse bioorthogonale en milieu biologique.....	15
1. Réactions de ligations bioorthogonales.....	16
a. Définition.....	16
b. Les réactions sans métaux de transition.....	16
c. Réactions catalysées par les métaux de transition	20
2. Utilisation de nanoparticules métalliques pour catalyser des réactions bioorthogonales	27
a. Définition des nanoparticules	27
b. Préparations de nanoparticules de métaux de transition	28
c. L'utilisation de NP pour catalyser des réactions bioorthogonales	30
3. Conclusion.....	38
4. Références	39
Chapitre 2 : Préparation de nanoparticules de palladium pour la catalyse de la réaction de Suzuki-Miyaura dans l'eau.....	42
1. Partie 1 : Formulation de nanoparticules de palladium et activité catalytique.....	44
a. Nanoparticules de Pd-poloxamère.....	45
b. Nanoparticules de Pd-Dextran	46
c. Activité catalytique sur un acide aminé modèle	48
d. Conclusion	50
e. Matériel et méthodes	51
f. Référence	53
2. Nanoparticules de Palladium supportées sur des nanoparticules de PLGA-PEG	55

3. Conclusion.....	75
Chapitre 3 : Modification sélective d'une protéine naturelle catalysée par des nanoparticules de palladium dans un broyat d'organe	76
1. La thyroglobuline	77
2. Recherche d'un système biologique exprimant une protéine iodée.	80
a. Expression de la thyroglobuline iodée dans les thyrocytes de rat	80
b. Utilisation de cellules thyroïdiennes transfectées	80
c. Tentatives d'iodation de la BSA dans une culture primaire de thyrocytes humains	83
d. Réaction de Suzuki-Miyaura dans un broyat de thyroïde.	83
3. Développement des outils d'analyse de la thyroglobuline.....	83
a. Synthèse d'une sonde rhodamine-triol boronate	84
b. Réaction de couplage entre la thyroglobuline bovine et la sonde fluorescente	87
4. Conclusion.....	88
5. References	89
6. Partie expérimentale	90
a. Matériels	90
b. Méthode	90
7. Modification selective de protéine par les nanoparticules de palladium dans un broyat d'organes.	93
Chapitre 4 : Auto-assemblage nanoparticulaire de calixarènes porteurs de complexes carbéniques du palladium : Application à la catalyse de la réaction de Suzuki-Miyaura dans l'eau	142
Conclusion Générale	168
Annexe	172

Glossaire

5-FU : 5-Fluorouracile

ADN : Acide déoxyribonucléique

BSA : Albumine de Sérum Bovin

Boc : tert-Butoxycarbonyl

BTAA : bis[(*tert*-butyltriazoyl)méthyl]-[(2-carboxyméthyltriazoyl)méthyl]-amine

Alloc : allyloxycarbonyl

CEA : Centre d'énergie atomique

CPCl : Chlorure de Cétalpyridinium

cRGDFE : peptide Arginine-Glycine-Aspartate-cyclisé par un acide glutamique

Cryo-TEM: cryogenic transmission électronique microscopie

CuAAC: Copper Azide-Alkene Cycloaddition

D6/D40: Dextran 6000/40000

D6C/D40C: Dextran 6000/40000 citrate

DEHAL1 : iodothyrosine désiodase

DIT : Diiodinated Tyrosine

DLS: Dynamic light scattering

DUOX2/ DUAXOA2: Dual oxydase2 et son facteur de maturation A2

FDA: Food and Drug Administration

ICMMO : Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay

MIT : Monoiodinated Tyrosine

MT : Métaux de transition

MTT : (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide

NADH: Nicotinamide adénine dinucléotide

NCL: Native chemical ligation

NHC: N-Heterocyclic carbenes

NIS: Symport Na/I

NP : Nanoparticules

PBS : Phosphate Buffer Saline

PDI : index de polydispersité

PLGA-PEG: poly(éthyléneglycol)méthyl éther-block-poly(lactide-co-glycolide

Poc : propargyloxycarbonyles

PROTACS: Proteolysis Targeting Chimeric Molecules

PVP: polyvinylpyrrolidone

RH: rayon hydrodynamique

ROS: Reactive oxygen species

SDS: sodium dodecyl sulfate

SPAAC: Strain Promoted Azide-Alkene Cycloaddition

Tg: Thyroglobuline

THPTA : tris-(hydroxypropyltriazolylméthyl)amine

T3: triiodothyronine

T4 : thyroxine

TPO: thyroperoxydase

TSH : **Thyroid** Stimulating Hormone

Avant-propos

L'introduction des nanotechnologies dans le domaine biomédical a ouvert de nouvelles perspectives pour l'administration ciblée des médicaments et le traitement de nombreuses maladies graves. Les approches utilisées jusqu'ici sont basées sur l'encapsulation d'un principe actif dans un nanovecteur. L'ambition de ce projet de Thèse est de développer des nanoparticules dotées d'une activité catalytique, capables de modifier chimiquement dans le milieu biologique et de manière spécifique des protéines dans un but thérapeutique. Cette approche originale ne faisant pas appel à l'encapsulation de principes actifs pour induire une activité pharmacologique, elle s'affranchira donc des problèmes liés à l'encapsulation des médicaments (taux d'encapsulation limité, libération non-contrôlée, problèmes de stabilité des formulations, etc...).

La fonctionnalisation sélective de macromolécules en milieu biologique a émergé ces dernières années comme un outil puissant pour disséquer et modifier les processus cellulaires. Typiquement, la machinerie biosynthétique de la cellule est utilisée pour incorporer un groupement fonctionnel exogène, un *tag*, sur une biomolécule cible. Une sonde est ensuite administrée de manière à réagir chimiosélectivement avec la protéine modifiée. Des acides aminés non naturels, fonctionnalisés par des groupements alcyne, azoture, alcène ou halogénure d'aryle peuvent être insérés dans les protéines. Le principal obstacle est de trouver une réaction pouvant être effectuée dans des conditions physiologiques, en utilisant des réactifs non-toxiques, traversant les membranes, et inertes avec les myriades d'autres groupes fonctionnels présents *in vivo*. Seules quelques réactions satisfont à ces critères, telles la cycloaddition d'Huisgen, la ligature de Staudinger, la réaction de Diels-Alder à demande inverse, les réactions 'photo-click' et les réactions de couplage pallado-catalysées. Parmi les réactions de formation de liaison carbone-carbone catalysées par le palladium, la réaction de Suzuki-

Miyaura semble particulièrement bien adaptée aux applications cellulaires. Elle implique le couplage d'un halogénure d'aryle (bromure et iodure principalement) avec un acide ou un ester arylboronique, en présence d'un catalyseur de palladium (0). La faible toxicité du palladium aux concentrations nécessaires, la solubilité des acides boroniques dans l'eau rendent cette approche très attrayante pour l'étiquetage des protéines en milieu biologique et même dans les cellules vivantes.

Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse sera d'apporter la preuve *qu'il est possible de modifier chimiquement en milieu biologique la thyroglobuline, une protéine naturellement iodée par une réaction de Suzuki-Miyaura, catalysée par des nanoparticules de palladium.*

Ce choix de la thyroglobuline mérite quelques commentaires. Les halogénures d'aryles nécessaires à la réaction de Suzuki-Miyaura ne sont pas habituellement présents dans le vivant à l'exception d'une protéine iodée, la thyroglobuline. Le ciblage de la thyroglobuline permet d'assurer l'orthogonalité du processus sans avoir besoin de marquer une cible par génie génétique. Pour autant ce choix ne ferme pas la porte à des applications thérapeutiques. En effet, chez les mammifères, la thyroglobuline est exprimée dans les cellules folliculaires et est transportée vers la lumière de la vésicule où les résidus tyrosine sont iodés et couplés pour former les protéines T3 et T4. La thyroglobuline iodée est ensuite réabsorbée par les cellules folliculaires où elle est dégradée dans les lysosomes pour libérer les hormones T3 et T4 qui sont ensuite envoyées vers le flux sanguin. La dérégulation des taux d'hormones thyroïdiennes peut conduire à des pathologies graves. Par exemple, leur surabondance peut conduire à la maladie de Graves, une maladie auto-immune affectant 2% des Femmes et 0,2% des Hommes.⁷ Une stratégie intéressante pour contrôler les niveaux de protéines intracellulaires serait de fixer sélectivement un tag sur la thyroglobuline par voie chimique pour la désigner à la dégradation par protéolyse en utilisant la machinerie cellulaire. Cette méthode est notamment utilisée dans la technologie PROTACS (Proteolysis Targeting Chimeric Molecules). Dans le cas présent, les

groupements iodés portés par les tyrosines de la thyroglobuline pourraient être exploités pour fixer par liaison covalente via une réaction de Suzuki-Miyaura catalysée par des nanoparticules de Pd(0), un agent de recrutement de la machinerie cellulaire. Cela pourrait aboutir au contrôle spécifique des niveaux d'expression de protéine, entraînant finalement une diminution des taux sanguins d'enzymes thyroïdiennes.

Les complexes du palladium généralement utilisés pour le couplage de Suzuki-Miyaura des biomolécules, reposent sur des ligands qui souffrent d'une mauvaise perméabilité cellulaire et ont une forte tendance à se fixer sur les protéines et les thiols endogènes. Pour résoudre ce problème, nous utiliserons des nanoparticules de palladium stabilisées par un polymère.

Ce manuscrit s'articule autour de quatre chapitres :

Le premier chapitre présente les réactions bio-orthogonales catalysées par les métaux de transition. La première partie du chapitre décrit l'emploi des métaux de transition sous forme de complexes solubles pour catalyser des réactions *in vivo*. La seconde partie décrit plus en détails l'utilisation de nanoparticules de métaux de transition dans ces mêmes applications *ex et in vivo*.

Le second chapitre traite de la formulation de nanoparticules de palladium pour la catalyse de la réaction de Suzuki-Miyaura dans l'eau. Il est organisé en trois parties : une première partie concernant la formulation des nanoparticules de palladium stabilisées par différents polymères, une seconde partie concernant l'activité catalytique des formulations les plus stables. La dernière partie présente les travaux publiés dans *Chimia* concernant la fonctionnalisation dans l'eau d'acides aminés iodés par réaction de Suzuki-Miyaura catalysée par des nanoparticules de PLGA-PEG-Palladium.

La preuve de concept de la modification d'une protéine dans un milieu biologique complexe sera présentée dans le Chapitre 3. Il comporte une première partie décrivant les difficultés

rencontrées pour établir une lignée cellulaire de thyrocytes capable de produire de la thyroglobuline iodée. La seconde partie décrit la synthèse d'une sonde rhodamine-boronique acide pour la détection de la formation d'une liaison covalente sur la thyroglobuline par fluorescence. La dernière partie, sous forme de publication soumise, décrit les résultats portant sur l'arylation sélective de la thyroglobuline par des nanoparticules de palladium dans un homogénat de tissu provenant de l'exérèse chirurgicale de la thyroïde de patients souffrants de la maladie de Basedow.

Le derniers chapitre décrit le développement d'une nouvelle formulation nanoparticulaire de calixarènes portant des complexes carbéniques hétérocycliques du palladium (calix[8]arene-NHC-Pd) développés par le Dr Vincent Huc au sein de l'ICMMO (Orsay)). Si la forme soluble développée par l'ICMMO possède une excellente activité dans la réaction de Suzuki-Miyaura en milieu organique, la forme nanoparticulaire montre quant à elle une remarquable capacité de catalyse du couplage de Suzuki dans l'eau. Ces nanoparticules palladées permettent d'accéder à un grand choix de biaryles, et d'acides aminés fonctionnalisés. Ce chapitre est constitué du manuscrit d'une publication en cours de rédaction.

Enfin, un bilan des résultats ainsi que les perspectives seront présentés dans une conclusion générale.

Chapitre 1 : Les nanoparticules de métaux de transition pour la catalyse bioorthogonale en milieu biologique

Dans ce chapitre nous commencerons par définir ce qu'est une réaction bioorthogonale, nous présenterons les différentes réactions non-catalysées avant d'exposer les différentes méthodes de manipulation de biomolécules grâce à des catalyseurs métalliques. Ensuite, nous définirons le terme de nanoparticule (NP) et nous décrirons les différentes méthodes pour préparer ces nanoparticules. Des exemples récents de l'utilisation de nanoparticules à base de métaux de transition comme catalyseur de réactions bioorthogonales seront ensuite présentés et discutés.

1. Réactions de ligations bioorthogonales

a. Définition

La définition de réaction bioorthogonale a été proposée en 2009 par Bertozzi. C'est un ensemble de réactions chimiques pouvant être réalisées dans un système biologique complexe sans interférer avec les processus biologiques naturels. Ces réactions doivent être capables de modifier une biomolécule rapidement, de façon chimiosélective, tout en restant inertes au milieu biologique.^[1]

Il existe une variété de nouvelles réactions développées afin de marquer, suivre, manipuler, ou isoler des biomolécules d'intérêt, sans affecter leur structure tertiaire ou leur activité. On peut les classer en deux grandes catégories, celles catalysées par les métaux de transition (MT) et celles fonctionnant sans ceux-ci.

b. Les réactions sans métaux de transition

Un certain nombre de réactions chimiques bioorthogonales ne reposant pas sur les MT ont été décrites dans la littérature. Elles peuvent être divisées en deux catégories : les réactions polaires (faisant réagir un électrophile avec un nucléophiles) et les réactions de cycloadditions (4+2 ou 3+2) comme décrites dans la Figure 1.^[2]

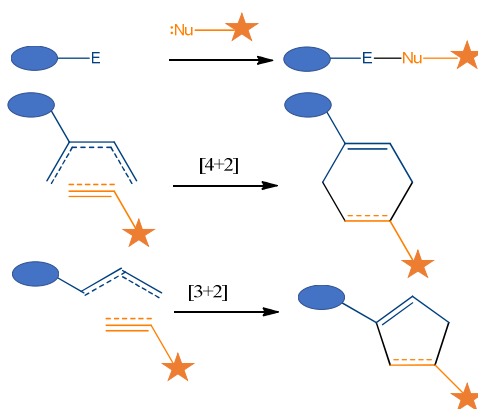


Figure 1. Les deux types de réactions bioorthogonales: les réactions polaires et les réactions de cycloaddition

Les réactions polaires :

Parmi les outils chimiques développés pour modifier des biomolécules sans altérer le milieu biologique, les réactions de types polaires, faisant réagir un nucléophile et un électrophile ont été largement étudiées. Nous ne donnerons que quelques exemples de leurs utilisations. L'une des premières développées est la ligation de Staudinger mise à profit par Bertozzi et coll. (Figure 2). Elle utilise une adaptation de la réduction de Staudinger permettant de réduire un azide en amine à l'aide d'une arylphosphine. En fixant un groupement ester en α du carbone portant le phosphore, il est possible de créer une liaison amide par réaction entre l'azote de l'imminophosphorane intermédiaire et le carbonyle du groupement ester.^[3]

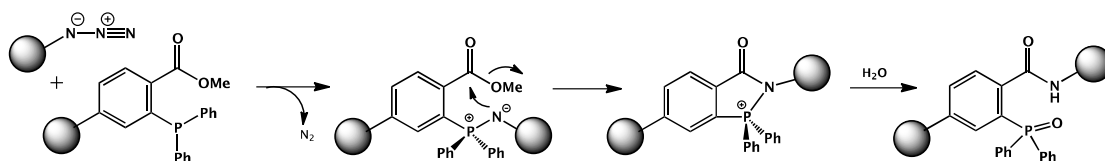


Figure 2. Mécanisme réactionnel de la ligation de Staudinger

Un récent exemple de l'utilisation de la ligation de Staudinger a été décrit par Bishnu et coll. afin de modifier la surface de macrophages pour étudier les interactions entre cellules cancéreuses et le système immunitaire.^[4] Pour traquer ces interactions un azido sucre a été

incorporé métaboliquement à la protéine pour permettre l'accrochage d'un fluorophore lié à une phosphine (Figure 3).

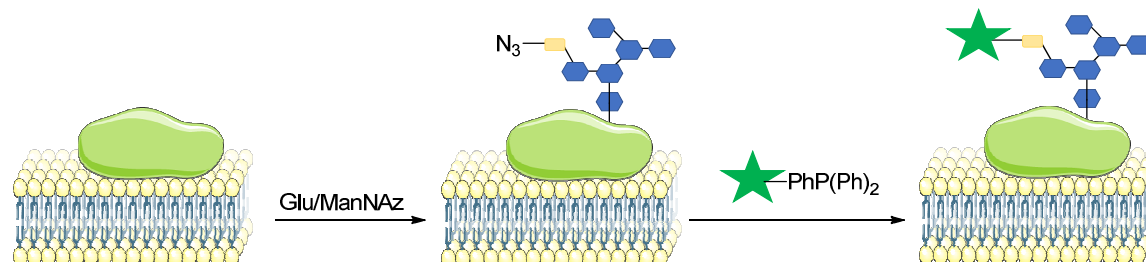


Figure 3. Marquage métabolique de la surface d'un macrophage après incorporation d'un azido-sucre via une ligation de Staudinger avec un fluorophore lié à une phosphine.

Bertozzi et coll. ont également mis en évidence l'utilisation de la ligation de Pictet-Spengler pour le marquage de protéines dont le principe est illustré dans la Figure 4. La condensation d'un aldéhyde avec une indolo-hydroxylamine, conduit intermédiairement à une nitrone qui subit alors une addition intramoléculaire de l'indole fournissant après prototropie une indoloxazine. Cette réaction permet d'établir un lien chimique stable entre les groupes portés par l'aldéhyde et l'indole et présente l'avantage d'avoir une cinétique cent fois plus rapide que la ligation de Staudinger quand elle est effectuée à pH 4-6.^[5]

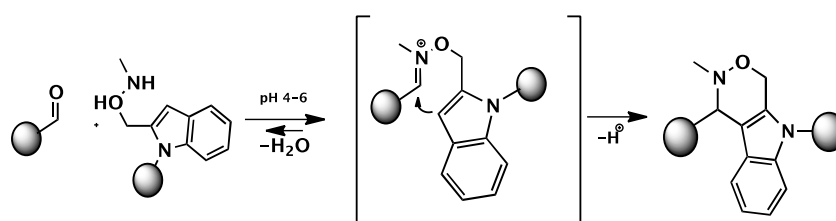


Figure 4. Ligation de Pictet Spengler

Une autre réaction polaire développée par le laboratoire du Pr. Kent, appelée Native Chemical Ligation (NCL) utilise un thiol et une cystéine pour homologuer un peptide dont l'extrémité C-terminale a été modifiée par un groupe thioester (Figure 5).^[6]

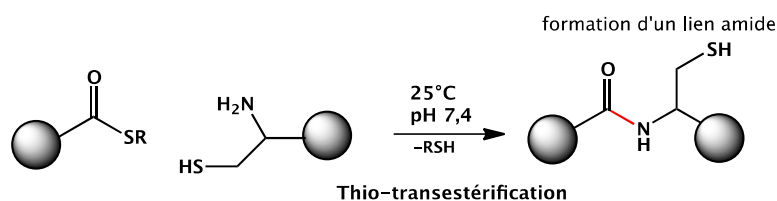


Figure 5. Formation d'une liaison amide par trans-thioestérification

Réactions de cycloaddition :

Il existe de nombreuses cycloadditions permettant d'effectuer des transformations en milieu biologique dont les plus employées sont la réaction de cycloaddition [3+2] entre les alcynes tendus et les azotures (Strain Promoted Azide-Alcine Cycloaddition, SPAAC) et les réactions de Diels-Alder [4+2] entre les transcyclooctènes et les tétrazines.

Bertozzi et coll. ont montré qu'on pouvait suivre le développement embryonnaire du poisson zèbre en incorporant dans des glycoprotéines de type mucine à la surface de l'embryon, des *N*-(azidoacétyl)galactosamines. L'azide est ensuite couplé à une sonde Alexa fluor, par cycloaddition, avec une cyclooctyne α,α' -difluorée permettant de suivre la biodistribution de ces glycosides au cours du développement de l'embryon par microscopie confocale (Figure 6).^[7]

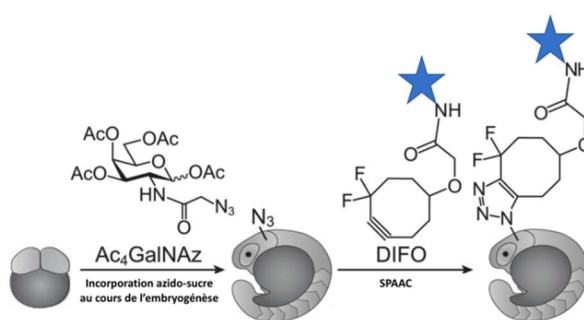


Figure 6. Incorporations métaboliques d'un azido sucre et réaction de cyclo addition alcynes-azide [3+2]

Ces réactions de cycloaddition ont également fait l'objet de nombreuses variations comme l'utilisation récente de sydnones développées par le groupe du Dr. Taran au CEA. Cette réaction a été utilisée pour le marquage de la myoglobine modifiée par des alcynes terminaux.

Elle permet de capturer une protéine grâce à un ligand biotine et de la relarguer à l'aide d'une cyclooctyne via une cycloaddition [3+2] suivie d'une extrusion d'isocyanate (Figure 7).^[8]

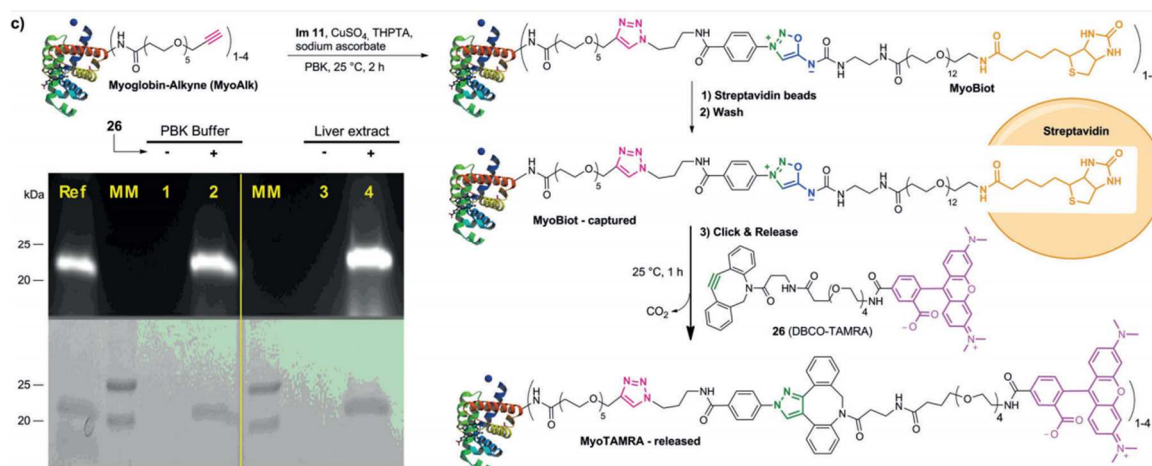


Figure 7. Réaction SPSAC entre la myoglobine modifiée par des alcynes terminaux et une sydnone, suivie par un relargage à l'aide d'un dibenzocyclooctyne (DCO) lié à un fluorophore

Pendant longtemps les cycloadditions et autres ligations ont été les composantes essentielles de la boîte à outils « chimie bio-orthogonale », car elles n'utilisaient pas de métaux potentiellement toxiques pour l'organisme comme le cuivre, le ruthénium ou le platine. Mais au cours des dernières décennies l'utilisation des métaux de transition pour catalyser des réactions classiques de chimie organométallique dans un environnement biologique est devenue l'un des principaux moteurs de la chimie-biologie actuelle, inspirant la recherche de nouvelles réactions chimiospécifiques et biocompatibles.

c. Réactions catalysées par les métaux de transition

Catalyse au cuivre :

L'une des réactions les plus emblématiques de la boîte à outils de chimie bioorthogonale est la cycloaddition [3+2] entre un azoture et un alcyne développé initialement par Huisgen. Cette réaction rendue extrêmement efficace par une catalyse aux sels de cuivre (I) a été appliquée à la chimie bioorthogonale par Sharpless dans les années 2000 et popularisée sous le terme de chimie *click*.^[9]

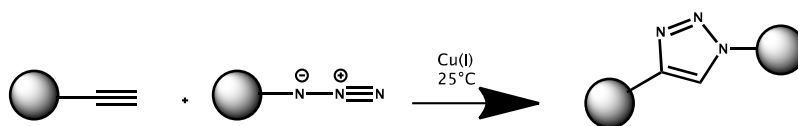


Figure 8. Cycloaddition alcyne-azoture catalysée par un sel de cuivre

Malheureusement, l'utilisation du cuivre comme catalyseur présente l'inconvénient d'engendrer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ce qui entraîne des dommages cellulaires dus à la peroxydation des lipides et de l'ADN.^[10] De nombreux ligands ont été développés permettant de réduire la production de ROS. Par exemple, il a été montré par Kennedy et coll. que la tris-(hydroxypropyltriazolylméthyl)amine (THPTA) ou la bis[(*tert*-butyltriazolyl)méthyl]-[(2-carboxyméthyltriazolyl)méthyl]-amine (BTAA) comme ligand permettent de réduire la toxicité induite par le cuivre.^[11] Une autre stratégie pour diminuer la production de ROS est de réduire la concentration en cuivre. Malheureusement, cette méthode réduit d'autant la vitesse de la réaction. Pour la rétablir, Uttamapinant et coll. ont développé des azotures plus efficaces comme les 2-azidoéthylpyridines dont l'atome d'azote hétérocyclique joue le rôle de complexant ce qui a eu pour effet d'améliorer la cinétique. Par exemple, cette méthode permet la cycloaddition en quelques minutes d'un ARN portant des groupements acétyléniques avec une azidopyridine jouant le rôle de ligand auxiliaire en présence de Cu(BTAA) à une concentration aussi faible que 10 μM .^[12]

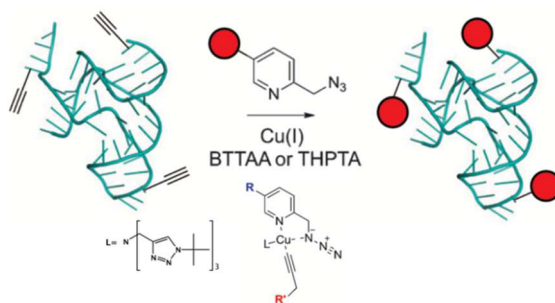


Figure 9. Chélation du cuivre par une pyridine lors d'une CuAAC sur une protéine portant des groupes alcynes

Catalyse au fer :

Outre les réactions permettant de fixer des marqueurs ou une chaîne peptidique aux macromolécules biologiques, d'autres transformations catalytiques ont été identifiées. C'est le cas de la réduction des azotures aromatiques par les métalloporphyrines ferriques (mésotétraarylporphyrines du Fe^{III}) en présence de thiol et à l'air. Cette transformation impliquerait la formation d'un complexe FeIV -nitrene qui réagirait avec le thiol de la cystéine pour donner l'amine. Meggers et coll. ont ainsi démontré qu'il était possible d'effectuer une réduction *in vivo* chez le Poisson-zèbre d'un précurseur non-fluorescent de la rhodamine 110 fluorescente. Cet exemple illustre les potentialités de la chimie du fer comme activateur de prodrogue ou en imagerie.^[13]

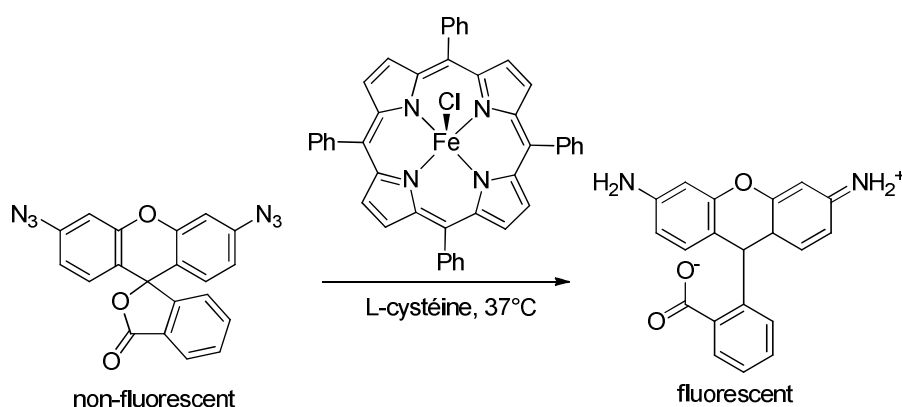


Figure 10. Complexe catalytique de fer engendrant une rhodamine fluorescente

Catalyse à l'iridium :

L'intérêt de l'iridium pour catalyser l'hydrogénation homogène des doubles liaisons $\text{C}=\text{C}$ et $\text{C}=\text{O}$ est bien connu depuis l'introduction du catalyseur de Crabtree à la fin des années 70. De nouveaux complexes de l'iridium possèdent maintenant une bonne solubilité dans l'eau et une remarquable stabilité à l'air. Do et coll. ont mis en évidence les propriétés de transfert d'hydrogène d'un complexe de l'iridium portant un ligand phénylpicolinamide dans des cellules NIH-3T3. Le composé est capable de réduire la fonction aldéhyde d'une sonde bodipy

pour engendrer une espèce fluorescente. Dans ce processus le NADH semble être la source d'hydrure intracellulaire. Tout comme ceux du fer, ce complexe pourrait être utilisé afin d'activer *in vivo* des principes actifs ou des marqueurs fluorescents (Figure 11).^[14]

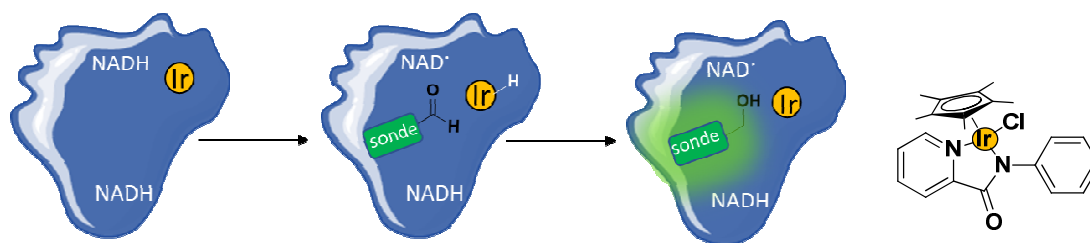


Figure 11. Réaction de transfert d'hydrogénation via un organo-iridium permettant l'activation intracellulaire d'une sonde fluorogénique par réduction d'un groupement l'aldéhyde

Catalyse au ruthénium :

En dehors des réactions de click, ou des réductions, les réactions de déprotection de groupement propargyloxycarbonyles (Poc) ou des allyloxycarbonyles (Alloc) dans des conditions physiologiques ont également été étudiées. Si le palladium est le métal de choix pour effectuer ces transformations, les complexes de ruthénium possèdent aussi un intérêt indéniable. Meggers et coll. ont ainsi décrit la synthèse de complexes solubles du ruthénium permettant de démasquer une prodrogue de la doxorubicine dont l'atome d'azote sur la daunosamine est masqué par un groupement Alloc. Dans des cellules HeLa, ce complexe à une concentration de 20 μM induit une déprotection efficace de la doxorubicine provoquant la mort cellulaire par apoptose comme observée avec la doxorubicine libre à 20 μM . Remarquablement le glutathion présent dans les cellules ne semble pas inhiber la réaction (Figure 12).^[15]

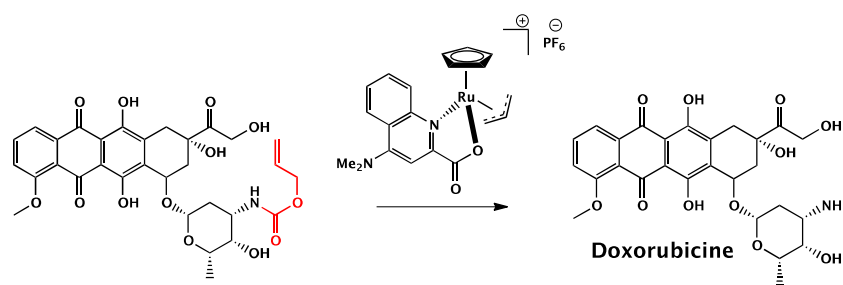


Figure 12. Activation de la Doxorubicine par un complexe de ruthénium

Catalyse à l'or :

Parmi les métaux de transition, l'or a été l'objet de nombreuses recherches. Sa stabilité, sa faible toxicité ainsi que sa réactivité particulière, font de ce métal un catalyseur idéal pour les réactions bio-orthogonales. Par exemple, la forte affinité du cation Au^+ , permet de modifier chimiosélectivement une liaison π d'alcynes ou d'allènes. Très récemment, Vidal et coll. ont développé un catalyseur d' $\text{Au}(\text{I})$ complexé par un ligand soluble permettant de catalyser sans cytotoxicité, l'hydroarylation intramoléculaire d'un phénylpropiolate porté par une hexapyridoquinoléine profluorescente à l'intérieur de cellules cancéreuses de type HeLa (Figure 13).^[16]

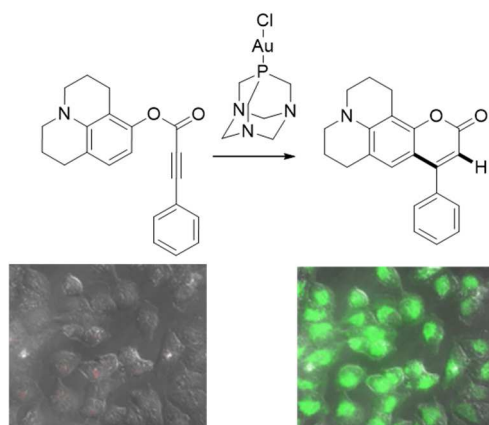


Figure 13. Hydroarylation intramoléculaire catalysée par l' $\text{Au}(\text{I})$

Catalyse au palladium :

Moins toxique, plus stable et moins cher que d'autres métaux précieux, le palladium a reçu récemment de nombreuses applications en chimie biologique. Largement utilisé dans la synthèse organique pour catalyser la formation de liaisons carbone-carbone dans les réactions de couplage croisé (Suzuki-Miyaura, Negishi, Sonogashira, Stille etc...), il a été employé sous forme homogène pour le marquage de protéine. Par exemple, le groupe de Davis a décrit un complexe de (2-amino-4,6-dihydroxypyrimidine) $\text{Pd}(\text{II})$ soluble dans l'eau, permettant de greffer une sonde de type fluorescéine sur une protéine mutée portant une phénylalanine iodée

via une réaction de couplage de Suzuki-Miyaura.^[17] Cette remarquable méthode a été étendue à une protéine transmembranaire d'*Escherichia coli* (pOmpC) mutée par génie génétique sur 4 positions accessibles en surface de la bactérie (N47X, N188X, Y232X et Y310X, X étant une *p*-iodophénylalanine non naturelle). L'incubation de ces *E. coli* mutés avec un acide boronique fluorescent et le complexe de palladium permet d'effectuer une réaction de Suzuki-Miyaura sur pOMpC au niveau des résidus *p*-iodophénylalanine qui s'accompagne d'un marquage détectable par cytométrie de flux de la surface des bactéries.^[18] L'absence de toxicité du complexe de palladium jusqu'à 700 μ M permet d'envisager des applications intracellulaires (Figure 14).

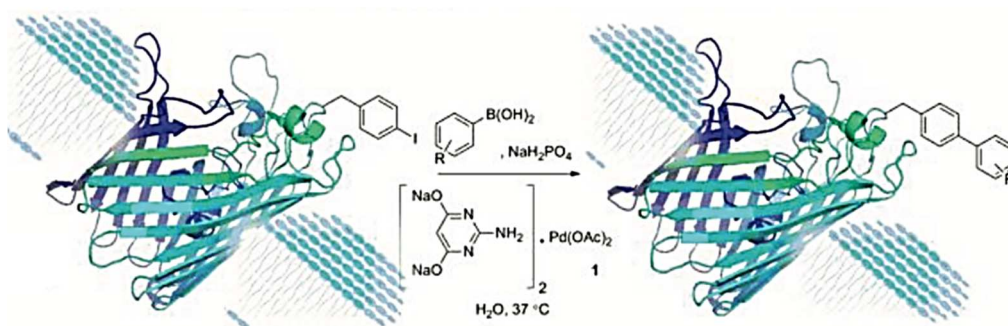


Figure 14. Marquage par réaction de Suzuki-Miyaura à la surface d'*Escherichia coli* de la porine bactérienne OmpC mutée par introduction de résidus I-Phe

De manière similaire, Chen a effectué le marquage de la protéine fluorescente verte (GFP) dont la Lys149 est remplacée par un analogue portant un butyne, dans *E. coli* via une réaction de Sonogashira intracellulaire avec le fluorophore FL525 portant un groupement iodophényle. Pour cela les bactéries exprimant la GFP mutée ont été incubées avec le fluorophore en présence de Pd(NO₃)₂. L'intérêt thérapeutique de la méthode a été illustré en effectuant la même réaction avec le fluorophore FL525 dans *Shigella*, une bactérie Gram négative, dont la protéine pathogène OspF a été mutée avec un résidu ϵ -butynylcarbamate-Lys. Le couplage a été démontré par détection de la fluorescence de la bande correspondant à la protéine OspF après séparation par SDS-PAGE (Figure 15).^[19]

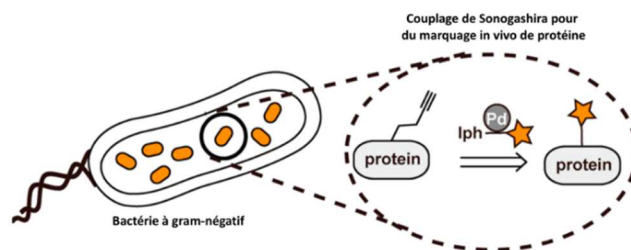


Figure 15. Couplage de Sonogashira in cellulo avec une sonde fluorescente

La forte réactivité des complexes de palladium avec le monoxyde de carbone a été mise à profit par le groupe de Chang pour synthétiser une sonde *turn-on* capable de détecter le CO à la fois dans un tampon aqueux et dans des cellules vivantes. Cette sonde est composée d'un arylchloropalladate dimérique couplé à une sonde bodipy, l'ensemble étant non-fluorescent. La réaction de carbonylation appauvrit le noyau aromatique et déclenche la fluorescence de la sonde. Cette technique permet de détecter de petite doses de CO relarguées par un complexe de ruthénium ($\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$) à l'intérieur de cellules épithéliales HEK293 (Figure 16).^[20]

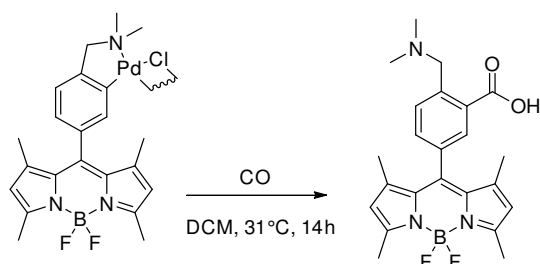


Figure 16. Réaction de carbonylation sur une sonde *turn-on* in cellulo

En dépit de ces résultats prometteurs, la toxicité et la stabilité en milieu biologique des complexes métalliques demeurent un frein aux applications biomédicales. Pour y remédier, des recherches intensives ont été réalisées afin de développer des formulations nanoparticulaires conservant les propriétés catalytiques des métaux mais susceptibles d'être vectorisées spécifiquement vers une cible biologique.

2. Utilisation de nanoparticules métalliques pour catalyser des réactions bioorthogonales

a. Définition des nanoparticules

L'Institut National de Recherche et de Sécurité INRS, définit les nano-objets comme étant des matériaux dont une, deux ou trois dimensions externes se situent à l'échelle nanométrique c'est-à-dire approximativement entre 1 et 100 nm. Parmi les nano-objets, une nanoparticule (NP) est définie comme étant un objet dont les trois dimensions externes se situent à l'échelle nanométrique (Figure 17).^[21] Mais cette définition est assez restrictive et dans le domaine pharmaceutique, on considère plutôt qu'un nanovecteur de médicament est un objet d'une taille de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres, injectable par voie intraveineuse et capable de modifier la pharmacocinétique, la biodistribution et/ou la métabolisation du principe actif encapsulé, afin d'en augmenter l'index thérapeutique (ie. augmentation de l'activité pharmacologique et/ou réduction de la toxicité).

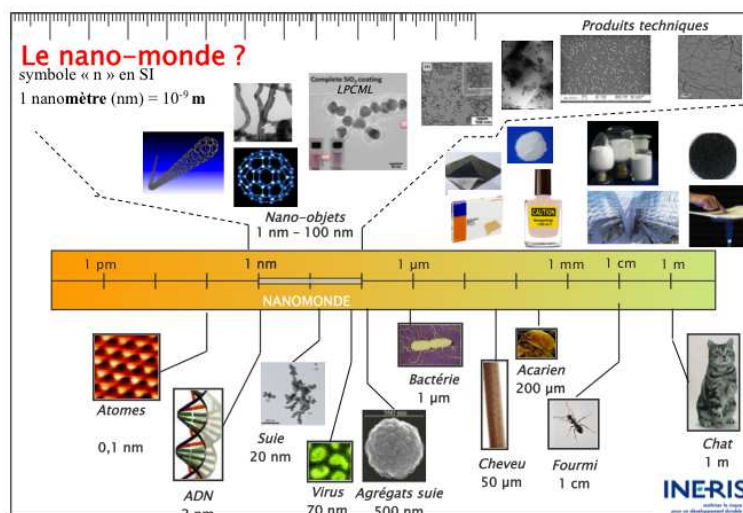


Figure 17. Echelle de grandeur du nanomonde source <http://culturesciencesphysique.ens->

[lyon.fr/ressource/risques-nanoparticules-Frejafon.xml](http://culturesciencesphysique.ens-lyon.fr/ressource/risques-nanoparticules-Frejafon.xml) Droits réservés - © 2015 E. Frejafon, INERIS

Les nanoparticules métalliques utilisées pour les réactions bio-orthogonales appartiennent à la catégorie des nanoparticules inorganiques de taille inférieure à 100 nm, composées de métaux de transition comme le cuivre, le palladium, le platine, l'or, le ruthénium ou encore le rhodium.

b. Préparations de nanoparticules de métaux de transition

Il existe deux méthodes principales permettant d'accéder à une suspension de NP inorganiques :

-Une **approche physique (top-down)** qui consiste à partir d'un matériau de granulométrie macroscopique pour arriver à des objets de taille nanométrique.

-Une **approche chimique (bottom-up)** qui consiste à partir de quelques atomes (sous forme ionique le plus souvent) pour former par réduction des agrégats métalliques de taille nanométrique. L'approche *bottom-up* est la plus employée car elle permet d'accéder à une plus grande variété de structure : sphériques, cubiques, hexagonales en bâtonnet, en feuillet, en étoile, ou plus complexes (Figure 18).^[22]

Ajoutons qu'il existe une troisième approche qui consiste à fixer un complexe métallique à la surface d'un nano-objet déjà formé (protéines, NP de polymère). Mais il ne s'agit pas explicitement de NP métalliques inorganiques dans ce cas.

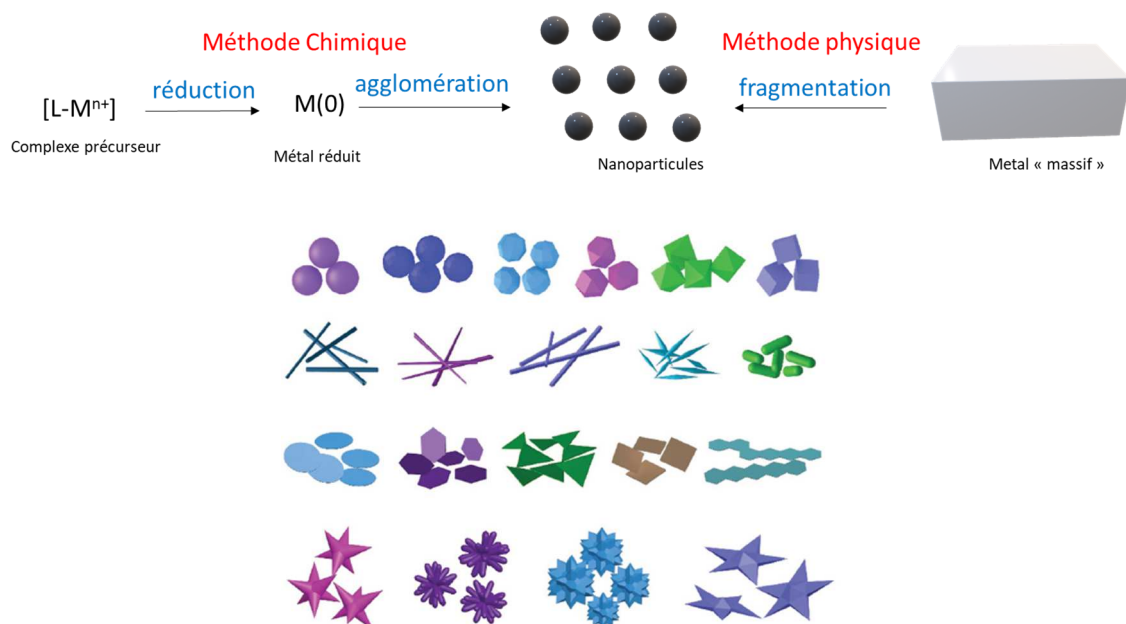


Figure 18. Schéma de synthèse de NP métalliques et structures possibles des NP inorganiques. (Source :

Biomater. Sci. 2018, 6, 726–745).

- Quelle que soit la méthode utilisée pour les préparer, les NP métalliques souffrent généralement d'une forte instabilité colloïdale. Il existe deux méthodes apportant une solution efficace à ce problème :

(a) L'adsorption de petits agrégats métalliques nanométriques généralement obtenus par réduction d'un sel, à la surface d'une nanoparticule organique ou de liposomes préétablis provenant eux-mêmes de l'autoassemblage de polymères amphiphiles, de phospholipides etc...

(Figure 19).

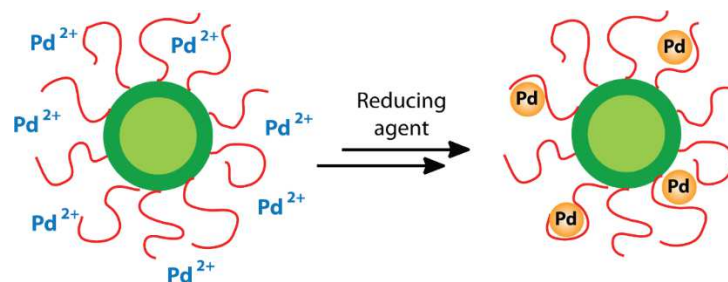


Figure 19. Stabilisation d'agrégats nanométriques à la surface d'une nanoparticule de polymères

(b) L'utilisation de polymères, de surfactants ou de petites molécules afin de stabiliser les NP métalliques obtenues par réduction (Figure 20).

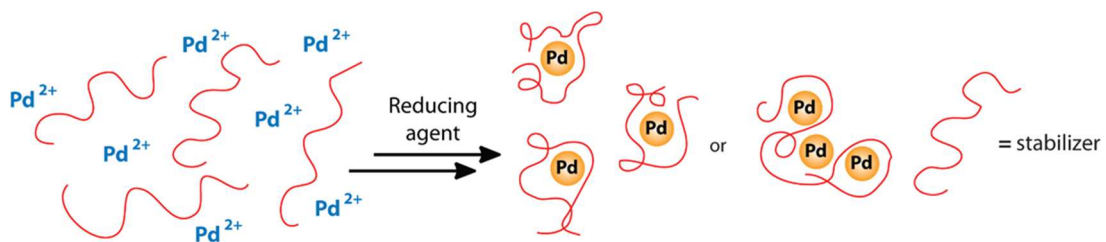


Figure 20. Nano-agrégat stabilisé par un surfactant

L'avantage de formulation sous forme de NP, est d'allier un fort pouvoir catalytique à la possibilité d'un ciblage des cellules tumorales via l'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*). L'effet EPR est un phénomène qui résulte d'une augmentation de la perméabilité vasculaire associée à une rétention tissulaire accrue au niveau de territoires biologiques qui sont le lieu d'une réaction inflammatoire (tumeur, infection, etc.). Il est induit par une dégradation des jonctions serrées des cellules endothéliales (Figure 21).

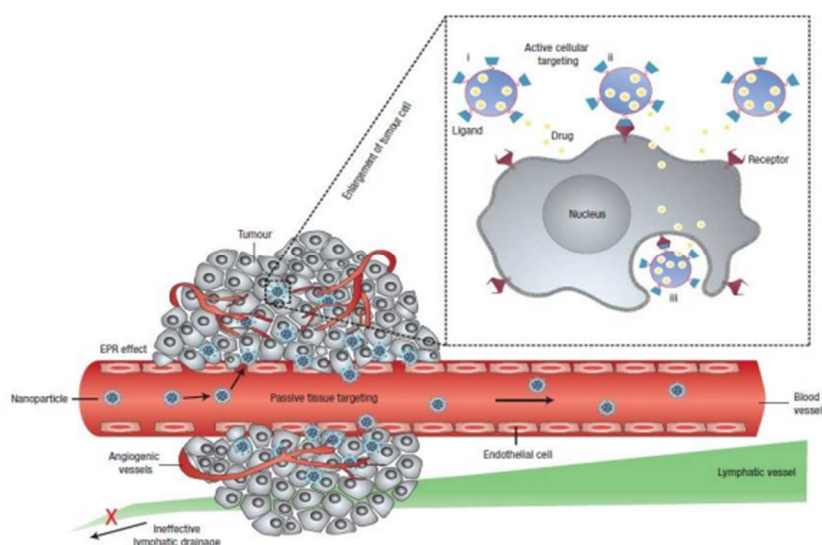


Figure 17. Représentation schématique de l'effet EPR aux abords d'une tumeur (Source conférence du Pr. Couvreur au collège de France)

c. L'utilisation de NP pour catalyser des réactions bioorthogonales

Au cours des dix dernières années, de nombreuses recherches ont été effectuées afin de développer des NP métalliques susceptibles de catalyser des réactions de cycloaddition, de déprotection ou de couplage croisé pallado-catalysé. Quelques exemples marquants sont décrits ci-dessous.

Nanoparticules de cuivre :

Le cuivre est le catalyseur de choix pour la réaction de cyclo addition [3+2] alcyne/azide développée par Sharpless. Malheureusement, comme il a déjà été mentionné plus haut, ce métal souffre d'une toxicité cellulaire qui limite son utilisation en milieu biologique. Afin de réduire cette toxicité, la formulation d'un complexe de cuivre sous forme de NP a été proposée par Bai et coll. Pour cela, ces auteurs ont fixé sur une chaîne polynorbornène hydrophobe des groupements acides permettant de chélater le cuivre et des groupes imidazolium solubilisant l'ensemble. L'addition d'un sel de cuivre (II) induit la réticulation de la chaîne polymérique et la formation de NP d'une dizaine de nanomètres. Ces nano-objets capables de passer les

barrières membranaires sont dotés d'une activité catalytique remarquable sur la réaction de cycloaddition [3+2] alcyne/azide par réduction par l'acide ascorbique, permettant par exemple la synthèse *in cellulo* d'une sonde fluorescente, dans des lignées cancéreuses de cancer du sein (MDA-MB-231) et de cancer du poumon (NCI-H460) ou encore l'assemblage d'un agent antimicrobien dans *E. coli* (Figure 22).^[23]

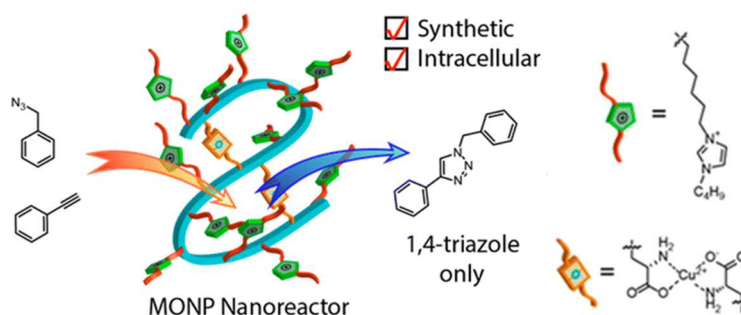


Figure 22. Représentation schématique d'une chaîne polynorbornène s'auto-organisant en NP en présence d'ions Cu^{2+} . Structure du complexe cuivre/aspartate et des groupes solubilisants.

Nanoparticules d'or :

Au cours des deux dernières décennies, l'utilisation de NP d'or pour le diagnostic, le traitement des tumeurs par photothermie, ou comme support pour administrer des principes actifs a été largement décrite.^[20] En revanche les NP d' $\text{Au}(0)$ n'ont reçu encore que peu d'applications en catalyse bioorthogonale, probablement parce que leur affinité pour les thiols masque toute autre réaction. Santamaria et coll. ont montré que l'adsorption des NP d'or à la surface de microsphères pégylées de polystyrène ($\sim 75 \mu\text{m}$) préservait leur activité catalytique de la réaction d'hydrolyse des carbamates de propargyle. De plus ces microsphères ne présentent pas de toxicité cellulaire et permettent de démasquer diverses prodrogues (Doxorubicine, SAHA, etc...) dans des cellules tumorales A549 (Figure 23). Cette stratégie innovante a également permis la libération contrôlée de rhodamine-*N*-propargylée dans le cerveau du Poisson-zèbre après implantation des microsphères d'or dans le tectum optique d'embryons.^[24]

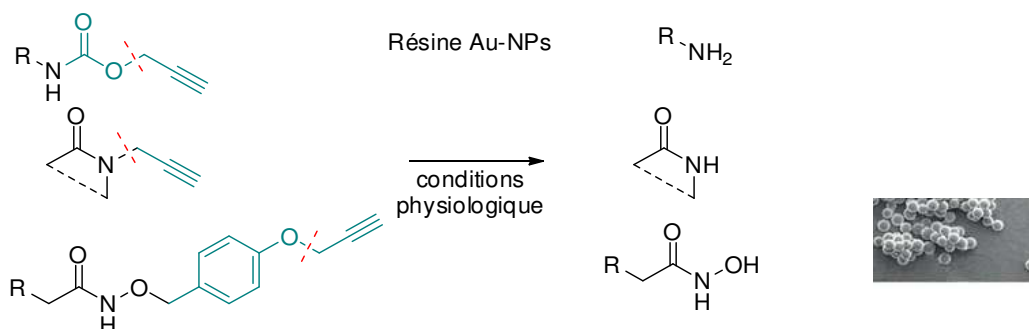


Figure 23. Image de microscopie électronique des microsphères de résine de polystyrène. Réaction de clivage de groupes protecteur propargylés.

Par ailleurs, des complexes de l'or(III) ont montré une activité catalytique *in vivo*. Par exemple, Tanaka et coll. ont décrit l'utilisation d'une glycoalbumine de taille nanométrique portant en surface des groupements disialoglycosyle ou galactosylglycosyle permettant de cibler respectivement le foie et l'intestin. Un complexe arylique de l'or(III) couplé à une coumarine via un espaceur PEG a pu être fixé sur ces glycoalbumines via l'interaction entre la coumarine et la poche hydrophobe 107-196 de l'albumine. Ce catalyseur supporté est capable de catalyser l'acylation d'une amine par activation d'un ester de propargyle. Cette réaction a été employée pour marquer d'un tag fluorescent rhodamine ou cyanine la surface du foie et de l'intestin chez la Souris (Figure 24).^[25]

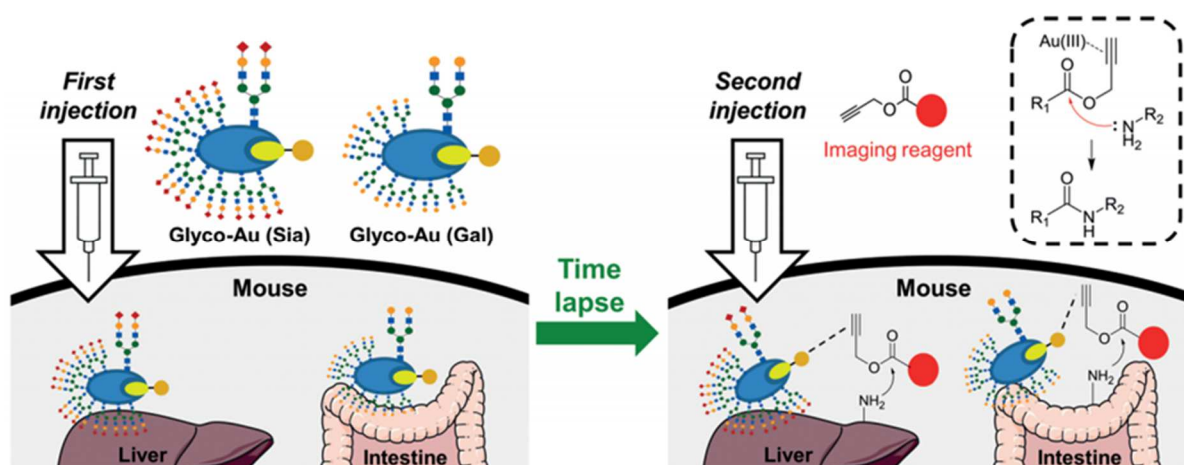


Figure 24. Schéma du marquage sélectif du foie et de l'intestin de souris par création d'une liaison amide catalysée par une glycoalbumine supportant un complexe de l'Au(III)

Nanoparticules de palladium :

La riche chimie du palladium et sa toxicité limitée vis-à-vis du vivant en font un métal idéal pour la catalyse en milieu biologique. Ce n'est donc pas surprenant si de nombreuses études reposent sur l'utilisation de NP de palladium. L'une des premières nanoformulations développées pour effectuer des réactions bioorthogonales *in vivo* a été décrite en 2011 par le groupe de Bradley. Celui-ci a préparé des microsphères de polystyrène couvertes de NP de Pd(0) de quelques nanomètres, obtenues par réduction d'un sel de Pd complexé en surface par des acides glutamiques. Dépourvues de cytotoxicité aigüe et pénétrant bien à l'intérieur des cellules, ces NP ont permis la libération de la rhodamine 110 à partir de son précurseur pro-fluorescent *N,N'*-allyloxycarbonylé. (Figure 25).^[26]

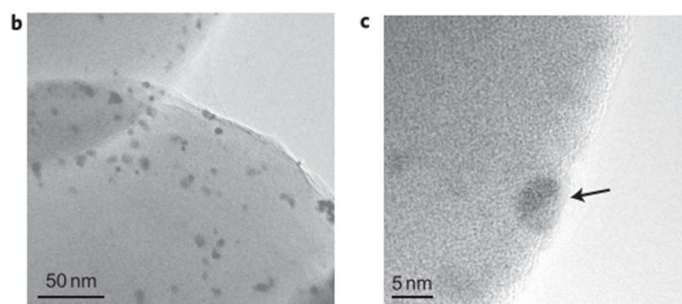


Figure 25. Image TEM de la surface de microsphères de polystyrène arborant en surface des NP de palladium.

Ces mêmes microsphères ont été mises à profit pour la création d'une liaison C-C à l'intérieur d'une cellule grâce à un couplage de Suzuki-Miyaura. Ainsi, lorsque des cellules HeLa pré-incubées par les microsphères de Pd sont traitées par un mélange de fluorescéine monotriflate et d'ester de pinacol d'un acide arylboronique, le produit de couplage est facilement observable par fluorescence. La présence d'un groupement triphénylphosphonium sur l'ester boronique permet en outre de cibler spécifiquement les mitochondries comme le suggère la co-localisation de la fluorescence du produit de Suzuki avec celle du Mito Tracker Deep Red (Figure 26).^[27]

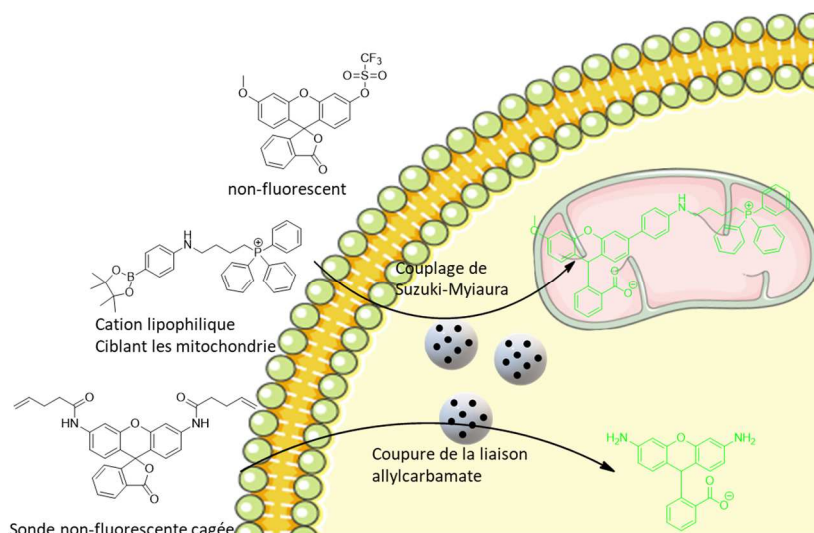


Figure 26. Relargage de sonde fluorescente à l'intérieur d'une cellule (a) couplage de Suzuki-Miyaura (b) clivage d'un groupement alloc (Source : *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 21: 128–135).

Le groupe du Dr. Unciti-Broceta a utilisé des microsphères de polystyrène pégylées décorées de NP de Pd pour activer une prodrogue *N*-propargylée du 5-fluorouracil (5-FU) (Figure 27).

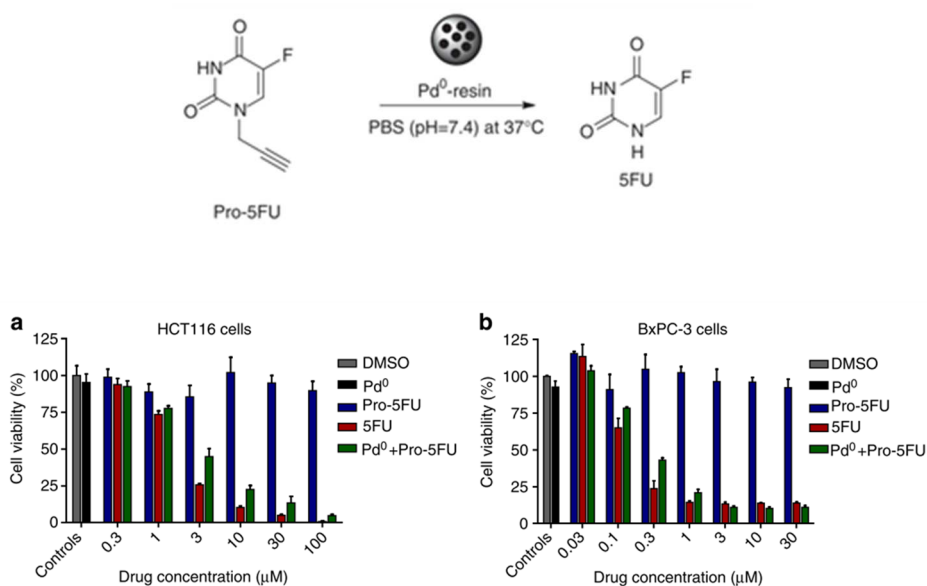


Figure 27. Déprotection du *N*-propargyl-5-fluorouracil par des NP de Pd supportées sur des microsphères d'hydroxyéthylpolystyrène pégylé. (b) Viabilité cellulaire après 5 jours d'incubation avec le Pro-5-FU en présence ou non des microsphères de Pd.

Bien que cette réaction intervienne dans le milieu de culture des cellules et non à l'intérieur de celles-ci, ces microsphères sont aussi capables d'induire une réaction *in vivo*.^[28] La remarquable biocompatibilité de ces microsphères au palladium a été illustrée par la déprotection *in vivo* chez le Poisson-zèbre du bis carbamate de propargyle fluorogénique de la rhodamine 110. Les microsphères contenant le palladium ont été injectées dans le sac vitellin de l'embryon de poisson-zèbre sans qu'aucune toxicité ne soit détectée. La sonde pro-fluorescente a ensuite été injectée et la réaction mise en évidence par l'apparition de la fluorescence de la rhodamine 110 (Figure 28).^[29]

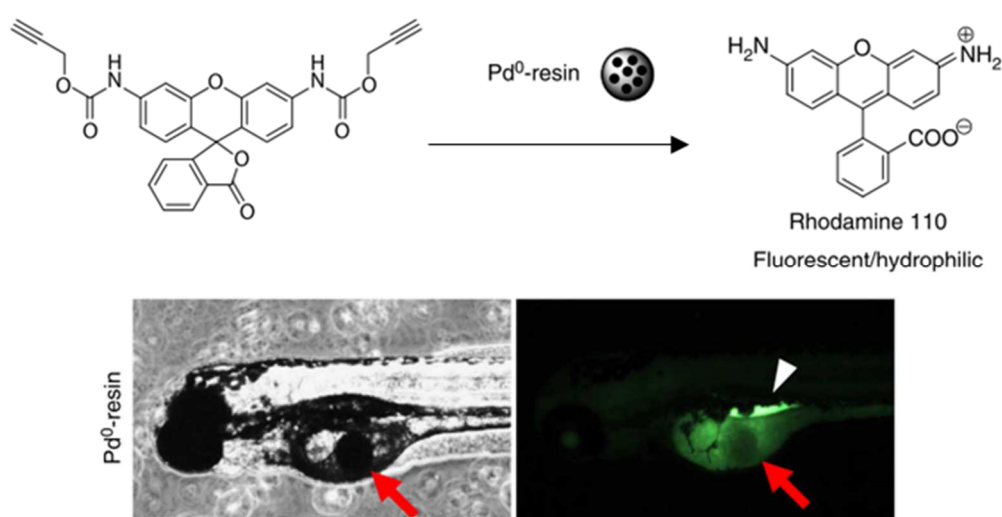


Figure 28. Image par fluorescence de la déprotection du N-Poc-Rhodamine 110 *in-vivo* chez le Poisson-zèbre par des microsphères de palladium, 3 jours après implantation

Il est aussi possible non plus de simplement activer une prodrogue mais de véritablement synthétiser un principe actif dans le milieu de culture. C'est ce qui a été fait par l'équipe de Bradley par un couplage de Suzuki-Miyaura catalysé entre deux sous-unités hétérocycliques pour former le PP-121^[30] un inhibiteur de tyrosine kinase (VEGF) et de phosphatidylinositol-3-OH kinase oncogénique, inhibant la prolifération de cellules cancéreuses de prostate (PC-3). Dans ce cas le catalyseur est constitué de NP de Pd adsorbées à la surface de petits cylindres millimétriques de résine polyéthylène/ polystyrène (Figure 29).^[31]

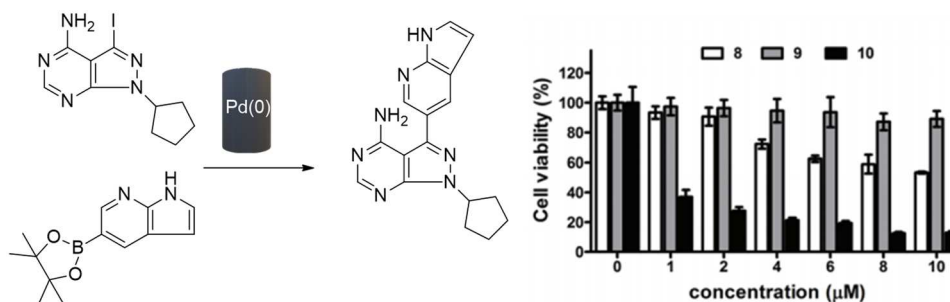


Figure 29. Schéma de la synthèse bioorthogonale du PP-121 par couplage de Suzuki entre la 3-iodo pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidinamine et l'ester de pinacol de l'acide 5-pyrrolopyridine boronique catalysée par les NP de Pd. Activité cytotoxique de la kinase formée *in situ* sur les cellules de cancer de la prostate PC3

L'efficacité des méthodes précédentes a été améliorée en décorant la surface des microsphères supportant les NP de Pd par un peptide de reconnaissance des cellules tumorales. Pour cela le peptide cyclique (cRGDfE) (peptide Arginine-Glycine-Aspartate-cyclisé par un acide glutamique) ciblant le récepteur $\alpha_v\beta_3$ surexprimé à la surface de la plupart des cellules tumorales a été couplé à l'acide glutamique du peptide via un petit espaceur éthylène glycol en surface des microsphères. Grâce à cette vectorisation des NP de palladium, la prodrogue Pro-5-FU a pu être activée et l'inhibiteur de kinase PP-121 synthétisé avec un rendement de 59% après 24 h d'incubation. Mieux encore lorsque les trois précurseurs sont ajoutés ensemble les deux composés sont formés dans la cellule provoquant la chute de la viabilité cellulaire à 22%. Ce travail montre qu'il est non seulement possible de cibler les cellules tumorales pour y effectuer sélectivement de la chimie, mais qu'on peut préparer plusieurs composés, ouvrant ainsi la voie à des polythérapies activées par le palladium (Figure 30).^[32]

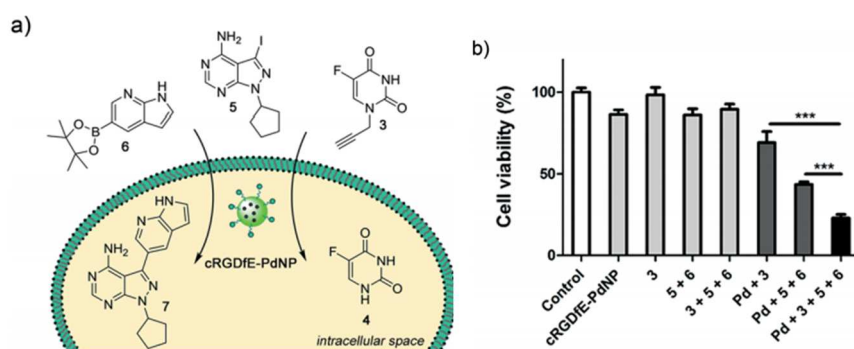


Figure 30. (a) Activation intracellulaire du 5-FU par déprotection et synthèse *in cellulo* de l'inhibiteur de kinase PP-121 par couplage de Suzuki-Miyaura catalysé par des microsphères palladées décorées du peptide cRGDfE
(b) Activité cytotoxique des prodrogues et de leurs formes activées

Comme nous l'avons vu, la doxorubicine dont le groupe amino de la daunomicine est protégé sous forme d'Alloc ou de propargyloxycarbamate (Poc) constitue une prodrogue non-toxique de la doxorubicine pouvant être activée par un complexe de ruthénium soluble.^[13] Plus récemment, le groupe d'Unciti-Bruceta a préparé de nouvelles prodrogues de la doxorubicine en intercalant un espaceur auto-immolable par formation d'ortho-méthylènequinone entre le groupe propargyle et le carbamate. La déprotection de cette prodrogue a pu être effectuée en utilisant des NP de Pd supportées sur des billes de TentaGgel® de 30 µm. La cytotoxicité du système a été étudiée sur des cultures de cellules de cancer de la prostate DU145, montrant une activité aussi forte que la doxorubicine elle-même. Ce résultat illustre la remarquable efficacité du processus de déprotection. Les billes de Pd ont été implantées par une fine aiguille dans un modèle orthotopique de cancer de la prostate chez la Souris en contrôlant le processus par échographie. Après 21 jours de croissance tumorale, les tumeurs ont été explantées et traitées par la prodrogue de doxorubicine. L'analyse par fluorescence montre un relargage complet de la molécule et une forte cytotoxicité confirmant que la capacité du système catalytique reste entière après un séjour prolongé *in vivo*.

Ces résultats ouvrent la voie à un traitement *in vivo* par la prodrogue, qui permettrait d'échapper à la forte toxicité cardiaque de la doxorubicine (Figure 31).^[33]

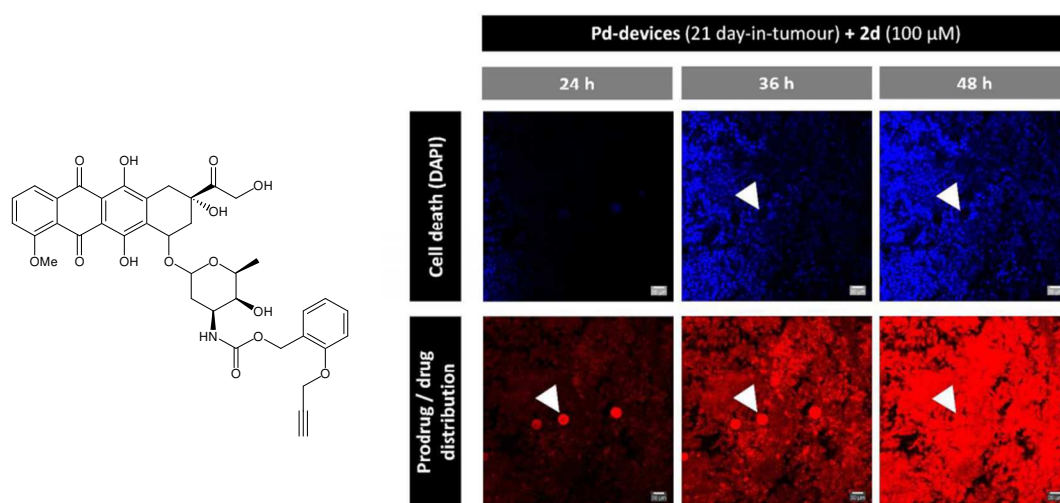


Figure 30. Structure de la prodrogue de doxorubicine et images de microscopie confocale d'explant de tumeur de la prostate. En bleu : mesure de la mort cellulaire (excitation à 405 nm du DAPI), en rouge mesure de la libération de la doxorubicine (excitation à 543 nm). La flèche blanche indique les NP de polystyrène/Pd.

3. Conclusion

Ces dernières années la catalyse bioorthogonale par les métaux de transition a connu des développements considérables. L'optimisation des ligands a permis d'appliquer des réactions chimiques jusqu'alors limitées au milieu organique, à la modification et la post fonctionnalisation de biomolécules dans des milieux biologiques complexes. D'autre part, les améliorations apportées aux ligands ont permis de diminuer la toxicité de ces métaux autorisant leur utilisation pour la manipulation de biomolécules situées à la surface de bactéries ou de cellules et même de manière intracellulaire. Enfin, la possibilité d'administrer de façon contrôlée des NP métalliques dans un organe cible afin d'y activer des agents cytotoxiques ou diverses sondes offre de nouvelles perspectives pour le traitement du cancer. Toutefois, si les développements en matière de catalyse par des NP métalliques *in-cellulo/in-vivo* sont impressionnants, l'utilisation de NP pour la modification de protéines *in vivo* n'a pas encore été explorée.

4. Références

- [1] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.
- [2] D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 592–605.
- [3] M. Grammel, H. C. Hang, *Nat. Chem. Biol.*, **2013**, *9*, 475–484.
- [4] P. J. Bishnu, K. Hardie, M. A. Mingroni, Michelle E. Farkas, *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 8, 2339-2346.
- [5] P. Agarwal, J. van der Weijden, E. M. Sletten, D. Rabuka, C. R. Bertozzi, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2013**, *110*, 46-51.
- [6] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *4*, 266, 776-779.
- [7] S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science* **2008**, *320*, 664-667.
- [8] S. Bernard, D. Audisio, M. Riomet, S. Bregant, A. Sallustrau, L. Plougastel, E. Decuypere, S. Gabillet, R. A. Kumar, J. Elyian, M. N. Trinh, O. Koniev, A. Wagner, S. Kolodych, F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 15612-15616.
- [9] C. Hartmuth, M. G. Kolb, K. Finn, B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [10] J. G. Brewer, *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 319–326.
- [11] D. C. Kennedy, C. S. McKay, M. C. B. Legault, D. C. Danielson, J. A. Blake, A. F. Pegoraro, A. Stelow, Z. Mester, J. P. Pezacki, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17993–18001.
- [12] C. Uttamapinant, A. Tangpeerachaikul, S. Grecian, S. Clarke, U. Singh, P. Slade, K. R. Gee, A. Y. Ting, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5852–5856.
- [13] P. K. Sasmal, S. Carregal-Romero, A. A. Han, C. N. Streu, Z. Lin, K. Namikawa, S. L. Elliott, R. W. Köster, W. J. Parak, E. Meggers, *Chem. Bio. Chem.* **2012**, *13*, 1116–1120.

- [15] T. Völker, F. Dempwolff, P. L. Graumann, E. Meggers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10536–10540.
- [16] C. Vidal, M. Tomas-Gamasa, P. Destito, F. Lopez, J. Mascareña, *Nat. Comm.* **2018**, DOI: 10.1038/s41467-018-04314-5.
- [17] J. M. Chalker, C. S. C. Wood, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 45, 16346–16347.
- [18] C. D. Spicer, T. Triemer, B. G. Davis *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2, 800–803.
- [19] J. Li, S. Lin, J. Wang, S. Jia, M. Yang, Z. Hao, X. Zhang, P. R. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7330–7338.
- [20] B. W. Michel, A. R. Lippert, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15668–15671
- [21] J. Alemán, A. V. Chadwick, J. He, M. Hess, K. Horie, R. G. Jones, P. Kratochvíl, I. Meisel, I. Mita, G. Moad, S. Penczek and R. F. T. Stepto, *Pure Appl. Chem.*, **2007**, *79*, 1801–1829
- [22] M. Jiao, P. Zhang, J. Meng, Y. Li, C. Liu, X. Luo, M. Gao, *Biomater. Sci.* **2018**, *6*, 726–745.
- [23] Y. Bai, X. Feng, H. Xing, Y. Xu, B. K. Kim, N. Baig, T. Zhou, A. A. Gewirth, Y. Lu, E. Oldfield, S. C. Zimmerman, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 11077–11080.
- [24] A. M. Pérez-López, B. Rubio-Ruiz, V. Sebastián, L. Hamilton, C. Adam, T. L. Bray, S. Irusta, P. M. Brennan, G. C. Lloyd-Jones, D. Sieger, J. Santamaria, A. Unciti-Brocetta *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 12548–12552.

- [25] K. Tsubokura, K. K. H. Vong, A. R. Pradipta, A. Ogura, S. Urano, T. Tahara, S. Nozaki, H. Onoe, Y. Nakao, R. Sibgatullina, A. Kurbangalieva, Y. Watanabe, K. Tanaka, *Angew. Chem. Ed.* **2017**, *56*, 3579–3584.
- [26] R. M. Yusop, A. Unciti-Broceta, E M.V. Johansson, R. M. Sanchez-Martin, M. Bradley. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 239-243.
- [27] A. Unciti-Broceta, E. M. V. Johansson, R. M. Yusop, Rosario M. Sánchez-Martín, M. Bradley *Nat. Prot.* **2012**, *7*, 1207–1218.
- [28] J. T. Weiss, N. O. Carragher, A. Unciti-Broceta, *Sci. Report* **2015**, *5*, DOI: 10.1038/srep09329.
- [29] J. T. Weiss, J. C. Dawson, K. G. Macleod, W. Rybski, C. Fraser, C. Torres-Sánchez, E. E. Patton, M. Bradley, N. O. Carragher, A. Unciti-Broceta, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, DOI 10.1038/ncomms4277.
- [30] B. Apsel, J. A. Blair, B. Gonzalez, T. M. Nazif, M. E. Feldman, B. Aizenstein, R. Hoffman, R. L. Williams, K. M. Shokat, Z. A. Knight, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 691 – 699.
- [31] E. Indrigo, J. Clavadetscher S. V. Chankeshwara A. Lilienkampfa, M. Bradley *Chem. Commun.*, **2016**, *52*, 14212-14214.
- [32] J. Clavadetscher, E. Indrigo, S. V. Chankeshwara, A. Lilienkampf A, M. Bradley, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 6864-6868.
- [33] T. L. Bray, M. Salji, A. Brombin, A. M. Pérez-López, B. Rubio-Ruiz, L. C. A. Galbraith, E. E. Patton, H. Y. Leung, A. Unciti-Broceta, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 7354–7361.

Chapitre 2 : Préparation de nanoparticules de palladium pour la catalyse de la réaction de Suzuki-Miyaura dans l'eau

Pour atteindre notre objectif de modifier par un lien covalent une protéine dans un milieu biologique par une réaction catalysée par des nanoparticules de Pd(0), nous avons choisi la réaction de Suzuki-Miyaura. Cette réaction met en jeu un dérivé halogéné et un acide boronique, qui n'étant pas (ou très peu) présents dans le milieu biologique assurent la biorthogonalité du processus. La réaction est catalysée par le palladium et elle permet de créer une liaison C-C totalement stable entre les deux molécules. De plus, la faible toxicité des nanoparticules de palladium et la très grande tolérance vis-à-vis des autres groupes fonctionnels conforte le choix de cette réaction pour une modification sélective de protéines. Mais avant tout, il était nécessaire de développer une formulation stable de nanoparticules de palladium possédant une forte activité catalytique en milieu aqueux à pH physiologique. Aussi avons-nous choisi de privilégier l'approche « bottom up » qui consiste à réduire un sel de Pd(II) en présence d'un agent stabilisant polymérique (Voir page 26). Cette méthode conduit à la formation de petits agrégats de palladium de quelques nanomètres qui se déposent sur la chaîne polymérique, cette force d'adhésion préservant ces petites particules d'une agglomération en gros objets sédimentant rapidement. Il nous fallait optimiser plusieurs paramètres : La source de palladium, le réducteur, le partenaire organoboré (acide boronique, boronate trifluoroboronate etc...) et enfin le polymère. Le principal obstacle à surmonter était d'obtenir une formulation stable pouvant permettre une réaction à une température compatible avec les processus biologiques. La réaction de Suzuki dans sa forme initiale en milieu organique est en effet généralement conduite vers 80-100 °C.

Dans ce chapitre, nous décrirons dans une première partie les tentatives pour obtenir une formulation stable et efficace en employant divers agents stabilisants comme les poloxamères, le dextran ou le PLGA-PEG. La seconde partie, décrit sous forme de publication la synthèse de petites nanoparticules de palladium supportées par des nanoparticules organiques de poly lactide-co-glycolide block- poly(éthylène glycol) et leur utilisation comme catalyseur de la

réaction de Suzuki-Miyaura dans l'eau. D'autre part, nous montrons que les partenaires organoborés les plus efficaces pour effectuer cette transformation sont les sels de triol borates cycliques.

1. Partie 1 : Formulation de nanoparticules de palladium et activité catalytique

Le paramètre le plus important pour élaborer un système nanoparticulaire de Pd apte à catalyser une réaction de Suzuki dans l'eau est sans doute l'agent stabilisant. En l'absence de stabilisant les nanoparticules de Pd s'agrègent rapidement en gros agrégats dénués d'activité catalytique et qui précipitent rapidement. Il existe déjà de nombreux exemples dans la littérature de suspensions nanoparticulaires de Pd dotées d'une activité catalytique en milieu aqueux. Néanmoins la plupart d'entre-elles sont peu actives à basse température ou reposent sur des stabilisants totalement incompatibles avec une administration *in vivo*. D'autres formulations utilisent des stabilisants biocompatibles mais les conditions requises ne sont généralement pas applicables en milieu biologique (température > 50°C). C'est par exemple le cas de nanoparticules formulées avec de l'acide polyacrylique,^[1] de la polyvinylpyrrolidone,^[2] du Pluronic P123,^[3] des polyméthacrylates,^[4] ou avec des polysaccharides naturelles comme la cellulose,^[5] l'amidon,^[6] la lignine,^[7] le chitosane^[8] et même une protéine thermiquement stable.^[9] Néanmoins, des nanoparticules de palladium supportées sur du poly(*N*-isopropylacrylamide)^[10] ou stabilisées par du Pluronic F68^[11] ont permis la formation de liaison C-C par réaction de Suzuki à température ambiante mais dans des conditions très basiques.

C'est en s'appuyant sur ce dernier résultat que nous avons commencé d'explorer le domaine en étudiant la possibilité de conduire la réaction à pH physiologique. En parallèle, un polysaccharide (le dextran) et le PLGA-PEG, deux polymères biocompatibles ont été testés.

a. Nanoparticules de Pd-poloxamère

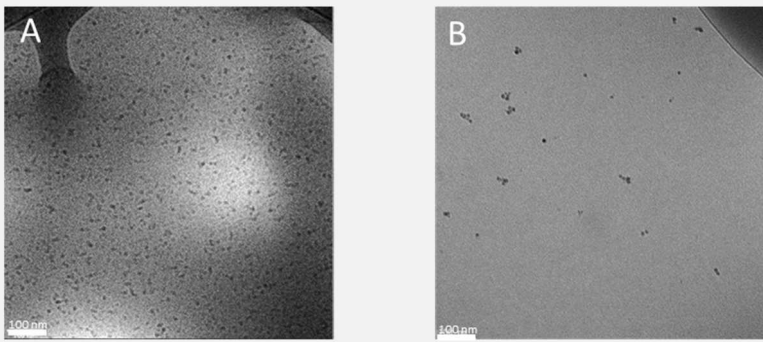
Parmi les différents agents stabilisants possibles, les poloxamères (Pluronic®) semblent des candidats de choix. Ce sont des copolymères non-ioniques composés d'un bloc central de polypropylène glycol hydrophobe et de deux blocs externes de polyéthylène glycol plus hydrophiles. Ce surfactant a été déjà utilisé comme agent stabilisant de nanoparticules métalliques d'or,^[12] d'argent,^[13] d'oxyde de fer,^[14]. En outre, la biocompatibilité des poloxamères a été largement démontrée. Par exemple Le Pluronic P188 bénéficie depuis très longtemps d'une autorisation de la *Food and Drug Administration* (FDA) comme agent tensioactif dans de nombreux injectables ^[15]. Les poloxamères possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, antithrombotiques et cytoprotectives ^[16] et sont aussi utilisés comme laxatif ^[17] Ajoutons que les poloxamères sont très largement utilisés comme surfactant par l'industrie cosmétique.

Piao *et coll.*, on décrit la préparation de nanoparticules de palladium de 4-5 nm dans l'eau par réduction du Na_2PdCl_4 en présence de PluronicP123.^[3] La taille des nanoparticules et la forme sont dépendantes des conditions. De plus, l'équipe a démontré qu'un tel système était capable de catalyser la réaction de Suzuki-Miyaura entre des dérivés d'halogénure de benzyle et l'acide phénylboronique dans un mélange DMF/eau à 90 °C en présence de carbonate de césium comme base.

Nous appuyant sur ces travaux, deux formulations de nanoparticules ont été préparées par réduction du tétrachloropalladate de potassium (K_2PdCl_4) par des poloxamères. Les nanoparticules stabilisées par le Pluronic F127 possèdent un rayon hydrodynamique (RH) de 39 nm, un indice de polydispersité (PDI) inférieur à 0,2 et un zêta potentiel négatif de -3 mV. Celles préparées avec Pluronic F68 sont assez similaires (Tableau 1). Les images de Cryomicroscopie révèlent dans les deux cas des objets sphériques individualisés.

Malheureusement, ces deux formulations sont peu stables à 37 °C et précipitent après quelques heures.

Tableau 1 Caractérisation des nanoparticules de Pd-Pluronic

<i>Pluronic</i>		
<i>Stabilisant</i>	<i>Pluronic F68</i>	<i>Pluronic F127</i>
<i>RH (nm)</i>	35,6	39,2
<i>PDI</i>	0,17	0,15
<i>Potentiel ζ (mV)</i>	-2,9	-3,0
<i>Image de CryoTEM</i>		

b. Nanoparticules de Pd-Dextran

Le dextran est un polysaccharide issu de la condensation du glucose découvert par Pasteur en 1861.^[18] Ce polymère a notamment été utilisé pour réduire la viscosité sanguine et prévenir la formation de thrombose^[19], comme support pour l'oxyhydroxyde ferrique pour le traitement de l'anémie.^[20] Il est également utilisé en nanomédecine, comme alternative au PEG, pour rendre « furtives » les NP en réduisant les interactions avec les opsonines^[21] ainsi que comme stabilisant pour des nanoparticules métalliques d'argent^[22], d'or^[23], d'oxyde de fer^[24] ou de palladium^[25].

Afin de synthétiser des nanoparticules de palladium stabilisées par le dextran, un protocole semblable à celui utilisé pour le pluronic a été appliqué. Une solution de K_2PdCl_4 a été ajoutée à une solution aqueuse de dextran. Le Pd(II) est ensuite réduit en Pd(0) par du borohydrure de sodium pour donner des nanoparticules de Pd-Dextran. Quatre formulations ont été préparées en présence de dextran 6000 (D6), de dextran 40000 (D40) et de dextran D6C et D40C en présence de citrate de sodium trisodique proposé par Wittemann *et coll.* comme stabilisant supplémentaire pour les nanoparticules de palladium.^[25] Pour chacune des formulations, a été réalisée une analyse du rayon hydrodynamique par DLS, du potentiel Zêta, et de la morphologie par Cryo-TEM. Les résultats obtenus sont décrits dans le Tableau 3 ci-dessous. En l'absence de citrate de sodium, les petites particules de palladium semblent se rassembler en objets plus ou moins structurés d'une centaine de nanomètres. En revanche, le citrate déstructure ces agrégats et des particules de palladium individualisées d'une dizaine de nm sont observées.

Tableau 2 Caractérisation des nanoparticules de Pd-Dextran 6000

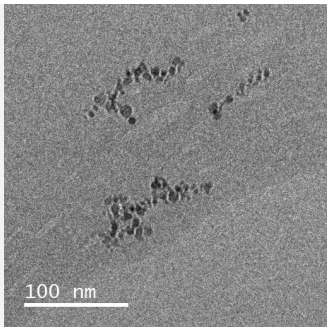
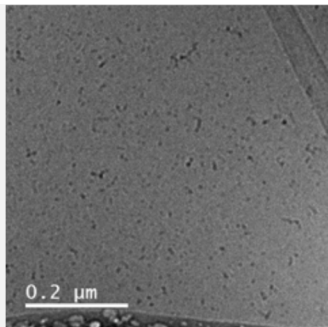
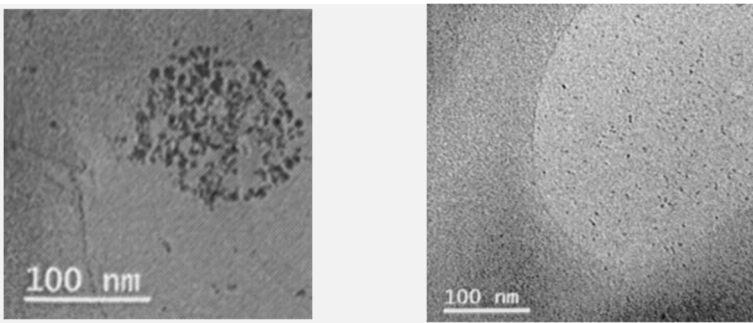
<i>Dextran 6 000</i>		
<i>Formulation</i>	D6	D6C
<i>RH (nm)</i>	90,0	6,1
<i>PDI</i>	0,19	0,22
<i>Potentiel ζ (mV)</i>	-9,3	-1,7
<i>Image de CryoTEM</i>		

Tableau 3 Caractérisation des nanoparticules de Pd-Dextrane 40000

Dextran 40 000		
Formulation	D40	D40C
RH (nm)	121,4	13,1
PDI	0,20	0,21
Potentiel ζ (mV)	-6,3	-2,7
Images de CryoTEM		

c. Activité catalytique sur un acide aminé modèle

Les diverses formulations de nanoparticules de palladium stabilisées avec les dextrans et les poloxamères ont ensuite été testées comme catalyseur de la réaction de couplage de Suzuki-Miyaura sur *N*-Boc-iodotyrosine utilisé comme acide aminé modèle et l'acide phénylboronique dans des conditions proches du milieu physiologique (37 °C, tampon pH 8). Le taux de conversion de la réaction a été déterminé par RMN du proton par intégration du système AB vers 3 ppm correspondant au méthylène C-3 (Figure 1). Les résultats sont consignés dans le Tableau 3. Toutes les formulations catalysent la réaction, celles reposant sur le Dextran 6000 en présence de citrate étant la plus active. L'influence du citrate et donc de l'agrégation des NP de Pd en objet plus gros, reste faible. Néanmoins, le niveau d'activité reste limité comparé à ce qui est décrit dans la littérature.

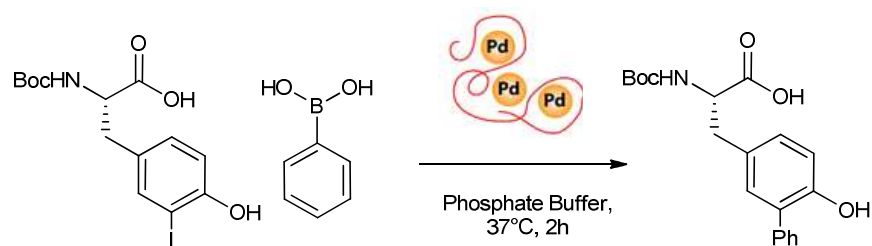


Schéma 1 Réaction de couplage de Suzuki-Miyaura entre la N-Boc-3-iodotyrosine et l'acide phénylboronique, catalysé par les nanoparticules de palladium en milieu aqueux.

Table 4 Taux de conversion de la réaction de couplage catalysé par les nanoparticules de palladium

N°	NP	Conversion (%) ^(a)
1	Pd-F68	31%
2	Pd-F127	51%
3	Pd-D6	52%
4	Pd-D6C	66%
5	Pd-D40	47%
6	Pd-D40C	55%

1 Equiv. *N*-Boc-3-Iodotyrosine, 3 équiv. d'acide phénylboronique, 1mol% Pd. ^(a) La conversion a été déterminée par ¹H-NMR du milieu réactionnel à partir du signal du méthylène C-3.

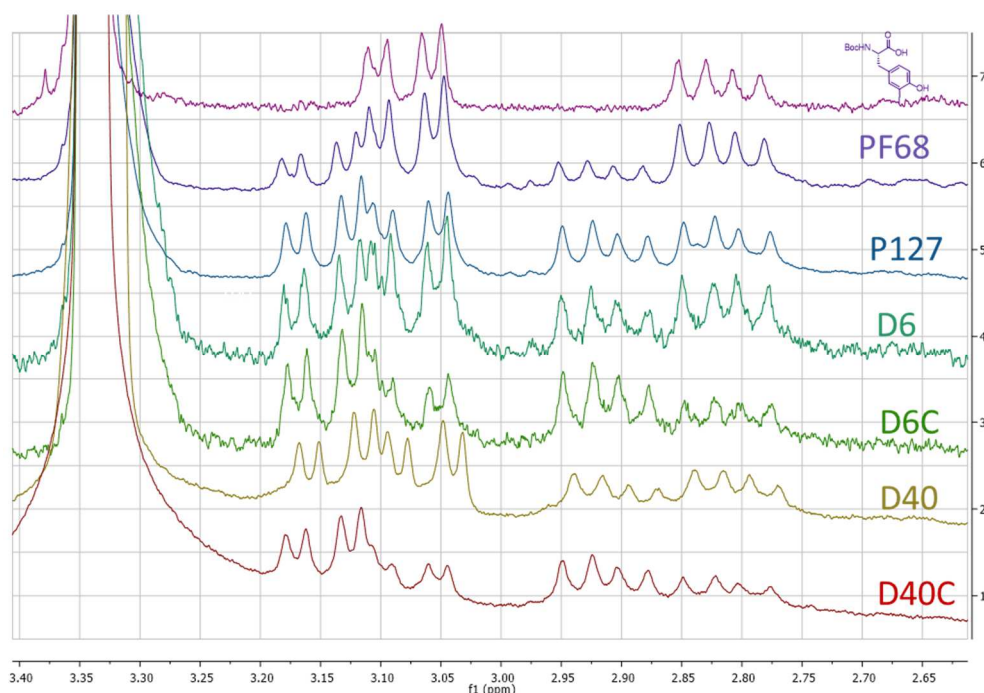


Figure 2. Comparaison de spectres RMN proton du méthylène C-3 de la N-Boc-3-iodotyrosine après réaction de couplage en milieu aqueux

d. Conclusion

Les formulations décrites dans ce chapitre sont dans l'ensemble stables et capables de catalyser la réaction de Suzuki-Miyaura à température corporelle. Néanmoins aucune d'entre-elles ne permet une conversion complète. Ce niveau d'activité reste insuffisant pour l'application en chimie orthogonale que nous envisageons. Par conséquent, une autre formulation a été étudiée avec le poly(éthyléneglycol)méthyl éther-*block*-poly(lactide-*co*-glycolide) (PLGA-PEG) non-plus utilisé comme simple stabilisant mais en « préformant » des nanoparticules de polymère d'une centaine de nanomètres et en précipitant à leur surface les nanoparticules de Pd(0) par réduction d'un sel de Pd(II).

e. Matériel et méthodes

Matériels

Tous les réactifs commerciaux proviennent de chez Merck et Alfa Aesar et ont été utilisés sans purification préalable. L'eau MilliQ utilisée pour les réactions a été obtenue au moyen d'un système Milipore). Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton ^1H (300 MHz) et du carbone ^{13}C (75 MHz) ont été enregistrés avec un spectromètre Bruker Avance 300 et les déplacements chimiques ont été donnés en partie par million (ppm), le pic de solvant étant utilisé comme valeur de référence (Methanol- d_4 : 3,34 ppm). La multiplicité des signaux est indiquée par : s = singulet, d = doublet, q = quadruplet, qt = quintuplet, m = multiplet et les constantes de couplage sont données en Hz. Les spectres de masse ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre LTQ-Velos Pro de chez Thermofisher Scientific. Le diamètre hydrodynamique et le potentiel ζ des nanoparticules ont été déterminés grâce à un Nanosizer Malvern: Nano ZS (Angle de dispersion 173°). Le potentiel ζ est mesuré après dilution avec une solution 1 mM en NaCl et calculé en appliquant l'équation de Smoluchowski. Les mesures sont réalisées en triple. Les images de Cryo-MET ont été obtenues à l'aide d'un microscope électronique à transmission JEOL JEM 100CXII à un voltage de 100 kV. Les échantillons ont été préparés par dépôt d'une goutte de suspension de NP sur une grille de carbone recouverte de cuivre (Ted Pella). L'excès de solution est éliminé avec un papier filtre.

Méthodes

Méthode générale pour la préparation des nanoparticules de poloxamère

A une solution de Pluronic F68 ou F127 (10% en masse) dans l'eau MilliQ (10 mL), est ajoutée une solution de K_2PdCl_4 (100 mM, 100 μL , 0,01 mmol). La solution est agitée 16 h à 37°C pour donner une suspension noire de nanoparticules de palladium à une concentration de 1 mM en Pd.

Méthode générale pour la préparation des nanoparticules de dextran

A une solution de D6000 ou D4000 (10% en masse) dans l'eau MilliQ (500 μ L), est ajouté une solution de K_2PdCl_4 (100 mM, 10 μ L). La solution est agitée à température ambiante. Après 1 h une solution de $NaBH_4$ (14,3 mM, 100 μ L) est ajoutée goutte à goutte. Le milieu est agité 1 h pour donner une suspension noire. Le milieu est dilué avec 450 μ L d'eau MilliQ avant d'être centrifugé (1 h, 22 000 g, 4 °C). Le surnageant incolore est éliminé et le culot est resuspendu dans 1 mL d'eau milliQ pour donner une suspension noire de nanoparticules de palladium à une concentration de 1 mM en Pd.

Méthode générale pour la préparation des nanoparticules de dextran citrate

A une solution de D6000 ou D4000 (10% en masse) dans l'eau MilliQ (500 μ L), est ajouté une solution de K_2PdCl_4 (100 mM, 10 μ L) et une solution de citrate trisodique (27,9 mM, 100 μ L). Le mélange est agité à température ambiante. Après 1 h une solution de $NaBH_4$ (14,3 mM, 100 μ L) est ajoutée goutte à goutte. Le milieu est agité 1 h pour donner une suspension noire. Le milieu est dilué avec 450 μ L d'eau MilliQ avant d'être centrifugé (1 h, 22 000 g, 4 °C). Le surnageant incolore est éliminé et le culot est resuspendu dans 1 mL d'eau milliQ pour donner une suspension noire de nanoparticules de palladium à une concentration de 1 mM en Pd.

Réaction de couplage en milieu aqueux

Dans un Eppendorf de 1.5 mL, on introduit 3,2 mg de *N*-Boc-3-iodotyrosine (0,008 mmol, 1 equiv.) et 2,9 mg d'acide phénylboronique (0,024 mmol, 3 equiv.) dans 420 μ L de tampon phosphate (pH 8.0, 20 mM). La suspension de nanoparticules de palladium (1 mM, 80 μ L, 8 10^{-5} mmol) est ajoutée. Le milieu est agité 2 h à 37 °C avant d'être lyophilisé et repris dans du méthanol- d_4 pour être analysé par RMN du proton.

f. Référence

- [1] M. M. Coulter, J. A. Dingslasan, J. B. Goh, S. Nair, D. J. Anderson, V. M. Dong *Chem. Sci.* **2010**, *1*, 772-775.
- [2] A. B. Patil, D. S. Patil, B. M. Bhanage, *J. Mol. Cat. A Chem.* **2012**, *35*, 146-153.
- [3] Y. Piao, Y. Jang, M. Shokouhimhr, I. S. Lee, T. Hyeon, *Small* **2007**, *2*, 255-260.
- [4] M. Zhang, W. Zhang, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 6245-6252.
- [5] V. W. Faria, D. G. M. Olivera, M. H. S. Kurz, F. F. Gonçalves, C. W. Scheeren, G. R. Rosa, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 13446-13452.
- [6] L. Shiyong, Z. Qizhong, J. Huajang, *Chin. J. Chem.* **2010**, *28*, 589-5993.
- [7] F. Coccia, L. Tonicun N. Alessandro, P. D'Ambrosio, M. Bressan, *Inorg. Chim. Acta* **2013**, *399*, 12-18.
- [8] A. Affrose, P. Suresh, I. A. Azath, K. Pitchumani, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 27533-27539.
- [9] A. Prastaro, P. Ceci, E. Chiancone, A. Boffi, R. Cirilli, M. Colonen G. Fabrizi, A. Stringaro, S. Cacchi, *Green Chem.* **2009**, *11*, 1929-1932.
- [10] M. Zhang, W. Zhang, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 6245-6252.
- [11] A. N. Kashin, I. P. Beletskaya, *Rus. J. Org. Chem.*, **2011**, *47*, 475–479.
- [12] K. Rahme, J. Oberdisse, R. Schweins, C. Gaillard, J.-D. Marty, C. Mingotaud, F. Gauffre, *Chem. Phys. Chem.* **2008**, *9*, 2230–2236.
- [13] C. Alves dos Santos, A. F. Jozala, A. Pessoa Jr, M Martins Seckler, *J. NanoBiotechnology* **2012**, *10*, 43-49.
- [14] T. K. Jain, S. P. Foy, B. Erokwub, S. Dimitrijevic, C. Flask, V. Labhasetwar, *Biomaterials*, **2009**, *30*, 6748–6756.

- [15] J. G. Moloughney, N. Weisleder, *Recent Pat. Biotechnol.* **2012**, 6, 200-211.
- [16] R. L. Hunter, A. Z. Luo, R. Zhang, R. A. Kozar, F. A. Moore, *Ann. Clin. Lab. Sci.* **2010**, 40, 115-125.
- [17] D. E. Corpet. S. Tache *European Patent* EP 1 124 566 B1.
- [18] L. Pasteur, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1861**, 30-31.
- [19] U.F. Gruber *Surg. Clin. North. Am.* **1975**, 55,679-96.
- [20] M. Wolf. T. A. M. Koch, D. B. Bregman, *J. Bone Miner. Res.* **2013**, 28, 1793–1803.
- [21] K. Ihareth, C. Vauthier, F. Bourasset, C. Gueutin, G. Ponchel, F. Moussa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, 81, 453–457.
- [22] R. Eisin, Signori A. M., Fort S., Domingos J. B. *Langmuir* **2011**, 27, 11860-11866.
- [23] S. Nath, C. Kaittanis, A. Tinkham, J. M. Perez, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 1033-1038.
- [24] R. S. Luciano Lara, A. D. Zottis, W. C. Elias, D. Faggion Jr, C. E. Maduro de Campos, J. Javier S. Acuña, J. B. Domingos. *RSC Adv.*, **2015**, 5, 8289–8296.
- [25] J. V. Wittemann, A. Kipke, E. Pippel, S. Senz, A. T. Vogel, J. de Boor, D. S. Kim, T. Hyeon, V. Schmid, *Applied Phys. Lett.* **2010**, 97, doi: 10.1063/1.3460918

2. Nanoparticules de Palladium supportées sur des nanoparticules de PLGA-PEG

Les nanosuspensions de Pd(0) stabilisées soit par des poloxamères soit par le Dextran s'étant avérées posséder un niveau d'activité trop faible pour être utilisées dans un milieu biologique en chimie bio-orthogonale, nous avons poursuivi nos recherches vers une formulation plus efficace. C'est ainsi qu'une formulation de nanoparticules de palladium supportées à la surface de nanoparticules de poly(éthylène glycol) méthyl éther-*block*-poly(lactide-co-glycolide) (PLGA-PEG) a été développée. Ces nanoparticules ont montré une bonne stabilité dans le temps, combinée à une excellente activité catalytique du couplage de Suzuki-Miyaura en conditions physiologiques. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication en 2016 dans *Chimia* (Anaëlle Dumas, Arnaud Peramo, Didier Desmaële, Patrick Couvreur PLGA-PEG-supported Pd nanoparticles as efficient catalysts for *Suzuki-Miyaura* coupling reactions in water, *Chimia*, **2016**, 70, 252-257) dont le manuscrit est reproduit ci-dessous.

PLGA-PEG-supported Pd nanoparticles as efficient catalysts for Suzuki-Miyaura coupling reactions in water

Anaëlle Dumas, Arnaud Peramo, Didier Desmaële, Patrick Couvreur*

Institut Galien Paris-Sud, Université Paris-Sud, UMR CNRS 8612, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France.

Keywords: amino acids chemistry, palladium nanoparticles, *Suzuki-Miyaura* cross-coupling

Abstract: Chemical transformations that can be performed selectively under physiological conditions are highly desirable tools to track biomolecules and manipulate complex biological processes. Here, we report a new nanocatalyst consisting of small palladium nanoparticles stabilized on the surface of PLGA-PEG nanoparticles that show excellent catalytic activity for the modification of biological building blocks through *Suzuki-Miyaura* cross-coupling reaction in water. Brominated or iodinated amino acids were coupled with aryl boronic acids in phosphate buffer in good yields. Interestingly, up to 98% conversion into the coupled amino acid could be achieved in 2 hours at 37 °C using the stable, water-soluble cyclic triolborate as organometallic partner in the presence of only 1 mol% of palladium. These results pave the way for the modification of biomolecules in complex biological systems such as the intracellular space.

Introduction

The tracking and manipulation of individual cellular components provide unprecedented opportunities to understand complex cellular processes and may open new avenues for the treatment of human diseases.^[1] Among the functional tools available for the manipulation of biological systems, “bioorthogonal reactions” offer versatile platforms for the selective and controlled modification of biomolecules of interest.^[1a] These transformations involve the covalent bond formation reaction between non-native chemical tags that react highly chemoselectively together under physiological conditions, while remaining inert towards the myriad of other functional groups found in biological environments. The major difficulty resides in finding non-perturbing chemical handles that react rapidly, while generating no or non-toxic side products.^[2] As a result, only a handful of reactions have been developed that fulfil all of these criteria.^[3] Among them, the *Staudinger* ligation (azide-phosphine), copper-catalyzed or strain-promoted azide-alkyne cycloadditions and tetrazine ligation approaches are the most widely utilised bioorthogonal reactions to date.^[4] While these transformations have been helpful addressing a number of fundamental biological questions,^[1b, 5] toxicity, cross-reactivity with endogenous thiols or other biomolecules, and poor stability of the reagents in biological environments, complicate their application in a number of settings.^[6] Therefore, the design of truly bioorthogonal reactions, involving stable, selective and synthetically accessible reaction partners remains an area of active investigation in chemical biology.^[3, 7]

Palladium-mediated cross-coupling reactions provide new possibilities for chemical reporter strategies.^[8] The reactive groups associated with these processes are rarely found in natural systems and cross-coupling reactions proceed with high specificity and broad functional group tolerance. However, the poor stability under aerobic conditions of most palladium(0) complexes used as catalysts, and the high temperatures required for activation, have restricted

these reactions to the conventional organic synthesis of small molecules. In the last decade, efforts to develop water- and air-stable catalytic systems active within the narrow biologically-relevant pH and temperature windows, have enabled the use of palladium reactions in biological settings.^[6d, 9] Palladium-catalyzed cross-coupling reactions involving protein substrates suffered from low yields until Davis et al. reported the 2-amino-4,6-dihydroxypyrimidine (ADHP)-based catalyst $[\text{Pd}(\text{OAc})_2(\text{ADHP})_2]$ enabling efficient *Suzuki-Miyaura* reaction of halogenated amino acids and peptides with boronic acids.^[10] This system proved its efficacy in the preparation of structurally-defined protein-conjugates with excellent conversions at chemically-installed or genetically-encoded aryl iodides on purified proteins and on the surface of bacteria.^[10-11] In parallel, the analog *N,N'*-dimethyl ADHP-palladium(II) complex was reported by Lin *et al.* to promote copper-free *Sonogashira* cross-coupling reactions on alkyne-labelled proteins inside bacterial cells.^[12]

These results propelled palladium-mediated reactions in the very demanding bioorthogonal chemistry toolbox. However, these transformations still suffer from drawbacks as the non-specific interactions of the homogenous palladium complexes with nitrogen-, sulfur-, or oxygen- containing biological building blocks may cause cytotoxicity^[12] and impose to remove the palladium catalyst after reaction using metal scavengers.^[11] The use of heterogenous palladium catalysts could overcome these problems by reducing non-specific binding to biomolecules.^[8] Palladium nanoparticles (Pd NPs) stabilised by organic polymers, or inorganic supports have already demonstrated their activity in *Suzuki-Miyaura* coupling with small molecules. In this context, they present attractive alternatives to homogenous catalysts owing to their facile separation from final products, possible reusability and cost-effectiveness as no elaborate ligand is necessary to their stabilisation.^[13] However, most reported Pd NPs-mediated reactions require the use of organic co-solvents, surfactants, strong bases and/or high temperatures, which are not compatible with biological applications.^[14] In

our continued effort to develop efficient nanotechnologies to promote biologically compatible reactions, we report here the elaboration of palladium nanoparticles (ca. 5 nm diameter) stabilized on the surface of larger poly(d,l-lactide-*co*-glycolide)-*block*-poly(ethylene glycol) copolymer nanoparticles (PLGA-PEG NPs, ca. 160 nm diameter) as catalysts for the *Suzuki-Miyaura* cross-coupling reaction between halogenated amino acids and aryl-boron reagents under physiologically-relevant conditions. The prepared palladium-PLGA-PEG (Pd-PLGA-PEG) nanoassemblies (176 nm mean diameter) were found to be good catalysts for the coupling of brominated or iodinated amino acids with aryl boronic acids in phosphate buffer. Interestingly, the coupling with a stable water-soluble cyclic triolborate was even more efficient, yielding up to 98% conversion in 2 hours at 37 °C in the presence of only 1 mol% of palladium, even at slightly acidic pH. The remarkable activity of these palladium-loaded nanoassemblies even in the absence of added base, the stability and the water-solubility of the cyclic triolborate^[15] make these reaction conditions a potential tool for the modification of biological systems through carbon-carbon bond formation.

Results and Discussion

Preparation of palladium-loaded nanoassemblies

The palladium-loaded PLGA-PEG nanoparticles were assembled according to a straightforward two-step process. Stable PLGA-PEG nanoparticles (157.9 nm $\pm$ 7.8 nm hydrodynamic diameter, as revealed by dynamic light scattering (DLS) analysis) were prepared according to the emulsion-evaporation method. These polymeric nanoparticles were then incubated with an aqueous solution of K₂PdCl₄. The mixture was stirred vigorously for 15 hours at 25 °C. The excess of palladium was then removed from the stable palladium-loaded nanoassemblies by ultracentrifugation. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) images of the Pd-PLGA-PEG nanoassemblies (Figure 1 A & B) showed palladium nanoparticles of 5.6 $\pm$ 1.2 nm diameter (Figure 1D) positioned on the surface of the

polymeric nanoparticles. Inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) quantified the presence of 4.8 atoms of palladium/polymer chain (Pd/polymer mass ratio = 0.01). DLS analysis revealed that palladium loading resulted in an increase in diameter going from $157.9 \text{ nm} \pm 7.8 \text{ nm}$ for PLGA-PEG NPs to $176.3 \pm 6.8 \text{ nm}$ for Pd-PLGA-PEG nanoassemblies. Reduction of the negative surface charge (Zeta potential) from $-14.32 \pm 0.45 \text{ mV}$ to $-7.68 \pm 5.71 \text{ mV}$ was also observed upon palladium loading (Table 1). Despite their low absolute surface charge, the Pd-PLGA-PEG nanoassemblies showed reasonable stability, with no significant aggregation at least 3 days after preparation (Figure 1C). Macroscopic aggregation was, however, observed after six days of storage.

Table 1. Physicochemical characterisation of PLGA-PEG NPs and Pd-PLGA-PEG nanoassemblies (NAs). Each value represents the average of more than six experiments $\pm$ standard deviation.

	Hydrodynamic diameter (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)
PLGA-PEG NPs	157.9 ± 7.8	0.094 ± 0.016	-14.3 ± 0.5
Pd-PLGA-PEG NPs	176.3 ± 6.8	0.113 ± 0.039	-7.7 ± 5

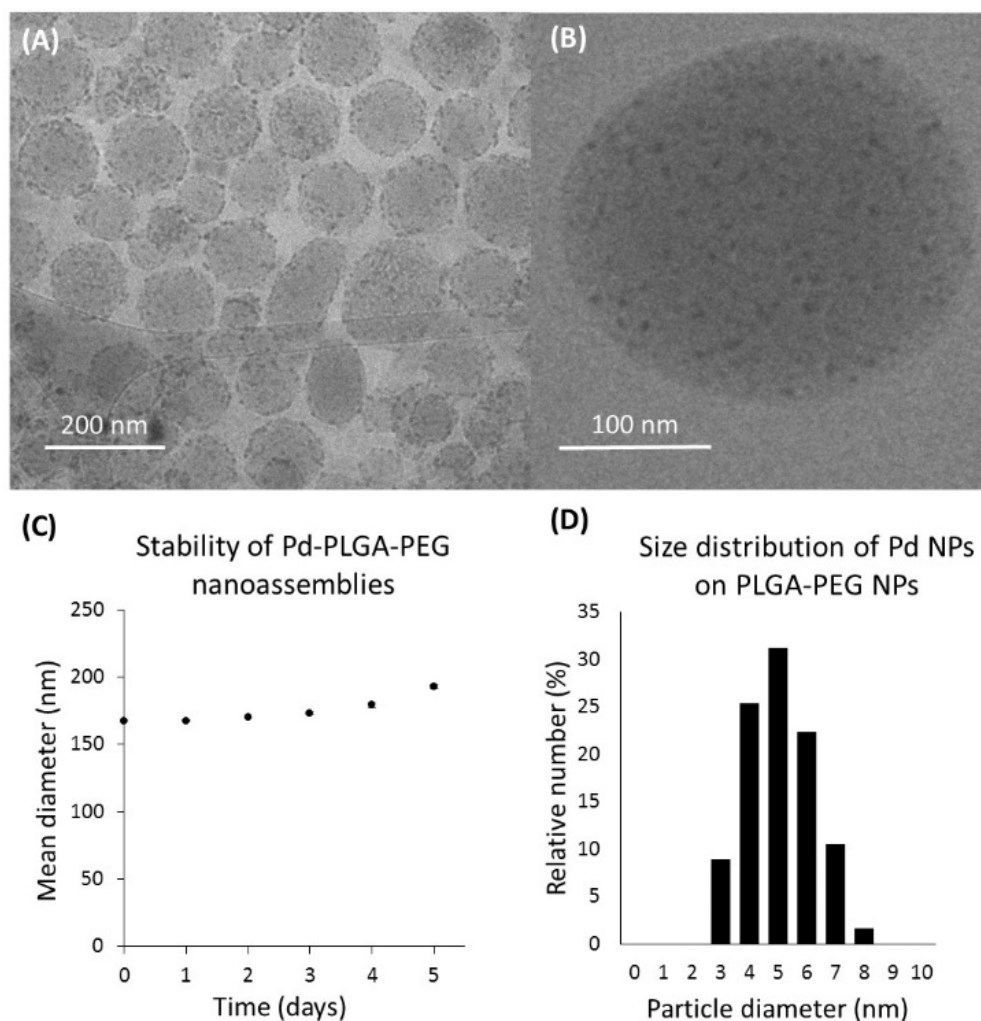


Figure 5 : Cryo-TEM images of (A) a representative sample and (B) a zoom of Pd-PLGA-PEG nanoassemblies. (C) Evolution of the mean diameter of Pd-PLGA-PEG nanoassemblies upon incubation at 25°C in water for several days after resuspension (PLGA-PEG concentration = 0.2 mg / mL), (D) Size distribution of the palladium nanoparticles on the PLGA-PEG (304 randomly chosen samples on Cryo-TEM images, mean diameter: $5.59 \text{ nm} \pm 1.17 \text{ nm}$).

Catalytic activity of Pd-PLGA-PEG nanoassemblies in Suzuki-Miyaura cross-coupling

The catalytic activity of the prepared assemblies was tested on model *Suzuki-Miyaura* reactions involving halogenated phenylalanine and tyrosine analogs in the presence of 1 mol% palladium in the form of Pd-PLGA-PEG nanoassemblies and in pH 8.0 phosphate buffer at 37 °C (Table 2). In these conditions, the reaction of *N*-Boc-4-iodo-*L*-phenylalanine

(1) with phenyl boronic acid reached 42% and 68% conversion after 2 and 18 hours respectively as determined by $^1\text{H-NMR}$ (Table 2, entry 1). Surprisingly, reaction with the 4-bromo-analog (2) showed 43% and 98% conversion efficiency after 2 and 18 hours respectively under the same conditions (Table 2, entry 2). Although aryl bromides are usually less reactive than their iodinated analogs in the *Suzuki-Miyaura* reaction,^[16] the poor solubility of *N*-Boc-4-iodo-*L*-phenylalanine in phosphate buffer might explain the reversed reactivity pattern observed here. However, coupling of the chlorinated analog (3) did not give the desired product under the mild conditions used here (Table 2, entry 3). When applied to *N*-Boc-3-iodo-*L*-tyrosine (4), our standard conditions yielded the expected coupling product in 67% and 70% conversion after 2 and 18 hours respectively (Table 2, entry 4).

Exploring the electronic effect of substituents on the phenyl boronic acid revealed that, as expected, substitution on the 3-position of the phenyl ring with an electron-withdrawing nitro group, significantly slowed down the reaction rate, probably due to a decreased nucleophilicity of the boron reagent, disfavoring the transmetallation step. In this case, no reaction was observed with *N*-Boc-4-bromo-*L*-phenylalanine (2) whereas, the coupling with *N*-Boc-4-iodo-*L*-phenylalanine (1) afforded the corresponding adduct in 35% conversion in 2 hours (Table 2, entry 5). By contrast, an electron donating methoxy group on the 4-position of the phenyl boronic acid facilitated the reaction. Thus, as expected from an increased nucleophilicity of the boron coupling partner, coupling of *N*-Boc-4-bromo-*L*-phenylalanine (2) with 4-methoxyphenylboronic acids was found more efficient than in the absence of substituent, giving 62% conversion in 2 hours (Table 2, entry 6).

Table 2 : Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions between halogenated amino acid and phenyl boronic acid derivatives catalyzed by Pd-PLGA-PEG nanoassemblies.

R1-X OH HO-B R2 Pd Pd Pd Pd				
--	--	--	--	--

1 equiv. R1-X, 3 equiv. Y-B(OH)₂, 1mol% Pd on PLGA-PEG nanoparticles. ^(a) The conversion was determined by ¹H-NMR spectroscopy on the crude reaction mixture.

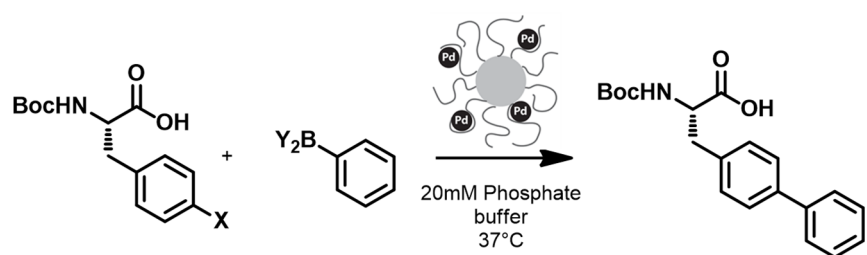
Aryl boronic acids are the most widely used coupling partners in the *Suzuki-Miyaura* cross-coupling reaction, nevertheless they can suffer from a poor stability and give side reactions such as protodeboronation, di- and trimerization leading to the formation of byproducts, reducing yields and demanding laborious purification processes.^[17] Alternative organoboron reagents, such as pinacol esters, potassium trifluoroborates, or boronates, display improved physico-chemical properties providing clear advantages over standard boronic acids under specific *Suzuki-Miyaura* coupling conditions. To investigate the effect of the boron species on the reaction outcome, different water-soluble boronic coupling partners were tested in a model system involving the halogenated *N*-Boc-*L*-phenylalanine derivatives **1-3** with phenyl-boron reagents **5-7** in the presence of 1 mol% of PLGA-PEG-supported palladium. Aryltrifluoroborate salts and the 6-methyl-**2-phenyl-1,3,6,2-dioxazaborocane-4,8-dione** (phenyl boronic MIDA esters) are known partners of the *Suzuki-Miyaura* cross-coupling reaction with the advantage to be monomeric, crystalline and air- and moisture-stable reagents.^[18] Although usually more efficient than the corresponding boronic acids in some reaction settings,^[15a] little or no reaction was observed with our system after 18 hours (Table 3, entry 1 & 2).

The air- and moisture-stable tetracoordinated boronate complex **7** was then tested. These reagents were reported as useful reaction partners in *Suzuki-Miyaura* cross-couplings as the quaternarisation of the boron center with the anionic ligand enhanced significantly the nucleophilicity of the organic groups attached, facilitating transmetallation on the metal center.^[15] As a result, such reagents have been reported to react in the *Suzuki-Miyaura* cross-coupling reaction even in the absence of added base. The phenyl cyclic triolborate derivative (**7**) was prepared from phenyl boronic acid following a reported procedure.^[15b] Interestingly, the reaction of this compound with *N*-Boc-4-iodo-*L*-phenylalanine (**1**) in the presence of the catalytic Pd-PLGA-PEG nanoassemblies led to excellent conversion in 2 hours in pH 8.0

phosphate buffer at 37°C (Table 3, entry 3). The reaction with the less reactive 4-bromophenylalanine analog (**2**) led to 90% and 98% conversion in 2 and 18 hours respectively (Table 3, entry 4). However, by analogy with the observation made with the arylboronic acids, no reaction was observed with *N*-Boc-4-chloro-*L*-phenylalanine (**3**) (Table 3, entry 5). Remarkably, although *Suzuki-Miyaura* cross-couplings with aryl boronic acids usually require the addition of an exogenous base, the reaction between *N*-Boc-4-iodo-*L*-phenylalanine (**1**) and the triolborate (**7**) catalyzed by the palladium-assemblies gave excellent conversions in 2 hours even in neutral and slightly acidic buffers (97% conversion at pH 7.0 and 6.0) (Table 3, entries 6 & 7). The remarkable activity of these palladium-loaded nanoassemblies in the absence of added bases represents a significant advantage over standard *Suzuki-Miyaura* coupling conditions for reactions involving base-sensitive reaction partners or where little control over the pH is possible.

Interestingly, the process is not limited to the micromolar scale but could be scaled to afford milligram quantities. The reaction of 33 mg of *N*-Boc-4-iodo-*L*-phenylalanine (**1**) with (**7**) in the presence of Pd-PLGA-PEG nanoassemblies (1mol% palladium) showed complete conversion after 2 hours at 37 °C in phosphate buffer. The coupled product was isolated by column chromatography in 89% yield validating the usefulness of our process for synthetic transformations of polyfunctional, water-soluble substrates under mild conditions.

Table 3 : Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions between halogenated phenylalanine and various organoboron reagents catalyzed by Pd-PLGA-PEG nanoassemblies



No	X	R2- B(OH) ₂	pH	Time (h)	Conversion (%) ^(a)
1	I		8.0	18	4
2	I		8.0	18	0
3	I		8.0	2	98
				18	100
4	Br		8.0	2	90
				18	98
5	Cl		8.0	18	0
6	I		7.0	2	97
7	I		6.0	2	97

1 equiv. R1-X, 3 equiv. Y₂B-Ph, 1 mol% Pd on PLGA-PEG nanoparticles. (a) The conversion was determined by ¹H-NMR spectroscopy on the crude reaction mixture.

Conclusion and perspectives

The Pd-PLGA-PEG nanoassemblies reported here showed excellent catalytic activities for the coupling of halogenated amino acid analogs *via Suzuki-Miyaura* reaction in water and mild conditions without the need of additional co-solvents or surfactants. Noteworthy is the remarkable efficiency of the coupling process when using cyclic triolborate reagents as boron partners. Indeed, the reaction of *N*-Boc-4-iodo-*L*-phenylalanine (**1**) with a phenyl cyclic triolborate derivative (**7**) led to 98% conversion in 2 hours in the presence of 1 mol% palladium in aqueous phosphate buffer at 37 °C, near-physiological pH and on a synthetically relevant-scale.

The *Suzuki-Miyaura* cross-coupling variant reported here work even at slightly acidic pH. This will present a significant advantage compared to the original version of the reaction in environments where the pH cannot be controlled, such as in the intracellular space. In addition, the chelating effect of the polymer chains stabilising the metal may reduce non-specific interactions with surrounding biomolecules, and thus minimize toxicity as compared to small-molecule-stabilized homogenous catalysts. In this context, we believe that the present approach will contribute to the design of a catalytic system able to selectively achieve an irreversible carbon-carbon bond formation in complex biological systems.

Material and Methods

Material

Unless otherwise stated, all reagents and solvents were purchased from Sigma-Aldrich. Potassium tetrachloropalladate (II) (K_2PdCl_4) 99.99% trace metal basis (Sigma-Aldrich, Lot N° MKBL2083V) was used as a palladium source.

N-Boc-4-iodo-*L*-phenylalanine, *N*-Boc-4-bromo-*L*-phenylalanine and *N*-Boc-4-chloro-*L*-phenylalanine were purchased from Alfa Aesar. *N*-Boc-3-iodo-*L*-tyrosine was prepared as

reported elsewhere.^[19] PLGA-PEG (poly(ethylene glycol)-poly(DL-lactide-co-glycolide) 50:50 Resomer® PEG type RGP d 50105 (MW 50000 g/mol) (diblock, 10% PEG with 5000 Dalton, Evonik Industries AG, Essen, Germany) was generously donated by the group of Prof. Elias Fattal, Université Paris-Saclay. Deionized MilliQ purified water was used for all chemical reactions and for nanoparticles synthesis. Proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectra were recorded on a Bruker AV500 (500 MHz) or Bruker AV400 (400 MHz). All chemical shifts are quoted on the δ scale in ppm using residual solvent as the internal standard. Ultracentrifugation was achieved using Optima LE-80K Ultracentrifuge Beckman Coulter apparatus.

PLGA-PEG Nanoparticles (PLGA-PEG NPs) preparation

Plain PLGA-PEG nanoparticles were prepared by emulsion-evaporation. Practically, PLGA-PEG (50 mg) was dissolved into CH₂Cl₂ (4 mL). The organic phase was emulsified into 10 mL of 1.5% sodium cholate (w/v) aqueous solution using a vortex for 1 min and then a vibrating metallic tip at 180V, at 30% amplitude for 1 min at 0 °C. The organic solvent was evaporated by magnetic stirring for 4 h. The nanoparticles were recovered by ultracentrifugation (1 h, 27 440 g, 4 °C) and the pellet was resuspended in MilliQ water to form a stock suspension of 5 mg PLGA-PEG / mL.

Pd loading on PLGA-PEG nanoparticles (Pd-PLGA-PEG NPs)

PLGA-PEG NPs stock suspension (200 μ L, 1 mg PLGA-PEG, 0.02 μ mol) was diluted with 990 μ L MilliQ water. K₂PdCl₄ stock solution (10 μ L, 100 mM, 1 μ mol) was added and the mixture was briefly vortexed and then incubated on at thermostated shaker (bioSan TS-100) at 25 °C and 800 rpm for 15 hours. The resulting nanoassemblies were recovered by

ultracentrifugation (1 h, 24 696 g, 4 °C), the supernatant was removed and the pellet was resuspended in 450 µL MilliQ water.

Size and zeta potential

The hydrodynamic diameter (dH) and polydispersity index (PDI) of the PLGA-PEG NPs and Pd-PLGA-PEG nanoassemblies, were measured by quasi elastic light scattering, using a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern, France). Suspensions were diluted in water and filtered over a 1 µm pores glass filter. Measurements were performed in triplicate at 20 °C, at an angle of 173° to avoid multiple scattering. The counting time was set at 60 s. Zeta potential measurements were carried out with the same instrument, at 25 °C, in 1 mM NaCl. The average palladium nanoparticles size and size distribution on the surface of the PLGA-PEG NPs were obtained from randomly chosen particles on Cryo-TEM images using imageJ software.

Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM)

For cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) analysis, 5 µL of nanoassemblies suspension at 5mg/mL were deposited onto a Lacey Formvar/carbon 300 Mesh Copper grid (Ted Pella). Most of the drop was removed with a blotting filter paper and the residual thin film remaining was vitrified by plunging into a bath of liquid ethane slush. The grids were stored under liquid nitrogen temperature until transfer to a 626 Single Tilt Cryotransfer System (Gatan Inc.) and observed with a JEOL 2100HC microscope operated at 200KV (JEOL Europe SAS). Images were recorded under low dose conditions on a Gatan Ultrascan 4k x 4k Digital (CCD) Camera System Camera at a nominal magnification of 80 x at a defocus level of 2 µm.

Determination of Pd encapsulation efficacy by ICP-MS

The association of Pd to PLGA-PEG nanoparticles (ie., encapsulation efficacy) was determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) by Antellis (Parc technologique du Canal, 3 rue des satellites, 31400 Toulouse).

Potassium 4-methyl-1-phenyl-2,6,7-trioxa-1-borate-bicyclo[2.2.2]octane (7)

A mixture of phenylboronic acid (1 mmol, 121.9 mg, 1 equiv.) and 1,1,1-tris(hydroxymethyl)ethane (1 mmol, 120.1 mg, 1 equiv.) in toluene (2 mL) was heated under reflux with azeotropic distillation using a Dean-Stark apparatus for 4 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the residue taken up into toluene (2 mL) and solid KOH (0.9 mmol, 50.4 mg, 0.9 equiv.) was added. The reaction mixture was heated at reflux with removal of the water by Dean-Stark method for 4 hours. The solid that precipitated was filtered, washed with acetone and dried under reduced pressure to afford the expected salt (**7**) (219.6 mg, 90 % yield). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.30 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.92 (m, 3H), 3.56 (s, 6H), 0.47 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 132.61, 125.86, 124.31, 74.19, 16.76, (C-B signal was not detected).

General method for Suzuki–Miyaura coupling on small scale

In an eppendorf tube, the arylhalide (0.008 mmol, 1 equiv.) and the boronic acid (0.024 mmol, 3 equiv.) were suspended in phosphate buffer pH 8.0 (200 mM, 50 μL). The suspension of Pd-PLGA-PEG nanoassemblies (0.00008 mmol, 0.01 equiv., 450 μL) was added and the reaction was mixed and shaken on a thermostated shaker (bioSan TS-100) at 800rpm at 37 °C. After 2/18h, reaction was frozen in liquid nitrogen and the solution lyophilised. The crude product was dissolved in MeOD and analysed by ¹H-NMR.

*Synthesis of N-Boc-4-phenyl-L-phenylalanine via Suzuki-Miyaura coupling involving cyclic triolborate **7***

The *N*-Boc-4-iodo-*L*-phenylalanine (0.08 mmol, 31.3 mg, 1 equiv.) and the potassium 4-methyl-1-phenyl-2,6,7-trioxa-1-borate-bicyclo[2.2.2]octane (**7**) (0.240 mmol, 58.5 mg, 3 equiv.) were dissolved in phosphate buffer (200 mM, 500 μ L). Then Pd-PLGA-PEG nanoassemblies (0.0008 mmol Pd, 0.01 equiv., 4500 μ L) were added and the reaction was stirred at 37 °C. After 2 hours, the solution was acidified with a citric acid solution 10% (5 mL). The aqueous solution was extracted with EtOAc (5 x 5 mL). The combined organic layers were then washed with brine (10 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by chromatography on silica gel column (100/0 to 95/5 DCM/MeOH) to provide the expected *N*-Boc-4-phenyl-*L*-phenylalanine (22.1 mg, 89%). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 7.47 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.30 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.20 (d, *J* = 7.4 Hz, 3H), 4.21 (m, 1H), 3.11 (dd, *J* = 13.6, 4.8 Hz, 1H), 2.86 (dd, *J* = 13.6, 8.0 Hz, 1H), 1.24 (s, 9H). MS (ESI+) *m/z* (%): 364.1 (100%) [M+Na]⁺.

Acknowledgements

This work is supported by a public grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the “Investissements d’Avenir” program (Labex NanoSaclay, reference: ANR-10-LABX-0035). We thank Dr. Jean-François Gallard (Institut de Chimie des Substances Naturelles CNRS-ICSN UPR 2301, Université Paris-Sud) and Camille Dejean (BioCIS (UMR-CNRS-8076)) for technical assistance on NMR measurements ; The Service d'Analyse des Médicaments et Métabolites (SAMM) and Stéphanie Nicolaÿ for technical assistance on mass spectrometry measurements ; Ghislaine Frébourg (Service de Microscopie Electronique de l'IFR de Biologie Intégrative, la FRM 2006, SESAME 2005 et le CNRS-INSB) and Julie Mougin (Insitut Galien, UMR CNRS 8612, Université Paris-Sud) for technical assistance on Cryo-TEM measurements. AD thanks the Swiss National Science Foundation for funding.

References

- [1] a) J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13; b) M. Grammel, H. C. Hang, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 475.
- [2] a) E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Edit* **2009**, *48*, 6974; b) K. Lang, J. W. Chin, *Acs Chem. Biol.* **2014**, *9*, 16.
- [3] M. King, A. Wagner, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 825.
- [4] a) E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Accounts Chem. Res.* **2011**, *44*, 666; b) A. C. Knall, C. Slugovc, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5131.
- [5] a) L. I. Willems, W. A. Van der Linden, N. Li, K. Y. Li, N. Liu, S. Hoogendoorn, G. A. Van der Marel, B. I. Florea, H. S. Overkleeft, *Accounts Chem. Res.* **2011**, *44*, 718; b) Z. Q. Li, D. Y. Wang, L. Li, S. J. Pan, Z. K. Na, C. Y. J. Tan, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 9990; c) J. Li, S. Jia, P. R. Chen, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 1003.
- [6] a) R. Ekkebus, S. I. van Kasteren, Y. Kulathu, A. Scholten, I. Berlin, P. P. Geurink, A. de Jong, S. Goerdayal, J. Neefjes, A. J. R. Heck, D. Komander, H. Ovaa, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2867; b) M. F. Debets, S. S. Van Berkel, J. Dommerholt, A. J. Dirks, F. P. J. T. Rutjes, F. L. Van Delft, *Accounts Chem. Res.* **2011**, *44*, 805; c) M. T. Taylor, M. L. Blackman, O. Dmitrenko, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9646; d) J. Li, P. R. Chen, *ChemBiochem* **2012**, *13*, 1728; e) H. E. Murrey, J. C. Judkins, C. W. A. Ende, T. E. Ballard, Y. Z. Fang, K. Riccardi, L. Di, E. R. Guilmette, J. W. Schwartz, J. M. Fox, D. S. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11461.
- [7] H. W. Shih, D. N. Kamber, J. A. Prescher, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 103.
- [8] S. V. Chankeshwara, E. Indrigo, M. Bradley, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 128.

- [9] a) R. M. Yusop, A. Unciti-Broceta, E. M. V. Johansson, R. M. Sanchez-Martin, M. Bradley, *Nat. Chem.* **2011**, 3, 239; b) K. Kodama, S. Fukuzawa, H. Nakayama, K. Sakamoto, T. Kigawa, T. Yabuki, N. Matsuda, M. Shirouzu, K. Takio, S. Yokoyama, K. Tachibana, *Chembiochem* **2007**, 8, 232.
- [10] J. M. Chalker, C. S. C. Wood, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 16346.
- [11] C. D. Spicer, B. G. Davis, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 1698.
- [12] N. Li, R. K. V. Lim, S. Edwardraja, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 15316.
- [13] a) M. Pérez-Lorenzo, *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, 3, 167; b) P. Taladriz-Blanco, P. Herves, J. Perez-Juste, *Top. Catal.* **2013**, 56, 1154.
- [14] a) B. J. Gallon, R. W. Kojima, R. B. Kaner, P. L. Diaconescu, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2007**, 46, 7251; b) S. W. Kim, M. Kim, W. Y. Lee, T. Hyeon, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 7642; c) Y. Li, X. M. Hong, D. M. Collard, M. A. El-Sayed, *Org. Lett.* **2000**, 2, 2385; d) C. Liu, Q. J. Ni, P. P. Hu, J. S. Qiu, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 1054; e) Y. Z. Piao, Y. J. Jang, M. Shokouhimehr, I. S. Lee, T. Hyeon, *Small* **2007**, 3, 255; f) A. Prastaro, P. Ceci, E. Chiancone, A. Boffi, R. Cirilli, M. Colone, G. Fabrizi, A. Stringaro, S. Cacchi, *Green Chem.* **2009**, 11, 1929; g) H. Veisi, A. R. Faraji, S. Hemmati, A. Gil, *Appl. Organomet. Chem.* **2015**, 29, 517.
- [15] a) A. J. J. Lennox, G. C. Lloyd-Jones, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 412; b) Y. Yamamoto, M. Takizawa, X. Q. Yu, N. Miyaura, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2008**, 47, 928.
- [16] J. K. Stille, K. S. Y. Lau, *Acc. Chem. Res.* **1977**, 10, 434.
- [17] D. G. Hall, in *Boronic Acids*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2006**, pp. 1-99.

- [18] a) D. M. Knapp, E. P. Gillis, M. D. Burke, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6961; b) G. A. Molander, B. Canturk, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2009**, *48*, 9240.
- [19] A. Dumas, C. D. Spicer, Z. H. Gao, T. Takehana, Y. Y. A. Lin, T. Yasukohchi, B. G. Davis, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2013**, *52*, 3916.

3. Conclusion

En conclusion, nous avons préparé différentes formulations de nanoparticules de palladium, stabilisées par un polymère (Pluronic F68 et F127) ou par un polysaccharide (Dextran 6000/40000 en présence ou non de citrate). Dans chacun des cas, le rayon hydrodynamique varie en fonction de support : 30-40 nm pour les nanoparticules de Pluronic-Pd, 90-120 nm pour de Dextran-Pd. L'ajout de citrate lors de la préparation des nanoparticules de dextran permet d'obtenir des nanoparticules de rayon hydrodynamique plus petit autour de 10 nm mais n'améliore pas l'activité catalytique qui reste voisine de 50%. Cette faible activité peut s'expliquer par la précipitation rapide des nanoparticules lors de la réaction entraînant une diminution de la surface permettant la catalyse. Ces formulations n'ont donc pas été retenues pour la suite du travail.

En ce qui concerne les nanoparticules de PLGA-PEG-Pd une formulation satisfaisante a été mise au point. Une bonne stabilité combinée à une activité catalytique remarquable nous a conduit à retenir cette formulation en combinaison avec les sels de triol borates cycliques qui sont les partenaires organoborés de choix pour effectuer cette transformation. Néanmoins, il est apparu ultérieurement que la stabilité de ces formulations au-delà de quelques jours était dépendante de l'origine du palladium. En dépit de nos efforts pour identifier la source du problème en changeant de fournisseur, de réducteur, en étudiant le pH etc... nous ne sommes pas parvenus à éliminer totalement ce problème. L'utilisation d'une formulation devant être systématiquement préparée fraîchement avant chaque expérience constituait un obstacle logistique considérable pour la suite du projet. C'est pourquoi, nous avons par la suite délaissé les nanoparticules de PLGA-PEG-Pd au profit des oursins de palladium nanoparticulaires préparés par radiolyse développés par le Dr. Hind Rémita au sein du Laboratoire de Chimie Physique de l'Université Paris-Sud qui nous assuraient une garantie d'uniformité et de stabilité à long terme.

Chapitre 3 : Modification sélective d'une protéine naturelle catalysée par des nanoparticules de palladium dans un broyat d'organe

Dans ce chapitre nous montrons qu'il est possible de coupler de manière covalente la thyroglobuline à une sonde exogène par une réaction de Suzuki-Miyaura catalysée par des nanoparticules de palladium dans un milieu biologique complexe constitué d'un broyat d'organe. Ce travail est présenté sous forme de manuscrit à la fin du Chapitre. Au préalable, nous commencerons par une brève présentation de la thyroglobuline, de son rôle physiologique et de son implication dans les maladies thyroïdiennes. Nous décrirons plus en détail la façon dont cette unique protéine halogénée de l'organisme est iodée *in vivo*. Nous poursuivrons en exposant les travaux réalisés pour établir un modèle cellulaire permettant l'expression de protéines iodées. Ensuite, nous décrirons la synthèse d'un acide arylboronique couplé à la rhodamine constituant une sonde fluorescente permettant la détection de la formation d'une liaison covalente C-C avec une protéine.

1. La thyroglobuline

La thyroglobuline est une glycoprotéine de 660 kDa qui existe principalement sous la forme d'un homodimère de deux sous-unités de 330 kDa. Cette protéine est synthétisée dans la thyroïde dans le réticulum endoplasmique des thyrocytes par les ribosomes avant d'être glycosylée dans l'appareil de Golgi et transférée hors des cellules vers le lumen des follicules. Les follicules thyroïdiens sont des formations sphériques comprenant une paroi, constituée par un épithélium simple reposant sur une lame basale et comportant divers types de cellules dont les cellules folliculaires (thyrocyte) et un contenu amorphe, pâteux et jaunâtre : la colloïde (Figure 1A). C'est précisément dans la colloïde que l'iode est fixé sur la thyroglobuline par iodation des thyrosines sous l'action de plusieurs protéines dont le Symport sodium/iode (NIS) qui apportent les ions iodure, la Dual oxydase2 (DUOX2) et son facteur de maturation (DUAXOA2) qui permettent la production d'eau oxygénée, et la thyropéroxydase TPO, une peroxydase héminique, catalysant l'oxydation des ions iodure en complexe hypoiodite du fer [TPO-Fe(III)OI] qui serait l'espèce iodante du processus.^[1] Les thyrosines de la thyroglobuline peuvent être mono iodées (MIT) ou diiodées (DIT). Un

couplage oxydant entre les résidus iodés (MIT et DIT) catalysé également par la TPO conduit aux précurseurs des hormones 3,5,3',5'-tétraiodothyronine (T4) et 3,5,3'-triiodothyronine (T3). La thyroglobuline iodée est alors endocytée dans les thyrocytes et soit digérée dans les lysosomes pour produire les hormones T3 et T4, soit stockée et dé-iodée par l'iodothyrosine désiodase DEHAL1 pour apporter une source diode.^[2]

Dans certains cas, ce système de production des hormones thyroïdiennes peut être dérégulé. C'est le cas dans la maladie de Basedow, une maladie auto-immune qui entraîne la production d'anticorps anormaux dirigés contre les thyrocytes qui stimulent continuellement la production d'hormones thyroïdiennes, reproduisant les effets de la thyroïdostimuline (Stimulating Thyroid hormone, TSH). Cette dérégulation du système de production provoque une hyperthyroïdie entraînant des symptômes variés comme l'accélération du métabolisme, une perte de poids, une diaphorèse, une irrégularité du rythme cardiaque, une augmentation de la nervosité. Il existe deux traitements à cette maladie : l'utilisation de médicaments antithyroïdiens qui vont bloquer la production d'hormones ou l'ablation partielle ou totale de la thyroïde. Cette opération entraîne pour le patient l'obligation de prendre un traitement de substitution comme le Lévothyrox® avec toutefois certains effets secondaires possibles. Trouver de nouvelles méthodes pour modifier et contrôler la production d'hormones représente donc un enjeu thérapeutique.

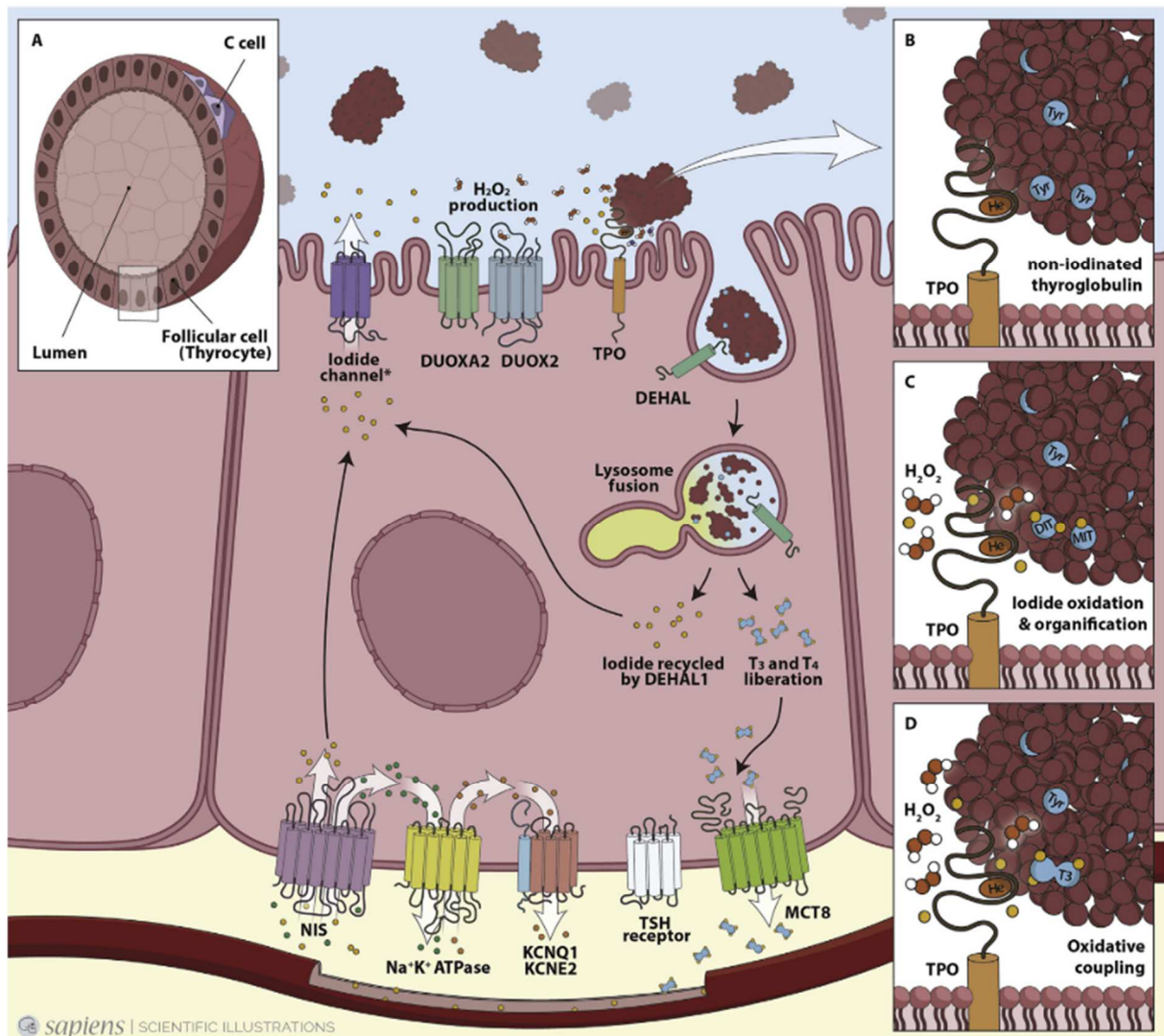


Figure 1. Représentation schématique de la biosynthèse et de la libération d'hormones thyroïdiennes. **A-** Structure tridimensionnelle des follicules thyroïdiens entourée de cellules thyroïdiennes épithéliales folliculaires. Les protéines impliquées dans la biosynthèse et la libération des hormones thyroïdiennes sont représentées. NIS: symporteur sodium / iodure; KCNQ1 et KCNE2: canaux Kp voltage-dépendants; TSHR: récepteur de la thyrotropine; MCT8: transporteur de monocarboxylate 8, transporteur d'hormones thyroïdiennes; DUOX2: double oxydase 2; DUOXA2: facteur de maturation de la double oxydase 2; TPO: thyroperoxydase; DEHAL: iodotyrosine déshalogénase. **B** reconnaissance du groupe hémique par la TPO, **C-** L'oxydation de l'iodure et son incorporation dans la thyroglobuline (organification). **D-** Le couplage oxydant des iodotyrosines, MIT et DIT, dépend de la présence de TPO et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et conduit à la formation des précurseurs T3 et T4. (Avec la permission de la Ref. 2)

2. Recherche d'un système biologique exprimant une protéine iodée.

a. Expression de la thyroglobuline iodée dans les thyrocytes de rat

Pour démontrer la possibilité de modifier la thyroglobuline par une réaction pallado-catalysée en milieu biologique, la première stratégie envisagée a été d'effectuer un couplage de Suzuki à l'intérieur de thyrocytes. Deux lignées cellulaires de thyrocytes de Rat, les FRTL-5 et les FRTL ont été retenues. Ces lignées commerciales sont réputées exprimer naturellement la thyroglobuline iodée et sont utilisées comme modèle d'étude de la thyroïde.^[3] Malheureusement, l'analyse protéomique de la thyroglobuline isolée par gel d'électrophorèse a montré qu'en aucun cas la protéine n'était iodée et ce, quelles que soient les conditions de culture incluant l'ajout de NaI, d'eau oxygénée, de TSH ou encore de transferrine. (Cf: Chapitre 3.7. *Supplementary informations* du manuscrit). Si la perte des caractères spécifiques des thyrocytes lors des cultures *in vitro* est un phénomène connu, ce problème remettait en cause notre stratégie.^[4]

b. Utilisation de cellules thyroïdiennes transfectées

La seconde solution étudiée pour obtenir des cellules exprimant une protéine iodée a été d'utiliser des cellules transfectées. Mais de quels gènes doivent-elles être dotées pour obtenir l'organification de l'iode? Wenzel et coll. ont montré en utilisant de l'iodure de sodium radioactif Na^{[125]I} que l'organification de la thyroglobuline dans des cellules cancéreuses thyroïdiennes exprimant la TPO et le NIS n'augmente pas en fonction de l'accumulation d'iode.^[5] Ces résultats ont été mis en évidence grâce à la transfection des gènes pIRES-NIS et pIRES-TPO dans des lignées de carcinome papillaire de la thyroïde, B-CPAP et BHT-101. Il en est de même dans les cellules embryonnaires de rein humain HEK-293.

Il a également été montré, en utilisant des inhibiteurs spécifiques, que l'organification est strictement dépendante de la TPO et non du NIS. De plus, les auteurs ont mis en évidence la formation d'un grand nombre de protéines iodées entre 30 et 250 kDa démontrant l'absence

de spécificité de la TPO. Il est donc permis d'envisager d'utiliser cette enzyme pour ioder à volonté des protéines plus simples comme l'albumine bovine (BSA) par exemple qui est un standard en analyse protéomique.^[5] En 2015, Carré et Coll. ont transfecté les gènes d'expression des protéines DUOX2 et DUOXA2 natives et mutantes dans des cellules HEK et ont dosé la production d'eau oxygénée. Ces résultats démontrent qu'il est donc possible de transfecter les deux protéines qui permettent l'organification de l'iode.^[6]

Mais est-il possible de produire une protéine iodée dans des cellules transfectées par les gènes d'expression de la TPO, du NIS et des DUOXA2 et DUOX2 ? En collaboration avec le Dr. Corine Dupuy à Institut de Cancérologie Gustave Roussy de Villejuif. (UMR 8200 CNRS) cette expérience a été tentée dans des cellules HEK. Ces cellules ont été transfectées avec les différents plasmides contenant les gènes codant pour les protéines intervenant dans l'organification. Une fois la lignée établie, la production d'eau oxygénée a été mesurée en utilisant l'Amplex® Red. Ce réactif (10-acétyl-3,7-dihydroxyphénoxazine) est oxydé en résorufine fluorescente par l'eau oxygénée. L'apparition de la fluorescence traduit donc une activité peroxydase (Schéma 1).

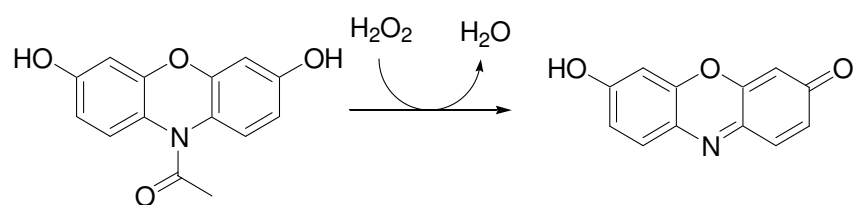


Schéma 2 Conversion de l'Amplex red en résorufine fluorescente sous l'action d' H_2O_2 et d'une peroxydase

L'activité peroxydase des enzymes transfectées séparément ou ensemble, mesurée par fluorescence est présentée dans la Figure 2. Les cellules transfectées par la TPO, la TPO + DUOX2 présentent un niveau de fluorescence ne dépassant pas le niveau basal. En revanche, la transfection du cocktail TPO + DUOXA2 et DUOX2 est beaucoup plus actif. L'ajout de NIS n'a pas d'influence.

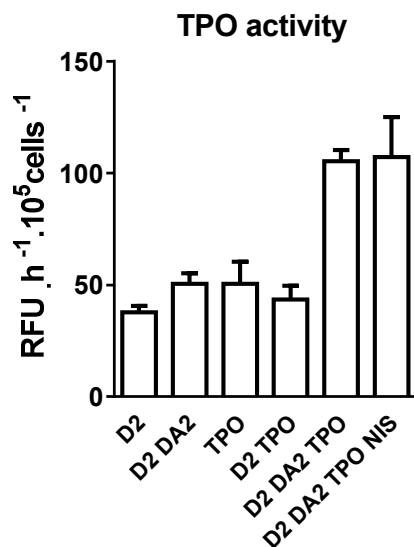


Figure 6 Mesure de l'activité de la thyroperoxydase et de la production d' H_2O_2 dans les cellules HEK transfectées.

Ayant établi un système contenant l'ensemble des éléments nécessaires pour l'iodation d'une protéine, l'albumine bovine a été sélectionnée comme modèle, car c'est une protéine commerciale, bon marché et utilisée comme standard en analyse de protéomique et qui possède 21 tyrosines pouvant être iodées. La BSA et du NaI ont donc été ajoutés au milieu de culture des cellules transfectées. Après incubation, la BSA a été séparée par gel d'électrophorèse, avant d'être digérée et analysée en protéomique par MS/MS pour déterminer le nombre de peptides iodés. Les détails expérimentaux de cette analyse sont décrits dans le manuscrit soumis à publication et dans les *Suppl. Informations* de cet article au Chapitre 7.3. Malheureusement, aucun peptide iodé n'a été détecté. Ce résultat décevant semble indiquer que la présence d'eau oxygénée et d'ions iodure ne suffit pas à l'iodation d'une protéine et que des éléments non encore identifiés doivent participer à la réaction. En l'absence d'autres pistes, cette voie a été abandonnée au profit d'une tentative d'utiliser la machinerie cellulaire des thyrocytes primaires humains pour ioder une protéine.

c. Tentatives d'iodation de la BSA dans une culture primaire de thyrocytes humains

La troisième voie que nous avons explorée a consisté en l'utilisation de thyrocytes humains pour ioder une protéine exogène. L'hypothèse était que ces cellules issues de tissu de patient possèdent à leur surface l'ensemble des éléments permettant l'iodation. En complétant le milieu de culture avec de la BSA, de l'iodure de sodium et de l'eau oxygénée, les cellules seraient capables d'ioder la protéine. Des thyrocytes ont donc été isolés à partir d'exérèses chirurgicales de patient souffrant de Maladie de Basedow. Ces pièces nous ont été fournies par le Dr Benoit Lamber et le Dr Jacques Young à l'Hôpital Bicêtre. La mise en culture des thyrocytes primaires à partir de l'organe est décrite dans le Chapitre 3.7. (*Supplementary Informations* du manuscrit). Après isolement, la BSA a été étudiée en protéomique. Malheureusement, aucune iodation des thyrosines de la BSA n'a été détectée par protéomique. L'organisation folliculaire pourrait être nécessaire pour maintenir une concentration d' H_2O_2 constante et non toxique pour les cellules, permettant aux diverses enzymes de jouer leur rôle. Une autre hypothèse serait que les cellules hors de l'organe perdent rapidement leur capacité d'iodation

d. Réaction de Suzuki-Miyaura dans un broyat de thyroïde.

Devant ces difficultés, nous avons décidé de tenter la réaction de Suzuki sur la thyroglobuline iodée au sein d'un broyat d'organe provenant d'une thyroïdectomie, mimant le milieu biologique. Cette étude est décrite en détail dans le manuscrit au Chapitre 3.7.

3. Développement des outils d'analyse de la thyroglobuline

La détection d'une éventuelle liaison covalente au sein d'une aussi grosse protéine est un défi analytique majeur. Les analyses précédemment décrites reposaient sur l'analyse par spectrométrie de masse de la protéine préalablement purifiée par électrophorèse. Les données de fragmentation sont ensuite analysées par des outils informatiques de protéomique. Cette analyse est extrêmement lourde, chère, et soumise à des délais d'accès aux appareils et aux

aléas techniques. Il nous fallait un moyen plus simple et peu coûteux d'analyser les résultats d'un essai de couplage permettant en outre d'évaluer rapidement les effets d'un changement des paramètres réactionnels. Nous avons développé deux sondes à cet effet : une sonde biotinylée permettant la détection par Western-blot (La synthèse et l'utilisation de cette sonde constituent le cœur du manuscrit soumis à publication, voir chapitre 3.7) et une sonde fluorescente basée sur un fluorophore rhodamine. Pour chacune de ces deux sondes, nous avons couplé une tête réactive de type aryltriolboronate cyclique puisque nous avons vu au Chapitre 2 que c'était ce dérivé du bore qui était le plus réactif avec les nanoparticules de Pd dans l'eau.

a. Synthèse d'une sonde rhodamine-triol boronate

Comme fluorophore, la rhodamine B a été sélectionnée en raison de sa très forte fluorescence, permettant une grande sensibilité, de son faible coût et de la possibilité de la fonctionnaliser aisément.^[7] La stratégie choisie consistait à coupler la pipérazine rhodamine **3**, avec l'ester pinacolique de l'acide 4-(carboxyméthylphényl)boronique (**2**) disponible dans le commerce. Le pinacol devait ensuite être transformé en triol boronate cyclique par traitement avec le triol. La pipérazine rhodamine **3** décrite dans la Littérature s'obtient facilement par ouverture du cycle lactone de la rhodamine B base (**4**) par l'amidure de diméthylaluminium de la pipérazine (Schéma 2).^[8]

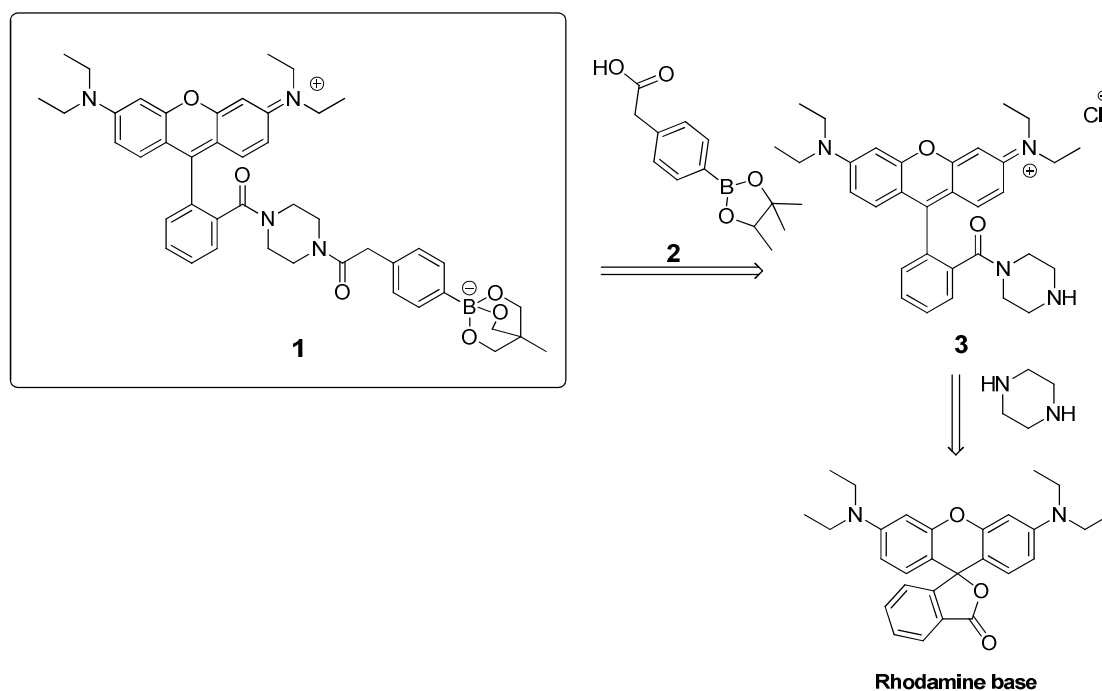


Schéma 3 Stratégie de synthèse de la sonde Rhodamine B triolboronate cyclique

La synthèse de la rhodamine pipérazine a été décrite par Nguyen et coll. L'emploi de la pipérazine conduit la formation d'un amide tertiaire ce qui évite la recyclisation en lactame observée avec les amines primaires par attaque de l'azote du groupement amide sur le carbone C-9',^[8] Cette réaction nous a conduit à l'amide **3** attendu avec un rendement de 72%. La seconde étape est un couplage amide entre la rhodamine-pipérazine **3** et l'acide **2** portant le boronate, en présence de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et de diméthylaminopyridine. Toutefois, après purification, seul 20% de l'ester de pinacol désiré ont été isolés, le produit majoritaire étant l'acide boronique correspondant, formé par hydrolyse sur la silice lors de la chromatographie (Schéma 3). L'ester de bore n'étant pas nécessaire pour la suite, il nous a semblé plus judicieux de l'hydrolyser avant purification. Malheureusement, en milieu homogène, cette transformation s'est avérée plus difficile que prévue. L'hydrolyse directe, ou la coupure oxydante par NaIO_4 ^[9] ont donné des mélanges complexes. Finalement, le résultat le plus satisfaisant a été obtenu par transborylation par le trichlorure de bore dans un mélange méthanol/eau.^[10]

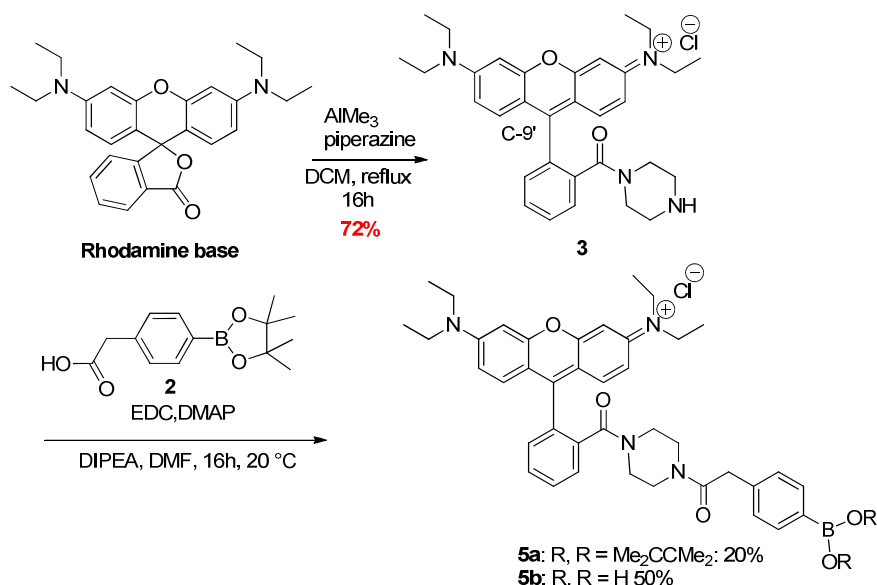


Schéma 3. Couplage amide entre la rhodamine pipérazine et l'ester pinacolique de l'acide 4-(carboxyméthylphényl)boronique

Dans ces conditions l'acide boronique **5b** est obtenu après purification par chromatographie sur colonne de silice avec un rendement de 70%. La synthèse du triolboronate donnant accès à la sonde fluorescente **1** a été réalisé dans un premier temps selon la méthode de Yamamoto qui consiste à estérifier l'acide boronique par le triol (2-(hydroxyméthyl)-2-méthylpropane-1,3-diol) par simple chauffage dans le toluène puis à cycliser l'ester de bore en présence de potasse, toujours au reflux du toluène avec élimination azeotropique de l'eau.^[11] Dans le cas de l'acide **5b**, la faible solubilité de la rhodamine, nous a contraints à ajouter du diméthylformamide comme co-solvant. Le chauffage avec de la potasse en milieu polaire a provoqué la coupure de la liaison amide avec la pipérazine redonnant la rhodamine B (**6**). Pour contourner ce problème, nous avons adapté les conditions décrites par Yamamoto, N. Miyaura.^[12] permettant la conversion en une seule étape par transestérification dans le dioxane d'un ester pinacolique d'acide arylboronique en triolboronate cyclique. Nous avons décidé d'appliquer cette méthode non pas avec un boronate mais directement sur l'acide boronique. Cette méthode compatible avec l'ajout de DMF, a permis d'isoler par précipitation la sonde rhodamine **1** avec un rendement de 56% (Schéma 4).

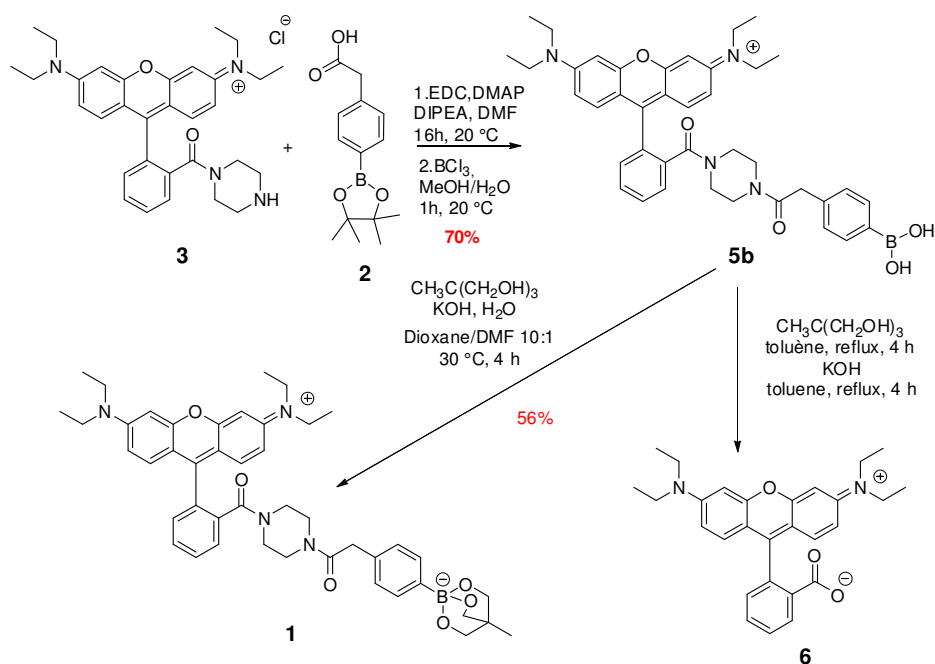


Schéma 4 : Synthèse de la sonde rhodamine triol boronate cyclique

b. Réaction de couplage entre la thyroglobuline bovine et la sonde fluorescente

Une fois la sonde rhodamine synthétisée, elle a été engagée dans un couplage croisé avec thyroglobuline bovine (iodée) catalysé par les nano-oursins de palladium développés par le Dr. Hind Remita du Laboratoire de Chimie Physique, UMR 8000 à Université Paris-Sud (voir infra Chapitre 3.7). L'analyse par fluorescence après séparation de la thyroglobuline sur gel d'électrophorèse montrent que la rhodamine se fixe de façon non sélective à TG (Figure 3).

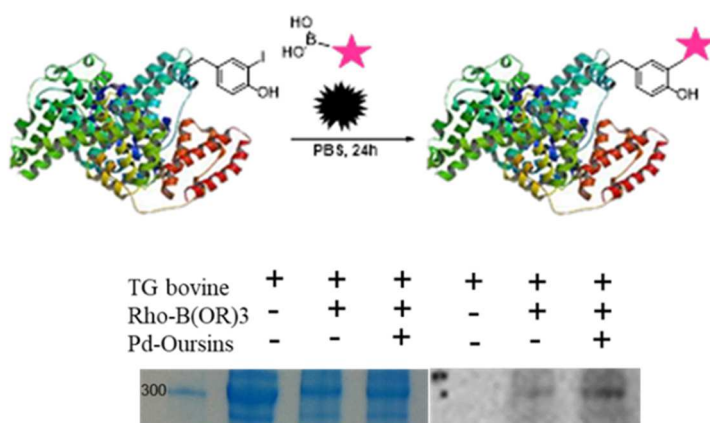


Figure 7 . Réaction de couplage entre la thyroglobuline bovine et la sonde fluorescente catalysée par les oursins de palladium. Gel SDS-Page révélé au bleu de coomassie et image de fluorescence obtenue sur Chemibis (led 525 nm, filtre 580nm) de la thyroglobuline.

Ainsi, cette tentative d'utiliser une sonde fluorescente pour détecter un éventuel couplage covalent avec une protéine s'est vue compromise par la fixation non spécifique de la rhodamine à la protéine, probablement via une simple interaction électrostatique. En conséquence, la mise en évidence du couplage dans la suite du travail reposera essentiellement sur la sonde biotinylée détectable par Western- blot, une technique beaucoup plus lourde mais hautement spécifique.

4. Conclusion

Malgré les efforts déployés pour obtenir un modèle cellulaire permettant l'expression d'une protéine iodée, aucune des stratégies envisagées n'a été couronnée de succès. L'expression de la thyroglobuline iodée dans les thyrocytes de Rat n'a pas pu être reproduite. La transfection de cellules embryonnaires de rein humain ou l'utilisation de thyrocytes humains issus de patients atteints de la maladie de Basedow, n'ont pas permis d'ioder la BSA. La dernière stratégie envisagée pour démontrer la faisabilité du couplage de Suzuki-Miyaura, catalysé par les nanoparticules de palladium, a été d'utiliser un broyat de thyroïde humaine. La thyroïde étant connue pour contenir une grande quantité de Tg iodée, l'utilisation d'un homogénat d'organe devait permettre d'obtenir un modèle de milieu biologique humain contenant une protéine iodée. Les résultats de cette étude font l'objet du manuscrit soumis à publication qui suit.

5. References

- [1] D. Manna, G. Roy, G. Mugesh, *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46, 2706-2715.
- [2] D. P. Carvalho, C. Dupuy *Mol. Cell. Endocrinol.* **2017**, 458, 6-15.
- [3] F. A. Ossendorp, L. M. Leer, P. F. Bruning, J. A. M. Vandenbrink, A. Sterk, J. J. M. Devijlder, *Mol. Cell. Endocrinol.* **1989**, 66, 199-205.
- [4] Y. Wang, W. Li, J. E., Phay, R. Shen, N. S. Pellegata, M. Saji, A. de La Chapelle, H. He, *Thyroid*, 2016, 26, 1131–1140.
- [5] A. Wenzel, G. Upadhyay, T. L. Schmitt, U. Loos, *Mol. Cell. Endocrinol.* **2003**, 213, 99-108.
- [6] A. Carre, R. A. N. Louzada, R. S. Fortunato R. Ameziane-El-Hassani, S. Morand, V. Ogryzko, D. Pires de Carvalho, H. Grasberger, T. L. Leto, C. Dupuy *Antioxid. Redox Signal.* **2015**, 20, 724-33.
- [7] M. Beija, C. A. M. Afonso, J. M. G. Martinho, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 2410–2433.
- [8] T. Nguyen, M. B. Francis *Org. Lett.* **2003**, 5, 3245-3248.
- [9] S. J. Coutts, J. Adams, D., Krolikowski, R. J. Snow, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 5109-5112
- [10] V. Martichonok, J. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 950-958.
- [11] Y. Yamamoto, M. Takizawa, X.-Q. Yu, N. Miyaura, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 928–931.
- [12] G.Q. Li, S. Kiyomura, Y. Yamamoto, N. Miyaura, *Chem. Lett.* **2011**, 40, 702-704

6. Partie expérimentale

a. Matériels

Tous les réactifs commerciaux proviennent de chez Merck et Alfa Aesar et ont été utilisés sans purification préalable. L'eau MilliQ utilisée pour les réactions a été obtenue au moyen d'un système Millipore. Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton ^1H (300 MHz) et du carbone ^{13}C (75 MHz) ont été enregistrés avec un spectromètre Bruker Avance 300 et les déplacements chimiques sont donnés en partie par million (ppm), le pic de solvant étant utilisé comme valeur de référence (Méthanol- d_4 : 3,34 ppm). La multiplicité des signaux est indiquée par : s = singulet, d = doublet, q = quadruplet, qt = quintuplet, m = multiplet et les constantes de couplage sont données en Hz. Les spectres de masse ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre LTQ-Velos Pro de chez Thermofisher Scientific.

b. Méthode

Culture Cellulaire et Transfection

Les cellules HEK293 transfectées ont été cultivées dans un milieu DMEM contenant une haute teneur en glucose, de chez PAA Lab complémenté avec 10% (v/v) de sérum fœtal bovin et une solution de pénicilline/streptomycine (100 $\mu\text{g/ml}$; Life Technologies). Après 24h, une fois à confluence de 50-70%, les cellules HEK293 sont transfectées avec 2500 ng d'ADN (1500 ng de TPO, 500ng de DUOX2, 300ng DUOXA2, 40ng NIS, 160ng pcDNA 3.1) dans une plaque 24-puits, à l'aide du réactif de transfection d'ADN X-tremeGENE HP en utilisant le protocole du fournisseur (Roche). Après 24h, le milieu est changé et une solution d'hémine (20 μM) est ajoutée, puis les cellules transfectées. Après 48 h, les cellules sont récoltées.

Mesure de l'activité TPO

Dans une plaque 6 puits, les cellules transfectées ont étéensemencées et lavées deux fois avec un tampon phosphate (Dulbecco's) avant l'ajout d'une solution contenant du KI (100 μM), la

Super Oxyde Dismutase (200 U/ml), de Amplex red (50 μ M) dans le PBS supplémenté en Ca^{2+} - Mg^{2+} , à 37 °C. La réaction est initiée par ajout de 50 μ L d' H_2O_2 (1 mM), Immédiatement après ajout, la fluorescence est mesurée avec un lecteur de microplaques Victor3 (Perkin-Elmer) at 37 °C pendant 30 min à une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et d'émission at 595 nm. La production d' H_2O_2 a été mesurée (nanomoles H_2O_2 par heure par 10^5 cellules) en utilisant une courbe de calibration.

Mesure de la production d' H_2O_2

Les cellules ont été incubées dans un tampon phosphate (D-PBS, Dulbecco's) contenant du CaCl_2 et du MgCl_2 avec du D-glucose (1 mg/ ml), ionomycine (1 M; Sigma Aldrich), de la superoxide dismutase (100 U/ml; Sigma Aldrich) et de l'Amplex red (50 μ M; Sigma Aldrich). Immédiatement après ajout, la fluorescence est mesurée avec un lecteur de microplaques Victor3 (Perkin-Elmer) à 37 °C pendant 30 min et à une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et d'émission at 595 nm. La production d' H_2O_2 a été mesurée (nanomoles H_2O_2 par heure par 10^5 cellules) en utilisant une courbe de calibration.

Synthèse de l'acide boronique (5b) : A une solution de diisopropyléthylamine (233 μ L, 1.47 mmol, 3 équiv.) et de EDCI (141 mg, 0.73 mmol, 1.5 équiv.) dans le DMF (5 mL) on ajoute 154 mg de d'ester pinacolique de l'acide 4-(carboxyméthyl)phénylboronique (0.69 mmol, 1.2 équiv.) dans le DMF (2 mL). Après 15 min d'agitation à 20 C, une solution de rhodamine-pipérazine **2** (250 mg, 0.49 mmol, 1 équiv.) et de DMAP (12 mg, 0.1 mmol, 0.2 équiv.) dans le DMF (5 mL) est ajoutée et le mélange réactionnel est agité à température ambiante. Après 16h, le solvant est évaporé sous vide, le résidu est repris dans un mélange eau/méthanol puis une solution de BCl_3 dans le DCM est ajoutée (1M, 1 mL, 1mmol, 2 équiv.). Le milieu est agité 1h à température ambiante avant d'être concentré sous vide, et purifié sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange DCM/MeOH : 70/30. Les fractions contenant le produit

sont rassemblées et concentrées pour donner l'acide boronique **5b** sous la forme d'un solide rouge rubis (229 mg, 70%). ^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 7.76 (d, J = 3.1 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.66 (s, 3H, CH_{Ar}), 7.55-7.47 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.27 (d, J = 9.5 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.15 (s, 2H, CH_{Ar}), 7.06 (d, J = 9.3 Hz, 2H, CH_{Ar}), 6.97 (s, 2H, CH_{Ar}), 3.70 (q, J = 7.2 Hz, 8H, CH_2CH_3), 3.39 (br, J = 12.0 Hz, 6H, CH_2N , CH_2Ph), 1.32 (t, J = 6.9 Hz, 12H, CH_3) ppm, ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 172.44 , 169.54 , 159.27, 157.22 , 157.04, 136.48, 135.25 , 133.19 , 132.31 , 131.78 , 131.32 , 130.83 , 129.86 , 128.94 , 128.71, 128.04, 115.42 , 114.87 , 97.39 , 46.96, 46.68 , 41.44 , 12.90 ppm, MS (ESI⁺): m/z (%) = 673.4 (100)

Synthèse de la sonde fluorescente (1): un mélange d'acide boronique (**5b**) (50 mg, 0.074 mmol, 1 équiv) in DMF (1.5 mL) de 2-(hydroxyméthyl)-2-méthylpropane-1,3-diol (8,9 mg, 0.074 mmol, 1 équiv.) de KOH (4,1 mg, 0.074 mmol, 1 equiv.) et d'eau (1.3 μL , 0.074 mmol, 1 équiv.) est agité à 30 °C. Après 4h, 10 mL de cyclohexane (10 mL) sont ajoutés et la suspension est transférée dans un tube Falcon[®]. Le mélange est centrifugé (4000 rpm, 10 min), et le surnageant est éliminé. Le solide est resuspendu dans l'éther et centrifugé de nouveau (4000 rpm, 10 min). L'éther est éliminé, le solide est séché au dessiccateur sur P_2O_5 pour donner la sonde **1** sous la forme d'un solide amorphe rose (31 mg; 56%). ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.82-7.65 (m, 3H), 7.56 (d, J = 15.2 Hz, 3H), 7.15 (m, 6H), 6.94 (s, 2H), 3.65 (d, J = 6.4 Hz, 10H), 3.34 (t, J = 9.7 Hz, 14H), 1.20 (t, J = 6.8 Hz, 12H), 0.87 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 169.29, 167.09 , 157.49 , 155.54 , 138.62 , 134.09 , 132.22 , 131.18 , 131.08, 130.52 , 130.35, 129.96, 128.65, 115.58, 114.35, 113.45, 96.36, 68.02, 64.55, 45.86, 37.00, 18.25, 16.75, 12.62, 11.34. MS (ESI⁺): m/z (%) = 757.4 [M+H] (100)

7. Modification selective de protéine par les nanoparticules de palladium dans un broyat d'organes.

Selective modification of a native protein in a patient tissue homogenate using palladium nanoparticles

Arnaud Peramo¹, Anaëlle Dumas¹, Hynd Remita², Mireille Benoît², Stephanie Yen-Nicolay³, Raphaël Corre⁴, Ruy A. Louzada⁴, Corinne Dupuy⁴, Shanon Pecnard¹, Benoit Lambert⁵, Jacques Young⁵, Didier Desmaële¹, Patrick Couvreur*¹

¹ Institut Galien Paris-Sud, UMR 8612, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Faculté de Pharmacie, 5 rue JB Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

² Laboratoire de Chimie Physique, UMR 8000-CNRS, Bâtiment 349, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France

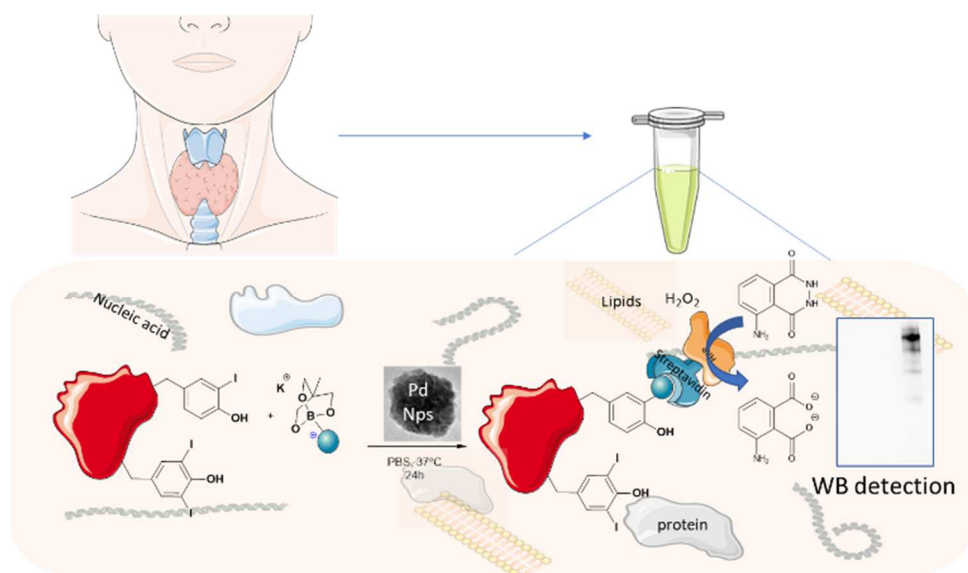
³ Trans-Prot, UMS IPSIT, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Faculté de Pharmacie, 5 rue JB Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

⁴ Institut de Cancérologie Gustave Roussy, UMR8200 CNRS, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France

⁵ Hôpital Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France

*To whom correspondence should be addressed: patrick.couvreur@u-psud.fr

Graphical Abstract



Abstract

Manipulation of proteins inside complex biological media would allow to better understand many biological processes and to develop innovative therapies. Reactions involving transition metals often require functional groups that are not found in nature. In the last decade, strong efforts were made to develop catalysts that can operate under complex biologically-relevant conditions. Here, we developed new benign palladium nanoparticles able to catalyze the *Suzuki–Miyaura* cross-coupling reaction on human thyroglobulin (Tg), a naturally iodinated protein produced by the thyroid gland, in homogenates from patients tissues. The site selective modification of iodinated tyrosine residues on Tg has been addressed using proteomic and Western-blot analysis. This represents the first example of a chemoselective native protein modification using transition metal nanoobjects in near-organ medium. The possibility to covalently modify Tg provides a new tool to study the thyroid gland and open new therapeutic perspectives in Grave's disease and others hyperthyroidism disorders.

Introduction

The selective functionalization of proteins with a chemical reporter inside complex biological media has been the subject of intensive studies during the last decade for investigating the dynamics and function of biomolecules^{1,2}. This approach usually involves the genetic or metabolic incorporation of a small organic reporter carrying a bio-orthogonal reactive group into a target protein within the cell. The modification of the resulting tagged-protein may then be achieved through a selective reaction using an exogenous probe. The identification of a selective reaction using a non-perturbing and cell permeable chemical handle that is inert towards other cellular components and will react rapidly with its partners under physiological conditions represents the main challenge of this approach³. As a result, only few chemical reactions fulfilling all these criteria have been developed. Among them, the Cu-catalyzed alkyne-azide cycloaddition has become one of the most commonly used bio-orthogonal conjugation reaction^{4,5}. However, the cytotoxicity of Cu ions has limited the use of this reaction in living systems⁶. As an alternative, copper-free versions of this ligation involving strain alkynes were developed but they showed specificity problems⁷. Many other approaches were proposed including Staudinger ligation⁸, hydrazine and oxime ligation⁹ and more recently the inverse-electron demand Diels-Alder¹⁰ reactions between tetrazines and *trans*-cyclooctenes¹¹ or vinylboronic acid¹². Transition metal-mediated reactions that involve reactive chemical groups not found in natural systems provide also fascinating possibilities for the selective *in vivo* chemical manipulation of proteins^{13,14}. Gold^{15,16} and ruthenium¹⁷ have been used for the selective uncaging of fluorescent probes but, palladium appeared as one of the most promising metal, giving rise to numerous applications in biology including *in vivo* prodrug activation or intracellular labelling^{18–20}.

Recently, site-specific protein derivatization by *Suzuki-Miyaura* reaction of genetically encoded *p*-iodophenylalanine (*p*IPhe) was demonstrated using a water soluble palladium

catalyst both *in vitro*²¹ and in living bacterial cells²². Nevertheless, the need to use a high concentration of palladium, probably to surmount the non-specific sequestration of the metal by surrounding biomolecules, could hamper further *in vivo* applications. This issue could be overcome to some extent by using nanoformulations of palladium which were reported to allow cross-coupling reactions in living mammalian cells, thanks to their ability to cross the cell membranes^{23,24}.

Despite these influential advances, palladium nanoparticles have never been used to modify a natural protein with direct therapeutic potential. In this study, we provide the first example of covalent modification of human thyroglobulin (Tg), an iodinated native protein, involved in the pathogenesis and the progression of the Graves's disease or in the *metastatic* papillary *thyroid carcinoma*. Indeed, using *Suzuki-Miyaura* cross-coupling reaction catalyzed by palladium nanoparticles (Pd NPs), we made the first proof of concept that a target native protein may be chemically altered, directly in a patient tissue homogenate. This brings the use of biorthogonal reactions a step ahead, closer to possible biomedical applications.

Results and discussion

Pd NPs formulations and Cytotoxicity

To harness the unique reactivity of palladium while preserving its biocompatibility we first explored the reactivity of small palladium nanoparticles entrapped into larger polymeric nanoparticles of poly(lactic-co-glycolic acid)-polyethyleneglycol²⁵, a material which demonstrated clinical safety²⁶. However, long-term stability concerns of this formulation compelled us to search for a more robust catalyst. We then investigated the palladium urchin-like nanostructures (Pd-Urchin NPs) developed by Ksar F. et al²⁷, assuming that their 3D porous morphology would offer a large surface area embedding high catalytic activity. The Pd-Urchin NPs were obtained by slow reduction of $(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})$ after γ irradiation, a

very efficient technique to synthesize nanoparticles of controlled size and shape²⁸, in the presence of one equiv. of cetylpyridinium (CPCl) as a stabilizing agent.

Although palladium-containing NPs have previously shown satisfactory cellular compatibility²⁹, the presence of CPCl surfactant in the present nanostructure required careful examination. Therefore, we systemically investigated the influence of the Pd/CPCl ratio, as well as, the reduction of the amount of CPCl by dialysis and ligand exchange on the shape, reactivity and cytotoxicity of the NPs. As depicted in Table 1 and Fig. 1A,B the initial 1:1 and the 5:1 Pd/CPCl mixtures provided well-defined urchin-shape NPs upon γ -irradiation according to transmission electronic spectroscopy (TEM). Reduction of the amount CPCl led to NPs with slightly smaller hydrodynamic diameter (DLS) but did not affect their overall stability (Supplementary Fig. S1). However, when less than 10% of CPCl were used the nanosuspension became unstable and TEM image revealed that the urchin-shape was partially lost, giving rise to large islets of aggregated small Pd nanobeads (Fig. 1C). Unfortunately, all these formulations were found cytotoxic on human primary thyroid cells isolated from histologically non-tumor tissue^{30,31} and Raw 264.7 macrophage cell line with $IC_{50} < 20\text{-}50\text{ }\mu\text{M}$ after 24h incubation time (Fig. 1 G-H, Table 1). In an attempt to reduce the amount of NPs unbound CPCl, dialysis of the 1:1 Pd/CPCl NPs was performed. This process did not affect the shape of the NPs (Fig. 1D) and significantly reduced their cytotoxicity ($IC_{50} > 1\text{ mM}$), but the colloidal stability was drastically reduced (Supplementary Fig. S1). As an alternative, the post-synthetic coating with polyethylene glycol was investigated using PEG-SH³². Interestingly, the treatment of the 1:1 Pd/CPCl nanosuspension with 2 mol% of PEG-SH provided a mixture of Pd beads (2-5 nm) together with some remaining urchin shape NPs (Fig. 1E). Although this formulation was found less cytotoxic ($IC_{50} > 1\text{ mM}$), it was observed that the catalytic activity was completely abolished (See below). Replacement of CPCl by another surfactant was next investigated. In this instance, we turned our attention to the use of polyvinylpyrrolidone (PVP) as it was reported to give stable Pd NPs upon reduction of Pd(II)

salt by ultrasonic irradiation³³. Moreover, PVP stabilized Pd NPs were previously found to catalyze *Suzuki-Miyaura* cross-coupling reactions in water³⁴. In the event, it was discovered that γ -irradiation of an aqueous solution of $(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})$ in the presence of 2 mol% of PVP provided highly stable nanosuspension of Pd NPs with narrow size distribution around 70 nm (DLS). TEM imaging showed *nanobead-like* structures with average particle size around 50 nm (Fig. 1F). Although these objects no longer displayed the urchin-shape structure, TEM images suggested that they were constituted of nanocrystalline Pd embedded in the polymer. Interestingly, biological evaluation revealed very low cytotoxicity on both Raw 264.7 macrophages and primary culture of human thyrocytes directly arising from patient tissue ($\text{IC}_{50} > 1 \text{ mM}$) (Table 1 and Fig.1).

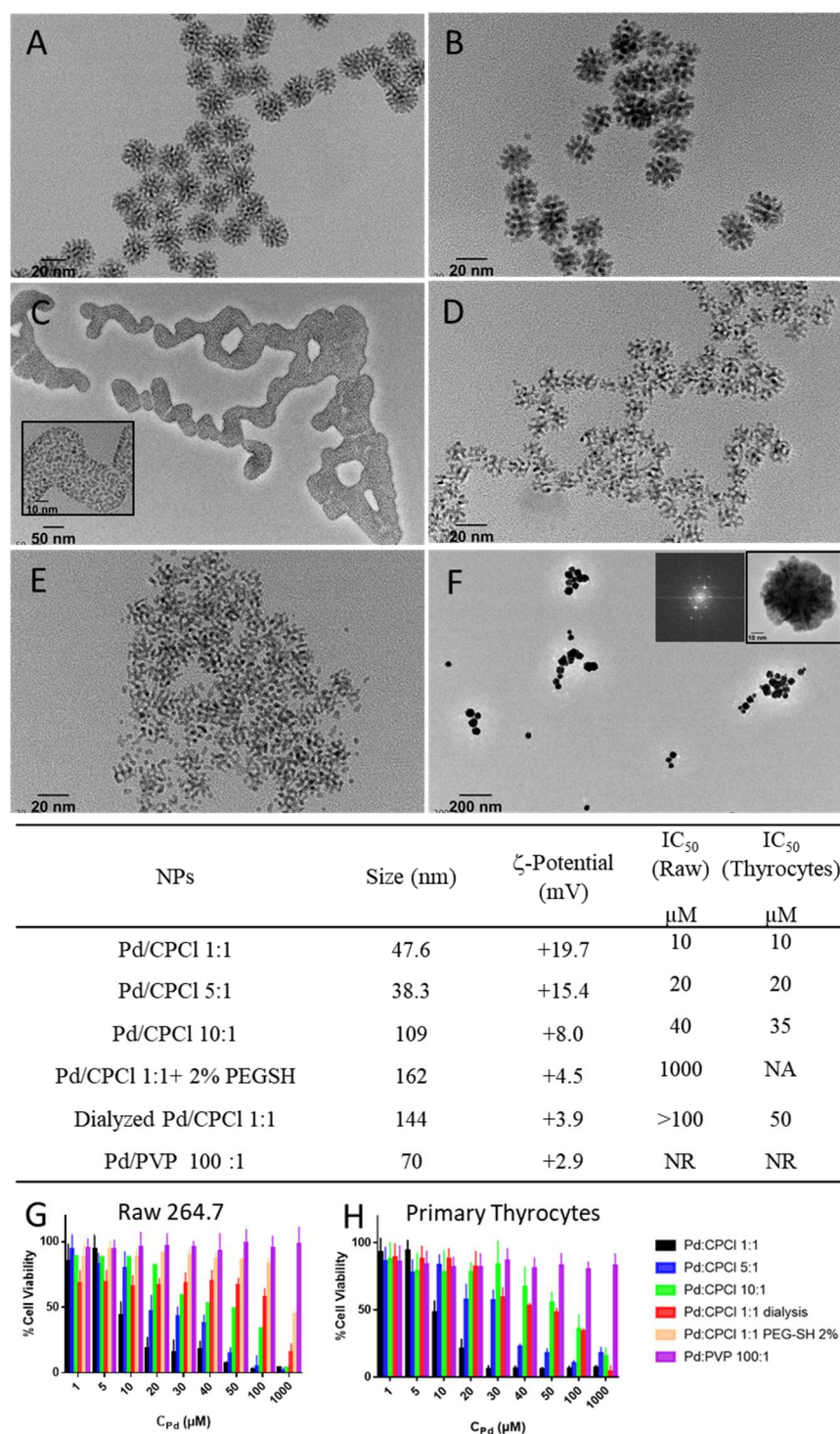


Figure 8 Characterization of Pd-Urchin NPs. The morphological appearance of Pd-Urchin NPs was observed by transmission electronic microscopy (TEM). TEM images of CuPd/Pd (A) 1:1, (B) 1:5, (C) 1:10, (D) 1:1 after dialysis, (E) 1:1+2% PEG-SH, (F) PVP: Pd 1:100; Table 1: Size and surface charge (zeta potential) of Pd NPs measured by DLS; the size distributions were highly monodisperse ($PdI < 0.250$) and only slight modifications of the size were observed when the amount of CuPd was reduced (data presented as mean $\pm$ SD); NR: IC₅₀ was not reached due to absence of cytotoxicity of Pd NPs on Raw 264.7 macrophages cell-line (G) and on primary culture of human thyrocytes from patient tissue (H) after 24h incubation

Pd NPs Mediated Suzuki-Miyaura reaction in water

Then, the catalytic activity of the different Pd nanoformulations was evaluated on the Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction of *N*-Boc-4-iodo-phenylalanine or *N*-Boc-4-iodo-thyrosine in a pH 8 phosphate buffer, using 1% of Pd Nano catalyst. Based on our previous findings that aryl cyclic triolborate potassium salts were better partners than boronic acids for the C-C bond forming reaction catalyzed by Pd NPs²⁵, phenyl cyclic triolborate potassium salts were selected as nucleophilic species. A full conversion was observed by ¹H NMR following 2 h incubation at 37 °C with all nanoformulations, except for the PEG-SH coated palladium NPs which were therefore not further used (Table 2, Fig. S2). Moreover, the reaction was also tested at pH 6 to make sure that the reaction is not limited to basic media and susceptible to proceed even under slightly acidic conditions such as can be found in some subcellular compartments (*i.e.* late endosomes and lysosomes). When the reaction was catalyzed by Urchin CPCI:Pd; 1:1 NPs at the lower pH, the conversion rate of the starting material was affected, whereas no influence of the pH was detected when the cross-coupling was catalyzed by PVP-Pd NPs (supplementary Fig. S3). According to these results, all further experiments were conducted with the PVP:Pd 1:100 catalyst.

Table 2. *Suzuki-Miyaura* cross-coupling reactions in water between iodinated amino acids and phenyl boronic acid derivatives catalyzed by Pd NPs at different pH.

Entry	Catalyst	R-I	BR'	pH	% conv. ^(a)
1	CPCl :Pd ; 1:1	<i>N</i> -Boc- <i>p</i> I ₁ Phe	Ph-B(OH) ₂	8.0	48
2	CPCl :Pd ; 1:1	<i>N</i> -Boc-3-I-Tyr	Ph-B(OH) ₂	8.0	70
3	CPCl :Pd ; 1:1	<i>N</i> -Boc-3-I-Tyr	[Ph-B(OCH ₂) ₃ CMe] ⁻ K ⁺	8.0	90
4	CPCl :Pd ; 1:1	<i>N</i> -Boc- <i>p</i> I ₁ Phe	[Ph-B(OCH ₂) ₃ CMe] ⁻ K ⁺	8.0	98
5	CPCl :Pd ; 1:1	<i>N</i> -Boc- <i>p</i> I ₁ Phe	[Ph-B(OCH ₂) ₃ CMe] ⁻ K ⁺	7.0	76
6	CPCl :Pd ; 1:1	<i>N</i> -Boc- <i>p</i> I ₁ Phe	[Ph-B(OCH ₂) ₃ CMe] ⁻ K ⁺	6.0	53
7	CPCl :Pd ; 1:5	<i>N</i> -Boc- <i>p</i> I ₁ Phe	[Ph-B(OCH ₂) ₃ CMe] ⁻ K ⁺	8.0	98
8	CPCl :Pd ; 1:10	<i>N</i> -Boc- <i>p</i> I ₁ Phe	[Ph-B(OCH ₂) ₃ CMe] ⁻ K ⁺	8.0	98
9	CPCl :Pd, 1 : 1; dialyzed	<i>N</i> -Boc- <i>p</i> I ₁ Phe	[Ph-B(OCH ₂) ₃ CMe] ⁻ K ⁺	8.0	98
10	CPCl :Pd ; 1:1 + 2% PEG-SH	<i>N</i> -Boc- <i>p</i> I ₁ Phe	[Ph-B(OCH ₂) ₃ CMe] ⁻ K ⁺	8.0	traces
11	PVP :Pd ; 1 :100	<i>N</i> -Boc- <i>p</i> I ₁ Phe	[Ph-B(OCH ₂) ₃ CMe] ⁻ K ⁺	8.0	98
12	PVP :Pd ; 1 :100	<i>N</i> -Boc- <i>p</i> I ₁ Phe	[Ph-B(OCH ₂) ₃ CMe] ⁻ K ⁺	7.0	98
13	PVP :Pd ; 1 :100	<i>N</i> -Boc- <i>p</i> I ₁ Phe	[Ph-B(OCH ₂) ₃ CMe] ⁻ K ⁺	6.0	98

1 equiv. R-I, 3 equiv. R-B(OR)₃, 1 mol% Pd NPs^(a) Conversions were determined by ¹H NMR spectroscopy on the crude reaction mixture analyzing the C-3 methylene signal (Supplementary Fig. S2 and S3) of the *N*-Boc amino-acids.

Cross-coupling reaction with a naturally iodinated protein

To investigate the catalytic activity of the Pd NPs on a biological macromolecule, the direct arylation of the naturally iodinated bovine thyroglobulin (Tg) was tested. This commercially available 640 kD dimeric glycoprotein³⁵ was found to possess thirty five iodinated tyrosine residues in the form of iodotyrosine (mono- or diiodotyrosine) and iodothyronine (3,5,3'-triiodothyronine or 3,5,3',5'-tetraiodothyronine) as evidenced by MS/MS analysis after 1D SDS-PAGE separation and chymotrypsin digestion of the Tg containing band (Supplementary Method 4, Fig.S4)³⁶. Depending on Tyrosine position, accessibility, function (hormonogenic donor or acceptor³⁷) and peptides miss cleavage, detection of specific modified tyrosines was obtained by mass spectrometry after Collision-Induced Dissociation (CID)-fragmentation using a LTQ-Orbitrap followed by studies of the fragmentation pathways of protonated peptides providing inter alias *C*-terminal ammonium *y* ion series and *N*-terminal *b* acylium ion series as previously reported by Dedieu³⁸. The obtained fragments were identified by X!TandemPipeline (software version 0.2.24)³⁹ by comparison with protein sequence P01267 from Uniprot database. For example, SY₈₀₉REASSRNF peptide was detected by high resolution mass spectrometry as a doubly charged ion under the following forms: unmodified Y, iodinated Y, phenylated Y. This later form was not detected in native proteins nor in samples reacted without catalyst, confirming the activity of the catalyst and dismissing hypothetical false positive discovery, as depicted in Fig 2. Detection of the Tyr₈₀₉ in the SY₈₀₉REASSRNF peptide fragment relied on the observation of the *y*₆ (*m/z* = 665.2) and *y*₇ (*m/z* = 794.4) ions (in red) which were clearly visible and did not shift in any fragmentation spectra, whereas modifications of *b*₃ (*m/z* = 407.2) and *b*₄ (*m/z* = 646.2) ions (in blue) confirmed the presence of tyrosine, iodotyrosine (+125.9), diiodotyrosine (+251.8), phenyltyrosine (+76.0), phenylated iodotyrosine (+201.9). Similarly, for the peptide fragment SLEHDSDDY₂₅₇₄ASF in which two iodine atoms were detected on the Y₂₅₇₄, no shift was detected for *y*₂ and *b*₈ ions, whereas for *b*₉, *b*₁₀ and *b*₁₁ ions a -99.7 *m/z* shift was observed confirming the replacement of the two iodine (+251.8) atoms by two phenyl

(+152.0) groups. A total of 17 tyrosines modified with one or two phenyl residues were detected on the Tg after 24h incubation in the presence of PVP-Pd NPs and potassium phenyl cyclic triolborate (Table 3). This result established the covalent C-C binding between phenyl and native iodinated protein through Pd nanoobject.

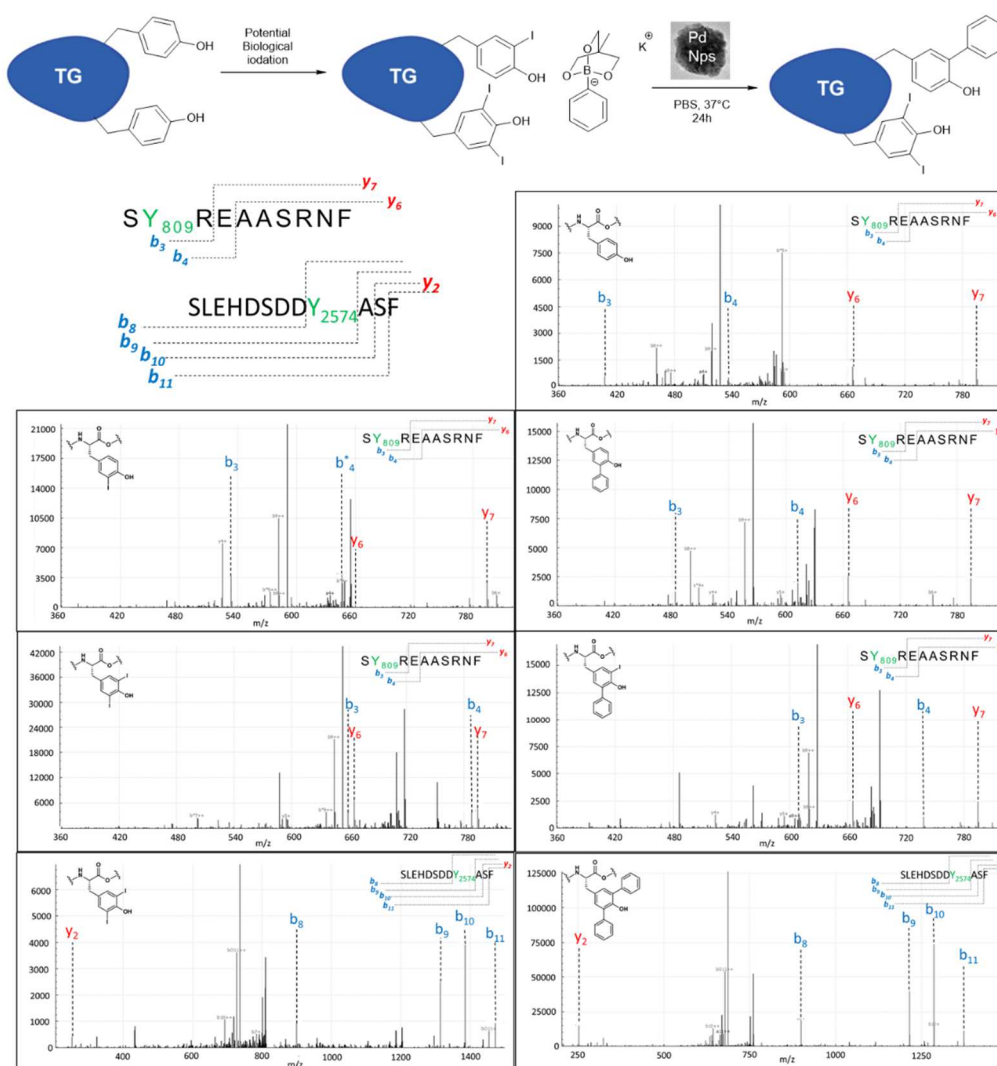


Figure 9 ESI CID-fragmentation spectra for Tg peptides SYREAASRN and SLEHSDDDYASF and assignment of Tyr809 and Tyr2574 iodination and phenylation patterns. No-iodinated tyrosine; monoiodinated tyrosine, diiodinated tyrosine, monophenylated tyrosine, monophenylated and iodinated tyrosine, diphenylated tyrosines.

Table 3. Iodinated and phenylated tyrosines in bovine Tg

Residues	Iodinated Peptides Detected	Coupled Product found
Y382	D	MP
Y703	D	MP ; DP
Y809	M ; D	MIP ; MP ; DP
Y839	M ; D	MP ; DP
Y879	D	DP
Y883	M ; D	MP ; DP
Y945	M ; D	MP
Y992	M	MP
Y1310	M, D	MP ; DP
Y1394	M ; D	MP
Y1503	M ; D	MP ; MIP ; DP
Y2185	D	DP
Y2336	Not detected	MIP
Y2488	M	MP ; DP
Y2574	M ; D ; Tyr.	MP ; DP
Y2588	M ; D	MP
Y2618	M ; D	MP

M: mono-iodinated, D, Diiodinated, MP: monophenylated, DP: diphenylated; MIP Monoiodinated monophenylated

To further validate the ability of PVP-Pd NPs to achieve C-C bond formation with proteins and to avoid any non-specific reaction, an immunodetection assay was set out. Because streptavidin conjugated to horse-radish peroxidase is commonly used as a standard for immunoblotting protein detection, a biotinylated probe was designed and synthesized. This probe was obtained by coupling a biotin head to a reactive aryl cyclic triolborate through an ethylenedioxy linker, in order to allow detection with streptavidin. Briefly, as depicted in Supplementary Fig. S5, biotine was first conjugated to a short ω,ω' -diaminotriethyleneglycol spacer to provide the known biotine amide derivative⁴⁰. Condensation of the latter with 4-carboxyphenyl pinacol boronic ester and transesterification with 2-(hydroxymethyl)-2-methylpropane-1,3-diol in the presence of KOH provided the required biotine cyclic triolborate probe (Supplementary Method 5, Fig. S6 and S7). After 24 h incubation of the bovine Tg (in a PBS buffer) with the biotinylated probe in the presence of 50 equiv. of PVP-Pd NPs, immunoblotting analysis showed fluorescence around 300 kDa, corresponding to Tg, whereas nothing was detected in the control experiments without Pd NPs or without the biotinylated probe (Supplementary Fig.S8). This result confirmed the C-C bond formation but more notably established the absence of non-specific labeling due to the eventual formation of protein-boronate adducts^{41,42}. These data provided evidence of the remarkable catalytic efficiency of the Pd NPs in aqueous media at low temperature, opening the way for the C-C bond formation with a native protein in physiological conditions.

Modification of Human Tg in patient tissue homogenates

Having secured an easily detectable coupling partner capable to modify Tg via Suzuki-Miyaura cross-coupling, we integrated the possibility to perform the biorthogonal ligation in a complex biological mixture. In vivo, Tg is iodinated within the follicles in thyroid gland at the thyrocyte surface by the thyroperoxydase (TPO), a *membrane*-bound protein, in the presence NaI brought by the sodium/iodide symporter (NIS) and H₂O₂ generated by the dual oxidase 2

(DUOX2)⁴³. Noteworthy, simple 2D cell culture of thyrocytes provided only un-iodinated Tg not suitable for our study and, in addition, the expression of Tg rapidly declined after few passage numbers. Commercially available FRTL and FRTL-5 cell lines derived from the thyroid gland of Fisher rat were initially investigated to access iodinated Tg. However, it was found that these cell lines either didn't expressed Tg or produced un-iodinated Tg (Supplementary Table S2 and Fig. S11). 3D culture system mimicking the follicle can be elaborated to allow the production of higher concentrations of transmembrane protein which facilitates thyroglobulin iodination. However, so far only 3D models using animal's cell lines were developed while human thyrocytes can only grow in 2D cultures⁴⁴. Therefore, in quest for a pertinent model for the cross-coupling reaction on a naturally iodinated protein, it was decided to attempt the reaction into tissue homogenates arising from thyroid biopsies obtained from thyroidectomy on Grave's disease patients. Tg concentration in the homogenate was estimated to 7.4 ± 0.4 mg/mL by ELISA (Supplementary Method 7). Incubation of phenyl cyclic triolborate in the tissue homogenate in the presence of 1 mol% of PVP-Pd NPs followed by proteomic analysis of the extracted Tg indicated that iodinated thyrosine residues were covalently modified (Supplementary Table S3). We next tested the performance of the system to tag the human Tg with the biotinylated probe. In the event, after 24 h incubation with PVP-Pd NPs and protein separation by SDS-PAGE gel, immunoblotting analysis showed a bright fluorescent band at Tg molecular weight that provided evidence of the covalent coupling (Fig. 3). The absence of fluorescence in all the control experiments confirmed the full chemoselectivity of the process.

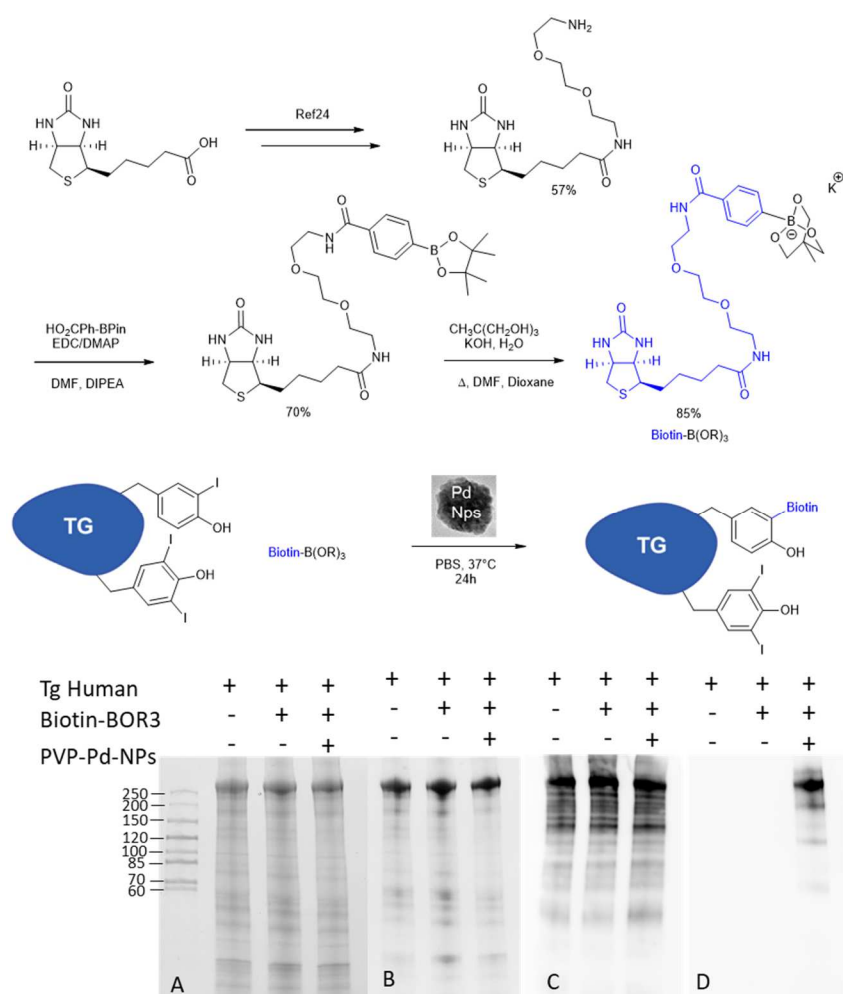


Figure 3: Synthetic scheme of the biotiny cyclic triolborate probe and chemical modification of human thyroglobulin in a patient thyroid homogenate through Suzuki-Coupling reaction with biotinylated cyclic triolborate catalyzed by PVP-Pd NPs (Western-Blot). A Separation of homogenate proteins by 1D-SDS Page gel (Stain free image), B Stain free image after protein transfer, C Detection of Human Thyroglobulin on nitrocellulose membrane was probed with goat anti-human thyroglobulin monoclonal Antibody followed by horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-goat secondary antibody. The specific band was detected for Thyroglobulin around 300 kDa. D Detection of Tg modification on nitrocellulose membrane probe with streptavidin-HRP.

Conclusion & Perspective

In summary, we have found that the *Suzuki-Miyaura* cross-coupling reaction of aryl cyclic triolborate salts catalyzed by Pd NPs allowed a selective modification of a naturally iodinated protein in near intra-organ medium. Coupling was observed with simple aromatic rings but also with a more complex biotinylated probe by western-blotting. Combined with the low cytotoxicity of the PVP-Pd NPs, this new tool may provide a unique example of specific transition-metal mediated reactions in a complex and natural biological medium that does not require genetic modification. This opens up the possibility to post-transcriptionally control the levels of thyroglobulin and thyroid hormones. Given the large number of pathologies associated with the dysregulation of these processes, this approach can lead to relevant therapeutic applications.

The transfer of this approach to now routinely used genetically-encoded iodinated unnatural amino acids could also open new perspectives to dissect and manipulate cellular processes⁴⁵. The potential of aryl-aryl coupling to form environmentally-sensitive fluorophores could reveal changes occurring in and around proteins with single amino acid resolution. In addition, the orthogonality of the palladium-mediated labeling to the alkyne-azide chemistry will enable multiplexed fluorescence labeling of different species in the same cell.

Methods

Palladium-urchin shape nanoparticles (Pd-Urchins NPs). In a 25 mL volumetric flask, cetylpyridinium chloride (CPCl) (850.0 mg, 2.5 mmol) was dissolved in MilliQ water to give a 100 mM stock solution. To a 10 mL glass vial, $(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})$ (131.7 mg, 0.5 mmol) was dissolved in 1 mL of the CPCl stock solution and 4 mL of MilliQ water. A nitrogen stream was bubbled through the solution for 10 min. The degassed palladium solution was then reduced upon γ -irradiation using the panoramic gamma source of ^{60}Co used for radiolytic synthesis at the maximum dose rate of $4.0 \text{ kGy} \cdot \text{h}^{-1}$ for 11 h to provide a stock solution of Pd-Urchin NPs (100 mM of Pd).

Palladium-Polyvinylpyrrolidone nanoparticles (PVP-Pd NPs). In a 10 mL glass vial, to a solution of polyvinylpyrrolidone in MilliQ water (5 mL, 0.001 mM), was added $(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})$ (131.7 mg, 0.5 mmol). The solution was degassed with a nitrogen stream for 10 min. The palladium was then reduced upon γ -irradiation using the same procedure as above to provide a stock solution of PVP-Pd NPs (100 mM of Pd, molar ratio 100:1 Pd/PVP).

Pd NPs mediated Suzuki-Miyaura cross coupling of iodinated amino-acids. A suspension of the iodinated aminoacid (ie, 4-iodo-phenyl-alanine or 4-iodo-thyrosine, 8 μmol , 1 equiv.) and boronic acid derivative (24 μmol , 3 eq.) in MilliQ water (370 μL) was placed into a 1.5 mL Eppendorf tube. A phosphate buffer pH 8, 7 or 6 (200 mM 50 μL) was added, followed by the stock solution of Pd NPs (10 mM, 80 μL , 0.08 μmol Pd, 0.01 equiv.). The mixture was briefly vortexed and then incubated on a thermostated shaker (bioSan TS-100) at 37 °C and 800 rpm. After 2 h, the reaction mixture was frozen in liquid nitrogen and freeze-dried. The crude product was dissolved in MeOD and analyzed by ^1H -NMR. The conversion was evaluated by integrating the C-3 methylene signal of the product and of the starting material at 2.97 ppm and 2.87 ppm, respectively.

Cross-coupling reaction with a naturally iodinated protein. To a solution of thyroglobulin from bovine thyroid (50 μ L, 7.4 mg/mL, 1.21 nmol, 1 equiv.) in PBS pH 7.4 was added a solution of Na₂HPO₄ (16 mg/mL) containing the cyclic triolborate derivatives (7.5 μ L, 19.68 mg/mL, 605 nmol, 500 equiv.). PVP-Pd NPs suspension (7.5 μ L, 8 mM, 60.5 nmol, 50 equiv.) was then added and the mixture was shaken at 37 °C for 24h. The product was then analyzed by MS/MS after 1D SDS-PAGE separation and chymotrypsin digestion (Supplementary S10).

Pd NPs mediated Suzuki-Miyaura with Human Tg in Graves disease patients tissue homogenates. To thyroid homogenate containing Tg (50 μ L, 7.4 mg/mL, 1.21 nmol, 1 equiv.) in PBS pH 7.4, was added a solution of Na₂HPO₄ (16 mg/mL) containing cyclic triolborate derivatives (7.5 μ L, 19.68 mg/mL, 605 nmol, 500 equiv.). Stock solution of PVP-Pd NPs catalyst (7.5 μ L, 8 mM, 60.5 nmol, 50 equiv.) was then added and the mixture was shaken at 37 °C for 24h. The product was then analyzed by western-blot after 1D SDS-PAGE separation (Supplementary S12).

References

1. Sletten, E. M. & Bertozzi, C. R. Bioorthogonal chemistry: Fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 6974–6998 (2009).
2. Grammel, M. & Hang, H. C. Chemical reporters for biological discovery. *Nat. Chem. Biol.* 9, 475–484 (2013).
3. Shih, H.-W., Kamber, D. N. & Prescher, J. A. Building better bioorthogonal reactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 21, 103–111 (2014).
4. Yang, M., Li, J. & Chen, P. R. Transition metal-mediated bioorthogonal protein chemistry in living cells. *Chem. Soc. Rev.* 43, 6511–6526 (2014).
5. Boutureira, O. & Bernardes, G. J. L. Advances in Chemical Protein Modification. *Chem. Rev.* 115, 2174–2195 (2015).

6. Hong, V., Presolski, S. I., Ma, C. & Finn, M. G. Analysis and optimization of copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition for bioconjugation. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 9879–9883 (2009).
7. Baskin, J. M. *et al.* Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 16793–16797 (2007).
8. van Berkel, S. S., van Eldijk, M. B. & van Hest J. C. M. Staudinger Ligation as a Method for Bioconjugation, *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 8806 – 882 (2011).
9. Kölmel D. K. & Kool E. T. Oximes and Hydrazones in Bioconjugation: Mechanism and Catalysis. *Chem Rev.* 117, 10358–10376 (2017).
10. Liu, D. S. *et al.* Diels-alder cycloaddition for fluorophore targeting to specific proteins inside living cells. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 792–795 (2012).
11. Wollack, J. W. *et al.* Site-specific labeling of proteins and peptides with trans-cyclooctene containing handles capable of tetrazine ligation. *Chem. Biol. Drug Des.* 84, 140–147 (2014).
12. Eising, S., Van Der Linden, N. G. A., Kleinpenning, F. & Bongers, K. M. Vinylboronic Acids as Efficient Bioorthogonal Reactants for Tetrazine Labeling in Living Cells. *Bioconjug. Chem.* 29, 982–986 (2018).
13. Gong, Y. & Pan, L. Recent advances in bioorthogonal reactions for site-specific protein labeling and engineering. *Tetrahedron Lett.* 56, 2123–2132 (2015).
14. Antos, J. M. & Francis, M. B. Transition metal catalyzed methods for site-selective protein modification. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10, 253–262 (2006).
15. Tsubokura, K. *et al.* In Vivo Gold Complex Catalysis within Live Mice. *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, 3579–3584 (2017).

16. Pérez-López, A. M. *et al.* Gold-Triggered Uncaging Chemistry in Living Systems. *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, 12548–12552 (2017).
17. Sadhu, K. K., Lindberg, E. & Winssinger, N. In cellulo protein labelling with Ru-conjugate for luminescence imaging and bioorthogonal photocatalysis. *Chem. Commun.* 51, 16664–16666 (2015).
18. Yusop, R. M., Unciti-Broceta, A., Johansson, E. M. V., Sánchez-Martín, R. M. & Bradley, M. Palladium-mediated intracellular chemistry. *Nat. Chem.* 3, 239–243 (2011).
19. Li, J. *et al.* Palladium-triggered deprotection chemistry for protein activation in living cells. *Nat. Chem.* 6, 352–361 (2014).
20. Dumas, A. & Couvreur, P. Palladium: a future key player in the nanomedical field? *Chem. Sci.* 6, 2153–2157 (2015).
21. Spicer, C. D., Triemer, T. & Davis, B. G. Palladium-mediated cell-surface labeling. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 800–803 (2012).
22. Li, J. *et al.* Ligand-free palladium-mediated site-specific protein labeling inside gram-negative bacterial pathogens. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 7330–7338 (2013).
23. Yusop, R. M., Unciti-Broceta, A., Johansson, E. M. V., Sánchez-Martín, R. M. & Bradley, M. Palladium-mediated intracellular chemistry. *Nat. Chem.* 3, 239–243 (2011).
24. Miller, M. A. *et al.* Nano-palladium is a cellular catalyst for in vivo chemistry. *Nat. Commun.* 8, (2017).
25. Dumas, A., Peramo, A., Desmaële, D. & Couvreur, P. PLGA-PEG-supported Pd Nanoparticles as Efficient Catalysts for Suzuki-Miyaura Coupling Reactions in Water. *Chimia* 70, 252–257 (2016).

26. Makadia, H. K. & Siegel, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers* 3, 1377–1397 (2011).
27. Ksar, F., Sharma, G. K., Audonnet, F., Beaunier, P. & Remita, H. Palladium urchin-like nanostructures and their H₂ sorption properties. *Nanotechnology* 22, doi:10.1088/0957-4484/22/30/305609, (2011).
28. Belloni, J., Mostafavi, M., Remita, H., Marignier, J.-L. & Delcourt, M.-O. Radiation-induced synthesis of mono-and multi-metallic clusters and nanocolloids. *New J. Chem.* 22, 1239-1255 (1998).
29. Chankeshwara, S. V., Indrigo, E. & Bradley, M. Palladium-mediated chemistry in living cells. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 21, 128–135 (2014).
30. Ameziane-El-Hassani, R. *et al.* NADPH oxidase DUOX1 promotes long-term persistence of oxidative stress after an exposure to irradiation *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 5051–5056 (2015).
31. Morgan, S. J., Neumann, S. & Gershengorn, M. C. Normal Human Thyrocytes in Culture. *Methods Mol. Biol.* 1817, 1–7 (2018).
32. Guerrini, L., Alvarez-Puebla, R. A. & Pazos-Perez, N. Surface modifications of nanoparticles for stability in biological fluids. *Materials* 11, 1–28 (2018).
33. Nemamcha, A., Moumeni, H. & Rehspringer, J. L. PVP Protective mechanism of palladium nanoparticles obtained by sonochemical process. *Phys. Procedia* 2, 713–717 (2009).
34. Li, Y., Boone, E. & El-Sayed, M. A. Size effects of PVP-Pd nanoparticles on the catalytic Suzuki reactions in aqueous solution. *Langmuir* 18, 4921–4925 (2002).

35. Noguchi, Y. *et al.* Thyroglobulin (Tg) induces thyroid cell growth in a concentration-specific manner by a mechanism other than thyrotropin/cAMP stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 890–894 (2010).
36. Gentile, F. & Pansini, V. Preferential sites of proteolytic cleavage of bovine, human and rat thyroglobulin. *Eur. J. Biochem.* 621, 603–621 (1993).
37. Gentile, F., Ferranti, P., Mamone, G., Malorni, A. & Salvatore, G. Identification of Hormonogenic Tyrosines in Fragment 1218-1591 of Bovine Thyroglobulin by Mass Spectrometry. *J. Biol. Chem.* 272, 639–646 (2002).
38. Dedieu, A., Gaillard, J. C., Pourcher, T., Darrouzet, E. & Armengaud, J. Revisiting iodination sites in thyroglobulin with an organ-oriented shotgun strategy. *J. Biol. Chem.* 286, 259–269 (2011).
39. Craig, R. & Beavis, R. C. TANDEM: Matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics* 20, 1466–1467 (2004).
40. Stewart, J. A., Piligian, B. F., Rundell, S. R. & Swarts, B. M. A trifunctional cyclooctyne for modifying azide-labeled biomolecules with photocrosslinking and affinity tags. *Chem. Commun.* 51, 17600–17603 (2015).
41. Li, H. & Liu, Z. Recent advances in monolithic column-based boronate-affinity chromatography. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 37, 148–161 (2012).
42. Azevedo, A. M. *et al.* Capture of human monoclonal antibodies from a clarified cell culture supernatant by phenyl boronate chromatography. *J. Mol. Recognit.* 23, 569–576 (2010).
43. Carvalho, D. P. & Dupuy, C. Thyroid hormone biosynthesis and release. *Mol. Cell. Endocrinol.* 458, 6–15 (2017).

44. Wang, Y. *et al.* Primary Cell Culture Systems for Human Thyroid Studies. *Thyroid* 26, 1131–1140 (2016).
45. Sharma, S. V *et al.* Living GenoChemetics by hyphenating synthetic biology and synthetic chemistry in vivo. *Nat. Commun.* 8, (2017).

Acknowledgements: The research leading to these results received the financial support of the *Ministère de la Recherche et de la Technologie* (Fellowship to A. P.), the *Fondation pour la Recherche Médicale FRM 2018* (Fellowship to A. P.), *Agence National pour la Recherche (ANR)* as part of the "*Investissements d'Avenir*" program (Labex NanoSaclay, ANR-10-LABX-0035) and *Swiss National Science Foundation* (fellowship to A. D.). The authors wish to thank Patricia Beaunier from *Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Réactivité de Surface, UMR 7197, F-75005* for the TEM images, <https://smart.servier.com/> for the cartoons used in this publication

Author contributions

P.C. and A.D. conceived and designed the research. D.D. developed and analyzed the chemical experiments. H.R. & M. B. prepared the Pd-urchin like NPs and AP designed the non-cytotoxic PVP-Pd NPs. A.P. and A.D. performed all chemical and biochemical experiments. S.N. performed and analyzed the proteomic experiments. C.D. J.Y. and R.C have the knowledge of the biology of thyroid gland allowing the primary culture of thyrocytes and S.P. helped to prepare the biotinylated probe. B.L. provided the thyroid biopsies from patients. P.C., D.D., A.P. co-wrote the paper. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

Additional information

The authors declare no competing financial interest. Supplementary information accompanies this paper at www.nature.com/naturechemistry. Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintandpermissions/>. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.C.

SUPPORTING INFORMATION

GENERAL INFORMATIONS

Equipements

Infrared (IR) spectra were obtained as solid using a Fourier Transform Bruker Vector 22 spectrometer. Only significant absorptions are listed. The ^1H , and ^{13}C NMR were recorded using a Bruker Advance 300 (300 and 75 MHz, respectively) spectrometer. Recognition of methyl, methylene, methine, and quaternary carbon nuclei in ^{13}C NMR spectra rests on the *J*-modulated spin-echo sequence. All chemical shifts are quoted on the δ scale in ppm using residual solvent as the internal standard (^1H NMR: CDCl_3 = 7.26; D_2O = 4.79; DMSO-d_6 = 2.50; D_3COD = 3.33, and ^{13}C NMR: DMSO-d_6 = 39.5). Coupling constants (*J*) are reported in Hz with the following splitting abbreviations: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet and m = multiplet. Mass spectra were recorded using a LTQ-Velos Pro Thermofisher Scientific spectrometer. The sizes of the obtained Pd nanoformulations were measured using a Malvern particle size analyser [nano ZS (173° scattering angle)]. The morphology of the different palladium nanoformulations was examined by transmission electron microscope (TEM) using a JEOL JEM 100CXII transmission electron microscope at an accelerating voltage of 100 kV and for high resolution image using a JEOL JEM 2010 instrument at 200 kV. Deionized water was used for chemical reactions and Milli-Q purified

water for nanoparticle preparation and protein manipulations. Bidistilled MilliQ water was produced using a water purification system (Millipore). Images of protein gels including stain free gels, coumassie SDS-PAGE gel, stain free and western blotting membranes were taken on ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) or the MF-ChemiBis system (Berthold, Pforzheim). Proteomic analyses were performed either by Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) on a Micromass LCT (ESITOF- MS) coupled to an Agilent 1100 Series HPLC system or by liquid chromatography (nano-UPLC Ultimate 3000 RSLCnano, Thermo Fisher Scientific) combined with mass spectrometry (LTQ-Orbitrap, Thermo).

Cell Culture

The Raw 264.7 cell lines (Tebu-bio) were grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, from Sigma Aldrich) supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum, from GIBCO) and 1% antibiotic antimycotic solution (Sigma Aldrich) The cells were cultured at 37 °C in a humidified air atmosphere containing 5% CO₂. The Raw cells formed a confluent monolayer within 5–7 days.

Primary thyrocytes were prepared from thyroid biopsies and obtained from thyroidectomy in patients who gave their informed consent. The biopsies were washed successively with EtOH (10 mL/g of tissue) and twice with calcium- and magnesium free phosphate-buffered saline (PBS) (10 mL/g of tissue) before minced into small pieces. To separate connective tissue and thyrocytes, the samples were digested using digestion buffer (10 mL/g of tissue) containing collagenase type I (100.5 U/mL) (Sigma-Aldrich) and dispase II protease (2.35 U/mL) (Sigma-Aldrich) in PBS with glucose (2 mg/mL), pH 7.4, at 37 °C for 45 min. The digested tissues were filtered through sterile Corning™ filter (100 µm and 40 µm). PBS was added and cells were washed by centrifugations at 300 g for 5 min. Thyrocytes were allowed to adhere at 37 °C (in a humidified air atmosphere containing 5% CO₂) in a DMEM-F12 (Sigma Aldrich) culture medium containing 5% of FBS complemented with 6 growth factors: Transferin (6

μg/mL) (Sigma-Aldrich), hydrocortisone (5 nM) (Sigma-Aldrich), thyreostimulin (1 μU/mL), insulin (10 μg/mL) (Sigma-Aldrich), somatostatin (10 ng/mL) (Sigma-Aldrich) and glycine/L-histidine/L-lysine (10 ng/mL) (Sigma-Aldrich). After 24 h, the remaining blood cells were removed with warm PBS. The cells were cultured at 37 °C in a humidified air atmosphere containing 5% CO₂. The primary culture cells formed a confluent monolayer within 7–9 days.

The Fisher rat cell lines FRTL and FRTL5 (European Collection of Authenticated Cell Cultures) were grown according to the Ambesi-Impoombato protocol¹ at 37 °C in an humidified air atmosphere containing 5% CO₂ in DMEM-F12 culture medium containing 5% of FBS supplemented with glutamine (Sigma Aldrich) (10 μg/mL), insulin (10 μg/mL), (Sigma Aldrich), hydrocortisone (10 nM) (Sigma Aldrich), transferrin (5 μg/mL) (Sigma Aldrich), somatostatin (10 ng/mL) (Sigma Aldrich), glycy-L- histidyl-L-lysine acetate (10 ng/mL) (Sigma Aldrich) and thyreostimulin (10 mUnits/mL) (Sigma Aldrich). For FRTL cell line, the medium was completed with 30 μM or 1 mM of NaI.

The prostate cancer-3 (PC-3) cell line (European Collection of Authenticated Cell Cultures) was grown in Coon's modified Ham's F12 medium (Sigma Aldrich) containing 5% FBS supplemented L ascorbic acid (45 mg/L) (Sigma Aldrich), Inositol (18mg/L) (Sigma Aldrich), Glutamine (2mM). The cells were cultured at 37 °C in a humidified air atmosphere containing 5% CO₂. The PC-3 cell formed a confluent monolayer within 7–9 days.

Chemicals & Solvents

Chemicals were obtained from Carbosynth Limited (UK), Sigma Aldrich Chemical Co (France) Fluorochem and Alfa Aesar (France) and were used without further purification. Solvents were obtained from VWR. Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4 with and without Ca²⁺ and Mg²⁺ were obtained from Sigma Aldrich. Tetrahydrofuran (THF) was distilled from sodium/benzophenone ketyl and CH₂Cl₂ from CaH₂. All reactions involving air- or water-

sensitive compounds were routinely conducted in glassware, which was flame-dried under a positive pressure of nitrogen or argon. Analytical thin-layer chromatography was performed on Merck silica gel 60F254 glass precoated plates (0.25 mm layer). Column chromatography was performed on Merck silica gel 60 (230e400 mesh ASTM (American Standard Test Sieve Series)).

SUPPLEMENTARY METHODS

1. PREPARATION AND CHARACTERIZATIONS OF Pd-NPs

Preparation of the palladium urchin nanoparticles (Pd-Urchin NPs) Pd:CPCI.

In a 25 mL volumetric flask, cetylpyridinium chloride (CPCI) (850 mg, 2.5 mmol) was dissolved in Milli-Q water to provide a 100 mM stock solution. In a 10 mL glass vial, $(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2\text{Pd}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (131.7 mg, 0.5 mmol) was dissolved in appropriate volume of the CPCI stock solution and Milli-Q water depending on Pd:CPCI molar ratio, ie. 1:1, 5:1 or 10:1 (Table S1). The solution was degassed under nitrogen for 10 min. Palladium was then reduced upon γ -irradiation using the panoramic gamma source of ^{60}Co used for radiolytic synthesis at the maximum dose rate of $4.0 \text{ kGy}\cdot\text{h}^{-1}$ for 11h as described by Ksar et al.² to provide a stock solution of Pd-Urchin NPs (100 mM of Pd).

Dialysis of the palladium urchin nanoparticles (Pd-Urchin NPs) 1:1 Pd:CPCI. 500 μL of 1:1 Pd:CPCI nanoparticles were placed in 3.5 KDo Slide-A-Lyzer® for dialysis against water for 3 days at room temperature (25 °C) with dialysis water changed twice a day. Sample was removed from the cassette to provide a stock solution of Pd-Urchin NPs dialyzed.

Preparation of the palladium urchin nanoparticles (Pd-Urchin NPs) 1:1 Pd:CPCI PEG-SH 2%. 1 mL of 1:1 Pd:CPCI Pd-Urchin NPs suspension was centrifuged (4000 rpm, 1h). 900 μL of the supernatant was then removed and Poly(ethylene glycol) methyl ether thiol

PEG-SH (2.5 kDa, 22 mg) solution in Milli-Q water (900 μ L) was added to provide 1 mL solution of Pd:CPCl 1:1 PEG-SH 2% solution.

Preparation of the palladium PVP nanoparticles (PVP-Pd NPs). In a 25 mL volumetric flask, polyvinylpyrrolidone (PVP, 5 kDa) (125 mg, 0.025 mmol) was dissolved in Milli-Q water to provide a 1 mM PVP stock solution before $(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2\text{Pd}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (131.7 mg, 0.5 mmol) was dissolved in 5 mL of this PVP stock solution. The solution was then degassed under nitrogen for 10 min and the palladium was reduced upon γ -irradiation as described above to provide a stock solution of palladium nanoparticles (100 mM of palladium, molar ratio 100:1 Pd/PVP).

Nanoparticles characterization by DLS

Mean particle size and polydispersity index were measured at 25 $^{\circ}\text{C}$ by quasi-elastic light scattering with a Nano ZS (Malvern Instrument, 173 scattering angle). The NPs surface charge was investigated by ζ -potential measurement with the Nano ZS instrument at 25 $^{\circ}\text{C}$ after dilution with 1 mM NaCl solution, applying the Smoluchowski equation. Measurements were carried out in triplicate. Colloidal stability in milliQ water at 20 $^{\circ}\text{C}$ was investigated by measuring the Pd NPs mean diameter over a period of 1 month (Figure S1)

Transmission electron microscopy

The morphology of the different palladium nanoformulations was examined by transmission electron microscopy (TEM). Briefly, 5 μ L of the Pd NPs suspension (1 mM) were deposited on a Lacey Formvar/carbon 300 mesh copper microscopy grid (Ted Pella). Most of the drop was removed with a blotting filter paper. Images were obtained using a JEOL JEM 100CXII transmission electron microscope at an accelerating voltage of 100 kV and for high resolution image, using a JEOL JEM 2010 instrument at 200 kV.

2. CELL VIABILITY STUDIES ON RAW264. 7 AND PRIMARY THYROCYTES

The cytotoxicity of Pd NPs was determined using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-3,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay, measuring mitochondrial dehydrogenase activity. Thyrocytes (10,000 cells per well in DMEM-F12 with 5% of FBS and 6 hormones) or Raw 264.7 cells (5,000 cells per well in DMEM with 10% FBS) were seeded in a 96-well plates at the appropriate cell concentration. Cells were allowed to adhere for 24 h at 37 °C. Then, fresh medium containing Pd NPs (0.01 μ M to 1 mM) was added and incubated for 24 h. MTT cell viability reagent (5 mg/mL; 20 μ L) was added to each well and the plates were incubated for 24 h at 37 °C. After 2 h incubation, the culture medium was removed, and the formed formazan crystals were dissolved in DMSO (200 μ L). Absorbance was measured using microplate reader (Metertech Σ 960, Fisher Bioblock, Illkirch, France) at 570 nm. The percentage of surviving cells was calculated as the absorbance ratio of treated to untreated cells.

3. SUZUKI-MIYAURA CROSS COUPLING REACTION WITH IODINATED AMINOACIDS CATALYZED BY Pd-NPs

To a suspension of the iodinated aminoacid (0.008 mmol) and boronic acid derivative (0.024 mmol, 3 equiv.) in Milli-Q water (370 μ L), was added phosphate buffer pH 8.0, 7.0 or 6.0 (200 mM, 50 μ L) and the suspension of Pd NPs (0.00008 mmol Pd, 80 μ L, 0.01 eq.). The reaction was mixed and shaken on a thermostated-shaker (bioSan TS-100) at 800 rpm (37 °C). After 2h, the reaction mixture was frozen in liquid nitrogen and freeze-dried. The crude product was taken up in MeOD and analyzed by ^1H -NMR. Typical ^1H NMR spectra of the obtained mixture are depicted in Figure S2-S3 in comparison with *N*-Boc-4-iodophenylalanine.

4. SUZUKI-MIYAURA CROSS COUPLING REACTION WITH BOVINE THYROGLOBULIN CATALYSED BY PVP-Pd NPs

Chemical reaction on bovine thyroglobulin catalyzed by palladium NPs.

To a solution of commercially available bovine thyroglobulin (50 μ L, 7.4 mg/mL, 1.21 nmol, 1 equiv.) (Sigma Aldrich) in PBS (Sigma Aldrich) pH 7.4, was added a solution of the biotiny cyclic triborate salt derivatives (0.366 mg, 605 nmol, 500 equiv.) in 16 mg/mL aqueous Na_2HPO_4 (7.5 μ L). The stock suspension of PVP-Pd NPs (7.5 μ L, 8 mM, 60.5 nmol, 50 equiv.) was then added and the mixture was shaken at 37 $^{\circ}\text{C}$. After 24 h incubation, 30 μ L of the reaction mixture were diluted with 30 μ L of Laemmli blue 2x (Bio-Rad), and the sample was heated at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 3 min and cooled at 4 $^{\circ}\text{C}$ before separation by SDS-PAGE gels (Figure S4)

Sample preparation for proteomic analysis

Bovine Tg sample from the reaction described previously was resolved by one dimensional SDS-PAGE (Bio-Rad). The gels were stained with Coomassie Blue (EZ Blue $^{\circ}$) (Sigma Aldrich). Proteins, 2.5 mm top to bottom bands at 250 kDa, were cut and then treated with 100 μ L of 100 mM dithiothreitol (DTT) at 56 $^{\circ}\text{C}$ for 45 min to reduce disulfide bonds. After a rapid wash with acetonitrile and a solution of NH_4HCO_3 in MilliQ water (25 mM), a solution of iodoacetamide (100 μ L, 55 mM) was added, and the samples were left in the dark for 30 min for cysteine alkylation. Finally, dry gel pieces were rehydrated with 15 μ L of 12 ng/ μ l of Sequencing Grade Modified Chymotrypsin solution (1 mg, Sigma Aldrich) in HCl (1 M) and incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ overnight. Peptides resulting from digestion were extracted with 20 μ L of 60% CH_3CN solution enriched with 0.1% HCO_2H . The samples were further analyzed by MS/MS-MS.

Mass spectroscopy of Tg Bovine

4 μ L of the peptides from the digested Bovine Tg sample were loaded at 20 μ L/min through a C18 enrichment cartridge (PepMap, 75 μ m $\times$ 15 mm, Thermo Scientific) and a C18 reversed-phase column (Pepmap, 75 μ m $\times$ 50 mm, Thermo Scientific) kept at 40 $^{\circ}\text{C}$. Capillary pump flow was set at 0.3 μ L.min $^{-1}$, with 3% of aqueous solvent A (97.9% H_2O , 2% CH_3CN , 0.1%

HCO₂H) and 97% of solvent B (80% CH₃CN, 19.9 %H₂O, 0.1% HCO₂H.). Nano pump flow rate was set at a 300 nL.min⁻¹ during the 53 min run. Starting at 1% of solvent B, elution was performed by a two-step linear gradient of solvent B percentage, from 1 to 35% over 47 min, followed by a quick wash of 98% solvent B and next by re-equilibration of the column. Eluted peptides were sprayed by nanospray ion source into the mass spectrometer in positive polarity mode. Peptide ions were analyzed using nano-UPLC. Full-scan mass spectra were measured from m/z 300 to 1400 ±10 ppm. Auto MS2 was activated for charge state +2 and +3 ions, allowing MS/MS scans on the 6 most abundant precursor ions with dynamic exclusion of previously selected ions. The activation type was collision induced dissociation (CID) with MS/MS normalized collision energy set at 35%.

Data processing

Peak lists were generated as mzXML files using MSConvert software (ProteoWizard 3.0). Mass spectrometric data were searched using X!TandemPipeline software version 0.2.24. Peptide searches were performed with the following parameters: a mass tolerance of 10 ppm on the parent ion and 0.5 Da for the MS/MS, precursor mass tolerance of ±10 ppm and fragment mass tolerance of 0.5 Da, static modifications of carbamidomethylated cysteine (+57.0215), potential modification of oxidized methionine (+15.9949), potential tyrosine post-translational modification: +125.8966 for moniodotyrosine (MIT); +251.7933 for diiodotyrosine (DIT); +76.0313 for monophenylated-tyrosine; +201.9229 for moniodo-monophenylated-tyrosine; + 152.0626 for diphenylated-tyrosine. Following chymotrypsin digestion, the maximum number of miss cleavages was set at 3. Bovine (and further rat and human) thyroglobulin sequences were downloaded from UniProt KB: sp|P01267|THYG_BOVIN to allow identification of protein. Under combined analysis mode, all peptides matched with a peptide E-value set at 0.05, allowing identification of each Tg with more 90% coverage.

5. SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF THE BIOTIN-CYCLIC TRIOLBORATE PROBE

The synthesis of the cyclic triolborate probe **4** was performed according to the scheme on Figure S.5 below. Briefly, the biotene amine **2** obtained from biotene according to the procedure described by Stewart *et al.*³ was first coupled using EDC/DMAP standard coupling conditions. Condensation of boronic acid pinacol ester **3** with 2-(hydroxymethyl)-2-methylpropane-1,3-diol in basic media afforded cyclic triolborate probe **4** in 34% overall yield.

Synthesis of 5-[(3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxo-hexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazolidin-4-yl]-N-{2-[2-(2-{[4-(tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]formamido}ethoxy)ethoxy] ethyl} pentanamide (4**).** To a solution of diisopropylamine (173 μ L, 1.06 mmol, 2 equiv.) and ethyl *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (152.4 mg, 0.8 mmol, 1.5 equiv.) in DMF (2 mL) was added dropwise a solution of 4-carboxyphenylboronic pinacol ester (156 mg, 0.63 mmol, 1.2 equiv.) in anhydrous DMF (2 mL). The mixture was stirred for 15 min at room temperature. A solution of biotene-PEG-NH₂ **2**² (200 mg, 0.53 mmol, 1 equiv.) and DMAP (6.5 mg, 0.053 mmol, 0.1 equiv.) in DCM (10 mL) was then added and the resulting mixture was stirred at room temperature. After 48h, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was washed with diethyl ether to provide the crude pinacol boronate **4** as a pale yellow pasty solid (223 mg, 70%) which was used directly in the next step. ¹H NMR Figure S6 (300 MHz, MeOD) δ : 7.83 (s, 4H, CH_{Ar}), 4.46 (dd, *J* = 7.5, 4.8 Hz, 1H, HNCONHCH), 4.28 (dd, *J* = 7.8, 4.5 Hz, 1H, HNCONHCH), 3.72-3.62 (m, 6H, CH₂O), 3.60 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, CH₂O), 3.56 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH₂NH), 3.38-3.34 (m, 2H, CH₂NH), 3.24-3.15 (m, 1H, CHS), 2.92 (dd, *J* = 12.8, 5.0 Hz, 1H, CH₂S), 2.71 (d, *J* = 12.8,

¹H, CH₂S), 2.20 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CON), 1.80-1.50 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CON) 1.47-1.38 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CON), 1.37 (s, 12H, (CH₃)₂CC(CH₃)₂) ppm; ¹³C NMR Figure S7 (75 MHz, MeOD) □: 174.70 (2C, CON), 136.70 (C, C_{Ar}), 134.33 (CH, CH_{Ar}), 126.07 (CH, CH_{Ar}), 84.03 (2C, (CH₃)₂CO), 69.92 (2CH₂, OCH₂), 69.20 (2CH₂, OCH₂), 61.94 (CH, HNCONHCH), 60.20 (CH, HNCONHCH), 55.53 (CH, CHS), 39.61 (CH₂, CH₂S), 39.5 (CH₂, CH₂NCO), 38.87 (CH₂, CH₂NCO), 35.32 (CH₂, CH₂CON), 28.29 (CH₂, CH₂CH₂CON), 28.06 (CH₂, CH₂CH₂CH₂CON), 25.37 (CH₂, CH₂CH₂CH₂CH₂CON), 23.8 (4CH₃, (CH₃)₂CC(CH₃)₂) ppm, the C-B was not detected. MS (ESI⁺): *m/z* (%) = 643.2 (100) [M + K]⁺, 627.3 (10) [M + Na]⁺, 605.3 (35) [M + H]⁺, 485.2 (45) [M - C₆H₁₀N₂OS + K]⁺.

Synthesis of potassium 4-methyl-1-(4-(12-oxo-16-((3a*R*,4*R*,6a*S*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-5,8-dioxa-2,11-diazaheptadecyl)phenyl)-2,6,7-trioxa-1-

borabicyclo[2.2.2]octan-1-uide (4). To a solution of pinacol boronate **4** (50 mg, 0.089 mmol, 1 equiv) in DMF/DMSO (1:1, 500 μL) was added 2-(hydroxymethyl)-2-methylpropane-1,3-diol (10.7 mg, 0.089 mmol, 1 equiv.), KOH (5 mg, 0.089 mmol, 1 equiv.) and water (2 μL, 0.089 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was stirred at 30 °C under argon atmosphere. After 4h, the mixture was added dropwise to diethyl ether (10 mL) in a Falcon[®] tube. The precipitate was centrifuged (4000 rpm, 10 min), and after supernatant removal, it was taken up into acetone and centrifuged once more (4000 rpm, 10 min). Acetone was then removed and the solid was dried under vacuum to provide the cyclic triolborate **4** as a white powder (48 mg; 85%). ¹H NMR Figure S8 (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.14 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, CONH), 7.80 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, CONH), 7.51 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.39 (d, *J* = 7.6 Hz, CH_{Ar}), 6.38 (s, 1H, NHCONH), 6.35 (s, 1H, NHCONH), 4.28 (br t *J* = 6.57 Hz, 1H, HNCONHCH), 4.11 (m, 1H, HNCONHCH), 3.58 (s, 6H, C(CH₂O)₃B), 3.52 (s, 6H, OCH₂CH₂O), 3.42-3.32 (m, 4H, CH₂O, CH₂NCO), 3.16 (t, *J* = 5.8 Hz, CH₂NCO), 3.10-3.02 (m, 1H, CHS), 2.77 (dd, *J* = 12.3, 7.2 Hz, 1H, CH₂S), 2.50 (m, 1H, CH₂S), 2.05 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂CONH), 1.70-1.20 (m, 6H, CH₂CH₂CH₂CH₂CONH), 0.49 (s, 3H, CH₃) ppm ¹³C NMR Figure S9 (75 MHz,

DMSO-d₆) δ 172.1 (C, CON), 167.4 (C, CON), 162.7 (C, NCON), 131.8 (CH, CH_{Ar}), 130.5 (C, C_{Ar}), 124.5 (CH, CH_{Ar}), 73.1 (3CH₂, C(CH₂O)₃B), 69.5 (CH₂, OCH₂), 69.4 (CH₂, OCH₂), 69.1 (CH₂, OCH₂), 68.9 (CH₂, OCH₂), 61.0 (CH, OCHNCH), 59.2 (CH, OCHNCH), 55.3 (CH, CHS), 38.4 (CH₂, CH₂CH₂NH), 35.0 (CH₂, CH₂CH₂NH), 34.6 (CH₂, CH₂CON), 28.1 (CH₂, CH₂CH₂CON), 28.0 (CH₂, CH₂CH₂CH₂CON), 25.2 (CH₂, CH₂CH₂CH₂CH₂CON), 16.2 (CH₃, CH₃C(CH₂O)₃B) ppm; the C-B was not detected and both the CH₂S methylene and the quaternary carbon of the triol were masked by the solvent pics; MS (ESI): m/z (%) = 605.2 (100) [M]⁻, 567 (30) ([M - CH₃C(CH₂OH)₃ + H₂O + 2MeOH]⁻, 5212 (23) ([M - CH₃C(CH₂OH)₃ + 2H₂O]⁻; HRMS (-ESI) calcd for C₂₈H₄₂BN₄O₈S⁻: 605.2816, found 605.2798; IR (neat, cm⁻¹): 3262, 3120, 2928, 2853, 1654, 1647, 1456, 1356, 1360, 1308, 1221, 1181, 1072, 973, 930, 837, 760.

6. ANALYSIS OF THE MODIFIED BOVINE THYROGLOBULIN BY WESTERN BLOT

Western Blotting with primary and secondary anti-bodies for the detection of Thyroglobulin

The separated proteins from SDS-PAGE gels (Method 4) were transferred to nitrocellulose. Membranes were saturated in 5% non-fat milk TRIS buffered saline TBS-Tween 0.1% (Bio-Rad) for one hour at room temperature and incubated with primary antibody (goat Anti-Tg from Santa Cruz Biotechnology N15 1:200 in 25 mL of blocking solution) overnight at 4 °C. After washing (3 x 20 min TBS-Tween 0.1%), horseradish peroxidase (HRP) secondary antibody (Donkey anti-goat from Santa Cruz Biotechnology 1:5000 25 mL of blocking solution) was added for 1 h at room temperature. After washing (3 x 20 min TBS-Tween 0.1%), detection of the modified Tg was achieved using the Clarity Western ECL Substrate (Bio Rad). Chemiluminescent signals were analyzed using the ChemiDoc™ (Figure S10-C).

Western Blotting with streptavidin for the detection of cross coupling reaction between Biotin probe and Thyroglobulin

The separated proteins from SDS-PAGE gels (Method 4) were transferred to nitrocellulose. Membranes were saturated in 5% non-fat milk TRIS buffered saline TBS-Tween 0.1% (Bio-Rad) for one hour at room temperature and incubated with streptavidin HRP (from Santa Cruz Biotechnology 1:10000 25 mL of blocking solution) overnight at 4 °C. After washing, detection was achieved using the Clarity Western ECL Substrate (Biorad). Chemiluminescent signals were analyzed using the ChemiDoc™ (Figure S10-D).

7. PRODUCTION OF NATURALLY IODINATED THYROGLOBULIN

Rat Thyroid homogenate

Thyroid rat homogenates were prepared according to the protocol describe by Römisch-Margl, W. *et al*⁴. Frozen samples from thyroid gland arising from three sacrificed rats were placed into 1.5 mL Eppendorf test tubes® containing MilliQ water with Complete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche Complete without EDTA) to a concentration of approximately 6 µL water/mg thyroid. The mixture was homogenized three times using an inox Turbospin at 6000 rpm for 30 s, with interval of 30 s on ice between each homogenization steps. The mixture was then centrifuged at 10000 rpm for 10 min at room temperature and the supernatant was recovered. The total protein concentration was determined by BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific).

Thyroglobulin detection in cellular lysate

3'000'000 FRTL, FRTL5 or PC-3 cells were lysed in 60 µL of RIPA Lysis and Extraction buffer (Thermo Fisher Scientific) with protease inhibitors (Roche Applied Science) at 0 °C for 30 min. The mixture was centrifuged 10 min at 10'000 rpm. The total protein content was determined by bicinchoninic acid BCA assay .The cellular lysate was diluted in PBS

buffer 25 μ L and 25 μ L of Laemmli buffer 2x (Bio-Rad) to provide a 1 μ g/ μ L solution of total proteins and then heated to 95 °C for 3 min. 30 μ L of each cellular lysate and rat thyroid homogenate sample (12 μ L for Bovine Tg) were separated by SDS-PAGE on 4-15% Bis–Tris polyacrylamide gel (Bio-Rad) with SDS 1x running buffer. The proteins were revealed with EZ-Blue© (Sigma Aldrich) stain and then extensively washed with water. The separated proteins from SDS-PAGE gels, were transferred to Polyvinylidene difluoride PVDF membranes 0.2 μ m (Bio-Rad), and blots were incubated in blocking solution containing 5% milk and 0.1% Tween 20 (Bio-Rad) in Tris-saline buffer, pH 7.6 (TBST) overnight at 4 °C. The membranes were then incubated with primary antibody (1:350) Goat Anti-Tg N15 in 25 mL of blocking solution. Blots were washed five times in TBST at room temperature for 10 min. Afterwards, the membranes were incubated with a secondary antibody (1:5000) Donkey AntiGoat (Ati Tg) Ig conjugated to HRP in 25 mL of blocking solution. Blots were washed five times at room temperature in TBST for 10 min and the blotting proteins were detected after 4 min membrane incubation with the detection solution (Clarity™ Western ECL Substrate). Chemiluminescent signals were analyzed using the MF-ChemiBis system (Figure S11).

Thyroid homogenization from patient tissue

Human thyroid homogenates were prepared according to the protocol described above for rat thyroid homogenate. Frozen samples from thyroid gland arising from surgical thyroidectomy of three Grave's disease patients (50–150 mg) were placed into 15 mL Falcon tubes® containing MilliQ water with Complete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche Complete without EDTA) to a concentration of approximately 6 μ L water/mg thyroid. The mixture was homogenized three times using an inox Turbospin at 6000 rpm for 30 s, with interval of 30 s on ice between each homogenization steps. The mixture was then centrifuged at 10000 rpm for 10 min at room temperature and the supernatant was recovered. The total protein

concentration was determined by BCA Protein Assay and thyroglobulin concentration by (Tg) ELISA Kit.

Sample Preparation for proteomic analysis

Cellular lysate from FRTL and human thyroid homogenate were analyzed by proteomic according the protocol described in Method 4 for bovine Tg.

Data processing

Data processing were performed in a similar manner as for bovine Tg (Method 4). Rat and human thyroglobulin sequence were downloaded from UniProt KB: sp|P06882|THYG_RAT, sp|P01266|THYG_HUMAN to allow identification of protein. Under combined analysis mode, all peptides matched with a peptide E-value set at 0.05, allowing identification of each Tg species with more 90% coverage.

8. SUZUKI-MIYAURA CROSS COUPLING OF HUMAN Tg CATALYZED BY PVP-Pd NPs IN PATIENT TISSUE HOMOGENATE

Chemical reaction in human thyroid gland homogenate catalyzed by palladium NPs

To a solution of thyroglobulin from human thyroid homogenate (50 μ L, 7.4 mg/mL, 1.21 nmol, 1 equiv.) in pH 7.4 PBS was added a solution of the cyclictrioborate salt derivative (0.147 mg, 605 nmol, 500 equiv.) in 16 mg/mL aqueous Na₂HPO₄ (7.5 μ L). Stock suspension of PVP-Pd NPs (7.5 μ L, 8 mM, 60.5 nmol, 50 equiv.) was then added and the mixture was shaken at 37 °C. After 24 h incubation, 30 μ L of reaction mixture were diluted into 30 μ L of Laemmli blue 2x, and the sample was heated at 95 °C for 3 min and cooled at 4 °C before separation by SDS-PAGE gels (Figure S12).

SUPPLEMENTARY TABLES

Table S1 Volume required for the preparation of Pd:CPCI NPs

Pd:CPCI molar ratio	Volume of CPCI Solution (mL)	Volume of Milli-Q water (mL)
1:1	5	0
5:1	1	4
10:1	0,5	4,5

Table S2 Iodinated peptides detected in Bovine, Rat and Human thyroglobuline

Protein	Iodinated Peptides detected
Tg Bovine (purified)	32
Tg Ratus (from FRTL cells)	1
Tg Human (from homogenate)	19

Table S3 Iodinated and phenylated tyrosines in human Tg

Residues	Iodinated peptides detected	Phenylated peptides detected
Y24	MI, DI	
Y48	Not detected	MIP
Y108	Not detected	DP
Y116	MI	
Y126	MI	
Y149	MIT, DIT	
Y211	Not detected	MP
Y277	Not detected	MP
Y626	MI	
Y785	MI	
Y866	MI	
Y1027	Not detected	DP, MP
Y1445	Not detected	MP
Y1310	MI	
Y1677	MI,	
Y1705	DI	
Y2157	MI	MIP, MP
Y2184	MI	
Y2283	MI	
Y2335	DI	
Y2478	MI	MP
Y2540	MI, DI	DP
Y2637	Not detected	MIP, MP
Y2573	MI, DI	
Y2697	DI	
Y2721	DI	
Y2767	MI, DI	

MI: mono-iodinated, DI, Diiodinated, MP: monophenylated, DP: diphenylated; MIP Monoiodinated monophenylated,

SUPPLEMENTARY FIGURES

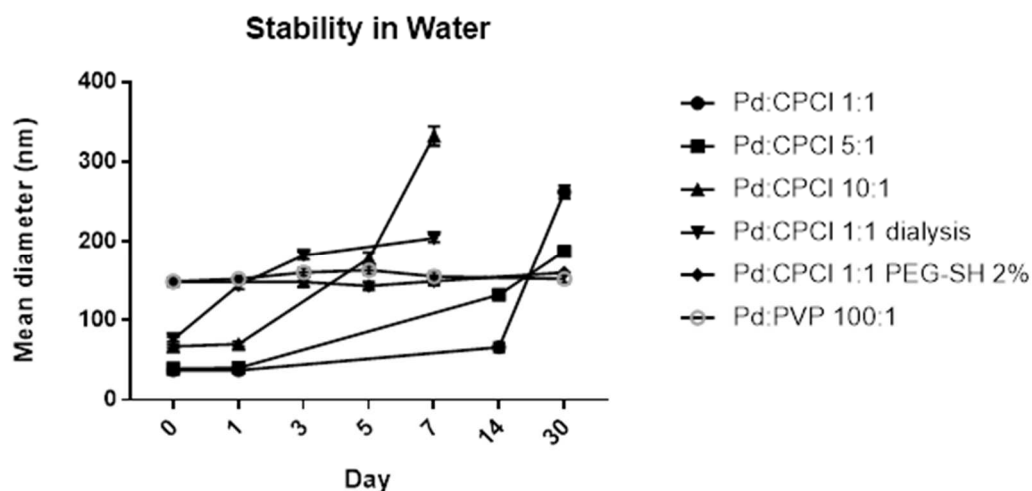


Figure | S1. Evolution of the mean diameter of different nanoformulations of Pd NPs at 25 °C in milli-Q water, as measured by DLS. The 1:1 Pd:CPCI dialyzed and 10:1 Pd: CPCI samples precipitated to a certain extend after 7 d and 14 d, respectively

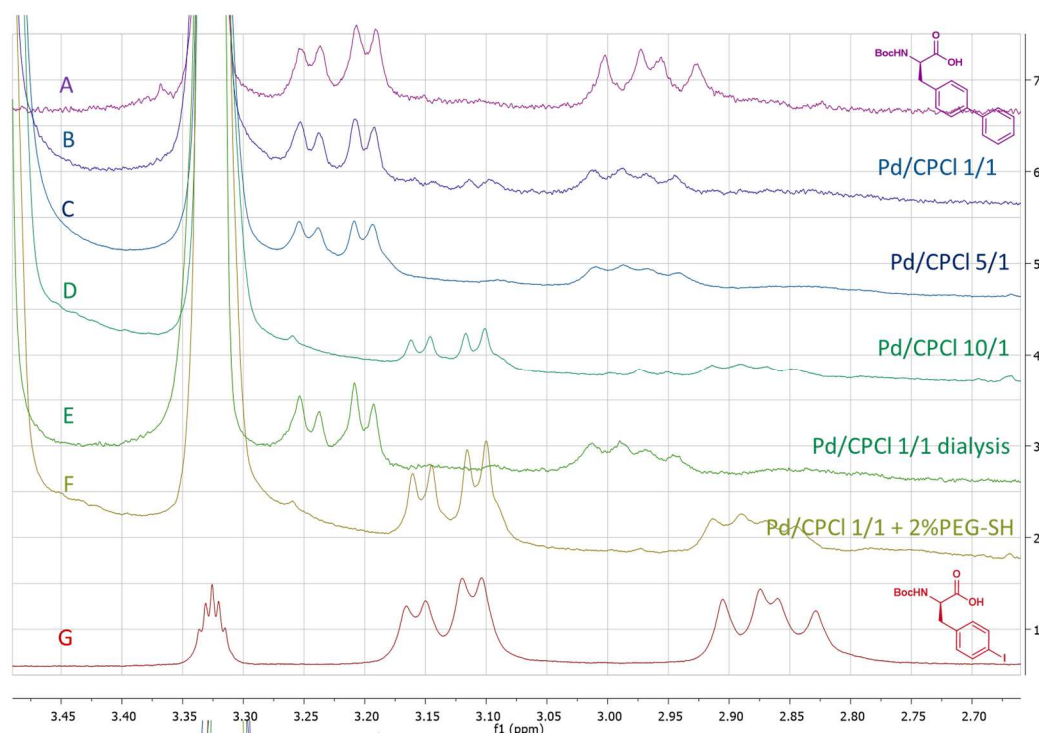


Figure | S2. NMR stacking spectrum of the C-3 methylene protons of phenylamine at 2.90-3.30 ppm with the various catalysts at pH 8. A N-Boc-biphenylalanine (purple), B-F Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction catalyzed by urchins Pd:CPCI 1:1 (blue), 5:1 (light

blue), 10:1 (turquoise), 1:1 after dialysis (green), 1:1 + 2% PEG-SH (light green) and **G** *N*-Boc-4-iodophenylalanine (red)

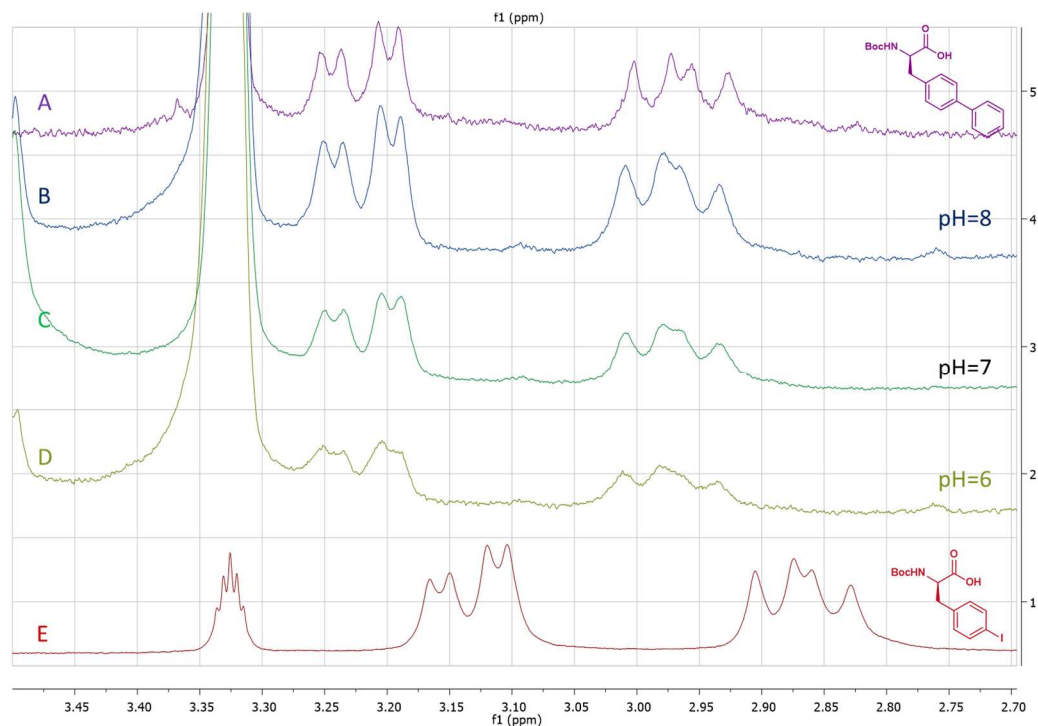


Figure | S3. NMR stacking spectrum of the C-3 methylene protons at 2.90-3.30 ppm with Pd:PVP NPs 100:1 at different pH. A *N*-Boc-biphenylalanine (purple), **B-D** Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction catalyzed by PVP-Pd NPs at pH = 8 (blue), pH = 7 (green), pH = 6 (light green) and *N*-Boc-4-iodophenylalanine (red).

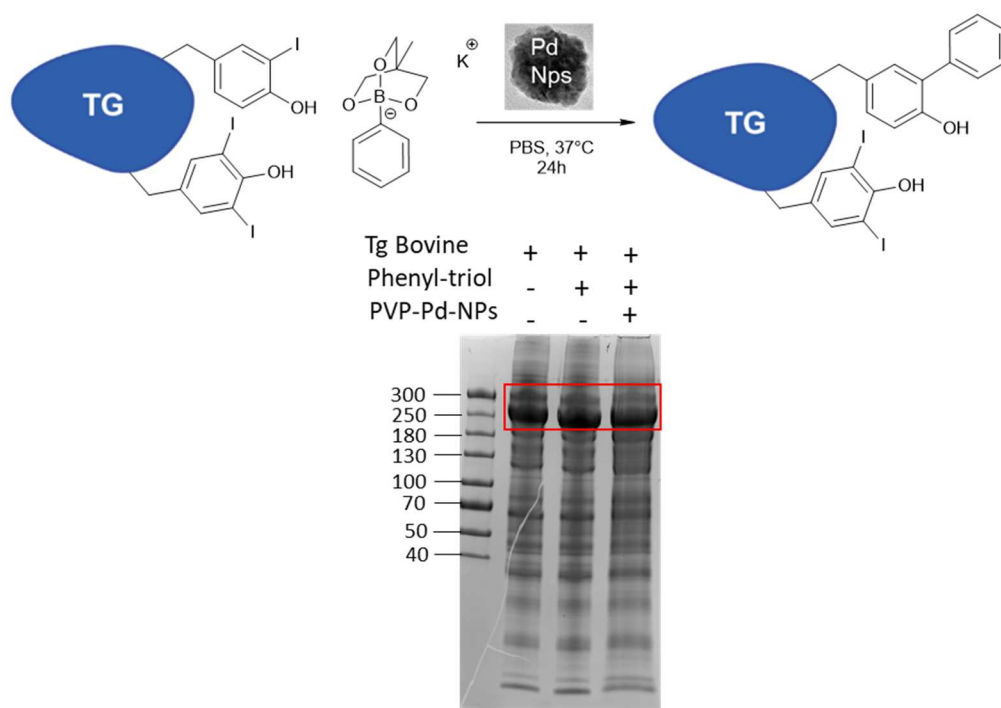


Figure | S4. EZ Blue staining 1D-SDS Page gels of bovine thyroglobulin

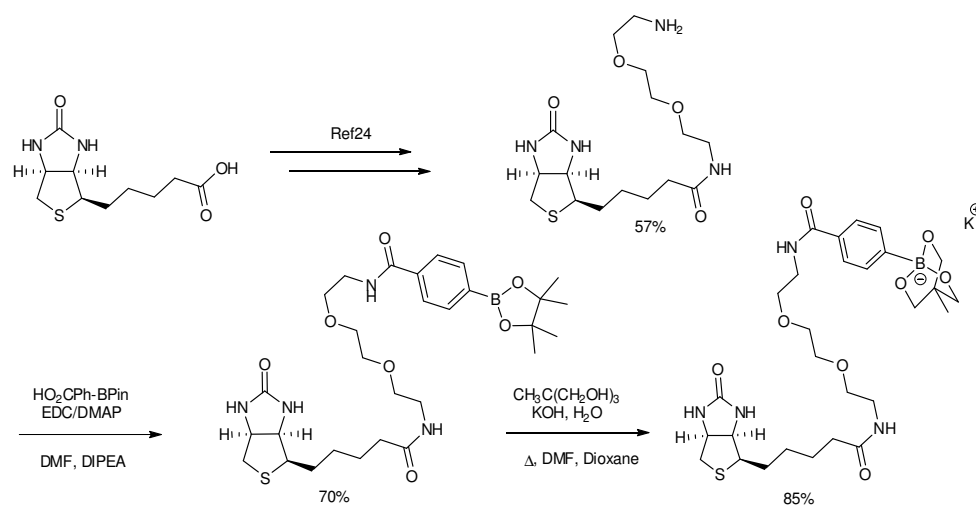


Figure | S5. Synthetic scheme of the biotinylation of the cyclic triolborate probe 4

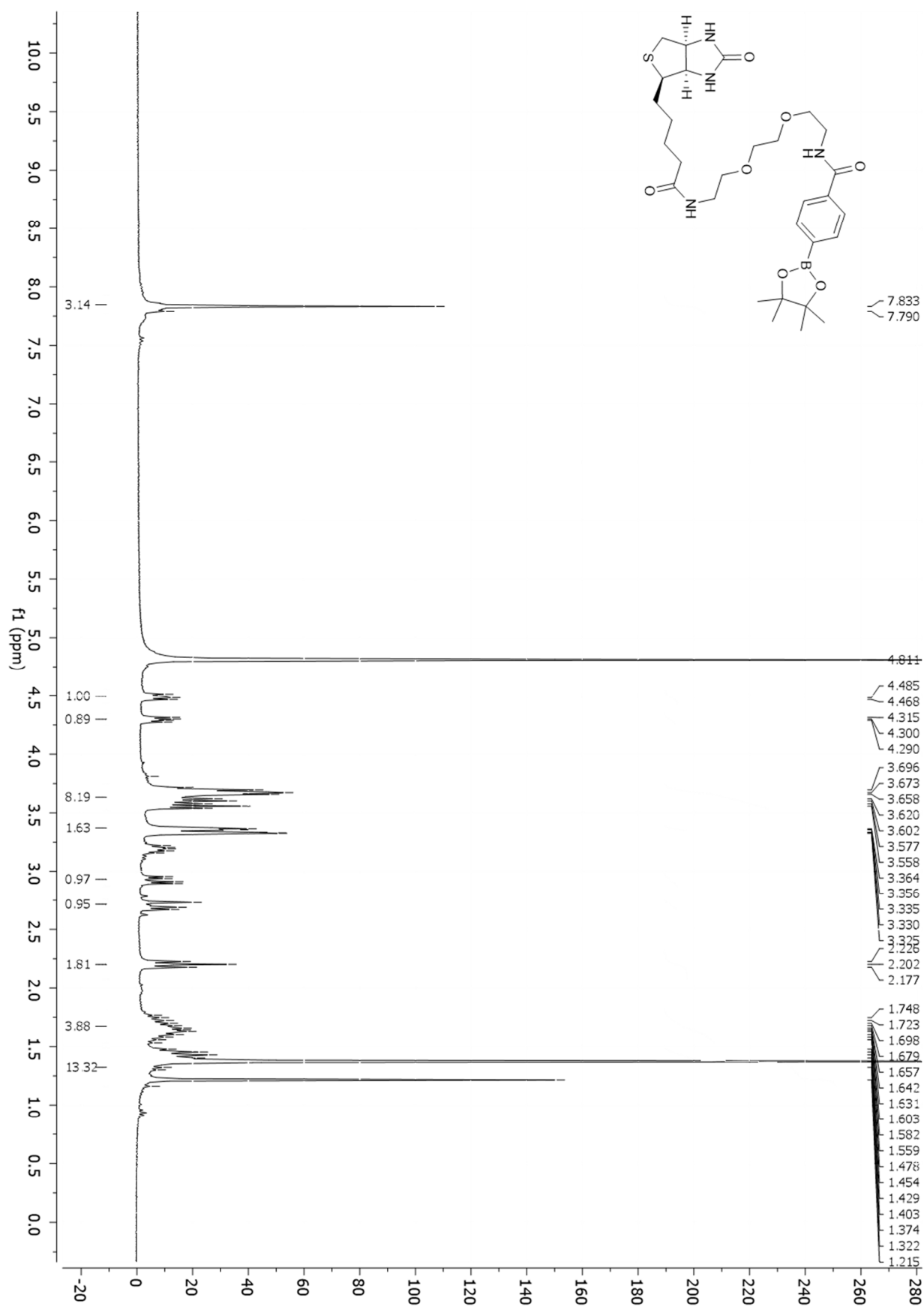


Fig S6. ¹H NMR Spectrum of the pinacol boronate biotin compound.

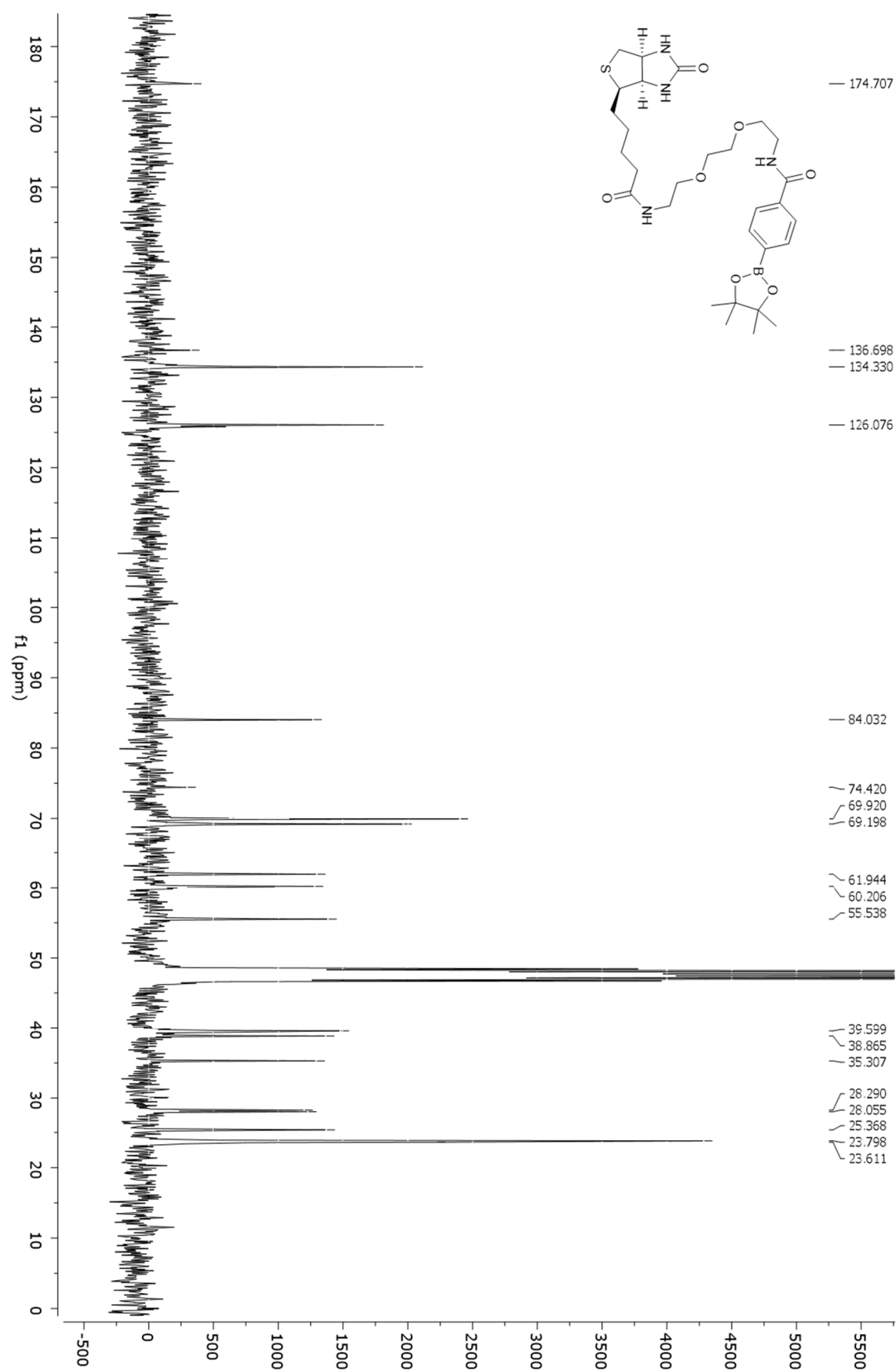


Fig S7. ¹³C NMR Spectrum of the pinacol boronate biotin compound.

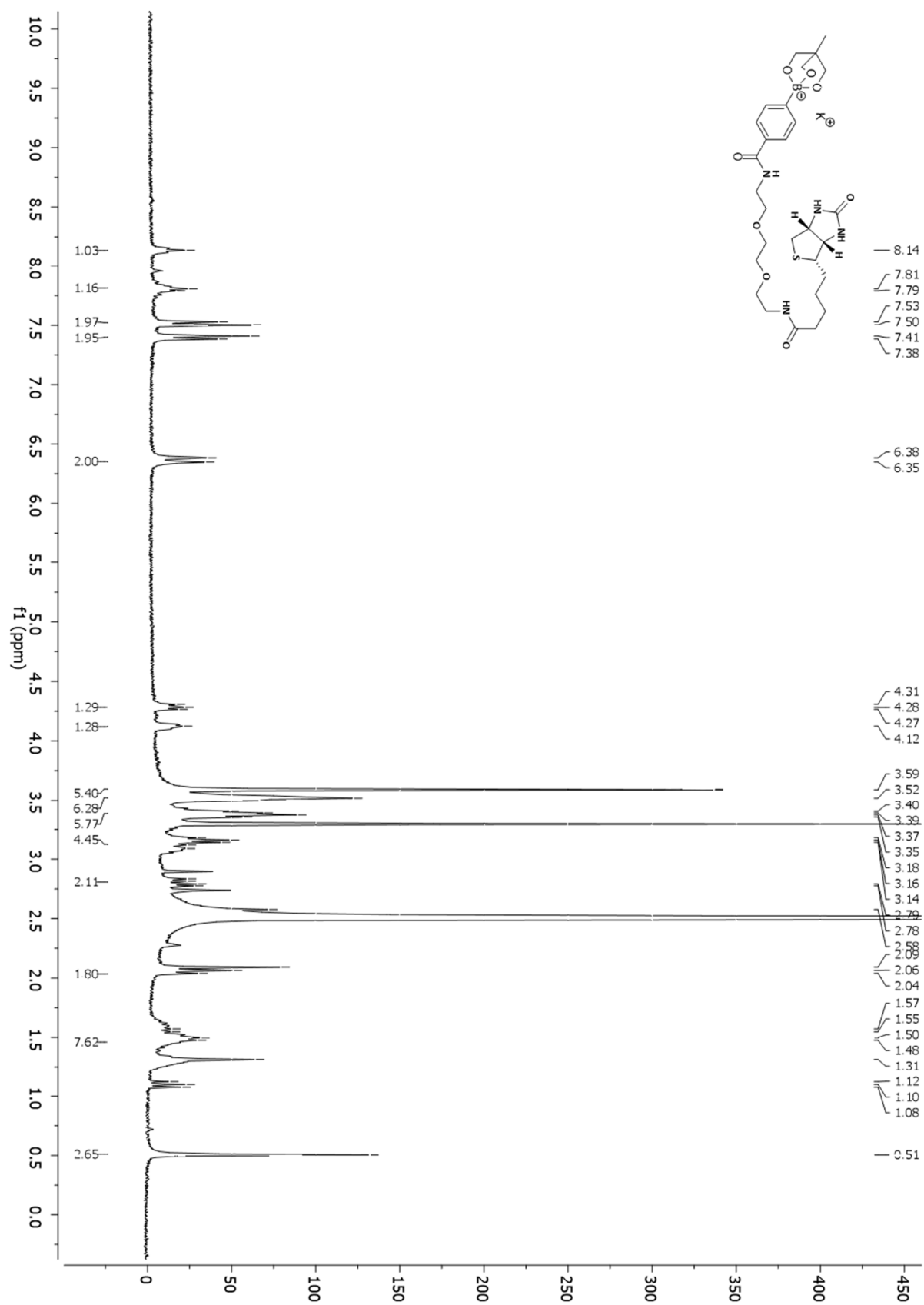


Figure | S8. ¹H NMR Spectrum of the cyclic triolborate biotine probe.

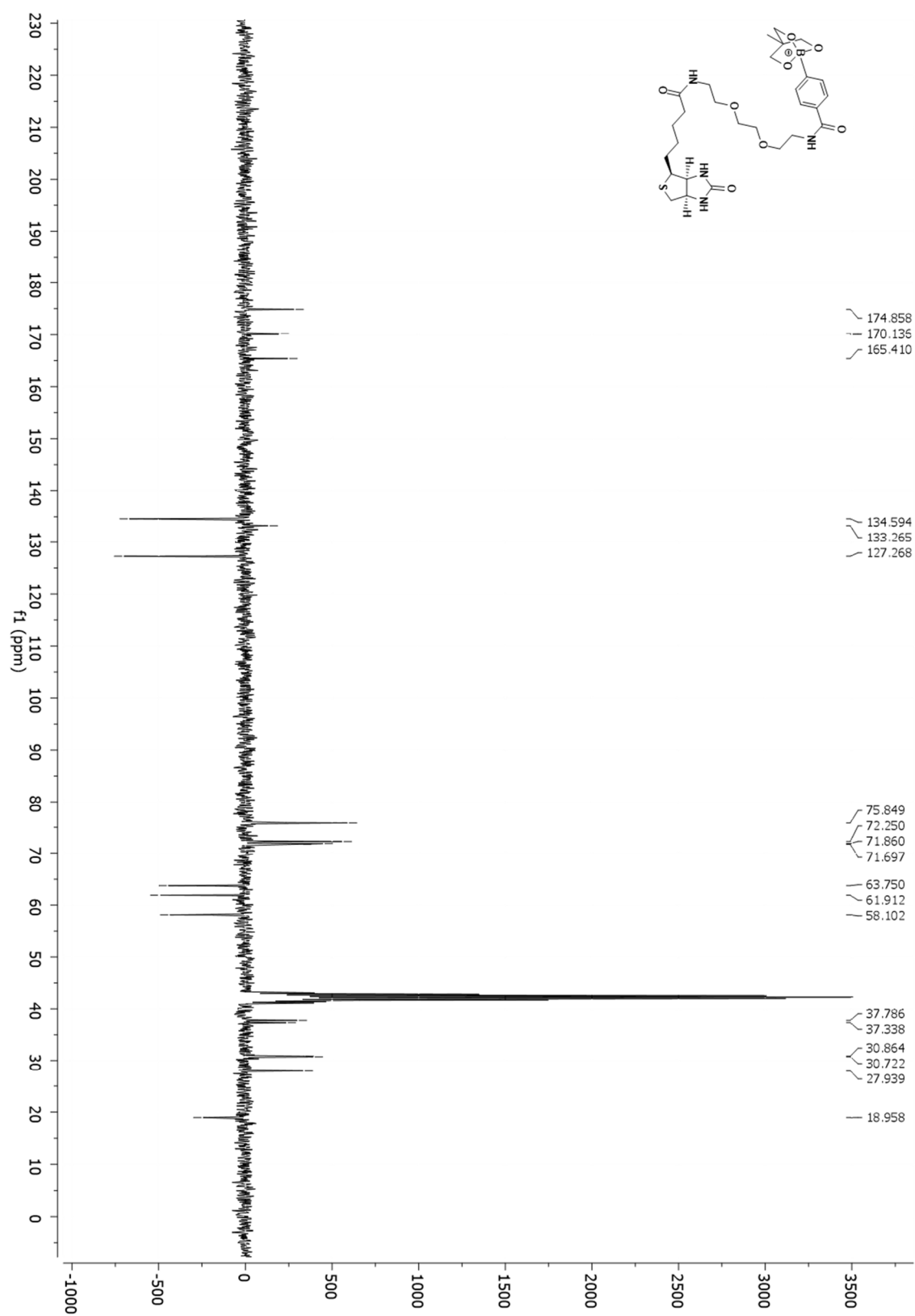


Figure | S9. ¹³C NMR Spectrum of the cyclic triolborate biotine probe.

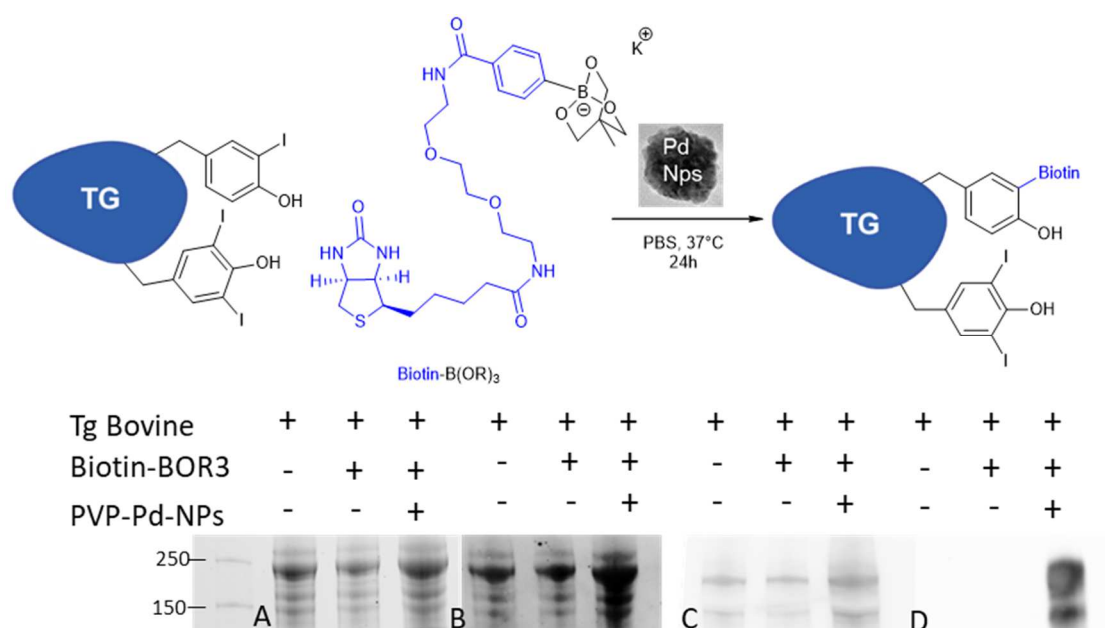


Figure | S10: Synthetic scheme of the reaction of the biotine triolborate probe with the iodinated bovine Tg and Western-Blot analysis. A Separation of proteins by 1D-SDS Page gel (Stain Free image); B Stain free image after protein transfer, C Detection of bovine Thyroglobulin on nitrocellulose membrane was probed with 1 goat Anti-Human Thyroglobulin Monoclonal Antibody followed by HRP-conjugated Anti-goat Secondary Antibody. The specific band was detected for Thyroglobulin around 250 kDa; D Detection of Tg modification on nitrocellulose membrane probe with streptavidin-HRP.

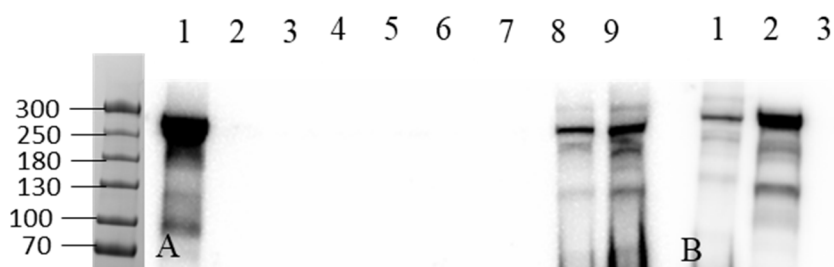


Figure | S11: Detection of thyroglobulin in FRTL and FRTL5 cell lysates (Western Blot).

Detection of Thyroglobulin on PVDF membrane was probed with Anti-Thyroglobulin N-15, follow by Donkey anti-goat IgG HRP-conjugated. The specific band was detected with MF-ChemiBis system around 300 kDa for Thyroglobulin. [A] 1-Rat Thyroid homogenate (positive control) FRTL-5line Lysates: 2-with no inhibitor of Tg (Thunicamycin); 3-Lysate with thunicamycin; 4-Lysate with TSH added after 24h; 5-Lysate with TSH added after 24h and Tunicamycin; 6-Lysate with No TSH and No Thunicamycin; 7-Lysate from Prostate Cancer 3 cell line lysate (negative control); 8-Bovine Tg (16 μ g), 9- Bovine Tg (42 μ g)). [B] 1-Bovine Tg 112 μ g (positive control); 2-FRTLCellular lysate3-PC-3 Cellular lysate (negative control)

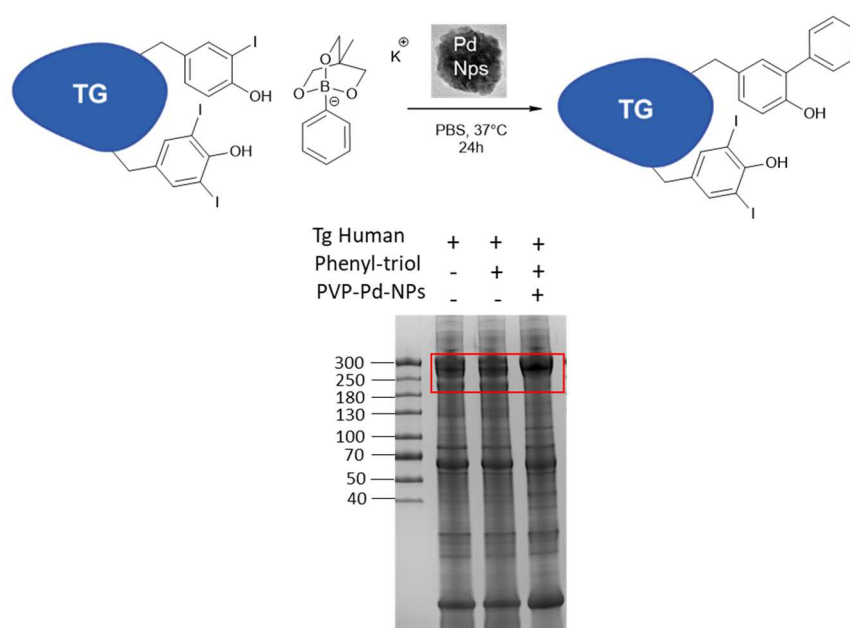


Figure | S12. EZ Blue staining 1D-SDS Pages gels of human thyroid gland homogenate

REFERENCES

1. Ambesi-Impiombato, F. S.; Parks, L. A. M.; Coon, H. G, Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 3455-3459 (1980).
2. Ksar, F., Sharma, G. K., Audonnet, F., Beaunier, P. & Remita, H. Palladium urchin-like nanostructures and their H₂ sorption properties. *Nanotechnology* **22**, doi:10.1088/0957-4484/22/30/305609 (2011).
3. Stewart, J. A., Piligian, B. F., Rundell, S. R. & Swarts, B. M. A trifunctional cyclooctyne for modifying azide-labeled biomolecules with photocrosslinking and affinity tags. *Chem. Commun.* **51**, 17600–17603 (2015).
4. Römisch-Margl, W. *et al.* Procedure for tissue sample preparation and metabolite extraction for high-throughput targeted metabolomics. *Metabolomics* **8**, 133–142 (2012).

Chapitre 4 : Auto-assemblage
nanoparticulaire de calixarènes
porteurs de complexes
carbéniques du palladium :
Application à la catalyse de la
réaction de Suzuki-Miyaura
dans l'eau

Découverts fortuitement par A. Zinke en 1944, les calixarènes sont des polycycles formés d'unités phénoliques, reliées par un pont méthylène en ortho de la fonction hydroxyle.^[1] Ces molécules en forme de vase ont fait l'objet de nombreuses recherches dans le domaine de la catalyse, en particulier grâce à leur cavité permettant de créer des complexes d'inclusion facilitant la réactivité. Le Dr Vincent Huc de l'ICMO a développé des benzyloxycalix[8]arenes originaux portant une sous unité palladium-carbénique (NHC-Pd) sur chacun des 8 phénols. Ces molécules possèdent une activité catalytique remarquable sur la réaction de Suzuki-Miyaura en milieu organique.^[2] Des conversions complètes sont observées dans des couplages aryle-aryle ou aryle-hétéroaryle avec des quantités de catalyseur aussi faible que 0.001 mol%. Néanmoins, V. Huc souhaitait élargir le champ d'application de ses catalyseurs à des réactions en phase aqueuse. C'est dans ce cadre que nous avons engagé une collaboration mettant à profit l'expertise de l'Institut Galien dans le domaine de la nanoformulation et des réactions de Suzuki dans l'eau.

Dans ce chapitre sous forme d'une publication en cours de rédaction, nous présentons le développement d'une formulation nanoparticulaire de ces benzyloxycalix[8]arene-NHC-Pd et la réactivité des nanoparticules sur la réaction de Suzuki-Miyaura en phase aqueuse entre des dérivés halogénés solubles et des triolboronates cycliques aromatiques.

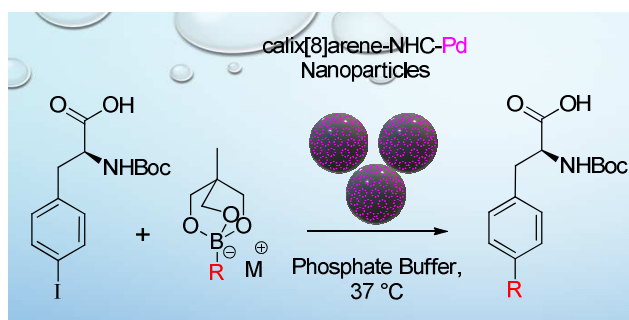
- [1] A. Zinke; E. Ziegler, Zur Kenntnis des Härtungsprozesses von Phenol-Formaldehyd-Harzen, X. Mitteilung, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1944**, 77, 264-272.
- [2] I. Abdellah, P. Kasongo, A. Labattut, R. Guillot, E. Schulz, C. Martini, V. Huc. Benzyloxycalix[8]arene: a new valuable support for NHC palladium complexes in C–C Suzuki–Miyaura Couplings. *Dalton Trans.* **2018**, 47, 13843-13848.

A Self-Assembling Palladium-Loaded Calixarene as a Potent Catalyst for the Suzuki-Miyaura Cross-coupling Reaction in Water

Arnaud Peramo^a, Ibrahim Abdellah^b, Shanon Pecnard^a, Julie Mougin^a, Cyril Martini^b, Patrick Couvreur^a, Vincent Huc^{b*} and Didier Desmaële^{a*}

^aInstitut Galien Paris Sud, CNRS UMR8612, Université Paris Sud, Univ. Paris Saclay, 5 rue Jean-Baptiste Clément 92290 Chatenay-Malabry, France

^bInstitut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay, CNRS UMR8182, Université Paris Sud, Université Paris Saclay, Bâtiment 420, 91405 Orsay, France.



ABSTRACT: Nanoformulated calix[8]arenes functionalized with N-heterocyclic carbene (NHC)-palladium complexes were found to be efficient nano-reactors for Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions of iodo and bromoaryl compounds with cyclic triol arylborates in water. Combined with a one-step synthesis of triol arylborates from boronic acid, this remarkably efficient new tool provided a variety of 4'-arylated phenylalanines and tyrosines in good yields at low catalyst loading.

Introduction

The Suzuki-Miyaura reaction has emerged as one of the most powerful tool for C-C bond formation because of its compatibility with a broad range of functional groups giving rise to numerous applications throughout organic chemistry, synthesis of pharmaceutical compounds¹ and materials science.² Aqueous Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions are particularly promising due to the water tolerance of boronic acids compared with the organometallic reagents required for other cross-coupling protocols. As a consequence the Suzuki-Miyaura reaction has been widely developed under homogenous or heterogeneous catalytic conditions in water media, and a large array of different ligands and palladium complexes have been designed to increase solubility and efficiency under aqueous conditions.³ The water and functional group tolerance of the Suzuki-Miyaura reaction culminated in the cross-coupling of iodoarylated proteins under physiological conditions opening the way to a realm of chemical-biology applications.⁴ Reactions in water are not restricted to those with biomolecules: due to water's ideal properties (abundance, environmental compatibility, non-toxicity and nonflammability) a wide range of catalytic and organic reactions have been developed in water as solvent.⁵ In this context, calixarene macromolecules have been used for Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions as supports for palladium catalyst. In particular calix[4]arenes bearing phosphine or N-heterocyclic carbene (NHC) ligands have demonstrated good catalytic efficiencies in this reaction.⁶ There are a few examples of the use of calix[4]arenes as catalyst supports in mixtures of water and dioxane,^{6b} however, to our knowledge no reactions in pure water have been reported using unsupported calixarene. Recently, the synthesis of a large-cavity calix[8]arene anchoring eight NHC-palladium catalytic heads (Pd-Calix, Figure 1) was reported.⁷ This catalyst demonstrated good catalytic properties for Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions with bromoarenes in green solvent such as ethanol but the Pd-Calix was also tested in water/organic mixtures giving promising results. On the other hand this catalyst was found much less efficient in pure water.⁷

Assuming that nanoparticles embedding the Pd-Calix (Figure 1) would show improved catalytic efficiency over the bulk material, a nanoformulation of this Pd-Calix was realized. Herein we describe the use of Pd-Calix nanoparticles (Pd-Calix-NPs) as an efficient catalyst for the Suzuki-Miyaura reaction in aqueous solution at 37 °C. A variety of water-soluble boronates were obtained in a one-step process from boronic acids and their reactions with different haloarenes under Suzuki-Miyaura cross-coupling conditions using the Pd-Calix-NPs are described.

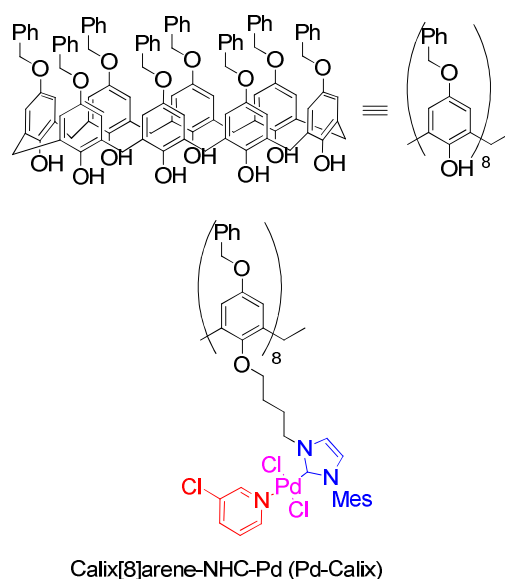


Figure 1. General structure of calix[8]arenes (top) and structure of the calix[8]arene bearing eight NHC-palladium units (Pd-Calix) (bottom).

The calix[8]arene-NHC-Pd catalyst was synthesized according to the method previously reported.⁷ Briefly, chloro-butyl appendages were first bound to the eight free phenol groups of benzyloxycalix[8]arene and the chlorides displaced with 3-(mesityl)-2,3-dihydro-1H-imidazole. The palladium carbene complexes were next generated with palladium chloride in the presence of potassium carbonate and 3-chloropyridine as extra ligand. Formulation of Pd-Calix was first performed using the nanoprecipitation/solvent evaporation method using THF as organic solvent.⁸ Nanoparticles with a 116 nm average hydrodynamic diameter were obtained as revealed by dynamic light scattering (DLS) (Table 1). Unfortunately, this formu-

lation was found quite unstable after few days. To address this problem the emulsion-solvent evaporation method was attempted using CH_2Cl_2 to solubilize the catalyst.⁹ The organic phase was poured into an aqueous solution containing sodium cholate (1.5%) as surfactant, the two phases were emulsified by sonication and the solvent was evaporated. Monodisperse NPs with a mean diameter of 112 nm (Z average determined by DLS) and a polydispersity index (PDI) of 0.2 were thus obtained. The formulation was found stable upon 30 days storage thanks to their quite negative zeta potential (Table 1). CryoTEM imaging revealed spherical NPs in line with DLS measurements (Figure 2).

Following our early finding that palladium stabilized PLGA-PEG NPs were an efficient catalyst for the Suzuki-Miyaura couplings of 4-iodophenylalanine with phenylboronic acid derivatives, we chose to evaluate the present catalyst in the same model reaction.¹⁰ Thus, reaction of N-Boc-4-iodo-L-phenylalanine (1a) with phenylboronic acid in the presence of 0.005 mol% of Pd-Calix-NPs in pH 8.0 phosphate buffer at 37 °C reached 40% conversion into diphenylalanine 3 after 3 h. Although boronic acids are the originally used organoboron derivative for Suzuki-Miyaura reaction, they suffered from some drawbacks such as protodeboronation and oxidation. More nucleophilic organo-boron reagents were thus developed with an improved stability and reactivity profile.¹¹ Among them, potassium phenylfluoroborate¹² and N-methyliminodiacetic acid phenylboronates (MIDA)¹³ provided very low conversion rate or no reaction. On the other hand, cyclic triol phenyl-borate¹⁴ turned out to give a full conversion in 3h (Table 2). Such a superior reactivity of borate salts squared with our previous results with Pd NPs stabilized by PLGA-PEG in water.¹⁰

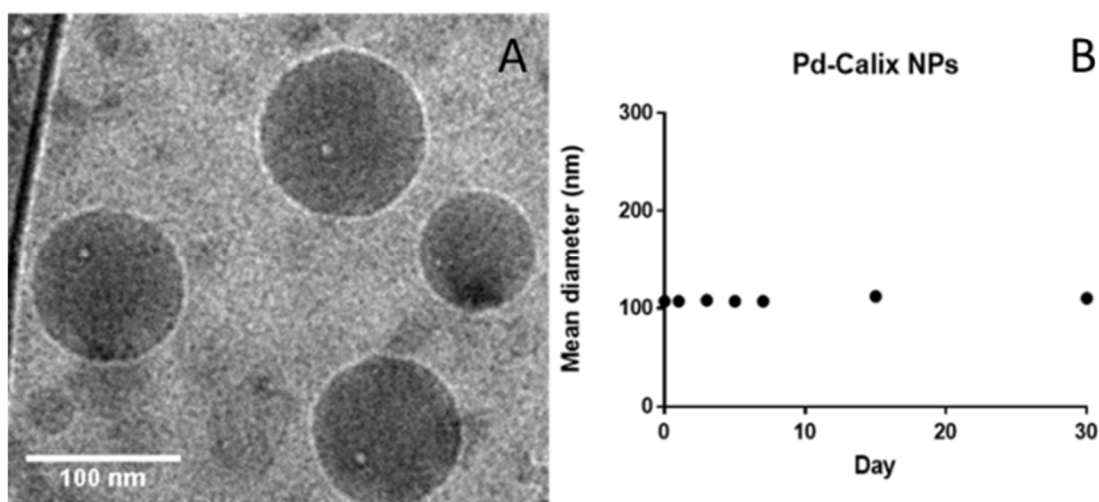


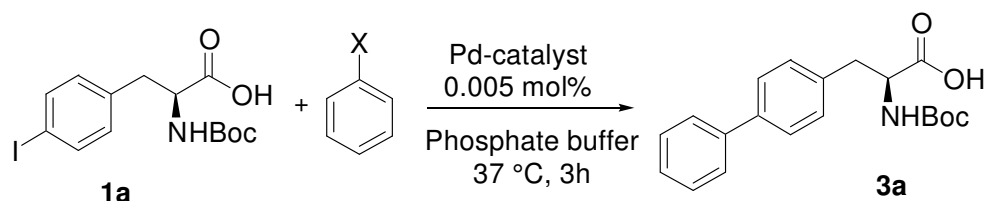
Figure 2. A: Cryo-TEM images of Pd-Calix-NPs prepared by emulsion-solvent evaporation; B: Evolution of the mean diameter of Pd-Calix-NPs upon incubation at 25 °C in water over one-month.

Table 1. Size, polydispersity index (PDI) and ζ -Potential of the Pd-Calix-NPs as measured by dynamic light scattering according to the method of preparation.

Method of formulation	Size (nm)	PDI	ζ -Potential (mV)
Nanoprecipitation	116	0.18	-3.14
Emulsion evaporation	112	0.21	-16.8

The hydrolytic stability of the cyclic triol borate derivatives in the reaction conditions (checked by NMR in D₂O-PBS) must be emphasized and clearly accounted for the efficiency of the process. To evaluate the influence of the nanoformulation, the bulk catalyst was used at the same concentration on the same benchmark reaction. However, less than 10% of conversion was observed highlighting the tremendous impact of the nano-reactor design on the catalysis efficiency. Interestingly, the amount of catalyst can be further diminished to 0.001 mol% on small scale reactions (3-4 mg) without reducing the overall conversion rate, highlighting the remarkable catalytic efficiency of the pre-sent nanoformulation.

Table 2. Influence of the organoboron derivative on the cross-coupling reaction of *N*-Boc-4-iodo-*L*-phenylalanine

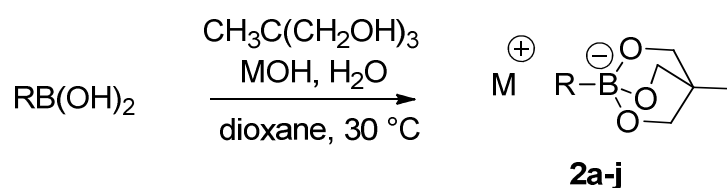


Entry	Pd catalyst	X	Conv (%) ^a
1	Pd-Calix-NPs	B(OH) ₂	40
2	Pd-Calix-NPs	BF ₃ ⁻ K ⁺	10
3	Pd-Calix-NPs		0
4	Pd-Calix-NPs		98
5	Pd-Calix		<5

N-Boc-4-iodo-*L*-phenylalanine (1 equiv.), boronic acid derivatives (3 equiv.), Pd-Calix-NPs (0.005 mol%), phosphate buffer (20 mM, pH = 8), 37 °C for 3h. ^a Conversion determined by ¹H NMR analysis of the C-3 methylene signal.

Having identified the best organo-boron partner we turned our efforts to expand the scope of the process to water soluble aryl halides. The results obtained using various halides with cyclic triol phenylborate 2a and 0.005 mol% of Pd-Calix-NPs as catalyst are summarized in Figure 3. The influence of the halide was briefly investigated. 4-Iodo- and 4-bromophenylalanine underwent reaction with similar high yield. By contrast the chloride derivative 1c was found completely unreactive. In addition to amino acid derivatives, we investigated several water soluble simple aromatic halides. The presence of carboxylic acid, phenol or amino groups on the arene ring did not affect the reaction, the main limitation being the solubility of the starting material in water. Even 2-iodoaniline underwent the desired coupling although at lower rate.

The influence of the structure of the cyclic triol borate was next explored. The requisite derivatives were obtained in a one-step process from boronic acids by a simple stir-ring in the presence of 1 equiv. of KOH in dioxane at 30 °C. The desired compounds were then isolated by simple filtration. This new method was found more convenient than the original procedure involving azeotropic distillation of the formed water and was amenable to large laboratory scale preparation.¹⁴ The bench-stable borate salts were thus obtained in good yields with a variety of aryl and heteroaryl compounds (Table 3). Hindered or electron poor boronic acids required longer reaction time (compounds 2g, 2h). Replacement of KOH base by another alkaline earth metal afforded the corresponding metal borate salt in similar yield (compounds 2b-d). On the other hand, the poorly crystallizing tetrabutylammonium cyclic triol borate (2e) was obtained in only 20% yield.



^a The reaction was conducted at 60 °C

With the small library of cyclic triol borate salts in hand, their reaction with N-Boc-4-iodo-L-phenylalanine was next examined (Table 4). The screenings of the influence of the counter anion clearly established that potassium and at a lesser extend sodium salts were the most effective. On the other hand the NBu₄ counter ion was found detrimental to the efficiency of the coupling. It appears that electron withdrawing group on the aromatic ring or steric hindrance made the reaction slower. Nevertheless both, 3'-nitrodiphenylalanine (3l) and [(2'-methylphenyl)phenyl] alanine (3k) were isolated with a good yield by prolonging the reaction time to 16 h. Moreover, when the pH was reduced to 7 and 6 the coupling still took place with only a small reduction of yield (Entries 2 and 3). The latter result may be useful for substrates poorly soluble at basic pH and to conduct reaction at physiological pH. Heterocyclic triolborates could also be used affording 2i,j in satisfactory yields.

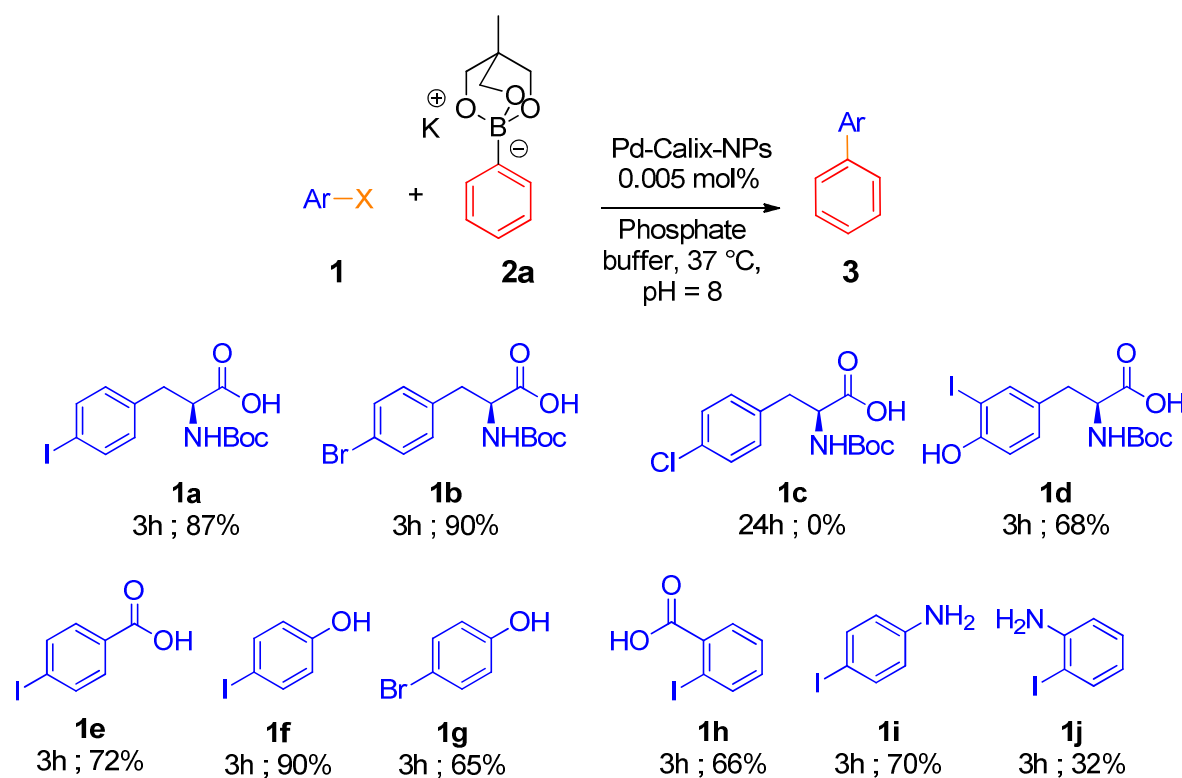


Figure 3. Reactivity of cyclic phenyltriolborate with selected water-soluble aryl halides. Aryl halide (1 equiv.), cyclic triol phenylborate (3 equiv.), Pd-Calix-NPs (0.005 mol%), phosphate buffer (20 mM, pH = 8), 37 °C 3h. Isolated yield after chromatographic purification.

Table 4. Reactivity of aryl and heteroaryl cyclic triol-borates with *N*-Boc-4-iodophenylalanine

Reaction scheme: **1a** (N-Boc-4-iodophenylalanine) + **2a-j** (cyclic triol boronate) $\xrightarrow[\text{Phosphate buffer, pH 8, 37}^\circ\text{C}]{\text{Pd-Calix-NPs}}$ **3** (coupled product).

Entry	cyclic borate	R	Metal	pH	Product	Yield (%) ^a
1	2a	Ph	K	8.0	3a	98
2	2a	Ph	K	7.0	3a	67
3	2a	Ph	K	6.0	3a	56
4	2b	Ph	Li	8.0	3a	30
5	2c	Ph	Na	8.0	3a	90
6	2d	Ph	Cs	8.0	3a	47
7	2e	Ph	TBA	8.0	3a	22
8	2f	<i>p</i> -MeOPh	K	8.0	3af	98
9	2g	<i>o</i> -Tol	K	8.0	3ag	79 ^b
10	2h	<i>m</i> -NO ₂ Ph	K	8.0	3ah	72 ^b
11	2i	2-furanyl	K	8.0	3ai	87
12	2j	3-thiophenyl	K	8.0	3aj	63

^a *N*-Boc-4-iodophenylalanine (1 equiv.), cyclic triol arylboronate (3 equiv.), Pd-Calix-NPs (0.005 mol%); ^b 16 h reaction time.

To conclude, we have shown that the nanoformulation of benzyloxycalix[8]arene supported NHC-palladium complexes gave highly stable nanosuspension endowed with very high catalytic activity for the Suzuki–Miyaura couplings in pure water. The high catalytic activity of the catalyst can be attributed to the specific characteristics of the unique nanostructure. In combination with cyclic triol boronates as nucleophilic partner, this nanoformulation was successfully engaged in coupling reactions with a wide range of water-soluble substrates using a low catalyst load-ing.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Experimental procedures and characterization data for all new compounds. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* E;mail didier.desmaele@u-psud.fr; vincent.huc@u-psud.fr

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the Ministère de la Recherche et de la Technologie (Fellowship to A.P.), the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM 2018 Fellowship to A.P.).

REFERENCES

- (1) (a) Torborg, C., Beller, M. *Adv. Synth. Catal.* 2009, 351, 3027. (b) Magano, J., Dunetz, J. R. *Chem. Rev.* 2011, 111, 2177 (c) Busacca, A. C., Fan-dricks, R. D., Song, J. J., Senanayake, C. H. in *Applications of Transition Metal Catalysis in Drug Discovery and Development*, John Wiley & Sons, New York, 2012, pp. 1–24. (d) Hayler, D., Leahy, K. D., Simmons, E. M. *Organometallics* 2019, 38, 36.
- (2) (a) Cheng, F., Adronov, A. *Chem. Mater.* 2006, 18, 5389. (b) Fei, Z., Soo Kim, J., Smith, J., Buchaca Domingo, E., Anthopoulos, T. D., Stingelin, N., Watkins, S. E., Kim, J. S., Heeney, M. J. *Mater. Chem.* 2011, 21, 16257.

- (3) (a) Genet, J. P.; Savignac, M. J. *Organomet. Chem.* 1999, 576, 305. (b) Polshettiwar, V., Decottignies, A., Len, C., Fihri, A. *ChemSusChem*. 2010, 3, 502. (c) Levin, E., Ivry, E., Diesendruck, C. E., Lemcoff, N. G. *Chem. Rev.* 2015, 115, 4607. (d) Chatterjee, A. Ward, T. R. *Catal. Lett.* 2016, 146, 820. (e) Takale, B. S.; Thakore, R. R.; Handa, S.; Gallou, F.; Reilly, J.; Lipshutz, B. H. *Chem. Sci.* 2019, 10, 8825. (f) Thakore, R. R.; Takale, B. S.; Gallou, F.; Reilly, J.; Lipshutz, B. H. *ACS Catal.* 2019, 9, 11647.
- (4) (a) Ojida, A.; Tsutsumi, H.; Kasagi, N.; Hamachi, I. *Tetrahedron Lett.* 2005, 46, 3301. (b) Chalker, J. M.; Wood, C. S. C.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 16346. (c) Jbara, M.; Maity, S. D.; Brik, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, 56, 10644. (d) Isengger, P. G., Davis, G. B. *J. Am. Chem. Soc.* 2019, 141, 8005.
- (5) Kitanosono, T., Masuda, K., Xu, P., Kobayashi, S. *Chem. Rev.* 2018, 118, 679.
- (6) (a) Frank, M.; Maas, G.; Schatz, J. *Eur. J. Org. Chem.* 2004, 607. (b) Brendgen, T.; Frank, M.; Schatz, J. *Eur. J. Org. Chem.* 2006, 2378. (c) Monnereau, L.; David Sémeril, D., Matt, D., Toupet, L. *Chem. Eur. J.* 2010, 16, 9237. (d) Brenner, E., Matt, D., Henrion, M., Teci, M., Toupet, L. *Dalton Trans.* 2011, 40, 9889. (e) Narkhede, N.; Uttam, B.; Pulla Rao, C. *ACS Omega* 2019, 4, 4908.
- (7) Abdellah, I., Kasongo, P., Labattut, A., Guillot, R., Schulz, E., Martini, C., Huc V. *Dalton Trans.* 2018, 47, 13843-13848.
- (8) Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N., Beni-ta, S. *Int. J. Pharm.* 1989, 55, R1–R4.
- (9) Pisani, E.; Fattal, E.; Paris, J.; Ringard, C.; Rosilio, V.; Tsapis, N. *J. Colloid Interface Sci.* 2008, 326, 66.
- (10) Dumas, A., Peramo, A., Desmaële, D., Couvreur, P. *Chimia* 2016, 70, 252.
- (11) Lennox, A. J. J., Lloyd-Jones, G. C. *Chem. Soc. Rev.*, 2014, 43, 412.

- (12) Molander, G. A., Canturk, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 9240.
- (13) Lee, S. J.; Gray, K. C.; Paek, J. S.; Burke, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 466.
- (14) Yamamoto, Y.; Takizawa, M.; Yu, X.-Q.; Miyaura, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47, 928.

A Self-Assembling Palladium-Loaded Calixarene as a Potent Catalyst for the Suzuki-Miyaura Cross-coupling Reaction in Water

Arnaud Peramo,[†] Ibrahim Abdellah,[‡] Shannon Pecnard,[†] Julie Mougins[†] Cyril Martini,^{‡,§} Patrick Couvreur,[†] Vincent Huc,^{‡,*} and Didier Desmaële^{†,*}

[†] Institut Galien Paris Sud, CNRS UMR8612, Université Paris Saclay, 5 rue Jean-Baptiste Clément 92290 Châtenay-Malabry, France

[‡] Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay, CNRS UMR8182, Université Paris Saclay, Bâtiment 420, 91405 Orsay, France.

[§] NOVECAL, 86 rue de Paris, 91400 Orsay, France, www.novecal.com

Email : vincent.huc@u-psud.fr and didier.desmaele@u-psud.fr

General Information

Infrared (IR) spectra were obtained using a Fourier Transform Bruker Vector 22 spectrometer. Only significant absorptions are listed. The ^1H , and ^{13}C NMR were recorded using a Bruker Advance 300 (300 and 75 MHz, respectively) spectrometer. Recognition of methyl, methylene, methine, and quaternary carbon nuclei in ^{13}C NMR spectra rests on the *J*-modulated spin-echo sequence. All chemical shifts are quoted on the δ scale in ppm using residual solvent as the internal standard (^1H NMR: CDCl_3 = 7.26; D_2O = 4.79; DMSO-d_6 = 2.50; D_3COD = 3.33, and ^{13}C NMR: DMSO-d_6 = 39.5). Coupling constants (*J*) are reported in Hz with the following splitting abbreviations: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet and m = multiplet. Mass spectra were recorded using a LTQ-Velos Pro Thermofisher Scientific spectrometer. The sizes of the obtained Pd nanoformulations were measured using a Malvern particle size analyser [nano ZS (173° scattering angle)]. The morphology of the different palladium nanoformulations was examined by transmission electron microscope (TEM) using a JEOL JEM 100CXII transmission electron microscope at an accelerating voltage of 100 kV and for high resolution image using a JEOL JEM 2010 instrument at 200 kV. Deionized water was used for chemical reactions and Milli-Q purified water for nanoparticle preparation. Bidistilled MilliQ water was produced using a water purification system (Millipore). Chemicals were obtained from Carbosynth Limited (UK), Sigma Aldrich Chemical Co (France), Fluorochem and Alfa Aesar (France) and were used without further purification. Solvents of analytical grade were obtained from VWR. Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4 was obtained from Sigma Aldrich. Anhydrous DMF and dioxane were obtained from Sigma Aldrich. Tetrahydrofuran (THF) was distilled from sodium/benzophenone ketyl and CH_2Cl_2 from CaH_2 . The calix[8]arene-NHC-Pd catalyst was synthesized according to the method previously reported.¹ All reactions involving air- or

water-sensitive compounds were routinely conducted in glassware, which was flame-dried under a positive pressure of nitrogen or argon. Analytical thin-layer chromatography was performed on Merck silica gel 60F254 glass precoated plates (0.25 mm layer). Column chromatography was performed on Merck silica gel 60 (230-400 mesh ASTM (American Standard Test Sieve Series)).

Nanoformulation of the calix[8]arene-NHC-Pd catalyst

Pd-Calix-NPs were prepared by the emulsion-evaporation technic. Practically, the calix[8]arene-NHC-Pd catalyst (29.74 mg, 0.005 mmol) was dissolved into CH₂Cl₂ (5 mL). The organic phase was emulsified into 10 mL of 1.5% sodium cholate (w/w) aqueous solution using a vortex for 1 min and then a vibrating metallic tip at 30% amplitude for 1 min at 0 °C. The organic solvent was evaporated by magnetic stirring overnight in an open flask under a laminar flow hood and readjusted to 10 mL to provide a stock suspension of Pd-Calix-NPs at 2.97 mg/mL.

Nanoparticles characterization by DLS

Mean hydrodynamic diameters of the nanoassemblies and polydispersity index were measured at 25 °C by quasi-elastic light scattering with a Nano ZS (Malvern Instrument, 173 scattering angle). The NPs surface charge was investigated by ζ -potential measurement at 25 °C after dilution with 1 mM NaCl solution, applying the Smoluchowski equation. Measurements were carried out in triplicate. Colloidal stability in milliQ water at 20 °C and 4 °C was investigated by measuring the Pd NPs mean diameter over a period of 30 days.

Cryogenic transmission electron microscopy (CryoTEM) of Pd-Calix-NPs

Morphology of Pd-Calix-NPs was observed by cryoTEM. Few drops of the NP suspension (2.97 mg/mL) were deposited on EM grids covered with a holey carbon film (Quantifoil R2/2) previously treated with a plasma glow discharge. Observations were conducted at low

temperature (−180 °C) on a JEOL 2010 FEG microscope operated at 200 kV. Images were recorded with a Gatan camera.

General method for the synthesis of potassium aren-2,6,7-trioxa-1-borate-bicyclo[2.2.2]octane salts. To a solution of the given boronic acid (1.64 mmol) and 1,1,1-tris(hydroxymethyl)ethane (197 mg, 1.65 mmol) in dioxane (10 mL) was added ground KOH (92 mg, 1.64 mmol). The mixture was flushed with argon and water (29 μ L, 1.65 mmol) was added. The resulting mixture was stirred at 30 °C for 3h. Cyclohexane (5 mL) was then added and the precipitated potassium triolborate salt was filtered on a sintered glass funnel and washed twice with acetone. The solid was dried under vacuum to afford the potassium borate salts as amorphous solids.

Potassium 4-methyl-1-phenyl-2,6,7-trioxa-1-borabicyclo[2.2.2]octan-1-uide (2a): The general method using phenyl boronic acid gave the title compound² in 87% yield. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.30 ppm (d, J = 7.2 Hz, 2H, , H-2, H-6), 6.98–6.88 (m, 3H, H-3, H-4, H-5), 3.57 (s, 6H, CH₂OB), 0.47 (s, 3H, CH₃) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 132.1 (2CH, C-2, C-6), 125.5 (2CH, C-3, C-5), 124.0 (CH, C-4), 73.6 (3CH₂, B(OCH₂)₃), 34.4 (C, CCH₃), 16.2 (CH₃, CCH₃) ppm. The C-B was not observed; IR (neat, cm^{−1}): 3064, 2958, 2843, 1613, 1351, 1207, 1093, 1042, 914, 878, 850, 714; MS (ESI[−]): m/z (%) = 205.1 (100) [M-K][−], 204.1 (20).

Tetra-*n*-butylammonium 4-methyl-1-phenyl-2,6,7-trioxa-1-borabicyclo[2.2.2]octan-1-uide (2e): The general method using 1 equiv of n-Bu₄NOH as base provided the tetra-*n*-butylammonium borate salt **2e**³ in 20% yield as an off-white amorphous solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.33 (d, J = 6.6 Hz, 2H, H-2,H-6), 7.02-6.85 (m, 3H, H-3,H-4, H-5), 3.58 (s, 6H, CH₂OB), 3.20-3.10 (m, 8H, CH₂N), 1.62-1.42 (m, 8H, CH₂CH₂N); 1.30 (hex, J = 7.3 Hz, 8H, CH₂CH₂CH₂N), 0.93 (t, 7.3 Hz, 12H, CH₃CH₂CH₂CH₂N), 0.48 (s, 3H, CH₃) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 132.2 (2CH, C-2, C-6), 125.4 (2CH, C-3, C-5),

123.9 (CH, C-4), 73.5 (3CH₂, B(OCH₂)₃), 57.5 (4CH₂, CH₃CH₂CH₂CH₂N), 34.4 (C, CCH₃), 23.0 (4CH₂, CH₃CH₂CH₂CH₂N), 19.1 (4CH₂, CH₃CH₂CH₂CH₂N), 16.2 (CH₃, CCH₃), 13.4 (4CH₃, CH₃CH₂CH₂CH₂N) ppm. The C-B was not observed.

Potassium 1-(4-methoxyphenyl)-4-methyl-2,6,7-trioxa-1-borabicyclo[2.2.2]octan-1-uide

(2f): The general method using 4-methoxyphenyl boronic acid give the title compound² as a white powder in 69% yield; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.22 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H-2, H-6), 6.57 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H-3, H-5), 3.63 (s, 3H, OCH₃), 3.57 (s, 6H, CH₂OB), 0.48 (s, 3H, CH₃) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 157.2 (C, C-4), 133.5 (2CH, C-2, C-6), 111.7 (2CH, C-3, C-5), 74.0 (3CH₂, B(OCH₂)₃), 54.9 (CH₃, OCH₃), 34.9 (C, CCH₃), 16.8 (CH₃) ppm, the C-B was not observed; IR (neat, cm⁻¹): 3230, 2863, 2841, 1598, 1510, 1451, 1399, 1283, 1214, 1178, 1078, 1045, 1024, 933, 854, 815, 729, 697, 608; MS (ESI-): m/z (%) = 235.1 (100) [M-K]⁻ 234.1 (20).

Potassium 4-methyl-1-(3-nitrophenyl)-2,6,7-trioxa-1-borabicyclo[2.2.2]octan-1-uide (2h):

The general method using 3-nitrophenyl boronic acid gave the title compound⁴ in 72% yield, ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.17 (d, J = 1.5 Hz, 1H, H-2), 7.83 (dd, J = 8.1, 1.5 Hz, 1H, H-4), 7.75 (d, 1H, J = 6.9 Hz, H-6), 7.29 (t, 1H, J = 7.6 Hz, H-5), 3.62 (s, 6H, CH₂OB), 0.51 (s, 3H, CH₃) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 146.48 (C, C-3), 138.98 (CH, C-6), 126.90 (CH, C-2 or C-5), 126.30 (CH, C-2 or C-5), 119.26 (CH, C-4), 73.52 (3CH₂, B(OCH₂)₃), 34.56 (C, CCH₃), 15.97 (CH₃) ppm, the C-B was not observed; IR (neat, cm⁻¹): 3015, 2948, 2850, 1606, 1519, 1458, 1402, 1342, 1278, 1238, 1216, 1083, 1054, 885, 863; MS (ESI-): m/z (%) = 250.0 (100) [M-K]⁻, 249 (20).

Potassium 4-methyl-1-(*o*-tolyl)-2,6,7-trioxa-1-borabicyclo[2.2.2]octan-1-uide (2g):

The general method using *o*-tolylboronic acid gave the title compound⁴ in 59% yield, ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.38 (d, J = 6.0 Hz, 1H, H-6), 6.90-6.75 (m, 3H, H-3, H-4, H-5), 3.61 (s, 6H, CH₂OB), 2.37 (s, 3H, ArCH₃), 0.52 (s, 3H, CH₃) ppm; ¹³C NMR (75 MHz,

DMSO- d_6): δ = 141.6 (C, C-2), 132.4 (CH, C-6), 128.0 (CH), 124.5 (CH), 122.8 (CH), 73.0 (3CH₂, B(OCH₂)₃), 34.5 (C, CCH₃), 22.2 (CH₃, ArCH₃), 16.3 (CH₃) ppm, the C-B was not observed; IR (neat, cm⁻¹): 3158, 2855, 1396, 1210, 1178, 1066, 1035, 970, 945, 928, 891, 829, 750, 689; MS (ESI-): m/z (%) = 219.1 (100) [M-K]⁻, 218 (20).

Potassium 1-(furan-2-yl)-4-methyl-2,6,7-trioxa-1-borabicyclo[2.2.2]octan-1-uide (2i): The general method using 2-furylboronic acid gave the title compound ⁵ in yield 67%; ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.31 (s, 1H, H-5), 6.10 (m, 1H, H-3), 5.94 (d, J = 3.0 Hz, 1H, H-4), 3.54 (s, 6H, CH₂OB), 0.48 (s, 3H, CH₃) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 140.6 (CH, C-5), 110.3 (CH, C-3 or C-4), 108.4 (CH, C-3 or C-4), 72.9 (3CH₂, B(OCH₂)₃), 34.4 (C, CCH₃), 16.1 (CH₃) ppm, the C-B was not observed; MS (APCI-): m/z (%) = 195.1 (100) [M]⁻, 194.1 (20).

Potassium 4-methyl-1-(thiophen-3-yl)-2,6,7-trioxa-1-borabicyclo[2.2.2]octan-1-uide (2j): The general method using 3-thienylboronic acid gave the title compound⁶ in yield 65%; ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.01 (dd, J = 4.5 Hz, J = 2.7 Hz, 1H, H-5), 6.93 (d, J = 4.5 Hz, 1H, H-4), 6.85 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-2), 3.54 (s, 6H, CH₂OB), 0.46 (s, 3H, CH₃) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 132.9 (CH, C-4), 123.7 (CH, C-2), 120.9 (CH, C-5), 73.6 (3CH₂, B(OCH₂)₃), 34.4 (C, CCH₃), 16.2 (CH₃) ppm, the C-B was not observed; IR (neat, cm⁻¹): 2948, 2847, 1630, 1468, 1421, 1400, 1351, 1215, 1172, 1071, 1000, 926, 869, 839, 774, 599, 622; MS (ESI-): m/z (%) = 211.2 (5) [M-H]⁻, 195.1 (100).

General method for the small-scale Suzuki-Miyaura coupling with Pd-Calix-NPs. In an Eppendorf tube, the arylhalide (0.008 mmol, 1 equiv.) and the boronic acid/cyclic-triolborate salt (0.024 mmol, 3 equiv.) were suspended in phosphate buffer pH 8.0-6.0 (200 mM, 50 μ L) and MiliQ Water (370 μ L). The suspension of Pd-Calix-NPs was added (3.2×10^{-6} mmol; 0.00004 equiv.; 80 μ L) and the reaction was mixed and shaken on a thermostated shaker (bioSan TS-100) at 800 rpm at 37 °C. After 3h, the reaction was frozen in liquid nitrogen and

the solution lyophilized. The crude product was taken up in CD₃OD and analyzed by ¹H-NMR.

General method for the preparative Suzuki-Miyaura coupling with Pd-Calix-NPs. The arylhalide (0.25 mmol, 1 equiv.) and the boronic acid (0.75 mmol, 3 equiv.) were suspended in phosphate buffer pH 8.0 (200 mM, 5 mL) and water (The stock solution of Pd-Calix-NPs (0.025 mmol Pd, 0.01 equiv.) was added and the reaction was stirred at 37 °C. After 3/16 h, the reaction was frozen in liquid nitrogen and the solution was lyophilized. The crude product was purified by flash chromatography on silica gels to afford the expected cross-coupling product.

4-Phenylbenzoic acid (3e). The general method using 4-iodobenzoic acid and potassium phenyltriolborate gave 4-phenylbenzoic acid ⁷ (Yield = 72%); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.19 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.71 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.64 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.55-7.38 (m, 3H, H-3'', H-4'', H-5'') ppm; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 167.2 (C, CO₂H), 144.3 (C), 139.1 (C), 130.0 (2CH), 129.7 (C), 129.1 (2CH), 128.3 (CH), 127.0 (2CH), 126.8 (2CH), ppm; MS (ESI-) m/z = 197.1 (100) [M-H]⁻.

4-Phenylphenol (3f). The general method using 4-iodophenol and potassium phenyltriolborate gave 4-phenylphenol ⁸ (Yield = 90%); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 10.38 (1H, br s, OH), 8.37 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H-2', H-6'), 8.28 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-3, H-5), 8.21 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H-3', H-5'), 8.07 (td, J = 7.2, 0.9 Hz, 1H, H-4'), 7.66 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-2, H-6) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 160.6 (C, C-1), 149.7 (C, C-1'), 140.5 (C, C-4), 138.3 (2CH, C-3, C-5), 137.3 (2CH, C-3', C-5'), 135.9 (CH, C-4'), 135.5 (2CH, C-2', C-6'), 125.3 (2CH, C-2, C-6) ppm; MS (ESI-) m/z (%) = 169.1 (100) [M-H]⁻.

2-Phenylbenzoic acid (3h). The general method using 2-iodobenzoic acid and potassium phenyltriolborate gave 2-phenylbenzoic acid ⁹ (Yield = 66%) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 12.70 (s, 1H, OH), 7.72 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H-6, 1H), 7.57 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H-4,

1H), 7.45 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-5, 1H), 7.45-7.30 (m, 6H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 173.6$ (C, CO_2H), 143.5 (C, C-2), 141.1 (C, C-1'), 132.2 (CH), 131.3 (CH), 130.8 (CH), 129.4 (C, C-1), 128.6 (2CH), 128.2 (2CH), 127.5 (CH), 127.3 (CH) ppm.

4-Phenylaniline (3i). The general method using 4-iodoaniline and potassium phenyltriolborate gave 4-phenylaniline¹⁰ (Yield = 70%) ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 7.52$ (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-2, H-5, 2H), 7.42-7.32 (m, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6'), 7.20 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-4'), 6.67 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-2, H-6), 5.19 (br s, 2H, NH_2) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 148.3$ (C), 140.7 (C), 128.7 (2CH), 127.5 (C), 127.1 (2CH), 125.6 (CH), 125.3 (2CH), 114.3 (2CH) ppm; MS (ESI+) m/z (%) = 170.1 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-Phenylaniline (3j): The general method using 2-iodoaniline and potassium phenyltriolborate gave 2-phenylaniline¹¹ (Yield = 32%) ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.50$ -7.25 (m, 5H), 7.09 (dt, $J = 8.1$ Hz, 1.5 Hz, 1H, H-5), 7.02 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-3), 6.81 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-6), 6.75 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-4) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD): $\delta = 144.85$ (C, C-2), 139.7 (C, C-1'), 130.0 (CH), 128.7 (2CH, C-3', C-5'), 128.6 (2CH, C-2', C-6'), 128.2 (CH), 126.7 (CH), 125.9 (C, C-1), 116.8 (CH, C-5), 115.3 (CH, C-3) ppm; MS (ESI+) m/z (%) = 170.1 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

***N*-Boc-4-phenyl-*L*-phenylalanine (3a):** The general method using *N*-Boc-4-iodo-*L*-phenylalanine and potassium phenyltriolborate (**2a**) gave the title compound¹² in 87% yield: ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.62-7.48 (m, 4H), 7.40 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.35-7.27 (m, 3H), 4.46-4.30 (m, 1H, H-2), 3.20 (dd, $J = 13.8, 5.1$ Hz, 1H, H-3), 2.95 (dd, $J = 13.8, 8.7$ Hz, 1H, H-3), 1.40 (s, 9H, $\text{NCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD): $\delta = 175.4$ (C, CO_2H), 157.8 (C, $\text{CO}_2t\text{-Bu}$), 142.3 (C), 141.0 (C), 137.8 (C), 130.8 (2CH), 129.8 (2CH), 128.2 (CH), 128.0 (2CH), 127.9 (2CH), 80.5 (C, $\text{NCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 56.3 (CH, C-2), 38.4 (CH_2 , C-3), 28.7 (3CH_3 , $\text{NCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm; MS (ESI-) m/z (%): 340.17 (100) $[\text{M}-\text{H}]^-$, 266.2 (80) $[\text{M}-t\text{-BuOH}-\text{H}]^-$.

***N*-Boc-3-phenyltyrosine (3d):** The general method using *N*-Boc-4-iodo-*L*-tyrosine and potassium phenyltriolborate (**2a**) gave the title compound¹³ in 68% yield; ^1H NMR (300 MHz,

CD₃OD): δ = 7.55 (d, J = 7.3 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.36 (t, J = 7.3 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.26 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H-4''), 7.12 (s, 1H, H-2'), 7.02 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-6'), 6.82 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-5'), 4.45-4.25 (m, 1H, H-3), 3.10 (dd, J = 13.1, 1.8 Hz, 1H, H-3), 2.89 (dd, J = 13.1, 7.7 Hz, 1H, H-3), 1.37 (s, 9H, NCO₂C(CH₃)₃) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 175.4 (C, CO₂H), 157.8 (C, CO₂t-Bu), 154.1 (C, C-4'), 140.2 (C, C-1'), 132.7 (C), 130.4 (2CH), 130.2 (CH), 129.6 (C), 129.5 (C), 128.9 (2CH), 127.6 (CH), 117.0 (CH), 80.5 (C, NCO₂C(CH₃)), 56.4 (CH, C-2), 37.9 (CH₂, C-3), 28.7 (3CH₃, NCO₂C(CH₃)₃) ppm; MS m/z (%) (ESI-): 356.2 (100) [M-H]⁻, 282.2 (65) [M-*t*-BuOH-H]⁻.

***N*-Boc-4-(4-methoxyphenyl)-*L*-phenylalanine(3af):** The general method using *N*-Boc-4-iodo-*L*-phenylalanine and potassium 4-methoxy-1-phenyl-2,6,7-trioxa-1-borabicyclo[2.2.2]octan-1-uide (**2f**) gave the title compound¹⁴ in 98% yield; ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 7.49 (t, J = 8.4 Hz, 4H, H-2', H-6', H-2'', H-6''), 7.27 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.97 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 4.45-4.30 (m, 1H, H-2), 3.82 (s, 3H, OMe), 3.18 (dd, J = 13.8, 4.8 Hz, 1H, H-3), 2.95 (dd, J = 13.8, 9.3 Hz, 1H, H-3), 1.38 (s, 9H, NCO₂C(CH₃)₃) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 175.4 (C, CO₂H), 160.7 (C-4''), 157.7 (C, CO₂t-Bu), 140.6 (C, C-1'), 137.0 (C), 134.7 (C), 130.8 (2CH), 128.8 (2CH), 127.5 (2CH), 115.2 (2CH, C-3'', C-5''), 80.5 (C, NCO₂C(CH₃)), 56.4 (CH, C-2), 55.7 (CH₃, OCH₃), 38.4 (CH₂, C-3), 28.7 (3CH₃, NCO₂C(CH₃)₃) ppm.

***N*-Boc-4-(2-methylphenyl)-*L*-phenylalanine (3ag):** The general method using *N*-Boc-4-iodo-*L*-phenylalanine and potassium 2-methyl-1-phenyl-2,6,7-trioxa-1-borabicyclo[2.2.2]octan-1-uide (**2g**) gave the title compound¹³ in 79% yield after 16 h reaction time. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 7.30 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.28-7.10 (m, 6H), 4.45-4.30 (m, 1H, H-2), 3.21 (dd, J = 13.8, 4.5 Hz, 1H, H-3), 2.95 (dd, J = 13.8, 9.3 Hz, 1H, H-3), 2.21 (s, 3H, ArCH₃), 1.39 (s, 9H, NCO₂C(CH₃)₃) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 175.4 (C, CO₂H), 157.8 (C, CO₂t-Bu), 143.0 (C, C-1'), 141.8 (C), 137.2 (C), 136.2 (C), 131.2

(CH), 130.6 (CH), 130.1 (4CH), 128.2 (CH), 126.7 (CH), 80.5 (C, NCO₂C(CH₃)), 56.3 (CH, C-2), 38.5 (CH₂, C-3), 28.7 (3CH₃, NCO₂C(CH₃)₃), 20.6 (CH₃, ArCH₃) ppm; MS m/z (%) (ESI-): 354.2 (100) [M-H]⁻, 280.2 (85) [M-*t*-BuOH-H]⁻.

ppm.

***N*-Boc-4-(3-nitrophenyl)phenylalanine (3ah):** The general method using *N*-Boc-4-iodo-*L*-phenylalanine and potassium 3-nitro-1-phenyl-2,6,7-trioxa-1-borabicyclo[2.2.2]octan-1-uide (**2h**) gave the title compound¹⁴ in 72% yield after 16 h reaction time; ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 8.45 (s, 1H, H-2''), 8.19 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-4''), 8.02 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-6''), 7.68 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-5''), 7.63 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.39 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-2', H-6'), 4.45-4.30 (m, 1H, H-2), 3.24 (dd, *J* = 13.8, 4.8 Hz, 1H, H-3), 2.98 (dd, *J* = 13.8, 8.4 Hz, 1H, H-3), 1.39 (s, 9H, NCO₂C(CH₃)₃) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 175.2 (C, CO₂H), 157.8 (C, CO₂*t*-Bu), 150.2 (C, C-3''), 144.0 (C), 139.4 (C), 138.4 (C), 134.0 (CH), 131.3 (2CH), 131.2 (CH), 128.4 (2CH), 122.9 (CH), 122.4 (CH), 80.6 (C, NCO₂C(CH₃)), 56.2 (CH, C-2), 38.4 (CH₂, C-3), 28.7 (3CH₃, NCO₂C(CH₃)₃), MS m/z (%) (ESI-): 385.2 (100) [M-H]⁻, 311.2 (65) [M-*t*-BuOH-H]⁻.

***N*-Boc-4-(2-furanyl)phenylalanine (3ai).** The general method using *N*-Boc-4-iodo-*L*-phenylalanine and potassium 4-methyl-1-(furan-2-yl)-2,6,7-trioxa-1-borabicyclo[2.2.2]octan-1-uide (**2i**) gave the title compound in 87% yield ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 7.60 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.51 (s, 1H, H-4''), 7.25 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.70 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H-3''), 6.50 (br s 1H, H-4''), 4.45-4.25 (m, 1H, H-2), 3.16 (dd, *J* = 13.8, 4.5, Hz, 1H, H-3), 2.92 (dd, *J* = 13.8, 9.3 Hz, 1H, H-3), 1.39 (s, 9H, NCO₂C(CH₃)₃); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 175.3 (C, CO₂H), 157.7 (C, CO₂*t*-Bu), 155.2 (C, C-2''), 143.2 (CH), 137.8 (C), 130.7 (2CH, C-2', C-6'), 129.8 (C), 124.7 (2CH, C-3', C-5'), 112.6 (CH, C-3''), 105.7 (CH, C-4''), 80.5 (C, NCO₂C(CH₃)), 56.2 (CH, C-2), 38.5 (CH₂, C-3), 28.6 (3CH₃, NHCO₂C(CH₃)₃); MS m/z (%) (ESI-): 330.2 (100) [M-H]⁻, 256.2 (85) [M-*t*-BuOH-H]⁻.

N-Boc-4-(4-thienyl)phenylalanine (3aj). The general method using *N*-Boc-4-iodo-*L*-phenylalanine and potassium 4-methyl-1-(thiophen-3-yl)-2,6,7-trioxa-1-borabicyclo[2.2.2]octan-1-uide (**2j**) gave the title compound¹⁵ in 63% yield ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 7.58-7.49 (m, 3H, H-2'', H-3', H-5'), 7.45-7.38 (m, 2H, H-4'', H-5''), 7.25 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 4.35-4.20 (m, 1H, H-2), 3.18 (dd, *J* = 13.5, 4.5, Hz, 1H, H-3), 2.94 (dd, *J* = 13.5, 7.2 Hz, 1H, H-3), 1.38 (s, 9H, NCO₂C(CH₃)₃); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 175.4 (C, CO₂H), 157.8 (C, CO₂t-Bu), 143.3 (C, C-3''), 137.5 (C), 135.7 (C), 130.8 (2CH, C-2', C-6'), 127.9 (2CH, C-3', C-5'), 127.2 (CH, C-3'' or C-4''), 127.1 (CH, C-3'' or C-4''), 120.9 (CH, C-2''), 80.5 (C, NCO₂C(CH₃)₃), 56.3 (CH, C-2), 38.4 (CH₂, C-3), 28.7 (3CH₃, NHCO₂C(CH₃)₃); MS (ESI-): *m/z* (%) 346.2 (100) [M-H]⁻, 272.1 (50) [M-*t*-BuOH-H]⁻.

References

- Abdellah, I.; Kasongo, P.; Labattut, A.; Guillot, R.; Schulz, E.; Martini, C.; Huc V. *Dalton Trans.* **2018**, 47, 1384313848.
- Yamamoto, Y.; Takizawa, M.; Yu, X.-Q.; Miyaura, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 928-931.
- Sakashita, S.; Takizawa, M.; Sugai, J.; Ito, H.; Yamamoto, Y. *Org. Lett.* **2013**, 15, 4308-4311.
- Akula, M. R.; Yao, M.-L., Kabalka, G. W. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 1170-1171.
- Chen, Y.J.; Cui, Z.; Feng, C.-G.; Lin, G.-Q. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, 357, 2815-2820.
- Yu, X.-Q.; Yamamoto, Y.; Miyaura, N. *Synlett* **2009**, 994-998.
- Schulman, E. M.; Christensen, K. A.; Grant, D. M.; Walling, C. *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 2686-2690.
- Paterson W. G.; Tipman, N. R. *Can. J. Chem.* **1962**, 40, 2122-2125.
- Wu, Z.-C.; Lu, Y.-N.; Ren, Y.-M.; Chen, Z.-M.; Tao, T.-X. *J. Chem. Res.* **2013**, 451-454.
- Lynch, B. M.; Macdonald, B. C.; Webb, J. G. K. *Tetrahedron* **1968**, 24, 3595-3605.

Appleton, J. M.; Andrews, B. D.; Rae, I. D., Reichert, B. E. *Aust. J. Chem.* **1970**, *23*, 1667-1677.

Ksander, G. M.; Ghai, R. D.; deJesus, R.; Diefenbacher, C. G.; Yuan, A.; Berry, C.; Sakane, Y.; Trapani, A. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1689-1700.

Knör, S.; Laufer, B.; Kessler, H. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5625-5630.

De Vasher, R. B.; Moore L. R.; Shaughnessy, K. H. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7919-7927.

Willemse, T.; Van Imp, K.; Goss, R. J. M.; van Vlijmen, H. W. T.; Schepens, W.; Maes, B. U. W.; Ballet, S. *ChemCatChem* **2015**, *7*, 2055-2070.

Conclusion Générale

Le développement des nanomédicaments a suscité un grand intérêt ces dernières années ouvrant de nouvelles possibilités dans le traitement de nombreuses maladies graves, en délivrant les médicaments de manière sélective à l'intérieur des cellules ou des tissus malades ou en élargissant leur fenêtre thérapeutique. Toutefois, d'importants verrous technologiques demeurent, dont le faible pouvoir de charge en principe actif ou leur libération incontrôlée qui constituent autant de freins au développement clinique et à la mise sur le marché de nanomédicaments.

Le développement de nano-objets capables d'induire une activité pharmacologique sans utiliser de principes actifs médicamenteux permettrait de s'affranchir des limitations inhérentes à la simple encapsulation et constituerait une avancée importante dans la conception de nouveaux agents thérapeutiques. C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail. Nous nous sommes proposés de modifier chimiquement une protéine par des nanoparticules de palladium, en milieu biologique dans le but ultime de perturber la machinerie cellulaire pour déclencher une action thérapeutique ciblée.

Pour aborder ce problème complexe nous avons dans un premier temps choisi une protéine naturellement iodée la thyroglobuline (Tg) et tenté de la modifier chimiquement par une réaction de couplage croisée de Suzuki-Miyaura catalysée par des nanoparticules de palladium. Le choix de la thyroglobuline, seule protéine iodée de l'organisme, nous assurait de la bioorthogonalité du processus. En cas de succès on pourrait envisager ultérieurement d'utiliser la méthode pour fixer un marqueur de reconnaissance désignant la Tg au système du protéasome pour être dégradée. Il serait ainsi possible de réguler la concentration en

hormones thyroïdiennes qui jouent un rôle essentiel dans de nombreuses pathologies, comme la maladie de Basedow. Pour mettre en œuvre ce projet nous avons :

i : développé des nanoparticules de palladium stables et possédant un très grand pouvoir catalytique.

ii : tenté d'établir un modèle cellulaire permettant l'expression de la Tg iodée

iii : Développé les outils nécessaires pour identifier la modification chimique introduite sur la protéine

iv : Trouvé les conditions réactionnelles en milieu biologique et identifié une éventuelle liaison covalente au sein de cette très grosse protéine de 660 kD.

Après avoir développé différentes formulations de nanoparticules de palladium stabilisées par du pluronic ou du dextran souffrant soit d'instabilité soit d'une faible réactivité, une formulation plus satisfaisante constituée de petites nanoparticules de palladium supportées par des nanoparticules plus grosses de PLGA-PEG a été préparée. L'activité catalytique a été testée, dans la réaction de Suzuki-Miyaura (en tampon phosphate et à 37 °C) entre des acides aminés halogénés modèles et des dérivés d'acide boronique. Une bonne conversion a été obtenue et nous avons pu mettre en évidence que les boronates cycliques dérivant du (2-hydroxyméthyl)-1,3-propanediol étaient les partenaires de choix pour cette transformation alliant une bonne solubilité dans l'eau et une forte réactivité.

Néanmoins, la stabilité à long terme de ces suspensions s'est avérée dépendante des lots de palladium. Ce problème nous a contraints à rechercher une formulation plus robuste pour la suite du projet et notre choix s'est porté sur les nano-oursins de palladium développés par le Dr Hind Rémita. Ces nanoparticules obtenues par irradiation γ possèdent une stabilité de plusieurs semaines et présentent une activité catalytique remarquable. En revanche, leur forte cytotoxicité a nécessité le remplacement du tensioactif cationique de la formulation initiale par un polymère neutre, la polyvinylpyrrolidone. Cette nouvelle formulation a permis de

réduire presque totalement la cytotoxicité sur des macrophages et les thyrocytes, tout en conservant l'activité catalytique et la stabilité à long terme.

Ainsi, ayant obtenu une formulation remplissant l'ensemble des critères requis nous avons pu montrer qu'elle permettait de catalyser une réaction de Suzuki-Miyaura sur une protéine iodée, la Tg bovine, avec un dérivé d'acide phénylboronique dans un tampon phosphate. La démonstration du couplage covalent a été apportée par spectrométrie de masse et analyse protéomique après digestion par la chymotrypsine. Ce résultat permettait d'envisager de réaliser cette même réaction de manière intracellulaire ou dans un tissu. Auparavant, nous avons aussi développé des outils permettant de détecter un éventuel couplage covalent sans avoir recours à la protéomique. Deux sondes ont été synthétisées à cet effet avec une tête réactive de type aryltriolboronate cyclique : une sonde biotinylée permettant la détection par Western-blot et une sonde fluorescente basée sur un fluorophore rhodamine.

La mise au point d'une lignée cellulaire exprimant soit la Tg iodée soit une autre protéine iodée était requise pour tester notre réaction *in cellulo*. Malheureusement, en dépit de nos efforts il n'a pas été possible d'y parvenir. Les thyrocytes de Rat (FRTL, FRTL5) initialement choisis sont apparus ne pas exprimer la Tg ou de la Tg non-iodée. Les tentatives pour ioder l'albumine bovine (BSA) par des cellules embryonnaires humaines de rein transfectées avec les enzymes nécessaires ou des thyrocytes issus de patients atteints de la maladie de Basedow, ont échoué à fournir une protéine iodée. Dans ce contexte, pour démontrer la possibilité d'un couplage de Suzuki-Miyaura, catalysé par les nanoparticules de palladium dans un milieu biologique, nous avons réalisé la réaction dans un homogénat thyroïdien riche en Tg iodée, provenant d'une pièce chirurgicale obtenue chez un patient atteint de la maladie de Basedow. La détection de la modification de la Tg par liaison covalente dans cet homogénat d'organe a pu être validée par analyse protéomique et par Western-blot. Ce résultat démontre qu'il est possible d'utiliser des métaux de transition nano-formulés, pour faire de la chimie sur des

protéines naturelles, présentes à de faibles concentrations dans un milieu biologique complexe et cela ouvre le chemin à une nouvelle approche dans le traitement de maladies thyroïdiennes.

En perspective, l'absence de modèle cellulaire simple, semble imposer de cibler directement la thyroïde *in vivo*. L'injection intra-thyroïdienne directe des nanoparticules pourrait être envisagée dans un premier temps pour faire la preuve d'un éventuel effet thérapeutique. Dans un second temps, il sera évidemment nécessaire d'élaborer un système nanoparticulaire permettant de cibler les thyrocytes ou mieux encore d'adresser les nanoparticules de palladium à l'intérieur du follicule. Il faudra ensuite, développer un marqueur permettant de recruter la machinerie cellulaire pour induire la protéolyse de la Tg. D'autre part, l'émergence de nouveaux outils génétiques capables de modifier sélectivement le génome permettant l'ajout d'acides aminés halogénés dans la séquence d'une protéine cible, pourrait élargir notre méthode à d'autres protéines.

En parallèle, nous montrons qu'il est possible de nanoformuler des calixarènes porteurs de complexes carbéniques hétérocycliques du palladium, développés par le Laboratoire du Dr. Vincent Huc de l'ICMO. Une formulation stable de *Pd-NHC-Calix* a été obtenue par la méthode d'émulsion-évaporation de solvant. Ces nanoparticules sont dotées d'un pouvoir catalytique remarquable lors du couplage de Suzuki-Miyaura entre une variété d'aryl- et hétéroaryltriolborates cycliques et des acides aminés halogénés. L'accroissement de l'activité catalytique observée par nanoformulation comparativement aux réactions effectuées en milieu organique suggère une utilisation possible de ces nano-réacteurs en chimie bio-organique ou dans des applications *éco*-compatibles.

Annexe