



HAL
open science

Chimie click pour la synthèse de pyrazoles et l'étude du Myristoylome

Manon Louis

► **To cite this version:**

Manon Louis. Chimie click pour la synthèse de pyrazoles et l'étude du Myristoylome. Chimie organique. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASF094 . tel-04496174

HAL Id: tel-04496174

<https://theses.hal.science/tel-04496174v1>

Submitted on 8 Mar 2024

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.

Chimie click pour la synthèse de pyrazoles et l'étude du Myristoylome

Click chemistry for the synthesis of pyrazoles and identification of myristoylated proteome

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 571 : sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et
biosystème (2MIB)

Spécialité de doctorat : Chimie

Graduate School : Chimie. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Médicaments et Technologies pour la
Santé (Université Paris-Saclay, CEA, INRAE),**

Sous la direction de **Frédéric Taran**, Directeur de recherche, le co-encadrement de
Antoine Sallustrau, ingénieur-chercheur

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 7 décembre 2023, par

Manon LOUIS

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Dominique BONNET

Directeur de recherche

Université de Strasbourg

Président

Christine GRAVIER-PELLETIER

Professeure

Université Paris-Cité

Rapporteur et examinatrice

Frédéric LAMATY

Directeur de recherche,

Université de Montpellier

Rapporteur et examinateur

Dominique GUIANVARC'H

Professeure,

Université Paris-Saclay

Examinatrice

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au Service de Chimie Bioorganique et de Marquage du CEA et ont été financés par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR).

Tout d'abord, je souhaite remercier les membres du jury qui ont acceptés d'évaluer mes travaux de thèse, Dr Dominique Bonnet, Dr Frédéric Lamaty, Pr Christine Gravier-Pelletier ainsi que Pr Dominique Guianvarc'h qui a aussi accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse durant ces trois années.

Je souhaite aussi remercier le Dr Frédéric Taran, mon directeur de thèse, pour m'avoir intégré à son équipe et pour m'avoir fait confiance sur ce projet. Je le remercie pour son encadrement, ses discussions scientifiques toujours constructives et passionnées et le soutien tout au long de cette aventure.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement le Dr Antoine Sallustrau qui m'a encadrée pendant cette thèse et sans qui elle n'aurait pas eu la même saveur. Tu as été un pilier chaque jour de cette thèse. Merci pour ton soutien et ta confiance sans faille. Tu as toujours été là pour moi même lorsque tu étais débordé et tu as été une oreille attentive à toute mes râleries. Merci pour ta patience. Comme on dit « qui aime bien châtie bien ».

Merci à Davide Audisio, chef du laboratoire LMC, de m'avoir suivi tout au long de ces trois ans et qui nous a toujours appris la rigueur scientifique. Merci pour toutes nos discussions scientifiques ou non.

Je remercie Eugénie Romero, de m'avoir initié à l'HTE. Ça été très agréable d'apprendre avec toi.

J'aimerais aussi remercier mes collègues thésards et post-docs avec qui j'ai partagé toute cette aventure. On s'est tenu les coudes jusqu'au bout. Alexandre merci pour tout, merci pour ta bonne humeur et tes imitations parfaites, celle de Voldemort me fera toujours craquer. Je n'oublierai jamais nos fous rires. Gus et Molins, les partenaires de crime, vous m'avez fait tant rire pendant ces deux ans, je vous souhaite le meilleur. Mais par pitié, Molins, cesse de me prendre en photo. Rémi et Emilie, nos papa et maman du laboratoire, merci pour votre gentillesse (surtout pour Emilie), vos conseils avisés et votre bonne humeur. Ça a été un grand plaisir de travailler avec vous. Sébastien je compte sur toi pour prendre ma relève et continuer d'embêter Antoine, je sais que tu prendras cette mission à cœur. Merci aussi à tous les anciens thésards qui m'ont beaucoup manqué après leur départ, Joao, Maxime, Sophia, Elise et Hugo. C'est avec vous que j'ai commencé au SCBM et je ne vous oublierai jamais. Taline, Chloé, Lilian, Louise et tous les nouveaux, j'ai confiance que vous saurez garder cette ambiance incroyable du SCBM dans les prochaines années (pas de pression).

J'aimerais aussi remercier le Laboratoire de Marquage sur Word, aussi appelé bureau des « rédactos », Alexandre, Maxime et Kevin. Ça été un plaisir de rédiger avec vous dans une super ambiance. Ça n'aurait pas été pareil sans vous.

Mon équipe de cœur, le Tritium, Claire, Céline, Stéphane, Anna, Chérif, Kévin, Maxime, Benoit, merci pour tout. Merci d'avoir su mettre une si bonne ambiance dans le service. Vous êtes au top !

Je ne pourrais pas continuer ces remerciements sans parler de Céline. Tu as été mon pilier au SCBM,

mon « gars-sûr » comme on dit, merci pour ton soutien à chaque instant. Tu étais déjà une amie quand tu es arrivée, tu l'es encore plus maintenant. Nos fous rires et ton rire machiavélique qui illuminaient mes journées vont terriblement me manquer, mais je sais que notre amitié continuera en dehors du SCBM. Par cette présente, je te nomme propriétaire à temps-plein du Nerf, n'hésite pas à l'utiliser si Edmond ou Éric t'embêtent un peu trop.

Je voudrais remercier toute l'équipe d'analyse, David, Timothée, Sabrina et Amélie qui ont toujours été là pour nous aider avec des purifications d'enfer. David, tu es génial, reste comme tu es. Tim, ça a été un plaisir de travailler avec toi sur la partie HTE qui nous en a fait voir de toutes les couleurs.

Je voudrais aussi remercier tous les membres du SCBM qui ont participé au bon déroulement de ma thèse, Greg Pieters, Edmond Gravel, Éric Doris, JC Cintrat, Sébastien Garcia, Karen Hinsinger, et Christophe Créminon pour ses petites anecdotes toujours rigolotes.

Plus particulièrement, un grand merci à Cristelle, toujours de bonne humeur et qui m'a toujours accompagné dans mes bêtises. Nos pauses vont beaucoup me manquer. Ne plus te voir chaque jour va laisser un grand vide.

Je voudrais remercier toutes les personnes que je n'ai pas citées mais qui ont participé au bon déroulement de ma thèse et à la merveilleuse ambiance qui règne au SCBM.

Enfin j'aimerais sincèrement remercier mes proches qui m'ont toujours soutenue dans cette aventure, Nicolas, qui a toujours été à l'écoute même après nos longues journées au labo, ainsi que ma mère, ma sœur et mes tantes. Vous avez toujours été un soutien sans faille tout au long de ma vie. Je vous aime.

Abréviations et symboles

A

ADC Antibody Drug Conjugate

B

BARAC Biarylazacyclooctynone

BCN Bi-cyclooctyne

Bim tris(2-benzimidazolylmethyl)amine

Boc tert-Butoxycarbonyl

BSA Bovin Serum Albumine

BTAA 2-(4-((Bis((1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acetic acid

BTES 3-(4-((Bis((1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propane-1-sulfonic acid

C

CDI Carbonyldiimidazole

CO₂ Dioxyde de carbone

CPMV *Cowpea mosaic virus*, Virus de la mosaïque du niébé

Cu Cuivre

CuAAC Copper-catalysed Alkyne-Azide Cycloaddition, cycloaddition alcyne-azoture cupro-catalysée

CuSAC Copper-catalysed Sydnone-Alkyne Cycloaddition, cycloaddition alcyne-sydnone cupro-catalysée

CuSO₄ Sulfate de cuivre

D

DBCO Aza-Dibenzocyclooctyne

DCC *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide

DCM Dichlorométhane

DIBO Dibenzocyclooctynol

DIFO Difluorocyclooctyne

DIPEA Diisopropyléthylamine

DMAP 4-Diméthylaminopyridine

DMF Diméthylformamide

DMSO Diméthylsulfoxyde

DTT Dithiothreitol

E

eq. Équivalent

Et Ethyle

(EtOH)₃N Triéthanolamine

G

GalNAz *N*-azidoacetylgalactosamine

GlcNAz	<i>N</i> -azidoacetylglucosamine
GSH	Glutathion
H	
h	Heure
HATU	Hexafluorophosphate de-N, N-diméthylméthaniminium
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	Spectromètre de Masse à Haute-Résolution
HSA	Human Serum Albumine, Albumine de Sérum Humain
HTE	High Throughput Experimentation
I	
I2BC	Institut de Biologie Intégrative de la Cellule
iEDDA	Inverse Electron Demand Diels-Alder, Réaction de Diels-Alder à demande inverse d'électrons
K	
k	Constante de vitesse
K _d	Constante de dissociation
L	
λ	longueur d'onde
LC/MS	Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse
M	
μ	Micro
m	Milli
M	Molaire
MALDI	Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice
Me	Méthyle
min	Minutes
ManNAz	<i>N</i> -azidoacetylmannosamine
MMAE	monomethyl auristatin
N	
Na	Sodium
nm	Nanomètre
Na Asc	Ascorbate de Sodium
Na ₂ S ₂ O ₄	Dithionite de sodium
NHS	N-Hydroxysuccinimide
O	
ONB	<i>ortho</i> -nitrobenzylique
P	
PBS	Phosphate Buffer Saline
PEG	polyéthylène glycol
Ph	Phényle
R	

rDa	rétro Diels-Alder
ROS	Reactive Oxygen Species, espèce réactive de l'oxygène
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
S	
s	Seconde
SDS Page	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SFC	Chromatographie en Fluide Supercritique
SiaNAc	Acide sialique <i>N</i> -acétylé
SPAAC	Strain Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition
SPICC	Strain-Promoted Iminosynone-Cyclooctyne Cycloaddition
SPSAC	Strain-Promoted Sydnone-Alkyne Cycloaddition
T	
T.a.	Température ambiante
TAMRA	5-Carboxytetramethylrhodamine
TBTA	Tris((1-benzyl-4-triazolyl)methyl)amine
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TFA	Acide trifluoroacétique
TFAA	Anhydride trifluoroacétique
THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine
THF	Tetrahydrofurane
TMTH	3,3,6,6-tetramethylthiaheptyne
U	
UV	Ultra Violet

Sommaire

Introduction générale	14
I) Chimie click et chimie bioorthogonale	15
I.1) Généralités	15
I.2) Les réactions de ligation	16
I.2.1) La ligation de Staudinger	16
I.2.2) La réaction tétrazine/TCO	18
I.2.3) Les cycloadditions 1,3-dipolaires	19
I.2.3.a) La CuAAC	20
I.2.3.b) La CuSAC	27
I.2.3.c) La cycloaddition azoture-alcyne cyclique (SPAAC)	28
I.2.3.d) La SPSAC	29
I.3) Les réactions de coupures	30
I.3.1) Coupure en milieu acide	32
I.3.2) Coupure par la réaction de Staudinger	33
I.3.3) Coupure par réaction entre une tétrazine et un alcène	34
I.3.4) Les coupures par photoactivation	35
I.3.5) Les liens clivables disulfure	36
II) Applications en chémobiologie pour l'étude des mécanismes du vivant	37
II.1) Les rapporteurs chimiques	37
II.2) Imagerie <i>in vivo</i> du glycome	40
I.2.1) Par la ligation de Staudinger	40
II.2.2) Par la réaction de SPAAC	41
II.2.3) Par la réaction de CuAAC	42
II.3) Imagerie <i>in vivo</i> du Protéome	43
II.4) Protein Fishing	45
III) Travaux antérieurs et objectifs	49
III.1) Les azotures chélatants	50
III.2) Les iminosydnonnes comme lien clivable	50
III.3) Objectifs de la thèse	53
Chapitre I. Cycloadditions des sydnones et des iminosydnonnes avec les alcynes	58

I)	Rappels sur les composés mésoioniques	58
I.1)	Les sydnones	59
I.1.1)	Synthèse des sydnones	59
I.1.2)	Fonctionnalisation des sydnones	61
I.1.3)	Réactivité des sydnones	62
I.1.3.a)	Cycloaddition thermique	62
I.1.3.b)	Cycloaddition cupro-catalysée	64
I.2)	Les iminosydnones	67
I.2.1)	Synthèse des iminosydnones	67
I.2.2)	Fonctionnalisation en position N6 des iminosydnones	68
I.2.3)	Fonctionnalisation en position C4 des iminosydnones	71
I.2.4)	Réactivité des iminosydnones	73
II)	Objectifs du chapitre	76
III)	High Throughput Experimentation	76
IV)	Tests de criblage	80
IV.1)	Premiers tests de criblage	80
IV.2)	Nouvelle technique d'analyse des plaques HTE	82
IV.3)	Criblage des ligands du cuivre	84
IV.3.1)	Synthèse des ligands du cuivre	84
IV.3.2)	Synthèse des composés mésoioniques	89
IV.3.3)	Mise en plaque	90
IV.3.4)	Résultats	91
IV.4)	Criblage des conditions de CuSAC	96
IV.4.1)	Criblage de la charge catalytique pour la réaction de CuSAC à partir de la Sydnone A	96
IV.4.2)	Criblage des bases et réducteurs pour la réaction de CuSAC à partir de la Sydnone A	97
IV.4.3)	Influence de la température sur la réaction de CuSAC à partir de la Sydnone A	98
IV.4.4)	Criblage du solvant pour la Sydnone A	100
IV.4.4.a)	Criblage de solvants aqueux ou organo/aqueux	100
IV.4.4.b)	Criblage de solvants organiques	101
IV.5)	Criblage des conditions de CuISAC	102
IV.5.1)	Criblage de la charge catalytique pour la réaction de CuISAC à partir de l'iminosydnone F	102

IV.5.2) Criblage des bases et réducteurs pour la réaction de CuISAC à partir de l'iminosydnone F	103
IV.5.3) Influence de la température sur la CuISAC pour l'iminosydnone F	104
IV.5.4) Criblage du solvant pour la réaction de CuISAC à partir de l'iminosydnone F	105
IV.5.4.a) Criblage de solvants aqueux ou organo/aqueux	105
IV.5.4.b) Criblage de solvants organiques	106
IV.6) Conclusion	107
V) Etendue de la réaction	108
VI) Conclusion	115
Chapitre II : Chimie Click pour l'étude du Myristoylome	120
I) Introduction sur le Myristoylome	120
I.1) Généralités	120
I.2) Identification de Myristoylome : les approches précédentes	122
I.3) Notre approche pour l'étude du Myristoylome	128
II) Comparaison des sondes azotures fluorescentes pour la visualisation des protéines myristoylées	131
II.1) Validation du protocole d'incorporation de YnMyr	131
II.2) Synthèse des sondes fluorescentes	133
II.2.1) Synthèse de la sonde SF2	134
II.2.2) Synthèse de la sonde SF3	135
II.3) Comparaison des sondes fluorescentes	137
III) Synthèse et utilisation des sondes pour le fishing de protéines myristoylées	138
III.1) Synthèse des sondes	140
III.1.1) Synthèse des azotures	140
III.1.1.a) Azoture classique de II-S1	140
III.1.1.b) Azoture chélatant de II-S2	140
III.1.1.c) Azoture chélatant de II-S3	141
III.1.2) Synthèse du lien clivable	142
III.1.3) Assemblage des building blocks	143
III.2) Comparaison des sondes et mise au point du protocole de CuAAC	145
III.3) Effet du temps de réaction	148
IV) Validation du protocole de protein fishing	149

V) Conclusion	154
Chapitre III : Synthèse d'indazolo[2,3-a]quinoxalines à partir de sydnones tricycliques	158
I) Introduction sur les indazoloquinoxalines	158
I.1) Généralités sur les indazoloquinoxalines	158
I.2) Synthèse d'indazolo[2,3-a]quinoxalines décrites dans la littérature	159
II) Notre approche	160
III) Synthèse de l'azidosydnone et de l'aminosydnone	163
IV) Synthèse de quinoxalines sydnones	164
V) Synthèse d'indazoloquinoxalines	167
VI) Conclusion	168
Conclusion et perspectives	172
Supporting information	180
Material and equipment	180
Chapitre I : Cycloadditions des sydnones et des iminosydnones avec des alcynes	182
Chapitre II : Click chemistry for the study of Myristoylome	250
Chapter 3 : Synthesis of indazolo[2,3-a]quinoxalines synthesis from tricyclic sydnones	269
Publications	Erreur ! Signet non défini.

Introduction générale

Introduction générale

Au cours des deux derniers siècles, des milliers de réactions chimiques ont été découvertes et ont permis d'augmenter la complexité des molécules de synthèse. Depuis les années 2000, une nouvelle classe de réactions chimiques a émergé : les réactions dites « click » qui conduisent à des produits de condensation entre deux unités réactionnelles avec une remarquable efficacité. Barry Sharpless, lauréat d'un prix Nobel en 2022 pour ses travaux sur la chimie click, définit en premier ce concept dans un article paru en 2001, la même année que son premier prix Nobel obtenu pour ses travaux sur la catalyse asymétrique. Selon B. Sharpless une réaction chimique peut être considérée comme « click » si elle répond à certains critères de réactivité, efficacité, ou encore de purification aisée :

« A reaction must be modular, wide in scope, give very high yields, generate only inoffensive by-products that are easily separated, and be stereospecific. The process must include simple reaction conditions, readily available starting materials and reagents, the use of no solvent, or a solvent that is benign or easily removed, and simple product isolation. »

Une propriété remarquable de la chimie click est sa très grande sélectivité ce qui se traduit en synthèse organique par une excellente tolérance pour les fonctions chimiques. Cette propriété remarquable a par la suite permis d'entrevoir des applications biologiques lorsque cette sélectivité est compatible avec la multitude de fonctions chimiques présente dans les milieux biologiques. C'est ainsi que dès 2003 Carolyn Bertozzi a introduit le concept de chimie bioorthogonale. Ce type de chimie doit permettre des réactions de ligations, telles que celles de la chimie click, ou des réactions de coupures compatibles avec les milieux biologiques. Si l'ensemble de ces propriétés est respecté alors ces réactions pourraient être réalisées dans des cellules ou même dans un organisme animal.

Ce concept, et tous les résultats qui ont contribué à sa validation, a permis à Carolyn Bertozzi d'être co-lauréate avec Barry Sharpless et Morten Meldal du prix Nobel de Chimie 2022 pour leurs travaux en chimie click et en chimie bioorthogonale.



Figure 1. Lauréats du Prix Nobel de Chimie 2022

I) Chimie click et chimie bioorthogonale

I.1) Généralités

Ces dernières décennies, les biochimistes se sont intéressés à l'étude de biomolécules d'intérêt (glycanes, lipides, acides nucléiques...) dans leur milieu naturel : la cellule. La chimie bioorthogonale permet d'apporter les outils nécessaires à ces études. Les réactions bioorthogonales sont des réactions qui n'interfèrent pas avec le milieu biologique. Les fonctions réactives impliquées dans la réaction (Figure 2) doivent être de préférence de petite taille et inertes vis-à-vis de la multitude de fonctions présentes dans les milieux biologiques (telles que les carboxylates, les ammoniums, les phosphates, ...) pour ne pas modifier l'environnement de la molécule d'intérêt. Les cinétiques de ces réactions sont elles aussi importantes et doivent être de préférence rapides en fonction des applications souhaitées. Par exemple, il est admis que pour des applications *in vivo* la constante de vitesse d'une réaction de ligation doit être idéalement supérieure à $100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.¹ Cette constante peut être plus faible, autour de $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, si une application sur cellule est recherchée.

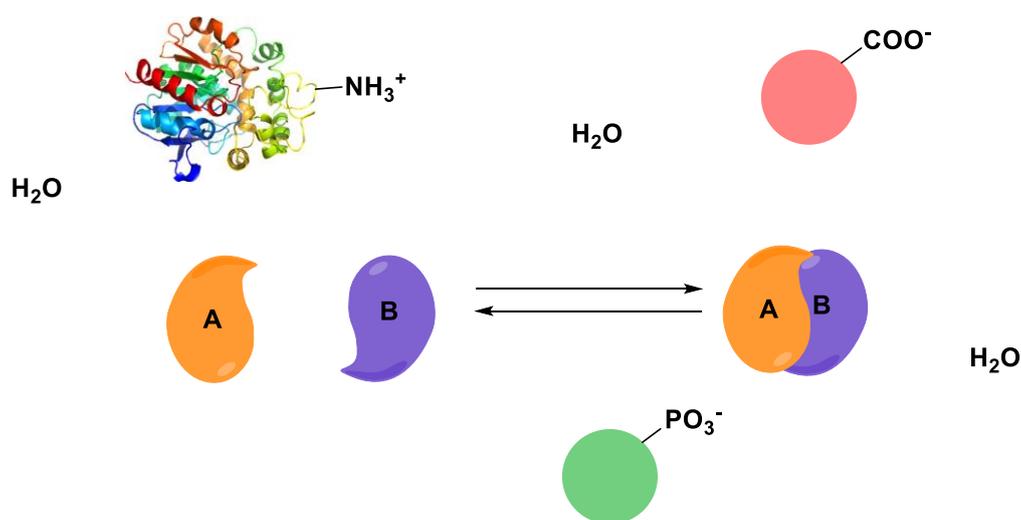


Figure 2. Schéma d'une réaction de ligation ou de coupure bioorthogonale

La chimie bioorthogonale permet d'effectuer des réactions chimiques dans la cellule sans interférer avec les autres fonctions, mais il est nécessaire pour cela d'introduire, sur l'objet moléculaire d'intérêt,

¹ E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, *44*, 666-676.

une fonction chimique bioorthogonale capable de réagir sélectivement. Cette fonction est appelée « rapporteur chimique » et sera développée de façon plus approfondie dans la suite de cette introduction. Une des applications majeures de la chimie bioorthogonale concerne l'étude des mécanismes fondamentaux du vivant à l'aide de sondes chimiques bioorthogonales permettant l'imagerie et l'identification des constituants du vivant.

Il existe deux types de réactions bioorthogonales : les réactions de ligation qui permettent de lier de façon covalente deux entités entre elles et les réactions de coupure qui permettent de libérer des molécules d'intérêt dans les milieux biologiques. Ces deux types de réactions seront présentées dans la suite de l'introduction.

1.2) Les réactions de ligation

1.2.1) La ligation de Staudinger

Le premier exemple de réaction bioorthogonale développée par Carolyn Bertozzi en 2000 est la ligation de Staudinger.² Elle s'appuie sur la réaction de Staudinger, très utilisée en chimie organique, qui permet de réduire les fonctions azotures en amines par l'action d'une phosphine en milieu aqueux. La petite taille des réactifs, leur stabilité et leur absence des systèmes biologiques font de la réaction de Staudinger une réaction de choix en chimie bioorthogonale. D'un point de vue mécanistique, la réaction de Staudinger implique une attaque nucléophile d'une phosphine sur un azoture pour former un phosphazène. La perte d'une molécule de diazote N_2 , mène à la formation d'un iminophosphorane qui est ensuite hydrolysé pour obtenir une amine et l'oxyde de phosphine (Schéma 1.A). L'introduction d'une fonction ester en position *ortho* de la phosphine permet de piéger l'imino-phosphorane et de former une liaison amide après un réarrangement intramoléculaire : il s'agit de la ligation de Staudinger (Schéma 1.B). L'équipe de Bertozzi a ensuite imaginé une version améliorée dite « traceless » de la ligation de Staudinger permettant de libérer l'oxyde de phosphine de l'adduit amide en inversant la fonction ester branchée sur la biomolécule devant être couplée (Schéma 1.C).

² E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science*, **2000**, 287, 2007-2010.

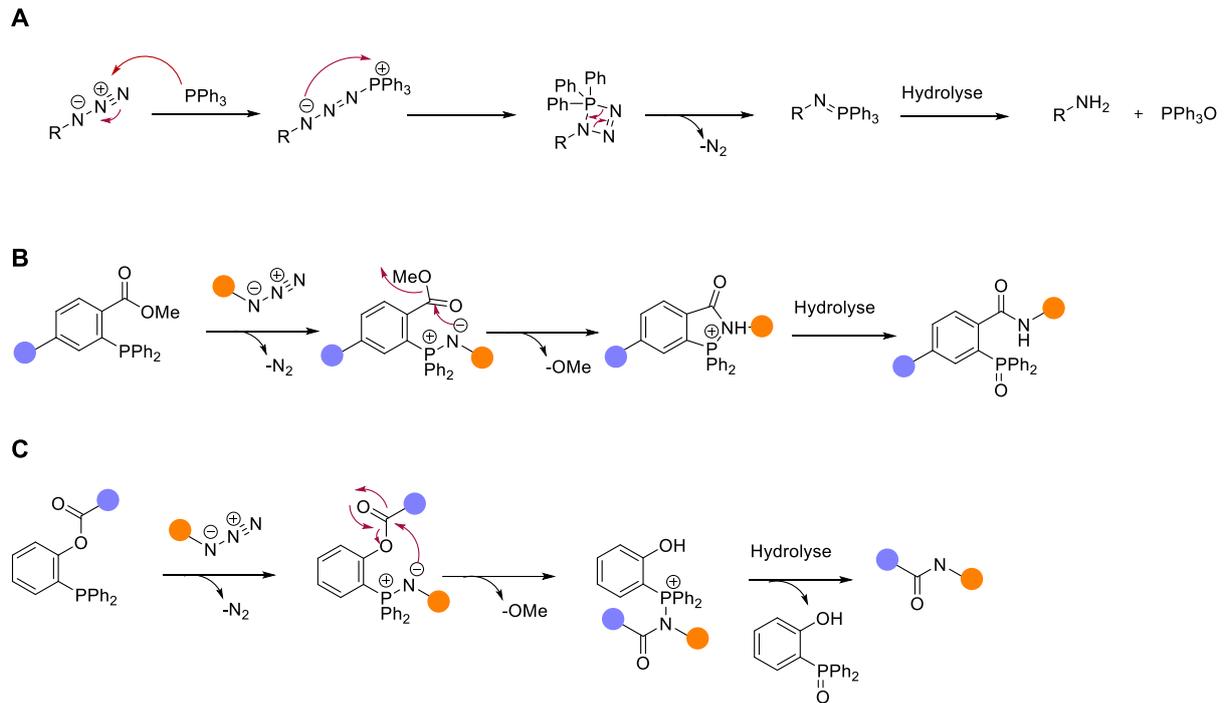


Schéma 1. A. Réaction de Staudinger, B. Ligation de Staudinger selon Bertozzi, C. Version « Traceless » de la ligation de Staudinger

Ainsi, l'équipe de Bertozzi a incorporé un sucre modifié, le *N*-azidoacetylmannosamine, en tant que rapporteur chimique à la surface des cellules par les voies métaboliques. Ce sucre, porteur de la fonction bioorthogonale azoture, est utilisé par la cellule pour la biosynthèse de ses polysaccharides de surface. Après quelques jours de culture cellulaire en présence de ce sucre, la surface des cellules se retrouve donc décorée par des azotures. Une sonde phosphine biotinylée a ensuite été incubée avec les cellules dans du PBS pendant 1h pour permettre la réaction de ligation de Staudinger, puis une avidine fluorescente permettant la capture des biotines et une analyse par cytométrie en flux a été utilisée. L'augmentation de la fluorescence prouve la présence de biotine sur la membrane des cellules et donc la ligation entre le rapporteur chimique et la sonde (Schéma 2).

Introduction générale

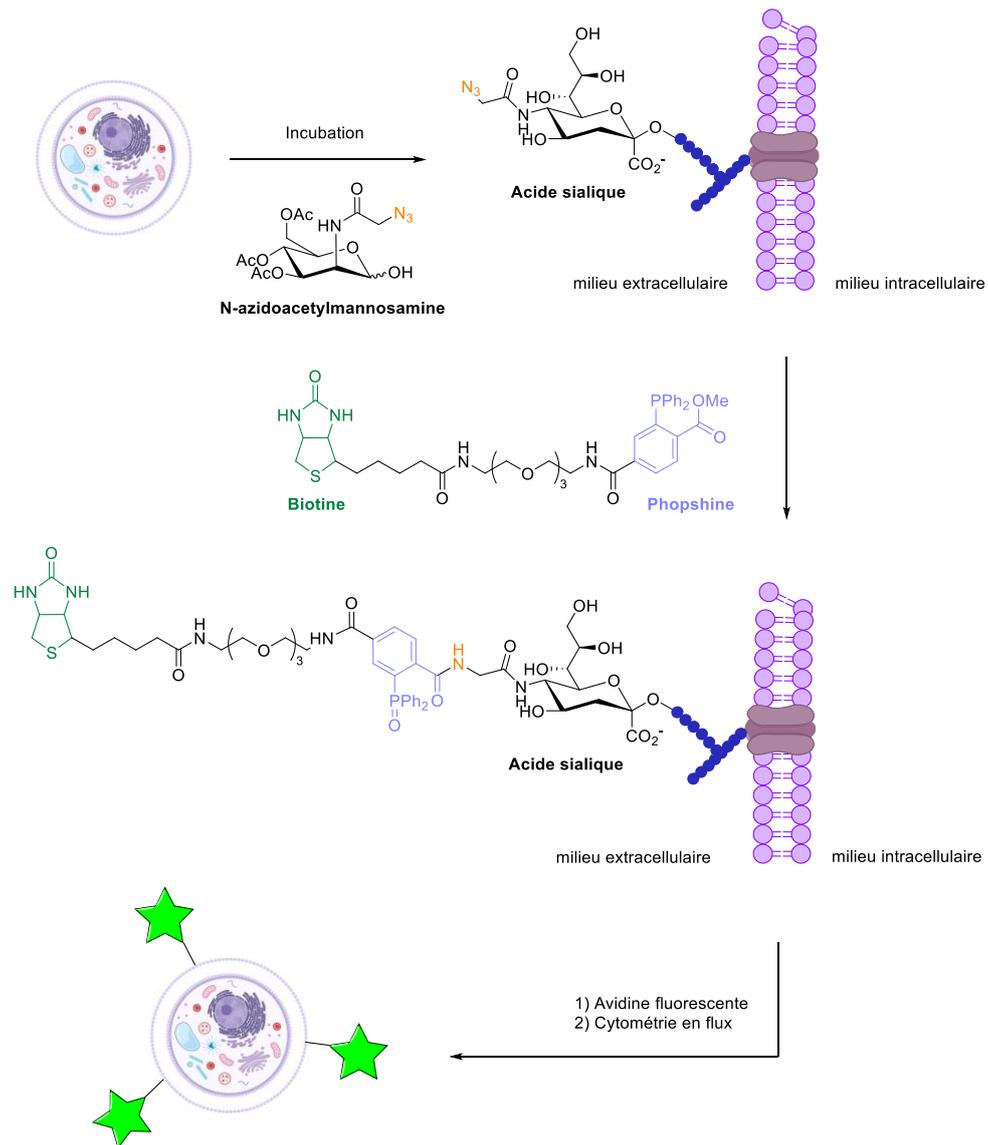


Schéma 2. Schéma de la ligation de Staudinger à la surface des cellules pour l'étude du glycome

Le groupement azoture a l'avantage d'être de petite taille, stable et facilement incorporable sur une biomolécule par substitution nucléophile sans modifier le comportement de celle-ci dans le milieu. L'azoture est une fonctionnalité de choix pour les réactions de click.

1.2.2) La réaction tétrazine/TCO

En 2008, l'équipe de Fox introduit les réactions avec les tétrazines comme réactions de ligation bioorthogonales notamment en utilisant un alcène tendu : le trans-cyclooctène (TCO).³ Cette

³ M. L. Blackman, M. Royzen, and J. M. Fox, J. Am. Chem. Soc., **2008**, *130*, 13518–13519

cycloaddition [4+2] de la famille des réactions de Diels-Alder à demande inverse en électron s'est montré intéressante. Le mécanisme réactionnel consiste en une réaction de cycloaddition [4+2] entre le TCO et la tétrazine pour former un intermédiaire subissant une réaction de rétro Diels-Alder puis un transfert d'électron et une oxydation pour former une pyridazine.

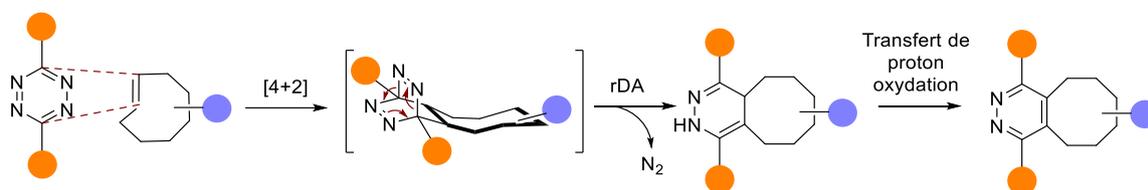


Schéma 3 : Mécanisme de la réaction iEDDA entre une tétrazine et le trans-cyclooctène

Cette réaction a l'avantage d'être bien plus rapide que toutes les réactions de click. Par exemple, Fox montre que la réaction entre le TCO et la 3,6-di-(2-pyridyl)-s-tétrazine a une constante de vitesse de $2000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à une très basse concentration en réactifs de $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. Par ailleurs, cette réaction a l'avantage de ne dégager qu'un seul sous-produit : le N_2 . Néanmoins, il est à noter que le composé TCO peut s'isomériser en cis-cyclooctène (CCO) qui est, certes plus stable, mais surtout inactif vis-à-vis des tétrazines. Des modifications structurales ont été faites sur les tétrazines pour modifier leur réactivité, notamment en ajoutant des groupements électroattracteurs, et augmenter la vitesse de la réaction mais cela implique le plus souvent une perte de stabilité de la tétrazine.⁴

1.2.3) Les cycloadditions 1,3-dipolaires

Comme introduit en début de chapitre, les réactions de chimie click décrites en 2002 par Barry Sharpless répondent à des critères précis de réactivité et de purification.⁵ Sharpless a classé les réactions click en 4 catégories : les réactions de cycloadditions, les substitutions nucléophiles de type ouverture d'époxyde, les transformations de carbonyles en urée, hydrazone, amide, ... et les additions sur des liaisons multiples. Dans la suite de cette partie, nous nous intéresserons plus particulièrement aux réactions de cycloadditions qui sont les plus utilisées en chimie bioorthogonale.

Une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire désigne une réaction entre un dipôle 1,3 (molécule dichargée) et un dipolarophile (généralement un alcène ou un alcyne) pour former un cycle à 5

⁴ M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.*, **2011**, *22*, 2263–2270.

⁵ H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2004–2021.

chaînons (Schéma 4). De nombreux dipôles peuvent être utilisés mais les groupements azotures restent aujourd'hui les plus reportés.

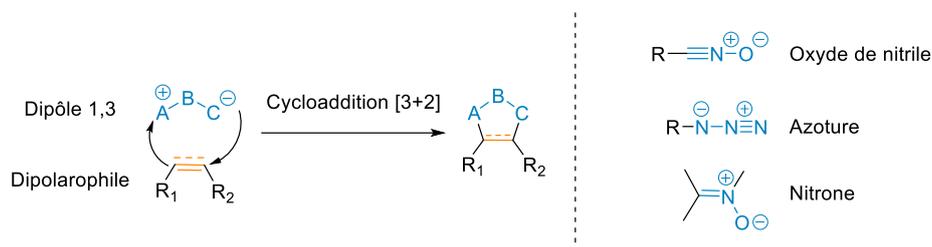


Schéma 4. Réactions de cycloadditions

1.2.3.a) La CuAAC

Désignée par Sharpless comme « la crème de la crème », la réaction de cycloaddition entre un alcyne et un azoture introduit par Huisgen en 1963 est à la base du concept de la chimie click. Cette réaction permet de former un triazole à partir d'un groupement azoture et d'un alcyne en conditions thermiques.^{6,7} Cette réaction a longtemps été peu utilisée par les chimistes à cause de la fonction azoture réputée dangereuse. De plus, cette cycloaddition mène à deux régioisomères : le triazole 1,4 et le triazole 1,5 (Schéma 5) et nécessite de hautes températures (> 150°C) qui sont souvent incompatibles avec certains substrats.

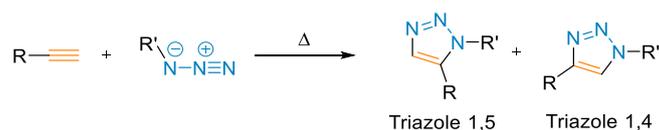


Schéma 5. Cycloaddition de Huisgen

En 2001, l'équipe de Sharpless et l'équipe de Meldal, de façon parallèle, mettent en évidence que la réaction de cycloaddition azoture-alcyne peut être catalysée par des sels de cuivre (I) permettant d'accélérer la vitesse de la réaction de façon spectaculaire. La réaction devient alors efficace à température ambiante et ne forme qu'un seul régioisomère : le triazole 1,4 (Schéma 6).^{8,9}

⁶ R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1963**, *11*, 633-645

⁷ M. Breugst, H. U. Reissig, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, *59*, 12293-12307

⁸ C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 3057-3064.

⁹ V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 2596-2599.

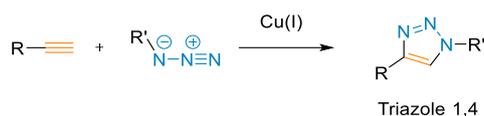
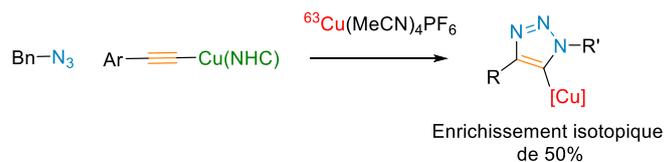


Schéma 6. Réaction de CuAAC

Cette réaction, appelée CuAAC pour Copper-catalysed Alkyne-Azide Cycloaddition, est devenue une référence dans le domaine de la chimie click du fait de son excellente tolérance aux différentes fonctions chimiques, de sa très grande efficacité permettant la formation de triazoles avec des rendements élevés, et de sa facilité de mise en œuvre. De plus, le produit triazole formé est un bioisostère de fonction amide donc très utile en chimie médicinale. L'espèce catalytique active de cette réaction est le cuivre(I) mais la procédure la plus utilisée consiste à utiliser des sels de cuivre (II), tels que le CuSO_4 , et de les réduire *in situ* par un excès d'un agent réducteur tel que l'ascorbate de sodium ou la tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP). Cela permet ainsi de faciliter la mise en œuvre pratique puisque le cuivre(I) s'oxyde en cuivre(II) en présence d'oxygène. En 2013, l'équipe de Fokin a établi l'implication de deux atomes de cuivre dans le mécanisme de la réaction de CuAAC en utilisant des sources de cuivre enrichies en ^{63}Cu .¹⁰ Leur équipe a synthétisé un acétylure de cuivre avec une distribution isotopique naturelle et a fait réagir ce composé avec un azoture en présence d'une source de cuivre enrichie en ^{63}Cu . Ils ont obtenu un enrichissement isotopique de 50% du triazole formé impliquant nécessairement la présence d'un deuxième atome de cuivre dans le mécanisme de cycloaddition, ici le ^{63}Cu (Schéma 7. A). La première étape du mécanisme correspond à la formation d'un π -adduit d'un premier atome de cuivre sur l'alcyne permettant de baisser suffisamment le pKa de l'alcyne pour qu'un second atome de cuivre puisse former l'acétylure de cuivre **2** (Schéma 7. B). L'azoture peut alors être coordonné par le premier cuivre. L'attaque nucléophile de la liaison σ sur l'azoture forme l'intermédiaire **4**. Enfin, l'azoture attaque la liaison carbone-cuivre de l'alcène et permet le départ d'un atome de cuivre pour former le triazole de cuivre **5** qui subit une hydrolyse pour former le triazole 1,4.

¹⁰ B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin, *Science*, **2013**, *340*, 457-460.

A. Expérience menée par Fokin pour prouver le mécanisme à deux atomes de Cu



B. Mécanisme proposé par Fokin

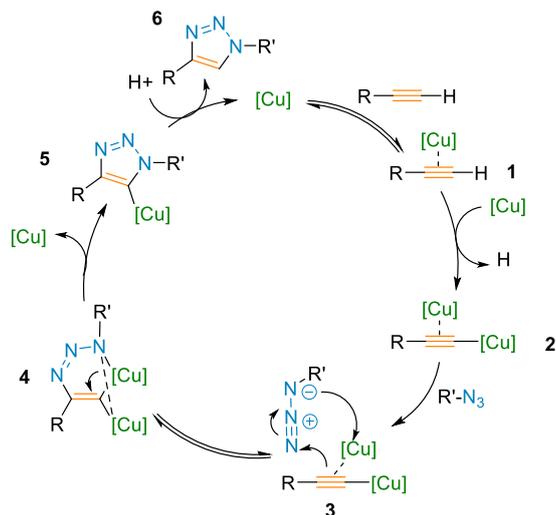


Schéma 7. A. Mécanisme proposé par Fokin et al., B. Confirmation d'un mécanisme à 2 atomes de cuivre

En 2015, l'équipe de Bertrand confirme l'hypothèse de Fokin en synthétisant un complexe à 2 atomes de cuivre(I) stable puis en l'utilisant dans la réaction de CuAAC mettant en évidence la formation d'un complexe à deux cuivres par diffraction des rayons X sur des cristaux.¹¹

Toutefois, la CuAAC présente certaines limites notamment lorsqu'elle est utilisée en milieu complexe. En effet, la combinaison du cuivre et de l'ascorbate de sodium génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS) capables d'oxyder la plupart des biomolécules présentes dans le milieu, limitant très largement son utilisation aux études *in vitro*. Des études ont par la suite montré que l'utilisation de ligands comme réactifs sacrificiels permettait d'inhiber ces espèces réactives de l'oxygène et ainsi rendre la CuAAC plus compatible avec les milieux biologiques complexes.^{12,13}

En plus de leur capacité à inhiber les ROS, les ligands permettent d'améliorer le système catalytique de la réaction en stabilisant et en activant l'espèce active Cu(I) ce qui permet de diminuer la quantité de cuivre et donc d'améliorer la biocompatibilité de la réaction de CuAAC.

¹¹ L. Jin, D. R. Tolentino, M. Melaimi, G. Bertrand, *Sci. Adv.*, **2015**, *1*, e1500304.

¹² S. I. Presolski, V. Hong, S.-H. Cho, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 14570-14576.

¹³ V. Hong, S. Presolski, C. Ma, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 9879-9883.

En 2004, l'équipe de Fokin et Finn, met en évidence l'effet bénéfique des ligands du cuivre pour accélérer la réaction, améliorer les rendements et former un complexe de cuivre stable.^{14,15} Les polytriazoles ont ainsi montré qu'ils étaient de très bons complexants du cuivre permettant de stabiliser le cuivre(I) en conditions aérobiques et d'accélérer la cinétique de réaction. Le ligand tris((1-benzyl-4-triazolyl)méthyl)amine (TBTA) (Figure 3) a été le premier ligand développé pour la réaction de CuAAC mais sa faible solubilité dans l'eau limite son utilisation en milieu biologique. Grâce à leur préparation facile, de nombreux analogues ont pu être rapidement synthétisés, notamment une version hydrosoluble du TBTA, le tris(3-hydroxypropyltriazolylméthyl)amine (THPTA). Ces deux ligands restent aujourd'hui les plus utilisés. Enfin, des ligands tels que BTTES ou BTAA, possédant des groupements volumineux *tert*-butyliques, ont montré d'excellentes capacités, souvent supérieures au TBTA et THPTA, à complexer le cuivre pour la réaction de CuAAC. Des ligands possédant des unités chélatantes de type benzimidazole (BimH)₃ ont eux aussi montré de bonnes capacités à complexer et à stabiliser le cuivre dans la réaction de CuAAC.

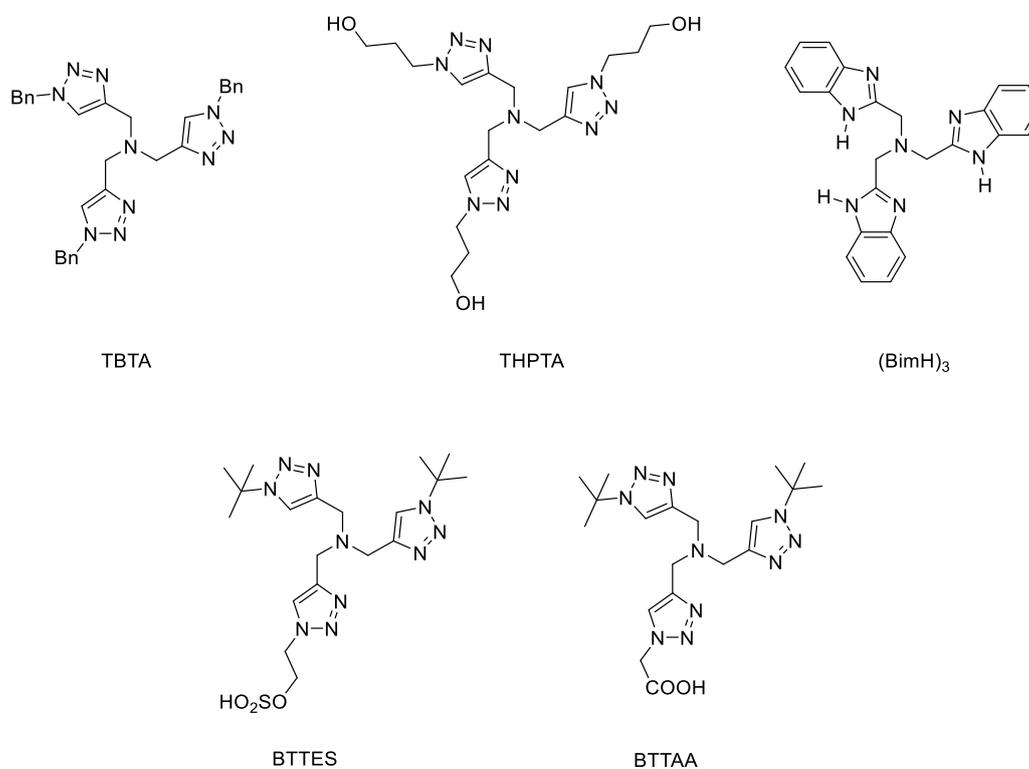


Figure 3. Exemples de ligands pour la CuAAC

En 2005, l'équipe de Finn a fonctionnalisé la surface du virus CPMV (Cowpea mosaic virus) avec des azotures et a réalisé la réaction de click en présence de sulfate de cuivre, de TCEP (un réducteur

¹⁴ T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 2853-2855.

¹⁵ W. G. Lewis, F. G. Magallon, V. V. Fokin, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 9152-9153.

hydrosoluble), d'un ligand tris-triazole (TBTA) et d'un alcyne fluorescent (TAMRA).^{16,17} Ils ont ainsi montré qu'en présence du ligand tris-triazole, toutes les fonctions azotures avaient été converties en triazole mais aussi que l'oxydation des ions Cu(I) en Cu(II) était ralentie. Ainsi, en présence de ligand, la charge catalytique du cuivre pouvait être diminuée. Néanmoins, la diminution de la concentration en cuivre entraîne logiquement une diminution de la cinétique.¹⁸ Dans le but d'améliorer la compatibilité cellulaire de la réaction de CuAAC en diminuant la quantité de ROS générés, l'équipe de Ting a imaginé une plateforme possédant à la fois un motif azoture et un motif chélatant du cuivre afin d'effectuer une « chélation interne permettant d'augmenter localement la concentration en cuivre ». ¹⁹ En effet, l'espèce active Cu(I) est alors complexée au niveau du site de réaction où se trouve l'azoture. Les motifs picolyles se sont montrés être de très bons chélatants internes. Des études cinétiques de ces azotures chélatants ont été menées en observant le « turn on » de fluorescence sur une réaction modèle impliquant une coumarine alcyne (40 μM) et deux composés azotures (20 μM) dont un portant un motif azidométhyl-pyridine, en présence de CuSO_4 à 40 μM et 10 μM ainsi que d'ascorbate de sodium (4 mM). Les cinétiques ont été mesurées avec et sans ajout de ligand externe THPTA (Schéma 8).¹⁹

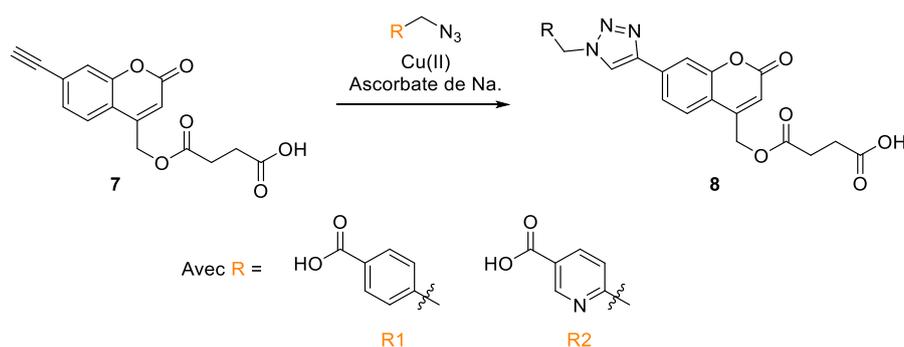


Schéma 8. Réaction modèle utilisée par A. Ting.¹⁹

Les auteurs ont observé que, pour les azotures non chélatants, l'ajout de ligand est indispensable pour former le triazole en moins de 30 minutes et que la diminution de la quantité de CuSO_4 entraîne une diminution de la cinétique. En revanche, pour l'azoture chélatant, l'ajout de ligand n'est pas indispensable mais permet tout de même d'accélérer considérablement la cinétique de réaction. Même à une faible concentration en cuivre de 10 μM , la réaction atteint les 100% de conversion en moins de 5 minutes (Figure 4).

¹⁶ S. S. Gupta, J. Kuzelka, P. Singh, W. G. Lewis, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.*, **2005**, *16*, 1572-1579.

¹⁷ V. Hong, S. I. Presolski, C. Ma, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 9879-9883.

¹⁸ P. S. Donnelly, S. D. Zanatta, S. C. Zammit, J. M. White, S. J. Williams, *Chem. Commun.*, **2008**, 2459-2461.

¹⁹ 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.

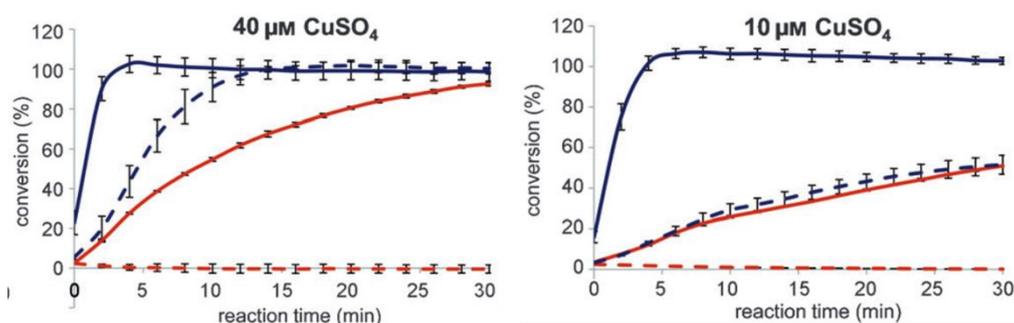


Figure 4. Courbes de cinétique de l'azoture non chélatant (en rouge) et de l'azoture chélatant (en bleu). Les traits pleins correspondent aux cinétiques avec l'ajout de ligand THPTA (4 équivalents par rapport au cuivre). Les traits en pointillés correspondent aux cinétiques sans ajout de ligand externe.

Par la suite, la membrane des cellules a ainsi pu être imagée grâce à l'incorporation d'une azidométhylpyridine, puis grâce à une réaction de click avec un alcyne fluorescent (AF647) (Schéma 9). Pour cette étude, 2 équivalents de cuivre et 20 équivalents de ligands ont été utilisés. Ainsi, même si la vitesse de réaction est augmentée, il est nécessaire d'avoir une quantité de cuivre substoichiométrique pour réaliser la réaction dans ces conditions de concentrations.

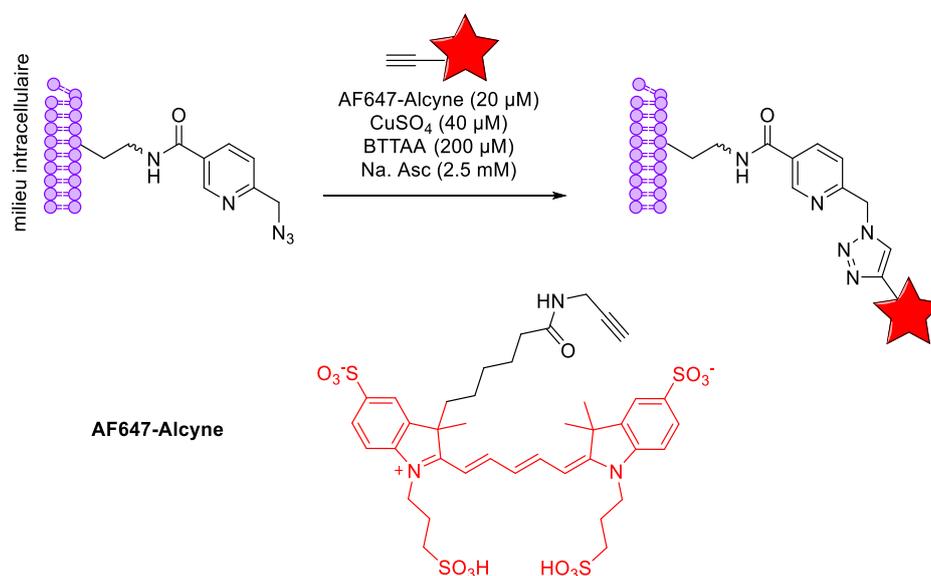


Schéma 9. Marquage de la membrane des cellules par Ting¹⁹

Le concept de chélation interne introduit par Ting a donc permis d'accélérer les réactions du CuAAC mais pas de diminuer la quantité de cuivre utilisée lorsque les cibles sont en faibles concentrations. Cette problématique est préjudiciable pour des applications impliquant des systèmes biologiques complexes tels que les cellules vivantes. Pour autant, ce concept a permis d'ouvrir la voie à des azotures chélatants plus performants. Ainsi, en 2014, notre équipe a été la première à s'inspirer des

ligands commerciaux de type tris-triazole pour imaginer des azotures chélatants possédant plusieurs atomes d'azotes capables de complexer le cuivre plus efficacement.²⁰ Une librairie d'azotures chélatants bi-, tri- et tétradentate a été synthétisée et des résultats prometteurs ont été obtenus pour l'azoture chélatant **9** (Figure 5) En effet, pour 1 équivalent de cuivre, les cinétiques de la CuAAC classique sont de l'ordre de 0.001 à 1 M⁻¹.s⁻¹ en fonction du ligand utilisé alors qu'elles sont de 82 M⁻¹.s⁻¹ avec l'azoture chélatant **9**. Par ailleurs, il est important de noter que contrairement à l'azidométhyl-pyridine **8** développée par Ting, l'azoture chélatant **9** s'utilise sans ajout de ligand externe. En effet, en présence de ligand BTTE, on observe une diminution de la cinétique, qui peut être liée à la complexation d'une partie des atomes de cuivre par le BTTE loin du site de réaction. Par la suite, l'azoture chélatant **9** a été fonctionnalisé par un fluorophore et cette sonde a permis le marquage intracellulaire des microtubules sur des cellules vivantes avec 1 équivalent de cuivre à 50 μM.

Deux ans plus tard, l'équipe de Zhang, s'est inspiré de cet azoture chélatant pour construire un nouvel azoture chélatant possédant 3 sites de fonctionnalisation.²¹ En effet, ils ont transformé l'azote central tertiaire de l'azoture de Taran **9** par un carbone quaternaire permettant d'avoir un site de fonctionnalisation supplémentaire (**10** Figure 5). Ainsi les groupements R1 et R2 peuvent être ajustés pour améliorer la biocompatibilité tandis que le groupement R3 peut être modulé pour permettre d'y accrocher un fluorophore ou une biotine pour des applications en bioconjugaison. Une étude a permis de montrer que la cinétique de réaction avec cet azoture chélatant **10** était légèrement supérieure à celle obtenue avec **9** (121 M⁻¹.s⁻¹). Grâce à ce composé ils ont pu imager les glycanes d'un organisme vivant : *Caenorhabditis elegans*. Ces vers ont été incubés avec Ac₄GalNAc, un sucre tétraacétylé portant une fonction alcyne, afin de marquer les glycanes puis avec 100 μM d'une sonde fluorescente portant l'azoture chélatant **10** complexé au CuSO₄ *in vivo*. La fluorescence de la queue des vers a permis de confirmer la réaction de CuAAC *in vivo* sur un animal.

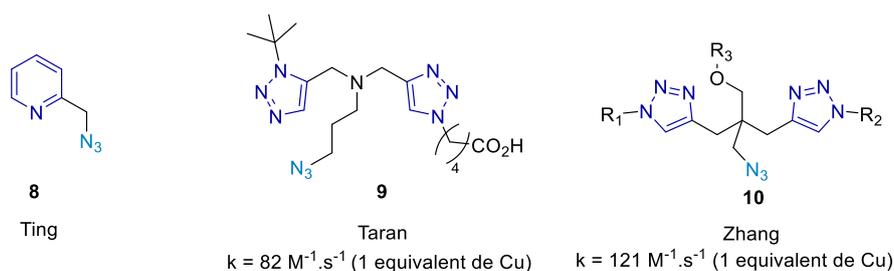


Figure 5. Exemples d'azotures chélatants

La conception de ces azotures chélatants a constitué une avancée pour le domaine de la chimie bioorthogonale puisque la CuAAC n'est maintenant plus cantonnée aux études *in vitro*.

²⁰ V. Bevilacqua, M. King, M. Chaumontet, M. Nothisen, S. Gabillet, D. Buisson, C. Puente, A. Wagner, F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5872–5876

²¹ Y. Su, L. Li, H. Wang, X. Wang, Z. Zhang, *Chem. Commun.*, **2016**, *52*, 2185–2188.

1.2.3.b) La CuSAC

Dans les années 1960, Rolf Huisgen a travaillé sur les réactions de cycloadditions 1,3-dipolaires entre les azotures et les alcynes et les a étendues à une nouvelle classe de dipôle : les sydnones.²² Les sydnones sont des composés mésoioniques qui feront l'objet d'une introduction plus approfondie dans le Chapitre 1 de cette thèse. Tout comme pour la réaction de cycloaddition azoture-alkyne, cette réaction par voie thermique conduit à deux régioisomères de pyrazole : le pyrazole 1,3 et le pyrazole 1,4. Par ailleurs, cette réaction libère une molécule de CO₂. Ici aussi, les conditions drastiques utilisées ne sont pas appropriées pour des applications *in vitro* et *in vivo*. En 2013, notre laboratoire, s'intéressant à la réactivité des composés mésoioniques, montre que les sydnones peuvent elles aussi réagir efficacement avec les alcynes par une réaction de cycloaddition cupro-catalysée. La réaction permet d'obtenir un seul régioisomère avec des rendements élevés et un seul sous-produit : le CO₂.²³ Cette réaction appelée CuSAC (pour Copper-catalysed Sydnone-Alkyne Cycloaddition) répond aux critères de chimie click. Le mécanisme se déroule en deux étapes : une cycloaddition [3+2] suivie d'une réaction de rétro-Diels-Alder libérant du CO₂ (Schéma 10).

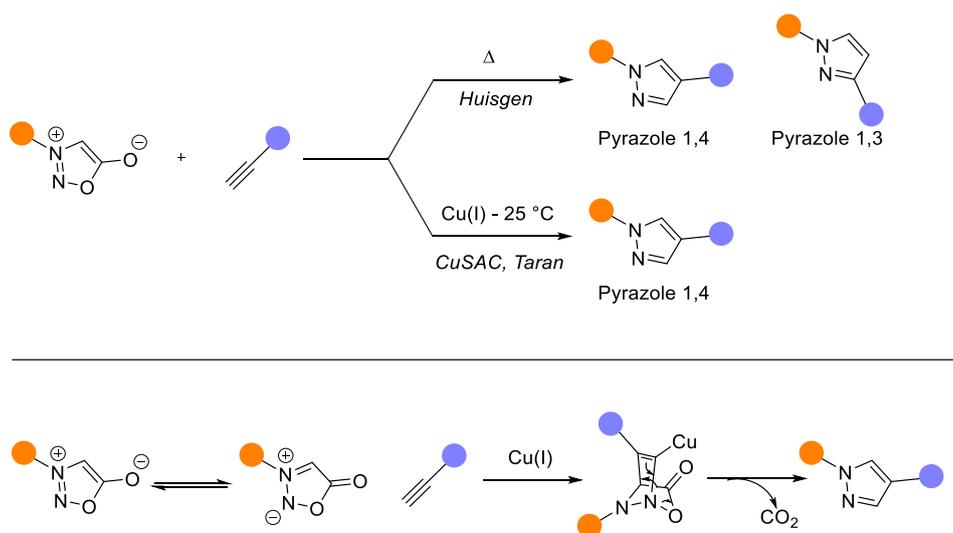


Schéma 10. Cycloaddition Sydnone-Alkyne de Huisgen vs CuSAC

Dans le même article, notre équipe, montre l'utilité de la CuSAC en bioconjugaison en réalisant le marquage fluorescent de la BSA préalablement modifiée par des groupements sydnones, avec un alcyne portant un fluorophore dansyl. Pour autant, elle comporte les mêmes limites que la CuAAC sur le plan bioorthogonal. En effet, l'utilisation de cuivre(I) reste problématique pour des études *in vivo*.

²² R. Huisgen, H. Gotthardt, R. Grashey, *Chem Ber.*, 1968, **101**, 536-551

²³ S. Kolodych, E. Rasolofonjatovo, M. Chaumontet, M.-C. Nevers, C. Créminon, F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 12056-12060.

1.2.3.c) La cycloaddition azoture-alcyne cyclique (SPAAC)

Afin d'améliorer la biocompatibilité des réactions de cycloaddition azoture-alcyne, l'équipe de Bertozzi a développé une méthode originale et efficace qui repose sur l'utilisation d'alcynes contraints. En effet, dès les années 1960, Wittig et Krebs ont décrit que le cyclooctyne pouvait réagir très rapidement avec l'azoture de phényle en formant un seul produit : le triazole correspondant.²⁴ Les angles de liaison C-C de part et d'autre de l'alcyne étant beaucoup plus faible (158° au lieu de 180°)²⁵, et rendant l'alcyne plus réactif, la réaction a lieu spontanément et ne nécessite pas d'ajout de cuivre (Schéma 11) ce qui permet de s'affranchir des problèmes de biocompatibilité de la CuAAC.



Schéma 11 Réaction de SPAAC

En 2004, l'équipe de Bertozzi utilise cette réaction de SPAAC (Strain Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition) pour marquer le glycome présent à la surface de cellules.²⁶ Pour cela, elle utilise un cyclooctyne biotinylé qui réagit avec un azoture préalablement incorporé par les voies métaboliques sur les glycanes. Une analyse par Westernblot a mis en évidence la réaction de click entre l'alcyne tendu et l'azoture.

Par la suite, de nombreux cyclooctynes ont été développés pour accélérer les cinétiques de cette réaction, par exemple en incorporant des groupements électroattracteurs en alpha de l'alcyne ou en augmentant sa tension de cycle.^{27,28} De nombreux cyclooctynes sont désormais commerciaux facilitant leur utilisation dans des cycloadditions avec des azotures dans des systèmes vivants (Figure 6). Notons que le tetramethylthiacycloheptyne (TMTH) est le seul alcyne stable connu à 7 chaînons grâce à l'angle de liaison du soufre intracyclique plus large que l'angle de liaison d'un carbone ce qui en fait un des alcynes cycliques les plus rapides à réagir (30 fois plus rapide que le BCN (Bicyclo-non-yne) et 4 fois plus rapide que le BARAC (biarylazacyclooctynone)).²⁹ Sa fonctionnalisation est toutefois complexe et sa stabilité modérée, ce qui explique pourquoi cet alcyne reste peu utilisé. Suivant la nature des

²⁴ G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.*, **1961**, *94*, 3260-3275.

²⁵ A. Krebs, J. Wilke, *Top. Curr. Chem.* **1983**, *109*, 189-233.

²⁶ N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 15046-15047.

²⁷ J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 11486-11493.

²⁸ A. Poloukhine, N. E. Mbua, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, V. V. Popik, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 15769-15776.

²⁹ G. de Almeida, E. M. Sletten, H. Nakamura, K. K. Palaniappan, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 2443-2447.

cyclooctynes utilisés, les constantes de vitesse varient mais restent toujours faibles en comparaison à la réaction de CuAAC.

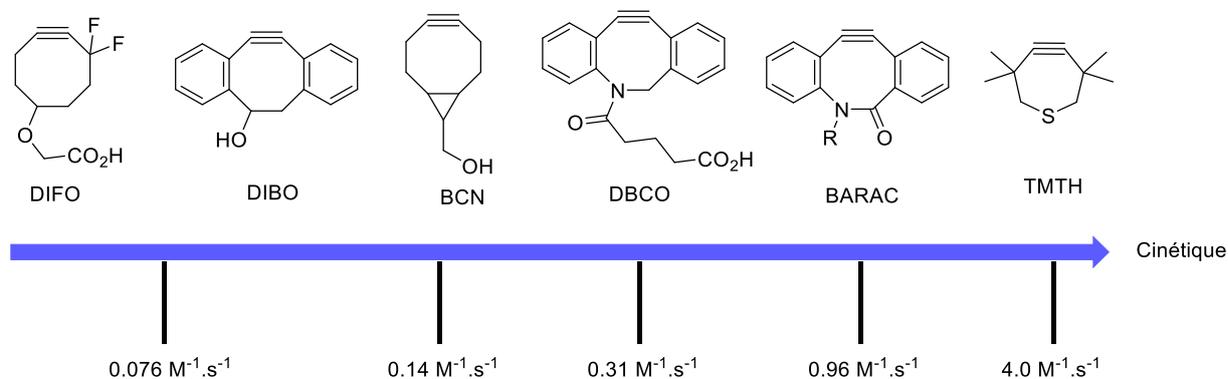


Figure 6. Vitesse de réaction de différents cycloalcyne avec l'azoture de benzyle

1.2.3.d) La SPSAC

De façon concomitante, en 2014, notre équipe et celle de Chin ont étendu la réaction de SPAAC aux sydnones (Schéma 12) pour donner lieu à la réaction de SPSAC (Strain-Promoted Sydnone-Alkyne Cycloaddition). Déjà bien connues pour les réactions de CuSAC, les sydnones peuvent aussi réagir avec des alcynes cycliques sans catalyse métallique et dans des conditions physiologiques, avec des constantes de vitesse du même ordre que pour la réaction de SPAAC.

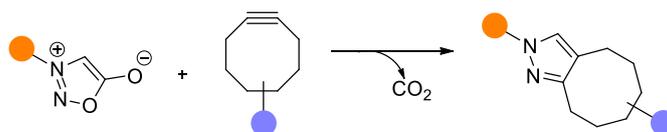


Schéma 12. Réaction de SPSAC

L'équipe de Chin décrit la réaction de SPSAC *in-vitro* entre la phényl-sydnone et un amino-acide non naturel portant un cyclooctyne BCN incorporé sur des protéines.³⁰ La même année, notre équipe prouve que l'ajout d'un halogène en position C4 de la sydnone permet d'accélérer significativement la réaction de SPSAC passant de 0.027 M⁻¹.s⁻¹ pour une sydnone non halogénée à 0.872 M⁻¹.s⁻¹ pour une sydnone chlorée en position C4 à 100 μM dans le PBS contenant 10% de DMSO.³¹ Une application en

³⁰ S. Wallace, J. W. Chin, *Chem. Sci.*, **2014**, 5, 1742-1744.

³¹ L. Plougastel, O. Koniev, S. Specklin, E. Decuyper, C. Créminon, D.-A. Buisson, A. Wagner, S. Kolodych, F. Taran, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 9376-9378.

bioconjugaison a pu être menée et le marquage des protéines BSA pré-fonctionnalisées par un motif chloro-sydnone avec un cyclooctyne BCN fluorescent a pu être mis en œuvre.

Les réactions de ligation qui ont été abordées dans cette introduction sont essentielles pour un grand nombre d'applications en chimobiologie. Parallèlement à ces réactions de ligation, les réactions de coupures ont été également développées pour d'autres types d'applications, comme par exemple le relargage de molécules bioactives dans la cellule. Dans la suite de cette introduction nous nous intéresserons à quelques réactions de coupures. Il ne s'agit pas d'une liste exhaustive.

1.3) Les réactions de coupures

Les réactions de coupures sont des réactions qui font intervenir un réactif ou un stimulus, interne ou externe, entraînant le clivage d'une partie de la molécule (Schéma 13).

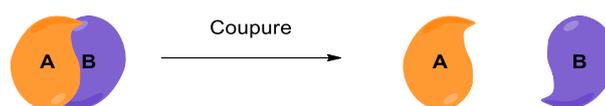


Schéma 13. Réaction de coupure

Les liens clivables ont longtemps été dédiés à la synthèse sur phase solide pour permettre le décrochage d'une molécule d'intérêt grâce à des conditions tolérées par cette dernière (milieu acide, basique, organique, aqueux, température, ...). Cependant, le plus souvent, ces conditions ne sont pas tolérées en milieu biologique. Ainsi les chimistes se sont intéressés à un nouveau domaine : les liens clivables bioorthogonaux. Dans le domaine de la chimobiologie, une des applications principales des liens clivables concerne la libération de composés bioactifs au sein de la cellule : on parle alors de relargage. Dans ce cas, on utilise le plus souvent des sondes portant la molécule bioactive liée à un transporteur (anticorps, peptide, ...) afin qu'elle soit vectorisée au plus près de son site d'action.³² Le lien clivable, placé entre le transporteur et la molécule bioactive, permet de libérer cette dernière. L'activité de la biomolécule n'est effective que lorsque le lien clivable est détruit (Schéma 14).

³² A. Dal Corso, L. Pignataro, L. Belvisi, C. Gennari, *Chem. Eur. J.*, **2019**, 25, 14740-14757.

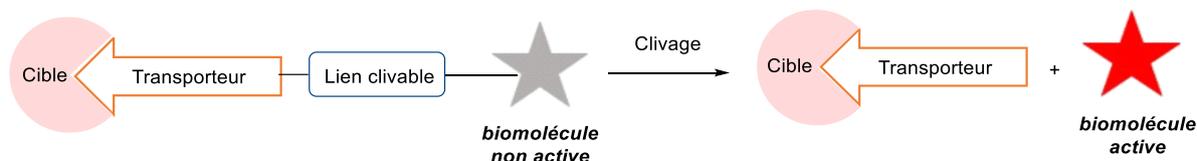


Schéma 14. Relargage d'une molécule active

Les liens clivables peuvent être classés en 2 catégories : les liens clivables enzymatiques et les liens clivables chimiques. Les liens clivables enzymatiques permettent le clivage entre deux molécules grâce à l'action d'une enzyme.

Par exemple, une équipe de Genentech a développé en 2018 un nouveau lien clivable enzymatique stable *in vivo* et sélectif de la cathepsin B, une protéase présente en plus grande quantité dans les cellules cancéreuses que dans les cellules saines.³³ Ils ont ainsi mis au point un ADC (Antibody Drug Conjugate) contenant un anticorps ciblant les cellules cancéreuses et une molécule bioactive, la monométhyl auristatine (MMAE). La MMAE permet de bloquer la polymérisation de tubule et donc la division cellulaire. L'ADC et la MMAE sont liés entre eux par un lien clivable peptidique cBu-Cit (Schéma 15) qui se clive en présence de cathepsin B et libère alors la MMAE dans les cellules ciblées.

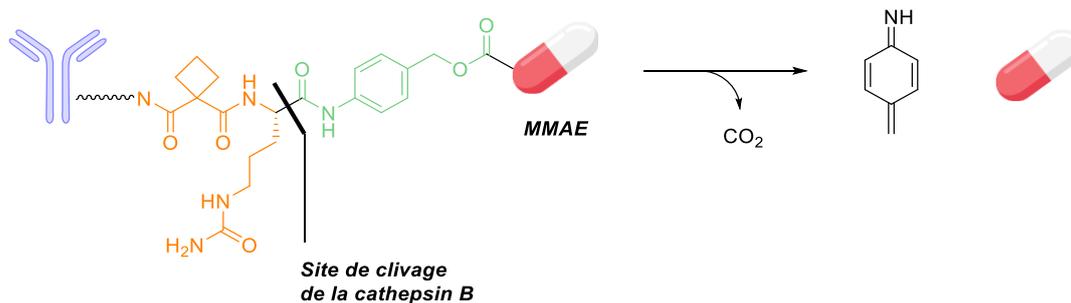


Schéma 15. Clivage enzymatique d'un ADC développé par Genentech

Néanmoins, les enzymes sont présentes dans de nombreux tissus et même si leur taux d'expression varie, les différences d'activités enzymatiques entre les divers tissus ne sont pas toujours suffisantes pour avoir une réelle sélectivité. C'est pour cela que les scientifiques se sont tournés vers les liens clivables chimiques bioorthogonaux.

Il existe différents types de liens clivables chimiquement : les liens clivables par réaction chimique suite à l'addition d'un réactif et les liens clivables par un stimulus externe.

³³ B. Safina *et al.* *J. Med. Chem.*, **2018**, *61*, 989-1000

I.3.1) Coupure en milieu acide

La cellule possède plusieurs organites ayant des fonctions bien définies. Par exemple, le lysosome a pour rôle de digérer les protéines et les lipides grâce aux enzymes qu'il contient. Le pH du lysosome est compris entre 4,5 et 5,0 ce qui peut être exploité pour libérer des principes actifs spécifiquement dans ce compartiment par le biais de liens clivables en milieu acide. En utilisant ces propriétés, Pfizer a mis sur le marché un ADC anticancéreux, construit en conjuguant un anticorps (Gemtuzumab) *via* la fonctionnalisation de ses lysines par un lien clivable *N*-acyl hydrazone et un cytotoxique (Ozogamicin).³⁴ L'anticorps est ainsi capable d'amener le principe actif vers une cible connue (ici l'antigène CD33 exprimé à la surface des cellules) (Figure 7). Afin de libérer le principe actif, une hydrolyse acide est nécessaire. Les chercheurs ont montré que l'ADC était stable à pH physiologique mais que la partie *N*-acyl hydrazone était labile à pH = 4,5. Ainsi grâce à une coupure en milieu acide dans le lysosome, l'anticancéreux peut être libéré de son vecteur anticorps dans une cellule tumorale ciblée.

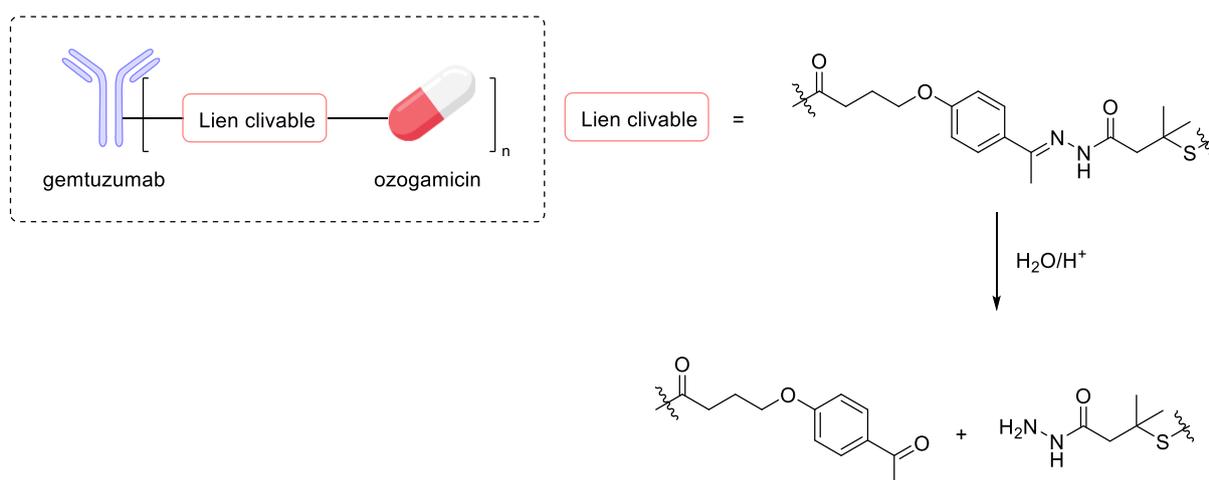


Figure 7. Coupure du lien clivable d'un ADC en milieu acide

D'autres exemples d'applications d'espaces clivables sont basés sur la sensibilité des hydrazones aux milieux acides. En 2015, l'équipe de Dawson utilise des sondes biotinyllées contenant un lien clivable hydrazone pour des applications de purification de protéines (Schéma 16).³⁵ Des protéines HSA (Human Serum Albumine) dans un milieu complexe ont été fonctionnalisées par cette sonde contenant une biotine, puis grâce à l'affinité biotine-avidine, les protéines HSA ont été capturées par des billes de streptavidine. Afin de décrocher la protéine des billes de streptavidine, la liaison hydrazone a été

³⁴ P. R. Hamann, L. M. Hinman, I. Hollander, C. F. Beyer, D. Lindh, R. Holcomb, W. Hallett, H.-R. Tsou, J. Upeslakis, D. Shochat, A. Mountain, D. A. Flowers, I. Bernstein, *Bioconjugate Chem.*, **2002**, *13*, 47-58.

³⁵ A. Dirksen, S. Yegneswaran, P. E. Dawson, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 2023-2027.

clivée par l'ajout d'hydroxylamine et d'aniline à pH = 6. Le clivage a été mis en évidence par des SDS-Page permettant d'observer la protéine HSA.

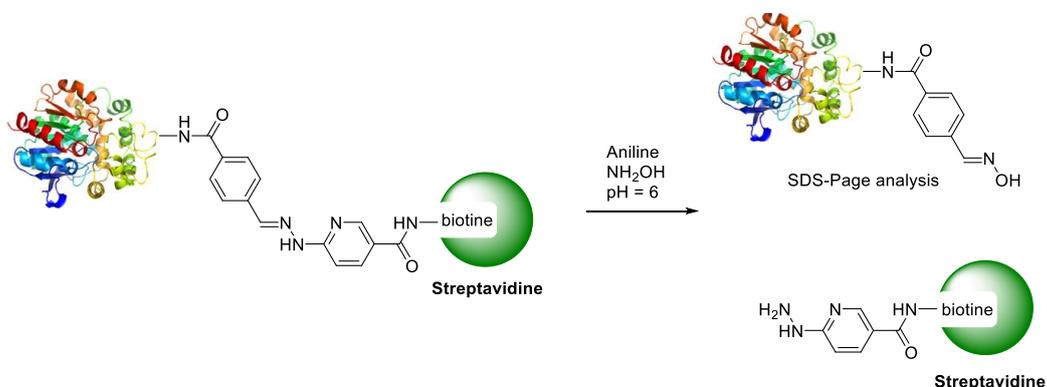


Schéma 16. Coupure en milieu acide du lien clivable de Dawson

Bien sûr, d'autres fonctions chimiques peuvent être utilisées en tant que lien clivable acide telles que les carbonates ou les carbamates.³⁶

I.3.2) Coupure par la réaction de Staudinger

En 2006, l'équipe de Florent de l'institut Curie, utilise la ligation de Staudinger pour libérer de manière contrôlée la doxorubicine, un médicament anticancéreux très puissant.³⁷ L'équipe a synthétisé une plateforme phényle-phosphine portant (Schéma 17) :

- 1) Une fonction carbamate en *ortho* de la fonction phosphine,
- 2) Une fonction méthyl-carbamate-doxorubicine en *meta* de la phosphine.

Comme dans la ligation de Staudinger développée par Bertozzi, l'ylure de phosphine réagit avec la fonction carbamate située en position *ortho* pour générer un phénolate, qui après une première élimination 1,6 suivie d'une décarboxylation, permet de libérer la doxorubicine.

³⁶ S.-J. Moon, S. V. Govindan, T. M. Cardillo, C. A. D'Souza, H. J. Hansen, D. M. Goldenberg, *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 6916-6926.

³⁷ M. Azoulay, G. Tuffin, W. Sallem, J.-C. Florent, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 3147-3149.

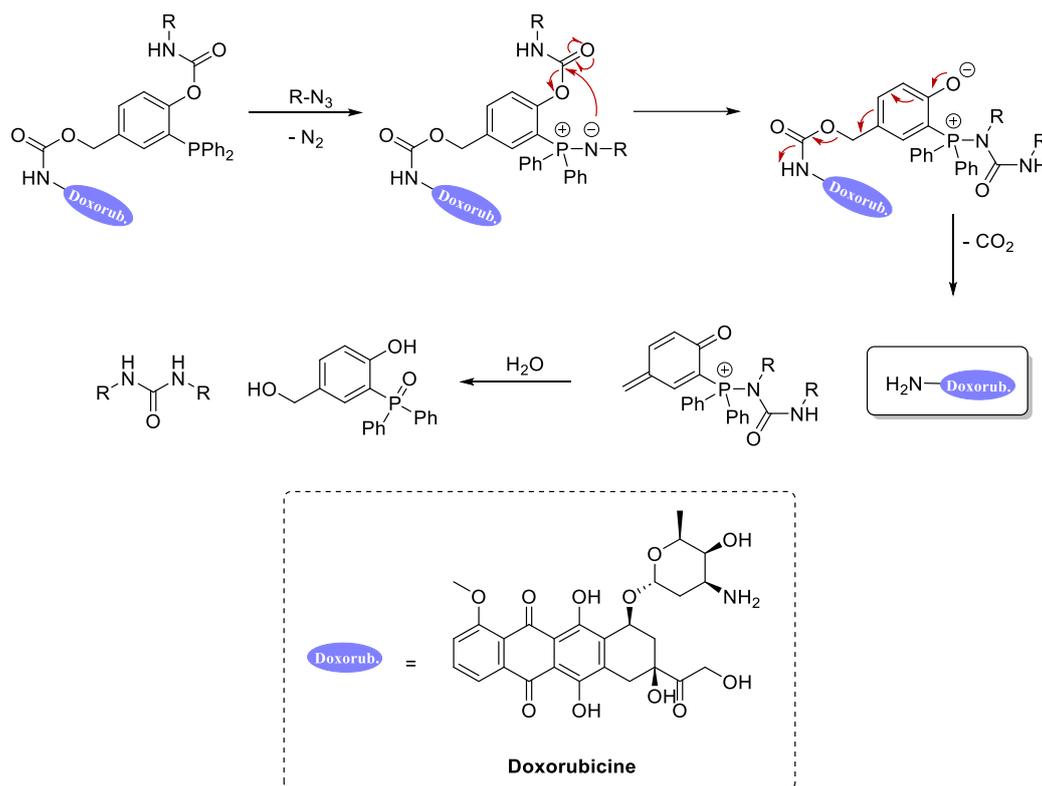


Schéma 17. Coupure par la réaction de Staudinger

I.3.3) Coupure par réaction entre une tétrazine et un alcène

En 2013, l'équipe de Robillard a utilisé la réactivité des tétrazine et du TCO pour développer une réaction de « click and release » très performante en introduisant une fonction carbamate en position alpha de l'alcène du TCO.³⁸ Après la réaction de click et le dégagement de N_2 , un transfert de proton permet la coupure de la fonction carbamate et donc la libération de composé actif. Dans ce cas, la réaction de click étant très rapide c'est la réaction de coupure qui induit les limitations de cette réaction (Schéma 18). En effet, l'oxydation de l'intermédiaire permet de former un composé stable et empêche la réaction de coupure et la libération du composé d'intérêt. En 2016, l'équipe de Robillard utilise ce principe de coupure et synthétise un ADC possédant un anticorps conjugué avec un TCO et avec la doxorubicine. Leur équipe a montré la libération de 50% de la doxorubicine en 24 heures *in vivo* sur des souris par l'action d'une tétrazine.³⁹

³⁸ R. M. Versteegen, R. Rossin, W. ten Hoeve, H. M. Janssen, M. S. Robillard, *Angew Chem Int Ed.*, **2013**, 52, 14112–14116.

³⁹ R. Rossin, S. M. J. Van Duijnhoven, W. Ten Hoeve, H. M. Janssen, L. H. J. Kleijn, F. J. M. Hoeben, R. M. Versteegen, M. S. Robillard, *Bioconjugate Chem.*, **2016**, 27, 1697–1706.

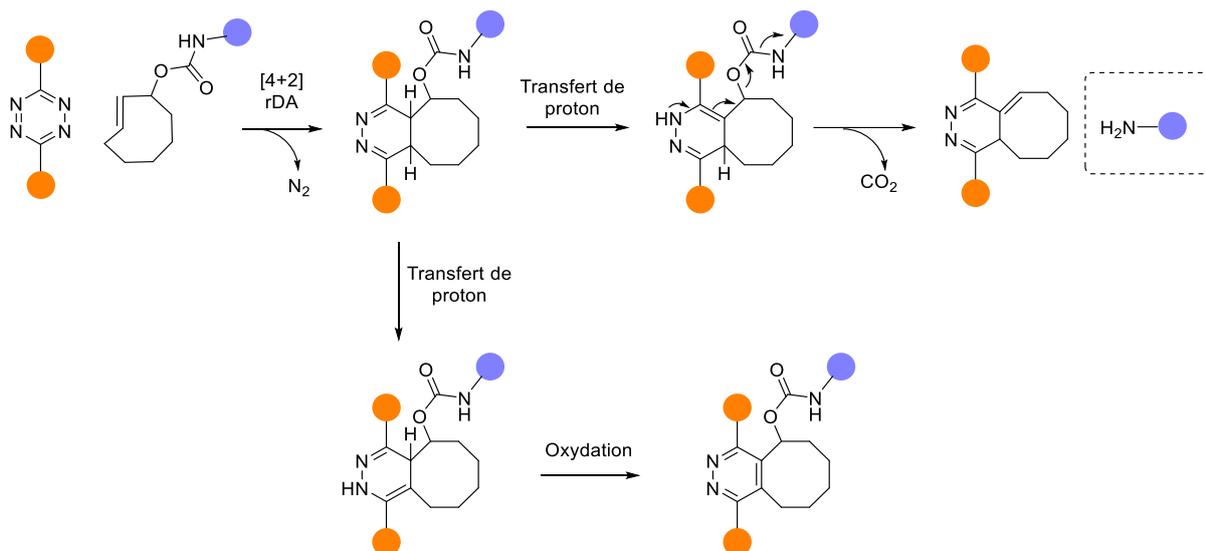


Schéma 18 : Mécanisme de la réaction "click and release" avec des tétrazines selon Robillard

1.3.4) Les coupures par photoactivation

Les groupements photoactivables sont des groupements qui réagissent sous l'effet d'une irradiation lumineuse. Dès les années 1970, Woodward met en évidence l'utilisation de dérivés *ortho*-nitrobenzylique (ONB) comme groupe protecteur photoactivable.⁴⁰ Sous irradiation dans le proche UV (300 – 350 nm), le groupement ONB permet de libérer la fonction en *ortho* du groupe nitro (acide carboxylique, thiol, phosphate, amine, ...) et former un sous-produit : le nitrosobenzaldéhyde (Schéma 19). D'un point de vue bioorthogonal, la formation de ce sous-produit est probablement le point faible de cette réaction puisque ce composé est toxique pour les cellules. Par ailleurs, cette stratégie est difficilement applicable dans les milieux biologiques puisque la lumière UV est nocive pour l'environnement biologique et la pénétration de la lumière UV est faible dans les tissus, ce qui rend toute application *in vivo* impossible.

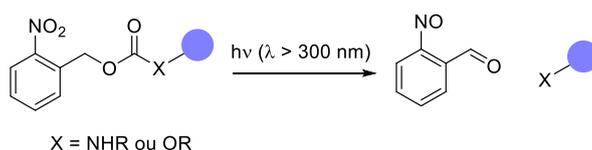


Schéma 19. Coupure par photoactivation développée par l'équipe de Woodward

⁴⁰ A. Patchornik, B. Amit, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 92, 21, 6333-6335

Plus récemment, des groupes de recherche ont développé d'autres liens photoactivables à partir de motifs coumarines réagissant sous des irradiations à des longueurs d'ondes plus élevées (900 nm) et donc moins toxiques pour les tissus.⁴¹

I.3.5) Les liens clivables disulfure

Les ponts disulfures sont naturellement présents dans la structure tertiaire des protéines et permettent à celles-ci de maintenir un repliement propre à chaque protéine. Les ponts disulfures se forment à la suite de l'oxydation de deux cystéines, sont stables à pH physiologique mais sensibles aux thiols. Cette réactivité avec les thiols peut ainsi permettre le clivage du pont disulfure et la libération de la molécule souhaitée. Généralement les thiols utilisés comme agents réducteurs de ponts disulfures sont le β -mercaptoéthanol, le dithiothreitol (DTT) ou encore le glutathion (GSH). Les phosphines peuvent également couper efficacement les ponts disulfures, parmi celles-ci la phosphine hydrosoluble TCEP est couramment utilisée. En 2017, l'équipe de Flygare a conçu un ADC possédant un anticorps anti-CD22 couplé à la MMAE, un anti-cancéreux, par un lien disulfure.⁴² Ce lien disulfure est clivable dans le cytosol où la concentration en glutathion est de 1-10 mM (Schéma 20) permettant alors de libérer la MMAE.

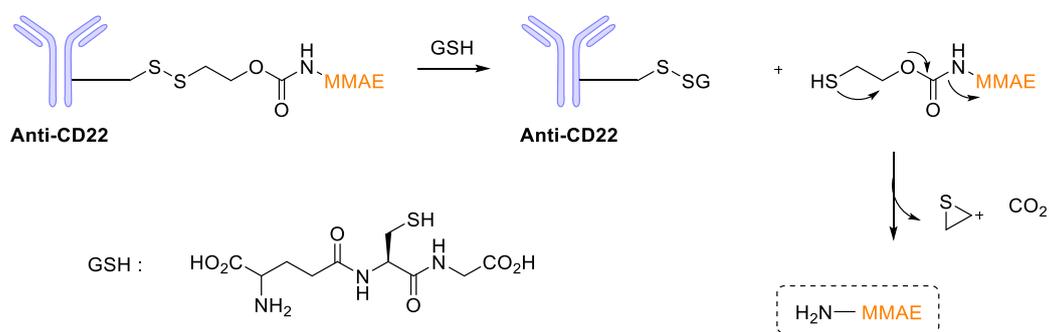


Schéma 20. Lien clivable disulfure

Toutes ces réactions de ligation et de clivage ont permis des applications en chimobiologie pour l'étude de biomolécules et de processus biologiques. Des applications plus remarquables ont permis

⁴¹ J. M. Amatrudo, J. P. Olson, G. Lur, C. Q. Chiu, M. J. Higley, G. C. R. Ellis-Davies, *ACS Chem. Neurosci.*, **2014**, 5, 64-70

⁴² T. H. Pillow, J. D. Sadowsky, D. Zhang, S.-F. Yu, G. Del Rosario, K. Xu, J. He, S. Bhakta, R. Ohri, K. R. Kozak, E. Ha, J. R. Junutula, J. A. Flygare, *Chem. Sci.*, **2017**, 8, 366-370.

d'observer des phénomènes biologiques *in vivo* et certaines seront développées dans la partie II de cette introduction.

II) Applications en chémobiologie pour l'étude des mécanismes du vivant

La chémobiologie est un concept apparu dans les années 1940 aux États-Unis pour définir une discipline visant à imaginer des outils chimiques permettant d'étudier un processus biologique afin d'en connaître l'origine ou le fonctionnement. Dans ce contexte, le développement des réactions click et bioorthogonales a permis une accélération spectaculaire des recherches dans ce domaine en fournissant des outils chimiques nouveaux et performants pour l'étude des processus biologiques fondamentaux.

De nombreuses applications thérapeutiques et diagnostiques de la chémobiologie sont apparues durant les 15 dernières années, mais dans cette introduction nous nous focaliserons sur les approches chémobiologiques pour l'étude des mécanismes fondamentaux du vivant.

II.1) Les rapporteurs chimiques

Les rapporteurs chimiques sont des fonctions bioorthogonales pouvant être incorporées dans des biomolécules dans le but de pouvoir les imager, les extraire ou les purifier grâce à une réaction bioorthogonale spécifique. Par définition, les rapporteurs chimiques ne doivent pas perturber le comportement, l'environnement ou la taille de la biomolécule dans son milieu biologique. Ce rapporteur chimique est incorporé *via* les voies métaboliques de la cellule en incubant la cellule en présence d'un analogue de substrat (sucre, lipide, acide aminé, nucléotide) utilisé dans la biosynthèse de la biomolécule d'intérêt (Figure 8).⁴³ Ainsi le rapporteur chimique est introduit dans la cellule par diffusion passive (1). En fonction de sa nature il pourra être incorporé dans des protéines, des lipides, des acides nucléiques ou des glycanes. Le marquage des protéines (2) peut se faire à l'aide de lipides modifiés qui seront introduits sur les protéines par des modifications post-traductionnelles ou bien à l'aide d'acides aminés modifiés qui seront introduits lors de la formation des protéines. L'ajout de nucléotides modifiés permet de marquer les acides nucléiques présents dans le noyau (3). Enfin l'ajout de sucres modifiés qui seront métabolisés par la cellule permet de marquer les glycanes et en particulier les polysaccharides présent à la surface des cellules (4). Par la suite, une sonde exogène

⁴³ V. Rigolot, C. Biot, C. Lion, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*, 23084–23105.

portant une fonction capable de se lier de façon bioorthogonale au rapporteur chimique est utilisée pour l'étude de la biomolécule modifiée (5).

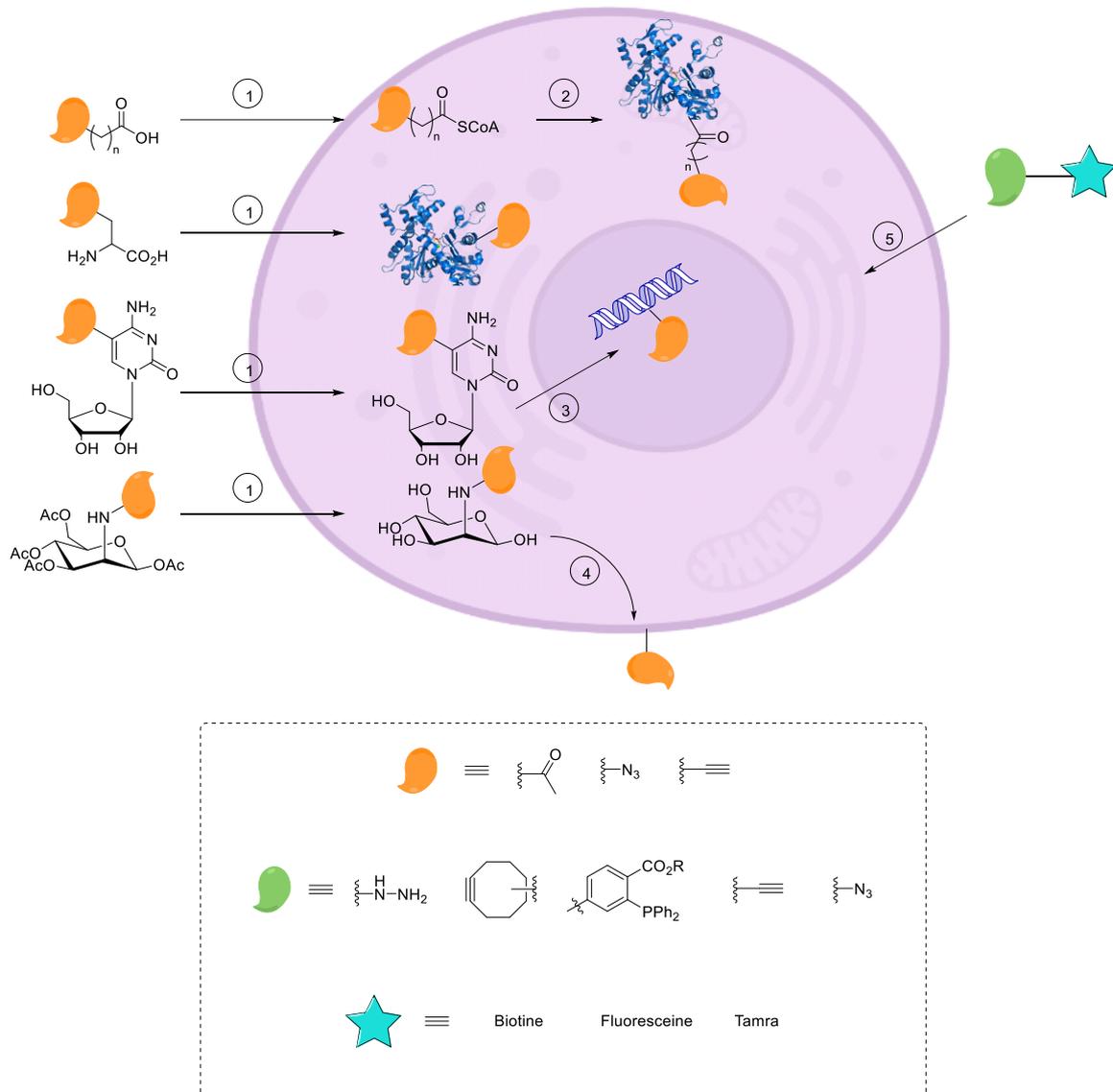


Figure 8. Modifications de biomolécules par des rapporteurs chimiques

Les rapporteurs chimiques peuvent avoir différentes fonctions bioorthogonales de ligation que nous avons vu dans la première partie de cette introduction. Ainsi, les premiers essais de marquage des glycanes ont été fait avec des rapporteurs chimiques portant des carbonyles (N-levulinoylmannosamine, ManLev) comme fonction de ligation afin de réagir avec une hydrazine et former une hydrazone (Schéma 21).^{44,45}

⁴⁴ J. H. Lee, T. J. Baker, L. K. Mahal, J. Zabner, C. R. Bertozzi, D. F. Wiemer, M. J. Welsh, *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 21878-21884.

⁴⁵ L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, *Science*, **1997**, 276, 1125-1128.

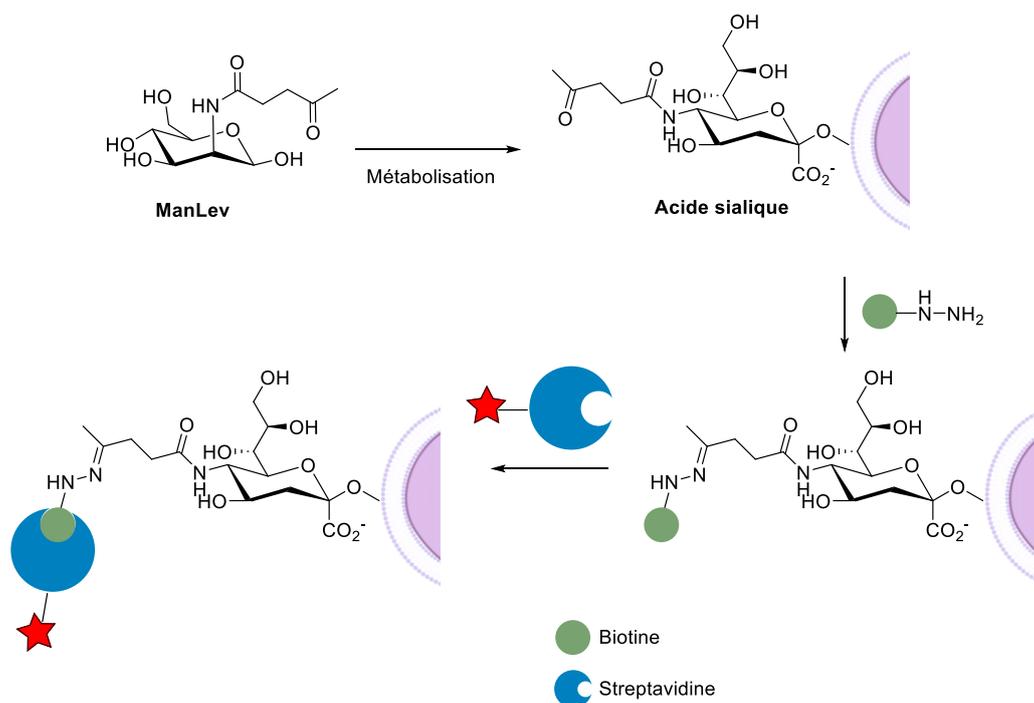


Schéma 21. Marquage des glycanes par un carbonyle puis ligation avec une hydrazine

Ce type de réaction de ligation a rapidement été abandonné du fait des carbonyles naturellement présents dans la cellule qui pouvaient interférer avec les sondes hydrazines. Par la suite, de nombreux rapporteurs chimiques ont été développés possédant le plus souvent une fonction alcyné ou azido (Figure 8). En effet, comme développé précédemment, les alcynes peuvent réagir dans des réactions de ligation avec de nombreuses fonctions comme des azotures (CuAAC), des tétrazines (iEDDA), des sydnones (SPSAC et CuSAC) et iminosydnones (SPICC). Les azotures peuvent eux réagir avec divers partenaires dans des réactions de ligation de Staudinger, de CuAAC, ou encore de SPAAC. Cette grande diversité de réactivité fait de l'azoture un rapporteur chimique de choix.

L'utilisation d'azotures comme rapporteur chimique a permis de nombreuses applications *in vivo*. En 2004, l'équipe de Zhao, s'intéresse aux protéines farnesylées, des protéines ayant subies une modification lipidique par l'ajout d'une chaîne à 15 carbones.⁴⁶ Pour cela, des cellules sont incubées en présence du lipide fonctionnalisé par un azoture. L'ajout d'une sonde phosphine biotinylée permet alors de faire une ligation de Staudinger et donc de marquer les protéines modifiées. Nous utiliserons cette méthode de marquage de protéines avec un acide myristique alcyné dans le Chapitre II de ce manuscrit.

Dans un article paru en 2007, Bertozzi a décrit le marquage métabolique de glycanes en utilisant 5 sucres différents, tous portant une fonction azido.⁴⁷ Les sucres modifiés *N*-azidoacetylgalactosamine

⁴⁶ Y. Kho, S. C. Kim, C. Jiang, D. Barma, S. W. Kwon, J. Cheng, J. Jaunbergs, C. Weinbaum, F. Tamanoi, J. Falck, Y. Zhao, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2004**, *101*, 12479-12484.

⁴⁷ S. T. Laughlin, C. R. Bertozzi, *Nat Protoc.*, **2007**, *2*, 2930-2944.

(GalNAz), *N*-azidoacetylglucosamine (GlcNAz) et 6-azido fucose (6AzFuc) remplacent leur homologue non azido, le *N*-azidoacetylmannosamine (ManNAz) permet lui de marquer les acides sialiques *N*-acétylés (SiaNAc) (Figure 9). Dans chacun de ces exemples, les sucres ont été administrés sous forme polyacétylée afin de permettre leur pénétration dans la cellule. La déacétylation est effectuée grâce aux enzymes présentes dans la cellule.

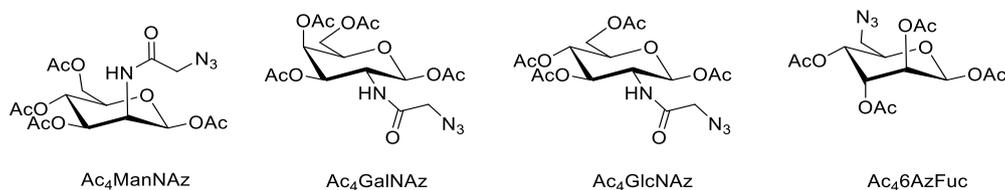


Figure 9. Structures des sucres utilisés par Bertozzi

L'incorporation des fonctions bioorthogonales par les voies métaboliques à l'aide de la stratégie du rapporteur chimique incorporé dans des pseudo-substrats naturels permet de visualiser les constituants du vivant dans la cellule mais aussi chez l'animal.

II.2) Imagerie *in vivo* du glycome

Le glycome, ensemble des sucres présents au sein de la cellule, a été largement étudié par Carolyn Bertozzi dans les années 2000 qui a été une des premières à utiliser et à développer la méthode du rapporteur chimique.^{48, 49, 45, 50, 2}

I.2.1) Par la ligation de Staudinger

En 2004, Bertozzi utilise la ligation de Staudinger pour la détection des sucres chez la souris.⁵⁰ Le sucre Ac_4ManNAz a été administré à des souris pendant 7 jours afin de convertir les acides sialiques des cellules en SiaNAz. Le huitième jour, les souris ont été sacrifiées et les cellules de rate riches en acides sialiques (splénocytes) ont été récupérées et traitées avec une sonde portant une phosphine couplée à une séquence peptidique dite « Flag », c'est-à-dire capable d'être reconnue par un anticorps correspondant, pour réaliser la ligation de Staudinger *ex vivo*. Un traitement avec l'anticorps « Flag » couplé à une fluorescéine a permis d'observer, par cytométrie en flux, la fluorescence uniquement sur les cellules de souris ayant reçu Ac_4ManNAz et la phosphine confirmant que la ligation de Staudinger a bien eu lieu (Schéma 22). La ligation de Staudinger a été une des premières réactions de ligation

⁴⁸ J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.*, **2005**, *1*, 13-21.

⁴⁹ S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science*, **2008**, *320*, 664-667.

⁵⁰ J. A. Prescher, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nature*, **2004**, *430*, 873-877.

bioorthogonale développée et a permis des applications *in vitro* et *in vivo*. Néanmoins, l'oxyde de phosphine générée pendant la réaction reste toxique pour les cellules et les cinétiques de cette réaction sont trop lentes pour de nombreuses applications *in vivo* ($0.003 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dans le PBS).⁵¹

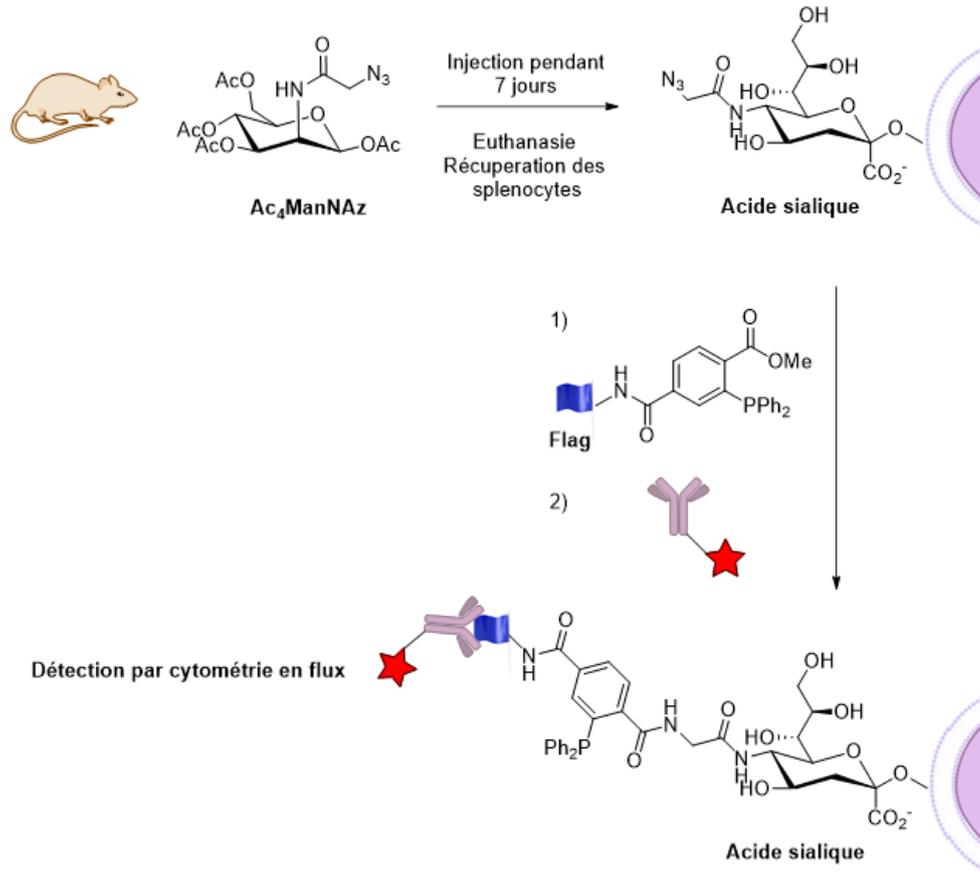


Schéma 22. Imagerie des glycanes de splénocytes de souris

II.2.2) Par la réaction de SPAAC

En 2008, l'équipe de Bertozzi étudie la néosynthèse des glycanes chez l'embryon du zebrafish.⁴⁹ Les zebrafish sont des poissons dont les tissus sont transparents et permettent une visualisation claire lors d'une étude d'imagerie. Des embryons de zebrafish ont été incubés avec Ac_4GalNAz pendant 60 heures après fécondation. Puis, les lysats d'embryon ont été mis en réaction avec des cyclooctynes DIFO-AF647 (fluorophore rouge) pendant 1 heure. La réaction de SPAAC a permis de lier les glycanes au cyclooctyne et d'observer la fluorescence rouge. Dans un second temps, les embryons ont été une nouvelle fois incubés avec Ac_4GalNAz et mis en réaction avec du DIFO-488 (fluorophore vert) pendant 1 heure. Une analyse par microscopie confocale a permis d'obtenir le cliché présenté dans le Schéma 23. Grâce à des réactions successives avec des DIFO de différentes couleurs il a été possible de visualiser la dynamique de biosynthèse des glycanes chez les embryons de zebrafish pendant leur

⁵¹ D. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher, *ACS Chem. Biol.*, **2014**, *9*, 592-605

développement. En effet, la couleur rouge indique les glycanes bio-synthétisés en premier alors que la couleur verte indique les glycanes bio-synthétisés en dernier (Schéma 23).

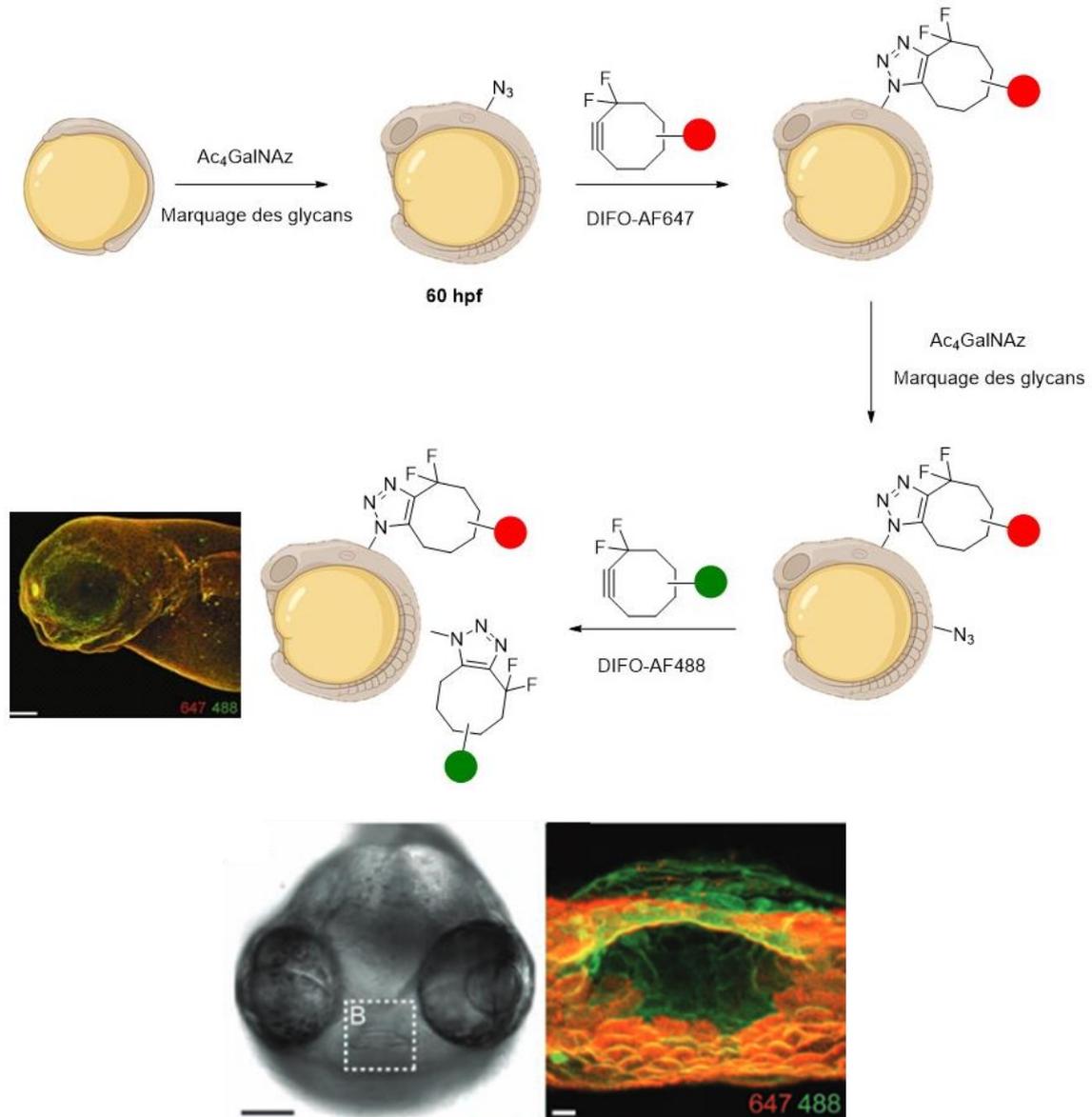


Schéma 23. SPAAC *in vivo* par Bertozzi

Dans le cas de cette étude, la réaction de SPAAC a l'avantage de ne pas nécessiter de cuivre et donc de pouvoir être utilisée *in vivo*. Néanmoins, il est important de noter que les cinétiques de cette réaction sont relativement lentes. En effet, il a fallu plus d'une heure pour marquer les glycanes. Pour autant, cette étude reste aujourd'hui un des plus beaux exemples de SPAAC *in vivo*.

II.2.3) Par la réaction de CuAAC

En 2011, l'équipe de Wu utilise le même protocole que Bertozzi pour marquer les glycanes présents à la surface de cellules embryonnaires de Zebrafish.⁵² 24 heures après l'incubation du sucre Ac₄GalNAz, les cellules embryonnaires de Zebrafish ont été mises en réaction avec un alcyne biotinylé en présence de cuivre et de ligands BTAA pendant seulement 5 minutes puis incubées avec de la streptavidine-AF488 fluorescente. L'analyse par microscopie confocale a montré le marquage fluorescent des embryons (Schéma 24). Ici, Wu a montré que la réaction de CuAAC était bien plus rapide que la réaction de SPAAC utilisée par Bertozzi. Par ailleurs, il est parvenu à démontrer que l'utilisation de la CuAAC était possible *in vivo* malgré la toxicité du cuivre. Néanmoins, aucune étude sur la viabilité des zebrafish n'a été menée.

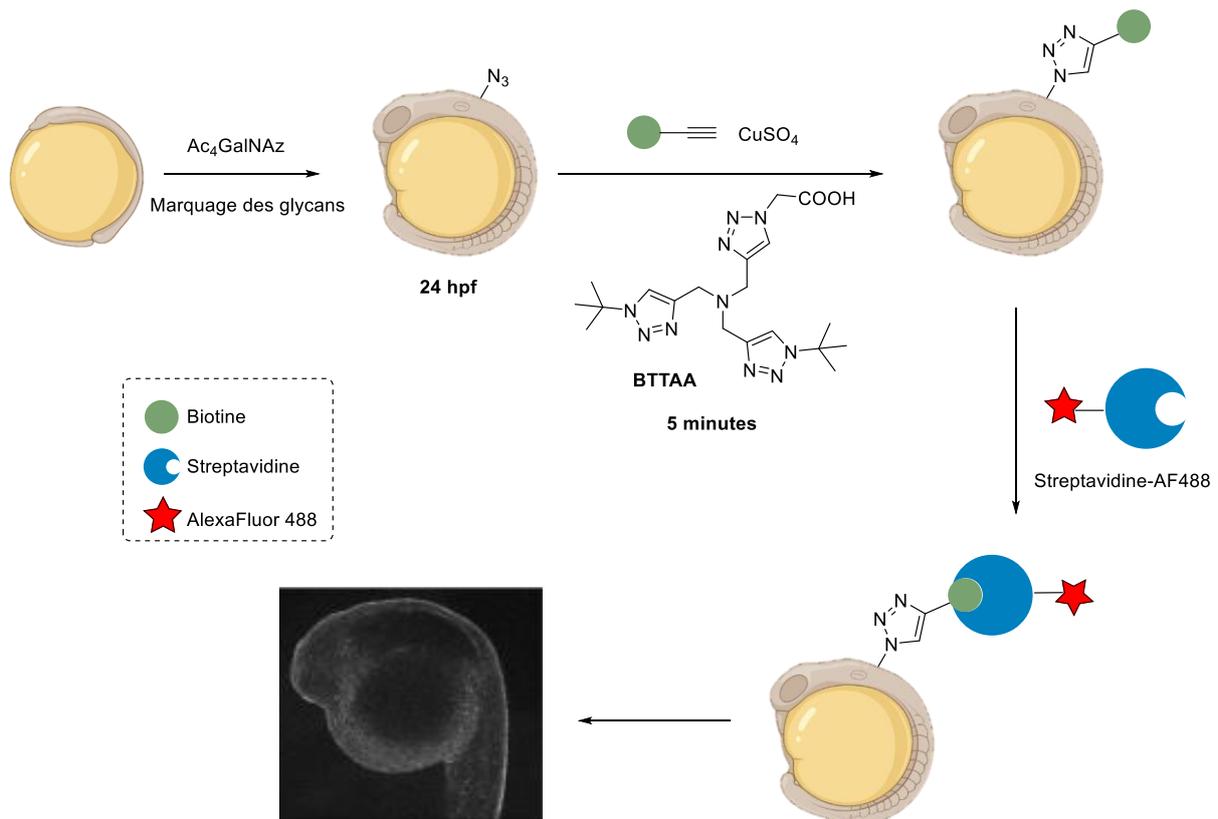


Schéma 24. Imagerie des embryons de zebrafish par microscopie confocale

II.3) Imagerie *in vivo* du Protéome

A l'instar de l'imagerie du glycome, l'imagerie du protéome a aussi été étudiée. Les protéines subissent des modifications co-traductionnelles ou post-traductionnelles. Ces modifications jouent un rôle important au sein de la cellule puisqu'elles régissent le rôle des protéines touchées. La modification la plus étudiée est la modification lipidique : l'ajout d'un acide gras sur une protéine. En 2009, une équipe

⁵² C. Besanceney-Webler, H.Jiang, T. Zheng, L. Feng, D. Soriano del Amo, W. Wang, L. M. Klivansky, F. L. Marlow, Y. Liu, P. Wu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 8051-805

de Genentech s'intéresse à la *N*-palmitoylation, une modification de protéines par un acide gras à 16 carbones, et utilise ces modifications post-traductionnelles pour marquer des protéines.⁵³ En effet, ils montrent qu'en incubant des cellules avec un acide gras modifié portant un alcyne (acide 15-hexadécynoïque) il est possible de marquer les protéines subissant la *N*-palmitoylation. Après la fixation et la perméabilisation des cellules, une sonde rhodamine-alcyne (verte) est ajoutée en présence de CuSO₄ et de TCEP, dans le PBS pendant 1 heure (Schéma 25), permettant de visualiser la distribution des protéines *N*-palmitoylées au sein de la cellule.

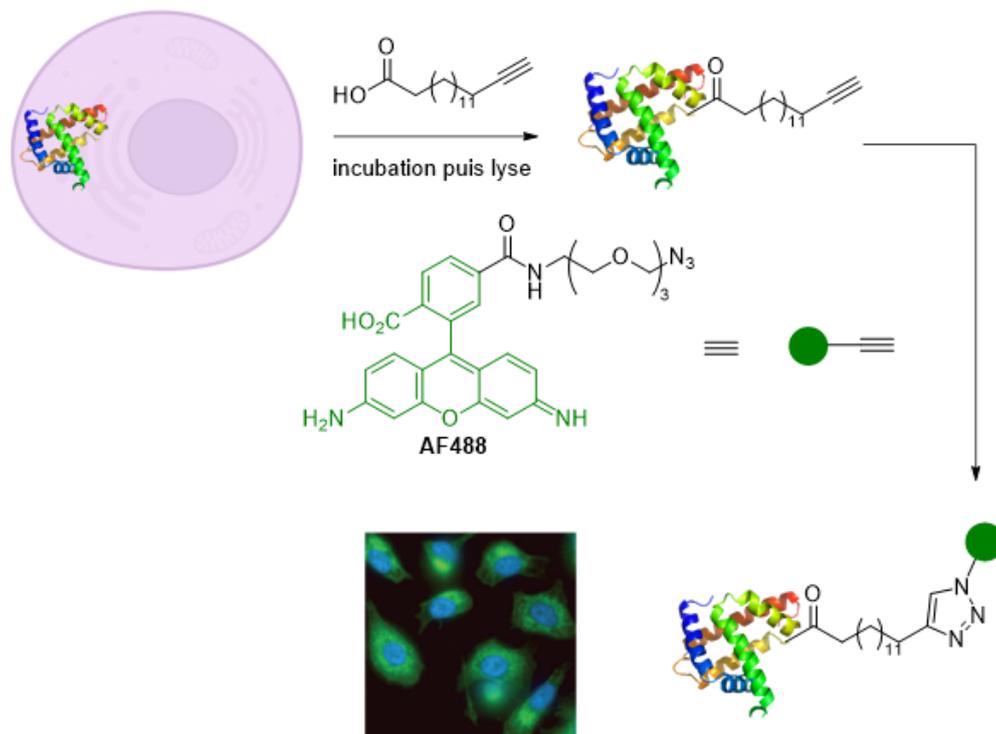


Schéma 25. Imagerie des protéines *N*-palmitoylées

Dans cet exemple précis, les cellules sont fixées avant la réaction de CuAAC donc l'utilisation de cuivre n'a pas posé de problème de viabilité cellulaire. Des exemples similaires ont été effectués sur des protéines glycosylées,⁵⁴ phosphorylées⁵⁵ ou farnesylées.⁴⁹

Jusqu'à présent, les études menées ont permis d'imager des biomolécules ou des processus biologiques grâce aux outils chimiques bioorthogonaux. Un autre domaine essentiel à la compréhension des systèmes biologiques est la purification, l'isolement et l'identification des constituants cellulaires. Dans la suite de cette introduction, nous nous intéresserons plus

⁵³ R. N. Hannoush, N. Arenas-Ramirez, *ACS Chem. Biol.*, **2009**, *4*, 581-587.

⁵⁴ N. Khidekel, S. B. Ficarro, P. M. Clark, M. C. Bryan, D. L. Swaney, J. E. Rexach, Y. E. Sun, J. J. Coon, E. C. Peters, L. C. Hsieh-Wilson, *Nat. Chem. Biol.*, **2007**, *3*, 339-348

⁵⁵ K. D. Green, M. K. H. Pflum, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10-11

particulièrement à l'identification de protéines à l'aide des outils de la chimie bioorthogonale. Dans ce type d'approche, les rapporteurs chimiques bioorthogonaux introduits sur les protéines sont utilisés comme « hameçon » pour aller « pêcher » les biomolécules d'intérêt à l'aide de sondes construites avec la fonction bioorthogonale complémentaire. Le terme anglais utilisé couramment pour ce type d'approche est « protein fishing ».

II.4) Protein Fishing

Les cellules sont composées de centaines de milliers de protéines dont on ne connaît pas encore la fonction ou le mode d'action. L'identification de ces protéines et de leurs interactions est un enjeu primordial dans de nombreux domaines comme la compréhension du mode d'action de médicaments ou encore du fonctionnement de processus biologiques fondamentaux. Les approches de « target fishing » ont été développées par les chimistes et les biologistes pour extraire et identifier ces cibles biologiques grâce à une analyse protéomique d'extraits purifiés à l'aide de sondes bioorthogonales.⁵⁶ Classiquement ces sondes sont composées de 3 parties (Figure 10) :

- Une fonction réactive permettant la ligation avec la cible de façon bioorthogonale. Ces fonctions peuvent être multiples et les réactions les plus couramment utilisées ont été décrites dans la partie I.2) de cette introduction.
- Une étiquette chimique (biotine) permettant d'extraire la protéine ou de la marquer par un fluorophore.
- Un lien, de préférence clivable, permettant de relier la fonction réactive et l'étiquette chimique tout en les espaçant suffisamment pour éviter la gêne stérique.

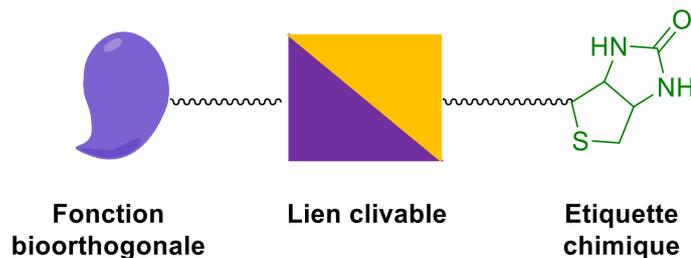


Figure 10. Schéma général d'une sonde pour le « target fishing »

La biotine possède une très forte affinité pour les protéines avidines ($K_d = 10^{-15}$ M). Ainsi, l'utilisation de streptavidine pour l'extraction de protéines est très utilisée. Néanmoins, certaines protéines

⁵⁶ X. Chen, Y. Wang, N. Ma, J. Tian, Y. Shao, B. Zhu, Y. K. Wong, Z. Liang, C. Zou, J. Wang, *Signal. Transduct. Target. Ther.*, **2020**, *5*, 72.

naturellement biotinyllées peuvent être aussi extraites en même temps que la cible, on appelle cela la capture « non spécifique ». Une fois la cible extraite par la streptavidine, il est impossible de la séparer de la biotine sans utiliser des conditions astringentes (chauffage, changement de pH, solvant organique, ...) qui risquent de dénaturer la protéine étudiée. Dans certains cas, cette dénaturation pose problème pour l'analyse protéomique de la cible. Ainsi, les liens clivables ne sont pas indispensables mais souhaitables. Ils permettent de décrocher les protéines cibles de la streptavidine dans des conditions plus douces. De plus, les liaisons « non spécifiques » ne posséderont pas ce lien clivable et ne seront donc pas « décrochées » de la streptavidine. Il existe différents types de liens clivables qui ont été décrit dans la première partie de cette introduction et qui sont utilisés pour décrocher des protéines des billes de streptavidine : des liens clivables en milieux acides,⁵⁷ par photochimie⁵⁸ ou encore par réduction par des thiols⁵⁹. Un fluorophore peut être utilisé en remplacement de la biotine pour visualiser des protéines cibles sur gel d'électrophorèse (Schéma 26).

⁵⁷ P. Van Der Veken, E. H. C. Dirksen, E. Ruijter, R. C. Elgersma, A. J. R. Heck, D. T. S. Rijkers, M. Slijper, R. M. J. Liskamp, *ChemBioChem*, **2005**, *6*, 2271–2280.

⁵⁸ E. V. Petrotchenko, K. Xiao, J. Cable, Y. Chen, N. V. Dokholyan, C. H. Borchers, *Molecular & Cellular Proteomics*, **2009**, *8*, 273–286.

⁵⁹ C. A. Gartner, J. E. Elias, C. E. Bakalarski, S. P. Gygi, *J. Proteome Res.*, **2007**, *6*, 1482–1491.

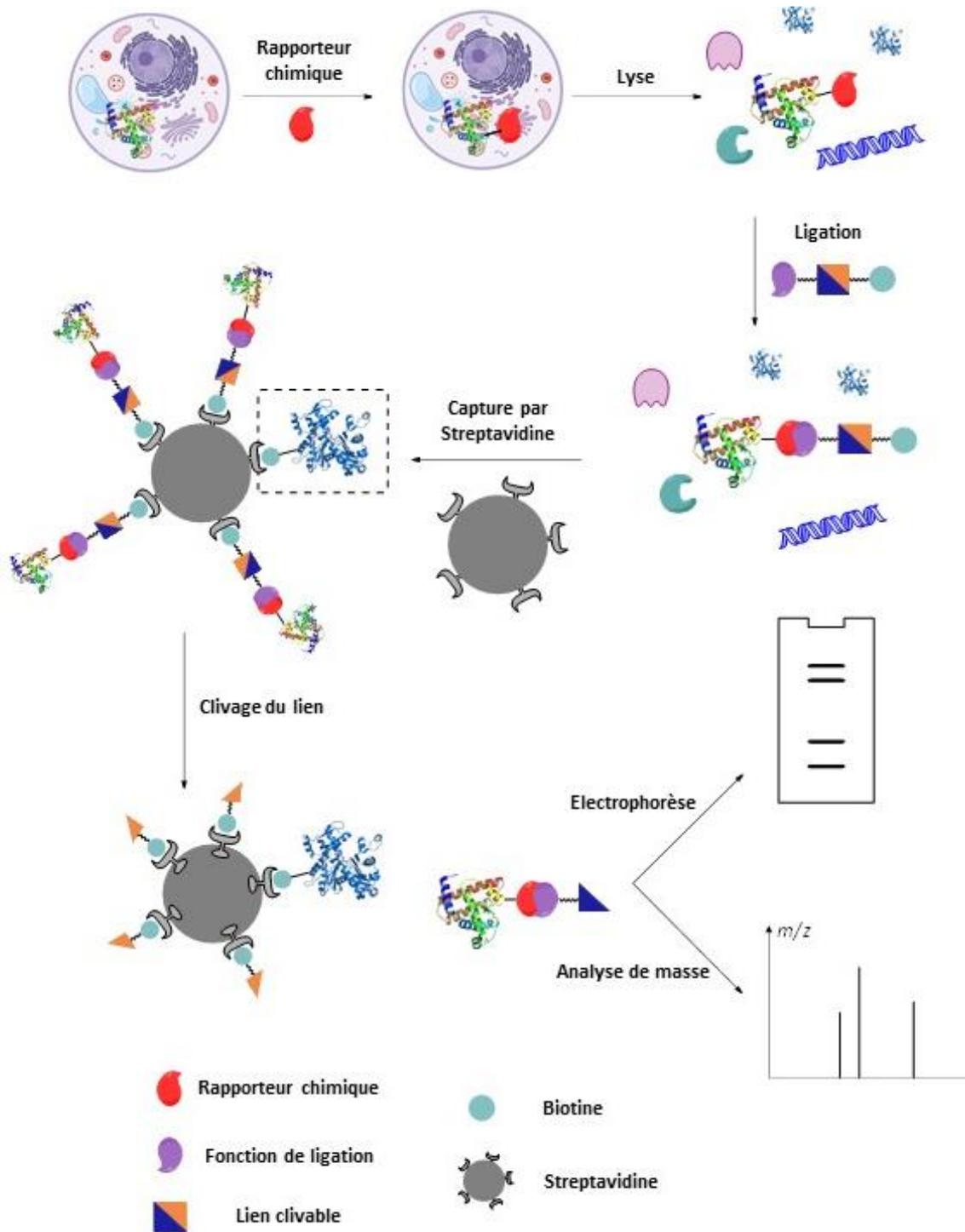


Schéma 26. Principe du « protein fishing »

L'identification des protéines cibles peut se faire de plusieurs façons. Un gel d'électrophorèse va permettre de séparer les protéines et de déterminer approximativement leur taille. Après récupération de la bande de protéines et un traitement avec de la trypsine pour découper les protéines en peptides, une analyse en spectrométrie de masse permet de reconnaître la protéine ainsi que des fragmentations. Cette méthode a tout de même des limites, en effet, si la protéine est présente en

faible quantité, elle ne sera pas visible sur gel d'électrophorèse et donc non identifiée. L'identification des protéines peut se dispenser du gel d'électrophorèse et la plupart des études protéomiques implique en fait une digestion des protéines décrochées du support streptavidine par la trypsine dont l'action enzymatique permet la formation d'une multitude de fragments peptidiques qui seront analysés par spectrométrie de masse. L'ensemble des données de masse est alors comparé aux banques de données disponibles (protein data bank) permettant alors d'identifier la nature des protéines.

Dans un premier article de 2007, l'équipe de Wong a marqué les protéines *N*-Glycosylées à la manière de Bertozzi avec un mannose alcynes ($Ac_4ManNAz$). Il a aussi mis au point une première sonde azoture-biotine sans lien clivable, permettant la purification de ces glycanes-alcynés (Schéma 27).⁶⁰ Après capture par des billes de streptavidine, les glycanes sont libérés par l'action d'une enzyme, PNGase F, capable d'hydrolyser la liaison entre le mannose et la protéine. Ainsi, une analyse LC-MS² a permis d'identifier 219 protéines subissant une *N*-glycosylation dont 68% n'avaient jamais été répertoriées (Schéma 27).

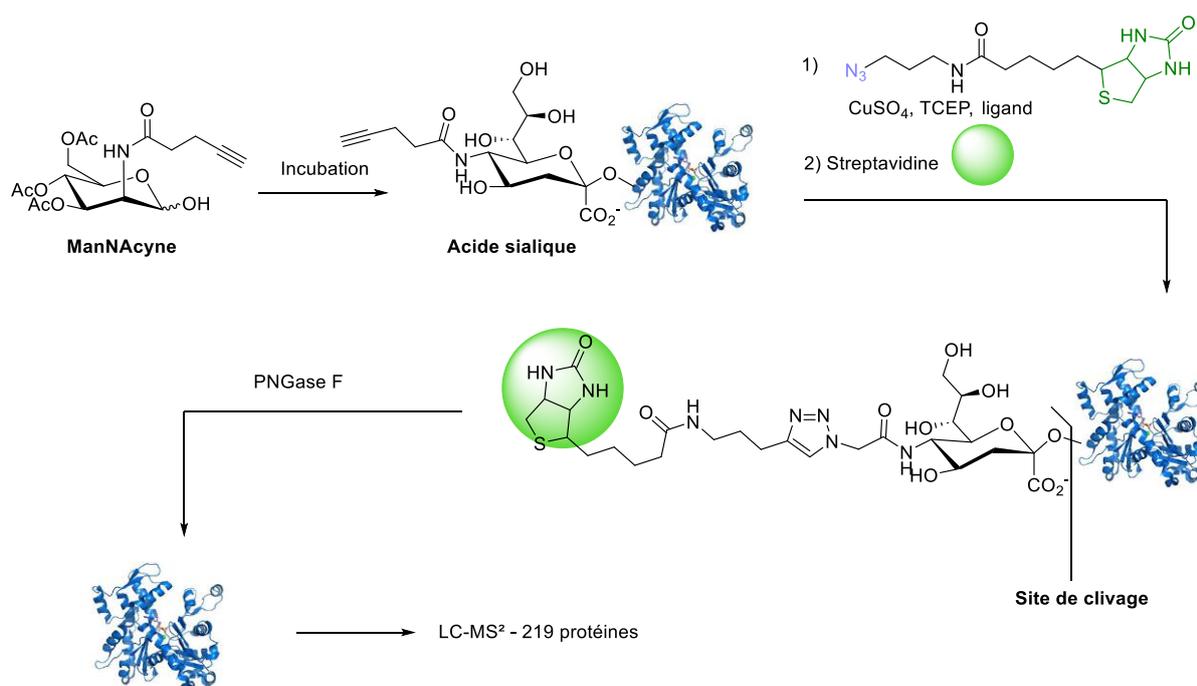


Schéma 27. Sonde de Wang sans lien clivable pour le target fishing des protéines *N*-glycosylées

Cette sonde, sans lien clivable, a néanmoins permis de réaliser la capture de protéines efficacement car une enzyme a été capable de rompre une liaison spécifique des glycanes. Par contre, dans le cas

⁶⁰ S. R. Hanson, T.-L. Hsu, E. Weerapana, K. Kishikawa, G. M. Simon, B. F. Cravatt, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 7266–7267.

d'études de protéines qui ne sont pas des glycanes, un lien clivable est nécessaire. Pour cette raison, de nombreux efforts ont été accomplis pour développer des sondes clickables biotinylées possédant un lien clivable.⁶¹ Plusieurs liens clivables ont donc été utilisés avec succès dans des démarches de target fishing. Parmi tous ces linkers, que nous ne détaillerons pas dans cette introduction, les azobenzènes sont probablement les plus utilisés. Par exemple, dès 2010, l'équipe de Hang utilise avec succès le *o*-hydroxyldiazobenzène clivable par un réducteur, le dithionite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) (Figure 11).⁶² Ils l'ont utilisé pour « pêcher » les protéines marquées par un alcyne chez une bactérie : *Salmonella typhimurium*. Ainsi, une sonde portant un azoture comme fonction de ligation, une biotine pour la capture par la streptavidine et un groupe *o*-hydroxyldiazobenzène comme lien clivable a permis une analyse protéomique et l'identification de 456 protéines.

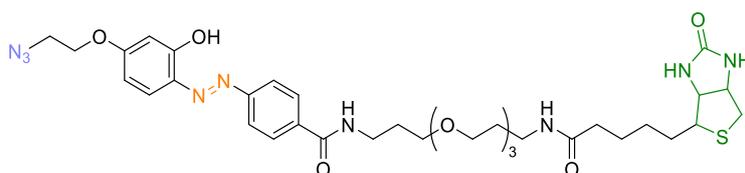


Figure 11. Sonde pour le target fishing de Hang⁶²

III) Travaux antérieurs et objectifs

La conception des sondes est très certainement une étape cruciale pour le succès des approches de « target fishing ». Nous pensons que cette conception doit tout particulièrement tenir compte de deux obstacles principaux : 1) l'étape de ligation entre la sonde et la cible doit être d'une très grande efficacité car la cible peut être présente à de très basses concentrations et 2) l'étape de détachement de la cible du support streptavidine doit être réalisée dans des conditions les plus douces et sélectives possibles afin d'éviter le décrochage non spécifique de protéines sans intérêt.

Nous pensons que l'utilisation combinée de deux types de réactifs développés antérieurement par notre laboratoire, les azotures chélatant et les iminosydones, pourraient permettre d'obtenir de nouvelles sondes permettant de surmonter ces deux obstacles.

⁶¹ a) G. Leriche, L. Chisholm, A. Wagner. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 571–582; b) J. Tu, M. Xu, R. M. Franzini. *ChemBioChem*, **2019**, *20*, 1615–1627.

⁶² Y.-Y. Yang, M. Grammel, A. S. Raghavan, G. Charron, H. C. Hang, *Chem. & Biol.*, **2010**, *17*, 1212–1222.

III.1) Les azotures chélatants

À la suite de la publication du premier azoture chélatant par l'équipe de Ting, notre équipe a synthétisé une librairie d'azotures chélatants pouvant coordonner le cuivre de façon bi, tri et tétradentée et permettant de s'affranchir de l'utilisation de ligands externes. Le potentiel de ces azotures chélatants a été évalué en mesurant la fluorescence à l'issue de la réaction de click en utilisant une coumarine alcyne pro-fluorescente (Figure 12). Ces réactions ont été réalisées à relativement basses concentrations en cuivre (17.5 μ M, 1 équivalent). Les ligands bis-triazoles et benzimidazoles ont ainsi permis de réagir à des vitesses très élevées. Le plateau de fluorescence a été atteint en 2 minutes pour le benzimidazole et en 40 secondes avec le bis-triazole. Par comparaison avec l'azoture non chélatant, le plateau a été atteint en 16 heures sans ajout de ligand et en 20 minutes avec le ligand BTTES. Avec l'azoture chélatant de Ting, le plateau a été atteint en 13 minutes sans ajout de ligand et en 7 minutes avec le ligand BTTES.

De très bonnes cinétiques ont également été obtenues en milieux complexes. La suite de l'étude a aussi mis en évidence la nécessité d'avoir un ratio 1 : 1 cuivre : azoture puisque l'ajout d'un excès de cuivre diminue fortement la cinétique de la réaction. La biocompatibilité de cette réaction a été mise en évidence par une réaction de click *in vivo* entre un paclitaxel alcyne (un inhibiteur de mitose) qui cible les microtubules et l'azoture chélatant bis-triazole couplé à un fluorophore rouge Tamra.²⁰

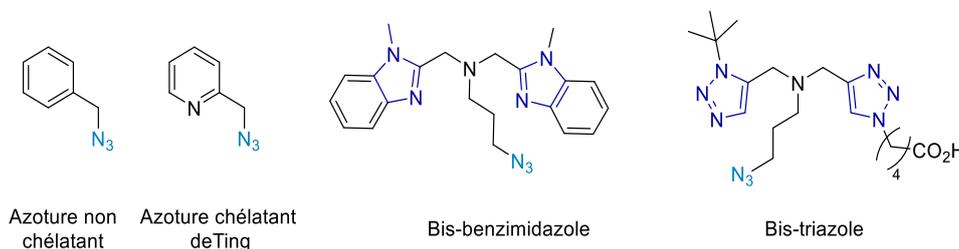


Figure 12. Structures des azotures comparés.

Nous pensons donc que des sondes équipées de ces azotures chélatants permettront d'aller « pêcher » des protéines présentes à basse concentration.

III.2) Les iminosydnone comme lien clivable

Récemment, dans notre laboratoire, une nouvelle réaction de coupure bioorthogonale consistant à faire réagir une iminosydnone, un composé mésoionique de la classe des sydnones (Figure 13), avec

un cyclooctyne a été développée : il s'agit de la réaction de SPICC (Strain Promoted Iminosydnone cycloalcyne cycloaddition).⁶³

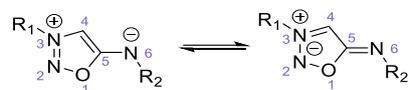


Figure 13. Structure et mésomérie des iminosydnone

Cette nouvelle réaction est très proche de la réaction de SPSAC mais utilise un mésoionique possédant l'avantage d'être doublement fonctionnalisable en position N3 et N6 contrairement à la sydnone. En 2017, notre équipe a publié une étude sur la découverte de nouveaux dipôles capables de réagir avec des cycloalcyne dans des réactions bioorthogonales. Ainsi, 25 composés mésoioniques ont été mis en réaction avec 4 cycloalcyne possédant des tensions de cycle différentes (BCN, DBCO, TMTH, bis(sulfinyl)cyclooctyne) dans un mélange DMSO/H₂O (50/50). Les résultats ont montré que les iminosydnone menaient à la formation du pyrazole correspondant de façon pure et avec de bons rendements. Le produit de *release* a lui aussi été isolé. Il est important de noter qu'en milieu aqueux, l'isocyanate relargué est rapidement hydrolysé en amine correspondante. Le mécanisme de la réaction de SPICC a été établi comme étant une cycloaddition [3+2] suivie d'une réaction de rétro-Diels-Alder libérant un isocyanate ensuite hydrolysé en amine correspondante en présence d'eau (Schéma 28).

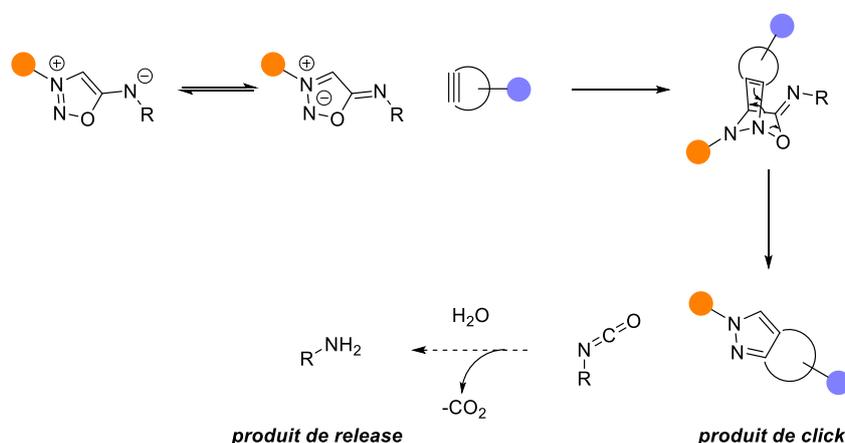


Schéma 28. Réaction de click and release avec les iminosydnone

⁶³ 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

Afin de rendre cette réaction la plus performante possible, une série d'iminosydnone a été ensuite préparée en modifiant les substituants en position N3 et N6 et a été engagée avec des cyclooctynes dans l'eau à pH et températures physiologiques. Les groupements attracteurs en position N3 et une fonction urée en position N6 permettent d'augmenter les cinétiques de réactions. Une étude plus approfondie a prouvé que la réaction entre une iminosydnone urée et le BCN était légèrement plus rapide que la réaction de de SPSAC (SPSAC = $0.027 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à $100 \mu\text{M}$; SPICC = $0.179 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Par ailleurs la réaction est encore plus rapide en modifiant la nature du cycloalcyne (DBCO = $1.47 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, TMTH = $29.2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Ces résultats prometteurs ont permis une application en bioconjugaison. Ainsi, l'anticorps Trastusumab a été fonctionnalisé par une iminosydnone urée fluorescente (Tamra) puis la réaction de SPICC avec un BCN a été réalisée dans un tampon et dans du plasma sanguin pour permettre le décrochage du fluorophore de l'anticorps. Des analyses SDS-Page ont montré la disparition des bandes de fluorescence et ont ouvert la porte à une preuve de concept quant à l'utilisation d'iminosydnone comme lien clivable (Schéma 29).

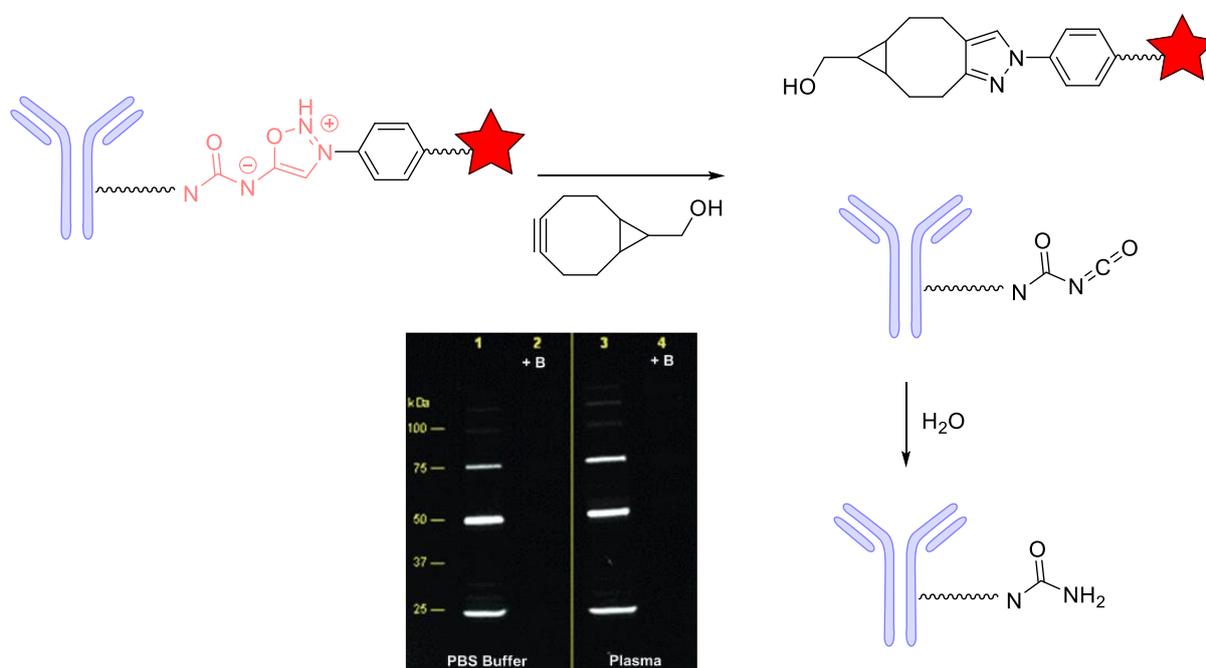


Schéma 29. Réaction de SPICC sur le Trastusumab

La réaction a, par la suite, été utilisée dans une expérience de fishing *in vitro* d'une protéine modèle alcynée dans un milieu complexe grâce à une sonde portant un groupement azoture et une biotine séparée par un lien iminosydnone. Après la capture sur la streptavidine, la réaction de click and release avec un cyclooctyne fluorescent a permis le décrochage de la protéine de la streptavidine ainsi que son marquage fluorescent (Schéma 30).

Introduction générale

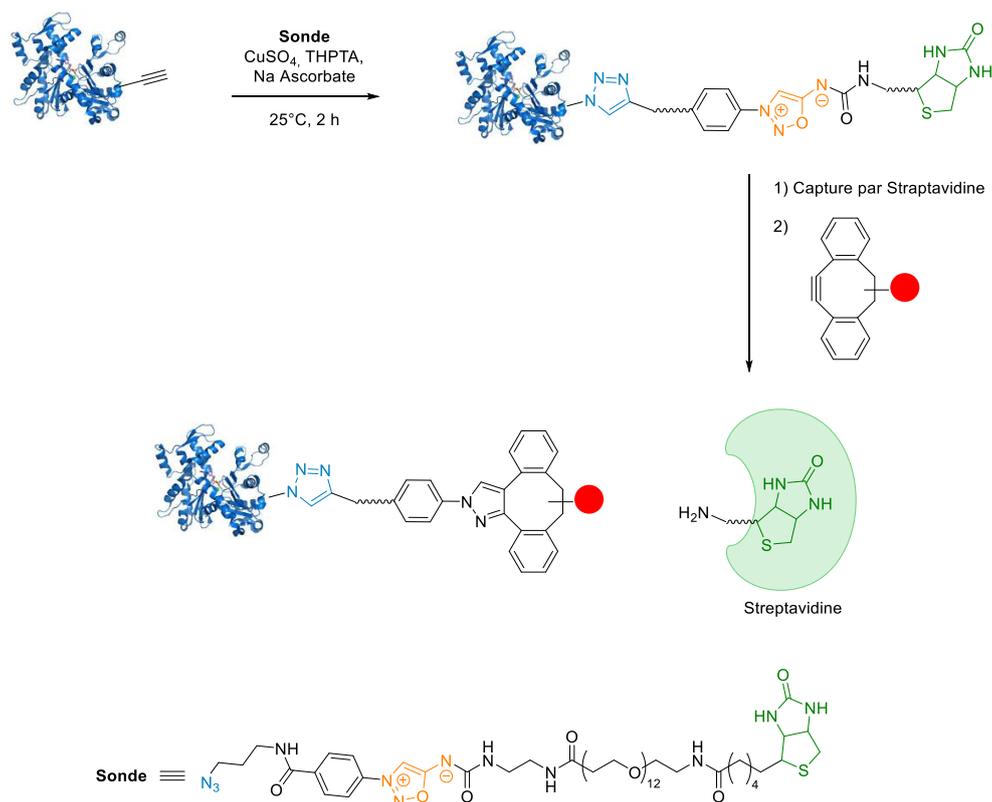


Schéma 30. Purification d'une protéine alcynée à l'aide d'une sonde possédant un lien clivable iminosydone

III.3) Objectifs de la thèse

Ce chapitre d'introduction nous a permis de montrer que les réactions bioorthogonales sont des outils de choix pour développer de nouvelles approches permettant l'étude des processus biologiques. L'utilisation des rapporteurs chimiques, des réactions de ligation mais aussi des réactions de coupure sont particulièrement utiles pour les applications d'imagerie et de target fishing.

Dans ce contexte, le premier chapitre de ce manuscrit, portera sur l'amélioration de la réaction de CuSAC afin de la rendre plus bioorthogonale, notamment en diminuant la charge catalytique en cuivre. Pour cela, nous utiliserons la technique de criblage haut débit HTE (High-Throughput Experimentation) pour trouver de nouveaux ligands et optimiser les conditions de réaction. De plus nous essaierons de transposer cette réaction de cycloaddition aux iminosydone afin d'ouvrir la voie à une nouvelle réaction de coupure bioorthogonale catalysée par du cuivre. Ce chapitre permettra de décrire en détail la chimie des sydone et des iminosydone que nous utiliserons comme outils bioorthogonaux pour des applications en chémobiologie et plus particulièrement en protein fishing dans le chapitre 2.

Dans un deuxième temps, en collaboration étroite avec l'équipe du professeur Thierry Meinel de l'I2BC, nous nous sommes intéressés au Myristoylome, l'ensemble des protéines ayant subies une myristoylation. Dans cette étude qui sera développée dans le Chapitre II de ce manuscrit, de nature très différente du premier, le but sera d'identifier les protéines myristoylées.

Nous utiliserons les concepts d'azotures chélatants et de liens clivables iminosydnone pour synthétiser plusieurs sondes originales capables de pêcher et d'identifier le Myristoylome. Ainsi, les azotures chélatants développés dans notre laboratoire seront utilisés pour pêcher les protéines myristoylées et le dipôle iminosydnone sera utilisé comme lien clivable pour permettre de décrocher la protéine cible des billes de streptavidine.

L'identification du Myristoylome nécessite au préalable d'introduire une fonction alcyne sur les protéines myristoylées. Les protéines seront donc cultivées dans un milieu contenant du myristate alcyne de synthèse, pseudo-substrat de l'enzyme impliquées dans la myristoylation des protéines.

Enfin dans un dernier et court chapitre, nous aborderons la synthèse d'indazolo[2,3-a]quinoxalines à partir de sydnones tricycliques qui a fait l'objet d'une étude de méthodologie de synthèse pendant mon doctorat.

Chapitre I : Cycloadditions des sydnones et des iminosydnones avec les alcynes

Chapitre I. Cycloadditions des sydnones et des iminosydnones avec les alcynes

I) Rappels sur les composés mésoioniques

Le terme « mésoionique » issu de la contraction des mots « mésomère » et « ionique », apparaît pour la première fois dans un article de Baker et Ollis paru en 1949 pour décrire des composés appartenant à une famille d'hétérocycle à 5 chaînons portant à la fois une charge positive et une charge négative pouvant toutes deux se délocaliser sans jamais former un composé non chargé (Schéma I. 1).^{64,65}

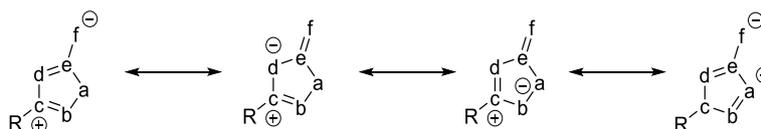


Schéma I. 1. Formes mésomériques des composés mésoioniques

Les composés mésoioniques qui nous intéressent tout particulièrement sont les sydnones et les iminosydnones. Leur stabilité et leur accès synthétique rendent ces composés mésoioniques très attractifs. De plus, ces composés dipolaires présentent des propriétés thérapeutiques et des réactivités intéressantes qui en font des outils utiles en chimobiologie.

Il existe d'autres composés mésoioniques tels que les münchnones (oxazoles avec un oxygène exocyclique) mais qui sont beaucoup moins stables et donc plus difficiles à isoler, ou encore les sydnones méthides encore très peu étudiées (Figure I. 1). Dans cette introduction, nous nous intéresserons particulièrement aux sydnones et aux iminosydnones, qui sont les deux mésoioniques les plus étudiés dans notre laboratoire, en donnant un bref aperçu de leurs propriétés et de leurs utilisations récentes.

⁶⁴ W. D. Ollis, V. D. Poole, *J. Chem. Soc.*, **1949**, 307-314.

⁶⁵ W. Baker and W. D. Ollis, *Q. Rev., Chem. Soc.*, **1957**, *11*, 15-29

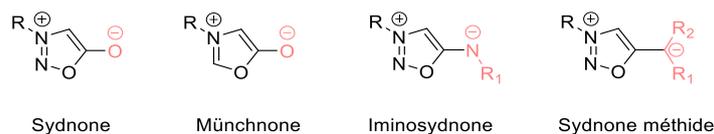


Figure I. 1. Exemples de composés mésoioniques

I.1) Les sydnones

Les sydnones prennent leur nom de la contraction de « Sydney » (ville où elles ont été synthétisées pour la première fois) et « lactone » (la fonction chimique incluse dans le cycle). Il existe plusieurs formes mésomères de la sydnone (Schéma I. 2). La forme mésomère dont la charge négative est portée par l'oxygène exocyclique et la charge positive par l'azote N3, est la représentation la plus communément retrouvée dans la littérature. Cependant, des études physico-chimiques sur les sydnones ont montré que la liaison C5-O6 possède un caractère de double liaison visible en analyse infrarouge à 1730 cm^{-1} . Le carbone en position 4, quant à lui, présente un caractère nucléophile et son proton possède un pKa compris entre 18 et 20 pouvant être déprotonné en présence d'une base forte.^{66,67,68} Enfin, l'azote en position 3 est très pauvre en électrons.

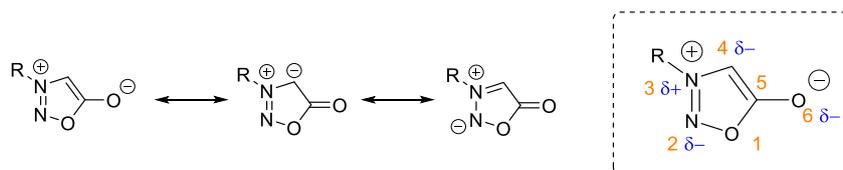


Schéma I. 2. Formes mésomères de la sydnone et numérotation des atomes

Les sydnones ont trouvé des applications en chimie médicinale grâce à leurs propriétés thérapeutiques, notamment en tant qu'anti-inflammatoire ou antibactérien.^{69,70,71}

I.1.1) Synthèse des sydnones

La synthèse des sydnones a été décrite pour la première fois en 1935 par Earl et Mackney.⁷² Elle

⁶⁶ C. V. Greco, B. P. O'Reilly, *J. Heterocycl. Chem.*, **1970**, 7, 1433–1434.

⁶⁷ S. Wiechmann, T. Freese, M. H. H. Drafz, E. G. Hübner, J. C. Namyslo, M. Nieger, A. Schmidt, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 11822–11824.

⁶⁸ J. M. Fan, Y. Wang, C. H. Ueng, *J. Phys. Chem.*, **1993**, 97, 8193–8199.

⁶⁹ R. Chandrasekhar and M. J. Nanjan, *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2012**, 12, 1359-1365

⁷⁰ H. Wagner, J. B. Hill, *J. Med. Chem.*, **1974**, 17, 1337-1338.

⁷¹ J. B. Hill, R. E. Ray, R. H. Wagner, R. L. Aspinall, *J. Med. Chem.*, **1975**, 17, 50-54.

⁷² J. C. Earl and A. W. Mackney, *J. Chem. Soc.*, **1935**, 899-900.

consistait en une nitrosylation de la phénylglycine par du nitrite de sodium (NaNO_2) suivi d'ajout d'anhydride acétique en chauffant, permettant la fermeture du cycle par élimination d'une molécule d'eau et ceci avec un rendement satisfaisant de 73% (Schéma I. 3). Plus tard, le remplacement de l'anhydride acétique par l'anhydride trifluoroacétique a permis de cycliser les *N*-nitroso-glycines à température ambiante. Dans ces travaux pionniers, Earl et Mackney mentionnent la relative stabilité des sydnones qui, en présence d'acide ou de base forte à haute température, se décomposent pour former de l'hydrazine, du dioxyde de carbone et de l'acide formique.

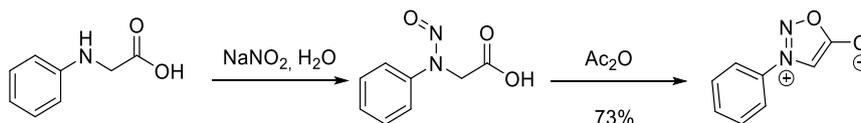


Schéma I. 3. Synthèse de la sydnone par Earl et Mackney⁷²

Plus récemment, notre groupe a optimisé la voie de synthèse de Earl et Mackney en développant une procédure « one-pot » des étapes de nitrosylation et de cyclo-déshydratation (Schéma I. 4). Cette méthode permet de s'affranchir d'une étape de purification et d'éviter la manipulation de composés nitrosylés hautement toxiques. Ainsi, la synthèse se fait en présence d'un donneur de groupement nitroso, le tert-butylnitrite, et d'anhydride trifluoroacétique, le tout sans nécessité d'isoler l'intermédiaire.⁷³ Cette nouvelle voie de synthèse a permis d'isoler 18 sydnones avec de très bons rendements entre 45% et 92%.

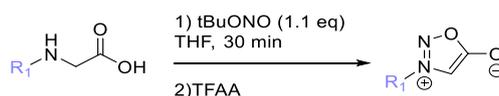


Schéma I. 4. Synthèse "one pot" de la sydnone

Aussi, en 2019, le groupe de Lamaty a mis au point une voie de synthèse de sydnones par mécanochemie (Schéma I. 5).⁷⁴ La mécanochemie, actuellement en plein essor, est une technique qui permet de réaliser des synthèses sans solvant grâce à un procédé mécanique qui fournit l'énergie nécessaire à la réaction. Cette technique s'inscrit dans une démarche de chimie verte puisque les solvants organiques ne sont plus utilisés. Le groupe de Lamaty a ainsi pu synthétiser 9 sydnones avec des rendements entre 37% et 95% à partir de dérivés de phénylglycine.

⁷³ S. Specklin, E. Decuypere, L. Plougastel, S. Aliani and F. Taran, *J. Org. Chem.*, **2014**, *79*, 7772

⁷⁴ N. Pétry, T. Vanderbeeken, A. Malher, Y. Bringer, P. Retailleau, X. Bantreil, F. Lamaty, *Chem. Commun.*, **2019**, *55*, 9495–9498.

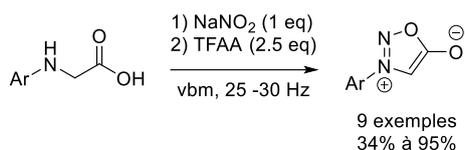


Schéma I. 5. Synthèse de sydnone par mécano-chimie décrite par Lamaty

I.1.2) Fonctionnalisation des sydnone

Le caractère acide du proton en position C4 de la sydnone permet une grande variété de fonctionnalisations sur cette position. Entre autres, l'utilisation de bases lithiées permet l'abstraction de ce proton et la fonctionnalisation par des espèces électrophiles.^{75,76,77} Par la suite il a été montré que des réactions de couplage direct pouvaient avoir lieu sur des sydnone. Ainsi des couplage pallado-catalysés (couplage de Heck et de Suzuki) peuvent être réalisés en une seule étape (Schéma I. 6).^{78,79}

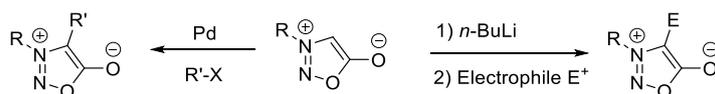


Schéma I. 6. Fonctionnalisation en position C4 de la sydnone par couplage pallado-catalysé ou par addition d'un électrophile

Par ailleurs, les réactions d'halogénéation de la position C4 des sydnone ont été très étudiées. Il a été montré que des réactions de chloration, bromation et iodation pouvaient être réalisées en présence de donneurs d'halogènes électrophiles tels que Cl₂, Br₂ ou ICl. Cependant, la méthode la plus simple à mettre en place reste la réaction avec les *N*-halogénosuccinimides NXS (Schéma I. 7).^{80,81,82} Ces halogéno-sydnone permettent elles aussi de réaliser des réactions pallado-catalysées et d'accéder à un grand nombre de fonctionnalisations en position C4.

⁷⁵ H. Kato, M. Ohta *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1957**, *30*, 210–213

⁷⁶ Foster, R. S.; Adams, H.; Jakobi, H.; Harrity, J. P. A. *J. Org. Chem.*, **2013**, *78*, 4049

⁷⁷ Tien, H.-J., Fang, G.-M.; Lin, S.-T.; Tien, L.-L. *J. Chin. Chem. Soc.*, **1992**, *39*, 107

⁷⁸ Yang, Y.; Kuang, C. *Eur. J. Org. Chem.*, **2014**, *2014*, 7810–7813

⁷⁹ Yang, Y.; Gong, H.; Kuang, C. *Synthesis.*, **2013**, *45*, 1469–1474.

⁸⁰ H.-J. Tien, M.-Y. Yeh, C.-Y. Huang, *Jnl Chinese Chemical Soc.*, **1985**, *32*, 461–465.

⁸¹ Turnbull, K.; Ito, S. *Synth. Commun.*, **1996**, *26*, 1441

⁸² Turnbull, K. J. *Heteroevel. Chem.*, **1985**, *22*, 965

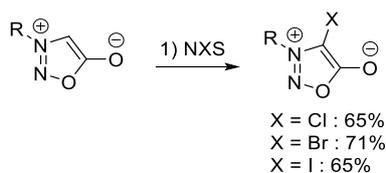


Schéma I. 7. Halogénéation en position C4 de la sydnone

I.1.3) Réactivité des sydnones

Aujourd'hui les sydnones sont principalement connues pour leur capacité à réagir en tant que dipôle dans des réactions de cycloaddition [3+2] avec des alcynes pour former des pyrazoles, des composés eux aussi très utilisés en chimie médicinale et présents dans la structure de nombreux composés pharmacologiques (Figure I. 2).⁸³

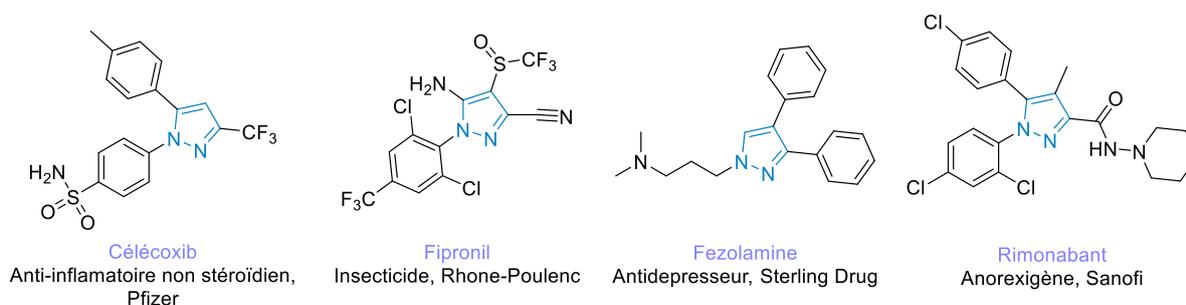


Figure I. 2. Exemples de pyrazoles utilisés en chimie médicinale

I.1.3.a) Cycloaddition thermique

C'est Huisgen qui, dans les années 1960, s'intéresse en premier à la réactivité des sydnones avec les alcynes.⁸⁴ Il a démontré que la réaction entre la sydnone et l'alcyne était compatible avec divers alcynes monosubstitués ainsi qu'avec des alcynes disubstitués portant des groupements tels que les groupes alcool, acétal, acyle et ester. Le mécanisme passe par une réaction de cycloaddition [3+2] suivie d'une réaction spontanée de rétro Diels-Alder permettant l'extrusion de dioxyde de carbone (Schéma I. 8). Néanmoins, cette réaction nécessite de hautes températures supérieures à 150 °C, et, dans le cas d'alcynes dissymétriques, forme 2 régioisomères. L'énergie nécessaire pour franchir la barrière

⁸³ M. Naim, O. Alam, F. Nawaz, Md. J. Alam, P. Alam, *J. Pharm. Bioall. Sci.*, **2016**, *8*, 2–17.

⁸⁴ R. Huisgen, R. Grashley, H. Gotthardt, R. Schmidt, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1962**, *1*, 48-49.

énergétique de la cycloaddition est de 32,5 kcal/mol pour le pyrazole 1,3 et 36,6 kcal/mol pour le pyrazole 1,4.⁸⁵

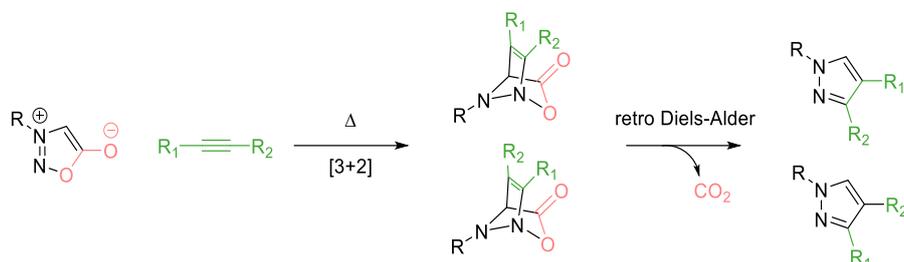


Schéma I. 8. Cycloaddition de Huisgen

Depuis quelques années, des alternatives de synthèse ont permis de contrôler la régiosélectivité de cette réaction. Une des stratégies utilisées par le groupe de Yeh joue sur la polarisation de l'alcyne pour modifier la régioisométrie de la réaction.⁸⁶ Ainsi, l'utilisation de propiolate d'ester permet d'obtenir préférentiellement le pyrazole 1,3 mais la formation du régioisomère 1,4 est toujours observée en quantité non négligeable (Schéma I. 9A). D'autres voies de synthèse ont permis de modifier plus drastiquement la régioisométrie de la réaction notamment en utilisant des alcynes monosubstitués par un groupement encombrant sur des sydnones fonctionnalisées en position C4 (Schéma I. 9B).⁸⁷ En 2009, les travaux de Harrity ont montré que les boronate d'alcynes permettaient un contrôle fin de la régiosélectivité.⁸⁸ En effet, en présence de boronate d'alcyne terminal, la formation du pyrazole 3-boronate est préférentielle. Lorsque le boronate d'alcyne est substitué, la formation du pyrazole 4-boronate est presque exclusive (Schéma I. 9C).

⁸⁵ J. Comas-Barcelo, R. S. Foster, B. Fiser, E. Gomez-Bengoa, J. P. A. Harrity, *Chem. Eur. J.*, **2015**, 21, 3257-3263.

⁸⁶ F. Fuh Wong, E.-M. Chang, T.-H. Chen, K.-C. Chiang and M.-Y. Yeh, *Heterocycles*, **2006**, 68, 1007-1015

⁸⁷ E.-M. Chang, T.-H. Chen, F. Wong, E.-C. Chang and M.-Y. Yeh, *Synlett*, **2006**, 6, 901-904

⁸⁸ D. L. Browne, J. F. Vivat, A. Plant, E. Gomez-Bengoa, J. P. A. Harrity, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 7762-7769.

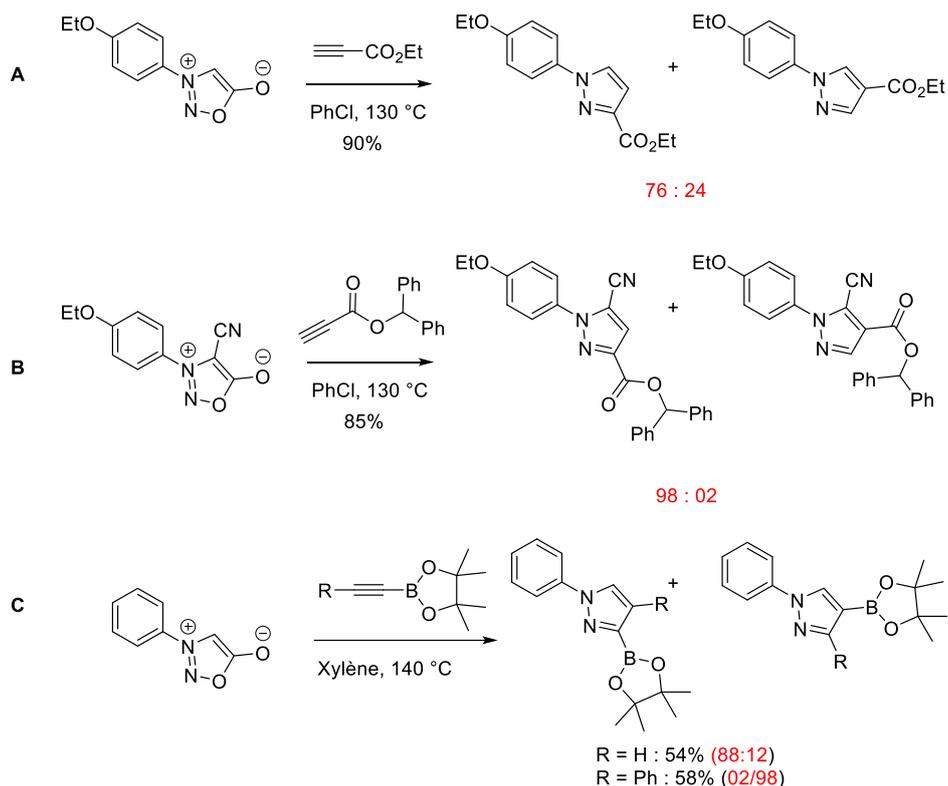


Schéma I. 9. Modification de la régioisométrie des pyrazoles par A : polarisation de l'alkyne. B : encombrement stérique. C : boronate d'alkyne

1.1.3.b) Cycloaddition cupro-catalysée

En 2013, notre équipe a réalisé une étude exploratoire ayant pour but de découvrir de nouvelles réactions de chimie click à l'aide d'une approche basée sur le criblage haut débit.²³ Pour cela, différents dipôles et dipolarophiles ont été synthétisés et testés en présence de différentes sources de métaux. Au total plus de 2000 réactions ont été réalisées et systématiquement criblées. Parmi celles-ci, la réaction entre une sydnone et un alcyne terminal en présence de cuivre a donné des résultats encourageants et présente un certain nombre de critères en rapport avec la chimie click tels que des conditions de réaction douces et une excellente régio- et chimio-sélectivité. Les conditions optimisées de cette réaction impliquent l'emploi de sels de cuivre (20 mol%), d'un ligand du cuivre (40 mol%), d'une quantité stœchiométrique de base et d'un excès de réducteur (Schéma I. 10). De la même façon que pour la CuAAC, le degré d'oxydation du cuivre doit être de +I pour permettre l'activation de l'alkyne et initier la réaction. Parmi les 8 ligands criblés, la bathophénantroline disulfonique acide (BPDS) a montré des résultats prometteurs permettant de réaliser l'étendue de cette réaction avec des rendements compris entre 61% et 99% selon les substrats. Cette nouvelle réaction entre sydnone et alcyne permet l'obtention à température ambiante d'un seul régioisomère : le pyrazole 1,4. Il s'agit de la réaction de CuSAC pour Copper-catalysed Sydnone Alkyne Cycloaddition.

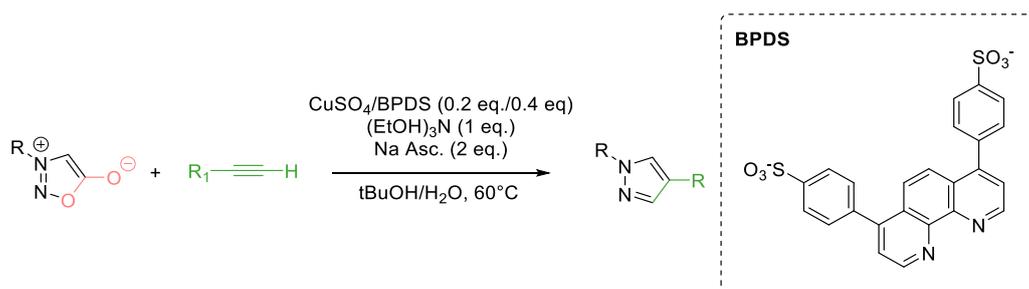


Schéma I. 10. Réaction de la CuSAC, Copper-catalysed Sydnone Alkyne Cycloaddition.

Le mécanisme proposé implique la formation d'un acétylénure de cuivre suivi de la coordination de celui-ci sur l'azote en position 2 de la sydnone provoquant la formation d'une liaison C-C et C-N. Une étape finale de décarboxylation par réaction de rétro Diels-Alder conduit à la formation du pyrazole. Une application en bioconjugaison a pu également être mise en œuvre. Cette réaction a, par la suite, été appliquée à la bioconjugaison de protéines *via* l'introduction préalable du motif aryl-sydnone par couplage peptidique d'une fonction acide positionnée en *para* de la sydnone sur les lysines de la BSA (*Bovine Serum Albumin*). La réaction de CuSAC a été menée avec un alcyne fonctionnalisé par un fluorophore, le dansyl.²³ Cette fonctionnalisation a pu être observée par SDS-Page et confirmée par analyse MALDI.

La réaction CuSAC est particulièrement intéressante pour la synthèse de pyrazoles disubstitués. Notre laboratoire a notamment mis au point une transformation monotope d'aryl-glycines en pyrazoles (Schéma I. 11).⁸⁹ Cette procédure implique la formation *in situ* de sydnones à partir d'aryl-glycines, suite à une réaction de nitrosylation et de cyclisation réalisée sans solvant, suivi de la réaction CuSAC.

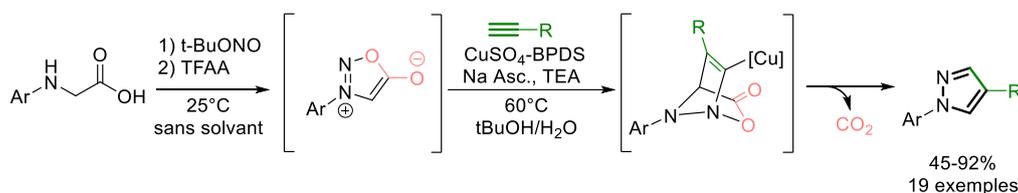


Schéma I. 11. Préparation de pyrazoles disubstitués à partir d'aryl-glycines

La réaction CuSAC permet donc d'accéder facilement à un grand nombre de pyrazoles différents. La grande chimiosélectivité de cette réaction permet de synthétiser des pyrazoles complexes sans devoir protéger les fonctions réactives. La réaction de CuSAC présente néanmoins certaines limitations. En particulier, la réaction ne fonctionne pas si la position C4 est substituée par quoique ce soit excepté un brome, un chlore ou un fluor. Notre équipe a montré que les bromosydnones pouvaient réagir avec les alcynes de manière cupro-catalysée mais avec une perte partielle de régiosélectivité au niveau du

⁸⁹ E. Decuypere, S. Specklin, S. Gabillet, D. Audisio, H. Liu, L. Plougastel, S. Kolodych, F. Taran, *Org. Lett.*, **2015**, *17*, 362–365.

pyrazole lorsque le ligand BPDS est utilisé. En revanche, lorsque le ligand **Bim**, comportant un motif biimidazole, était utilisé un seul régioisomère est obtenu.⁹⁰ Les pyrazoles bromés obtenus peuvent alors être utilisés comme synthons pour la préparation de pyrazoles trisubstitués par le biais de couplages de Suzuki (Schéma I. 12). Le rôle bénéfique de ce ligand bis-imidazole sur la réaction CuSAC sera rediscuté plus loin, il est à l'origine des travaux de thèse décrits dans ce chapitre. Par ailleurs, les chlorosydnones ont montré elles aussi une légère perte de régiosélectivité dans la réaction de CuSAC.

Les 4-fluoro-sydnones sont d'excellents substrats pour la réaction CuSAC et réagissent très rapidement pour former des 5-fluoro-1,4-pyrazoles avec de bons rendements (Schéma I. 12).⁹¹ Cependant, les sydnones fluorées sont difficiles à synthétiser. Elles nécessitent la préparation de complexes palladiques à partir de sydnones iodées et leur traitement par le Select-Fluor, un donneur de Fluor électrophile. De plus, la stabilité de ces sydnones est faible.

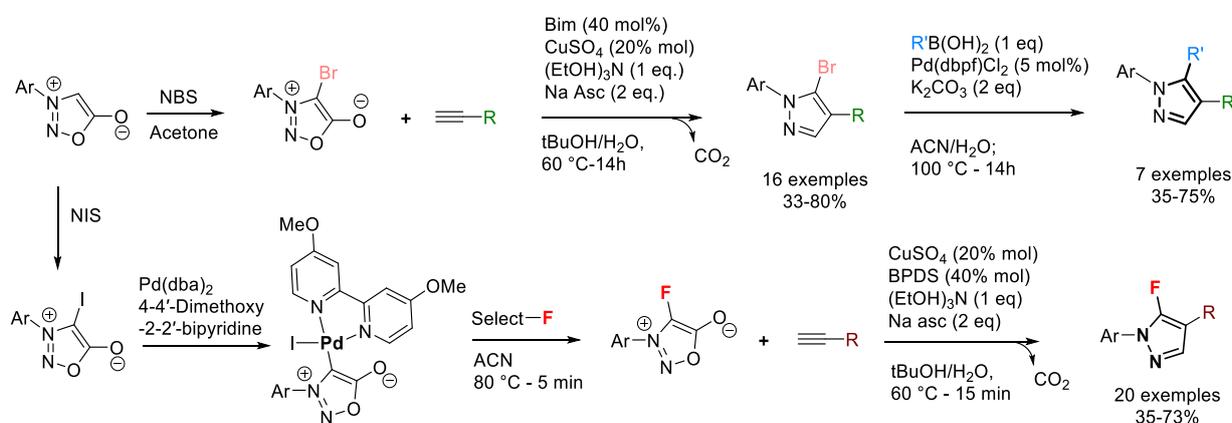


Schéma I. 12. Préparation de pyrazoles trisubstitués en utilisant la réaction CuSAC

La réaction de CuSAC présente aussi d'autres limitations :

- elle nécessite des quantités relativement importantes de cuivre (20% molaire).
- elle est relativement lente et nécessite souvent plus de 14h de réaction. Pour certains substrats récalcitrants, un chauffage est nécessaire pour éviter les temps de réactions trop longs.
- elle est faiblement reproductible en fonction des lots du ligand BPDS. Ce point a été découvert récemment dans le laboratoire et sera détaillé plus loin dans le manuscrit.

Il est à noter que d'autres mésoioniques sont capables de réagir dans des réactions de cycloaddition

⁹⁰ E. Decuypere, S. Specklin, S. Gabillet, D. Audisio, H. Liu, L. Plougastel, S. Kolodych and F. Taran, *Org. Lett.*, **2015**, *17*, 362-365.

⁹¹ H. Liu, D. Audisio, L. Plougastel, E. Decuypere, D. Buisson, O. Koniev, S. Kolodych, A. Wagner, M. Elhabiri, A. Krzyczmonik, S. Forsback, O. Solin, V. Gouverneur, F. Taran, *Angew Chem Int Ed*, **2016**, *55*, 12073–12077.

comme les iminosydnones.

I.2) Les iminosydnones

Les iminosydnones sont des composés mésoioniques de la famille des sydnones mais qui ont la particularité d'être fonctionnalisables de part et d'autre du cycle, grâce à la présence des azotes N3 et N6. Le carbone C4 peut lui aussi être fonctionnalisé. Les iminosydnones ont été mises en évidence pour la première fois par Brooks et Walker en 1957.⁹² Dans les années 1970, des médicaments possédant un motif iminosydnone ont montré des activités thérapeutiques dans le traitement de diverses pathologies telles que l'angor ou certaines maladies neurodégénératives. Nous pouvons notamment citer la Molsidomine® dans le traitement anti-angoreux ou encore le Mesocarb® dans la prise en charge de la maladie de Parkinson (Figure I. 3).⁹³

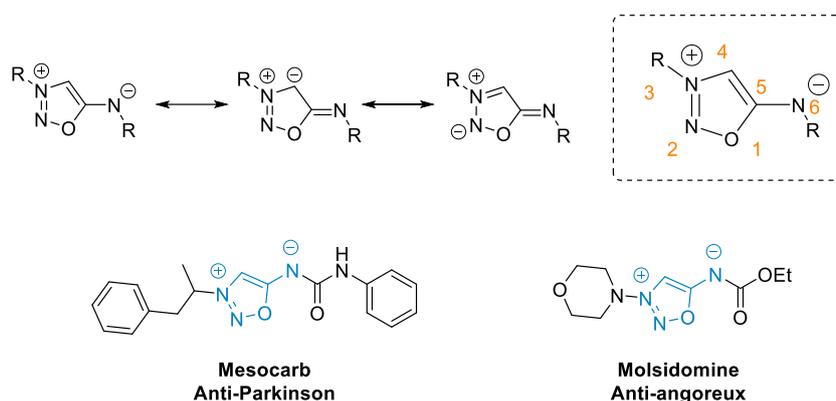


Figure I. 3. Composés pharmaceutiques possédant un motif iminosydnone

I.2.1) Synthèse des iminosydnones

A l'origine, les iminosydnones étaient synthétisées à partir de la *N*-nitroso-*N*-méthylaminoacétonitrile en présence d'un acide de Brønsted, tel que l'acide nitrique ou l'acide chlorhydrique, permettant la cyclisation et donc la formation de l'iminosydnone (Schéma I. 13). Au vu de la dangerosité et de l'instabilité des composés *N*-nitrosoamines, l'équipe de Turnbull et Beal a mis en évidence la possibilité de nitrosyler les amino-nitriles par réaction avec le nitrite d'isoamyle et de faire la cyclisation monotope en conditions acides par bullage de HCl gazeux.⁹⁴ (Schéma I. 13). Il est à noter que l'isoamyle

⁹² P. Brookes and J. Walker, *J. Chem. Soc.*, **1957**, 4409–4416.

⁹³ R. R. Gainetdinov, T. D. Sotnikova, T. V. Grekhova, K. S. Rayevsky, *Eur. J. Pharmacol.*, **1997**, 340, 53–58.

⁹⁴ E. N. Beal, K. Turnbull, *Synthetic Commun.*, **1992**, 22, 673–676.

nitrite est un composé volatil et nocif. Afin de s'affranchir de la dangerosité des réactifs utilisés, notre laboratoire utilise une voie de synthèse utilisant du *tert*-butyle nitrite en solution ainsi qu'un traitement acide à l'aide de HCl en solution dans le dioxane pour réaliser cette cyclisation.

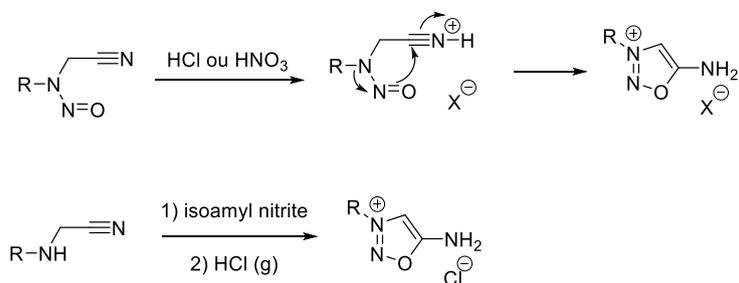


Schéma I. 13. Synthèse des iminosydrones.

Plus récemment, l'équipe de Lamaty a développé une voie de synthèse permettant la formation de l'iminosydnone monotope (Schéma I. 14). Cette méthode a la particularité de former les iminosydrones sans étape de purification et sans réactif toxique avec de très bons rendements. Grâce à cette voie de synthèse, l'équipe de Lamaty a pu synthétiser un analogue de feprosidine, une amphétamine possédant un groupe iminosydnone, avec un rendement de 93%.⁹⁵

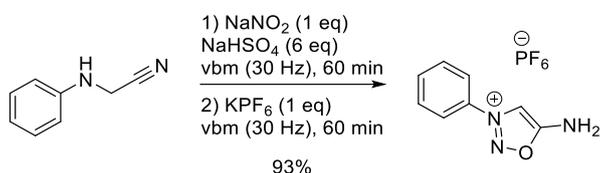


Schéma I. 14. Synthèse monotope de l'iminosydnone par mécano-chimie décrite par Lamaty

Contrairement aux sydrones, les iminosydrones ont l'avantage d'être doublement fonctionnalisables, sur l'azote N3 et sur l'azote exocyclique N6, permettant l'accès à une diversité structurale plus importante.

I.2.2) Fonctionnalisation en position N6 des iminosydrones

⁹⁵ N. Pétry, F. Luttringer, X. Bantreil, F. Lamaty, *Faraday Discuss.*, **2023**, *241*, 114–127.

Après avoir formé le cycle iminosydnone, il est possible de fonctionnaliser la fonction amine en position N6 par des électrophiles puissants pour accéder à diverses iminosydrones. Ainsi, une réaction avec un chloroformate mène à la formation d'une iminosydnone carbamate ; un couplage avec un acide carboxylique conduit à la formation d'une iminosydnone amide ; une réaction avec un isocyanate induit la formation d'une iminosydnone urée et une réaction avec un chlorure de sulfonyle mène à la formation d'une iminosydnone sulfonamide (Schéma I. 15).

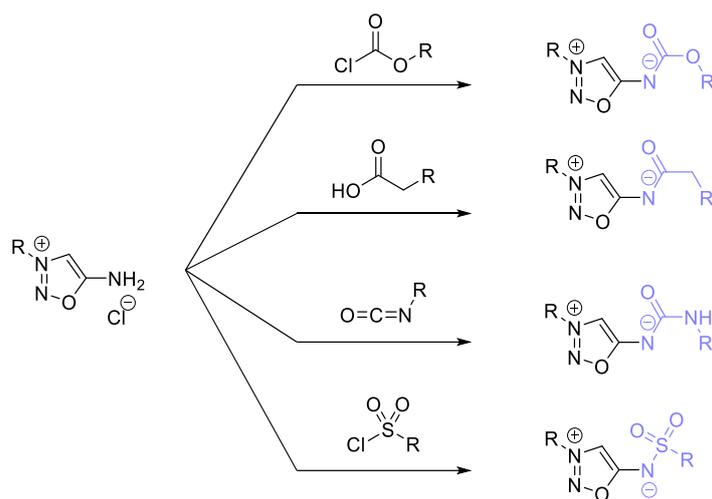


Schéma I. 15. Fonctionnalisation des iminosydrones en N6

Comme indiqué dans le Schéma I. 15, la formation d'iminosydrones urée nécessite la préparation préalable d'un isocyanate. Il est à noter que la synthèse d'isocyanates complexes se fait en présence de l'amine correspondante et de triphosgène, réactif hautement toxique générant du phosgène *in situ* en phosgène. Pour limiter l'utilisation de ce composé nocif, d'autres alternatives ont été explorées au laboratoire afin d'accéder aux motifs iminosydnone urée ou carbamate. Ainsi, des études plus poussées ont permis de mettre en place un protocole général dans lequel une iminosydnone portant un groupement imidazolium en position N6 peut réagir en tant qu'électrophile avec divers nucléophiles (Schéma I. 16).⁹⁶ Ainsi, pour former une iminosydnone urée ou carbamate, il est possible de faire réagir directement une amine ou un alcool sur l'intermédiaire imidazolium. Cet intermédiaire imidazolium est préparé à partir du sel d'iminosydnone mis en réaction avec du carbonyldiimidazole (CDI) puis méthylié à l'aide d'iodure de méthyle (MeI) pour former un meilleur groupe partant. De par son instabilité, l'intermédiaire imidazolium n'est pas isolé et réagit directement avec le nucléophile. Par ailleurs, en 2003, l'équipe de Hoffmann, a mis en évidence l'utilisation d'iminosydrones portant un groupement *p*-nitrophenyl carbamate en position N6 permettant de former des iminosydrones urée ou carbamate par réaction avec un alcool ou une amine.⁹⁷

⁹⁶ M. Riomet, K. Porte, L. Madegard, P. Thuéry, D. Audisio, F. Taran. *Org. Lett.* **2020**, *22*, 6, 2403–2408

⁹⁷ L. Soullère, P. Hoffmann, F. Bringaud, *J. Heterocycl. Chem.*, **2003**, *40*, 943–947.

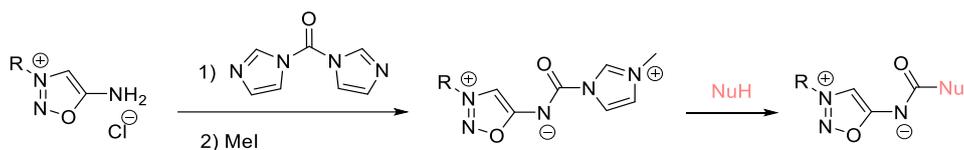


Schéma I. 16. Synthèse alternative pour la fonctionnalisation en N6 des iminosydrones

D'autre part, il est beaucoup plus complexe de synthétiser des iminosydrones portant un groupement aryle ou alkyle en position N6. Concernant les iminosydrones bis-aryliques, leur voie de synthèse est très différente des autres iminosydrones déjà décrites. Celle-ci implique tout d'abord l'alkylation d'une première aniline par du chlorure de chloroacétyle suivie d'une réaction entre le chlorure d'acide avec une seconde aniline. L'amine secondaire ainsi formée est alors nitrosylée en présence de nitrite de *tert*-butyl puis une étape de cyclisation a lieu à l'aide du pentachlorure de phosphore PCl_5 pour former l'iminosydnone bis-arylique (Schéma I. 17).⁹⁸ La purification par colonne chromatographique en phase normale de ces iminosydrones s'avère délicate et mène systématiquement à des dégradations du produit. Ces iminosydrones sont donc purifiées en phase inverse sur une colonne C18.

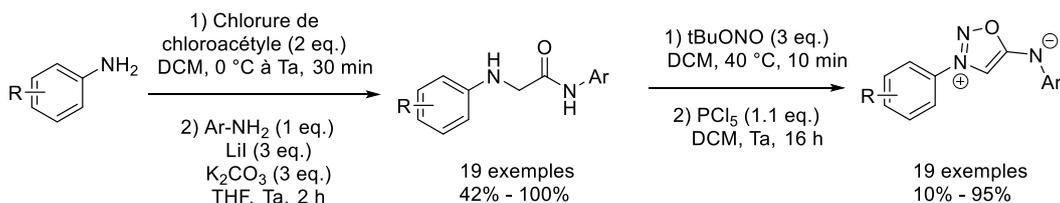


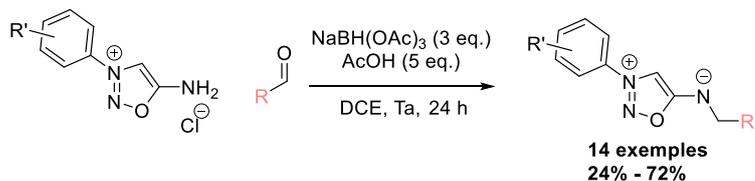
Schéma I. 17. Synthèse de l'iminosydnone bis-aryliques

Concernant les iminosydrones substituées en N6 par un groupement alkyle, les voies classiques d'alkylation entre le sel d'iminosydnone et un électrophile ne permettent pas d'obtenir le produit souhaité. En effet, l'azote exocyclique N6 est faiblement nucléophile ce qui restreint grandement sa réactivité. Malgré cette limite, des études menées au sein du laboratoire ont permis de mettre au point trois voies de synthèse afin d'accéder à des iminosydrones substituées en N6 par un groupement alkyle. La première, développée par le Dr Arnaud Chevalier, consiste en une réaction d'amination réductrice entre le sel d'iminosydnone et un aldéhyde en présence d'un agent réducteur tel que $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ et d'acide acétique (Schéma I. 18A). Cette voie de synthèse a permis de former pour la première fois des iminosydrones alkyles. L'étendue de la réaction a été réalisée et a permis d'isoler 14 iminosydrones alkyles avec des rendements entre 24% et 72% malgré les purifications exigeantes dues

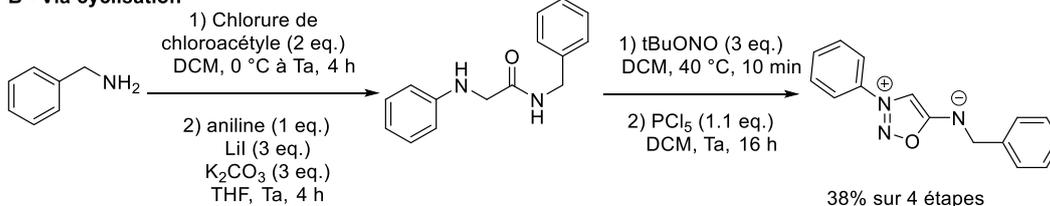
⁹⁸ M. Ribéraud, K. Porte, A. Chevalier, L. Madegard, A. Rachet, A. Delaunay-Moisan, F. Vinchon, P. Thuéry, G. Chiappetta, P. A. Champagne, G. Pieters, D. Audisio, F. Taran, *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, *145*, 2219–2229.

à leur instabilité sur silice. De plus, cette réaction s'avère photosensible et doit être effectuée à l'abri de la lumière dans des conditions de pH neutres afin d'éviter l'ouverture de l'iminosydnone de départ. La deuxième voie de synthèse consiste en une réaction de cyclo-déshydratation de composés de type nitrosamide par PCl_5 , de la même façon que pour la synthèse des iminosydnones bis-aryliques mais à partir d'une amine alkylique (Schéma I. 18B). Cette réaction permet d'obtenir de bons rendements mais l'utilisation de PCl_5 reste incompatible avec de nombreux substrats et n'a pour le moment été utilisé que pour synthétiser l'iminosydnone N3-phényle, N6-benzyle. Enfin, une troisième voie de synthèse a été développée dans notre laboratoire très récemment par les Dr Judith Baudet, Dr Maxime Ribéraud et Dr Emilie Lesur et dont les résultats, encore préliminaires, ne permettent pas d'avoir des rendements satisfaisants. Cette voie de synthèse consiste dans un premier temps à activer l'oxygène exocyclique de la sydnone par de l'anhydride triflique (Tf_2O) (Schéma I. 18C). Dès lors, une espèce nucléophile, telle qu'une amine, peut alors effectuer la substitution aromatique du groupement triflate pour former l'iminosydnone correspondante. Cette réaction a permis de préparer l'iminosydnone N3-phényle, N6-benzyle avec un rendement de 40% ainsi que 13 iminosydnone-aryles avec des rendements encore relativement faibles entre 2% et 44%. Malgré ces rendements, cette nouvelle réaction a permis d'accéder à des iminosydnones originales.

A - Via amination réductrice



B - Via cyclisation



C - Via activation de la sydnone

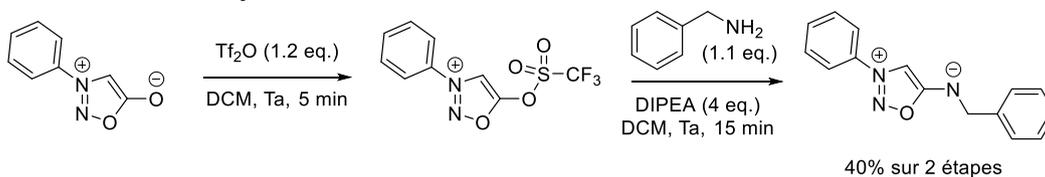


Schéma I. 18. Voies de synthèse de N3-aryle, N6-alkyle-iminosydnones

I.2.3) Fonctionnalisation en position C4 des iminosydnones

Comme introduit précédemment, le carbone en position C4 des sydnones et des iminosydnones porte un proton ayant un pKa compris entre 18 et 20. Une déprotonation en C4 est alors possible grâce à l'emploi de bases fortes comme le *n*-butyllithium, permettant ensuite de réaliser des réactions d'addition nucléophile sur des électrophiles tels que des carbonyles comme décrit par Kalinin en 2000, ou des isocyanates comme décrit par Schmidt en 2018 pour former une liaison C-C en position C4 de l'iminosydnone.^{99,100}

Les iminosydnones peuvent aussi être halogénées sur la position C4 *via* une réaction avec un donneur d'halogène. Ainsi, le groupe de Turnbull a montré qu'une bromation de la position C4 des iminosydnones était possible par réaction entre une N6-amide-iminosydnone et le NBS dans le DMF. Dans le même article, ils montrent qu'il est également possible d'effectuer la réaction inverse de protodé bromation en présence de NaBH₄ ou Na₂SO₃ (Schéma I. 19).⁸¹

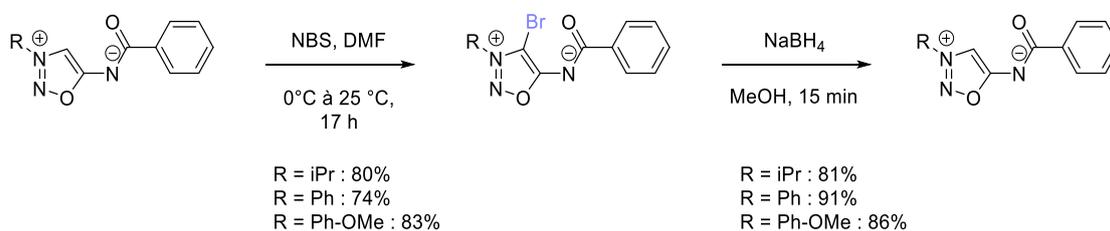


Schéma I. 19. Bromation et débromation d'iminosydnone par Turnbull⁸¹

Plus récemment, notre groupe a également décrit la bromation et l'iodation de différents types d'iminosydnones et étudié leur influence sur les vitesses de réaction en présence d'alcynes tendus selon une réaction de SPICC.¹⁰¹ A partir de ces iminosydnones halogénées par ailleurs plus réactives, des réactions pallado-catalysées telles qu'un couplage de Sonogashira, de Heck ou de Suzuki peuvent aussi être réalisées pour fonctionnaliser l'iminosydnone facilement.

⁹⁹ I. A. Cherepanov, V. N. Kalinin, *Mendeleev Commun.*, **2000**, *10*, 181–182.

¹⁰⁰ T. Freese, A.-L. Lücke, J. C. Namyslo, M. Nieger, A. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.*, **2018**, 1646–1654.

¹⁰¹ M. Riomet, E. Decuypere, K. Porte, S. Bernard, L. Plougastel, S. Kolodych, D. Audisio, F. Taran, *Chem. Eur. J.*, **2018**, *24*, 8535–8541.

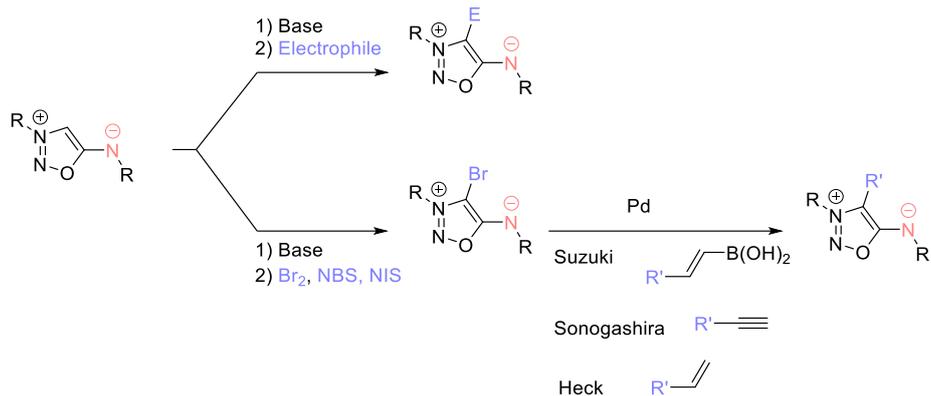


Schéma I. 20. Fonctionnalisation en position C4

I.2.4) Réactivité des iminosydnones

Comme discuté dans le chapitre d'introduction de ce manuscrit, les sydnones sont connues pour réagir avec des cycloalcynes tendus dans des réactions de SPSAC sans catalyse au cuivre, ce qui en fait un outil intéressant pour diverses applications bioorthogonales (Schéma I. 21). En 2017, notre laboratoire a étendu cette réactivité aux iminosydnones qui, en tant que mésoioniques, sont, elles aussi, capables de réagir avec ces cycloalcynes tendus pour former un pyrazole et libérer un isocyanate suite à la réaction de rétro Diels-Alder. Cet isocyanate, est alors hydrolysé en présence d'eau pour former l'amine correspondante. Cette réaction a été appelée SPICC pour Strain-Promoted Iminosydone–Cyclooctyne Cycloaddition.⁶³ Les iminosydnones constituent dès lors un outil permettant un clivage contrôlé par simple addition d'un cyclooctyne tendu dans des conditions douces et bioorthogonales. Cette propriété sera exploitée dans le Chapitre 2 de ce manuscrit.

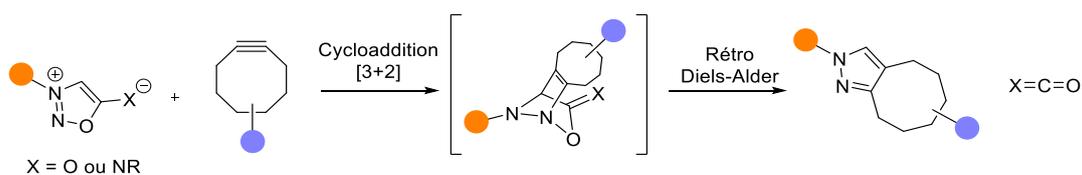
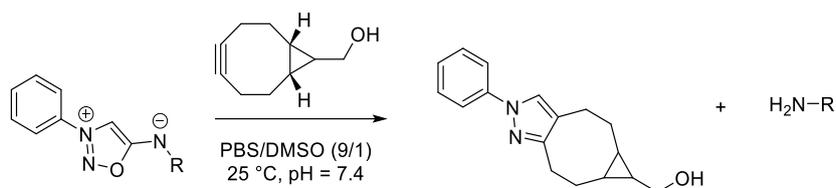


Schéma I. 21. Schéma général des réactions SPSAC et SPICC

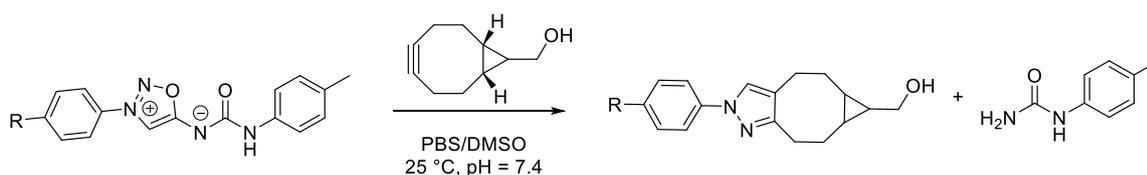
Grâce aux nombreuses possibilités de fonctionnalisations évoquées précédemment, une série d'iminosydnones a été synthétisée dans le but d'évaluer l'influence de leurs substituants sur la vitesse de réaction de SPICC.¹⁰¹ Concernant l'influence de la substitution en position N6, il a été prouvé qu'en présence de fonctions urées ou sulfonamides, les cinétiques de réaction sont plus rapides qu'avec des fonctions amides ou carbamates (Tableau I. 1).



Entrée	R	k (M ⁻¹ .s ⁻¹)
1	H	< 0.001
2		0.004
3		0.018
4		0.032
5		0.061

Tableau I. 1. Influence des substituants en N6 sur la vitesse de réaction de SPICC

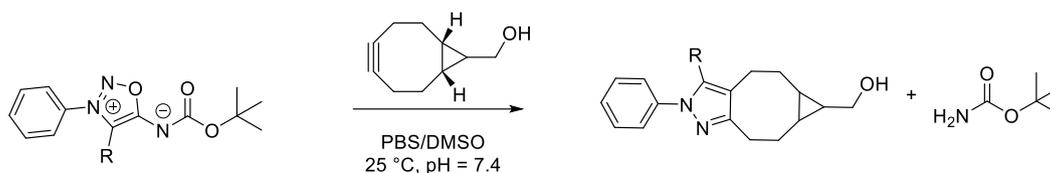
En revanche, concernant la substitution de l'azote N3, nous avons montré que l'ajout d'un substituant électroattracteur permettait d'augmenter les cinétiques (Tableau I. 2).



Entrée	R	k (M ⁻¹ .s ⁻¹)
1	H	0.047
2	OH	0.008
3	CO ₂ Et	0.179

Tableau I. 2. Influence des substituants en N3 sur la vitesse de réaction de SPICC

Enfin, il a été montré que l'introduction d'un atome de brome ou d'iode en position C4 permettait aussi d'améliorer la vitesse de réaction. La bromation est particulièrement intéressante et permet d'augmenter significativement la vitesse d'un facteur 25 (Tableau I. 3).



Entrée	R	K (M ⁻¹ .s ⁻¹)
1	H	0.018
2	I	0.111
3	Br	0.457

Tableau I. 3. Comparaison de la vitesse de réaction de SPICC en fonction des halogènes en C4

Plus récemment, en 2022, notre groupe a montré que la chloration d'iminosydnones obtenues grâce à l'utilisation d'hypochlorite de *tert*-butyle permet aussi d'augmenter les cinétiques de réaction avec des cycloalcynes.¹⁰² Pour résumer, afin d'augmenter les cinétiques de réaction de SPICC, il est préférable que l'iminosydnone utilisée porte une fonction urée ou sulfonamide en position N6, un groupement électroattracteur en position N3 et un halogène en position C4 (Figure I. 4).



Figure I. 4. Substituants de l'iminosydnone favorisant la cinétique de SPICC

Ces caractéristiques réactionnelles sont identiques à celles des sydnones (SPSAC) où les cinétiques augmentent en présence d'halogènes en position C4 et de groupements électroattracteurs en position N3.

¹⁰² M. Feng, L. Madegard, M. Riomet, M. Louis, P. A. Champagne, G. Pieters, D. Audisio, F. Taran, *Chem. Commun.*, **2022**, 58, 8500–8503.

II) Objectifs du chapitre

Comme explicité précédemment, la réaction de CuSAC présente quelques limitations telles que des difficultés de reproductibilité en fonction des lots de ligand employés, une cinétique réactionnelle plutôt lente et une charge catalytique importante. Ainsi, l'objectif des travaux menés dans ce chapitre consiste à développer de nouvelles conditions pour la réaction de CuSAC afin de la rendre plus efficace, notamment en améliorant son système catalytique. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés au développement d'un nouveau système Cuivre/Ligand capable de remplacer le couple CuSO₄/BPDS tout en travaillant sur différents paramètres comme la charge catalytique, le solvant et la température. En parallèle, nous avons également tenté d'étendre la réaction de CuSAC aux iminosydrones. En effet, cette réaction n'a encore jamais été décrite et serait d'un grand intérêt notamment pour le développement de nouveaux linkers clivables. Ceci permettrait d'ajouter une nouvelle réaction à l'ensemble des outils de chimie click que nous appellerons CuISAC (Copper-catalysed IminoSydnone Alkyne Cycloaddition) dans le reste du manuscrit. Pour cette étude, nous nous sommes appuyés sur la technique HTE (pour High Throughput Experimentation). Cette technique, permet l'évaluation d'un nombre important de conditions réactionnelles en une seule expérience et représente une méthode de choix pour le criblage de paramètres réactionnels d'une réaction (Schéma I. 22).

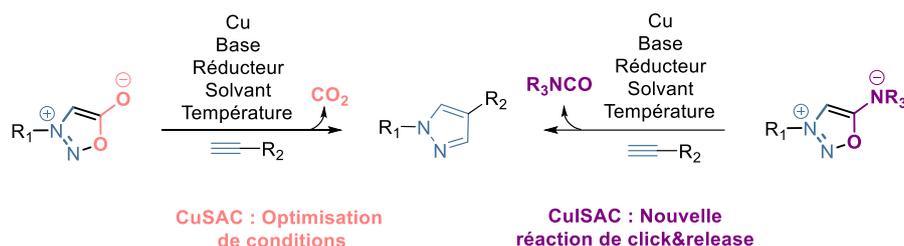


Schéma I. 22. Réactions de CuSAC et CuISAC, étudiées dans ce chapitre

III) High Throughput Experimentation

L'HTE (High Throughput Experimentation) ou expérimentation à haut débit est une technique développée dans les années 1990 et grandement inspirée de l'HTS (High Throughput Screening). La technologie HTS, constitue, depuis les trente dernières années, une méthode standard dans le processus de recherche au sein de l'industrie pharmaceutique permettant l'identification de nouvelles substances biologiquement actives. En effet, l'HTS permet la mise en réaction simultanée et en parallèle d'une librairie de composés avec une cible thérapeutique et l'identification rapide des composés possédant une activité sur cette cible d'intérêt. L'HTE est utilisée par les chimistes dans le but de réaliser un grand nombre d'expériences dans un temps plus court par rapport à une approche plus traditionnelle effectuée en ballon. Au cours des vingt dernières années, la technologie HTE a été

largement employée par les industriels pour accélérer les processus d'optimisation.¹⁰³ Ainsi, certains grands laboratoires pharmaceutiques disposent de leur laboratoire HTE automatisé. Cette technique est encore peu utilisée dans le monde de la recherche académique de par le prix élevé des consommables et du matériel utilisé. Le principe de l'HTE repose sur la miniaturisation, la parallélisation et parfois l'automatisation des réactions afin d'effectuer un maximum d'expériences en un minimum de temps et avec un minimum de matière première. Ce type de criblage permet d'étudier de manière plus approfondie les réactions qu'avec l'approche traditionnelle puisqu'il est possible de tester un très grand nombre de combinaisons. Les réactions sont réalisées dans des plaques contenant des mini-réacteurs. Avec l'avancée des techniques de pesée et de pipetage, les réacteurs sont devenus de plus en plus petits permettant une augmentation considérable du nombre de conditions criblées. Ainsi, au début des années 1990, les plaques possédaient 96 mini-réacteurs pouvant contenir 100 μL de milieu réactionnel tandis que dans les années 2000, les plaques possédaient 1536 mini-réacteurs pouvant contenir 10 μL de milieu réactionnel.¹⁰⁴ Bien sûr, plus les réacteurs sont petits, plus il est nécessaire d'automatiser le processus. Par ailleurs, la miniaturisation permet d'utiliser beaucoup moins de réactif de départ par réaction puisque des micromoles de réactifs sont engagées dans chaque puit de réaction (des nanomoles dans le cas de plaques 1536 puits). Notre laboratoire a la chance de détenir une plateforme HTE, mais les protocoles ne sont pas automatisés. C'est pourquoi dans notre étude nous n'utiliserons que des plaques 96 puits (Figure I. 5). Les plaques 96 puits utilisées sont robustes et capables de s'adapter à une grande variété de conditions réactionnelles telles qu'une élévation considérable de la température de réaction (jusqu'à la température de reflux des solvants). De plus, les plaques 96 puits peuvent être scellées afin de limiter le phénomène d'évaporation du solvant ou encore d'éviter les contaminations croisées en isolant chacun des mini-réacteurs. Il est aussi possible d'effectuer des réactions sous atmosphère inerte en boîte à gants ou sous flux de réactif gazeux. Enfin, des réactions photo-catalysées peuvent aussi être étudiées en irradiant chaque puit par une LED (Figure I. 6). Un barreau aimanté est ajouté dans chaque puit et les plaques sont ensuite placées sur un banc d'agitation magnétique permettant une agitation homogène sur l'entièreté de la plaque (Figure I. 7).

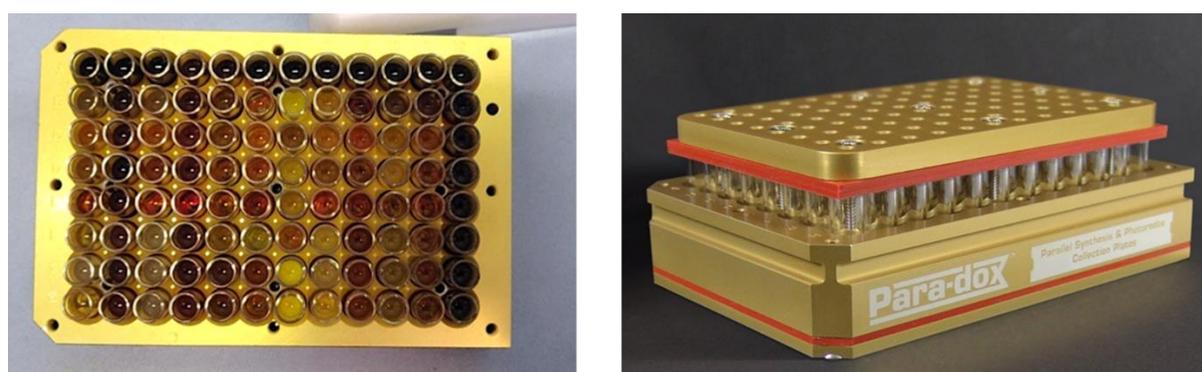


Figure I. 5. Plaque 96 puits ouverte (à gauche) et fermée (à droite)

¹⁰³ M. Shevlin, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2017**, *8*, 601–607.

¹⁰⁴ L. M. Mayr, D. Bojanic, *Curr Opin Pharmacol*, **2009**, *9*, 580–588.

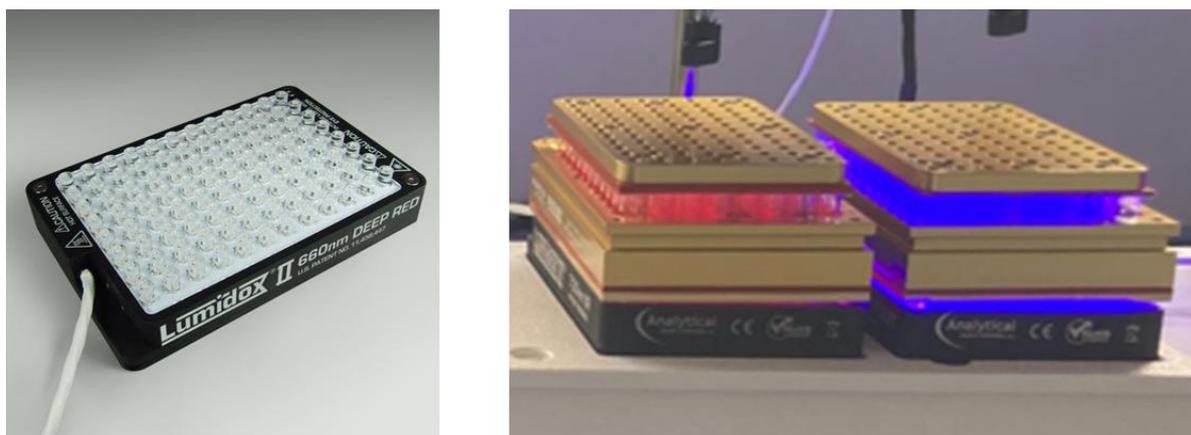


Figure I. 6. Plaque LED (gauche); Plaques 96-puits irradiées (droite)

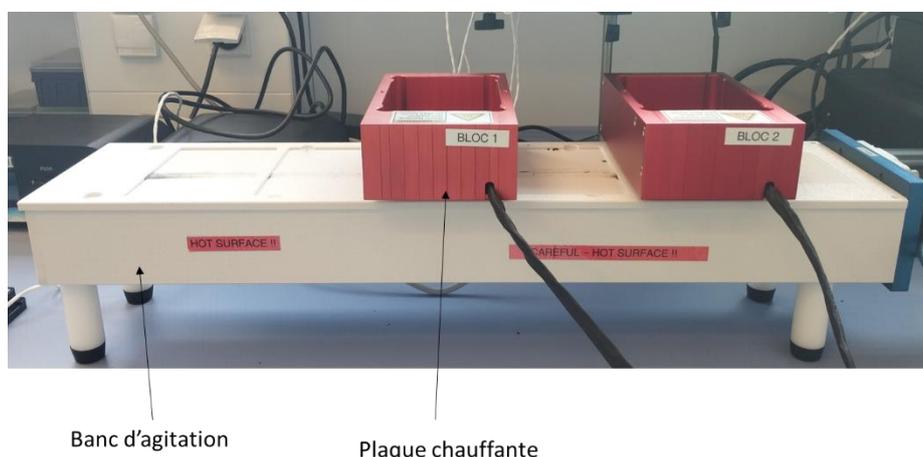


Figure I. 7. Banc d'agitation magnétique et plaque chauffante

Par définition, une expérience conduite par HTE va permettre l'exploration d'un grand nombre de variables et donc de données récoltées, c'est pourquoi la conception de la plaque HTE est l'étape clé d'une expérience réussie.¹⁰⁵ En effet, certaines règles et contraintes doivent être prises en compte pendant l'élaboration de la plaque et avant lancement de la réaction. Par exemple, les faibles quantités de matière engagées dans chaque puits nécessitent la formulation préalable de solutions mères des différents réactifs à utiliser à des concentrations connues. Ces solutions mères pourront ensuite être distribuées dans chaque puits à l'aide de pipettes multicanaux (Figure I. 8) afin d'obtenir la quantité de réactif exacte pour chacune des conditions testées. A ce stade il est important de tenir compte de l'ordre d'ajout des réactifs. En effet, certains réactifs volatils ou initiant la réaction doivent être ajoutés en derniers. La plaque HTE est préparée en ajoutant un à un les réactifs dans un solvant volatil (dichlorométhane, méthanol, ...) à l'aide de pipettes multicanaux. Entre chaque ajout, le solvant de la

¹⁰⁵ X. Caldenty, E. Romero, *Chem. Methods*, **2023**, *3*, e20220005

solution mère est évaporé à l'aide d'un appareil envoyant un flux d'air comprimé dans chaque puit (EquaVAP) (Figure I. 8)



Figure I. 8. Pipettes 12 et 8 multicanaux (gauche) ; Evaporateur 96 puits, EquaVAP (droite).

Enfin, le solvant de réaction est ajouté et la plaque est scellée à l'aide d'une plaque métallique, empêchant toute évaporation de solvant ou de réactif, puis placée sur le banc d'agitation magnétique. A la fin de la réaction, un étalon interne absorbant dans le domaine UV-Visible est ajouté afin de déterminer quelles conditions ont permis d'obtenir les meilleurs résultats. Pour cela, l'étalon interne est choisi, entre autre, en fonction de sa polarité, il doit par ailleurs être totalement inerte vis-à-vis du milieu réactionnel. Il est à noter que, dans le cas où le milieu réactionnel est hétérogène, les plaques HTE sont centrifugées et seul le surnageant est analysé. L'analyse quantitative de la plaque peut se faire de différentes façons. Dans la plupart des cas la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse avec une détection UV (LCMS ou HPLC) est utilisée, sous réserve de travailler avec des réactifs et produits visibles en détection UV. Dans une moindre mesure, la chromatographie en phase supercritique (SFC) et la chromatographie en phase gazeuse (GC) sont aussi utilisés. Il est possible de calculer un taux de conversion en utilisant la formule suivante (avec A = aire sous pic) :

$$\text{Conversion} = \frac{\frac{A_{\text{produit}}}{A_{\text{étalon}}}}{\frac{A_{\text{produit}}}{A_{\text{étalon}}} + \frac{A_{\text{réactif}}}{A_{\text{étalon}}}}$$

Par ailleurs, dans le cas où le produit de la réaction est le même sur toute la plaque, il est possible de calculer un ratio permettant de classer les meilleures conditions :

$$\text{Ratio} = \frac{A_{\text{produit}}}{A_{\text{étalon}}}$$

Le recours à ce ratio pour la comparaison des conditions criblées n'est possible que si le produit de la

réaction est le même dans tous les puits. En effet, l'absorbance du produit observée étant liée à la structure du produit désiré, l'emploi de ce ratio ne permettrait qu'une analyse qualitative des résultats obtenus dans le cas de deux produits structurellement différents.

Pour conclure, l'approche HTE permet, dans le cadre d'une optimisation de réaction, de cribler un très grand nombre de conditions et de variables plus simplement que l'approche traditionnelle. Cet outil nous a semblé parfaitement adapté à notre objectif qui est d'optimiser la réaction CuSAC et de l'étendre à d'autres composés mésoioniques compte tenu du nombre de variables possibles pouvant avoir un impact sur cette réaction.

IV) Tests de criblage

IV.1) Premiers tests de criblage

Dans un premier temps, nous avons exploré l'influence du solvant et de la source de cuivre sur la formation de pyrazoles par la réaction de CuSAC. Le criblage de différentes sources de cuivre à l'état d'oxydation (I) et (II) a été réalisé en présence d'un agent réducteur, l'ascorbate de sodium. Pour cela, nous avons imaginé un design de plaque permettant de cribler 9 sources de cuivre et 8 solvants repartis en 3 familles : aqueux, organo/aqueux et organique. Pour ce premier criblage, la réaction entre la phényl-sydnone avec le 4-phényl-1-butyne à 100 mM en présence de 20 mol% de cuivre et 40 mol% de bathophénantroline disulfonate (BPDS) a été sélectionnée comme modèle. Cette combinaison permet de n'obtenir qu'un seul pyrazole sur toute la plaque et donc de faire une analyse semi-quantitative des résultats. D'un point de vue pratique, les solutions mères de chaque réactif ont été préparées dans le dichlorométhane et après ajout de la quantité de réactif nécessaire dans chaque puits de la plaque à l'aide de pipettes multicanaux, le dichlorométhane a été évaporé sous flux d'air comprimé. Cette étape a été répétée pour chaque réactif puis la réaction a été agitée pendant 16 heures. Enfin le triméthoxybenzène un étalon interne couramment utilisé et choisi parce qu'il évite le recouvrement des réactifs et produits en LCMS, a été ajouté dans chacun des puits.

Un simple ratio $\frac{A_{pyrazole}}{A_{étalon}}$ permet dans un premier temps de classer les résultats par ordre d'efficacité croissante sans pour autant permettre de déterminer les rendements associés aux différentes conditions testées (Tableau I. 4). Les premiers résultats obtenus par le calcul de ce ratio ont montré que la réaction était totalement inefficace avec le $\text{CuBr}(\text{PPh}_3)_3$, pourtant utilisé comme catalyseur dans des réactions de CuAAC.¹⁰⁶ Par ailleurs, la réaction semble être peu efficace dans un

¹⁰⁶ S. Lal, S. Díez-González, *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 2367–2373.

milieu 100% aqueux (Tableau I. 4) probablement en raison de la faible solubilité aqueuse des substrats. Les dix meilleures combinaisons (hits) sont colorées en vert foncé sur le Tableau I. 4 où les valeurs représentent le ratio $\frac{\text{Apyrazole}}{\text{Aétalon}}$.

Tableau I. 4. Criblage des sources de cuivres et solvants de réaction, duplicata 1. [Phényl-sydnone] = [4-phényl-1-butyne] = [triéthylamine] = 100 mM, [Cuivre] = 20 mM, [BPDS] = 40 mM, [Ascorbate de sodium] = 200 mM, 37 °C, 16 heures. Les données représentent le ratio des aires sous pic Apyrazole/Aétalon.

	H ₂ O	H ₂ O/tBuOH	H ₂ O/MeCN	MeOH	DMF	DMSO	DMSO/H ₂ O	MeCN
Cu(acac) ₂	0,25	1,99	1,64	2,77	0,19	0,79	0,72	0,25
CuTC	0,07	2,32	1,76	3,00	1,38	0,76	1,35	0
Cu(OTf) ₂	0,17	1,93	1,60	1,91	1,66	0,41	2,81	0,53
Cu(OAc) ₂	0,17	2,04	1,8	4,10	1,74	1,39	2,07	0
CuSO ₄	0,09	1,59	6,80	0	0	0	2,26	0
Cu(MeCN) ₄ PF ₆	0,22	1,37	1,70	2,62	1,03	0,83	0,82	0,10
CuCl ₂	0,25	0,62	1,61	2,92	0	0	0,15	0
Cu(OH) ₂	0,27	2,58	1,61	0	0	0	0,00	0,31
CuBr(PPh ₃) ₃	0	0	0	0	0	0	0	0

Dans le but de confirmer la tendance observée durant cette première expérimentation HTE, l'expérience a été reconduite une deuxième fois en conservant les mêmes conditions réactionnelles (

Tableau I. 5) :

Tableau I. 5. Criblage des cuivres et solvants, duplicata 2. [Phényl-sydnone] = [4-phényl-1-butyne] = [triéthylamine] = 100 mM, [Cuivre] = 20 mM, [BPDS] = 40 mM, [Ascorbate de sodium] = 200 mM, 37 °C, 16 heures. Les données représentent le ratio des aires sous pic Apyrazole/Aétalon.

	H ₂ O	H ₂ O/tBuOH	H ₂ O/MeCN	MeOH	DMF	DMSO	DMSO/H ₂ O	MeCN
Cu(acac) ₂	5,65	4,31	5,28	6,83	5,84	4,19	1,42	0
CuTC	0	0	0	0	0	0	0	0
Cu(OTf) ₂	8,32	5,57	0	0	4,28	2,79	2,07	0
Cu(OAc) ₂	0	4,12	5,67	4,05	0	2,70	1,24	0
CuSO ₄	1,79	0	5,44	4,16	0	0	1,00	0
Cu(MeCN) ₄ PF ₆	4,97	5,95	6,80	4,49	0	0	1,55	0
CuCl ₂	0	0	6,47	3,84	0	0	1,68	0
Cu(OH) ₂	3,21	4,35	7,99	0	0	0	0	0
CuBr(PPh ₃) ₃	0	0	0	0	0	0	0	0

Comme observé, les résultats diffèrent énormément entre les deux plaques. Cette première expérience montre clairement que la méthode de mise en plaque n'est pas adaptée aux conditions de la réaction CuSAC. En effet, lors de l'évaporation du dichlorométhane entre chaque ajout successif, des résidus de réactifs sur les parois des piluliers HTE ont été observés. Lors de l'ajout des solvants, les réactifs ne se redissolvent pas entièrement et entraînent des problèmes d'homogénéité, et de reproductibilité. Dans ce contexte, nous avons décidé de mettre au point une nouvelle méthode de mise en plaque permettant de s'affranchir des problèmes de solubilité des composés. Dans la suite de ce manuscrit, les solutions mères des composés hydrosolubles seront désormais préparées dans l'eau et les solutions mères des composés organosolubles seront préparées dans le DMSO. Ces deux solvants utilisés pour les solutions mères, seront aussi les solvants finaux de la réaction permettant une solubilisation complète de toutes les espèces. Les solvants seront criblés ultérieurement et nous nous concentrerons dans un premier temps sur le criblage des ligands. De plus, afin de s'affranchir de tout phénomène de précipitation, la concentration en composé mésoionique est diminuée à 25 mM pour la suite des expériences

IV.2) Nouvelle technique d'analyse des plaques HTE

Suite aux problèmes de méthodologie et de reproductibilité, nous avons décidé de modifier la méthode de mise en plaque mais aussi de changer notre méthode d'analyse et d'utiliser la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) pour analyser les plaques HTE. En effet, cette technique nous permet de nous affranchir de l'utilisation de l'absorbance des molécules, tels que les ligands du cuivre, et donc des recouvrements de pics possibles en LCMS.

Dans ce contexte, nous avons cherché à rendre cette méthode quantifiable afin d'obtenir des rendements plus précis et non des ratios d'air sous pic. En HRMS, pour comparer la quantité d'un produit avec un étalon interne, il est nécessaire que ce dernier ait la même force d'ionisation que le produit étudié. Ainsi, nous avons conçu la première plaque HTE de telle façon que le pyrazole formé soit le même dans chaque puit. Ainsi, de la même façon que pour le criblage précédent, les réactions ont été lancées avec un seul partenaire alcyne : le 4-phényl-1-butyne afin de former uniquement le pyrazole correspondant (Schéma I. 23). Il a donc été possible d'utiliser un seul et même composé comme étalon interne : le pyrazole final deutéré. En effet, les deux isotopologues de pyrazole (protoné et deutéré) ont la même force d'ionisation puisqu'ils ont la même structure, mais leur masse diffère d'un écart de $M = 5$. Cet écart de masse les rend distinguables sur le spectre de masse de la réaction.

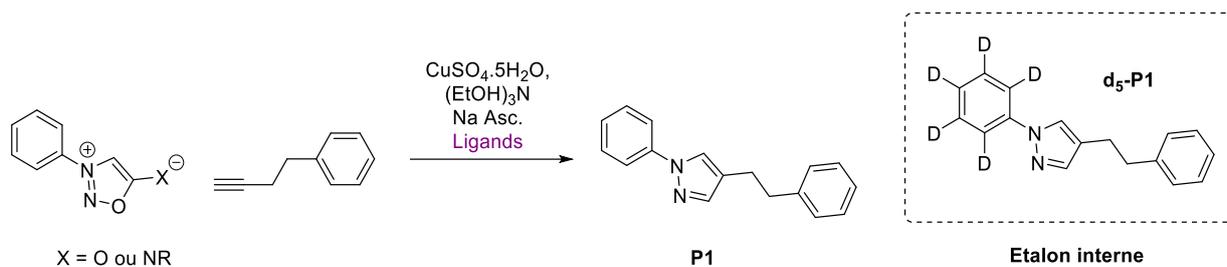


Schéma I. 23. Schéma général de la réaction de criblage des ligands du cuivre

Cet étalon interne a été préparé à partir de l'aniline deutérée commerciale. Celle-ci a réagi avec le chloroacétate d'éthyle en présence d'acétate de sodium dans l'éthanol pour obtenir le composé **I-1** avec un rendement satisfaisant de 68%. Une saponification de **I-1** suivie d'une nitrosylation en présence de *tert*-butylnitrite a permis d'obtenir la sydone deutérée **I-2** après cyclisation avec de l'anhydride acétique et avec un rendement correct de 39% sur 3 étapes. Enfin, une réaction de cycloaddition a été effectuée en présence de 40%mol de sulfate de cuivre et 80%mol de bathophénantroline disulfonique acide pour former le pyrazole deutéré **d₅-P1** avec un rendement correct de 54%. Par la suite, ce pyrazole sera alors utilisé en tant qu'étalon interne pour l'analyse quantitative des réactions de la plaque HTE par HRMS (Schéma I. 24).

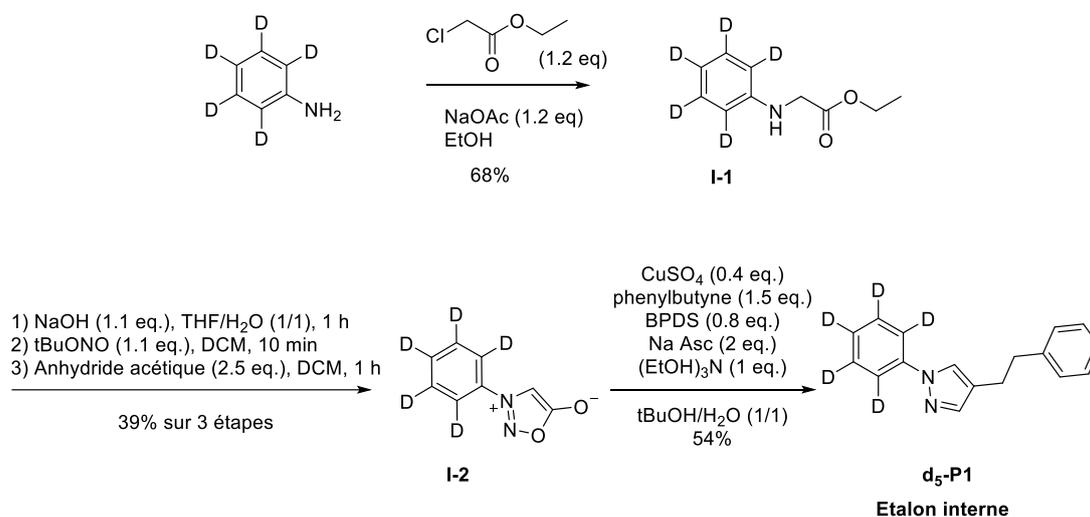


Schéma I. 24. Synthèse de l'étalon interne deutéré

Une fois cet étalon interne obtenu nous avons réalisé une courbe d'étalonnage afin de convertir les aires sous pic des produits en rendements. Pour cela, le pyrazole non-deuté **P1** a été préparé en présence de CuSO₄ et de BPDS avec un rendement de 49%. Des solutions de **P1** dans les solvants finaux (DMSO/H₂O) ont été préparées sur plaque 96-puits à des concentrations de 25 mM (rendement = 100%), 12.5 mM (50%), 6.25 mM (25%), 2.5 mM (10%), 1.25 mM (5%) et 0.25 mM (1%). L'étalon interne deutéré a ensuite ajouté dans chacun des puits à une concentration de 25 μM afin d'obtenir des ratios

d'aire sous pic permettant la construction d'une courbe de calibration (Figure I. 9). Par ailleurs, des contrôles ont été effectués et ont montré que le coefficient de variation est inférieur à 10% ce qui montre la robustesse de la méthode d'analyse. Enfin, cette expérience a été réalisée quatre fois de manière indépendante afin de valider la reproductibilité de la méthode.

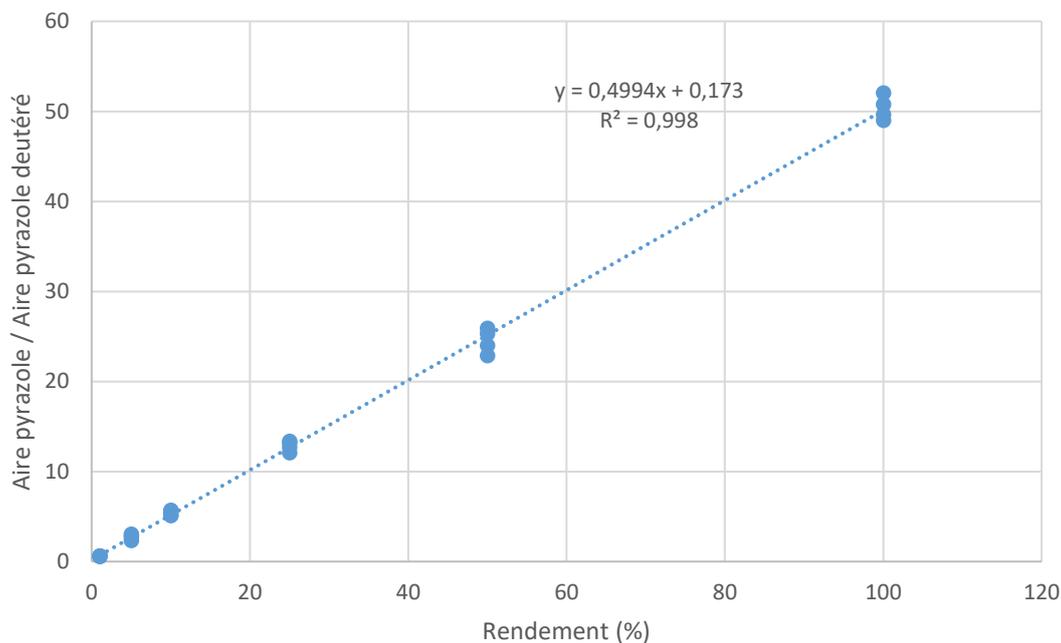


Figure I. 9. Courbe de calibration avec étalon interne deutéré

Une fois la méthode d'analyse mise en place et la reproductibilité confirmée, nous avons pu réaliser le premier criblage pour tenter de trouver un nouveau ligand pour la réaction de CuSAC et pour la réaction de cycloaddition avec les iminosydrones (CuISAC).

IV.3) Criblage des ligands du cuivre

IV.3.1) Synthèse des ligands du cuivre

Afin de trouver de nouveaux ligands capables de former des complexes de cuivre actifs dans la réaction de CuSAC, nous nous sommes intéressés à la distance séparant les deux atomes d'azote des ligands bidentates. Les phénantrolines, déjà utilisées pour la CuSAC en 2013²³ et connues pour chélater des métaux tels que le cuivre,¹⁰⁷ ont une distance de 2.71 Å entre les deux atomes d'azotes chélatant le

¹⁰⁷ M. T. Miller, P. K. Gantzel, T. B. Karpishin, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 2285–2290.

cuivre. Deux ligands peuvent alors être complexés au cuivre pour former un complexe CuL_2 très probablement inactif vis-à-vis de la réaction CuSAC (Figure I. 10). Afin de pallier cette limitation de la réactivité du cuivre, il nous est apparu judicieux de modifier la distance entre les deux atomes d'azote coordinants des ligands afin de modifier les angles de liaison du cuivre et de freiner la formation d'un complexe CuL_2 inactif. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à des ligands biimidazoles et bibenzimidazoles possédant 2 atomes d'azote coordinants plus écartés que dans le cas les phénantrolines afin de modifier les angles de liaison du cuivre et de limiter la formation d'un complexe CuL_2 .

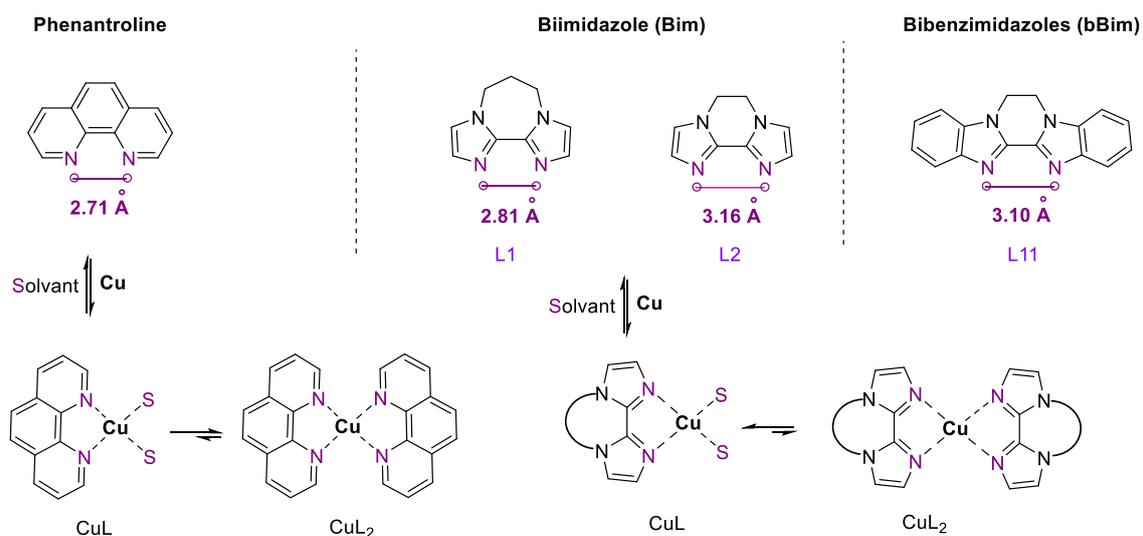


Figure I. 10. Distance entre les deux atomes d'azote selon les familles de ligands

Ainsi, une librairie de ligands a été synthétisée issus de différentes familles de ligands : phénantrolines, biimidazoles et les bibenzimidazoles. Par ailleurs, des bipyridines et ligands de CuAAC commerciaux ont été ajoutés pour compléter la librairie (Figure I. 11).

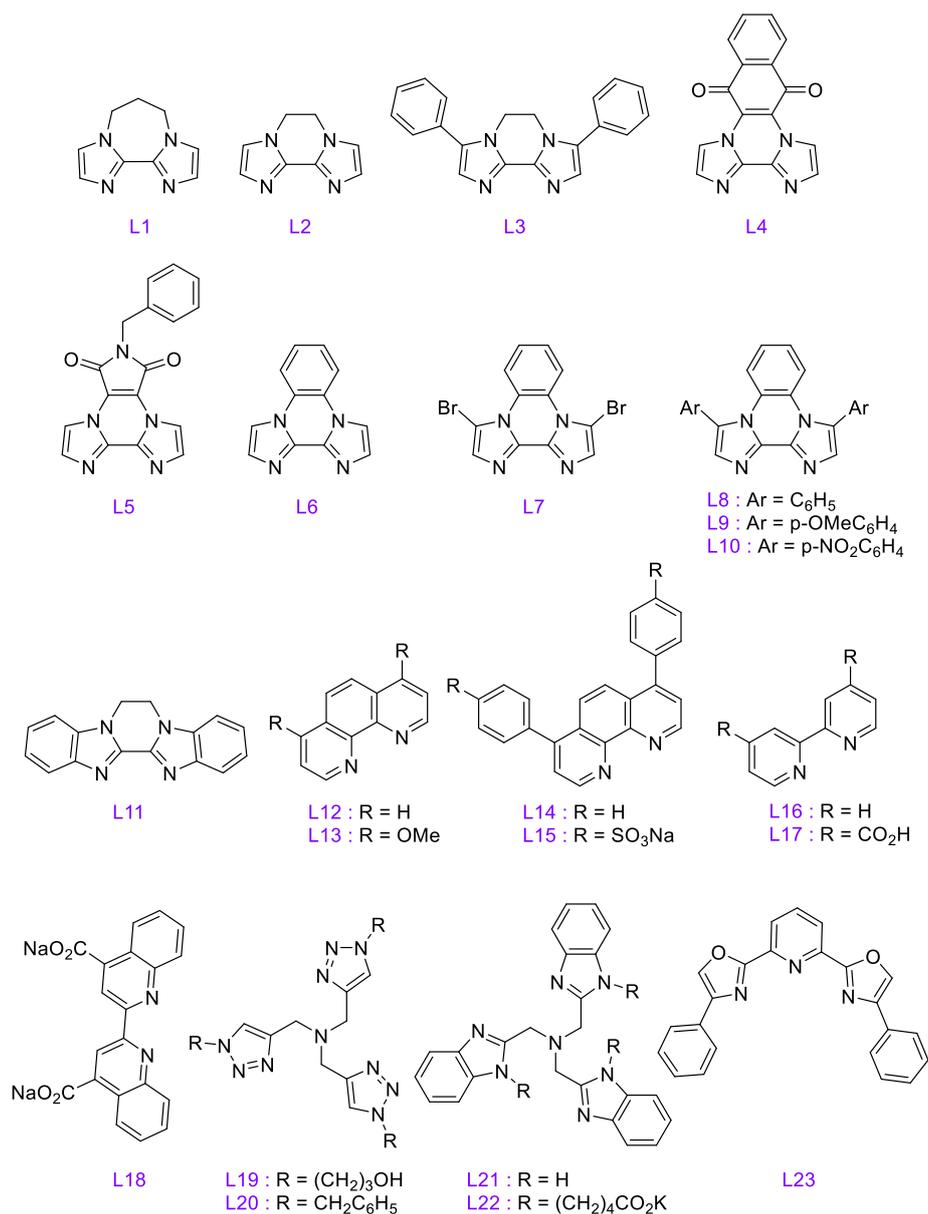


Figure I. 11. Ligands utilisés pour le criblage

Les ligands **L1** à **L10** font partie de la famille des biimidazoles (Bim) pontés et présentent une distance entre les deux atomes d'azote de 2.81 Å pour les ponts à 3 carbones et 3.16 Å pour les ponts à 2 carbones. Ces 10 ligands ont été synthétisés avec l'aide du Dr Guillaume Force à partir du 2,2'-Biimidazole commercial. Des substitutions nucléophiles sur des composés bromés ont permis d'obtenir les ligands **L1**, **L2**, **L4**, et **L5** avec des rendements corrects entre 28% et 75%. Notamment, le ligand **L2** a été synthétisé avec un rendement de 75% sans étape de purification. Le composé **L3** a été obtenu grâce à une réaction de C-H activation à partir du composé **L2** avec un rendement correct de 45% (Schéma I. 25).

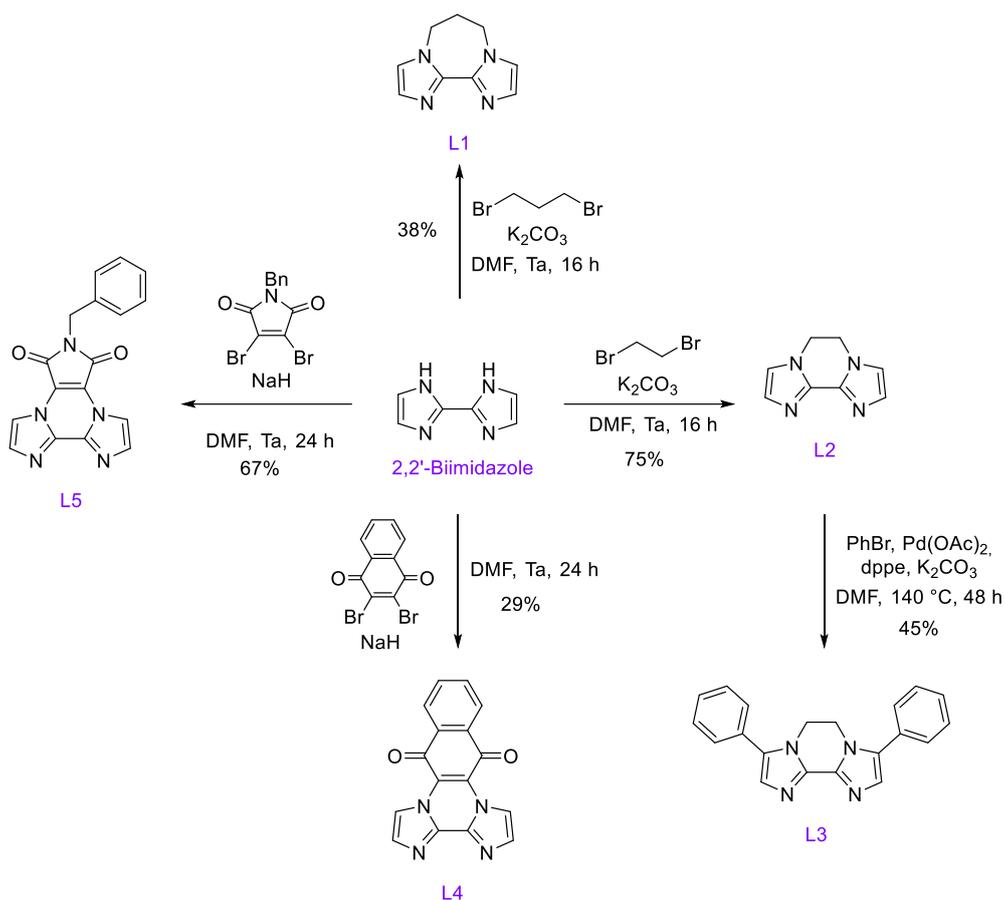


Schéma I. 25. Schéma de synthèse des ligands L1 à L5

Par ailleurs le composé **L6** a été synthétisé à partir d'un intermédiaire **LS1** obtenu par réaction entre le 1,2-dibromobenzène et 2 équivalents d'imidazole en présence de K_2CO_3 et de Cu_2O . Une réaction de couplage intramolécule du composé **LS1** suite à un traitement au *n*-BuLi en présence de palladium tetrakis a permis d'obtenir le composé **L6** avec un rendement de 69% sur les deux étapes.⁹⁰ A partir de **L6**, le ligand **L7** a été synthétisé avec un rendement de 98% *via* une réaction de bromation avec NBS et les ligands **L8**, **L9** et **L10** ont été synthétisés par réaction de C-H activation avec différents dérivés bromés. Ces ligands ont été obtenus avec des rendements respectifs de 84%, 40% et 59% (Schéma I. 26).

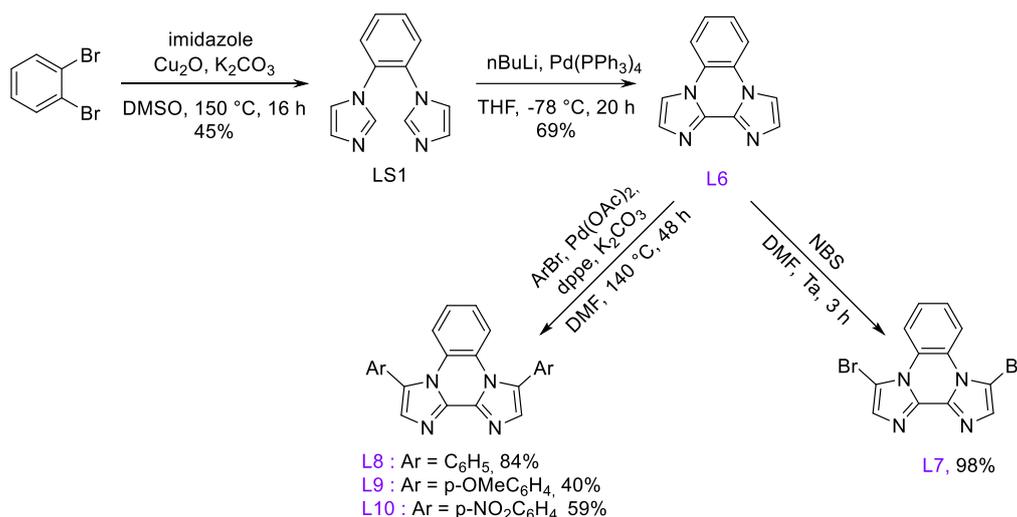


Schéma I. 26. Schéma de synthèse des ligands L6 à L10

Le ligand **L11** fait partie de la famille des Bibenzimidazoles et possède une distance entre les deux azotes de 3.10 Å. Ce ligand a été synthétisé à partir du *o*-phenylenediamine par réaction avec le méthyl 2,2,2-trichloroacétimide dans le méthanol avec un rendement de 85%.¹⁰⁸ La seconde étape consiste en une réaction de substitution nucléophile avec du 1-bromo-2-chloroéthane (Schéma I. 27).

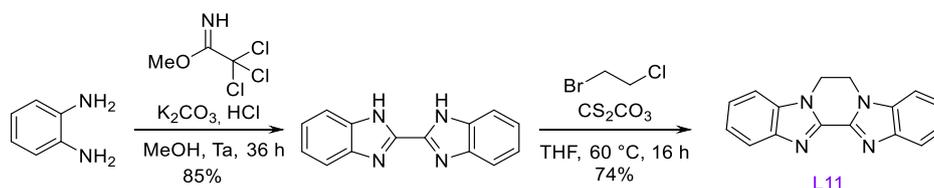


Schéma I. 27. Schéma de synthèse du ligand L11

Les ligands **L12** et **L13** sont des phénantrolines commerciales, décrite dans la littérature pour chélater le cuivre.¹⁰⁹ Les ligands **L14** et **L15** sont des bathophénantrolines, structurellement proches des phénantrolines, qui ont préalablement démontré leur réactivité dans la réaction de CuSAC. Les ligands **L16** à **L18** sont des bipyridines, dont la rotation est possible. Les ligands **L19** à **L22** sont des ligands connus pour chélater le cuivre dans les réactions de CuAAC. Les ligands **L19** et **L20**, aussi appelés respectivement THPTA et TBTA, ont des motifs tris-triazoles et sont des ligands commerciaux parmi les plus actifs pour la réaction de CuAAC. En ce qui concerne les ligands **L21** et **L22**, ce sont des tris-benzimidazoles commerciaux également connus pour former des complexes de cuivre efficace pour la réaction CuAAC. Enfin, le ligand **L23** est un composé Pybox commercial bien connu pour former des

¹⁰⁸ J. Yin, R. L. Elsenbaumer, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9436–9446.

¹⁰⁹ S. Masuri, P. Vaňhara, M. G. Cabiddu, L. Moráň, J. Havel, E. Cadoni, T. Pivetta, *Molecules* **2021**, *27*, 49.

complexes de cuivre actif dans diverses réactions notamment dans des réactions d'arylation énantiosélectives.¹¹⁰

Suite à ces préparations de ligands nous avons donc étudié l'efficacité des complexes ligands/cuivre sur différents composés mésoioniques. Pour ce faire, la phényl-sydnone ainsi que six iminosydnones substituées en position N6 ont été synthétisées.

IV.3.2) Synthèse des composés mésoioniques

La phényl-sydnone et les différentes iminosydnones ont été synthétisées selon les voies de synthèse décrites dans l'introduction de ce chapitre. Ainsi, la phényl-sydnone a été synthétisée à partir de la *N*-phénylglycine par une réaction de nitrosylation avec le *tert*-butylnitrite puis par cyclisation en présence d'anhydride acétique avec un rendement de 60% sur 3 grammes. Les iminosydnones -urée, -sulfonamide, -amide et -carbamate ont été synthétisées à partir de la phényl-iminosydnone par des réactions de couplages avec des rendements satisfaisants allant de 35% à 68% (Schéma I. 28A).

¹¹⁰ R. Beaud, R. J. Phipps, M. J. Gaunt, *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, *138*, 13183–13186.

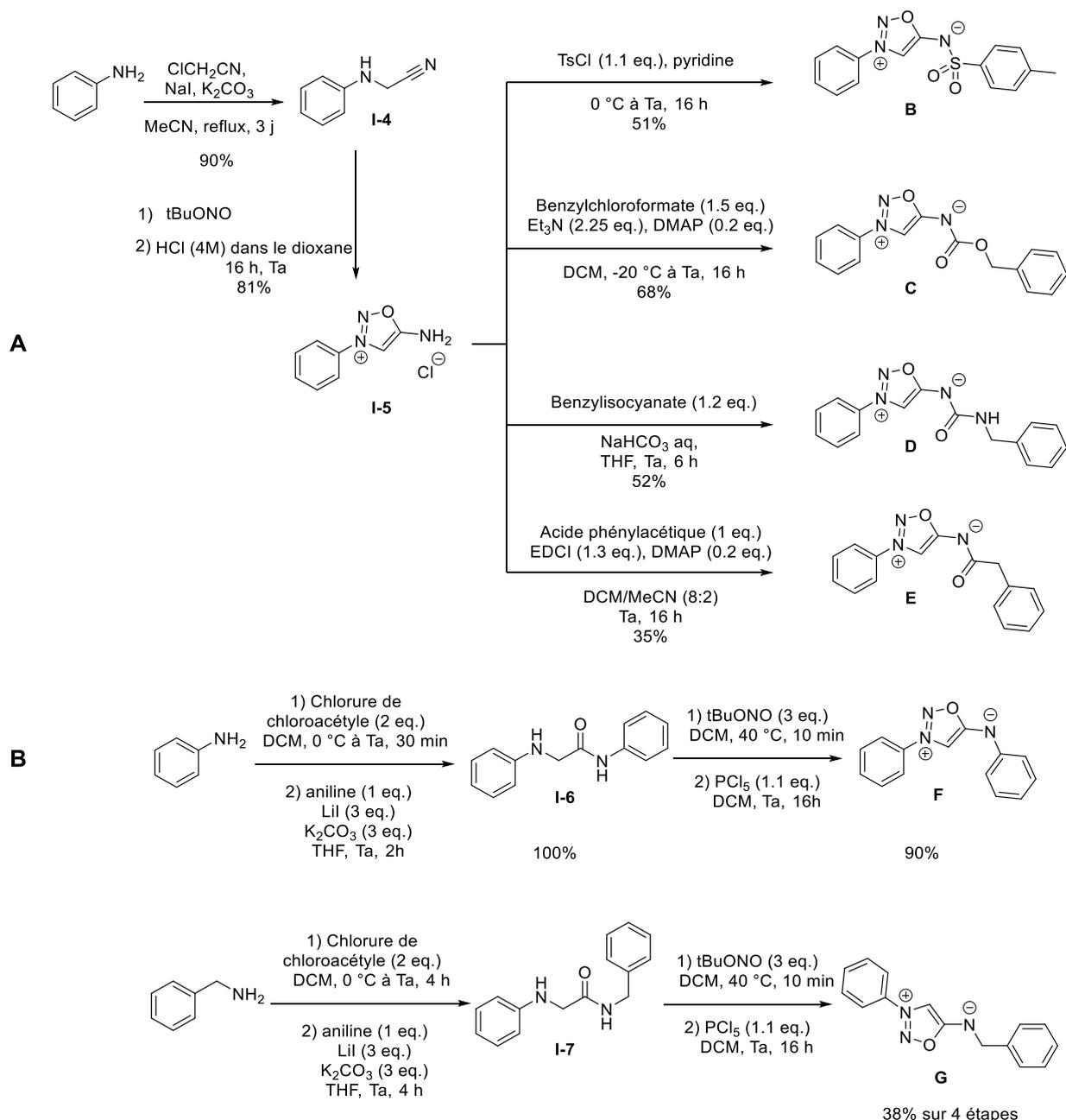


Schéma I. 28. Synthèse des iminosydnones

Par ailleurs, les iminosydnones -phényle et -benzyle ont été synthétisées selon les voies de synthèse décrites respectivement dans les Schéma I. 17 et Schéma I. 18.B avec des rendements globaux de 90% et 38 %.

IV.3.3) Mise en plaque

Une première expérience HTE a été réalisée de façon à ce que chaque composé mésoionique soit testé avec chacun des ligands. Ainsi, les composés mésoioniques ont été placés verticalement et les ligands ont été placés horizontalement sur la plaque 96 puits (Schéma I. 29). Le cuivre et l'ascorbate de sodium

ont été solubilisés dans l'eau et les autres réactifs solubilisés dans le DMSO à des concentrations adéquates. Chaque réactif a été pipeté un à un dans les puits en terminant par l'ascorbate de sodium qui initie la réaction en réduisant le cuivre(II) en cuivre(I). Les concentrations finales en réactifs ont été fixées à :

- [Mésoionique] = [4-phenyl-1-butyne] = [Triéthanolamine] = 25 mM;
- [CuSO₄] = 5 mM (0.2 équivalent),
- [Ligand] = 10 mM (0.4 équivalent),
- [Na. Asc.] = 50 mM (2.0 équivalents),
- Solvant = H₂O : DMSO (1 : 1) = 100 µL.

Par la suite, la plaque a été scellée et placée sur le banc d'agitation à 37°C. Cette température, qui correspond à une température cible pour une potentielle exploitation en milieux biologique, nous permet aussi de maintenir la réaction à une température indépendante des potentielles variations de température de la pièce où sont lancées les plaques HTE.

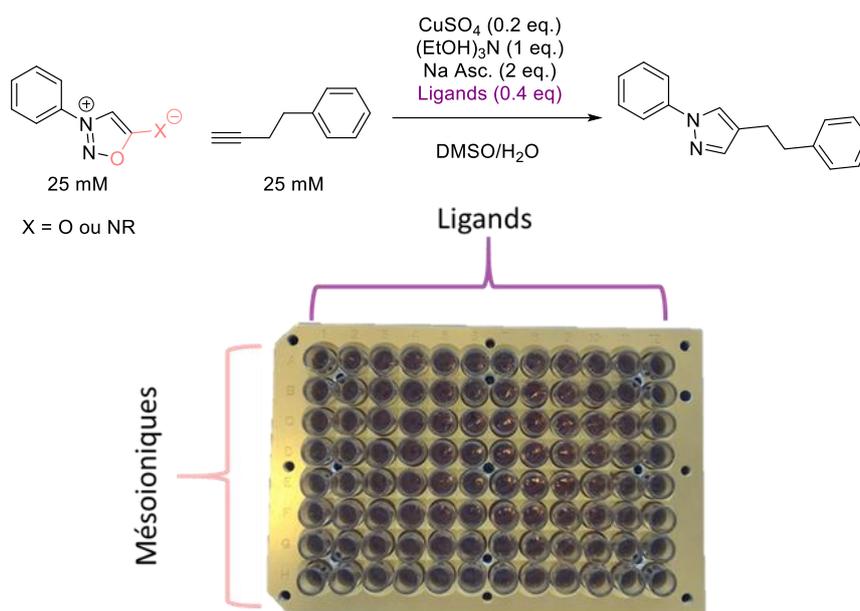


Schéma I. 29. Schéma de réaction de la plaque HTE et design de la plaque

Après 16 heures, les réactions sont arrêtées, l'étalon interne deutéré est ajouté et des étapes de dilution permettent d'obtenir des concentrations adéquates (25 µM) pour une analyse HRMS. Ces plaques ont été répétées deux fois afin de vérifier la répétabilité de notre nouvelle méthode.

IV.3.4) Résultats

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau ci-dessous (Figure I. 12) où chaque rendement

correspond à la moyenne des rendements des duplicatas. On peut observer la formation du pyrazole désiré pour certaines combinaisons mésoionique/ligand. Il est à noter que pour la phényl-sydnone (Ligne A) trois ligands montrent la formation du pyrazole de manière plus significative : **L2**, **L3** et **L9**. Ce sont tous les trois des biimidazoles qui donnent des rendements HTE de 47%, 19% et 15% respectivement. Concernant les iminosydnones, les composés **B**, **D** et **E** n'ont pas montré de résultats concluants et semblent relativement inactifs. Seules les 6N-phenyl et 6N-benzyl-iminosydnones **F** et **G** ont montré une réactivité avec plusieurs ligands. Notamment, l'iminosydnone **G** a permis la formation de pyrazole avec des rendements modérés jusqu'à 30% avec les ligands **Bim**, **bBim** et les **tris-triazoles**. L'iminosydnone **F** montre, elle, les meilleurs résultats avec des rendements calculés entre 28% et 58% pour les ligands **Bim**, 39% pour la bathophénantroline et 39% pour les **tris-triazoles L19** et **L20**. Étonnamment, cette iminosydnone fonctionne même sans ajout de ligand (Ligne F; 1^{ère} Colonne). Cela pourrait s'expliquer par la possible chélation du cuivre par l'iminosydnone elle-même au niveau de l'amine exocyclique. Dans la suite du chapitre, nous nous concentrerons donc sur ce mésoionique et les ligands qui ont permis d'obtenir les meilleurs résultats : **L1**, **L2**, **L3**, **L4**, **L8**, **L14** et **L19**.

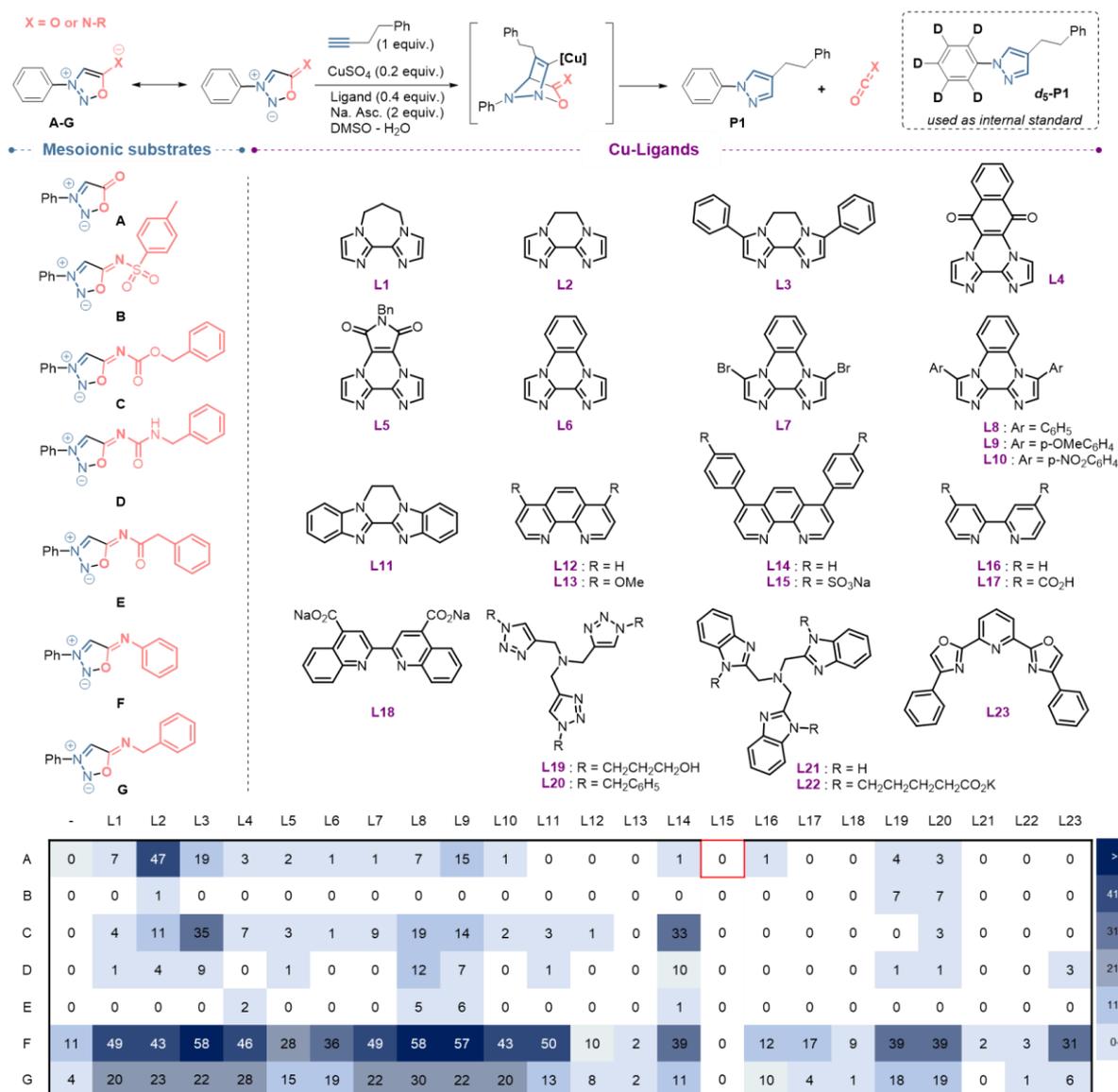
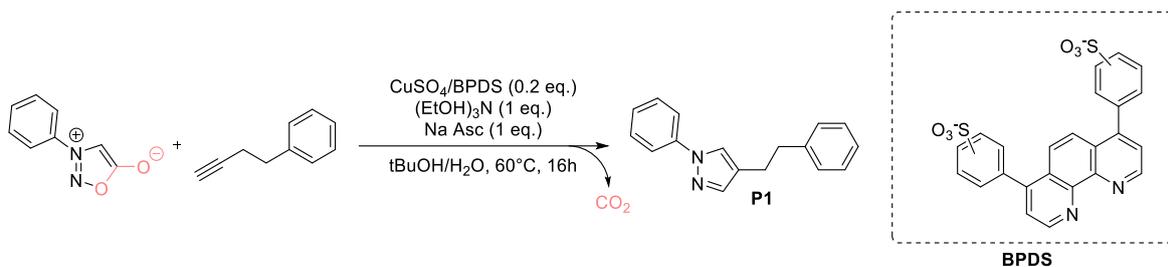


Figure I. 12. Résultats du criblage des ligands. [Mésioionique] = [4-phenyl-1-butyne] = [Triéthanolamine] = 25 mM; [CuSO₄] = 5 mM (0.2 équivalent), [Ligand] = 10 mM (0.4 équivalent), [Na. Asc.] = 50 mM (2 équivalents), Solvant = H₂O : DMSO (1 : 1) = 100 μL. Les chiffres indiqués dans le tableau correspondent aux rendements (%) en produit **P1** calculés en HRMS.

En revanche, de façon inattendue, aucune formation de pyrazole n'a été observée en présence de ligand BPDS (L15), et ce quel que soit le type de mésoionique étudié. Ce résultat surprenant, n'est pas en accord avec les résultats publiés en 2013 par notre laboratoire.²³ Il est à noter que pour ce criblage, un nouveau lot de BPDS a été utilisé. Des différences de réactivité en fonction des lots BPDS employés ont été suspectées. Nous avons donc étudié une série de lots de BPDS provenant de fournisseurs différents et comparé les rendements isolés de pyrazoles (**P1**) obtenus. Les résultats ont montré que les rendements étaient dépendant du lot et variaient de façon très importante (Figure I. 13). Certains lots de BPDS ne permettent aucune conversion de la sydnone de départ.



Rendements en P1 en fonction des lots de BPDS

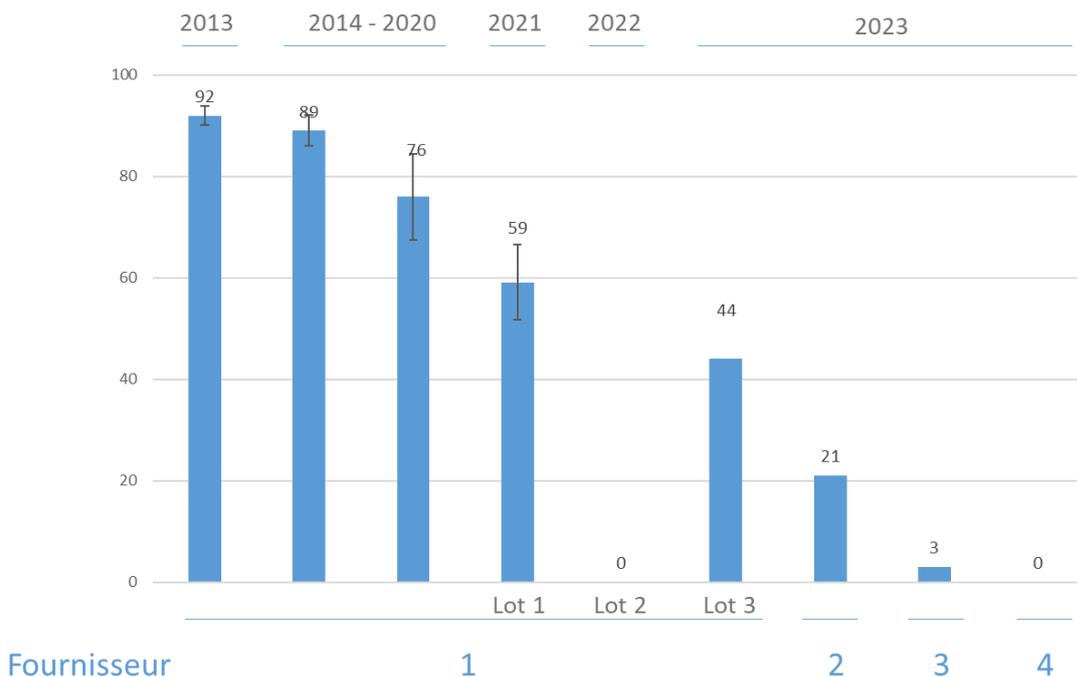


Figure I. 13. Rendements de la réaction de CuSAC en fonction des lots de BPDS.

Une analyse RMN de plusieurs lots de BPDS a mis en avant que les spectres RMN étaient non seulement différents selon les fournisseurs mais également pour des lots provenant d'un même fournisseur (Figure I. 14). Le ligand BPDS est commercialisé sous forme de plusieurs régioisomères en raison de l'étape de sulfonation des cycles aromatiques dont la régiosélectivité n'est pas contrôlée. En conséquence plusieurs complexes de cuivre, ayant des réactivités probablement différentes, peuvent être formés dans les conditions de réaction CuSAC.

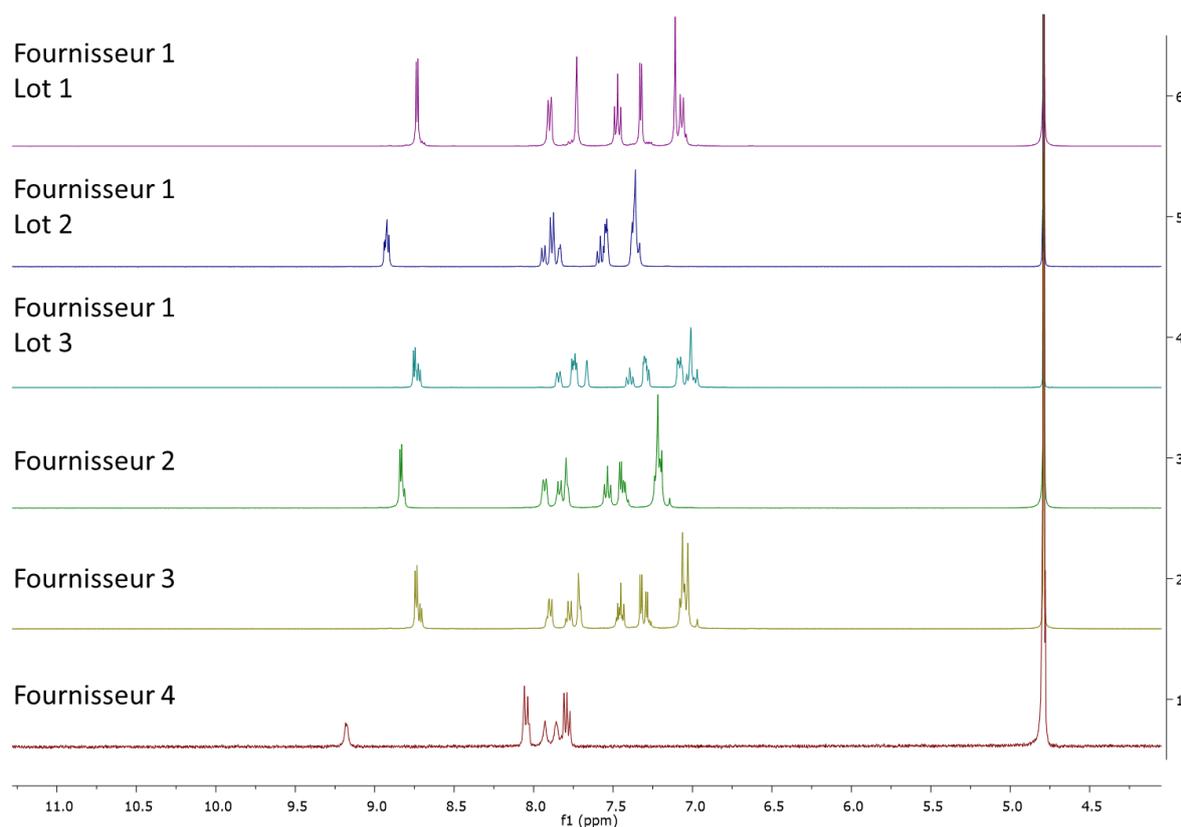


Figure I. 14. Spectres RMN des différents lots de BPDS

Par ailleurs, une analyse des métaux par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) a permis de mettre en évidence une différence notable entre le lot 3 du fournisseur 1 et les autres lots : ce lot possède quantitativement 13 fois plus de manganèse que les autres lots. Le lot du fournisseur 2 contient lui aussi plus de manganèse que les autres lots mais dans des quantités plus faibles. La présence de manganèse dans ces lots de BPDS pourrait suggérer une possible co-catalyse Cu/Mn. Des travaux sont en cours au laboratoire pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Ces analyses prouvent que la structure de la BPDS ainsi que la pureté des lots sont des causes possibles pour expliquer le manque de reproductibilité de la réaction CuSAC avec ce ligand, appuyant ainsi la nécessité de développer de nouveaux ligands comme alternative à la BPDS. Les sept mésoioniques initialement étudiés ont été de nouveaux criblés en utilisant, cette fois-ci, uniquement le lot A de BPDS (L15). Les résultats du screening ont permis d'obtenir des rendements HTE de 45% pour la sydnone **A**, 44% pour l'iminosydnone **F** et 11% pour l'iminosydnone **G**. Comme précédemment, ce ligand n'a pas permis de former le pyrazole désiré avec les autres iminosydnones.

Afin de s'affranchir de ces problèmes de pureté des lots BDPS, nous avons décidé de nous intéresser plus particulièrement à la réaction du mésoionique **A** en présence du ligand **L2**. En plus d'être facilement accessible à partir du 2,2-Diimidazole en une étape avec un rendement de 75% sans purification, le ligand **L2** permet de former le pyrazole souhaité avec un bon rendement. Une vérification en ballon sur une échelle de 70 mg de sydnone a été faite en duplicata (Expérience **A** ; **L2**)

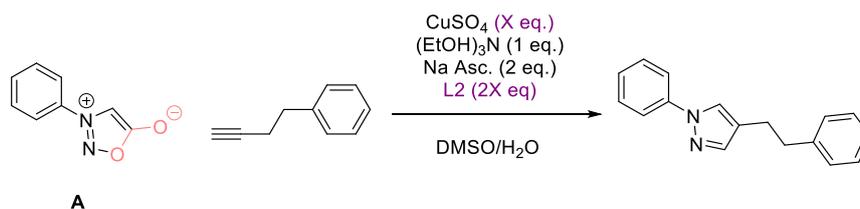
dans les mêmes conditions que l'HTE, a permis d'obtenir le pyrazole attendu sous la forme d'un seul régioisomère 1,4 avec des rendements isolés de 83 % et 72 %. Les rendements obtenus en ballon sont sensiblement plus élevés que ceux obtenus en HTE, ceci s'expliquant par certaines différences expérimentales telles que l'agitation ou encore la précision des pesées

Dans la suite de ce chapitre, nous discuterons tout d'abord du criblage des conditions de CuSAC puis du criblage des conditions de CuISAC.

IV.4) Criblage des conditions de CuSAC

IV.4.1) Criblage de la charge catalytique pour la réaction de CuSAC à partir de la Sydnone A

Nous avons dans un premier temps souhaité évaluer si l'emploi du ligand **L2** permettait de diminuer la charge catalytique en cuivre. Différentes charges catalytiques ont donc été testées en HTE sur la réaction modèle en respectant un ratio ligand : cuivre de 2 : 1 (**Figure I. 15**).



%L2	40%	20%	10%	2%	1%	0,2%	0,02%	0%
%Cu	20%	10%	5%	1%	0,5%	0,1%	0,01%	0%
n = 1	59	46	24	7	4	0	0	0
n = 2	52	55	28	8	3	0	0	0
n = 3	40	48	44	10	4	0	0	0
n = 4	50	52	43	14	4	1	0	0
Moyennes	50	50	35	10	4	0	0	0

Figure I. 15. Influence de la charge catalytique en cuivre sur la réaction CuSAC avec la sydnone A. [Sydnone] = [4-phenyl-1-butyne] = [Triéthanolamine] = 25 mM, [Na. Asc.] = 50 mM, Solvant = H₂O : DMSO (50 : 50), volume = 100 μL. Les chiffres indiqués dans le tableau correspondent aux rendements (%) en produit **P1** calculés en HRMS

Les expériences ont été conduites en quadruplicata et ont montré la possibilité de réduire la charge catalytique en cuivre de 20% à 10% sans compromettre l'efficacité de la réaction. Les rendements demeurent acceptables jusqu'à une charge catalytique en cuivre de 5%, mais diminuent fortement en dessous de cette valeur. Pour les prochaines étapes de notre optimisation avec la sydnone, nous avons

décidé d'utiliser une charge catalytique de 5% en cuivre et 10% en ligand.

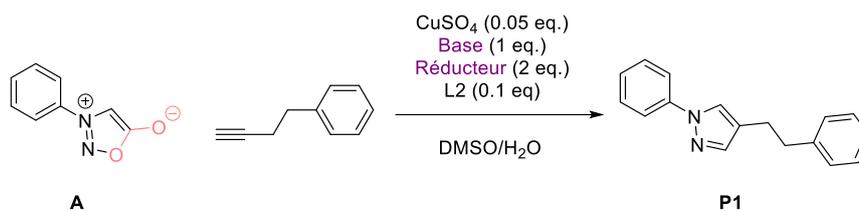
IV.4.2) Criblage des bases et réducteurs pour la réaction de CuSAC à partir de la Sydnone A

Nous nous sommes par la suite intéressés au couple base/réducteur. Six agents réducteurs décrits dans la littérature ont été criblés. Le sulfite de sodium et le lactate de sodium sont décrits comme des agents réducteurs de cuivre.¹¹¹ Par ailleurs, le glucose, le galactose et l'hydroquinone ont montré une bonne efficacité en tant que réducteur du cuivre dans la réaction d'arylation d'amine primaire catalysée au cuivre(I).¹¹² Nous avons donc choisi ces 5 réducteurs en plus de l'ascorbate de sodium pour mener notre criblage. Concernant les bases, nous avons choisi 3 bases aminées possédant des pKa différents : la triéthanolamine classiquement utilisée ayant un pKa de 7.8, la pyridine avec un pKa plus acide à 5.2 et le triazabicyclodécène (TBD) avec un pKa plus basique à 15.2, afin de voir l'influence de la base sur la réaction.

Cette expérience de criblage a été réalisée deux fois afin de valider les résultats obtenus et la moyenne des deux essais est reportée dans la **Figure I. 16**.

¹¹¹ K. Liang, Y. Xu, Q. Lu, S. Zhang, Y. Tan, in *Proceedings of the 2017 International Conference on Material Science, Energy and Environmental Engineering (MSEEE 2017)*, Atlantis Press, Xi'an, China, **2017**.

¹¹² M. Bollenbach, P. Wagner, P. G. V. Aquino, J.-J. Bourguignon, F. Bihel, C. Salomé, M. Schmitt, *ChemSusChem.*, **2016**, 9, 3244–3249.



	Na. Asc	D-Galactose	D-Glucose	Na ₂ SO ₃	Hydroquinone	Na. Lactate	
-	18	0	0	16	3	2	>50
(EtOH) ₃ N	45	58	56	2	58	24	41-50
Pyridine	15	0	0	2	38	2	31-40
TBD	16	19	9	0	14	11	21-30
							11-20
							0-10
							0

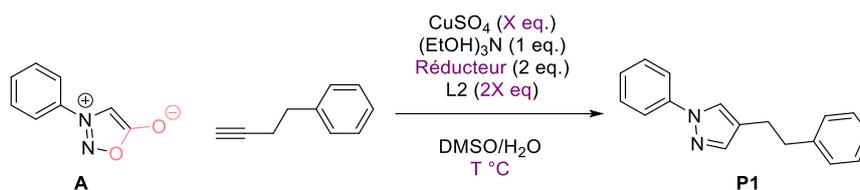
Figure I. 16. Résultats du criblage des bases et des réducteurs pour la sydnone A. [Mésioionique] = [4-phenyl-1-butyne] = [Base] = 25 mM, [L2] = 2.5 mM, [CuSO₄] = 1.25 mM, [Réducteur] = 50 mM, Solvant = H₂O : DMSO (50 : 50), Volume = 100 μL. Les chiffres indiqués dans le tableau correspondent aux rendements (%) en produit **P1** calculés en HRMS.

Au vu des résultats, il paraît évident que la pyridine et le TBD n'apportent pas d'effet bénéfique à la réaction par rapport à la triéthanolamine. Concernant les réducteurs, le galactose, le glucose et l'hydroquinone permettent, en présence de triéthanolamine, d'obtenir des rendements du même ordre de grandeur que le couple triéthanolamine/ascorbate de sodium. En effet, les sucres ont la capacité de réduire le cuivre de façon efficace. En effet, les sucres sous la forme d'hémiacétals sont oxydés en acide carboxylique par réaction avec un Cu(II) réduit en Cu(I). Le test de Fehling repose sur ce procédé et met en évidence les sucres réducteurs chez les patients diabétiques.

IV.4.3) Influence de la température sur la réaction de CuSAC à partir de la Sydnone A

Généralement, une augmentation de la température permet d'améliorer les cinétiques de réaction, selon la loi d'Arrhenius ($k = A.e^{-E_a/RT}$). L'augmentation de la température ne permet pas d'améliorer la biocompatibilité de la réaction mais permet potentiellement d'améliorer les rendements dans un contexte de synthèse de pyrazoles. Ainsi, nous avons décidé d'observer l'influence de la température sur la réaction de CuSAC avec la phényl sydnone **A**.

Nous avons vu précédemment que la réaction de CuSAC avec la phényl sydnone fonctionnait efficacement avec 4 réducteurs différents : l'ascorbate de sodium, le glucose, le galactose et l'hydroquinone. Afin d'opter pour le meilleur système catalytique (cuivre/ligand/réducteur du cuivre) nous avons décidé de cribler la charge catalytique en fonction des différents réducteurs à plusieurs températures : 37 °C, 50 °C et 100 °C. Ce criblage a été réalisé 2 fois pour obtenir une moyenne et confirmer les résultats. Les moyennes de ces deux plaques sont représentées dans la **Figure I. 17**.



	%L2/%Cu	40%/20%	20%/10%	10%/5%	2%/1%	1%/0,5%	0,2%/0,1%	0,1%/0,05	0,02%/0,01%	0%/0%
37 °C	Na. Asc	55	47	35	5	2	0	0	0	1
	D-Glucose	26	23	6	0	0	0	0	0	0
	Hydroquinone	51	43	47	3	1	0	0	0	0
	D-Galactose	25	29	15	0	0	0	0	0	0
50 °C	Na. Asc	51	34	25	5	3	0	0	0	1
	D-Glucose	22	18	13	1	0	0	0	1	0
	Hydroquinone	45	52	37	4	1	0	0	0	0
	D-Galactose	29	28	12	0	0	0	0	0	0
100 °C	Na. Asc	87	80	65	28	13	2	2	0	0
	D-Glucose	70	73	73	17	19	1	1	1	1
	Hydroquinone	85	79	76	19	11	5	1	1	1
	D-Galactose	63	74	71	27	3	1	1	1	1

Figure I. 17. Résultats du criblage de l'influence de la température sur la charge catalytique en fonction des réducteurs pour la sydnone **A**. $[\text{Mésioionique}] = [4\text{-phenyl-1-butyne}] = [\text{Triéthanolamine}] = 25 \text{ mM}$, $[\text{Réducteur}] = 50 \text{ mM}$, Solvant = $\text{H}_2\text{O} : \text{DMSO}$ (50 : 50), volume = $100 \mu\text{L}$. Les chiffres indiqués dans le tableau correspondent aux rendements (%) en produit **P1** calculés en HRMS

Comme attendu, la température a une influence positive sur la réaction. Si à 37 °C et 50 °C les rendements restent similaires, à 100 °C une nette amélioration des rendements est observée et ceci, pour tout les réducteurs. A cette même température, il est possible de diminuer la charge catalytique jusqu'à 1% de cuivre en gardant des rendements significatifs. Concernant les réducteurs, nous observons qu'à 37 °C et 50 °C, l'ascorbate de sodium et l'hydroquinone permettent d'obtenir les meilleurs résultats. Pour finir, il est important de noter que sans système catalytique Cu/L nous n'observons pas de formation de pyrazole même à 100 °C. Nous pouvons donc en conclure que la réaction de cycloaddition par voie thermique ne se produit pas à 100 °C et que les rendements obtenus à cette température sont le fruit de la catalyse par le cuivre. Une analyse par RMN a confirmé que même à cette température seul l'isomère 1,4 du pyrazole est formé.

Ce criblage n'a pas permis de mettre en avant un réducteur plus efficace qu'un autre. Pour la suite de nos criblages nous avons donc choisi de garder une charge catalytique en cuivre de 5%, l'ascorbate de sodium et une température de 50 °C qui nous permettent de garder de bons rendements. Par ailleurs, la température de 50 °C permettra de limiter l'évaporation des substrats alcynes volatiles.

IV.4.4) Criblage du solvant pour la Sydnone A

IV.4.4.a) Criblage de solvants aqueux ou organo/aqueux

Le choix d'utiliser un cuivre (II) nécessite l'ajout de réducteur dans le milieu réactionnel pour réduire le Cu(II) en Cu(I) qui est l'espèce active dans la réaction de CuSAC. Les cuivres (II) ainsi que les réducteurs criblés sont solubles dans l'eau mais les substrats sont généralement solubles dans les solvants organiques. Il est donc nécessaire d'utiliser des mélanges de solvants permettant de solubiliser à la fois les composés hydrosolubles et les composés organosolubles. Bien sûr, dans ce cas, nous sortons du contexte de biocompatibilité mais ce criblage reste utile pour des applications en synthèse de pyrazoles. Nous avons choisi quatre mélanges de solvants : un mélange tBuOH/H₂O utilisé pour la CuSAC comme décrit en 2013 ;²³ un mélange DMSO/H₂O utilisé dans le screening de cette partie; une solution de TPGS-750-M à 5% massique dans l'eau une solution de Tween à 5% massique dans l'eau. Le TPGS-750-M est un amphiphile développé par l'équipe de Lipshutz permettant de former des nanomicelles dans l'eau, agissant comme mini-réacteur pour des réactions impliquant des espèces organiques.¹¹³ Ce tensio-actif a permis de réaliser des couplages métallo-catalysés dans l'eau. De la même façon, le Tween est un tensio-actif permettant la solubilisation des espèces organosolubles dans l'eau (Figure I. 18). Ces deux tensio-actifs seront utilisés pour palier au problème de solubilité des réactifs hydrophobes.

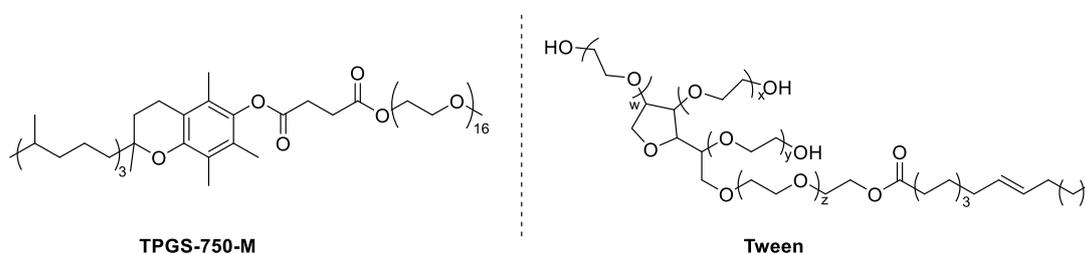
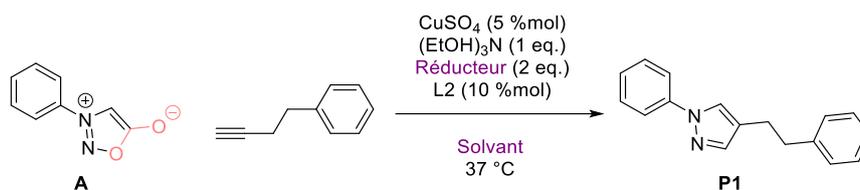


Figure I. 18. Structures des tensio-actifs utilisés

Le criblage de ces quatre solvants en présence de Cu(II) sur la phényl sydnone a été mené en présence de différents réducteurs : l'ascorbate de sodium, le D-glucose et l'hydroquinone (Figure I. 19)

¹¹³ B. H. Lipshutz, S. Ghorai, A. R. Abela, R. Moser, T. Nishikata, C. Duplais, A. Krasovskiy, R. D. Gaston, R. C. Gadwood, *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 4379–4391.



		CuSO_4										
Solvant	tBuOH/H ₂ O			DMSO/H ₂ O			H ₂ O + 5% TGPS-750-M			H ₂ O + 5% Tween		
Réducteur	Na. Asc	D-Glucose	Hydroquinone	Na. Asc	D-Glucose	Hydroquinone	Na. Asc	D-Glucose	Hydroquinone	Na. Asc	D-Glucose	Hydroquinone
n = 1	13	4	8	42	45	56	51	19	51	29	14	12
n = 2	16	4	10	45	37	56	59	19	55	29	14	13
n = 3	16	4	10	42	41	63	48	13	59	29	15	13
Moyennes	15	4	9	43	41	58	53	17	55	29	14	13

Figure I. 19. Résultats du criblage des solvants aqueux et organo/aqueux en fonction des réducteurs pour la sydnone A. [Mésoionique] = [4-phenyl-1-butyne] = [Triéthanolamine] = 25 mM, [L2] = 2.5 mM, [CuSO₄] = 1.25 mM, [Réducteur] = 50 mM, Volume = 2.5 mL. Les chiffres indiqués dans le tableau correspondent aux rendements (%) en produit **P1** calculés en HRMS

Ce criblage montre que l'utilisation d'un mélange DMSO/H₂O ainsi qu'un mélange d'eau avec 5% massique de TPGS-750-M permettent d'obtenir les meilleurs rendements en particulier avec l'ascorbate de sodium et l'hydroquinone. L'hydroquinone peut donc être une alternative intéressante à l'ascorbate de sodium.

IV.4.4.b) Criblage de solvants organiques

Nous avons par la suite criblé des conditions pour réaliser les réactions de cycloadditions en milieu purement organique. Dans ce cas, l'emploi de Cu(I) semble plus adapté que l'emploi de Cu(II) puisque la solubilité est souvent meilleure dans les solvants organiques. Ainsi, nous avons testé deux Cu(I) : le CuI et le Cu(MeCN)₄PF₆ sans ajout de réducteur dans différents solvants organiques (**Figure I. 20**)



Solvant	CuI			Cu(MeCN) ₄ PF ₆		
	EtOH	ACN	DMF	EtOH	ACN	DMF
n = 1	0	0	16	4	3	7
n = 2	0	0	17	4	3	7
n = 3	0	0	17	4	3	7
Moyennes	0	0	17	4	3	7

Figure I. 20. Criblage des solvants organiques pour la CuSAC. [Mésioionique] = [4-phenyl-1-butyne] = [Triéthanolamine] = 25 mM, [L2] = 2.5 mM, [CuSO₄] = 1.25 mM, Volume = 5 mL. Les chiffres indiqués dans le tableau correspondent aux rendements (%) en produit **P1** calculés en HRMS.

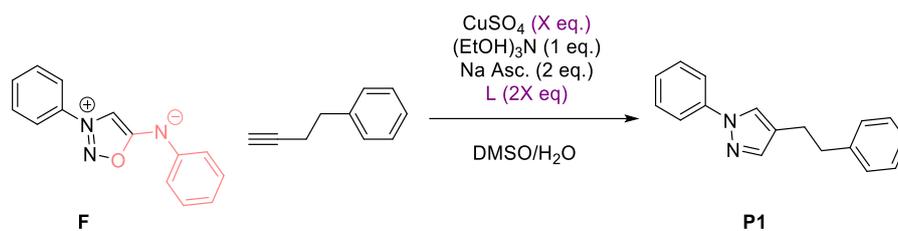
Aucune des conditions n'a permis d'obtenir de rendements corrects. Il semble que la présence de réducteur est indispensable pour maintenir le cuivre à l'état d'oxydation +1 même en conditions inertes. Il est probable que, de la même façon que pour la CuAAC, la présence d'eau favorise cette réaction de cycloaddition.

Afin de transposer cette réaction cupro-catalysée aux iminosydrones, les mêmes criblages ont été réalisés à partir de l'iminosydnone **F**.

IV.5) Criblage des conditions de CuSAC

IV.5.1) Criblage de la charge catalytique pour la réaction de CuSAC à partir de l'iminosydnone **F**

Après avoir amélioré les conditions réaction de la CuSAC, nous nous sommes focalisés sur la réaction de CuSAC. Nous avons vu précédemment que la réaction était possible avec plusieurs ligands mais aussi que la formation de pyrazole était possible sans ajout de ligand. Grâce à l'HTE nous avons pu tester la charge catalytique de tous ces ligands sur la réaction de CuSAC en une seule expérience (**Figure I. 21**).



%L	40%	20%	10%	2%	1%	0,2%	0,1%	0,02%	0%
%Cu	20%	10%	5%	1%	0,5%	0,1%	0,01%	0,01%	0%
-	14	11	32	4	1	0	0	0	0
L1	65	53	46	16	6	2	4	1	0
L2	55	54	57	45	36	5	1	1	0
L3	20	45	48	55	49	4	3	1	0
L4	58	56	56	28	13	8	2	1	0
L8	69	64	69	54	53	14	4	2	0
L14	67	68	61	38	25	12	2	1	0
L19	46	38	24	16	16	2	1	1	0

Figure I. 21. Résultats du criblage de la charge catalytique en fonction des ligands pour l'iminosydnone **F**. [Mésoionique] = [4-phenyl-1-butyne] = [Triéthanolamine] = 25 mM, [Na. Asc.] = 50 mM, Solvant = H₂O : DMSO (50 : 50), Volume = 100 μL. Les chiffres indiqués dans le tableau correspondent aux rendements (%) en produit **P1** calculés en HRMS

Les résultats présentés dans la première ligne du tableau indiquent que la réaction de CuI/SAC avec l'iminosydnone **F** peut être réalisée sans l'ajout de ligand jusqu'à une charge catalytique en cuivre de 5%, mais avec des rendements modérés. Les ligands **L2**, **L3** et **L8** sont les plus performants et permettent de baisser la charge catalytique à 0.5% sans trop diminuer les rendements. Pour des raisons d'accès synthétique plus simple, nous avons décidé de poursuivre nos études avec le ligand **L2**.

IV.5.2) Criblage des bases et réducteurs pour la réaction de CuI/SAC à partir de l'iminosydnone **F**

Concernant le criblage des bases et réducteurs, nous nous sommes intéressés aux mêmes réactifs que pour la réaction de CuSAC pour ce criblage (**Figure I. 22**).



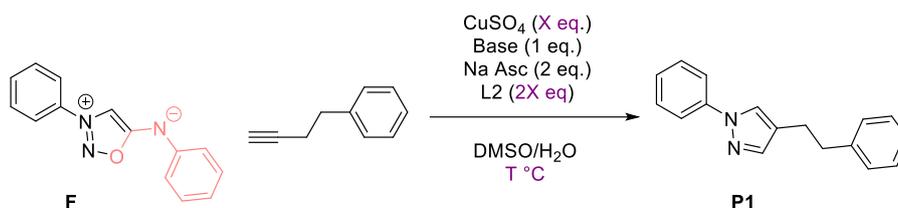
	Na. Asc	D-Galactose	D-Glucose	Na ₂ SO ₃	Hydroquinone	Na. Lactate
-	6	0	0	32	0	0
(EtOH) ₃ N	68	0	0	3	11	0
Pyridine	21	1	0	3	3	0
TBD	33	0	0	2	0	0

Figure I. 22. Résultats du criblage des bases et des réducteurs pour l'iminosynone **F**. [Mésioionique] = [4-phenyl-1-butyne] = [Base] = 25 mM, [L2] = 0.5 mM, [CuSO₄] = 0.25 mM, [Réducteur] = 50 mM, Solvant = H₂O : DMSO (50 : 50), volume = 100 μL. Les chiffres indiqués dans le tableau correspondent aux rendements (%) en produit **P1** calculés en HRMS

Dans ce cas, seul l'ascorbate de sodium permet d'obtenir des résultats satisfaisants avec chaque base testée, en particulier avec la triéthanolamine qui permet d'obtenir un rendement satisfaisant. Concernant les autres réducteurs, nous observons une inhibition complète de la réaction en leur présence. L'analyse HRMS du brut réactionnel a permis de mettre en évidence la présence d'un sous-produit de masse $m/z = 314$ commun à toutes les expériences réalisées avec un autre réducteur que l'ascorbate de sodium. Ce sous-produit n'a pas été isolé dans nos essais en ballon mais notre hypothèse serait qu'il s'agit d'un produit de dégradation de l'iminosynone. Le mécanisme de cette dégradation sera exploré dans de futurs travaux. Ces résultats nous permettent de conclure que la combinaison triéthanolamine/ascorbate de sodium est la plus performante.

IV.5.3) Influence de la température sur la CuISAC pour l'iminosynone **F**

Dans le cas de l'iminosynone aryle, nous avons vu précédemment que seul le système catalytique triéthanolamine/ascorbate de sodium permet de réaliser la réaction de CuISAC. Ainsi, de la même façon que pour la sydnone, nous avons criblé la charge catalytique et 3 températures. Le criblage a été réalisé en duplicata et les moyennes des 2 plaques sont reportées dans la **Figure I. 23** ci-dessous :



%L2/%Cu	40%/20%	20%/10%	10%/5%	2%/1%	1%/0,5%	0,2%/0,1%	0,1%/0,05	0,02%/0,01%	0%/0%	
37 °C	57	56	57	46	36	12	3	1	0	>50
50 °C	53	66	59	46	39	0	0	0	0	41-50
100 °C	42	39	37	27	12	0	0	0	0	31-40
										21-30
										11-20
										0-10
										0

Figure I. 23. Résultats du criblage de l'influence de la température sur la charge catalytique pour l'iminosydnone F. [Mésoionique] = [4-phenyl-1-butyne] = [Triéthanolamine] = 25 mM, [Na. Asc] = 50 mM, Solvant = H₂O : DMSO (50 : 50), volume = 100 μL. Les chiffres indiqués dans le tableau correspondent aux rendements (%) en produit P1 calculés en HRMS.

Etonnamment, et contrairement à la réaction de CuSAC, l'augmentation de la température a un effet néfaste sur la réaction de CuSAC. En effet, nous observons une baisse des rendements pour le criblage réalisé à 100 °C, et la présence du même sous-produit de masse m/z = 314. Ainsi, une augmentation de la température semble susceptible de favoriser la dégradation de l'iminosydnone. Enfin, de la même façon que pour la réaction de CuSAC, les résultats montrent que la réaction de cycloaddition thermique n'a pas lieu puisque nous n'observons aucune formation de pyrazole en absence de cuivre. Pour la suite de nos explorations, nous avons décidé de réaliser les criblages à 37 °C afin d'éviter toute dégradation de l'iminosydnone.

IV.5.4) Criblage du solvant pour la réaction de CuSAC à partir de l'iminosydnone F

IV.5.4.a) Criblage de solvants aqueux ou organo/aqueux

Comme pour la réaction de CuSAC, nous avons criblé 4 solvants organo/aqueux ou aqueux dans les conditions optimisées. Les résultats montrent de bons rendements dans tous les solvants excepté la solution de Tween à 5% massique dans l'eau (**Figure I. 24**).

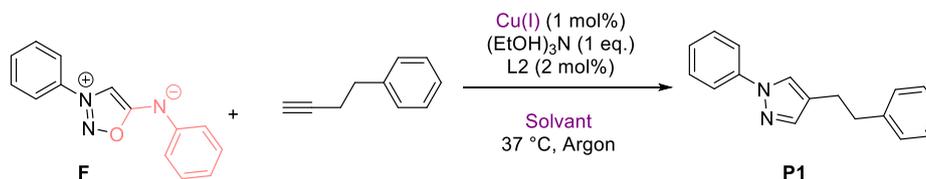


Solvant	tBuOH/H ₂ O	DMSO/H ₂ O	H ₂ O + 5% TGPS-750-M	H ₂ O + 5% Tween
n = 1	28	45	78	9
n = 2	27	46	53	6
n = 3	45	46	52	6
Moyennes	33	46	61	7

Figure I. 24. Résultats du criblage des solvants organo/aqueux pour l'iminosydnone F. [Mésioionique] = [4-phenyl-1-butyne] = [Triéthanolamine] = 25 mM, [L2] = 0.5 mM, [CuSO₄] = 0.25 mM, [Na. Asc] = 50 mM, volume = 1.1 mL. Les chiffres indiqués dans le tableau correspondent aux rendements (%) en produit **P1** calculés en HRMS.

IV.5.4.b) Criblage de solvants organiques

Dans la même dynamique que le criblage avec la sydnone A, nous avons utilisé des Cu(I) pour le criblage de solvants organiques en conditions anhydre (**Figure I. 25**).



Solvant	CuI			Cu(MeCN) ₄ PF ₆		
	EtOH	ACN	DMF	EtOH	ACN	DMF
n = 1	0	0	16	4	3	7
n = 2	0	0	17	4	3	7
n = 3	0	0	17	4	3	7
Moyennes	0	0	17	4	3	7

Figure I. 25. Résultats du criblage des solvants organiques pour l'iminosydnone F [Mésioionique] = [4-phenyl-1-butyne] = [Triéthanolamine] = 25 mM, [L2] = 0.5 mM, [Cuivre] = 0.25 mM, Volume = 2.3 mL. Les chiffres indiqués dans le tableau correspondent aux rendements (%) en produit **P1** calculés en HRMS

Ici, aucune des conditions criblées n'a permis de former le pyrazole **P1** avec de bons rendements. Comme pour la sydnone, il est donc nécessaire d'utiliser un couple Cu(II)/réducteur en présence d'un solvant aqueux.

IV.6) Conclusion

Après l'optimisation d'un grand nombre de paramètres, nous avons jugé que les conditions obtenues permettaient une optimisation suffisante des réactions. Afin de confirmer les résultats obtenus, nous avons réalisé des tests de reproductibilité en ballon avec les conditions optimisées (Figure I. 26).

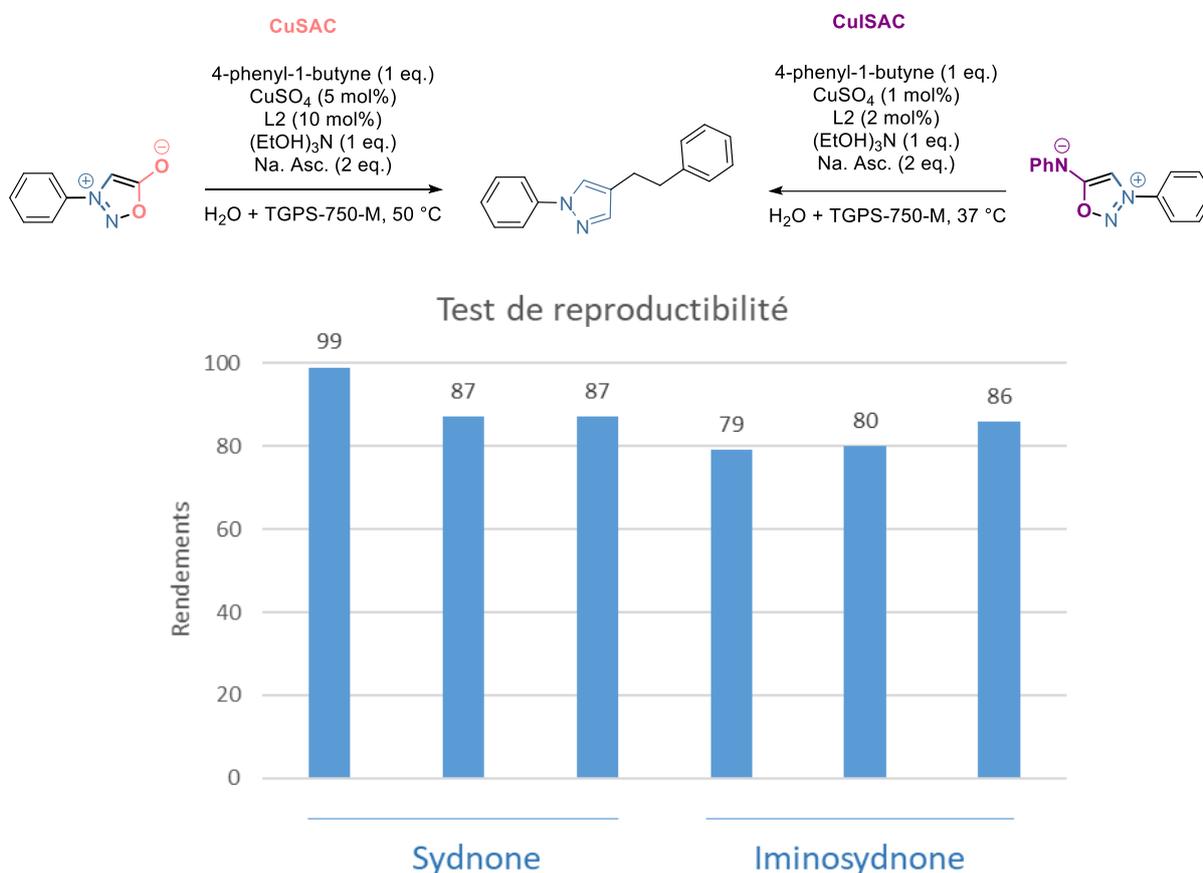


Figure I. 26. Haut : Schéma réactionnel des conditions optimisées pour la CuSAC et la CuISAC. Bas : Reproductibilité des réactions de CuSAC et CuISAC avec les conditions optimisées. Chaque réaction est testée 3 fois sur 0.185 mmol.

Chacune de ces réactions a été répétée 3 fois et le pyrazole désiré a été obtenu avec un rendement moyen de $91\% \pm 3.5\%$ par la voie CuSAC et $82\% \pm 2\%$ par la voie CuISAC ce qui confirme que les conditions optimisées ainsi que l'utilisation du ligand Bim L2 sont robustes. Par ailleurs une expérience

de montée en échelle sur 1 gramme de sydnone de départ a été effectuée permettant d'obtenir un rendement de 75%.

V) Etendue de la réaction

Les criblages menés précédemment nous ont permis d'obtenir des conditions de réactions optimisées. Suite à cette phase d'optimisation nous avons voulu évaluer les nouvelles procédures sur une variété de substrats dans le but notamment de vérifier la compatibilité des réactions avec les groupements fonctionnels. Pour cela nous avons souhaité utiliser une nouvelle fois la technologie HTE. En effet, elle nous permettra de réaliser un nombre important de réactions sur un nombre important de substrats différents. Ainsi, nous avons pu explorer une librairie de 36 alcynes différents afin de démontrer la chimiosélectivité des réactions de CuSAC et CuISAC. La librairie est composée d'alcynes aromatiques, aliphatiques et hétéro-aromatiques possédant un grand nombre de fonctionnalisations différentes (halogène, nitro, alcool, acide carboxylique, amine, ...) (Figure I. 27).

Chaque alcyne a réagi avec 4 mésoioniques différents (3 sydnones et 1 iminosydnone) dans les conditions optimales (Figure I. 26). Les conditions optimisées pour l'iminosydnone sont les mêmes mais 10 équivalents de tris(hydroxyméthyl)aminométhane ont été ajoutés pour neutraliser l'isocyanate formé au cours de la réaction et éviter qu'il n'entre en compétition avec des composés nucléophiles présents dans le milieu. Au total, nous avons réalisé 144 réactions pour accéder à 108 pyrazoles différents (Schéma I. 30).

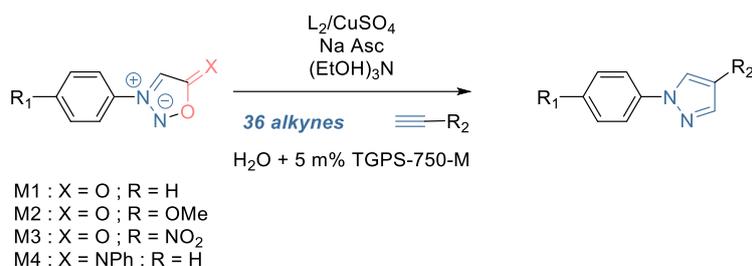


Schéma I. 30. Schéma de la réaction de criblage des alcynes

La structure des alcynes formés étant différente pour chaque réaction, nous avons mis en place une méthode rapide d'estimation des rendements par SFC (Supercritical Fluid Chromatography) en utilisant un étalon interne, le di-*tert*-butylbiphenyl, ajouté dans chaque puit HTE à une concentration connue (2 mM). En fonction de la nature des alcynes utilisés, des pyrazoles peuvent être substitués soit par un groupement aromatique soit par un groupement aliphatique en position 6. Cette différence structurale peut avoir un impact important sur les propriétés d'absorbance donc sur l'intensité des pics obtenus par SFC et donc sur l'estimation des rendements obtenus par comparaison des aires sous

pics des pyrazoles et de l'étalon interne. Afin d'estimer ce biais, nous avons synthétisé deux pyrazoles, l'un obtenu à partir de l'alcyne aromatique **B3** et l'autre à partir de l'alcyne aliphatique **B6**. Une injection du mélange stœchiométrique de ces deux pyrazoles en SFC a permis, par extrapolation, d'établir que les pyrazoles conjugués étaient environ deux fois plus absorbants que les pyrazoles non-conjugués. Ainsi, nous avons pu calculer des rendements approximatifs pour chaque réaction en tenant compte de cette différence d'absorbance observée pour ces deux familles de pyrazoles. Les 144 réactions ont été réalisées en duplicata et les moyennes des deux résultats sont présentées ci-dessous (**Figure I. 27**).

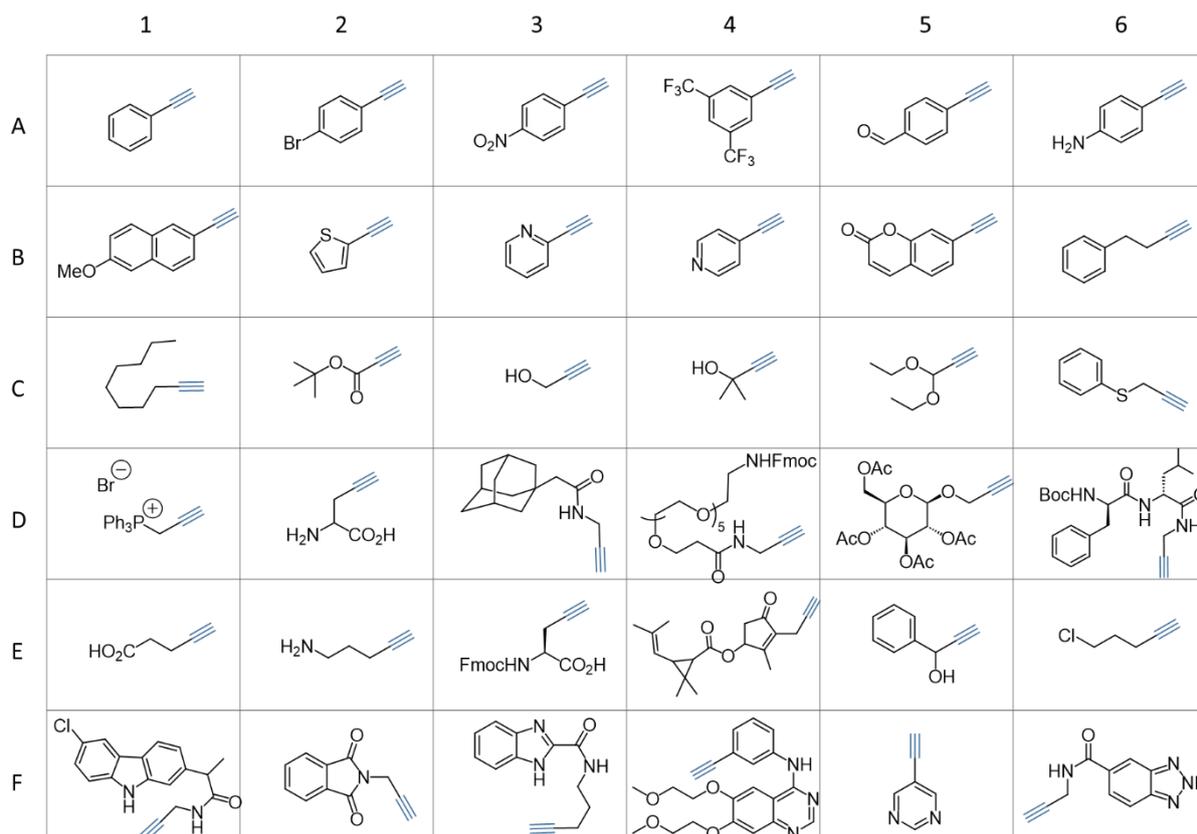


Figure I. 27. Bibliothèque des alcynes utilisés pour le scope par HTE

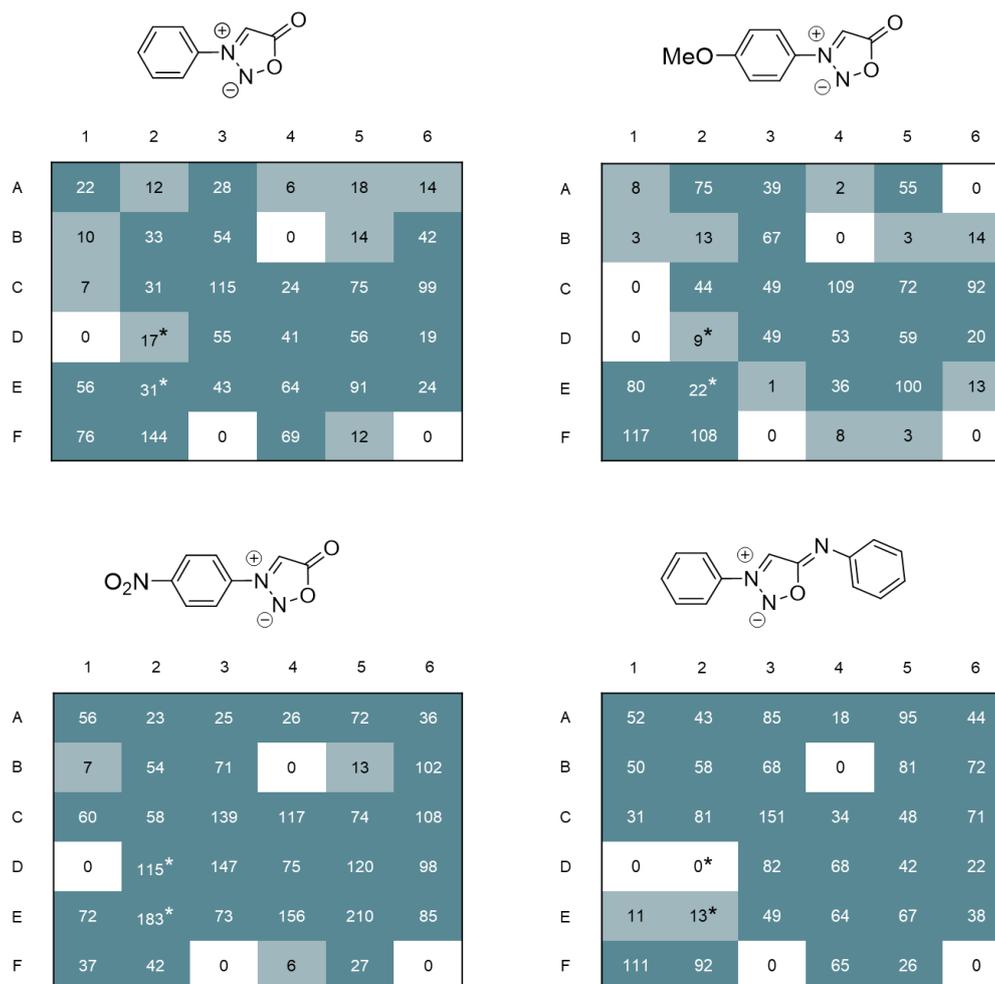


Figure I. 28. Résultats du criblage des alcynes pour 4 mésoioniques. En bleu : les rendements supérieurs à 20%. En gris : les rendements inférieurs à 20%. En blanc : les rendements nuls. Les chiffres indiqués dans le tableau correspondent aux rendements (%) en produit **P1** estimés par SFC, ceux indiqués d'une étoile ont été estimés en LCMS.

Les résultats obtenus ont été classés en 3 catégories représentées par 3 couleurs. Le blanc pour les réactions ne permettant pas de former le pyrazole correspondant, le gris représentant les rendements inférieurs à 20% et le bleu foncé pour les rendements supérieurs à 20%. Les analyses SFC pour les alcynes **D2** et **E2** n'ont pas permis de conclure sur la présence ou non de pyrazole. En effet, nous pensons que les produits sont élués dans le pic d'injection en raison de leur polarité d'où l'impossibilité d'analyser les résultats par cette méthode. Ainsi toutes les réactions ayant pour partenaire ces deux alcynes ont été analysées par LC-MS afin de calculer le rendement. Certains rendements supérieurs à 100% montrent les limites de notre méthode de calcul basée uniquement sur un rapport d'aire sous pic. Elle permet néanmoins de montrer qualitativement une hiérarchie dans l'efficacité de formation des pyrazoles souhaités. Sur les 144 réactions menées, seules 19 n'ont pas permis d'observer le produit désiré. Parmi elles, 4 alcynes ne fonctionnent avec aucun des mésoioniques testés. L'inactivité de l'alkyne **D1** peut être expliquée par l'encombrement stérique de la molécule. Les alcynes **B4**, **F3** et **F6**

ont en commun la présence d'hétérocycles azotés susceptibles de complexer le cuivre. Une hypothèse pour tenter d'expliquer leur mauvaise réactivité pour la réaction CuSAC serait une inhibition de la réactivité du complexe Cu-L2 par chélation de ces substrats au complexe de cuivre. Les réactions entre la phényl-sydnone et ces 4 alcynes ont été répétées en ballon et ont confirmé ces résultats négatifs.

Par la suite, nous avons souhaité reproduire en ballon les réactions qui fonctionnaient en plaque HTE pour confirmer les résultats positifs et voir s'il y avait des écarts de rendements entre les réactions menées en HTE et celles réalisées en ballon. Ainsi 19 réactions ont été reproduites dans les mêmes conditions que celles utilisées dans les plaques HTE mais à l'échelle de 0.185 mmoles, permettant de former 19 pyrazoles avec des bons rendements compris entre 45% et 99% (Figure I. 29). Les rendements obtenus en ballon se sont révélés être généralement plus élevés que ceux obtenus par HTE. Cela peut s'expliquer par les différences entre les deux techniques : absence de solutions mères, agitation, quantité de réactif utilisé.

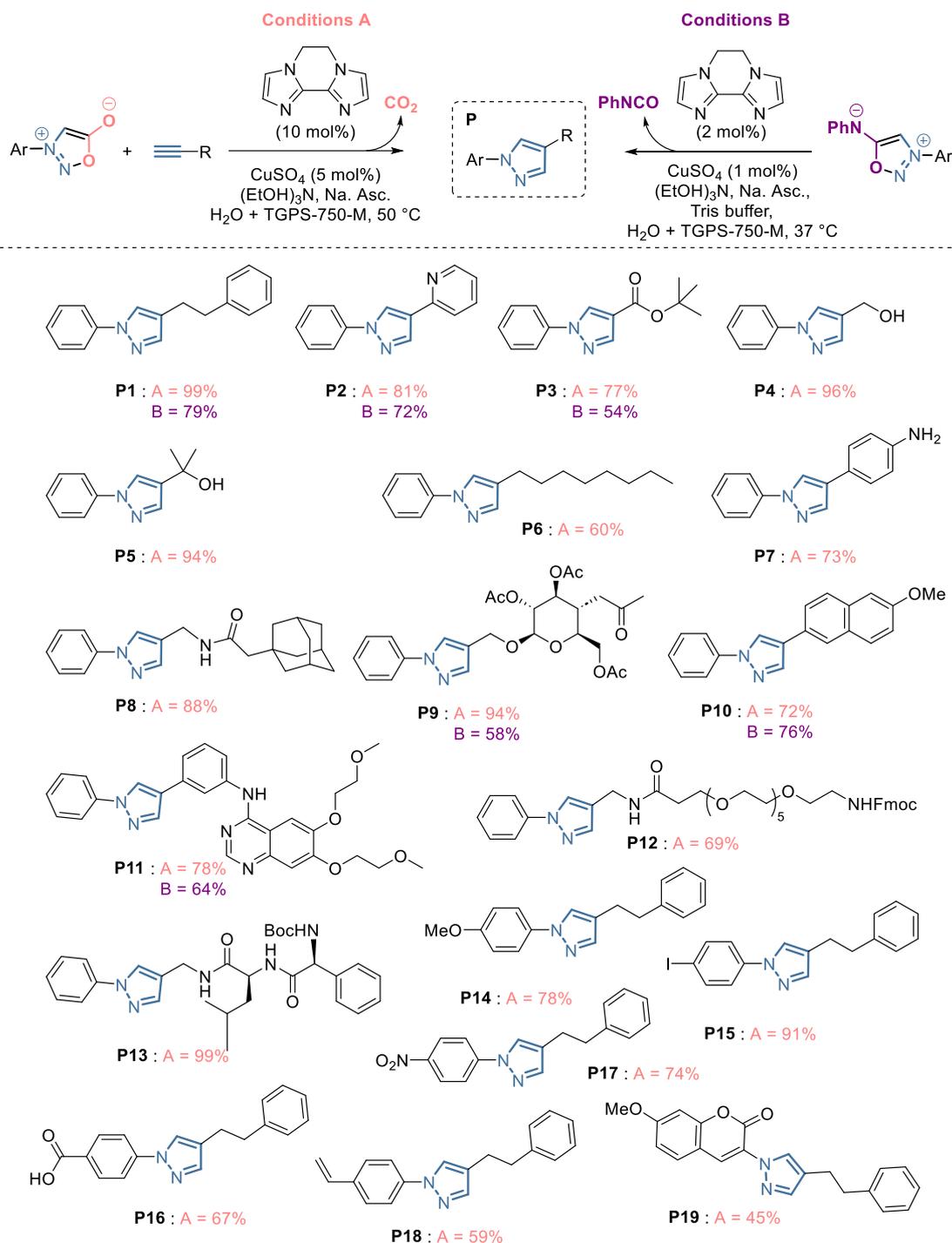


Figure I. 29. Etendue des réactions de CuSAC et CuISAC avec les conditions optimisées

Six de ces pyrazoles ont été obtenus à partir la phényle sydnone **A** ou de l'iminosydnone **F** (P1 – P3 et P9 – P11). Des rendements légèrement plus faibles ont été obtenus en partant de l'iminosydnone **F**. Cette différence de rendements avait déjà été observée lors de l'étape d'optimisation mais aucune réaction secondaire de dégradation n'a par contre été observée. Dans chaque cas, un seul régioisomère de pyrazole a été obtenu. Concernant la réaction de CuISAC, grâce à l'utilisation de tampon Tris, lors de l'utilisation d'alkyne portant une fonction nucléophile, nous avons généralement

peu observé la formation de l'urée provenant de la réaction monotope entre le nucléophile et l'isocyanate libéré. En revanche nous avons observé le produit issu de la réaction entre un isocyanate et l'amine résultant de l'hydrolyse de l'isocyanate formant une urée (Schéma I. 31).

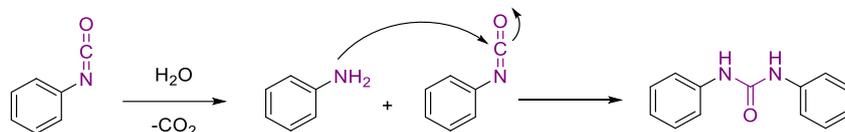


Schéma I. 31. Mécanisme de formation de l'urée observée dans les réactions menées avec l'iminosydnone F

La formation de ces deux produits montre que les isocyanates sont des espèces suffisamment actives dans ce milieu pour réagir avec des amines nucléophiles. La réaction de CuISAC à l'instar de la réaction de CuSAC s'est montrée plutôt performante dans les conditions optimisées et a permis d'abaisser la charge catalytique en cuivre. Néanmoins, d'un point de vue purement synthétique, la réaction de CuISAC n'apporte pas de bénéfice majeur par rapport à la CuSAC pour la formation de pyrazoles : les rendements sont moins bons, des sous-produits sont formés à cause de la libération d'un isocyanate et cette réaction est peu économe en atome. Dans ce contexte, nous avons cherché à tirer profit de la libération d'isocyanates par les iminosydrones.

Comme discuté juste avant, les isocyanates sont capables de réagir avec des espèces nucléophiles. Jusqu'à présent, nous avons cherché à inhiber ce phénomène afin de former les pyrazoles souhaités en ajoutant un agent de désactivation : le tampon Tris. Dorénavant, nous souhaitons tirer profit de cet isocyanate pour développer une réaction en cascade. Après la formation d'un pyrazole à partir d'une iminosydnone et d'un alcyne porteur d'une fonction amine, l'isocyanate peut réagir avec l'amine nucléophile pour former un pyrazole porteur d'une fonction urée au cours de la même réaction. Un scope de cette réaction a été mené et 6 produits issus de la cascade réactionnelle ont été obtenus avec des rendements compris entre 23% et 76% (Figure I. 30). Pour ce scope les mêmes conditions réactionnelles ont été utilisées que pour le scope de pyrazoles.

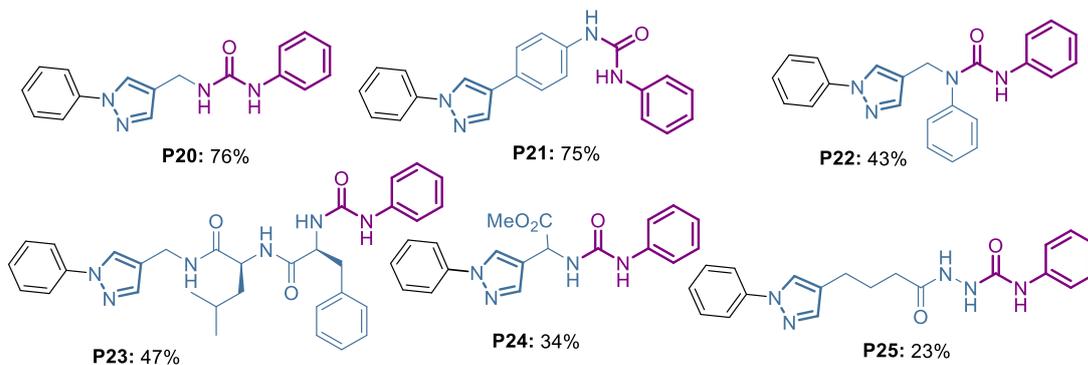
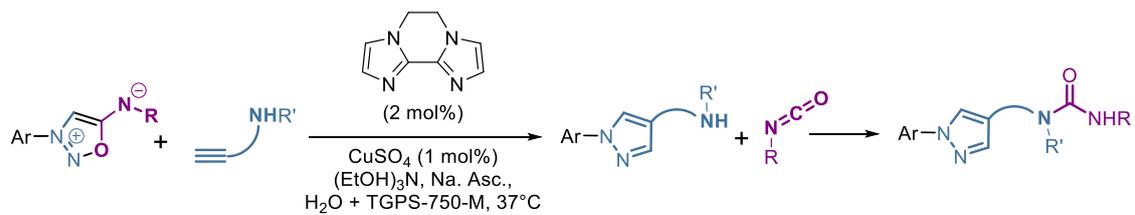


Figure I. 30. Etendue de la réaction de cascade à partir d'iminosydnones

VI) Conclusion

La technique HTE (High Throughput Experimentation) a permis de réaliser un nombre important de réactions en un temps court pour cribler de nombreux paramètres. Malgré les limitations rencontrées, nous avons pu mettre en place une méthode d'analyse simple, rapide et adéquate pour notre cas.

Le criblage par HTE des ligands de la réaction CuSAC (Copper-catalysed Sydnone Alkyne Cycloaddition) entre la phényl sydnone et le 4-phenyl-1-butyne a mis en évidence que seul le ligand biimidazole ponté (**L2**) permettait la réaction avec des très bons rendements de façon reproductible et sur une vaste gamme de substrats. Ce ligand **L2** permet de remplacer la bathophenanthroline disulfonique acide (BPDS) classiquement utilisée pour cette réaction, qui a montré des problèmes de répétabilité en fonction des fournisseurs. Le large criblage des autres conditions de la réaction, à savoir, la base, le réducteur, le solvant et la température ont permis d'augmenter le rendement de cette réaction pour atteindre des valeurs supérieures à 90% de rendement isolé. Enfin, l'utilisation du ligand **L2**, synthétisable avec un bon rendement en 1 étape sans purification, permet de diminuer la charge catalytique en cuivre par 4 et passer de 20% de ligand à seulement 5%.

Par ailleurs, une nouvelle réaction cupro-catalysée entre les iminosydnones aryles et un alcyne a été identifiée : la CuISAC, et un criblage HTE a montré que la réaction était possible avec tous les ligands biimidazoles, bathophénantrolines et tristriazoles criblés. Dans le cas du ligand **L2**, la charge catalytique peut être diminuée jusqu'à 1% de cuivre sans altérer les rendements. Cette réaction, jusque-là encore jamais étudiée, a montré des performances prometteuses pour des applications en bioconjugaison du fait de la faible quantité de cuivre utilisée.

Une étude sur l'étendue de ces réactions a été menée par HTE avec 36 alcynes et 4 mésoioniques afin d'obtenir 144 pyrazoles différents. Sur ces 144 réactions, près de 90% ont fonctionné avec des rendements estimés à plus de 20% montrant la robustesse et la chimiosélectivité des réactions de CuSAC et de CuISAC. Un scope en ballon a ensuite été mené permettant d'isoler 25 pyrazoles et de confirmer les résultats obtenus par la méthode HTE.

Nous avons ensuite tenté de valoriser la libération d'un isocyanate lors de la réaction de CuISAC en utilisant des alcynes nucléophiles capables de piéger l'isocyanate. Cette réaction permet de former des pyrazoles urées en un seul pot.

Chapitre II : Chimie click pour l'étude du Myristoylome

Chapitre II : Chimie Click pour l'étude du Myristoylome

De façon parallèle aux recherches que nous avons menées sur les réactions de chimie click impliquant les sydnones et les iminosydnones (décrites dans le chapitre I), nous avons également travaillé activement sur l'utilisation des outils de la chimie click pour un projet à l'interface chimie/biologie. Celui-ci consiste à étudier le Myristoylome, l'ensemble des protéines subissant une myristoylation, par une approche de « protein fishing » à l'aide de sondes bioorthogonales, telles que décrite dans l'introduction générale de ce manuscrit.

I) Introduction sur le Myristoylome

I.1) Généralités

La cellule est l'élément de base qui compose les organismes vivants. Elle est dotée d'une membrane plasmique qui permet entre autres de protéger le contenu de la cellule (cytoplasme) du milieu extracellulaire et de contrôler les échanges entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule.¹¹⁴ Cette membrane est composée essentiellement de lipides et de protéines dont le cœur est hydrophobe tandis que les extrémités sont hydrophiles. La cellule est aussi composée de ribosome dont le rôle est de synthétiser les protéines nécessaires au bon fonctionnement de la cellule à partir d'acides aminés. Ces protéines peuvent subir des modifications lors de leur synthèse (co-traductionnelles) ou après leur synthèse (post-traductionnelles) telles que des glycosylations,¹¹⁵ des phosphorylations¹¹⁶ ou des lipidations.¹¹⁷ Ces modifications sont utiles dans la régulation de l'activité cellulaire. Ici, nous nous intéresseront aux modifications lipidiques et plus particulièrement à la myristoylation.

La myristoylation est une modification lipidique connue depuis les années 1980¹¹⁸ présente chez toutes les cellules eucaryotes qui permet l'ajout d'un acide gras saturé à 14 carbones (C14:0) sur une

¹¹⁴ T. Harayama, H. Riezman, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2018**, *19*, 281-296.

¹¹⁵ K. Ohtsubo, J. D. Marth, *Cell.*, **2006**, *126*, 855-867.

¹¹⁶ S. Panni, *Biochimie*, **2019**, *163*, 117-127.

¹¹⁷ S. Ramazi, J. Zahiri, *Database*, **2021**, *2021*, baab012.

¹¹⁸ A. Aitken, P. Cohen, S. Santikarn, D. H. Williams, A. G. Calder, A. Smith, C. B. Klee, *FEBS Lett.*, **1982**, *150*, 314-318.

protéine.^{119,120,121} On estime que cette modification représente entre 1% et 2% du protéome humain (soit environ 600 protéines). Il s'agit d'un mécanisme principalement co-translationnel qui a lieu sur des protéines dont l'acide aminé N-terminal est une méthionine et qui possède une glycine en position 2. C'est l'acide aminé glycine qui sera myristoylé (G-myristoylation). Dans de rares cas, cette modification peut aussi avoir lieu sur les chaînes latérales lysine (K-myristoylation)¹²². La myristoylation a lieu *in vivo* par l'action successive d'une enzyme capable de cliver la méthionine N-terminale, appelée Méthionine aminopeptidase (MetAP), et de myristoyl coenzyme A (Myr-CoA) naturellement présent dans la cellule (Schéma II. 1).¹²³ Cette deuxième étape est catalysée par une enzyme appelée N-Myristoyltransférase (NMT) et a lieu lorsque la chaîne naissante est encore attachée au ribosome.

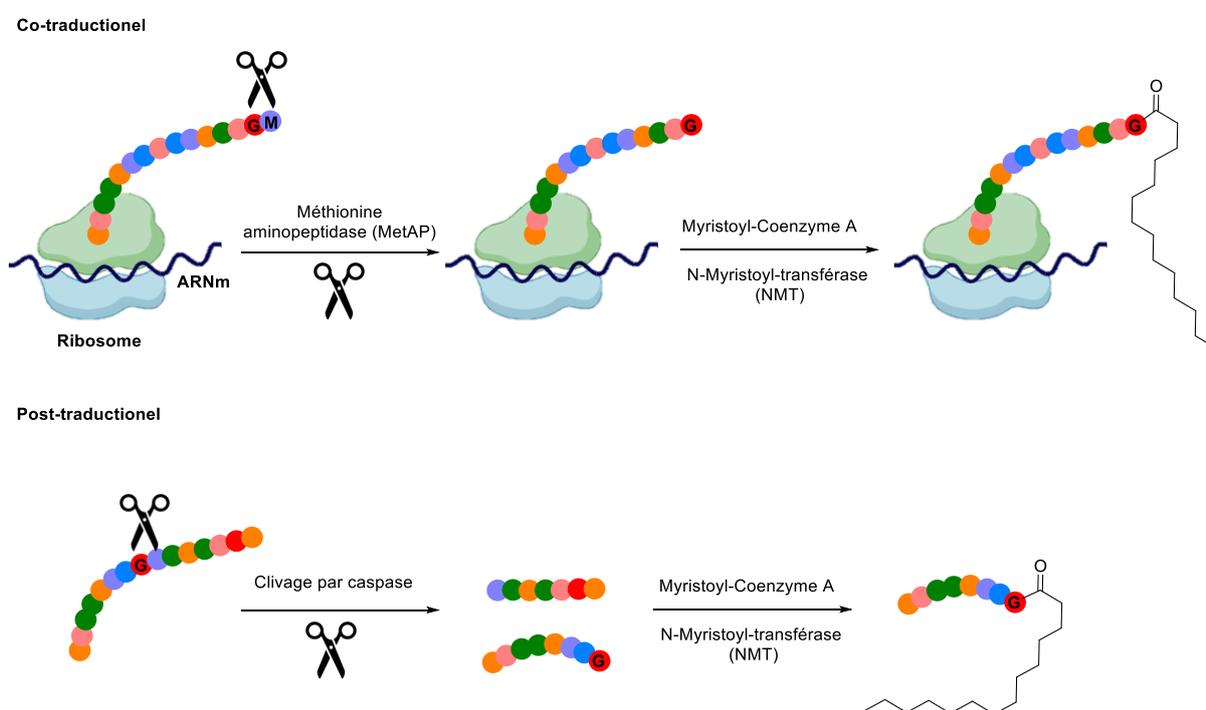


Schéma II. 1. Mécanismes de myristoylation des protéines

Pour résumer, la myristoylation a lieu sur des protéines naissantes qui possèdent une méthionine en position 1 et une glycine en position 2 et qui ont subi l'action de l'enzyme MetAP ainsi que d'un catalyseur NMT. Dans certains cas rares, la myristoylation peut se faire de façon post-translationnelle lors de l'apoptose après un clivage de la méthionine par des caspases. Dans tous les cas, la liaison

¹¹⁹ D. Johnson, R. S. Bhatnagar, L. J. Knoll, J. I. Gordon, *Annu. Rev. Biochem.*, **1994**, *63*, 869–914.

¹²⁰ J. A. Boutin, *Cell. Signal.*, **1997**, *9*, 15-35

¹²¹ C. Giglione, T. Meinel, *Prog. Lipid. Res.*, **2022**, *85*, 101139.

¹²² F. T. Stevenson, S. L. Bursten, R. M. Locksley, D. H. Lovett, *J. Exp. Med.*, **1992**, 1053-1062.

¹²³ C. Giglione, A. Boularot, T. Meinel, *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, **2004**, *61*, 1455-1474

amide formée est très stable et ne peut être clivée biologiquement. Ainsi, la myristoylation est dite irréversible. Seule une enzyme appelée IpaJ permet de démyristoyer les protéines en attaquant la liaison entre la glycine terminale et le reste de la protéine.

La myristoylation facilite la vectorisation des protéines vers les membranes cellulaires, modulant ainsi leur localisation subcellulaire, leur stabilité et leurs interactions avec d'autres protéines. D'autres modifications, telles que la palmitoylation, cette fois-ci réversible, permettent l'ancrage de la protéine sur ces membranes cellulaires. Ainsi, on retrouve des protéines myristoylées dans différents compartiments tels que la membrane plasmique, l'endosome, les mitochondries, etc.¹²⁴ Les protéines connues ayant subies une myristoylation sont des protéines participant à la signalisation cellulaire telles que des kinases ou des GTPases.¹²⁵ La compréhension du Myristoylome présente un intérêt significatif pour la découverte de médicaments et pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet, la dérégulation de la *N*-myristoylation est impliquée dans diverses maladies, dont le cancer, les troubles neurodégénératifs et les maladies infectieuses. Des expériences d'inactivation de la myristoylation ont mené à la mort cellulaire ce qui montre l'importance des protéines myristoylées dans le bon fonctionnement de la cellule. Par conséquent, déchiffrer le Myristoylome en identifiant les protéines myristoylées permettrait de fournir de nouvelles perspectives sur la régulation cellulaire et mieux comprendre son mécanisme d'action.

1.2) Identification de Myristoylome : les approches précédentes

Une des premières étapes pour l'identification de protéines myristoylées a été de prédire une séquence d'acide aminés préférentielle à la Myristoylation. Le nombre de possibilité étant colossal, des approches bio-informatiques ont été mises en place à partir de base de données permettant d'estimer avec un certain degré de confiance la myristoylation d'une séquence d'acides aminés. Des outils de prédiction accessibles en ligne ont donc vu le jour permettant d'enrichir une base de données sur le Myristoylome.^{126,127} Par ailleurs, les progrès dans le domaine de la spectrométrie de masse ont permis de modifier les approches et d'identifier avec certitude des protéines myristoylées. Ainsi, en 2018, l'équipe du Dr. Meinel a réalisé une réaction de myristoylation *in vitro* d'une banque de 2048 octapeptides synthétiques.¹²⁸ Sur les 829 peptides ayant été myristoylés, l'équipe a pu mettre en évidence que certains acides aminés étaient plus souvent présents à certaines positions. Une séquence préférentielle de 8 acides aminés montrée en Figure II. 1, subit beaucoup plus souvent une Myristoylation. Notamment, en position 6, le résidu Sérine semble être présent sur un grand nombre

¹²⁴ T. Meinel, C. Dian, C. Giglione, *TIBS*, **2020**, *45*, 619–632.

¹²⁵ E. Beauchamp, V. Rioux, P. Legrand, *Med Sci*, **2009**, *25*, 57–63.

¹²⁶ S. Maurer-Stroh, B. Eisenhaber, F. Eisenhaber, *J. Mol. Biol.*, **2002**, *317*, 541-557

¹²⁷ <https://mendel.imp.ac.at/myristate/myrbase/>. consulté le 5 octobre 2023

¹²⁸ B. Castrec, C. Dian, S. Ciccone, C. L. Ebert, W. V. Bienvenu, J.-P. Le Caer, J.-M. Steyaert, C. Giglione, T. Meinel, *Nat. Chem. Biol.*, **2018**, *14*, 671–679.

de protéines myristoylées. Cette séquence est préférentielle mais pas indispensable, elle est une référence prédictive afin de confirmer des potentiels résultats obtenus *in vivo*.

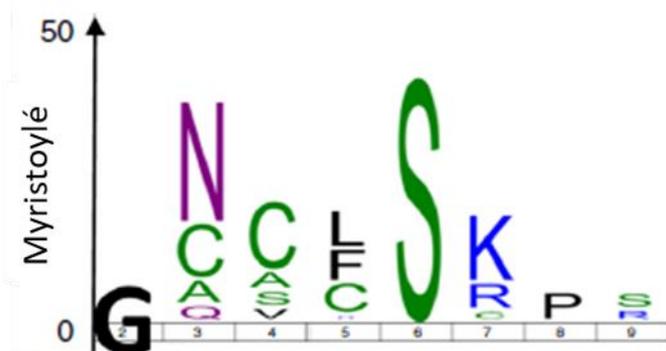


Figure II. 1 Séquence préférentielle pour la Myristoylation

C'est dans les années 2010, que des approches bioorthogonales ont été envisagées pour étudier le Myristoylome. Notamment, l'équipe de E. Tate a grandement contribué à l'identification *in vivo* d'un certain nombre de protéines myristoylées. En 2014, ils sont les premiers à utiliser les outils de la chimie click pour cibler spécifiquement les protéines myristoylées. En effet, ils ont montré que l'incorporation dans les cellules d'un rapporteur chimique bioisostère de l'acide myristique, l'acide tetradécynoïque (aussi appelé YnMyr dans la suite de ce manuscrit), un acide gras à 14 carbones possédant un alcyne terminal, était possible et permettait de remplacer l'acide myristique naturellement présent dans la cellule (Figure II. 2).¹²⁹ Cette idée s'appuie sur les travaux de Boyle qui a montré l'incorporation d'acide myristique YnMyr dans les plantes.¹³⁰

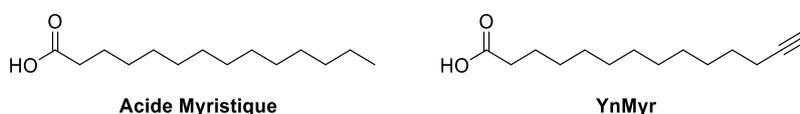


Figure II. 2. Structure de l'acide myristique et de son analogue YnMyr

Ainsi, il est possible de former *in situ* le partenaire YnMyr-CoA en remplacement du Myristoyl-CoA nécessaire à la myristoylation (Schéma II. 2). L'ajout d'un rapporteur chimique spécifiquement sur les protéines myristoylées a permis d'ouvrir la voie à des techniques d'identification de protéines basées

¹²⁹ W. P. Heal, S. R. Wickramasinghe, R. J. Leatherbarrow, E. W. Tate, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2308-2315.

¹³⁰ Boyle, P.C., Schwizer, S., Hind, S.R, *Plant Methods*, **2016**, *12*, 38-52

sur le fishing de protéine.

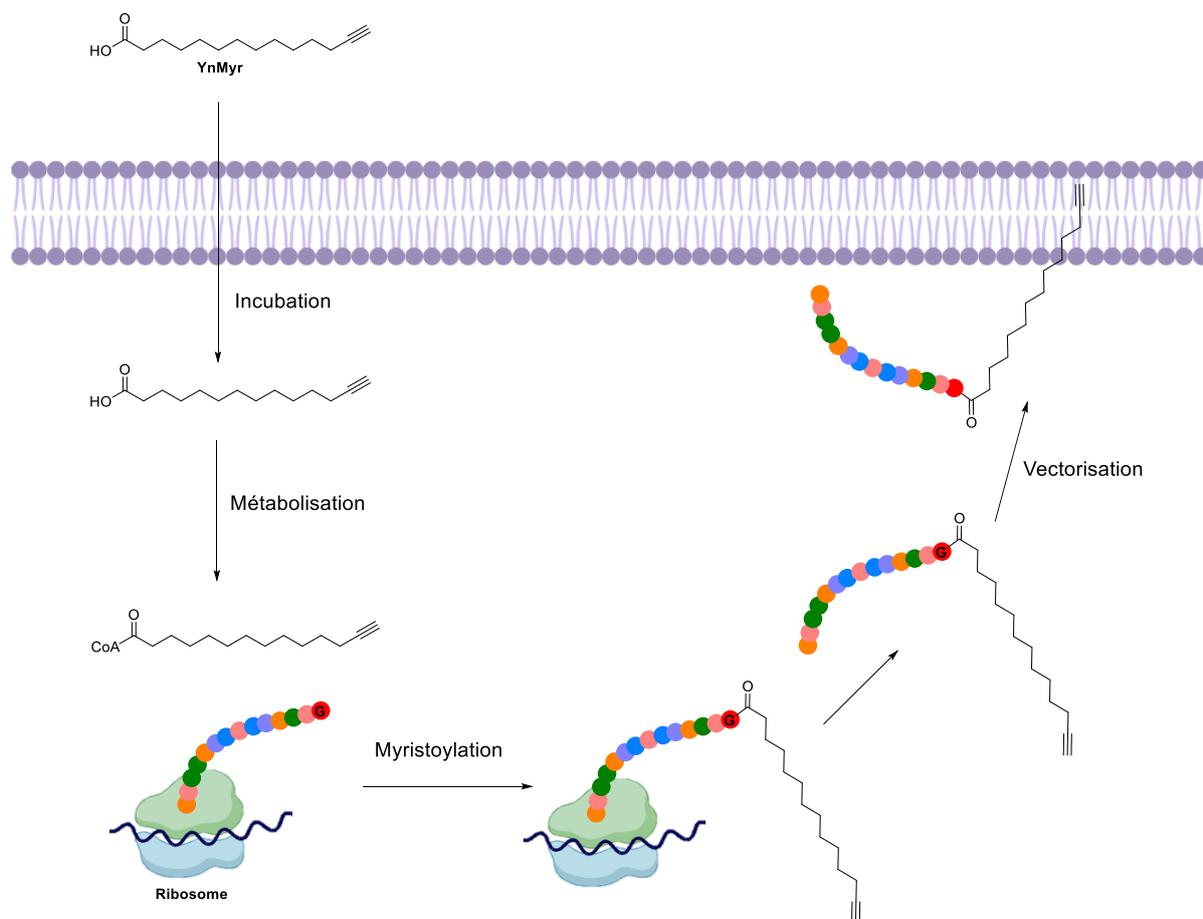


Schéma II. 2. Mécanisme d'incorporation de l'analogue YnMyr sur les protéines myristoylées

Ainsi, des cellules HeLa ont été traitées pendant 24 heures dans un milieu de culture contenant 20 μM de YnMyr. Après cette étape d'incorporation du rapporteur chimique, les cellules ont été broyées et une réaction de CuAAC a été menée sur le lysat impliquant une sonde azoture comportant un fluorophore Tétraméthylrhodamine (Tamra) ainsi qu'un motif biotine. La fonction azoture permet de cliquer les protéines myristoylées de manière spécifique, le fluorophore permet de les visualiser par gel SDS-Page et la biotine permet de capturer les protéines myristoylées sur des billes fonctionnalisées par de la streptavidine (Schéma II. 3) et de les analyser par spectrométrie de masse. Cette stratégie permet donc la visualisation des protéines et leur identification *in vivo*. Pour la visualisation sur gel, la réaction de CuAAC a été menée en présence de 100 μM de sonde, 1 mM de CuSO_4 , 100 μM de ligand TBTA et 1 mM de réducteur TCEP sur 100 μg de protéines pendant 1 heure. Le protocole de capture a ensuite eu lieu en ajoutant 15 μL de billes de streptavidine au milieu pendant 1h30. Après avoir récupéré les billes, elles sont lavées puis chauffées à 100 $^\circ\text{C}$ pendant 10 min pour décrocher les protéines de la streptavidine, l'échantillon de protéines récupéré est utilisé pour la visualisation sur gel. Concernant l'identification des protéines par spectrométrie de masse, le protocole de CuAAC est le même que vu précédemment mais le protocole de capture sur billes de streptavidine est réalisé sur

2 heures et le décrochage à lieu pendant 30 min à 60°C dans du bicarbonate d'ammonium. Une digestion sur trypsine permet alors le découpage de la protéine en peptides qui sont analysés en spectrométrie de masse.

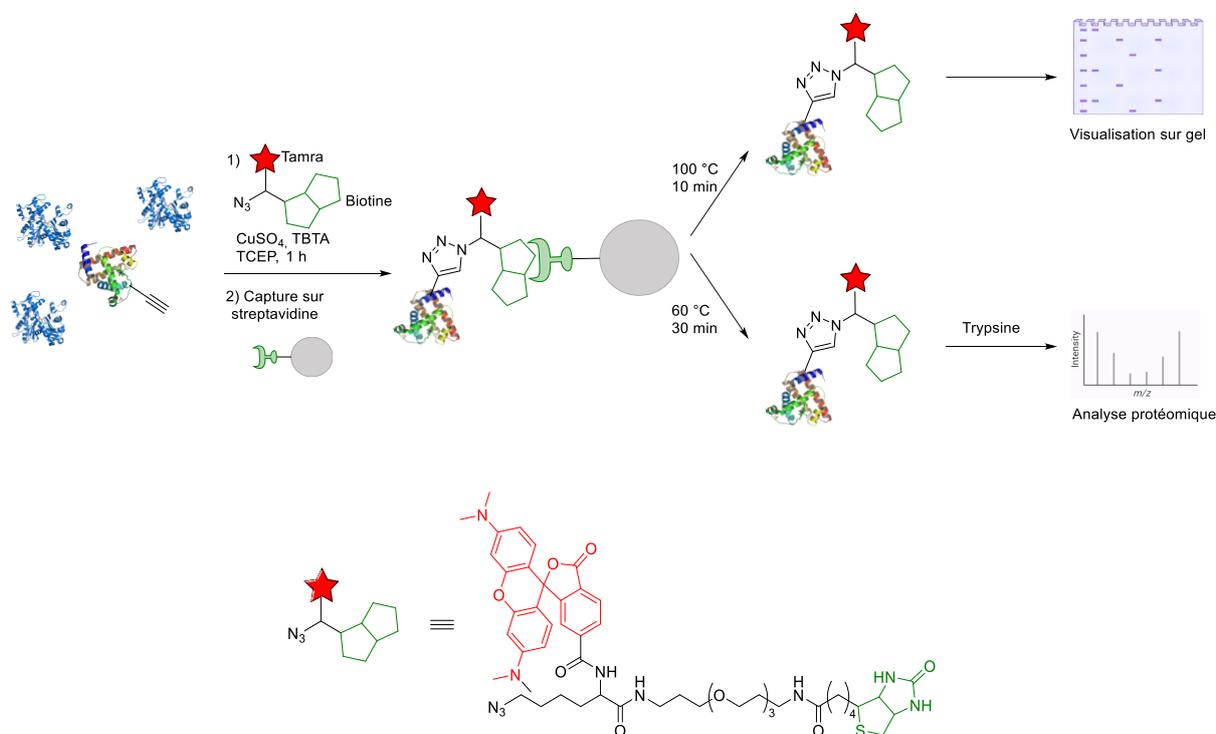


Schéma II. 3. Première stratégie de Tate pour identifier le Myristoylome

A l'issue de ces différentes étapes, l'analyse protéomique sur 4 répliques a permis d'identifier plus de 250 protéines.¹³¹ Néanmoins, il est important de noter que sur ces 250 protéines, environ 60% ne possédaient pas le motif N-Terminal glycine qui est nécessaire pour la myristoylation. L'équipe en a alors conclu que 60% des protéines capturées ne sont pas réellement myristoylées et qu'il s'agit de faux-positifs. 108 protéines ont été identifiées possédant le motif glycine. Mais les prédictions informatiques ont montré une corrélation « modérée » avec les bases de données (Myristoylator¹³² et MyrPredictor¹³³). Ces incertitudes sont dues expérimentalement à une non-spécificité lors de la capture des protéines. Comme expliqué en introduction, certaines macromolécules biologiques telles que les protéines sont naturellement biotinylées et sont donc capturées par la streptavidine alors même qu'il ne s'agit pas de protéines myristoylées. Des interactions non spécifiques avec le support

¹³¹ E. Thinon, R. A. Serwa, M. Broncel, J. A. Brannigan, U. Brassat, M. H. Wright, W. P. Heal, A. J. Wilkinson, D. J. Mann, E. W. Tate, *Nat. Commun.*, **2014**, 5, 4919.

¹³² Myristoylator, <http://web.expasy.org/myristoylator>

¹³³ MYR_Predictor, <http://mendel.imp.ac.at/myristate/suplpredictor.htm>

sont également possibles.

En 2016, la même équipe utilise cette même stratégie sur le parasite *Trypanosoma brucei*, responsable de la trypanosomiase (maladie du sommeil).¹³⁴ Grâce à la même sonde qu'utilisée précédemment, l'équipe a pu identifier 101 protéines dont 46 portant un N-terminal glycine nécessaire à la myristoylation. Les protéines identifiées sont des GTPases impliquées dans la modulation des signaux cellulaires, des phosphatases nécessaires au transport intracellulaire ou encore des ATPases impliquées dans la régulation du protéasome.

Dans ces deux cas, les auteurs rapportent un grand nombre de capture non spécifique par les billes de streptavidine. Cela peut s'expliquer d'une part par la capture de protéines naturellement biotinylées mais aussi par le protocole de décrochage des protéines de la streptavidine impliquant un chauffage qui peut dénaturer les protéines et ne pas permettre un décrochage de la totalité des protéines ancrées sur la résine des billes de streptavidine. La structure de la sonde ne comporte pas de lien clivable qui aurait permis un décrochage sélectif des protéines myristoylées en conditions douces.

Afin de contourner les limites de leur stratégie initiale, l'équipe de Tate a préparé de nouvelles sondes possédant cette fois-ci des liens clivables permettant de libérer les protéines myristoylées des billes par coupure enzymatique (Chapitre 1.3).¹³⁵ Ainsi 8 sondes ont été synthétisées, comportant une fonction azoture séparée d'une fonction biotine par un lien clivable composé d'un acide aminé étant une arginine, une lysine, une phénylalanine ou encore un acide aspartique.

¹³⁴ M. H. Wright, D. Paape, H. P. Price, D. F. Smith, E. W. Tate, *ACS Infect. Dis.*, **2016**, *2*, 427–441.

¹³⁵ M. Broncel, R. A. Serwa, P. Ciepla, E. Krause, M. J. Dallman, A. I. Magee, E. W. Tate, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 5948–5951.

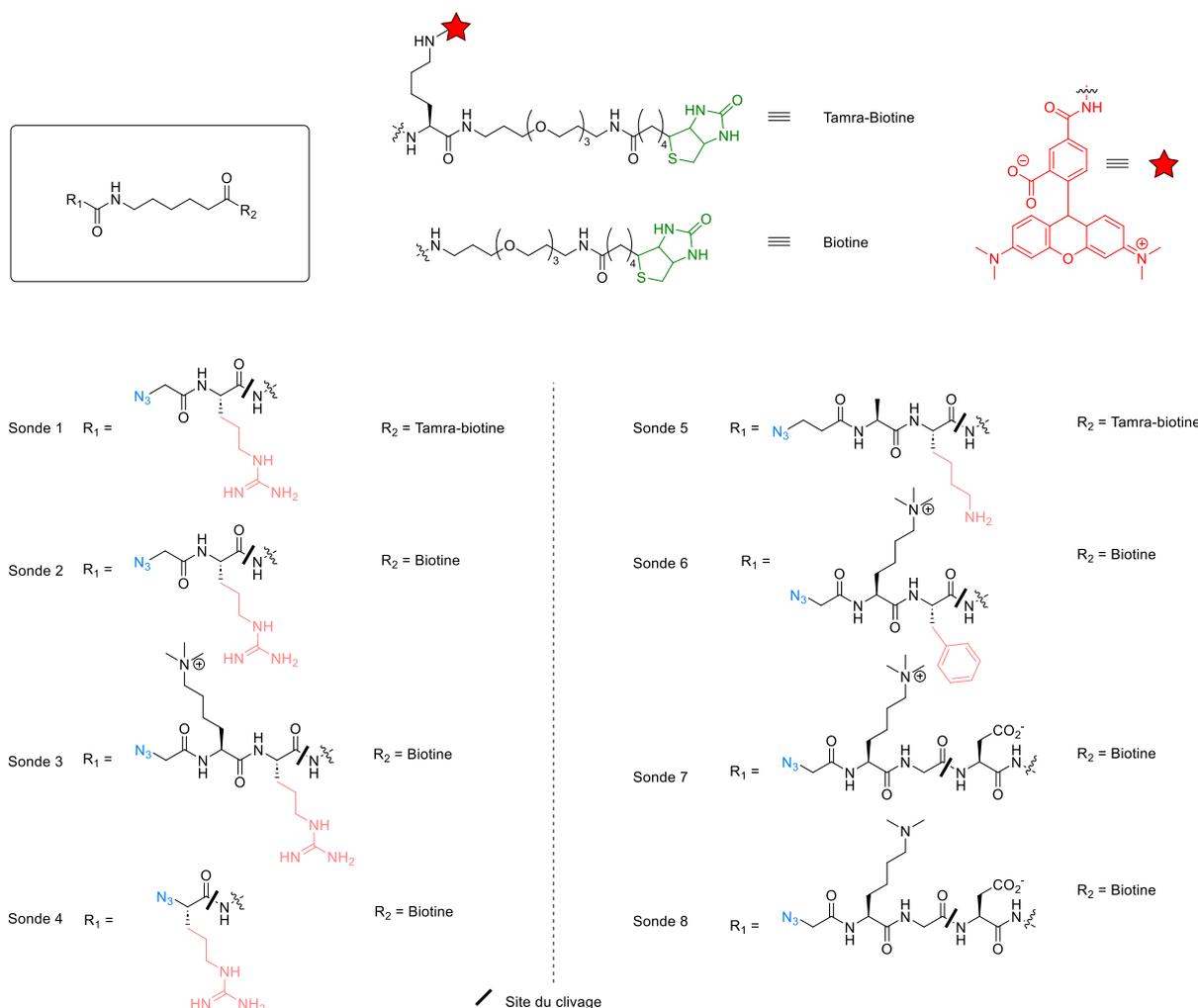


Figure II. 3. 8 sondes clivables enzymatiquement utilisées par Tate¹³⁵

Ces liens sont clivables par l'action d'enzymes telles que la trypsine ou la chymotrypsine sur la position C-terminal de ces acides aminés. Un premier essai de visualisation sur gel des protéines a été réalisé sur des cellules HEK293 traitées avec YnMyr en utilisant les 8 sondes. La capture a ensuite été réalisée avec des billes de streptavidine et un chauffage a permis de décrocher les protéines. Les analyses de Western Blot avec un anticorps reconnaissant la streptavidine a permis de visualiser sur gel des protéines myristoylées purifiées à partir des 8 sondes. Cette expérience a permis d'évaluer l'efficacité de la CuAAC des différentes sondes. Il a été montré que les sondes 7 et 8 étaient moins performantes que les autres sondes. La même expérience en utilisant cette fois le lien clivable pour décrocher les protéines des billes de streptavidine a permis d'évaluer le clivage enzymatique et d'identifier des protéines myristoylées. En tout, cette expérience a mis en évidence 38 protéines ayant une Glycine en position N-terminal encore jamais observées *in vivo*. La sonde 1 possédant un lien clivable arginine s'est révélée être la plus performante des 8 sondes et a permis d'identifier 33 protéines myristoylées sur les 38 à elle seule (Figure II. 4). Néanmoins, il est à noter que les auteurs ont rapporté un grand nombre de protéines identifiées ne portant pas de N-terminal Glycine (70%) qui correspondent à des captures aspécifiques. 30% de la totalité des protéines identifiées portaient un N-terminal glycine ce qui est 4 fois plus important que l'abondance naturelles de ces protéines (environ 7%).

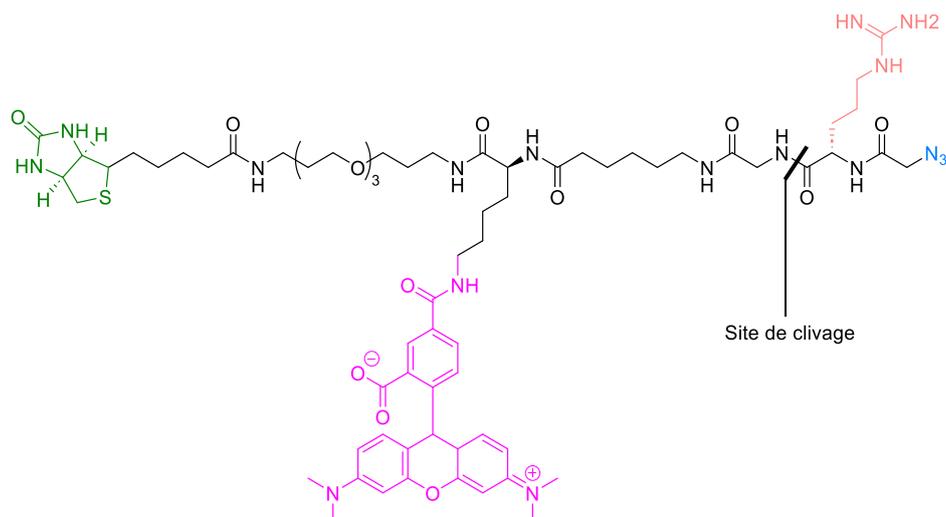


Figure II. 4. Exemple de sonde décrite par l'équipe de Tate possédant un lien clivable

L'enrichissement des protéines sur trois lignées cellulaires HEK293, HeLa et MCF7 par la sonde 1 a permis d'identifier 87 protéines myristoylées dont 47 avaient déjà été reportées. Cette même stratégie a aussi été utilisée sur des organismes vivants tels que le poisson zébrafish *Danio rerio* et a aussi permis d'identifier 56 nouvelles cibles de la myristoylation.

Pour résumer, les approches bioorthogonales pour le fishing de protéines myristoylées ont permis d'identifier une centaine de protéines dans des cellules humaines. Néanmoins, cela reste peu par rapport au total de protéines myristoylées estimé à environ 600. Cela peut s'expliquer d'une part par la conception des sondes chimiques trop peu performantes pour cliquer des protéines pouvant être à très faibles concentrations et d'autre part par le manque de spécificité de la stratégie de coupure. En effet, les enzymes utilisées peuvent également couper la plupart des protéines non myristoylées capturées. Cela implique alors un nombre considérable de résultats faux-positifs. Par ailleurs, la streptavidine étant elle-même une protéine, elle peut subir l'action de l'enzyme et ajouter des contaminants.

1.3) Notre approche pour l'étude du Myristoylome

Afin de proposer une nouvelle stratégie plus efficace permettant de contourner les limites des approches précédentes, nous avons imaginé de nouvelles sondes que nous espérons plus performantes pour la capture de protéines marquées par YnMyr, l'analogue de l'acide myristique portant un alcyne terminal (Figure II. 5). Ces sondes seront composées de 3 parties :

1) Un azoture chélatant le cuivre pour réagir avec les protéines fonctionnalisées par un alcyne *via* une

réaction de cycloaddition CuAAC. Comme décrits dans l'introduction de ce manuscrit, les azotures chélatants sont des azotures possédant un site de chélation du cuivre ce qui permet une activation intramoléculaire du dipôle. Ces azotures chélatants permettent d'accélérer la cinétique de la réaction CuAAC de manière considérable par rapport aux azotures classiques et par la même occasion de réduire la quantité de cuivre nécessaire. Par ailleurs, ils sont également capables de réagir à des concentrations en alcyne inférieure au micromolaire en milieux complexes ce qui est un avantage important pour permettre d'étudier les protéines myristoylées présentes en faibles concentrations.

2) Une biotine, impliquée dans la capture des protéines marquées sur des billes magnétiques et fonctionnalisées par de la streptavidine. Les billes de streptavidine magnétiques sont des billes composées d'un cœur d'oxyde de fer magnétique recouvert d'un polymère greffé par des streptavidines. Ces billes ont l'avantage d'être magnétiques et peuvent donc facilement être séparées du reste du lysat cellulaire grâce à un aimant. Les lavages ultérieurs sont aussi facilités.

3) Un lien clivable spécifique et efficace. Cette étape représente un défi de taille. En effet, l'affinité de la biotine pour la streptavidine est très élevée ($K_D = 10^{-15}$ M). Pour rompre cette interaction il est nécessaire d'utiliser des conditions drastiques qui peuvent dénaturer les protéines étudiées et surtout décrocher les protéines s'étant fixées de façon non spécifique sur les billes de streptavidine. Une alternative consiste à utiliser un lien clivable permettant de décrocher spécifiquement les protéines cibles dans des conditions plus douces. Dans le contexte de l'étude du Myristoylome, seuls des liens clivables enzymatiquement ont été employés mais cela présente plusieurs inconvénients comme nous l'avons détaillé dans le paragraphe précédent. En effet, l'enzyme peut aussi agir sur des protéines qui ont été capturées de façon non spécifique sur la streptavidine et ainsi entraîner des résultats faux positifs. Nous avons donc opté pour un lien clivable chimiquement basé sur l'utilisation d'iminosydnone qui peuvent réagir avec des cyclooctynes par une réaction de SPICC (Cf Chap I.III.2). Les iminosydnone ont d'ailleurs été utilisées dans des conditions de bioconjugaison pour la capture de protéines marquées par un alcyne.^{63,136}

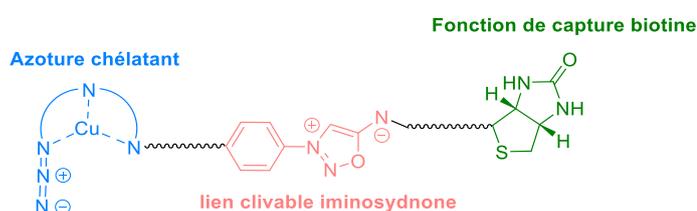


Figure II. 5. Structure générale des sondes de protein fishing

¹³⁶ S. Saidjalolov, E. Braud, Z. Edoov, L. Iannazzo, F. Rusconi, M. Riomet, A. Sallustrau, F. Taran, M. Arthur, M. Fonvielle, M. Etheve-Quellejeu, *Chem. Eur. J.*, **2021**, 27, 7687–7695

Le protein fishing du Myristoylome aura alors lieu en 4 étapes (**Schéma II. 4**):

- Incorporation de l'analogue l'acide myristique YnMyr par les voies métaboliques puis lyse des cellules
- Réaction de CuAAC entre l'azoture chélatant et l'alcyne
- Capture des protéines par les billes de streptavidine grâce à la biotine et purification
- Décrochage des protéines par réaction du lien clivable iminosydnone avec un cycloalcyne

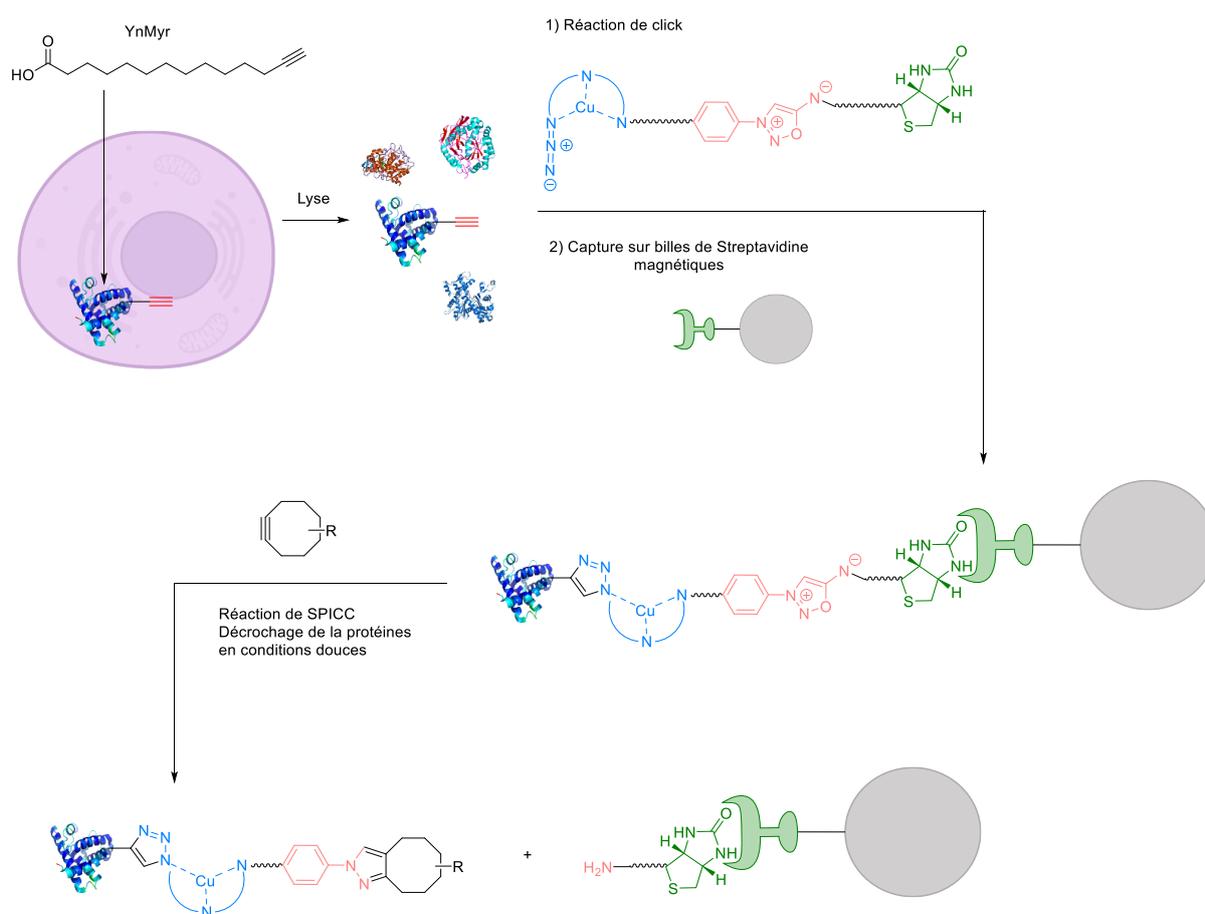


Schéma II. 4. Approche de fishing des protéines myristoylées proposée par le laboratoire

Dans ce contexte, notre approche consistera à valider chaque étape du protocole. Dans un premier temps, nous validerons l'étape d'incorporation de YnMyr dans les cellules. Nous synthétiserons dans un deuxième temps des sondes fluorescentes azotures et azotures chélatant pour valider l'efficacité supérieure des azotures chélatants. Enfin, nous synthétiserons des sondes biotinylées portant l'azoture chélatant le plus performant pour réaliser la capture sur billes de streptavidine et le décrochage par l'action de cyclooctyne (DBCO).

Dans l'optique de contribuer au déchiffrement du Myristoylome, nous avons collaboré avec l'équipe des Dr. Thierry Meinel et Dr. Carmela Giglione, qui travaillent sur l'identification du Myristoylome depuis de nombreuses années.

Le modèle cellulaire utilisé pour les tests biologiques de première intention est la lignée HEK293 surexprimant la protéine ARF6-Flag. La protéine ARF6 est une protéine d'environ 25 000 Da connue pour subir la myristoylation et l'ARF6-Flag qui est une protéine d'ARF6 portant une étiquette reconnaissable par un anticorps monoclonal spécifique. La culture de cellules surexprimant ARF6-Flag en présence de l'analogue d'acide myristique YnMyr permet d'intégrer une référence de protéine myristoylée que l'on peut suivre sur gel d'électrophorèse.

II) Comparaison des sondes azotures fluorescentes pour la visualisation des protéines myristoylées

II.1) Validation du protocole d'incorporation de YnMyr

Dans un premier temps, il a fallu démontrer l'incorporation de YnMyr sur la protéine ARF6-Flag. Pour cela, les cellules ont été cultivées en présence de YnMyr (20 μ M) pendant 24 heures puis lysées par sonication. Les lysats cellulaires ont alors été mis en réaction avec la sonde azoture-TAMRA-biotine utilisée par l'équipe de Tate à 0.1 M et en présence de CuSO_4 (1 mM), TCEP (1 mM) et THPTA (0.1 mM) (Figure II. 6). Nous avons choisi d'utiliser du TCEP en tant que réducteur du Cu(II) en Cu(I) car c'est le réactif utilisé par l'équipe de Tate pour les réactions de CuAAC dans les lysats cellulaires.

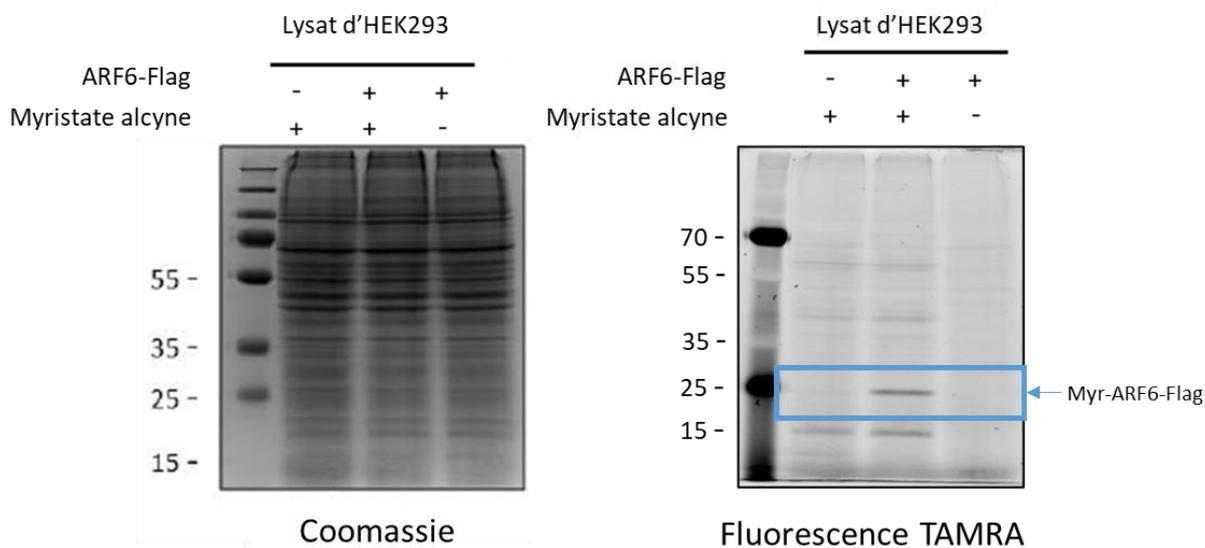
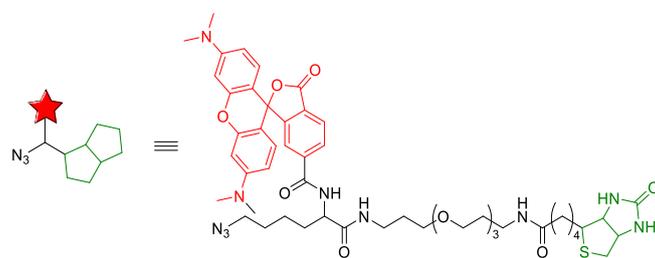
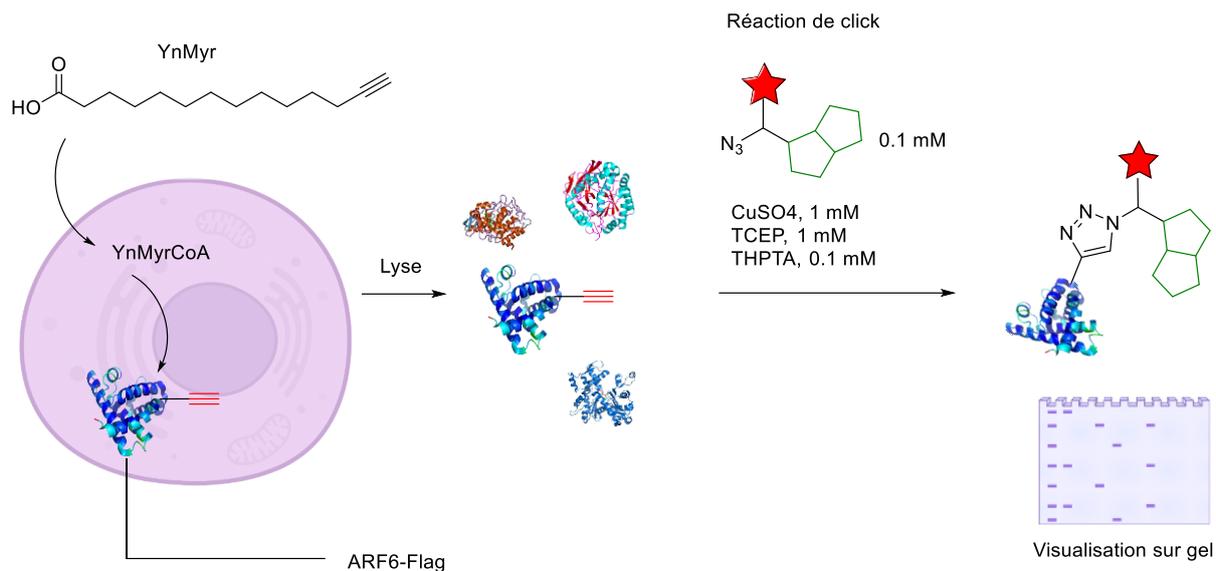


Figure II. 6. Visualisation par fluorescence sur gel des protéines myristoylées étiquetées TAMRA

La révélation par fluorescence du gel d'électrophorèse montre bien la présence d'une bande correspondant à la protéine ARF6 myristoylée. D'autres bandes moins intenses apparaissent également, elles pourraient correspondre à d'autres protéines myristoylées moins abondantes (car

non sur-exprimées). Ce résultat montre donc que YnMyr a bien été assimilé et utilisé par les mécanismes enzymatiques de myristoylation de ces cellules, il montre également que la sonde fluorescente de l'équipe de Tate est bien fonctionnelle. C'est donc ce modèle cellulaire que nous utiliserons pour la suite du projet, notamment pour comparer l'efficacité des diverses sondes.

II.2) Synthèse des sondes fluorescentes

Afin de confirmer l'efficacité des azotures chélatants par rapport aux azotures classiques, nous avons souhaité synthétiser 3 sondes portant chacune un fluorophore rhodamine (TAMRA, Figure II. 7). Une des sondes porte un azoture simple tandis que les deux autres sondes seront composées d'un azoture chélatant soit de structure bis-triazole qui a déjà montré de très bons résultats *in vitro* et permet d'augmenter significativement les cinétiques de réactions de CuAAC, soit un azoture chélatant de structure benzimidazole qui a lui aussi montré de très bons résultats en bioconjugaison.²⁰

La sonde fluorescente **SF1** est commercialement disponible et il s'agit de la sonde classiquement utilisée pour des réactions de click *in vitro* afin de visualiser la fluorescente sur gel.¹³⁷ Nous avons aussi tenté de synthétiser les sondes fluorescente SF2 et SF3 possédant des azotures chélatants.

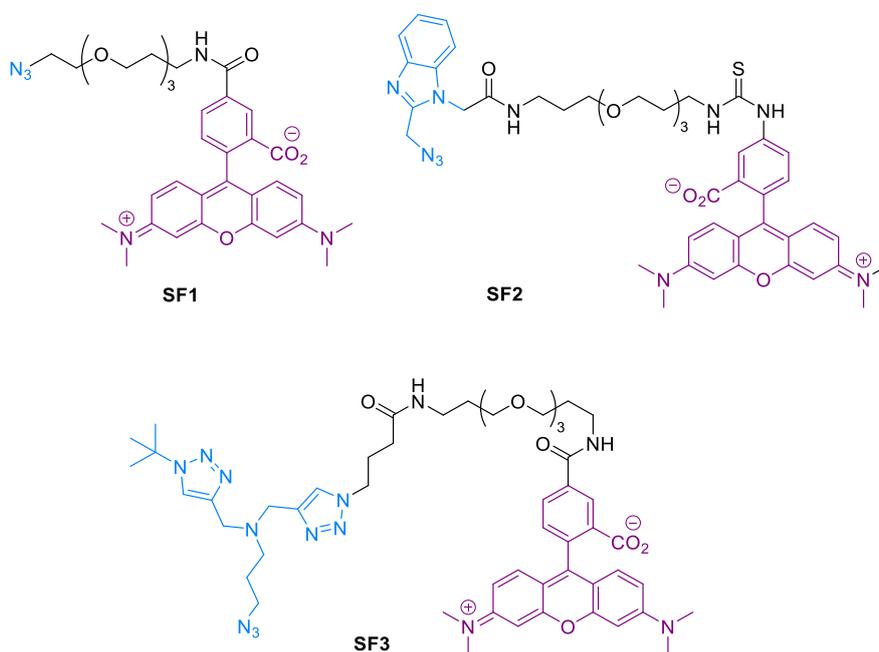


Figure II. 7. Structures des sondes fluorescentes

¹³⁷ N. Shindo, H. Fuchida, M. Sato, K. Watari, T. Shibata, K. Kuwata, C. Miura, K. Okamoto, Y. Hatsuyama, K. Tokunaga, S. Sakamoto, S. Morimoto, Y. Abe, M. Shiroishi, J. M. M. Caaveiro, T. Ueda, T. Tamura, N. Matsunaga, T. Nakao, S. Koyanagi, S. Ohdo, Y. Yamaguchi, I. Hamachi, M. Ono, A. Ojida, *Nat Chem Biol.*, **2019**, *15*, 250–258.

II.2.1) Synthèse de la sonde SF2

La synthèse de la sonde **SF2** commence par une première étape de *N*-alkylation du produit commercial 1H-Benzimidazole-2-méthanol par le iodoacétate d'éthyle en présence de carbonate de sodium avec un rendement correct de 58%. Une seconde étape permettant d'introduire la fonction azoture a lieu en présence de chlorure de mésyle pour activer l'alcool puis par ajout d'azoture de sodium avec un rendement de 37%. Enfin, une saponification permet d'obtenir l'intermédiaire **II.3** souhaité (Schéma II. 5).

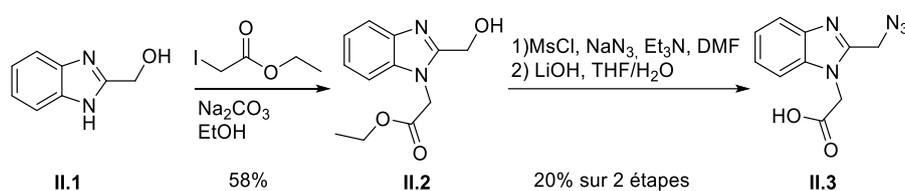


Schéma II. 5. Synthèse de l'intermédiaire II.3

La sonde **SF2** a été synthétisée à partir de cet intermédiaire **II.3** auquel nous avons greffé un PEG₃ par couplage peptidique pour obtenir **II.4** avec un rendement correct de 51%. Par la suite, nous avons fait réagir ce composé sur un Tamra isothiocyanate (Schéma II. 6). Pour cette étape, la purification a été effectuée par HPLC préparatrice permettant d'isoler un mélange de deux régioisomères provenant du Tamra commercial vendu sous forme de mélange de régioisomères. La RMN du produit a permis de conclure quant à la pureté du produit mais a aussi montré des premiers signes de dégradations après seulement quelques heures. Nous n'avons donc pas pu utiliser cette sonde dans le reste du projet. Il est difficile de rationaliser cette instabilité. Une étude en LC-MS pourrait être réalisée afin de comprendre ce phénomène de dégradation. D'autres modes de couplage du fluorophore TAMRA pourraient être explorés mais nous n'avons pas pu le faire faute de temps.

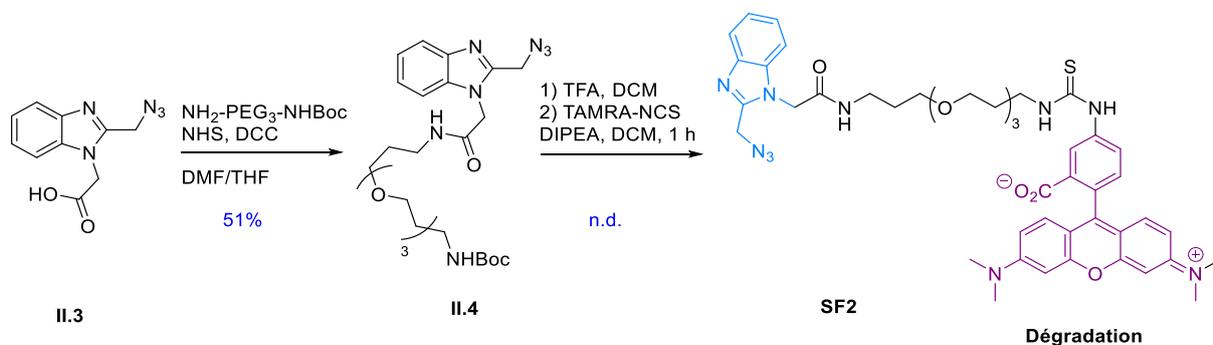


Schéma II. 6. Synthèse de la sonde SF2

II.2.2) Synthèse de la sonde SF3

L'azoture chélatant bis-triazole a déjà été synthétisé en 2014 dans notre laboratoire avec un rendement global très faible de 2.4%.²⁰ En effet, il est très compliqué de synthétiser des triazoles dissymétriques en peu d'étapes avec des bons rendements. Ainsi, à l'origine, la voie de synthèse consistait en une première réaction de CuAAC entre l'azidobutanoate d'éthyle et le composé **II.5** puis une seconde réaction de CuAAC avec l'azoture *tert*-butylique pour former **II.7** (Schéma II. 7). Enfin, une activation d'alcool par du chlorure de mésyle et une substitution par l'azoture de sodium ont permis d'obtenir l'azoture chélatant **II.8**.

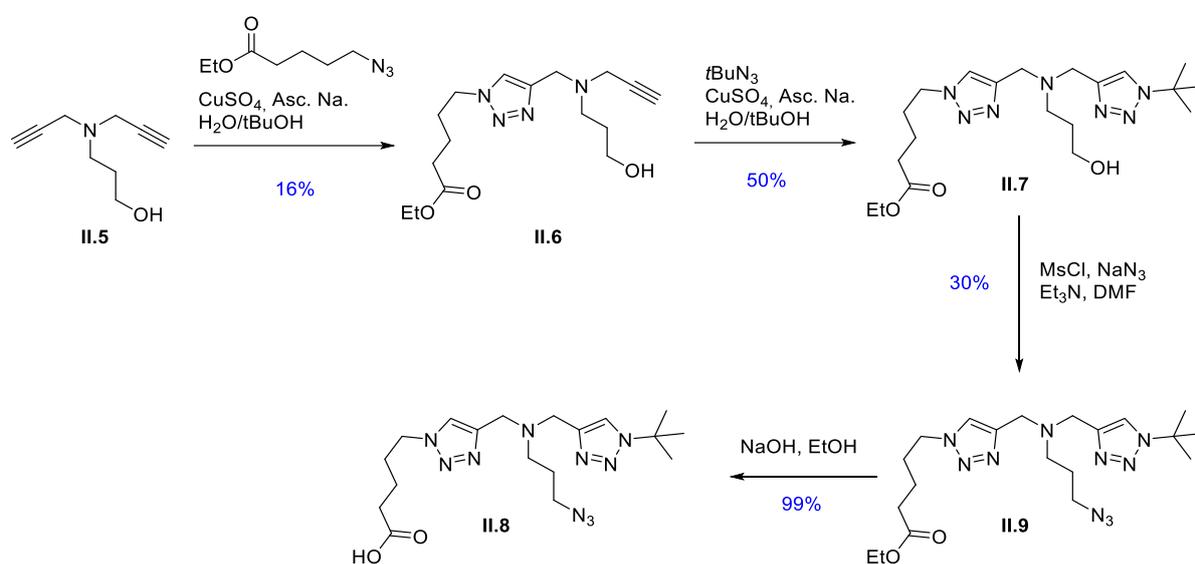


Schéma II. 7. Première voie de synthèse de l'azoture chélatant

Cette voie de synthèse ne permet pas d'obtenir le composé **II.8** en quantité suffisante. Lors de travaux ultérieurs, de nombreux efforts ont été réalisés par le Dr Antoine Sallustrau de notre laboratoire pour mettre au point une nouvelle voie de synthèse plus performante¹³⁸ que nous avons décidé d'utiliser pour la préparation de la sonde bis-triazole TAMRA **SF3**. La synthèse convergente décrite dans le Schéma II. 8 est basée sur une étape clé d'amination réductrice pour obtenir **II.12**. L'alcyne terminal est alors engagé dans une réaction de CuAAC avec le *t*BuN₃ pour former le bistriazole **II.13**. C'est à partir de cet intermédiaire **II.13** encore disponible au laboratoire, que nous avons pu continuer la synthèse en activant la fonction alcool pour former l'azoture correspondant par une réaction de

¹³⁸ A. Sallustrau, S. Bregant, C. Chollet, D. Audisio, F. Taran, *Chem. Commun.*, **2017**, 53, 7890–7893.

substitution nucléophile. Seul l'activation sous forme de phosphonate a donné de bons résultats.¹³⁸ Ainsi le traitement de **II.13** par $(\text{PhO})_2\text{POCl}$ en milieu basique suivi d'une substitution par NaN_3 et d'une saponification de la fonction ester ont permis d'obtenir l'azoture chélatant **II.14** en 24% pour les 3 étapes.

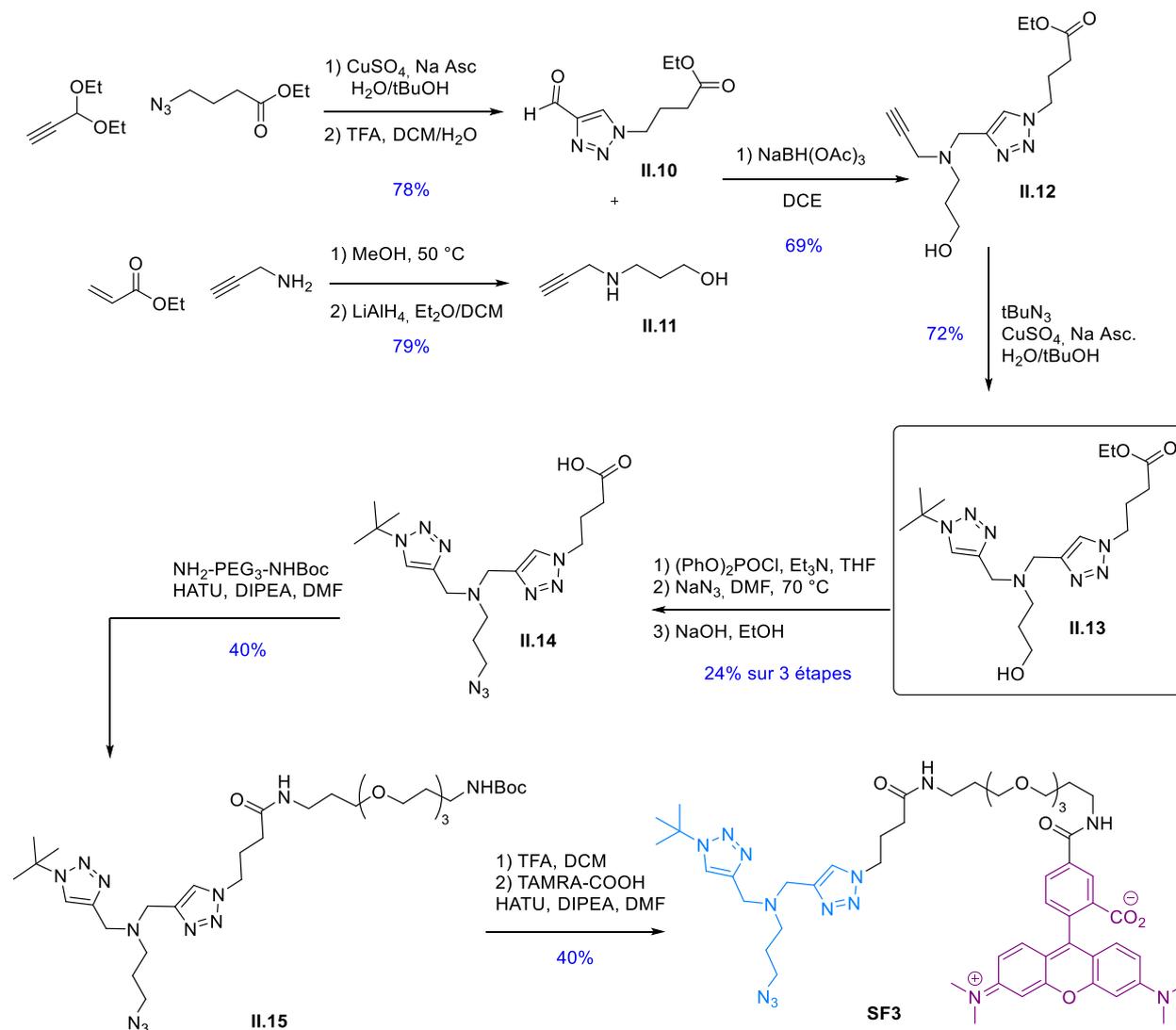


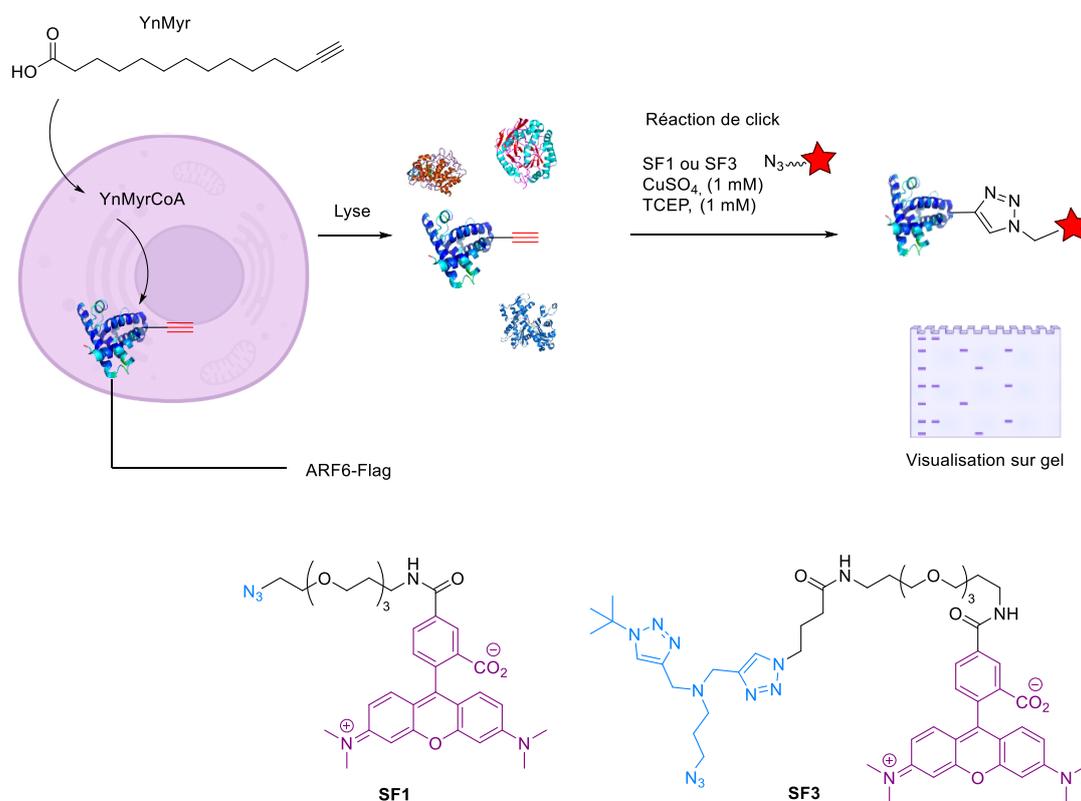
Schéma II. 8. Synthèse de la sonde SF3

A partir de cet azoture chélatant **II.14**, un couplage avec la diamine-PEG₃ monoprotégée a été réalisé. La déprotection du groupement Boc en milieu acide suivi d'un couplage avec un Tamra-Acide permet alors d'obtenir l'azoture chélatant bis triazole **SF3**.

Les deux sondes fluorescente **SF1** et **SF3** en main, nous avons comparé leur efficacité respective pour réagir avec des protéines myristoylées modèles (ARF-6) à des concentrations de plus en plus faibles.

II.3) Comparaison des sondes fluorescentes

Les tests de comparaison entre l'azoture **SF1** et l'azoture **SF3** chélatant ont été réalisés en collaboration avec l'I2BC. Des cellules ont été incubées avec YnMyr et les sondes fluorescente **SF1** et **SF3** ont été ajoutés aux lysats cellulaires d'HEK293 à plusieurs concentrations (0, 5, 25, 100, 200 μM) en présence de cuivre (1 mM) et de TCEP (1 mM). Les gels d'électrophorèses ci-dessous montrent bien que la sonde **SF3** est plus performante (Figure II. 8). En effet, la protéine ARF6 surexprimée est visible uniquement lorsque 100 μM de la sonde SF1 sont utilisés alors que pour la sonde portant un azoture chélatant SF3, la concentration en sonde peut être diminuée jusqu'à 5 μM . De plus, à concentration égale en sonde, il apparait nettement que le signal d'ARF6 est bien supérieur avec la sonde **SF3**. Une mesure de l'intensité de la fluorescence a permis de conclure que la sonde **SF3** augmente le signal d'un facteur 8. L'intensité des bandes de fluorescence sur gel étant corrélé au nombre de protéines, on peut affirmer que les azotures chélatants sont plus performants que les azotures simples et qu'à concentration égale, l'azoture chélatant est capable de faire la réaction de click avec plus de protéines. Par ailleurs, la diminution de la concentration en sonde fluorescente permet de diminuer le bruit de fond et d'optimiser le rapport signal sur bruit. Grâce à cette expérience nous avons pu montrer que l'azoture chélatant est bien plus performant que les azotures simples et ce résultat nous a fortement encouragé pour la suite de l'étude.



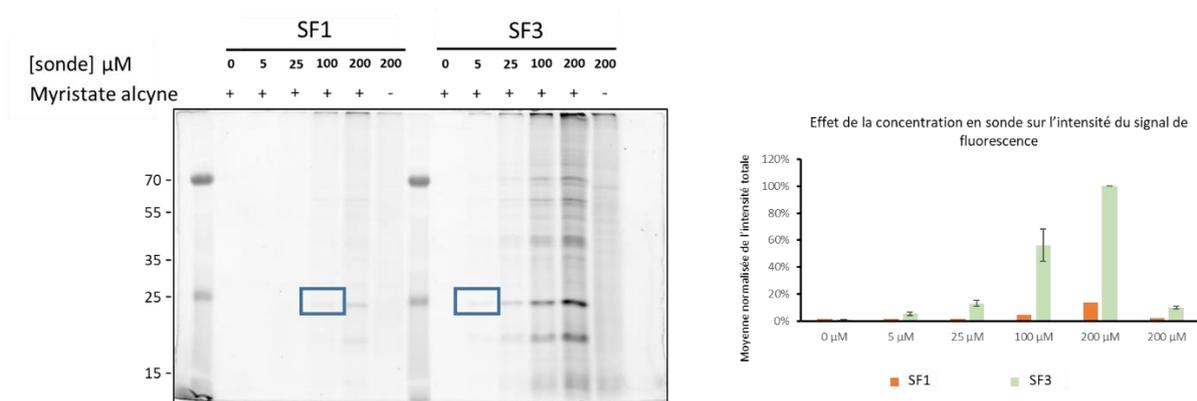


Figure II. 8. A. Visualisation par fluorescence sur gel des sondes fluorescentes SF1 et SF3. [Sonde] = 0, 5, 25, 100, 200 μM ; [CuSO₄] = 1 mM; [TCEP] = 1 mM., B. Graphique de l'intensité de fluorescence relative des bandes observées sur gel d'électrophorèse.

III) Synthèse et utilisation des sondes pour le fishing de protéines myristoylées

Dans l'optique de réaliser le fishing de protéines myristoylées, nous avons synthétisé 3 sondes biotinylées (Figure II. 9). Comme introduit précédemment, chaque sonde sera composée de 3 parties : un azoture permettant la réaction de CuAAC, une iminosydnone utilisée comme lien clivable, et une biotine pour la capture sur billes magnétiques de streptavidine. La différence structurale entre ces sondes est située au niveau de l'azoture. La première sonde **II-S1** sera composée d'un azoture non chélatant utilisé comme référence. La deuxième sonde **II-S2** possédera un azoture chélatant benzimidazole et la troisième sonde **II-S3** possédera un azoture chélatant bis-triazole. Le lien clivable iminosydnone et la biotine seront séparés par un espaceur PEG (polyéthylène glycol). Nous avons choisi d'utiliser un PEG₁₂ en tant qu'espaceur. En effet, la capture se fait sur des billes de streptavidine très encombrante, il est donc nécessaire que le lien clivable soit éloigné des billes pour réagir avec le cycloalcyne sans problème d'accessibilité causé par les billes de streptavidine.

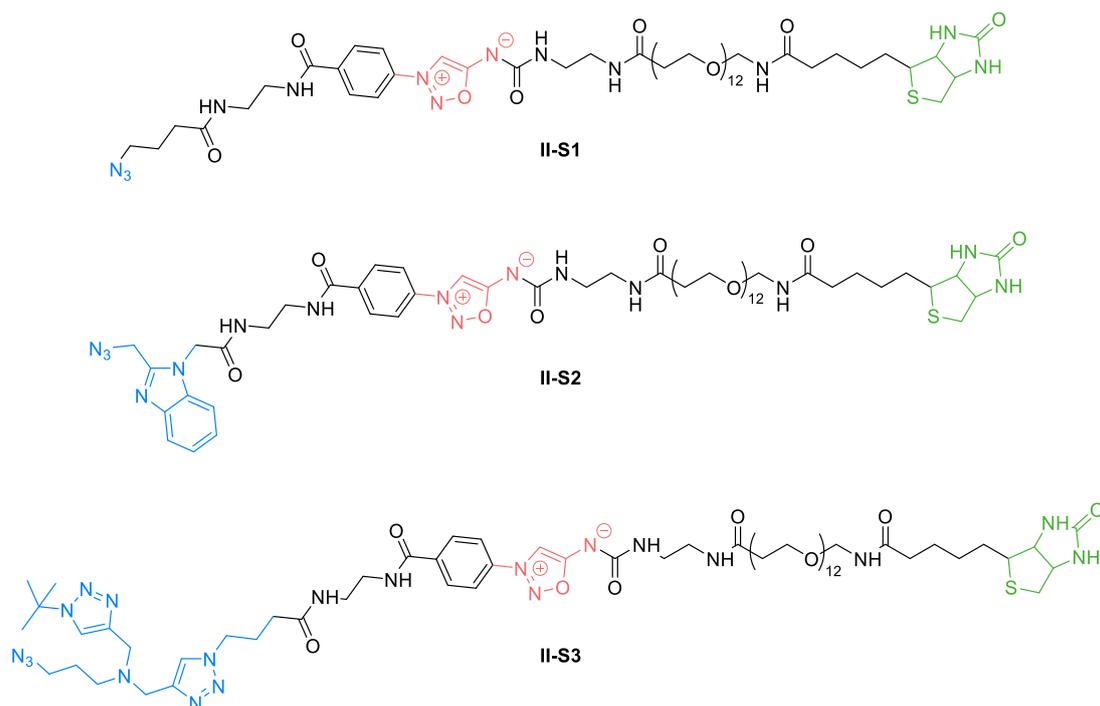


Figure II. 9. Structures des sondes pour le fishing des protéines myristoylées

Le lien clivable est composé d'une structure mésoionique iminosynone fonctionnalisée de part et d'autre par l'azoture et la biotine (Figure II. 11). Nous avons décidé d'utiliser comme bloc de synthèse une iminosynone fonctionnalisée par une fonction acide carboxylique afin de pouvoir y coupler l'azoture chélatant possédant une amine terminale et d'autre part une fonction amine permettant de coupler la biotine commerciale activée sous forme *N*-hydroxysuccinimide.

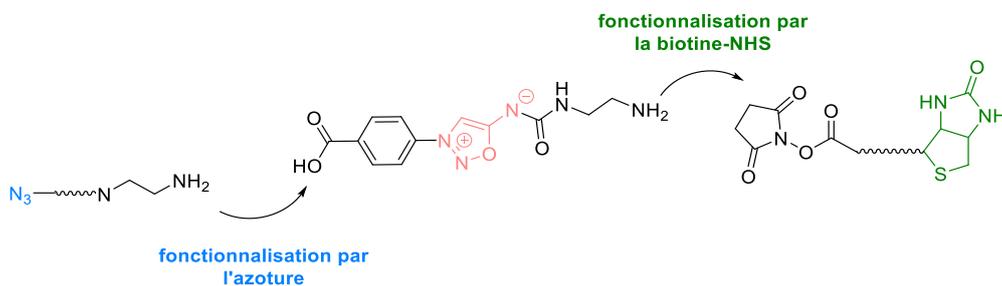


Figure II. 10. Assemblage des blocs de synthèse pour la préparation des sondes biotinylées

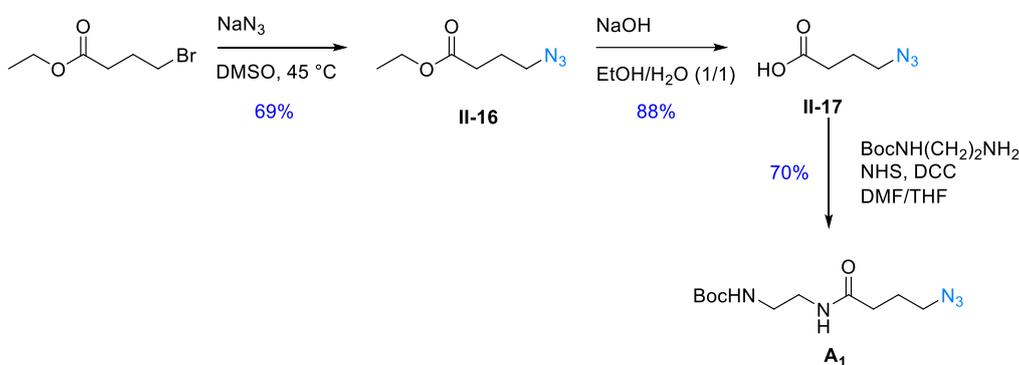
III.1) Synthèse des sondes

La synthèse des sondes sera décrite en 3 parties. Une première partie décrira la synthèse des azotures, une seconde partie décrira la synthèse du lien clivable et enfin une dernière partie concernera l'assemblage des building blocks.

III.1.1) Synthèse des azotures

III.1.1.a) Azoture classique de II-S1

L'azoture A_1 de la sonde II-S1 n'est pas chélatant. Il a été le plus simple à synthétiser à partir du bromobutyrate d'éthyle par réaction avec l'azoture de sodium dans le DMSO à 45 °C (Schéma II. 9). Cette réaction de substitution nucléophile a permis d'obtenir le composé II-16 qui a ensuite été saponifié. Enfin, la dernière étape consiste à réaliser un couplage peptidique entre un espaceur éthylènediamine et l'azoture II-17 en présence de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) et de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) permettant d'obtenir l'azoture A_1 en quantité suffisante pour les développements synthétiques ultérieurs.

Schéma II. 9. Synthèse de l'azoture A_1

III.1.1.b) Azoture chélatant de II-S2

L'azoture chélatant CA_2 de la sonde II-S2 est synthétisé à partir du composé II-3 déjà utilisé pour la sonde fluorescente SF2. Ce composé a été engagé dans une réaction de couplage avec l'espacer éthylènediamine monoprotégé par un groupement Boc en présence de NHS et de DCC pour obtenir l'azoture chélatant CA_2 (Schéma II. 10).

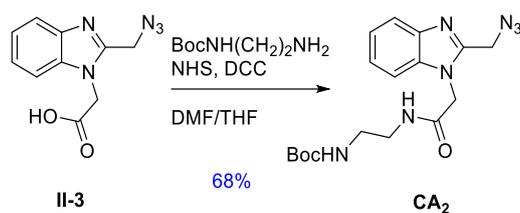


Schéma II. 10. Synthèse de l'azoture chélatant CA₂

III.1.1.c) Azoture chélatant de II-S3

L'azoture chélatant CA₃ a été obtenu à partir du composé II-14 déjà utilisé pour la synthèse des sondes fluorescentes sur lequel un couplage a été réalisé avec l'espaceur éthylènediamine monoprotégé (Schéma II. 11).

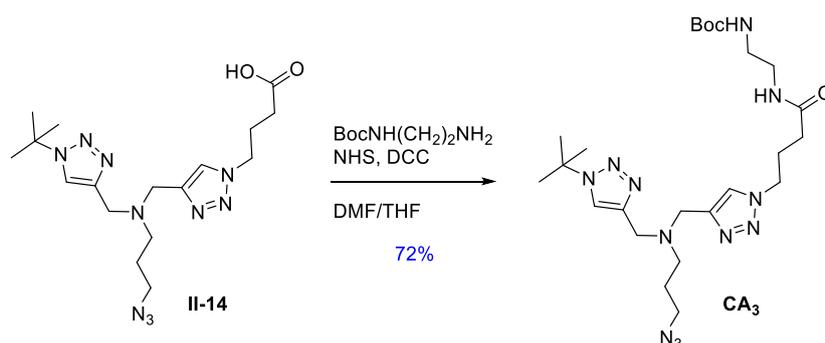


Schéma II. 11. Synthèse de l'azoture chélatant CA₃

Ces étapes de synthèse ont permis d'obtenir chaque azoture désiré. L'étape suivante a consisté à synthétiser le lien clivable iminosydnone.

III.1.2) Synthèse du lien clivable

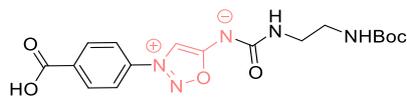


Figure II. 11. Structure du lien clivable

Pour la synthèse de ce building block, plusieurs voies de synthèse ont été testées. La première tentative a consisté à préparer la phényl iminosynone portant un ester éthylique en position *para* de la syndone. L'iminosynone **II-19** est préparée par une attaque nucléophile du chloroacétamide sur l'aminobenzoate d'éthyle. Une étape de nitrosylation de l'amine et de cyclisation avec Tf_2O permet d'obtenir le sel d'iminosynone correspondant (Schéma II. 12).

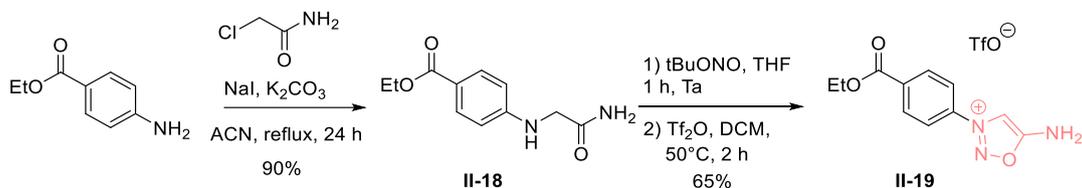


Schéma II. 12. Synthèse du composé II-19

Par la suite, une activation de l'amine exocyclique a été tentée avec du 1,1'-Carbonyldiimidazole (CDI) puis par l'ajout d'iodure de méthyle. L'imidazolium ainsi obtenu est directement engagé dans la réaction suivante en présence de *N*-Boc-éthylènediamine mais sans succès, seule une dégradation de l'iminosynone a été observée (Schéma II. 13).

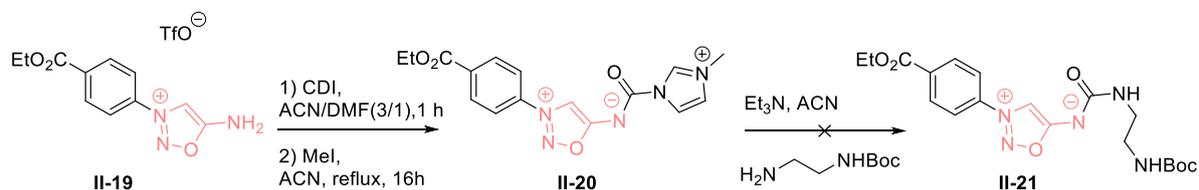


Schéma II. 13. Tentative de synthèse du composé II-21

Une nouvelle voie de synthèse a été alors envisagée pour synthétiser le composé **II-25**. Une fonction

urée a été introduite sur le sel de iodo-phényle iminosydnone **II-22**. Pour cela, l'isocyanate **II-23** a été formé *in-situ* à partir du *N*-Boc-éthylènediamine et de triphosgène, et a réagi avec l'amine libre de l'iminosydnone (Schéma II. 14) pour former **II-24**. Une réaction pallado-catalysée en présence de monoxyde de carbone dans l'éthanol a ensuite permis la carbonylation de l'iminosydnone pour obtenir l'ester éthylique **II-21** avec un bon rendement de 97%. Cette étape a été complexe à mettre en œuvre. En effet, pour des raisons encore peu claires, la montée en échelle entraîne des chutes de rendements. De plus, la purification doit se faire rapidement pour éviter toute dégradation. Enfin, une réaction de saponification réalisée en 10 minutes permet d'obtenir l'acide souhaité **II-25**. Finalement, le lien clivable a été obtenu avec un bon rendement global de 47% sur 3 étapes.

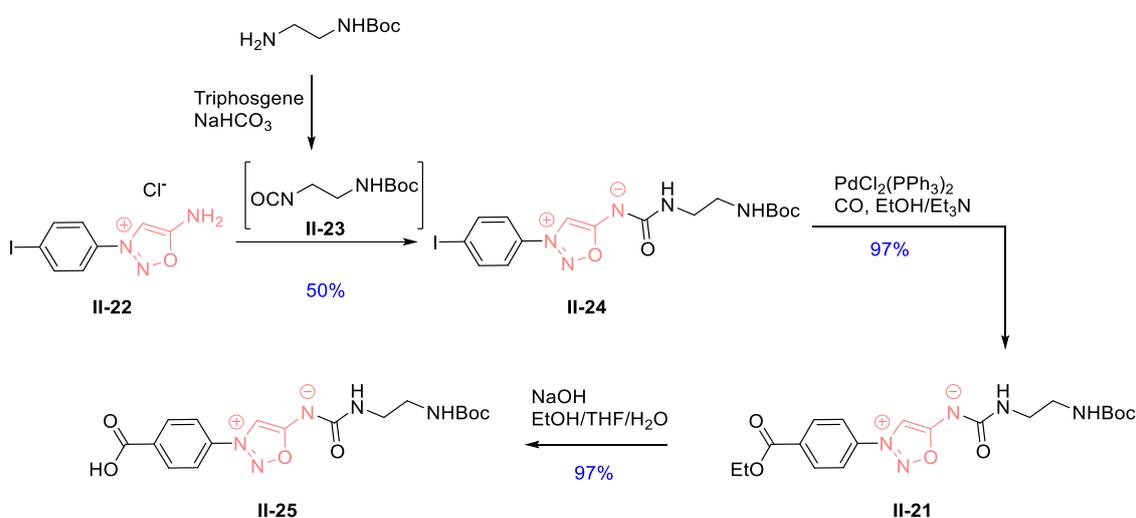


Schéma II. 14. Nouvelle voie de synthèse de l'intermédiaire **II-25**

Après avoir synthétisé les azotures chélatants d'une part et le lien clivable d'autre part, nous avons assemblé les trois parties afin d'obtenir les sondes souhaitées.

III.1.3) Assemblage des building blocks

Le composé NHS-PEG₁₂-Biotine est un composé commercial coûteux (1929 €/g). Pour cette raison, nous avons décidé de l'incorporer lors de la dernière étape de synthèse afin de perdre le minimum de matière. La première étape de l'assemblage a donc été de coupler les azotures avec le lien clivable **II-25** (Schéma II. 15). Pour cela, les groupements protecteurs Boc présents sur les building block azotures ont été déprotégés à l'aide d'acide trifluoroacétique (TFA) et le couplage a été réalisé avec du HATU (hexafluorophosphate d'*O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium) un agent de

couplage capable de générer un ester activé à partir d'acide carboxylique en présence de DIPEA.

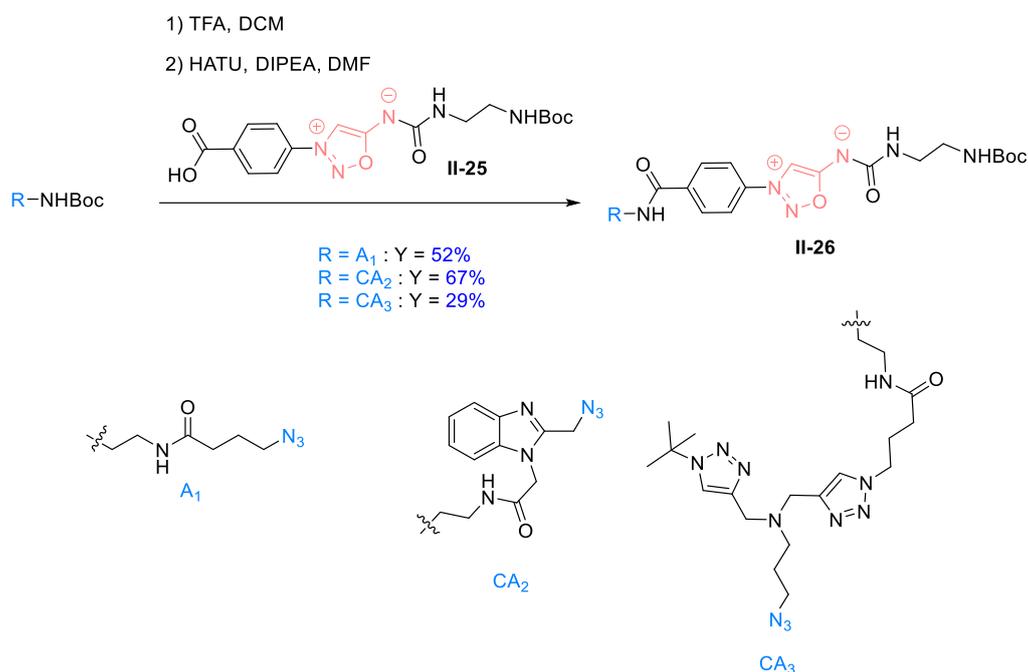


Schéma II. 15. Voie de synthèse pour le couplage entre l'azoture et le lien clivable

Les rendements de cette étape varient en fonction de l'azoture utilisé et sont compris entre 29% et 67%, le rendement le plus faible étant obtenu logiquement avec l'amine la plus encombrée CA3. Les composés **II-26CA2** et **II-26CA3** ont été purifiés par HPLC préparatrice pour obtenir des composés les plus purs possible. Enfin, la dernière étape, le couplage entre les intermédiaires **II-26** et le composé NHS-PEG₁₂-Biotine a pu être réalisé en présence de triéthanolamine après déprotection du groupement Boc par le TFA (Schéma II. 16).

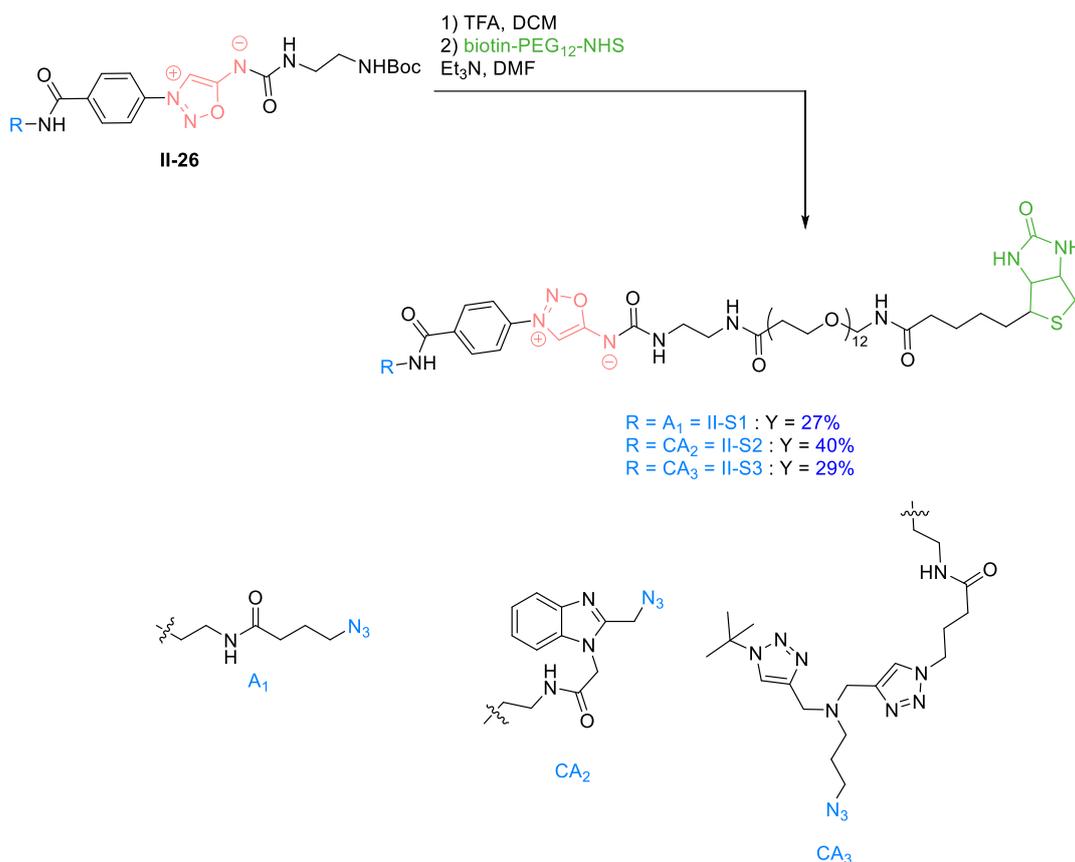


Schéma II. 16. Couplage avec la biotine, obtention des sondes II-S1, II-S2 et II-S3

Les rendements obtenus sont modérés entre 24 et 29%. Pour cette étape aussi, la purification a été réalisée sur HPLC préparatrice.

Ces sondes seront utilisées pour le protein fishing du Myristoylome. Au préalable, nous avons souhaité comparer l'efficacité des sondes chélatantes **II-S2** et **II-S3** et de la sonde non chélatante **II-S1**.

III.2) Comparaison des sondes et mise au point du protocole de CuAAC

Avec ces sondes en notre possession, nous avons souhaité identifier quel azoture chélatant possédait les meilleures performances de click. Ce travail a été réalisé par Paul Monassa, doctorant dans l'équipe de Thierry Meinel à l'I2BC. Dans un premier temps, un essai de révélation sur gel d'électrophorèse des protéines myristoylées à l'aide des sondes biotinylées a été réalisé sur le modèle de cellules surexprimant la protéine ARF6. Le gel a ensuite été transféré sur membrane PVDG et traité avec une streptavidine marquée par un fluorophore (AlexaFluor 635) permettant de révéler les protéines portant une biotine. Dans un premier temps, nous avons comparé l'efficacité de la réaction de CuAAC en comparant la sonde non chélatante **II-S1** et la sonde chélatante **II-S2** avec 1 mM de CuSO₄ et de réducteur TCEP.

Les résultats obtenus avec la sonde non chélatante II-S1 sont peu concluants. En effet, même avec des concentrations en sonde élevées (500 μM), aucun signal de fluorescence correspondant à la protéine ARF6 n'a été observé (Figure II. 12). En revanche, la capture réalisée en présence de la sonde chélatante **II-S2** a montré des résultats très encourageants, montrant l'apparition de bandes à 25 kDa correspondant à la protéine ARF6 jusqu'à des concentrations en sonde de 25 μM . Cette expérience a permis de confirmer la bonne réactivité des sondes biotinylées possédant un azoture chélatant.

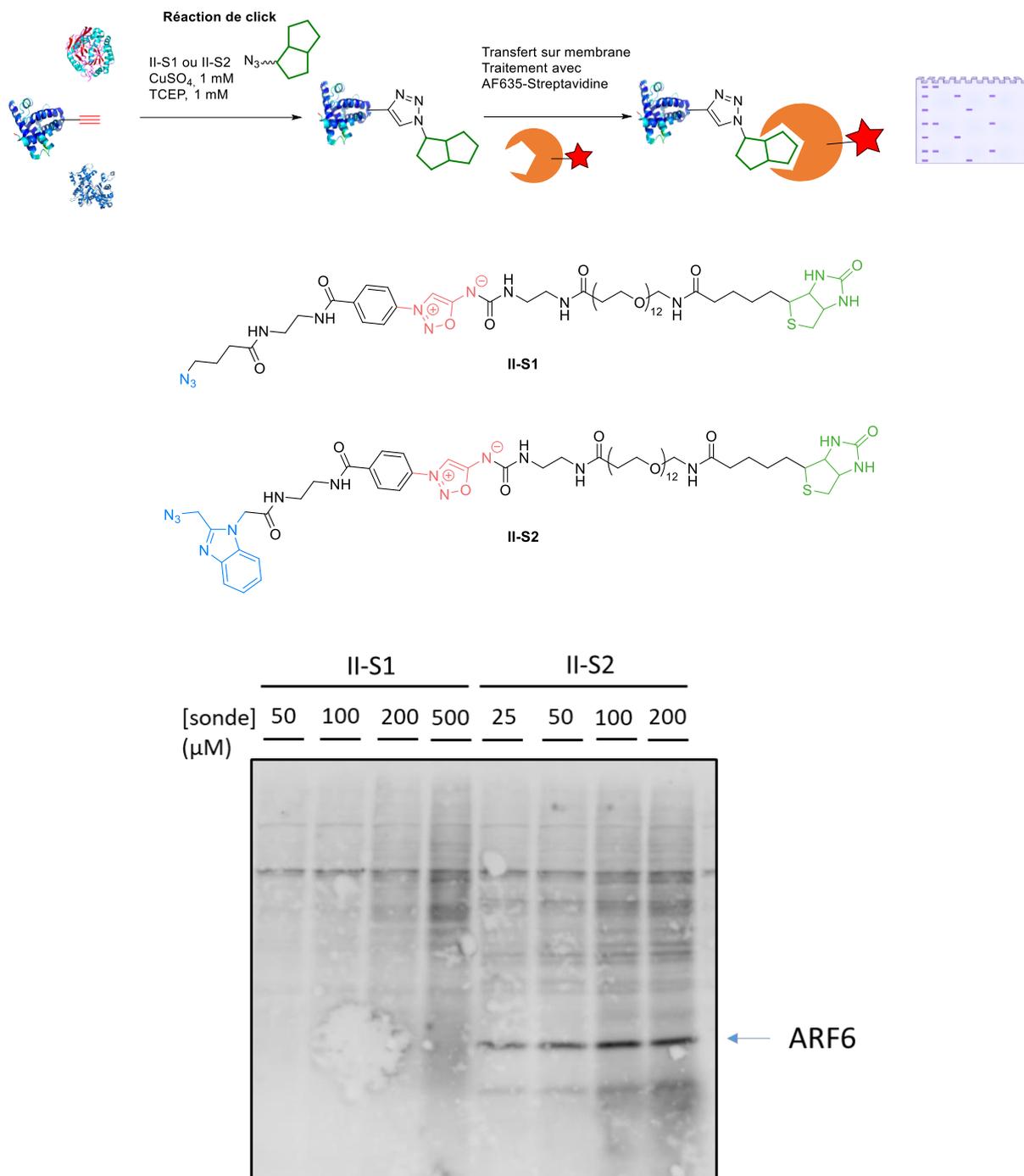


Figure II. 12. Visualisation sur gel de la protéine ARF6-Alcyne surexprimée dans un milieu complexe révélée par AF635-Streptavidin. [Sonde] = 25, 50, 100, 200, 500 μM ; $[\text{CuSO}_4]$ = 1 mM ; [TCEP] = 1 mM. Pour la sonde II-S1 : [THPTA] = 1 mM, 1h30.

ARF6 mise à part, il est important de noter que d'autres bandes de fluorescence sont également visibles que ce soit avec la sonde **II-S1** ou avec **II-S2**. Cela peut être expliqué par deux raisons. Tout d'abord, nous pouvons faire l'hypothèse que les bandes fluorescentes communes aux deux sondes sont issues de la révélation de protéines biotinylées naturellement mais non myristoylées. Quant aux bandes de fluorescence observées uniquement lors de l'utilisation de la sonde chélatante **II-S2**, il peut s'agir de la détection de protéines myristoylées autres que l'ARF6.

Par la suite, nous avons souhaité comparer les deux sondes chélatantes à différentes concentrations. Le gel d'électrophorèse obtenu a permis de montrer que l'utilisation de la sonde **II-S2** permettait d'obtenir un signal de fluorescence relativement proche de celui de **II-S3** à partir de 100 μM . Cependant, lorsque la concentration en sondes est plus basse que 25 μM on observe une meilleure réactivité de la sonde **II-S2** (Figure II. 13).

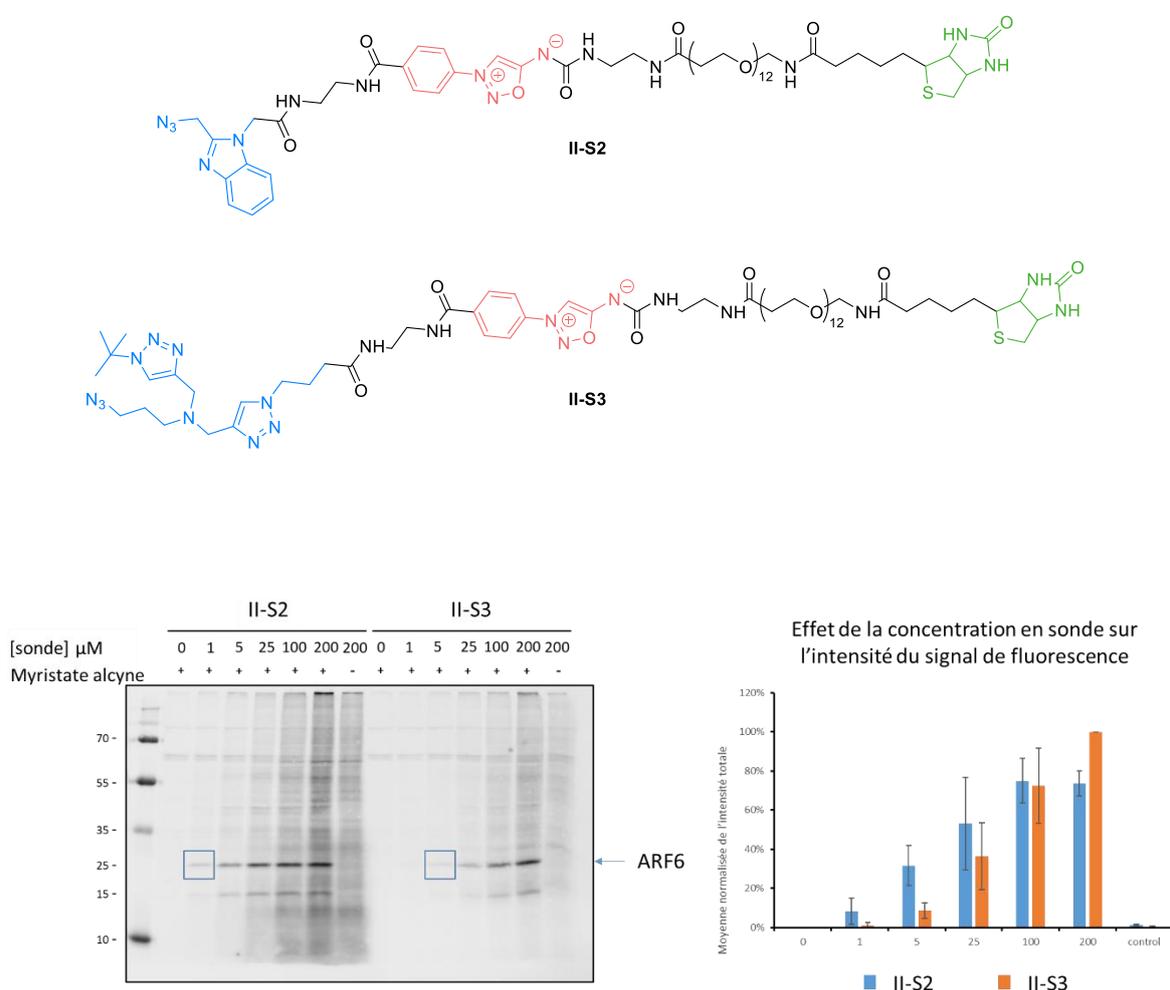
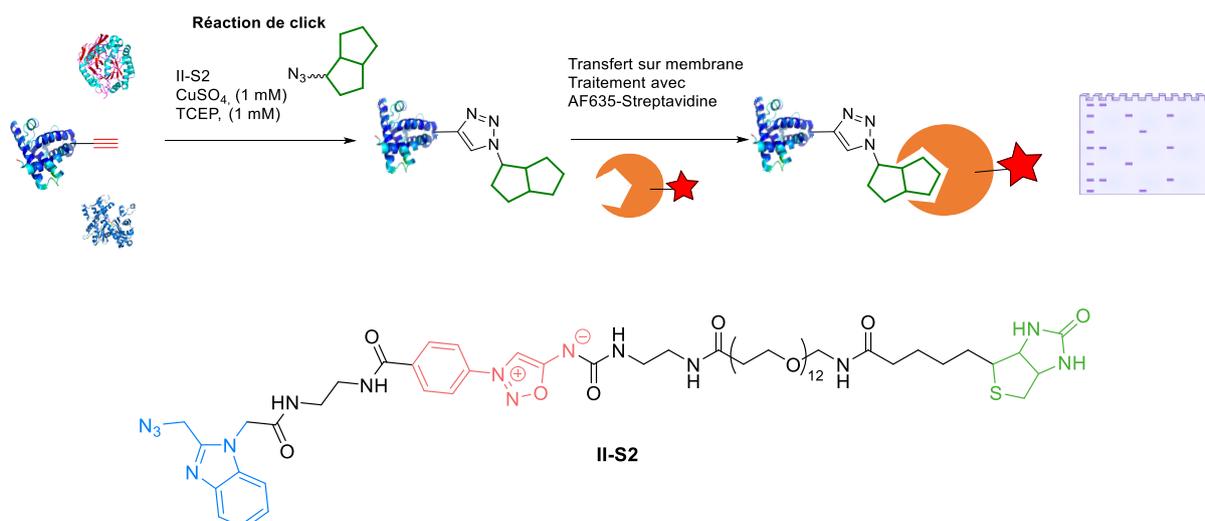


Figure II. 13. A. Comparaison des sondes chélatantes **II-S2** et **II-S3**. Visualisation sur gel de la protéine ARF6-Alcyne surexprimée dans un milieu complexe révélée par AF635-Streptavidin ; [Sonde] = 0, 1, 5, 25, 100, 200 μM ; $[\text{CuSO}_4] = 1 \text{ mM}$; $[\text{TCEP}] = 1 \text{ mM}$, 1h30. **B.** Graphique de l'intensité de fluorescence relative des bandes observées sur gel d'électrophorèse.

Suite à ces résultats très prometteurs, nous avons décidé d'utiliser la sonde **II-S2** pour le reste de l'étude, qui est la sonde la plus performante, à une concentration de 25 μM qui correspond à la concentration à laquelle le rapport signal/bruit de fond est le meilleur.

III.3) Effet du temps de réaction

Nous avons ensuite tenté d'évaluer l'influence de la durée de réaction sur l'efficacité de la réaction click sur les protéines alcynées. Pour cela, la sonde **II-S2** a été ajoutée au lysat cellulaire d'HEK239 pendant des temps variant de 10 minutes à 18 heures et à des concentrations de 1 à 25 μM (Figure II. 14). De la même façon que précédemment, le gel a été transféré sur membrane et révélé par une streptavidine fluorescente (AF635). Les gels d'électrophorèse montrent une augmentation du signal de fluorescence avec l'augmentation des temps réactionnels. En effet, bien que l'azoture chélatant de la sonde **II-S2** permette d'augmenter la cinétique de la réaction de CuAAC, les concentrations en certaines protéines alcynées sont très faibles et ainsi un temps de réaction plus élevé permet de réagir avec un plus grand nombre d'alcynes. L'analyse du signal de fluorescence par le logiciel ImageLab a permis de montrer qu'un temps de réaction de 18 heures permet d'augmenter significativement l'intensité de fluorescence et donc le nombre de protéines visualisées (Figure II. 14). Néanmoins, nous pensons qu'un temps d'incubation trop long entraîne une augmentation de la proportion de signal non spécifique, c'est pourquoi, nous avons fixé le temps d'incubation à 1h30 pour éviter ce potentiel problème tout en conservant un signal suffisant. Par ailleurs, et de manière assez logique, la concentration en sonde permet également d'augmenter le signal de fluorescence. Nous avons décidé pour la suite du projet d'utiliser une concentration en sonde de 25 μM .



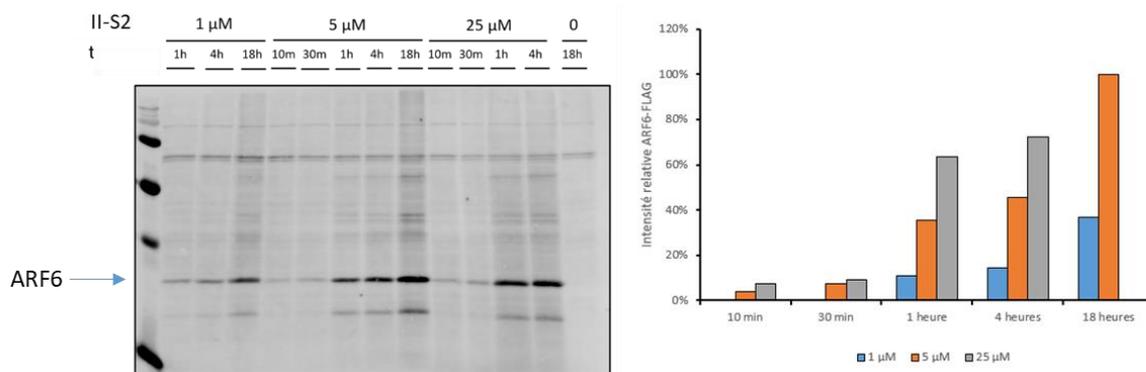


Figure II. 14. Effet du temps de réaction. Visualisation sur gel de la protéine ARF6-Alcyne surexprimée dans un milieu complexe révélée par AF635-Streptavidine. A gauche : gels d'électrophorèse. A droite : Analyse de la fluorescence relative observée sur les bandes du gel d'électrophorèse. [Sonde] = 0, 1, 5, 25 μM ; [CuSO₄] = 1 mM ; [TCEP] = 1 mM.

Ces expériences ont donc permis de définir les conditions réactionnelles adéquates pour l'étape de CuAAC. Ainsi, pour la suite de notre étude, nous utiliserons la sonde **II-S2** qui s'est montrée être la plus performante à une concentration de 25 μM pour avoir le meilleur ratio signal/bruit. La concentration en cuivre CuSO₄ et réducteur TCEP a été fixée à 1 mM et le temps d'incubation à 1h30.

IV) Validation du protocole de protein fishing

Après avoir optimisé l'étape de CuAAC en lysat cellulaire, nous avons voulu mettre au point celles correspondant à la capture sur billes de streptavidine et au décrochage par réaction SPICC. Cette dernière constitue certainement une étape clé de notre approche.

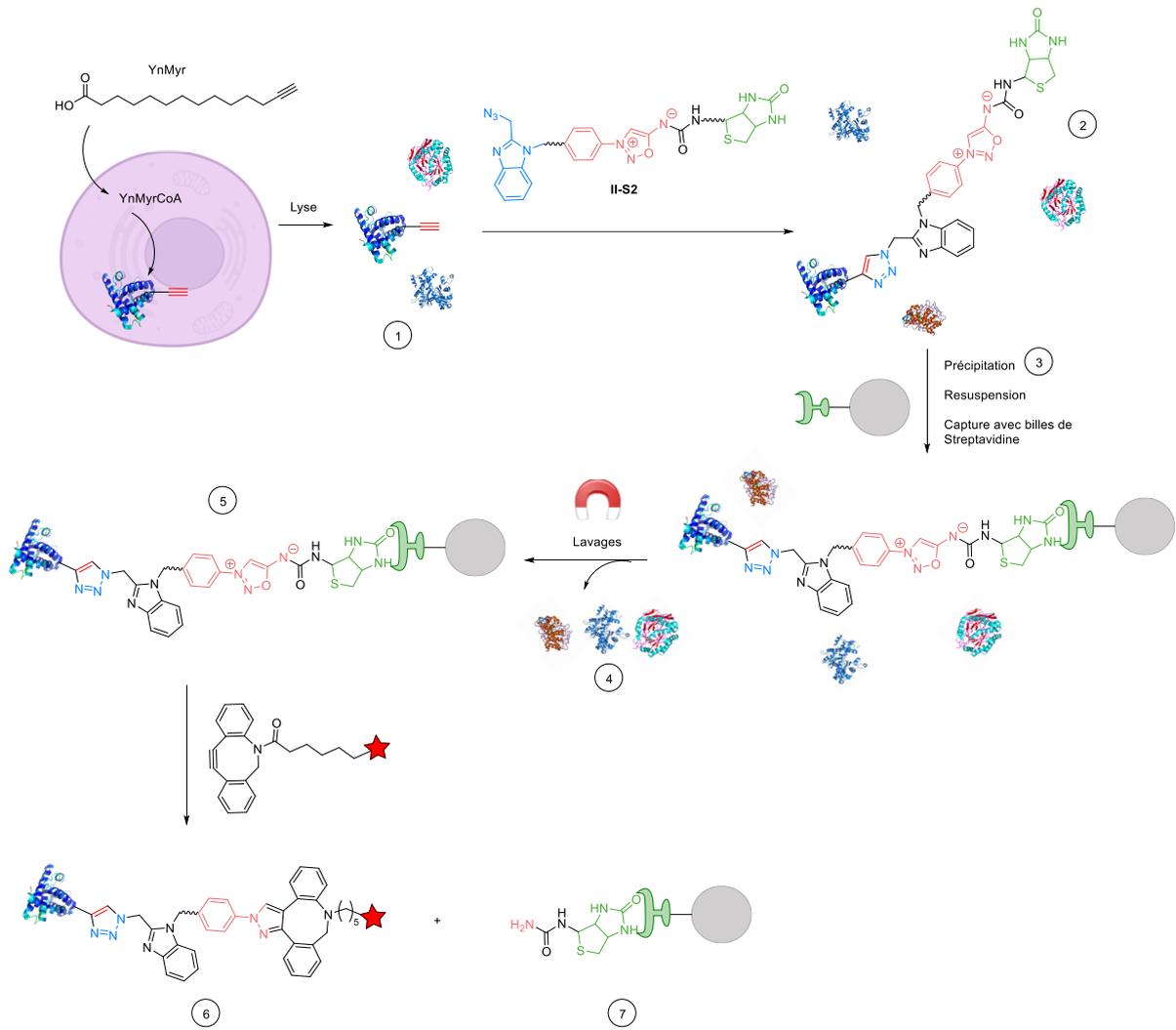
Pour cela, une validation du protocole d'enrichissement sur billes puis du relargage a été effectuée par Paul Monassa en réalisant un gel d'électrophorèse à chaque étape du protocole de protein fishing. L'équipe de l'I2BC a utilisé la protéine modèle ARF6-Flag capable d'être détectée par la technique d'immunoblot à l'aide d'un anticorps spécifique d'ARF6 (anticorps anti-ARF6). Ainsi, après culture des cellules surexprimant la protéine ARF6 en présence de YnMyr, celles-ci sont lysées. Le protocole d'enrichissement des protéines myristoylées implique alors : 1) une étape de réaction click des protéines alcynées avec à la sonde **II-S2** pendant 1h30, 2) une étape de précipitation des protéines par un mélange Méthanol/Chloroforme pour éliminer l'excès de sonde et de cuivre, 3) une capture avec des billes magnétiques de streptavidine suivi de lavage et enfin, 4) une étape de clivage avec un cycloalcyne fluorescent DBCO-Tamra permet de décrocher les protéines ARF6 des billes de streptavidine et de les marquer.

Chaque étape est analysée par gel d'électrophorèse couplé à un test d'immunoblot (Figure II. 15) pour mettre en évidence de façon spécifique la présence de la protéine ARF6-Flag. Lors de la première étape, la bande correspondant à l'ARF6-Flag est bien visible mais il n'est pas possible de quantifier l'efficacité de la myristoylation par YnMyr (1). Lors de la deuxième étape (2) correspondant à la réaction de ligation avec la sonde **II-S2**, nous pouvons observer une bande de masse moléculaire plus élevée que nous attribuons à la protéine ARF6 liée à la sonde. Cette bande est bien moins intense que la bande d'ARF6-Flag ce qui pourrait indiquer :

1) soit une faible efficacité de ligation avec la sonde, malgré les résultats obtenus dans les expériences précédentes. La solution serait de modifier la concentration en sonde en passant de 25 μM à 100 μM .

2) soit une faible myristoylation d'ARF6-Flag. Dans ce cas, une solution consisterait à augmenter la concentration d'YnMyr (100 μM) lors de la culture cellulaire.

L'analyse de l'étape de capture puis de lavage a permis de mettre en évidence que toutes les ARF6-Flag couplées à la sonde **II-S2** ont été capturées comme l'indique la disparition du signal dans les fractions de lavage (4). Par ailleurs, la fraction contenant les billes de streptavidine qui a été dénaturée par chauffage pour décrocher les protéines d'ARF6 confirme la présence de ces protéines et leur capture (5). Enfin, l'analyse de l'étape de clivage du lien par le DBCO-Acide, montre l'efficacité du clivage qui semble être total. En effet, la colonne (6) correspondant à la fraction issue du clivage par le DBCO-Acide montre bien la présence de protéines ARF6 et donc le décrochage de ces protéines lors du clivage. Enfin après chauffage des billes de streptavidine restantes pour décrocher le reste des protéines, nous n'observons aucune trace d'ARF6 ce qui confirme que le clivage par le DBCO est complet.



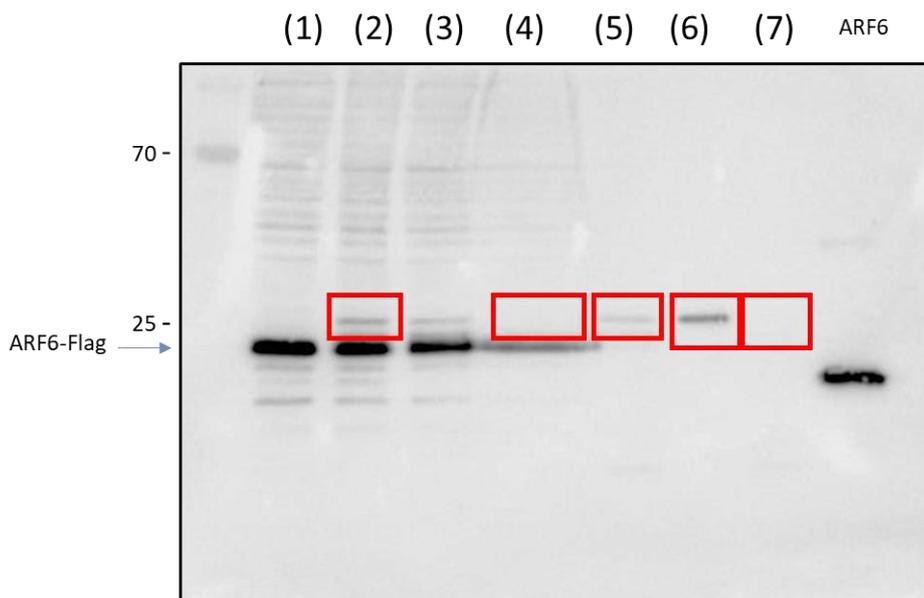


Figure II. 15. Mise au point du protocole de target fishing. Révélation par Immunoblot à l'aide d'un anticorps spécifique anti-ARF6. [Sonde] = 25 μ M, [CuSO₄] = 1 mM, [TCEP] = 1 mM, [DBCO-TAMRA] = 50 μ M. (1) lysat cellulaire, (2) lysat cellulaire après réaction de click, (3) lysat cellulaire après précipitation des protéines par Méthanol/Chloroforme, (4) fraction de lavage des billes de streptavidine, (5) fraction de récupération des billes de streptavidine, (6) fraction de lavage avec DBCO -Acide, (7) fraction issue du chauffage des billes de streptavidine pour vérifier la totale réaction de clivage.

Cette expérience a permis de valider le protocole utilisé permettant la capture et le relargage des protéines myristoylées. Elle a notamment permis de démontrer que les étapes de capture sur billes puis coupure SPICC étaient apparemment quantitatives. Elle a également montré que la réaction CuAAC fonctionnait même si nous n'avons pas pu conclure sur son efficacité.

Encouragés par ces résultats, un deuxième essai de fishing a été réalisé sur le même modèle de cellule mais cette fois avec pour objectif d'identifier les protéines pêchées par spectrométrie de masse. La concentration en sonde a été augmentée à 100 μ M et les concentrations en CuSO₄ et TCEP ont été fixées à 2 mM et 1 mM respectivement pour potentialiser le nombre de protéines « pêchées ». Pour cette expérience, le DBCO-Acide non fluorescent (50 μ M) a été utilisé afin de ne pas contaminer la colonne chromatographique utilisée en spectrométrie de masse par un fluorophore. La fraction de protéines relarguée par le DBCO a été récupérée, digérée par la trypsine pour former des peptides de 8 à 15 acides aminés environ et une analyse protéomique a été réalisée en analysant les peptides obtenus par spectrométrie de masse. Les spectres obtenus ont été comparés à une base de données de l'ensemble des protéines connues pour identifier les protéines myristoylées. Par ailleurs, la même expérience sans ajout de l'analogue YnMyr a été menée comme témoin négatif (Figure II. 16). Cette

expérience a permis de récupérer 1170 protéines dont 757 présentes dans le témoin négatif ce qui nous permet d'écarter ces protéines de la liste des protéines myristoylées puisqu'elles sont très probablement liées à une capture non spécifique. Sur les 413 protéines restantes, seules 82 possèdent un acide aminé glycine en position *N*-terminale et 52 d'entre elles ont déjà été identifiées *in vivo* comme étant des protéines myristoylées. Parmi ce pool de protéines, 4 nouvelles protéines ont été identifiées pour la première fois. Les 26 protéines restantes possèdent une glycine en position *N*-terminale et sont donc des candidates probables pour une myristoylation. Cependant, ne faisant pas partie des prédictions, leur identification devra être confirmée par des expériences de réplica actuellement en cours.

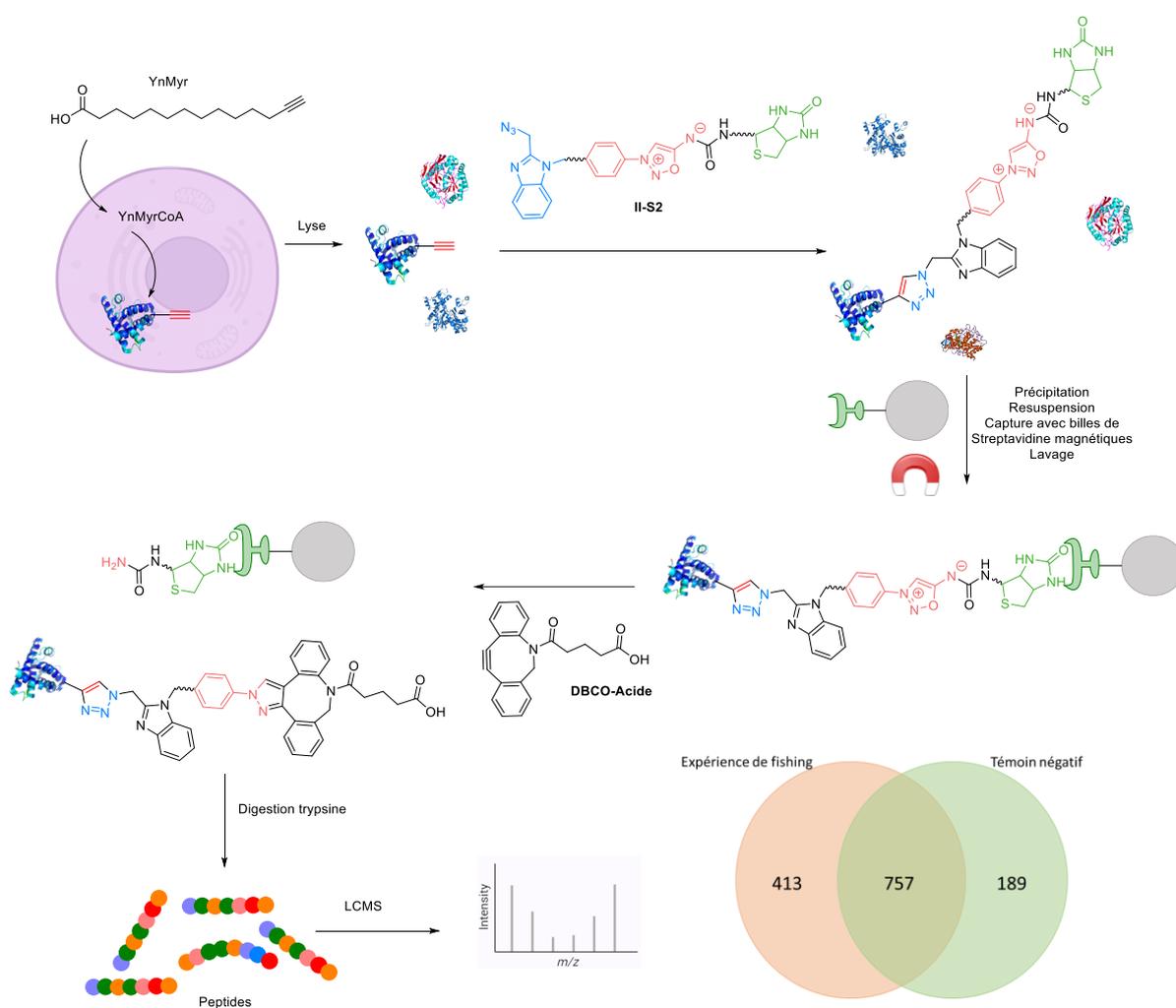


Figure II. 16. Protocole et fishing de protéines et analyses par spectrométrie de masse [Sonde II-S2] = 100 μ M, [CuSO₄] = 2 mM, [TCEP] = 1 mM, [DBCO-Acide] = 50 μ M

V) Conclusion

Pour conclure, la synthèse de 3 sondes possédant un azoture chélatant pour améliorer la réaction click CuAAC, une biotine pour permettre la capture de protéines sur billes de streptavidine et un lien clivable iminosydnone pour permettre le décrochage bioorthogonal des protéines des billes de streptavidine, a été réalisée entre 8 et 12 étapes. Les premiers essais réalisés avec ces sondes ont permis de confirmer l'efficacité des azotures chélatants par rapport aux azotures classiques dans le cadre du fishing de protéines. Par ailleurs, le lien iminosydnone a permis de s'affranchir d'un lien clivable enzymatique présentant certaines limites pour une étude protéomique. Un suivi du protocole par visualisation sur gel a mis en évidence l'efficacité de ce lien clivable puisque toutes les protéines modèles cibles ont été capturées et relarguées. Le premier essai de fishing de protéines a permis de réaliser une preuve de concept de notre approche en identifiant 56 protéines myristoylées dont 4 jamais identifiées in vivo. La suite de cette étude est encore en cours afin d'enrichir la bibliothèque de protéines identifiées.

Chapitre III : Synthèse d'indazolo[2,3-a]quinoxalines à partir de sydnones tricycliques

Chapitre III : Synthèse d'indazolo[2,3-a]quinoxalines à partir de sydnones tricycliques

I) Introduction sur les indazoloquinoxalines

I.1) Généralités sur les indazoloquinoxalines

Les quinoxalines sont des composés hétérocycliques possédant un noyau benzénique fusionné à un noyau pyrazine (Figure III- 1).¹³⁹ Les quinoxalines sont des hétérocycles que l'on retrouve dans un grand nombre de composés ayant des propriétés pharmacologiques pour diverses activités biologiques tels que des propriétés anti-inflammatoire,¹⁴⁰ anti-tumorale¹⁴¹ et anti-bactérienne.¹⁴² Dans ce chapitre, nous nous intéresserons particulièrement à des dérivés de quinoxalines, les indazolo[2,3-a]quinoxalines. Ces dérivés ont une structure proche de la quinoxaline avec un noyau indazole fusionné au noyau pyrazine (Figure III- 1).

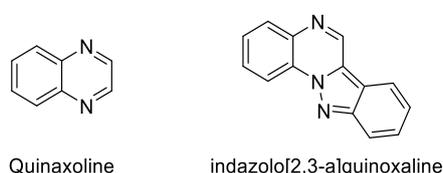


Figure III- 1. Structure des quinoxalines et indazolo[2,3-a]quinoxalines

Ces composés polycycliques sont connus pour avoir notamment des propriétés anti-tumorales¹⁴³. Dans ce chapitre, nous décrivons une nouvelle voie de synthèse à partir de sydnones pour accéder à ces composés polycycliques.

¹³⁹ S. K. Suthar, N. S. Chundawat, G. P. Singh, J. M. Padrón, Y. K. Jhala, *Eur. J. Med. Chem. Reports.*, **2022**, 5, 100040.

¹⁴⁰ A. A. El-Gendy, S. El-Meligie, A. K. El-Ansary, A. M. Ahmedy, *Arch. Pharm. Res.*, **1995**, 18, 44–47.

¹⁴¹ R. Ingle, R. Marathe, D. Magar, H. M. Patel, S. J. Surana, *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, 65, 168–186.

¹⁴² A. K. Parhi, Y. Zhang, K. W. Saionz, P. Pradhan, M. Kaul, K. Trivedi, D. S. Pilch, E. J. LaVoie, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 4968–4974.

¹⁴³ G. Moarbess, C. Deleuze-Masquefa, V. Bonnard, S. Gayraud-Paniagua, J.-R. Vidal, F. Bressolle, F. Pinguet, P.-A. Bonnet, *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16, 6601–6610.

I.2) Synthèse d'indazolo[2,3-a]quinoxalines décrites dans la littérature

Les indazolo[2,3-a]quinoxalines sont des composés possédant une activité biologique et qui sont donc intéressants pour l'industrie pharmaceutique. A notre connaissance, il n'existe à ce jour que 4 voies de synthèse pour obtenir des indazolo[2,3-a]quinoxalines. Les 3 premières consistent à fonctionnaliser la position C3 des indazoles et ont été décrites par le même groupe à partir d'un intermédiaire commun, le 2-aminoindazole (Schéma III. 1).¹⁴⁴ Cet intermédiaire est synthétisé de façon efficace à partir d'un azidobenzaldehyde **III-1** et d'une aniline par chauffage au micro-ondes sans solvant. A partir du composé 2-aminoindazole **III-2** il est alors possible de réaliser une réaction de Pictet-Spengler en présence d'un aldéhyde et d'une quantité catalytique de TFA afin de former une dihydroindazolo[2,3-a]quinoxaline **III-3**, qui peut par la suite être oxydée par du DDQ afin de former le composé souhaité (Schéma III. 1.A). L'intérêt pratique de cette voie de synthèse est que chaque réaction est réalisée par micro-ondes en très peu de temps.

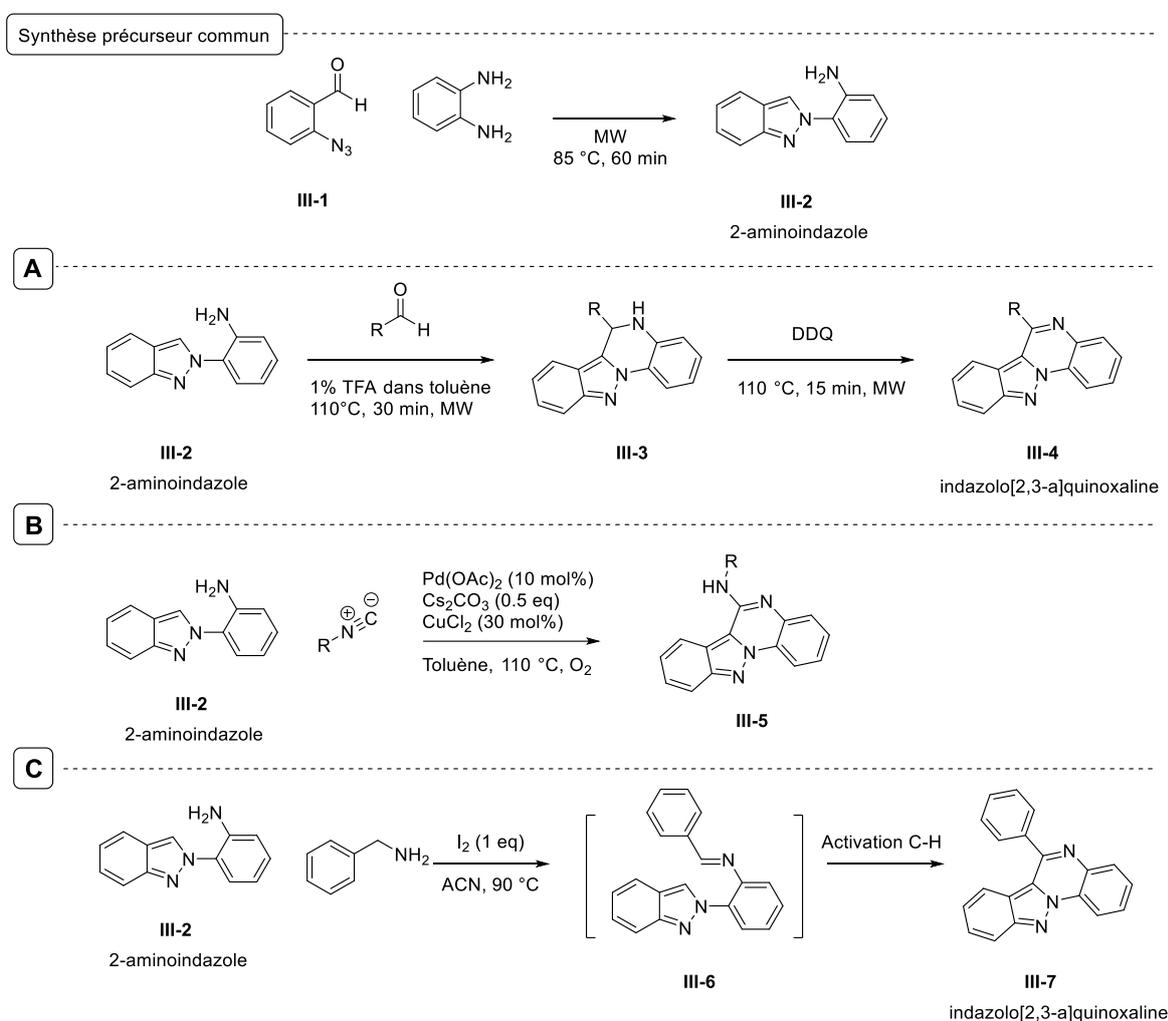


Schéma III. 1. Voies de synthèse d'indazoloquinoxalines décrites par Sharada^{144,145,146}

¹⁴⁴ S. Vidyacharan, A. Sagar, N. C. Chaitra, D.S. Sharada, *RSC Adv.*, **2014**, *4*, 34232–34236.

La deuxième voie de synthèse consiste en une insertion d'isonitriles en présence de quantités catalytiques de palladium sur le 2-aminoindazole (Schéma III. 1.B).¹⁴⁵ Cette voie de synthèse bien que très intéressante ne permet d'obtenir que des composés indazolo[2,3-a]quinoxaline fonctionnalisés par des amines (III-5).

Enfin, la troisième voie de synthèse consiste en une activation C-H du 2-aminoindazole catalysée par du diiode en présence de benzylamine (Schéma III. 1.C).¹⁴⁶ Cette réaction permet de mener aux composés souhaités avec de bons rendements sans catalyse métallique contrairement à l'approche précédente.

Ces trois voies de synthèse permettent d'obtenir de bons rendements mais le composé de départ commun à ces 3 voies, l'azidobenzaldehyde III-1, ne permet pas d'avoir facilement accès à une diversité structurale importante au vu de sa synthèse. Par ailleurs, le composé III-2 doit être préparé dans des conditions réactionnelles relativement risquées. En effet, la réaction d'un azoture au micro-onde peut provoquer des explosions.

En 2014, l'équipe de Jamison, propose une voie de synthèse d'un dérivé de quinoxalines à partir d'isonitriles en présence d'iode hypervalent par catalyse photoredox à l'iridium. Cette réaction permet la formation d'un pyrazolo[2,3-a]quinoxaline (Schéma III. 2) à partir d'isonitriles ayant un noyau imidazole judicieusement positionné en position *ortho*.¹⁴⁷

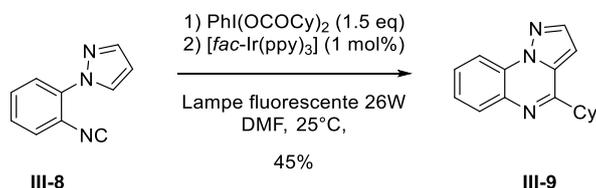


Schéma III. 2. Voie de synthèse du pyrazolo[2,3-a]quinoxaline par Jamison¹⁴⁷

II) Notre approche

Les indazoles sont des composés très utilisés en chimie médicinale en raison de leur activité anti-inflammatoire et anti-cancéreuse.¹⁴⁸ En 2010 et 2011, l'équipe de Shi a publié deux articles montrant

¹⁴⁵ S. Vidyacharan, A. Murugan, D. S. Sharada, *J. Org. Chem.*, **2016**, *81*, 2837–2848.

¹⁴⁶ A. Murugan, S. Vidyacharan, R. Ghosh, D. S. Sharada, *ChemistrySelect.*, **2017**, *2*, 3511 – 3515.

¹⁴⁷ Z. He, M. Bae, J. Wu, T. F. Jamison, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 14451 –14455.

¹⁴⁸ H. Cerecetto, A. Gerpe, M. Gonzalez, V. J. Aran, C. O. de Ocariz, *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2005**, *5*, 869-878

une synthèse d'indazoles simples dans des conditions douces à partir de sydnones.^{149,150} Les sydnones étant capables de réagir par réaction de cycloaddition avec des alcynes tendus pour former des pyrazoles, l'utilisation d'un alcyne cyclique à 6 chaînons (benzyne) permet de former un indazole (Schéma III. 3). C'est d'ailleurs avec un benzyne que Huisgen a montré la première réaction de cycloaddition sydnones/alcyne.¹⁵¹ Les benzyne sont des composés dipolarophiles très tendus et donc très réactifs. L'équipe de Shi a décrit leur synthèse *in situ* à partir du *o*-(trimethylsilyl)phenyl triflate en présence d'une source fluorure pour former des 2H-indazoles (Schéma III. 3).

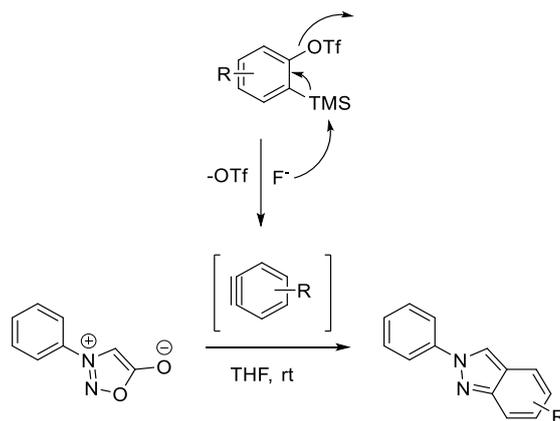


Schéma III. 3. Cycloaddition sydnone/benzyne

L'utilisation de TBAF plutôt que du CsF comme source de fluorure pour la formation de l'aryne *in situ* permet en effet d'obtenir le pyrazole correspondant avec de meilleurs rendements et dans des temps plus courts. Plusieurs précurseurs de benzyne substitués ont été utilisés pour former des indazoles avec des rendements entre 33% et 97%. En 2011, la même équipe étend la réaction à différentes structures de sydnones notamment des sydnones substituées en position C4. Il a été montré que la substitution sur cette position par des groupements aromatiques ou halogénés donnait de très bons rendements (70% à 93%) (Schéma III. 4). En revanche la présence de groupes alkyles sur cette position ne permettait pas d'obtenir les pyrazoles correspondant.

¹⁴⁹ C. Wu, Y. Fang, R. C. Larock and F. Shi, *Org. Lett.*, **2010**, 12, 2234-2237

¹⁵⁰ Y. Fang, C. Wu, R. C. Larock and F. Shi, *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 8840-8851

¹⁵¹ R. Huisgen, R. Grashey, H. Gotthardt and R. Schmidt, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1962**, 1, 48

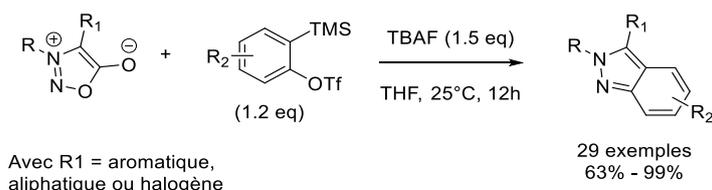


Schéma III. 4 Cycloaddition sydnone-benzyne de Shi.

Récemment cette stratégie a été utilisée au sein de notre groupe pour former des hélicènes à partir de sydnones polycycliques et de précurseurs de benzynes polycycliques.¹⁵² Ainsi, 15 hélicènes ont été préparés avec des rendements entre 18% et 79% (Schéma III. 5).

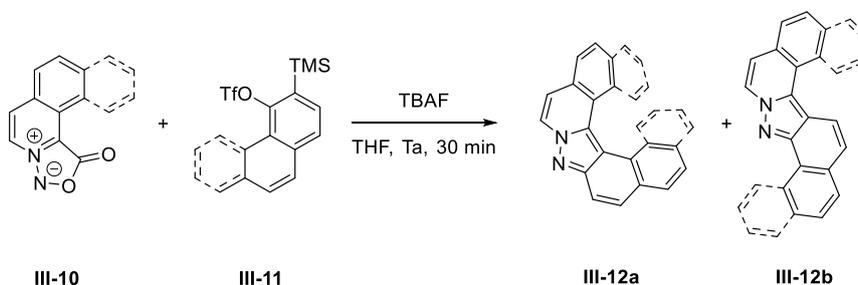


Schéma III. 5. Formation d'hélicènes par réaction de Cycloaddition sydnone-benzyne

En se basant sur cette réaction, nous proposons de développer une réaction impliquant un benzyne et une sydnone tricyclique qui possède un motif quinoxaline dans le but de préparer des indazolo[2,3-a]quinoxalines (Schéma III. 6). L'étape clé de cette approche est la synthèse de la sydnone tricyclique **III-19** que nous envisageons de réaliser soit à partir de l'aminosydnone **III-14** soit à partir de l'azidosydnone **III-15**. La préparation des sydnones tricycliques impliquerait alors une réaction de cyclisation intramoléculaire à partir d'une imine formée soit par réaction d'un aldéhyde avec l'amine **III-14** soit par réaction d'aza-Wittig avec l'azidosydnone **III-15**. Cette imine subirait une attaque nucléophile de la position C4 pour former un hétérocycle qui après oxydation donnerait accès aux indazolo[2,3-a]quinoxalines.

¹⁵² E. Yen-Pon, P. A. Champagne, L. Plougastel, S. Gabillet, P. Thuery, M. Johnson, G. Muller, G. Pieters, F. Taran, K. Houk, D. Audisio, *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, *141*, 1435–1440

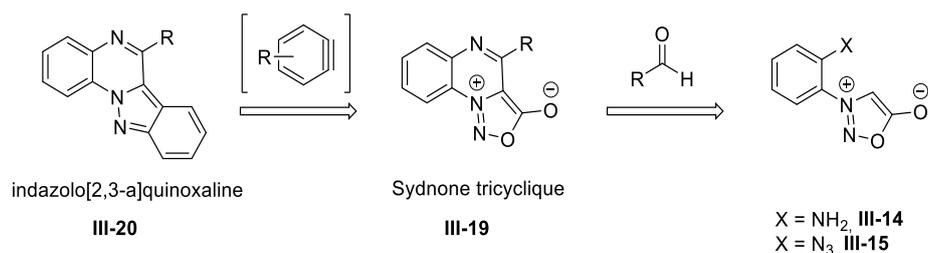


Schéma III. 6. Rétrosynthèse envisagée pour la préparation d'indazolo[2,3-a]quinoxalines

III) Synthèse de l'azidosydnone et de l'aminosydnone

La synthèse de l'azidosydnone **III-15** a précédemment été décrite par Burson et al. en 1991 mais la voie de synthèse décrite implique l'emploi de réactifs toxiques (HN₃) avec un rendement de 67% en une étape (Schéma III. 7.A).¹⁵³ Nous avons donc souhaité modifier cette synthèse dans le but d'améliorer les rendements et d'utiliser des conditions plus douces de synthèse. Dans un premier temps, une réaction d'azidation de l'aniline décrite par Jiao¹⁵⁴ permet d'obtenir l'azidoaniline **III-16** avec un rendement de 44% qui est plus faible que celui obtenu par Jiao (73%) (Schéma III. 7.B). Par la suite, la construction du noyau sydnone est possible par une première alkylation de l'aniline à l'aide du bromoacétate d'éthyle pour former **III-17** suivie d'une réaction de nitrosylation avec du *tert*-butylnitrite et une cyclisation avec l'anhydride acétique pour former l'azidosydnone **III-15** avec un rendement de 68% sur les deux étapes. Une montée en échelle a permis d'obtenir 2,9 grammes de la sydnone **III-15**. Enfin, une dernière étape de réduction de Staudinger a permis d'obtenir le composé **III-14** avec un rendement correct de 72%.

¹⁵³ W. C. Burson, D. R. Jones, K. Turnbull, P. N. Preston, *Synthesis*, **1991**, 9, 745-746.

¹⁵⁴ C. Tang, N. Jiao., *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 46, 18924–18927

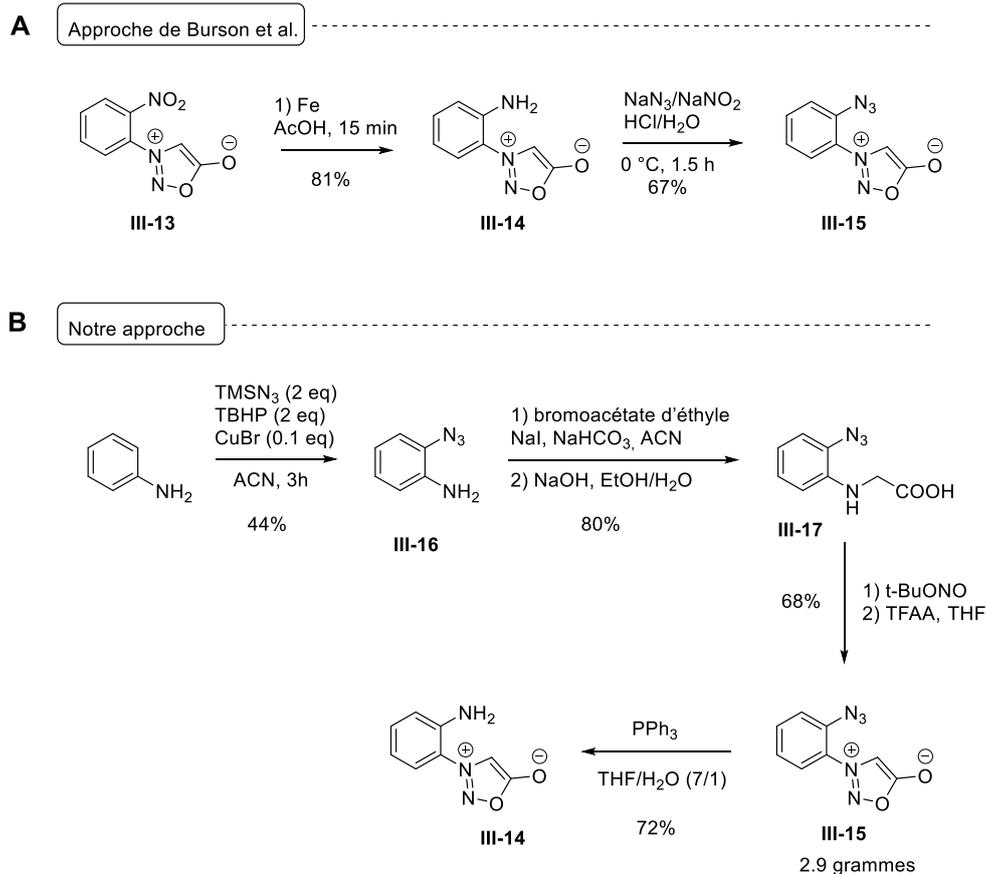


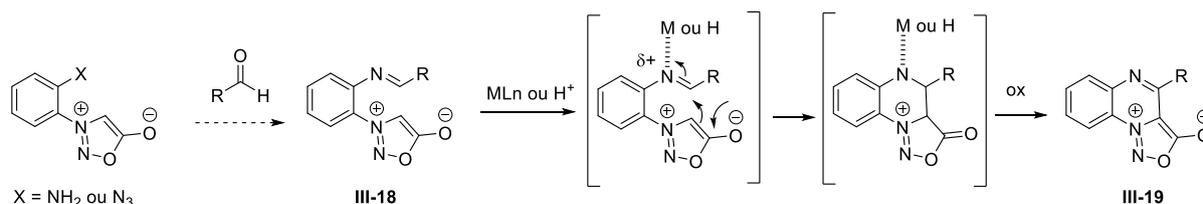
Schéma III. 7. A. Synthèse de l'azidosydone III.15 par Preston¹⁵³. B. Voie de synthèse utilisée dans cette étude

IV) Synthèse de quinoxalines sydnones

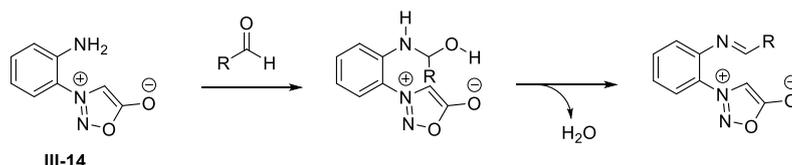
Comme décrit dans l'introduction du chapitre I, la position C4 des sydnones possède un hydrogène dont le pKa entre 18 et 20 peut être déprotonée par une base forte et réagir avec des espèces électrophiles.¹⁵⁵ C'est en se basant sur ces propriétés que nous avons imaginé la formation du motif quinoxaline par une réaction de cyclisation intramoléculaire entre le carbone C4 de la sydone et une fonction imine. La stratégie consiste à former une imine à partir de **III-14** ou **III-15** puis à cycliser grâce au carbone électrophile de l'imine activée par une catalyse par un acide de Bronsted ou un acide de Lewis (Schéma III. 8.A).

¹⁵⁵ D. L. Browne, J. P. A. Harrity, *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 553-568.

A. Stratégie de synthèse de quinoxaline sydnone



B. Synthèse d'imine par condensation amine/aldéhyde



C. Synthèse d'imine par réaction de Staudinger aza-Wittig

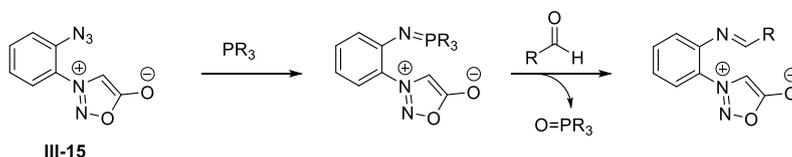
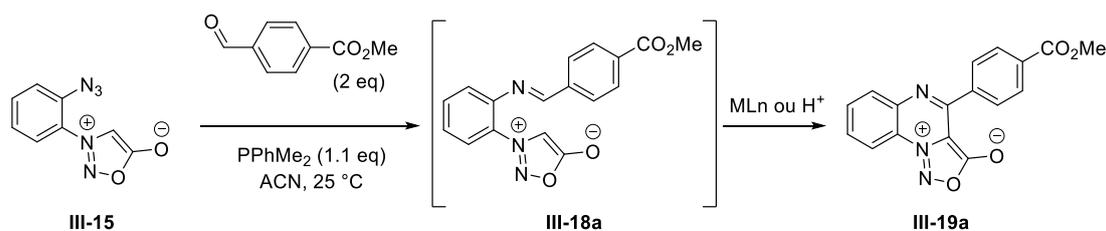


Schéma III. 8. A. Synthèse de quinoxaline sydnone, B. Par condensation amine/aldéhyde, C. Par réaction de Staudinger aza-Wittig.

L'imine peut être formée par une réaction de condensation entre une amine et un aldéhyde ou bien par une réaction de Staudinger Aza-Wittig entre un azoture et un aldéhyde (Schéma III. 8). Cette réaction de Staudinger Aza-Wittig génère un iminophosphorane, obtenu par action d'une phosphine sur un azoture, qui réagit ensuite avec un aldehyde pour former une imine et un oxyde de phosphine.

Ainsi, ces 2 voies de synthèse ont été testées pour former la sydnone tricyclique **III-19**. Tous nos essais pour former l'imine par réaction de condensation amine/aldéhyde ont échoué même en chauffant et en présence d'un aldéhyde fortement appauvri. Cela peut s'expliquer par la faible réactivité de l'amine aromatique appauvrie par le noyau sydnone. En revanche, la réaction de Staudinger aza-Wittig a permis de former l'imine lorsque la phosphine utilisée est peu encombrée. Ainsi, nous avons utilisé la diméthylphénylphosphine et un excès d'aldéhyde pour mener cette réaction. En revanche, l'imine étant instable il n'a pas été possible de l'isoler. Nous avons donc décidé de l'utiliser *in situ* pour réaliser l'étape clé de cyclisation.

Afin d'activer la fonction imine et ainsi favoriser la cyclisation, nous avons criblé une série d'acides de Lewis et d'acides de Brønsted (**Figure III- 2**).



Entrées	MLn ou H ⁺ (équivalent)	Temps	Rendements isolés
1	CH ₃ SO ₃ H (2 eq)	24 h	22%
2	AgOTf (0.2 eq)	24 h	0
3	Sc(OTf) ₃ (0.2 eq)	24 h	0
4	Cu(OTf) ₂ (0.2 eq)	24 h	0
5	Cu(OTf) ₂ (0.6 eq)	24 h	29%
6	Cu(OTf) ₂ (1.1 eq)	24 h	68%
7	Cu(OTf) ₂ (2 eq)	16 h	81%

Figure III- 2. Optimisation des conditions de cyclisation

Parmi les acides criblés, seul Cu(OTf)₂ s'est montré efficace pour permettre la cyclisation. L'augmentation de la quantité à 2 équivalents de Cu(OTf)₂ permet la conversion complète de l'imine et augmente les rendements jusqu'à 81%.

A la suite de ce criblage, l'étude de l'étendue de la réaction a été menée en faisant varier la structure de l'aldéhyde ce qui nous a permis d'obtenir plusieurs sydnones polycycliques (Figure III- 3). Les rendements obtenus entre 25% et 81% ont montré la tolérance de la réaction vis-à-vis de différentes fonctions telles que les esters, les amides et les halogènes. Il est à noter que le sous-produit **III-14**, issu de l'hydrolyse de l'imino-phosphorane, a été observé ce qui explique que les rendements ne soient pas plus élevés et qui montre que l'étape de cyclisation est lente.

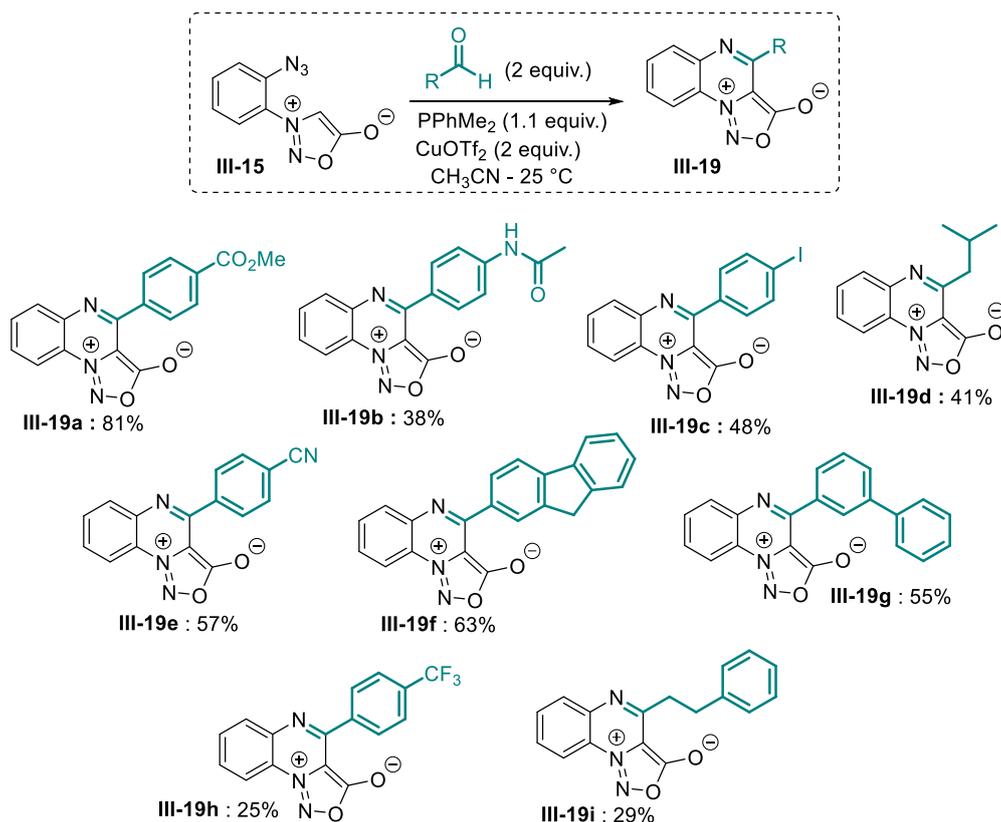


Figure III- 3. Etendue de la réaction de formation de quinoxaline-sydnones

Après avoir synthétisé 9 quinoxaline-sydnones, il a été possible de nous intéresser à la réactivité de ces composés en tant que dipôle pour la réaction de cycloaddition et ainsi former des indazolo[2,3-a]quinoxalines.

V) Synthèse d'indazoloquinoxalines

A partir de cette stratégie décrite précédemment et des travaux publiés par Shi^{149,150} et notre groupe,¹⁵² nous avons synthétisé 5 composés indazolo[2,3-a]quinoxalines issus des quinoxaline-sydnones précédemment obtenues (Figure III- 4). Même si les rendements obtenus sont plutôt bons, il est à noter que 1.5 équivalents de précurseur de benzyne et 1.5 équivalents de TBAF ont été ajoutés chaque heure pendant 4 heures pour arriver à complétion. Cela peut s'expliquer par des traces d'eau présentes dans l'acétonitrile qui peuvent alors hydrolyser le benzyne. Enfin, pour le composé **III-20b**, un précurseur de benzyne plus encombré a été utilisé ce qui pourrait expliquer le faible rendement de 22% obtenu.

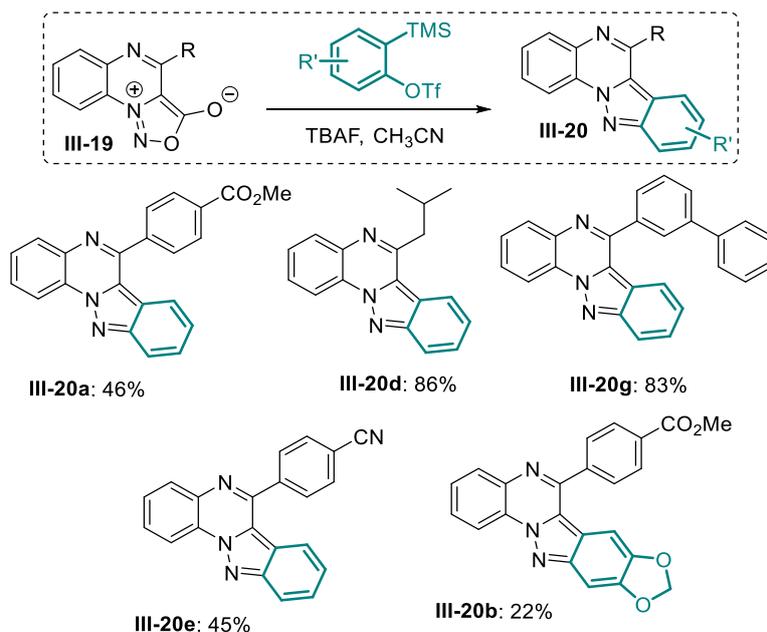


Figure III- 4. Etendue de la réaction de cycloaddition entre les sydnones tricycliques et divers benzynes

VI) Conclusion

Pour conclure, nous avons développé une nouvelle voie de synthèse pour former des indazolo[2,3-a]quinoxalines par réaction entre des sydnones polycycliques et des benzynes. Les sydnones polycycliques ont été obtenues avec de bons rendements grâce à la cyclisation intramoléculaire d'imines sur le carbone C4 de la sydnone en présence de cuivre(II).

Cette nouvelle voie de synthèse à l'avantage de fournir en 2 réactions les composés souhaités à partir d'azido-sydnones facilement synthétisables et dérivatisables. La nature de la chaîne latérale ainsi que du groupe indazole peuvent eux aussi être facilement modifiés en choisissant les substrats adéquats.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Depuis le début des années 2000, le concept de chimie « click » développé par Sharpless a permis de découvrir une nouvelle classe de réaction entre deux entités moléculaires avec une grande efficacité, sélectivité et des purifications aisées. De la même façon, la chimie bioorthogonale développée par Bertozzi a connu un véritable essor ces dernières années pour des applications en chimobiologie. Ce nouvel élan a permis des études *in vivo* de phénomènes biologiques jusque-là encore inexplorés. Les travaux sur la chimie click et la chimie bioorthogonale ont été récompensés l'année dernière par un prix Nobel de Chimie remis à C. Bertozzi, B. Sharpless et M. Meldal.

La réaction la plus représentative de la chimie click est la réaction de CuAAC (Copper catalysed Azide-Alkyne Cycloaddition) décrite par Sharpless et Meldal en 2001 et qui permet la liaison entre deux blocs de construction moléculaire portant d'une part un alcyne et d'autre part un azoture pour former un seul régioisomère de triazole. Cette réaction a lieu en présence d'une quantité catalytique de cuivre et de ligand. Plus récemment, diverses équipes de recherche (dont la nôtre) ont cherché à améliorer les vitesses de réaction de la CuAAC en utilisant des azotures possédant un ligand du cuivre intramoléculaire, appelés des azotures chélatants. Ces nouveaux azotures permettent d'une part de s'affranchir de l'utilisation d'un ligand externe et d'autre part d'améliorer les vitesses de réaction (Schéma IV. 1).

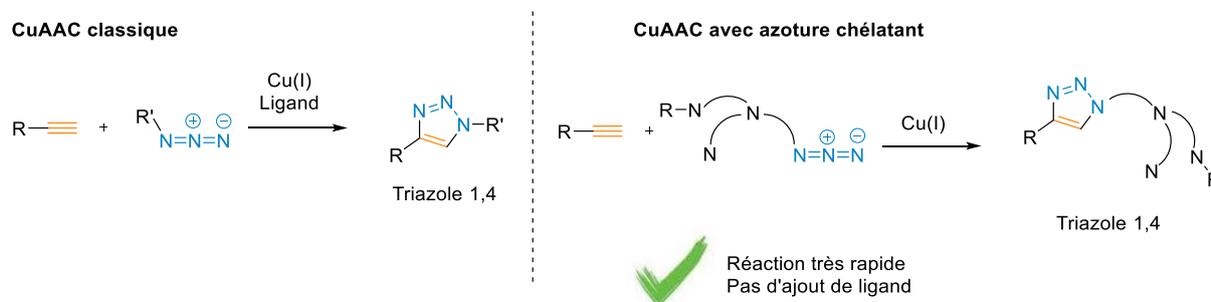


Schéma IV. 1. Comparaison CuAAC classique vs CuAAC avec azoture chélatant

D'autres réactions de chimie click ont été découvertes dont la réaction de CuSAC (Copper catalysed Sydnone-Alkyne Cyloaddition). Cette réaction permet la formation d'un noyau pyrazole par réaction cupro-catalysée entre une sydnone et un alcyne en présence d'un ligand bathophénantroline (BPDS). Des applications en bioconjugaison ont déjà permis d'utiliser cette réaction dans un contexte chimobiologique mais la CuSAC présente tout de même des limitations. Notamment, la quantité de cuivre utilisée peut être toxique pour les milieux biologiques, la réaction est lente et le ligand utilisé a présenté des problèmes de reproductibilité en fonction des fournisseurs. Le premier objectif de cette thèse a donc été de remplacer le système catalytique originel, de diminuer la quantité de cuivre pour

de possibles applications en chémobiologie et d'explorer les autres paramètres de la réaction. Pour cela, la technique HTE (High Throughput Experimentation) a été utilisée et a permis de réaliser plus de 2000 réactions pour cribler les paramètres de cette réaction. Nous avons ainsi pu trouver un nouveau ligand pour chélater le cuivre : le ligand **Bim L2** (Schéma IV. 2) et permettre la formation efficace et reproductible de pyrazoles. Ce ligand peut être synthétisé en une étape de synthèse sans purification et permet de diminuer la quantité de cuivre de 20% molaire à 5% molaire.

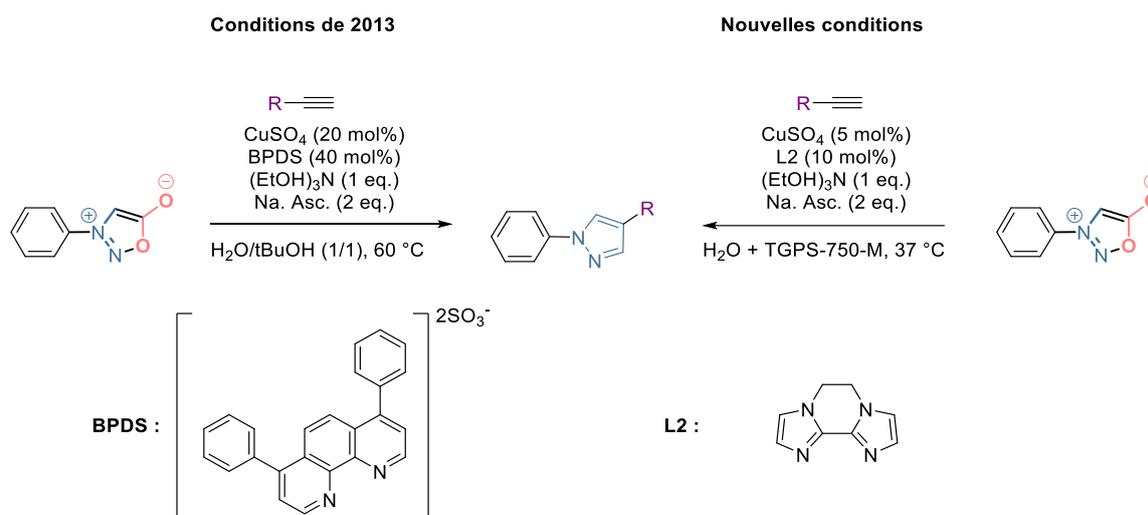
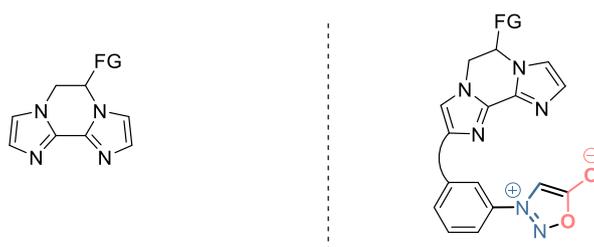


Schéma IV. 2. Comparaison des conditions publiées en 2013 vs conditions optimisées pendant cette thèse

Par ailleurs, les réactions peuvent être effectuées à température ambiante sans diminution du rendement. Concernant le ligand bathophénantroline, les analyses montrent des différences structurales (RMN) entre les différents lots commerciaux et des contaminations par divers métaux dans les différents lots de BPDS. Le ligand L2 s'est avéré plus performant que la BPDS mais sa structure pourrait être optimisée. Nous savons, que les ligands hydrosolubles sont globalement plus performants que les ligands organosolubles pour des réactions de cycloadditions dans l'eau. Il pourrait donc être intéressant d'imaginer un ligand **Bim** plus hydrosoluble et d'évaluer ses performances par rapport au ligand L2 (Schéma IV. 3). Enfin, pour des applications en chémobiologie, il pourrait être intéressant, de la même manière que pour les azotures chélatants, d'imaginer des sydnones chélatantes portant un motif **Bim** hydrosoluble et permettant dans un premier temps la solubilisation de la sydnone en milieu biologique et dans un second temps la complexation du cuivre au niveau du site de réaction induisant une augmentation de la vitesse de réaction.



FG = groupe hydrophile (PEG, SO₃⁻, ...)

Schéma IV. 3. Gauche : Ligand Bim hydrosoluble. Droite : Sydnone chélatante

Dans un second temps, nous avons extrapolé la réaction de CuSAC à une autre classe de mésoionique, les iminosydnones, dans le but de découvrir une nouvelle réaction de chimie click : la CuISAC. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux iminosydnones N3-N6-biaryle qui ont montré les meilleurs résultats en présence du ligand Bim. Nous avons ainsi pu diminuer la concentration en Cuivre à 1% pour la réaction de CuISAC (Schéma IV. 4). Ce type d'iminosydnones bi-aryliques pourraient présenter un intérêt en tant que lien clivable puisque cela permet de former un cycloadduit et un produit de release. Ce nouveau type de linker clivable par catalyse au cuivre pourrait donc trouver un intérêt notamment pour les techniques de fishing de protéines ou bien la libération de principes actifs. Comme nous l'avons vu, ces composés sont également intéressants pour développer des réactions en cascade. En effet, cette nouvelle réaction à l'avantage de libérer un isocyanate qui peut réagir avec un nucléophile. Grâce à cette réactivité, nous avons pu mettre en place une synthèse « one pot » de pyrazoles contenant une fonction urée.

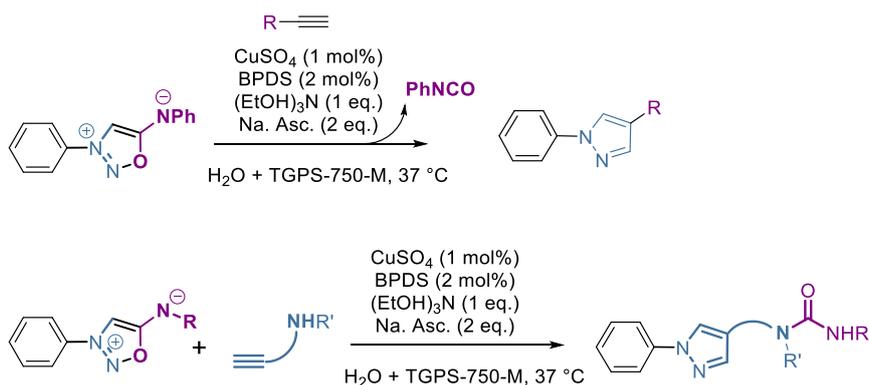


Schéma IV. 4. Haut : Conditions de réaction de CuISAC. Bas : Synthèse « one pot » de pyrazole urée

Une perspective intéressante de ce travail pourrait être de concevoir des iminosydnones chélatantes du cuivre (Schéma IV. 5). De tels composés pourraient alors cliquer de façon très rapide avec les alcynes vrais tout en libérant le complexe de cuivre.

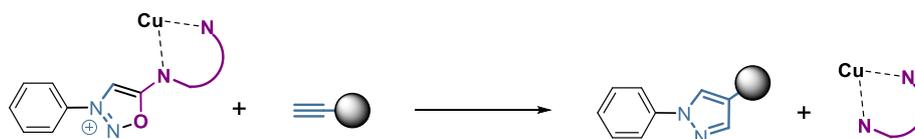


Schéma IV. 5. Perspectives : Iminosydnones chélatantes

Dans un contexte de chimie bioorthogonale, nous nous sommes intéressés à une modification du protéome par un acide gras myristique : la Myristoylation. Grâce aux outils de chémobiologie et notamment la stratégie du rapporteur chimique, nous avons pu incorporer un alcyne terminal sur ces protéines. Des sondes bioorthogonales possédant un azoture, un lien clivable et une biotine, ont permis la visualisation sur gel d'électrophorèse ainsi que l'identification des protéines. Pour le design des sondes, nous avons imaginé un azoture chélatant capable de réaliser une première réaction de CuAAC avec le rapporteur chimique alcyne. En effet, les azotures chélatant en plus d'augmenter la vitesse de réaction permettent aussi la CuAAC dans des milieux très dilués tels que les milieux biologiques. La fonction biotine permet la capture et l'isolation des protéines cibles du reste du milieu cellulaire grâce à son affinité avec la streptavidine. Par ailleurs nous nous sommes inspirés de la réaction de SPICC (Strain Promoted Iminosydone Cyclooctyne Cycloaddition) pour le décrochage des protéines de la streptavidine. Des gels d'électrophorèse ont permis de suivre chaque étape de ce fishing de protéines et ont montré l'importance d'utiliser des azotures chélatant et des liens clivables en conditions douces. Une première preuve de concept a permis d'identifier 56 protéines myristoylées donc 4 encore jamais observées *in vivo*. Des répliques sont actuellement en cours pour identifier d'autres protéines et enrichir la base de données.

Dans ce contexte, un projet d'imagerie du Myristoylome serait utile pour visualiser *in vivo* la dynamique de ces protéines et apporter de nouvelles informations sur ce processus encore méconnu. Pour cela, la synthèse de sonde portant un azoture chélatant très performant et un fluorophore peut être envisagée (Schéma IV. 6). De nombreux obstacles seront toutefois à franchir comme avoir un complexe de cuivre suffisamment stable et réactif pour cliquer sur un grand nombre de protéines probablement localisées dans plusieurs compartiments cellulaires. L'utilisation du myristate radioactif, marqué au carbone 14, pourrait également être très utile pour ces recherches. En effet, notre laboratoire développe des techniques d'imageries cellulaires en utilisant l'autoradiographie haute résolution (Schéma IV. 6). Couplée au fractionnement cellulaire et comptage radioactif, une quantification des protéines myristoylées dans la cellule et ses compartiments pourrait être aisément réalisée. L'ensemble de ces techniques complémentaires pourraient apporter des informations importantes pour une meilleure compréhension de la myristoylation.

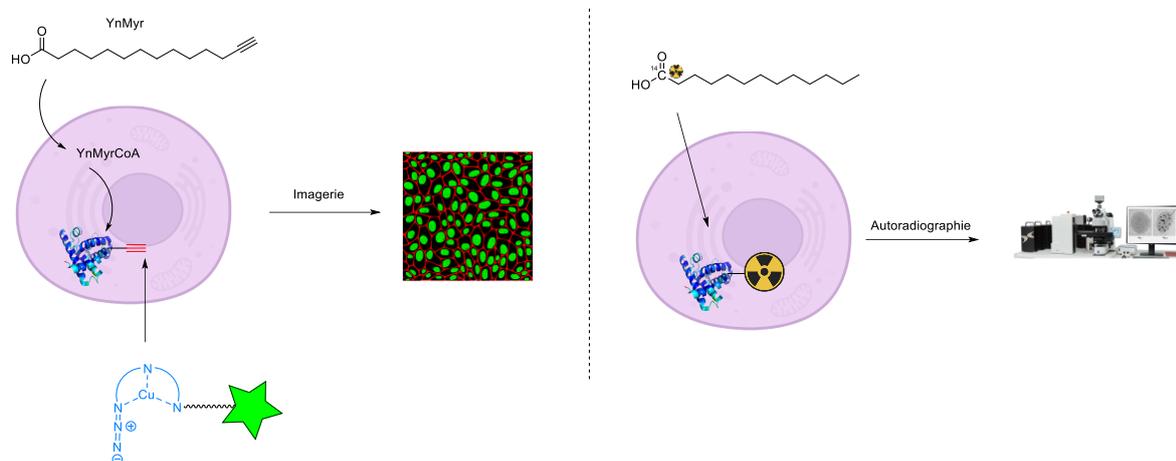


Schéma IV. 6. Perspectives : imagerie par fluorescence, imagerie par autoradiographie

Pour conclure, les travaux réalisés durant cette thèse viennent enrichir le nombre de réactions click connues et ainsi contribuer au développement d'outils pour la chémobiologie, une discipline scientifique en plein essor. Leur utilisation peut permettre d'étudier des mécanismes biologiques fondamentaux, tels que l'étude du Myristoylome, avec des moyens chimiques jusque-là inaccessibles. Nul doute que de nombreux développements futurs viendront encore améliorer les performances de ces outils et permettre de nombreuses découvertes majeures en biologie.

Supporting information

Supporting information

Material and equipment

All chemical products commercially available were purchased from Sigma-Aldrich, Acros and Fluka and used without further purification. Anhydrous solvents: 1,2-dichloroethane, acetonitrile, DMF, DMSO were purchased in anhydrous form and used without further purification. THF was dried from sodium/benzophenone under nitrogen. Dichloromethane was distilled from calcium hydride under nitrogen.

Reactions were monitored by TLC carried out on silica 0,25 mm (60 F254, Merck) using UV light as visualizing agent and basic aqueous permanganate as developing agent.

^1H NMR (400 MHz), ^{13}C NMR (100 MHz) were measured on a Bruker Avance 400 MHz spectrometer. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) downfield from residual solvents peaks and coupling constants are reported as Hertz (Hz). Splitting patterns are designated as singlet (s), broad singlet (br. s), doublet (d), triplet (t), quartet (q), quintet (quint), heptuplet (hept), multiplet (m). Splitting patterns that could not be interpreted or easily visualized are designated as multiplet (m).

LC-MS mass spectra were recorded using a single quadrupole mass spectrometer (SQD 2, Waters) with electrospray source coupled to Ultra-High Performance Liquid Chromatography (Acquity UPLC H-Class, Waters).

LC-UV analysis were performed on the same LC system.

Accurate mass measurements of final compounds were achieved using a high resolution mass spectrometer (Xevo[®] G2-XS Q-Tof, Waters)

Infrared spectra (IR) were obtained on a Perkin Elmer system 2000 FT-IR spectrophotometer or a Perkin Elmer UATR TWO FTIR spectrophotometer and are reported as wavenumbers (cm^{-1}).

Melting points (Mp) were obtained on a BÜCHI Melting Point B-545 and are reported in °C.

Absorbances were measured on a UV JASCO V-750 equipped with an injection module (GSP-909) and a Peltier (EHCS-760).

Steady state spectra were reported on a Edinburgh FS5 spectrofluorometer with SC20 module.

Purification on reversed phase chromatography were done with a Puriflash[®] XS520Plus (Columns: BIOTAGE[®] SNAP Cartridge KP-C18-SH-120g or KP-C18-SH-60g).

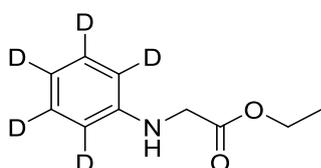
Purification via supercritical fluid chromatography (SFC) were achieved using a JASCO semi preparative SFC system composed of two CO₂ pumps (Pu-4386, Pu-4387) and two modifier pumps (Pu-4180, Pu-4087), an autosampler (As-4350), a column oven (Co-4065) and a backpressure regulator (BP-4340). Chromatographic response was recorded using a PDA detector (MD-4010). Data were collected by ChromNAV 2 software.

Analytical SFC analyses were performed on a Waters ACQUITY UPC² system. Chromatographic response was recorded using a PDA detector. Data were collected by MassLynx Software

Chapitre I : Cycloadditions des sydnones et des iminosydnones avec des alcynes

▪ Deuterated internal standard synthesis

Ethyl (phenyl-d5)glycinate I-1



$C_{10}H_8D_5NO_2$
MW: 184.25 g.mol⁻¹
Yield: 68%
White solid

To a solution of aniline-*d*₅ (65 mg, 60 μL, 0.66 mmol, 1 equiv.) in EtOH (2 mL) was added ethylchloroacetate (97 mg, 84 μL, 0.79 mmol, 1.15 equiv.) and NaOAc (65 mg, 0.79 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was warmed at 80 °C overnight. The mixture was cooled down to room temperature, extracted with AcOEt (3 x 20 mL) and washed with water. Crude product was purified by chromatographic column (SiO₂, Heptane/AcOEt 9/1) to give the desired product as a white solid (83 mg, 0.45 mmol, 68%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 4.19 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.89 (s, 2H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). NH not observed

¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 173.5, 149.2, 129.5 (t, *J* = 23 Hz, 2C), 118.2 (t, *J* = 23 Hz), 113.6 (t, *J* = 23 Hz, 2C), 62.0, 46.6, 14.5.

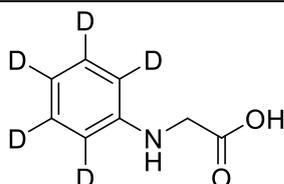
LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 185.0

HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₁₀H₉D₅NO₂ 185.1338 ; Found 185.1336.

IR : 1560, 1378, 1161.

Mp : 269-271 °C

(phenyl-d5)glycine I-1b



$C_8H_4D_5NO_2$
MW: 156.20 g.mol⁻¹
Yield: 50%
White solid

To a solution of ethyl (phenyl-*d*₅)glycinate 4 (133 mg, 0.72 mmol, 1 equiv.) in a mixture of water/THF (2 mL/2 mL) was added NaOH (58 mg, 1.44 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 3 h at 80 °C. After cooled down, HCl was added until pH = 2 and the product was extracted with AcOEt. Organic layers were evaporated to give the desired white compound (56 mg, 0.36 mmol, 50%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 3.86 (s, 2H).

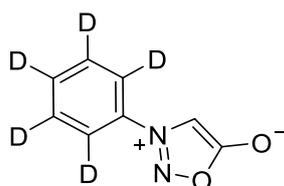
¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ (175.1, 149.1, 129.5 (t, *J* = 24 Hz, 2C), 118.2 (t, *J* = 24 Hz), 113.6 (t, *J* = 24 Hz, 2C), 46.4.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₈H₅D₅NO₂ 157.1025 ; Found 157.1025.

IR : 3385, 1729, 1573, 1408.

Mp : 126-128 °C

3-(phenyl-*d*₅)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olate 1-2



C₈HD₅N₂O₂

MW: 167.18 g.mol⁻¹

Yield: 78%

White solid

To a solution of (phenyl-*d*₅)glycine 5 (260 mg, 1.67 mmol, 1 equiv) in DCM (6 mL) was added *tert*-butylnitrite (188 mg, 218 μL, 1.83 mmol, 1.1 equiv). The mixture was stirred 10 minutes then evaporated at 0 mbar to remove *tert*-butylnitrite. Crude was redissolved in DCM (6 mL) and anhydride acetic (425 mg, 394 μL, 4.17 mmol, 2.5 equiv) was added and warmed to 60 °C for 1 hour. The mixture was then cooled down to room temperature and evaporated to give the desired product (217 mg, 1.3 mmol, 78%)

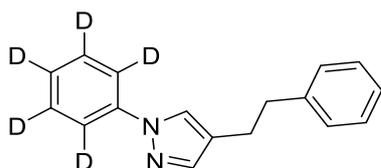
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.73 (s, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 169.1, 134.9, 132.1 (t, *J* = 24 Hz, 2C), 130.0 (t, *J* = 24 Hz), 121.0 (t, *J* = 24 Hz, 2C), 93.8.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺: 168.1.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₈H₂D₅N₂O₂ 168.0821; Found 168.0821.

4-phenethyl-1-(phenyl-*d*₅)-1H-pyrazole *d*₆-P1



$C_{17}H_{11}D_5N_2$
MW: 253.36 g.mol⁻¹
Yield: 54%
 Yellowish oil

To a solution of 3-(phenyl-d₅)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olate (100 mg, 0.60 mmol, 1 equiv.) in tBuOH/H₂O (1.5/1.5 mL) was added 4-phenyl-1-butyne (117 mg, 0.90 mmol, 1.5 equiv.). bathophenanthroline disulfonic acid (284 mg, 0.48 mmol, 0.8 equiv) was added followed by CuSO₄·5H₂O (60 mg, 0.24 mmol, 0.4 equiv) in water. (EtOH)₃N (149 mg, 0.60 mmol, 1 equiv.) was added followed by sodium ascorbate (237 mg, 1.18 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred at 40 °C during 16 h, then cooled down and purified by Supercritical Fluid Chromatography to give 81 mg of internal standard **d₅P1** as a yellowish oil (81 mg, 0.32 mmol, 54%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.62 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.31 (dd, *J* = 9.5, 5.5 Hz, 2H), 7.22 (m, 3H), 2.97 – 2.90 (m, 2H), 2.90 – 2.84 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 141.6, 141.1, 140.3, 129.3 – 128.8 (t, *J* = 24 Hz, 2C), 128.7 (2C), 128.5 (2C), 126.2, 125.9 – 125.5 (t, *J* = 24 Hz, 1C), 125.0, 123.1, 118.9 – 118.1 (t, *J* = 24 Hz, 2C) 37.3, 26.3.

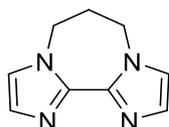
LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺: 254.4

HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₁₇H₁₂D₅N₂ 254.1706; Found 254.1705.

IR : 3288, 3082, 2276, 1796, 1603, 1564, 1440, 1392.

▪ Ligand synthesis

6,7-dihydro-5H-diimidazo[1,2-a:2',1'-c][1,4]diazepine (L1)



$C_9H_{10}N_4$
MW: 174.21 g.mol⁻¹
Yield: 38%
 Orange solid

To a solution of 2,2'-biimidazole (200 mg, 1.49 mmol, 1 equiv.) in DMF (100 mL) was added K₂CO₃ (823 mg, 5.96 mmol, 4 equiv.). The mixture was stirred for 1 hour at 40 °C. Then 1, 3-dibromopropane (166 μL, 1.64 mmol, 1.1 equiv.) was added and the reaction was stirred for 16 h at 40 °C. The solvent was

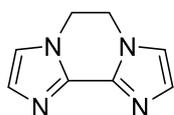
removed under reduced pressure and the crude was diluted with DCM and H₂O, the organic layer was extracted with DCM, dried over MgSO₄, and the solvent was removed under reduced pressure to afford the product **L1** as an orange solid without further purification (100 mg, 0.57 mmol, 38%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.92 (s, 2H), 6.74 (s, 2H), 4.11 (t, *J* = 7.6 Hz, 4H), 2.24 (quint, *J* = 7.6 Hz, 2H).

LC-MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 175.

According to Rau *et al. Inorg. Chem.* **2020**, 59, 17, 12097–12110

5,6-dihydrodiimidazo[1,2-*a*:2',1'-*c*]pyrazine (**L2**)



C₈H₈N₄
MW: 160.18 g.mol⁻¹
Yield: 75%
Beige solid

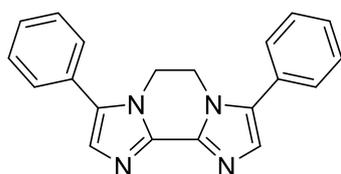
To a solution of 2,2'-biimidazole (600 mg, 4.47 mmol, 1 equiv.) in DMF (125 mL) was added K₂CO₃ (3.09 g, 22.36 mmol, 5 equiv.). The mixture was stirred for 1 hour at 40 °C. Then 1,2-dibromoethane (423 μL, 4.92 mmol, 1.1 equiv.) was added and the reaction was stirred for 16 h at 100 °C. The solvent was removed under reduced pressure and the crude was diluted with DCM and H₂O, the organic layer was extracted with DCM, dried over MgSO₄, and the solvent was removed under reduced pressure to afford the product **L2** as a beige solid without further purification (537 mg, 3.36 mmol, 75%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.13 (d, *J* = 1.0 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 1.0 Hz, 2H), 4.35 (s, 4H).

LC-MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 161.

According to *Inorg. Chem.* **2020**, 59, 17, 12097–12110

3,8-diphenyl-5,6-dihydrodiimidazo[1,2-*a*:2',1'-*c*]pyrazine (**L3**)



C₂₀H₁₆N₄
MW: 312.37 g.mol⁻¹
Yield: 45%
White solid

Into a round bottom flask, dried K₂CO₃ (345 mg, 2.5 mmol, 4 equiv.), **L2** (100 mg, 0.624 mmol, 1 equiv.), bromobenzene (195 μL, 1.87 mmol, 3 equiv.), Pd(OAc)₂ (28 mg, 0.125 mmol, 0.2 equiv.) and dppe (99

mg, 0.249 mmol, 0.4 equiv.) were mixed in DMF (final concentration 0.1 M). The mixture was stirred at 140 °C for 48 h under argon atmosphere. The resultant mixture was cooled down to room temperature and subsequently filtered off through celite with CHCl₃ three times. To the organic solution was added brine. The combined mixture was extracted with CHCl₃. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc, 1/9) to afford the desired product **L3** as a white solid (87 mg, 0.28 mmol, 45%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.65–7.59 (m, 4H), 7.42–7.28 (m, 6H), 7.12 (s, 2H), 4.29 (s, 4H).

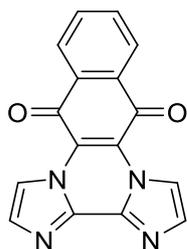
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 138.8 (2C), 132.8 (2C), 132.2 (2C), 130.9 (2C), 129.1 (4C), 128.9 (2C), 128.3 (4C), 42.0 (2C).

IR (cm⁻¹) 3040, 2965, 1603, 1478, 1348, 1227, 1174, 1057, 958.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₂₀H₁₇N₄ 313.1453; Found 313.1454.

Mp : 228–230 °C.

Benzo[*g*]diimidazo[1,2-*a*:2',1'-*c*]quinoxaline-8,13-dione (**L4**)



C₁₆H₈N₄O₂
MW: 288.27 g.mol⁻¹
Yield: 29%
Brown solid

To a solution of 2,2'-biimidazole (250 mg, 1.86 mmol, 1 equiv.) in DMF (10 mL) was added NaH (75 mg, 3.91 mmol, 60% in oil, 2.1 equiv.). The mixture was stirred for 1 hours at room temperature. Then 2,3-dibromo-1,4-naphthoquinone (587 mg, 1.86 mmol, 1 equiv.) was added and the reaction was stirred for 24 h at room temperature. The reaction was quenched by H₂O (4 mL) and the organic layer was extracted with DCM, dried over MgSO₄, and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH, 95/05) to afford the desired product **L4** as a brown solid (155 mg, 0.54 mmol, 29%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.02 (dd, *J* = 7.6, 1.1 Hz, 2H), 7.96 (dd, *J* = 7.6, 1.1 Hz, 2H), 7.69 (td, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 2H), 7.60 (td, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 2H).

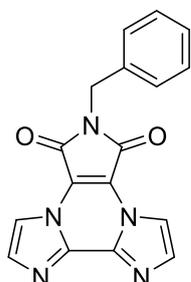
¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 185.7 (2C), 136.0 (2C), 135.3 (2C), 132.5 (2C), 131.9 (2C), 127.4 (2C), 127.1 (2C), 107.5 (2C).

IR (cm⁻¹) 1628, 1587, 1536, 1405, 1267, 1145, 1104, 994, 939.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₁₆H₉N₄O₂ 289.0725; Found 289.0724.

Mp : decomp. > 315 °C.

6-benzyl-5H-diimidazo[1,2-*a*:2',1'-*c*]pyrrolo[3,4-*e*]pyrazine-5,7(6H)-dione (L5)



$C_{17}H_{11}N_5O_2$
MW: 317.31 g.mol⁻¹
Yield: 67%
Orange solid

To a solution of 2,2'-biimidazole (250 mg, 1.86 mmol, 1 equiv.) in DMF (10 mL) was added NaH (75 mg, 3.91 mmol, 60% in oil, 2.1 equiv.). The mixture was stirred for 1 hour at room temperature. Then *N*-benzyl-2,3-dibromomaleimide (641 mg, 1.86 mmol, 1 equiv.) was added and the reaction was stirred for 24 h at room temperature. The reaction was quenched by H₂O (4 mL) and the organic layer was extracted with DCM, dried over MgSO₄, and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH, 95/05) to afford the desired product **L5** as an orange solid (395 mg, 1.24 mmol, 67%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.14 (d, *J* = 1.4 Hz, 2H), 7.76 (d, *J* = 1.4 Hz, 2H), 7.48–7.40 (m, 2H), 7.39–7.31 (m, 3H), 4.87 (s, 2H).

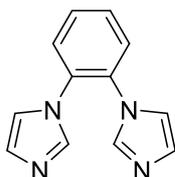
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 161.9 (2C), 137.1 (2C), 135.3 (2C), 129.1, 129.0 (2C), 128.8 (2C), 128.6, 118.2 (2C), 113.5 (2C), 42.3.

IR (cm⁻¹) 3140, 2940, 1785, 1699, 1505, 1437, 1385, 1341, 1305, 1124, 916, 815, 770.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₁₇H₁₂N₅O₂ 318.0991; Found 318.0990.

Mp : decomp. > 315 °C.

1-[2-(1H-imidazol-1-yl)phenyl]-1H-imidazole (LS1)



$C_{12}H_{10}N_4$
MW: 210.23 g.mol⁻¹
Yield: 45%
White solid

In a round-bottom flask were added 1,2-dibromobenzene (10.0 g, 42.4 mmol), imidazole (7.21 g, 106 mmol), K₂CO₃ (11.7 g, 84.8 mmol), Cu₂O (0.303 g, 2.12 mmol), and DMSO (20 mL). The mixture was stirred at 150 °C overnight. The resultant mixture was cooled to room temperature and filtered off through Celite with EtOAc. To the organic solution was added H₂O and the mixture was extracted with EtOAc. The combined organic layer were dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. A recrystallisation was performed with CHCl₃ and heptane to afford the desired product **LS1** as a white solid (3.30 g, 15.7 mmol, 45%).

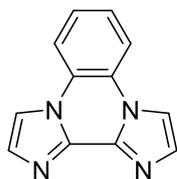
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.53–7.60 (m, 2 H), 7.46–7.52 (m, 2 H), 7.41–7.46 (m, 2 H), 7.11 (s, 2 H), 6.74 (s, 2 H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 136.7 (2C), 132.1 (2C), 130.5 (2C), 129.7 (2C), 127.1 (2C), 119.4 (2C).

IR (cm⁻¹) 3101, 2919, 2850, 1682, 1600, 1520, 1487, 1368, 1304, 1247, 1177, 1112, 1090, 1065, 965, 904, 835, 780.

LC-MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 211.

Diimidazo[1,2-*a*:2',1'-*c*]quinoxaline (L6)



C₁₂H₈N₄
MW: 208.07 g.mol⁻¹
Yield: 86%
Yellow solid

1-[2-(1*H*-imidazol-1-yl)phenyl]-1*H*-imidazole **LS1** (400 mg, 1.90 mmol) was dissolved in 8 mL of dried THF. The reaction was cooled to -78 °C and *n*BuLi (1.6 M solution, 2.85 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred for 60 min, then a solution of Pd(PPh₃)₄ (43.9 mg, 0.0380 mmol) in THF (5 mL) was added. The solution was slowly warmed to room temperature, and stirred for 19 h under argon atmosphere. Then a solution of brine was added and extraction was carried out with ethyl acetate. The organic layer was dried with magnesium sulfate, and then evaporated under vacuum. A recrystallization was performed in CHCl₃ and heptane to afford the desired product **L6** as a yellow solid (341 mg, 1.64 mmol, 86%).

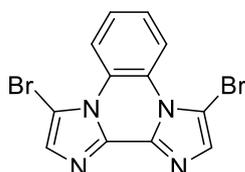
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.89–7.66 (m, 4 H), 7.628–7.625 (m, 2 H), 7.55–7.53 (m, 2 H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 135.8 (2C), 132.6 (2C), 126.3 (2C), 124.4 (2C), 116.6 (2C), 112.4 (2C).

IR (cm⁻¹) 1633, 1574, 1509, 1463, 1410, 1348, 1326, 1116, 931, 759, 685.

LC-MS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ 231.

3,10-dibromodiimidazo[1,2-*a*:2',1'-*c*]quinoxaline (L7)



$C_{12}H_6Br_2N_4$
MW: 366.02 g.mol⁻¹
Yield: 98%
Yellow solid

To a solution of diimidazo[1,2-*a*:2',1'-*c*]quinoxaline **L6** (155 mg, 0.745 mmol, 1 equiv.) in DMF (10 mL) was added NBS (265 mg, 1.49 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred for 3 hours at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure, and the crude was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH, 95/05) to afford the desired product **L7** as a yellow solid (266 mg, 0.73 mmol, 98%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.23 (dd, *J* = 6.5, 3.5 Hz, 2H), 7.55 (dd, *J* = 6.5, 3.5 Hz, 2H), 7.53 (s, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 137.0 (2C), 135.9 (2C), 126.5 (2C), 126.2 (2C), 117.4 (2C), 97.9 (2C).

IR (cm⁻¹) 1597, 1559, 1402, 1984, 1332, 1238, 1162, 1117, 755.

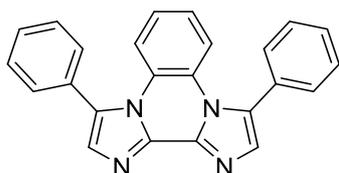
HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₁₂H₇Br₂N₄ 364.9037; Found 364.9037.

Mp : decomp. > 315 °C.

General Procedure A for arylation of compound L6:

Into a round bottom flask, dried K₂CO₃ (4 equiv.), **L6** (1 equiv.), bromoaryl (3 equiv.), Pd(OAc)₂ (0.1 equiv.) and dppe (0.2 equiv.) were mixed in DMF (final concentration 0.1 M). The mixture was stirred at 140 °C for 48 h under argon atmosphere. The resultant mixture was cooled down to room temperature and subsequently filtered off through Celite with CHCl₃ three times. To the organic solution was added brine. The combined mixture was extracted with CHCl₃. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate and evaporated. A column chromatography was performed (SiO₂, EtOAc/Heptane : 9/1).

3,10-diphenyldiimidazo[1,2-*a*:2',1'-*c*]quinoxaline (L8)



$C_{24}H_{16}N_4$
MW: 360.42 g.mol⁻¹
Yield: 84%
Yellow solid

Following the general procedure A using compound **L6** (275 mg, 1.32 mmol), bromobenzene (416 μ L, 3.96 mmol) and the crude was purified by column chromatography (Heptane/Ethyl acetate : 1/9) to afford the desired product **L8** as a yellow solid (399 mg, 1.10 mmol, 84%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45–7.59 (m, 14 H), 6.99–7.07 (m, 2 H).

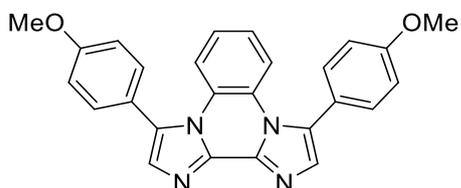
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 137.2 (2C), 133.6 (2C), 130.6 (2C), 130.2 (2C), 129.6 (4C), 129.1 (6C), 126.0 (2C), 125.2 (2C), 118.5 (2C).

IR (cm⁻¹) 3057, 1708, 1623, 1572, 1523, 1494, 1476, 1445, 1376, 1347, 1283, 1161, 1073, 953, 848, 761, 731, 702, 645.

LC-MS (ESI) m/z [M+H]⁺ 361.

Mp : 219–221 °C.

3,10-bis(4-methoxyphenyl)diimidazo[1,2-a:2',1'-c]quinoxaline (L9)



$C_{26}H_{20}N_4O_2$
MW: 420.47 g.mol⁻¹
Yield: 40%
Brown solid

Following the general procedure A using compound **L6** (100 mg, 0.48 mmol), bromoanisole (240 μ L, 1.92 mmol) and the crude was purified by column chromatography (Heptane/Ethyl acetate : 1/9) to afford the desired product **L9** as a brown solid (82 mg, 0.2 mmol, 40%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.53–7.51 (m, 3 H), 7.46–7.43 (m, 5 H), 7.05–7.03 (m, 6 H), 3.51 (s, 6 H).

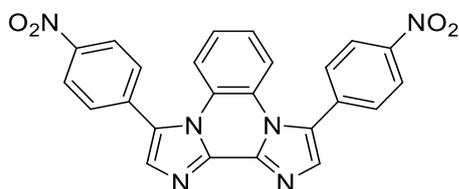
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 160.2 (2C), 136.9 (2C), 133.3 (2C), 131.1 (4C), 129.8 (2C), 126.2 (2C), 125.1 (2C), 122.8 (2C), 118.3 (2C), 114.5 (4C), 55.6 (2C).

IR (cm⁻¹) 3004, 2960, 2838, 2545, 2231, 2045, 1894, 1681, 1610, 1573, 1556, 1505, 1494, 1473, 1463, 1441, 1416, 1376, 1347, 1297, 1249, 1177, 1109, 1083, 1029, 954, 909, 8333, 754, 731, 678.

LC-MS (ESI) m/z [M+H]⁺ 421.

Mp : 189–191 °C.

3,10-bis(4-nitrophenyl)diimidazo[1,2-a:2',1'-c]quinoxaline (L10)



$C_{24}H_{14}N_6O_4$
MW: 450.41 g.mol⁻¹
Yield: 59%
Yellow solid

Following the general procedure A using compound **L6** (100 mg, 0.48 mmol), 1-bromo-4-nitrobenzene (388 mg, 1.92 mmol) and the crude was purified by column chromatography (Heptane/Ethyl acetate : 1/9) to afford the desired product **L10** as a yellow solid (127 mg, 0.28 mmol, 59%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.42 (d, J = 8.4 Hz, 4 H), 7.79 (d, J = 8.4 Hz, 4 H), 7.68 (s, 2 H), 7.49–7.47 (m, 2 H), 7.22–7.20 (m, 2 H).

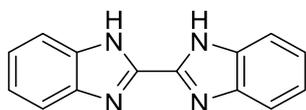
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 147.8 (2C), 138.3 (2C), 136.5 (2C), 135.6 (2C), 129.5 (4C), 128.4 (2C), 126.1 (2C), 125.6 (2C), 124.5 (4C), 118.9 (2C).

IR (cm⁻¹) 3102, 1916, 1596, 1515, 1492, 1474, 1375, 1342, 1299, 1139, 1108, 1014, 973, 909, 852, 753, 731, 697.

LC-MS (ESI) m/z [M+H]⁺ 451.

Mp : decomp. > 315 °C.

1H,1'H-2,2'-bibenzo[d]imidazole (LS2)



$C_{14}H_{10}N_4$
MW: 234.26 g.mol⁻¹
Yield: 85%
Yellow solid

To a solution of *o*-phenylenediamine (5 g, 46.23 mmol, 2.0 equiv.) in methanol (70 mL) was added methyl-2,2,2-trichloroacetimidate (4.07 g, 23.11 mmol, 1.0 equiv.), followed by concentrated HCl (0.2 mL) at 0 °C under argon, and the obtained mixture was stirred for 3 hours at room temperature. To this mixture three portions of K₂CO₃ (1.63 g, 11.8 mmol, 0.5 equiv.; 3.25 g, 23.11 mmol, 1.0 equiv.; 3.25 g, 23.11 mmol, 1.0 equiv.) were added at intervals of 3 h, 3 h and 15 h. The reaction mixture was stirred another 24 h after the final addition, and then water and Et₂O were added. The resulting precipitate

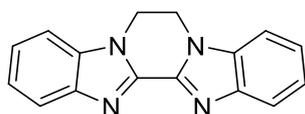
was filtered, washed with water and Et₂O, and dried in vacuum to afford the desired product **LS2** as a yellow solid (4.6 g, 19,7 mmol, 85%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 13.54 (s, 2H), 7.75 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.35-7.26 (m, 4H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ 143.8 (2C), 143.5 (2C), 134.8 (2C), 123.6 (2C), 122.2 (2C), 119.2 (2C), 112.1 (2C).

According to *Inorg. Chem.* **2020**, 59, 17, 12097–12110

6,7-dihydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-*a*]benzo[4,5]imidazo[2,1-*c*]pyrazine (L11)



C₁₆H₁₂N₄
MW: 260.3 g·mol⁻¹

Yield: 74%
Yellow solid

To a solution of 1*H*,1'*H*-2,2'-bibenzo[*d*]imidazole **LS2** (200 mg, 0.854 mmol, 1 equiv.) in THF (8 mL) was added Cs₂CO₃ (834 mg, 2.56 mmol, 3 equiv.), followed by 1-bromo-2-chloroethane (1.5 mL, 18.02 mmol, 21 equiv.), and the obtained mixture was stirred for 16 hours at 60 °C. Then NH₄OH (25%) was added and the solution was stirred for 15 min at room temperature. H₂O and DCM were added, and the organic layer was extracted with DCM. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate and evaporated to afford the desired product **L11** as a yellow solid (174 mg, 0.67 mmol, 74%).

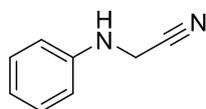
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.92 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.46–7.40 (m, 2H), 7.40–7.33 (m, 4H), 4.67 (s, 4H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 144.5 (2C), 141.8 (2C), 134.3 (2C), 124.6 (2C), 123.7 (2C), 121.7 (2C), 109.5 (2C), 40.9 (2C).

According to *Inorg. Chem.* **2020**, 59, 17, 12097–12110

▪ Mesoionics synthesis

2-(phenylamino)acetonitrile I-4



$C_8H_8N_2$

MW: 132.1 g.mol⁻¹

Yield: 90%

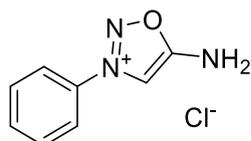
Beige solid

To a suspension of aniline (3.5 g, 38 mmol, 1.0 equiv.) in MeCN (20.0 mL) was added successively NaI (38 mmol, 1.0 equiv.), K₂CO₃ (6.3 g, 45 mmol, 1.2 equiv.) and chloroacetonitrile dropwise (76 mmol, 2.0 equiv.). The mixture was refluxed for 18 hours under argon. The reaction mixture was cooled down, filtered on a pad of Celite and rinsed with EtOAc. The filtrate was washed with brine. The organic layer was separated, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc, 8:2 to 7:3) to give the desired product as a beige solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.83 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.03 (s, 1H), 3.75 (s, 2H).

According to *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 12056–12060

5-amino-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride I-5



$C_8H_8N_3O^+$

MW: 162.1g.mol⁻¹

Yield: 81%

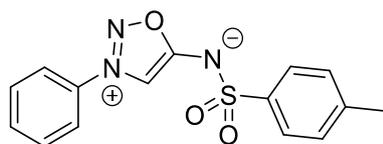
Brown solid

To a solution of 2-(phenylamino)acetonitrile (200 mg, 1.5 mmol, 1.0 equiv.) in dry THF (7.0 mL), *tert*-butyl nitrite (4.5 mmol, 3.0 equiv.) was added dropwise at 0 °C. The mixture was then stirred at room temperature for 16 hours. After full conversion, the solvent was evaporated under reduce pressure. To the crude was added HCl 4 M in dioxane (6.0 mL). The mixture was stirred during 30 min at room temperature under argon. Et₂O was added and the precipitate was collected by filtration, washed with Et₂O to afford the product as a brown solid.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8.27 (s, 1H), 7.96 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 7.25 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 6.97 (s, 1H).

According to *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 12056–12060

(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(tosyl)amide (B)



C₁₅H₁₃N₃O₃S

MW: 315.3 g.mol⁻¹

Yield: 51%

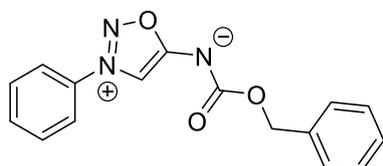
White solid

To a solution of **I-5** (39.5 mg, 0.20 mmol) in anhydrous pyridine (180 μ L) at 0 °C was added tosyl chloride (41.9 mg, 0.22 mmol) portionwise. The mixture was stirred at room temperature overnight. Afterward, H₂O was added and the mixture was extracted with DCM. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The resulting material was purified through flash chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc, from 100/0 to 90/10) to afford 21 mg (0.067 mmol, 43% yield) of analytically pure white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.90 (s, 1H), 7.85 (m, 2H), 7.78 (m, 2H), 7.70 (m, 1H), 7.63 (m, 2H), 7.24 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 2.37 (s, 3H)

According to *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 12056–12060

((benzyloxy)carbonyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (C)



C₁₆H₁₃N₃O₃

MW: 295.3 g.mol⁻¹

Yield: 68%

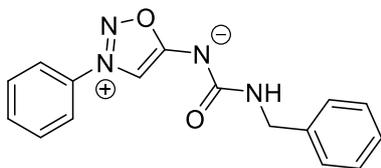
Brown powder

To a solution **I-5** (2.0 g, 10.1 mmol, 1.0 equiv.) in DCM was added benzylchloroformate (2.17 mL, 15.2 mmol, 1.5 equiv.). Et₃N (3.17 mL, 22.8 mmol, 2.25 equiv.) was added dropwise at -20 °C. DMAP (62 mg, 61.8 mmol, 0.2 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 16 h. The mixture was stirred for 16 h at room temperature. H₂O was added the mixture was extracted with DCM and washed with brine. The organic phase was dried over MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified on silica chromatographic column using cyclohexane/EtOAc 8:2 to 5:5 to afford the desired compound as a brown powder.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.10 – 8.04 (m, 1H), 7.81 – 7.66 (m, 2H), 7.41 – 7.35 (m, 2H), 7.34 – 7.29 (m, 1H), 5.10 (s, 1H).

According to *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 12056–12060

(benzylcarbamoyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (D)



C₁₆H₁₄N₄O₂

MW: 294.31 g.mol⁻¹

Yield: 52%

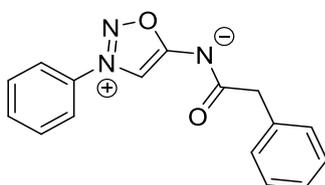
White solid

To a solution of **I-5** (200 mg, 1.5 mmol, 1.0 equiv.) and benzylisocyanate (1.8 mmol, 1.2 equiv.) in THF was added a solution of NaHCO₃ in H₂O (2.3 mmol, 1.5 equiv.) and the mixture was stirred at room temperature for 16 h. The crude product was purified by reversed phase on automatized Puriflash[®] (100% Water + 0,1% TFA to 100% MeCN + 0,1% TFA over one hour) to give the desired compound.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.20 – 8.16 (m, 1H), 7.82 – 7.76 (m, 2H), 7.73 – 7.60 (m, 3H), 7.32 (dd, *J* = 8.2, 5.5 Hz, 4H), 4.50 (s, *J* = 6.1 Hz, 2H).

According to *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 12056 –12060

(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(2-phenylacetyl)amide (E)



C₁₆H₁₃N₃O₂

MW: 279.30 g.mol⁻¹

Yield: 35%

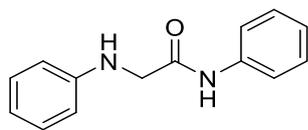
Yellow powder

To a solution of **I-5** (2.0 g, 10.1 mmol, 1.0 equiv.) in DCM/MeCN 8:2 were added phenylacetic acid (316 μL, 2.5 mmol, 1.0 equiv.), EDCI (510 mg, 3.3 mmol, 1.3 equiv.) and DMAP (62 mg, 61.8 mmol, 0.2 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 16 h. The mixture was evaporated under reduced pressure, extracted with DCM and washed with a solution of Na₂CO₃. The organic phase was dried over MgSO₄, filtrated and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified on silica chromatographic column using cyclohexane/EtOAc 100:0 to 0:100 to afford the desired compound as a yellow powder.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.08 – 8.01 (m, 1H), 7.80 – 7.67 (m, 2H), 7.30 (s, 1H), 7.28 (dd, *J* = 2.9, 2.3 Hz, 1H), 7.20 (ddd, *J* = 11.0, 5.5, 3.0 Hz, 1H), 3.64 (s, 1H).

According to *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 12056 –12060

***N*-phenyl-2-(phenylamino)acetamide I-6**



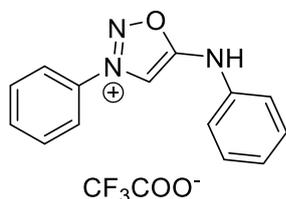
$C_{14}H_{14}N_2O$
MW: 226.28 g.mol⁻¹
Yield: Quantitative
White solid

To a solution of aniline (0.82 g, 8.8 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous DCM (0,1M) was added dropwise at 0°C chloroacetylchloride (17.7 mmol, 2.0 equiv.). Then the mixture was warmed to room temperature until completion of the reaction (30 min). The volatiles were removed under reduced pressure. The crude intermediate was dissolved in anhydrous THF (0,1M) and Lil was added (26.5 mmol, 3.0 equiv.) followed by 1.0 equiv. of aniline and 3.0 equiv. of K₂CO₃. After completion of the reaction (2h), the crude was concentrated under reduced pressure and purified by chromatographic column (DCM/EtOAc 7:3).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.60 (s, 1H), 7.62 – 7.49 (m, 2H), 7.37 – 7.31 (m, 2H), 7.29 – 7.24 (m, 2H), 7.16 – 7.11 (m, 1H), 6.91 – 6.87 (m, 1H), 6.75 – 6.71 (m, 2H), 4.38 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 3.93 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H).

According to *J. Am. Chem.Soc.* **2023**, *145*, 2219–2229

***3*-phenyl-5-(phenylamino)-1,2,3-oxadiazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate (F)**



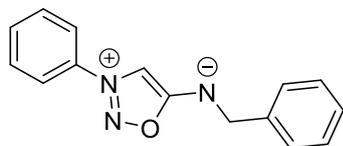
$C_{14}H_{11}N_3O$
MW: 237.3 g.mol⁻¹
Yield: 90%
Yellow solid

N-phenyl-2-(phenylamino)acetamide (200 mg, 0.9 mmol, 1.0 equiv.) was suspended in freshly distilled DCM (0,2 M) in an oven dry sealed tube. *t*BuONO (2.6 mmol, 3.0 equiv.) was added to the solution, the mixture was heated at 40 °C for 10 min. After completion of the reaction volatiles were removed under reduced pressure (for at least 30 min) and the crude mixture was re-suspended in freshly distilled DCM (0,2 M). After that, PCl₅ (0.97 mmol, 1.1 equiv.) was added to the mixture and the reaction was stirred for 16 h at room temperature. After completion of the reaction DCM was removed, and the crude product was purified by reversed phase on automatized Puriflash® (100% Water + 0,1% TFA to 100% MeCN + 0,1% TFA over one hour) to give the desired compound.

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.94 (s, 1H), 8.13 – 8.06 (m, 2H), 7.92 – 7.85 (m, 1H), 7.84 – 7.78 (m, 2H), 7.56 (ddd, *J* = 9.2, 5.6, 1.9 Hz, 2H), 7.51 – 7.46 (m, 2H), 7.42 – 7.34 (m, 1H).

According to *J. Am. Chem.Soc.* **2023**, *145*, 2219–2229

benzyl(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (G)



C₁₅H₁₃N₃O

MW: 251.3 g.mol⁻¹

Yield: 38%

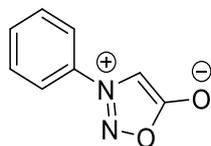
Brown solid

To a solution of benzylamine (200 mg, 1.87 mmol, 1.0 equiv.) in freshly distilled DCM (20 mL) was added chloroacetylchloride (419 mg, 295 μ L, 3.74 mmol, 2 equiv.) and the mixture was stirred 30 minutes. Volatiles were removed and redissolved in THF (20 mL). LiI (376 mg, 2.8 mmol, 1.5 equiv.) was added followed by aniline (521 mg, 5.60 mmol, 3 equiv.) and K₂CO₃ (774 mg, 5.6 mmol, 3 equiv.) and the mixture was stirred overnight. After evaporation, the crude mixture was purified by reversed phase on automatized Puriflash® (100% Water + 0,1% TFA to 100% MeCN + 0,1% TFA over one hour). 138 mg of the desired product was engaged directly in the next step by dissolving in DCM (3 mL). *t*BuONO (0.177 mg, 3 equiv.) was added and the mixture was stirred 30 minutes then evaporated to remove volatils. The crude was redissolved in DCM (3 mL) and PCl₅ (0.131 mg, 1.1 equiv.) was added. After 1 hour stirring, the crude was evaporated and purified by reversed phase on automatized Puriflash® to give the desired product.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.73 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.76 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.67 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.45 – 7.32 (m, 5H), 4.73 (s, 2H).

According to *J. Am. Chem.Soc.* **2023**, *145*, 2219–2229

3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olate (A)



C₈H₆N₂O₂

MW: 162.1 g.mol⁻¹

Yield: 85%

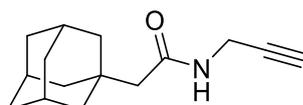
Beige solid

To a stirred solution of *N*-phenyl glycine (10.0 g, 66.2 mmol) was slowly added *t*BuONO (8.51 mL, 72.8 mmol). The mixture was stirred during 30 min at room temperature before the addition of acetic anhydride (22.0 mL, 165 mmol). The stirring was kept for 1 h at 100 °C after which the mixture was evaporated under *vaccum*. The crude product was purified by recrystallization from H₂O/EtOH 8/2. 9.10 g (56.1 mmol, 85%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.94 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 2H), 7.78 (s, 1H), 7.77–7.67 (m, 3H) ppm
According to *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 12056–12060

▪ Alkynes synthesis

acetamide 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)-*N*-(prop-2-yn-1-yl)acetamide (D3)



$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}$

MW: 231.33 g.mol $^{-1}$

Yield: 67%

White solid

To a solution of 1-adamantaneacetic acid (200 mg, 1.03 mmol, 1 equiv.) in DMF (2 mL) was added HATU (392 mg, 1.03 mmol, 1 equiv.), DIPEA (179 μL , 1.03 mmol, 1 equiv.) followed by propargylamine (7.2 μL , 1.13 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was stirred overnight then evaporated. The crude mixture was purified by chromatographic column (SiO_2 , DCM/MeOH (8/2)) to give a white solid as desired product (160 mg, 67%).

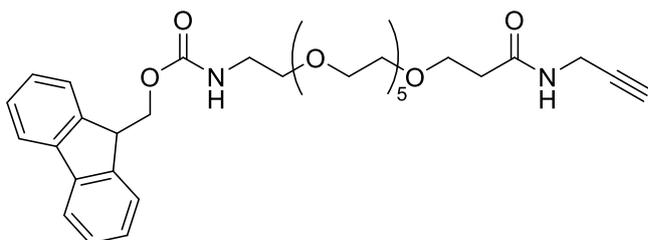
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.90 (s, 1H), 4.01 (dd, $J = 5.3$, 2.6 Hz, 2H), 2.19 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 1.93 (s, 5H), 1.64 (m, 12H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 170.9, 80.0, 71.4, 51.4, 42.7 (3C), 36.8 (3C), 33.0, 29.0, 28.7 (3C).

LCMS (ESI) m/z [M+H] $^+$ 232.9

According to *J. Org. Chem.* 2014, 79, 11, 5047–5061

(9*H*-fluoren-9-yl)methyl(21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-22-azapentacos-24-yn-1-yl)carbamate (D4)



$\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_9$

MW: 612.72 g.mol $^{-1}$

Yield: 99 %

Yellow oil

To a solution of 1-(9*H*-fluoren-9-yl)-3-oxo-2,7,10,13,16,19,22-heptaoxa-4-azapentacosan-25-oic acid (0.23 g, 0.39 mmol, 1 equiv.), HATU (0.13 g, 0.39 mmol, 1.0 equiv.), DIPEA (0.07 mL, 0.39 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (7 mL) was added prop-2-yn-1-amine (0.03 mL, 0.47 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at room temperature. DMF was evaporated then the crude mixture was purified by flash chromatographic column (SiO₂, Heptane/EtOAc 100/0 to 70/30) to give the desired product as a yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (dt, *J* = 7.6, 1.0 Hz, 2H), 7.58 (dd, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 2H), 7.45 – 7.36 (m, 2H), 7.32 (td, *J* = 7.4, 1.2 Hz, 2H), 6.52 (s, 1H), 5.52 (m, 1H), 4.51 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 4.22 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.98 (dd, *J* = 5.6, 2.6 Hz, 2H), 3.69 – 3.65 (m, 3H), 3.62 – 3.47 (m, 20H), 3.35 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 2.49 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 2.17 (m, 2H).

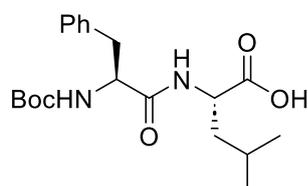
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.2, 157.3, 144.0 (2C), 141.5 (2C), 127.9 (2C), 127.3 (2C), 125.1 (2C), 120.1 (2C), 79.9, 71.2, 70.7 (2C), 69.9 – 68.8 (8C), 68.6, 66.7, 66.4, 47.3, 40.7, 35.6, 29.1.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₃₃H₄₅N₂O₉ 613.3125; Found 613.3126

LC-MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 614,3

IR (cm⁻¹) : 3425, 3287, 2918, 2879, 1711, 1667, 1530, 1247, 1099, 937.

(*tert*-butoxycarbonyl)-*L*-phenylalanyl-*L*-leucine (D6a)



C₂₀H₃₀N₂O₅

MW: 378.47 g.mol⁻¹

Yield: 78%

White solid

To a solution of *L*-Phenylalanyl-*L*-leucine (500 mg, 1.79 mmol, 1 equiv.) in MeOH (15 mL), was added Boc₂O (391 mg, 1.79 mmol, 1 equiv.) and triethylamine (301 μL, 2.16 mmol, 1.2 equiv.) and the solution was stirred overnight at 60 °C. The solvent was removed under reduced pressure, and the crude mixture was solubilized in AcOEt. the organic layer was washed with HCl (0.25 M, 3x5 mL), brine, and dried over MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure, to afford the desired product as a white solid without further purification (528 mg, 78%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.33 – 7.22 (m, 4H), 7.21 – 7.15 (m, 1H), 4.48 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.37 (dd, *J* = 9.3, 4.8 Hz, 1H), 3.13 (dd, *J* = 13.9, 4.8 Hz, 1H), 2.81 (dd, *J* = 13.8, 9.6 Hz, 1H), 1.80 – 1.58 (m, 3H), 1.35 (s, *J* = 13.5 Hz, 9H), 0.93 (dd, *J* = 10.5, 6.4 Hz, 6H), COOH and NH not observed.

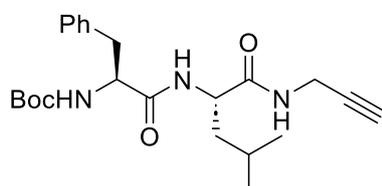
¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 175.6, 174.3, 157.5, 138.6, 130.4 (2C), 129.3 (2C), 127.6, 80.5, 57.0, 52.0, 41.8, 39.1, 28.6 (3C), 25.8, 23.4, 21.9.

IR (cm⁻¹) 3278, 2954, 2834, 1711, 1680, 1546, 1444, 1358, 1248, 1041, 1010, 958.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M-H]⁻ Calcd for C₂₀H₂₉N₂O₅ 377.2076; Found 377.2077.

Mp. 178–180 °C.

Tert-butyl ((S)-1-(((S)-4-methyl-1-oxo-1-(prop-2-yn-1-ylamino)pentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamate (D6)



$C_{23}H_{33}N_3O_4$
MW: 415.54 g.mol⁻¹
Yield: 87%
Yellow solid

To a solution of **D6a** (204 mg, 0.539 mmol, 1 equiv.), propargylamine (41 μ L, 0.647 mmol, 1.2 equiv.) and HOBT (87 mg, 0.647 mmol, 1.2 equiv.), in DMF (8 mL), were added EDC hydrochloride (124 mg, 0.647 mmol, 1.2 equiv.) and DIPEA (220 μ L, 1.347 mmol, 2.5 equiv.). The reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was concentrated and the crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH, 95/05) to afford the desired product as a yellow solid (195 mg, 87%).

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) δ 7.34 – 7.29 (m, 2H), 7.28 – 7.24 (m, 1H), 7.23 – 7.18 (m, 2H), 6.80 (s, 1H), 6.51 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 5.14 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 4.48 – 4.39 (m, 1H), 4.38 – 4.27 (m, 2H), 3.10 (dd, J = 13.9, 6.2 Hz, 1H), 2.99 (dd, J = 13.9, 7.5 Hz, 1H), 2.24 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 1.68 (ddd, J = 13.5, 8.5, 5.0 Hz, 1H), 1.58 – 1.44 (m, 2H), 1.40 (s, 9H), 0.89 (dd, J = 6.3, 4.4 Hz, 6H), one NH not observed.

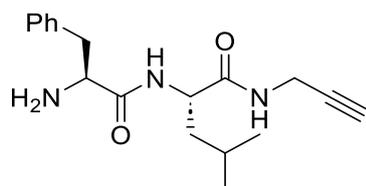
¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂) δ 171.9, 171.7, 156.3, 136.9, 129.7 (2C), 129.1 (2C), 127.4, 80.9, 80.1, 71.3, 56.6, 52.0, 41.0, 38.1, 29.3, 28.4 (3C), 25.0, 23.2, 21.8.

IR (cm⁻¹) 3324, 3297, 2953, 2929, 2870, 1686, 1637, 1526, 1447, 1291, 1249, 1170.

HRMS (ESI-TOF) m/z [M+Na]⁺ Calcd for C₂₃H₃₃N₃O₄Na 438.2369; Found 438.2368.

Mp. 147–149 °C.

(S)-2-((S)-2-amino-3-phenylpropanamido)-4-methyl-N-(prop-2-yn-1-yl)pentanamide (D6')



$C_{18}H_{25}N_3O_2$
MW: 315.42 g.mol⁻¹
Yield: 99%
Solidifying oil

To a solution of **D6** (100 mg, 0.241 mmol, 1 equiv.) in DCM (2 mL) was added HCl (4M in dioxane, 5.6 mL, excess). After 2 hours, the solvent was removed under reduced pressure, and the mixture was rediluted in DCM. A basic work up with NaHCO₃ sat. was performed and the organic layer was extracted

with DCM, dried over MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was obtained as a solidifying colourless oil without further purification (75 mg, 0.24 mmol, 99%).

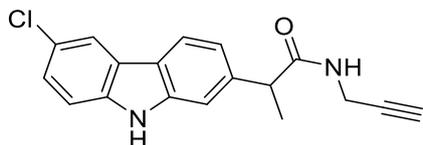
¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.44 – 7.23 (m, 5H), 4.46 (dt, J = 9.1, 5.5 Hz, 1H), 4.23 (dd, J = 7.8, 5.8 Hz, 1H), 3.97 (qd, J = 17.5, 2.5 Hz, 2H), 3.30 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 3.08 (dd, J = 14.2, 8.1 Hz, 1H), 2.66 (t, J = 2.5 Hz, 1H), 1.79 – 1.51 (m, 3H), 0.97 (dd, J = 12.0, 6.5 Hz, 6H), NH and NH₂ not observed.

¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 173.6, 169.4, 135.4, 130.6 (2C), 130.1 (2C), 128.8, 80.4, 72.4, 55.4, 53.2, 42.1, 38.5, 29.5, 25.7, 23.3, 22.2.

IR (cm⁻¹) 3272, 2955, 1691, 1665, 1630, 1542, 1419, 1366, 1143.

HRMS (ESI-TOF) m/z [M+H]⁺ Calcd for C₁₈H₂₆N₃O₂ 316.2025; Found 316.2023.

2-(6-chloro-9H-carbazol-2-yl)-N-(prop-2-yn-1-yl)propanamide (F1)



C₁₈H₁₅ClN₂O
MW: 310.78 g.mol⁻¹
Yield: 72%
White solid

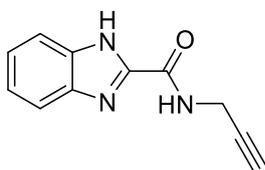
To a solution of *carprofen* (100 mg, 0.37 mmol, 1 equiv.) in DMF (5 mL) was added HATU (141 mg, 0.37 mmol, 1 equiv.), DIPEA (129 μ L, 0.74 mmol, 2 equiv.) and propargylamine (20.4 mg, 0.37 mmol, 1 equiv.). The mixture was stirred 16 hours at room temperature and evaporated. The product was purified by chromatographic column (SiO₂, DCM/MeOH 98/2) to give the desired product as a white solid. (82 mg, 0.26 mmol, 72%)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.99 (dd, J = 2.1, 0.5 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 0.5 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 0.5 Hz, 1H), 7.45 – 7.42 (m, 1H), 7.38 (dd, J = 8.6, 0.5 Hz, 1H), 7.30 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 7.15 (dd, J = 8.2, 1.4 Hz, 1H), 3.94 (qd, J = 17.5, 2.6 Hz, 2H), 3.79 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 2.53 (t, J = 2.6 Hz, 1H), 1.52 (d, J = 7.1 Hz, 3H), NH not observed.

¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 142.4, 141.6, 140.1, 126.3, 125.4, 125.2, 122.5, 121.3, 120.5, 120.0, 112.9, 110.6, 80.6, 72.1, 47.8, 29.6, 19.2.

LCMS (ESI) m/z [M-H]⁺ 311.4

N-(prop-2-yn-1-yl)-1H-benzo[d]imidazole-2-carboxamide (F3)



C₁₁H₉N₃O
MW: 199.21 g.mol⁻¹
Yield: 58%
beige solid

To a solution of 1*H*-benzo[*d*]imidazole-2-carboxylic acid (0.20 g, 1.23 mmol, 1 equiv.), HATU (0.467 g, 1.23 mmol, 1 equiv.), DIPEA (0.43 mL, 2.46 mmol, 2.0 equiv.) in DMF (4 mL) was added prop-2-yn-1-amine (0.08 mL, 1.23 mmol, 1 equiv.). The mixture was stirred 16 h at room temperature. DMF was evaporated then the crude mixture was purified by flash chromatographic column with Heptane/EtOAc 70/30 to 60/40 to give the desired product as a beige solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.31 (s, 1H), 9.36 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.30 (t, *J* = 9.6 Hz, 2H), 4.06 (dd, *J* = 6.0, 2.5 Hz, 2H), 3.12 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.6, 145.2, 142.5, 134.5, 124.2, 122.6, 120.0, 112.6, 80.9, 72.8, 28.3.

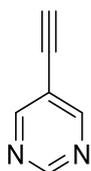
HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₁₁H₁₀N₃O 200.0824; Found 200.0824

LCMS (ESI) *m/z* [M-H]⁺ 200.6

IR (cm⁻¹): 3283, 2921, 2852, 2394, 2358, 1651, 1519, 1385.

Mp : 187-189 °C.

5-ethynylpyrimidine (F5)



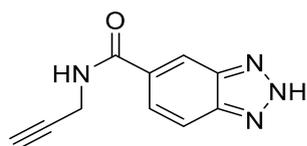
C₆H₄N₂
MW: 104,11 g.mol⁻¹
Yield: 24%
White solid

To a flask was added 5-bromopyrimidine (500 mg, 3.1 mmol, 1 equiv.), PPh₃ (21 mg, 0.078 mmol, 0.025 equiv.) and PdCl₂(PPh₃)₂ (110 mg, 0.15 mmol, 0.05 equiv.) under argon. Dry THF (6 mL) was added followed by triethylamine (476 mg, 656 μL, 4.71 mmol, 1.5 equiv.) and trimethylsilylacetylene (462 mg, 669 μL, 4.71 mmol, 1.5 equiv.). The mixture was stirred 15 minutes before adding Copper iodide (14.9 mg, 0.078 mmol, 0.025 equiv.) and stirred overnight. Volatils were removed and the crude was redissolved in hexane and filtered through Celite. Hexane was removed and crude mixture was redissolved in methanol (5 mL). K₂CO₃ (1.41 g, 10.2 mmol, 2 equiv.) was added and stirred 1h30. Methanol was removed carefully to give the desired product extremely volatil.

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 9.12 (s, 1H), 8.88 (s, 2H), 4.07 (s, 1H).

According to *Organic Materials* **2021**, 3, 295–302

N-(prop-2-yn-1-yl)-2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazole-5-carboxamide (F6)



$C_{10}H_8N_4O$
MW: 200,20 g.mol⁻¹
Yield: 60%
White solid

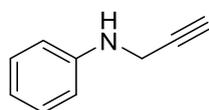
To a solution of benzotriazole-5-carboxylic acid (100 mg, 0.61 mmol, 1 equiv.), in DMF (2 mL) was added HATU (82 mg, 0.67 mmol, 1.1 equiv.), DIPEA (213 μ L, 1.23 mmol, 2 equiv.) followed by propargylamine (43 μ L, 0.67 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was stirred overnight at room temperature. After evaporation, the crude mixture was purified by chromatographic column using AcOEt (100%) to give a white solid as desired product.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 15.98 (s, 1H), 9.13 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.47 (s, 1H), 7.95 (s, 2H), 4.10 (dd, *J* = 5.5, 2.5 Hz, 2H), 3.15 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ 165.6, 81.3, 73.0, 28.7. Aromatics carbons are not visible by ¹³C NMR, assignation shown on HSQC spectra.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₁₀H₈N₄O⁺H 201.0776; Found 201.0774

***N*-(prop-2-yn-1-yl)aniline (P22a)**



C_9H_9N
MW: 131.18 g.mol⁻¹
Yield: 82%
Yellow oil

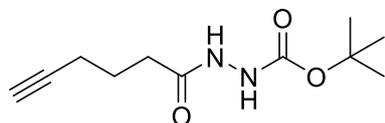
To a solution of aniline (1.27 mL, 13.71 mmol, 4 equiv.) in DMF (10 mL) was added K₂CO₃ (948 mg, 6.86 mmol, 2 equiv.) and the mixture was stirred for 5 min at room temperature. Then propargyl bromide (solution 80% in toluene, 0.381 mL, 3.43 mmol, 1 equiv.) was added and the solution was stirred overnight at room temperature. Then, the DMF was removed and DCM and H₂O were added to the mixture, the organic layer was extracted with DCM, dried over MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Hept/AcOEt, 7/3) to afford the desired product as a yellow oil (368 mg, 2.81 mmol, 82%). According to the literature.¹⁵⁶

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) δ 7.32 – 7.26 (m, 2H), 6.86 (tt, *J* = 7.4, 1.1 Hz, 1H), 6.79 – 6.74 (m, 2H), 4.00 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 2.34 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), NH not observed.

¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂) δ 147.4, 129.5 (2C), 118.8, 113.8 (2C), 81.6, 71.2, 33.8.

¹⁵⁶D. Zhu, Z. Wu, B. Luo, Y. Du, P. Liu, Y. Chen, Y. Hu, P. Huang, S. Wen ; *Org. Lett.* **2018**, *20*, 16, 4815–4818.

Tert-butyl 2-(hex-5-ynoyl)hydrazine-1-carboxylate (P25b)



$C_{11}H_{18}N_2O_3$
MW: 226.27 g.mol⁻¹
Yield: 98%
White solid

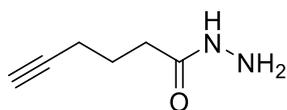
To a solution of hexanoic acid (300 mg, 2.67 mmol, 1 equiv.) in DCM (10 mL) was added DCC (551 mg, 2.67 mmol, 1 equiv.), DMAP (33 mg, 0.267 mmol, 0.1 equiv.) and tert-butyl carbazole (353 mg, 2.67 mmol, 1 equiv.) and the mixture was stirred 4 hours at room temperature. After evaporation, a purification with a reverse phase chromatographic column gave a white solid as the desired compound (595 mg, 2.63 mmol, 98%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 2.33 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.27 – 2.21 (m, 3H), 1.87 – 1.78 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), NH not observed.

¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 175.0, 157.8, 84.1, 81.8, 70.2, 33.5, 28.5 (3C), 25.6, 18.6.

LCMS (ESI-TOF) m/z [M+H]⁺ 225.2

Hex-5-ynehydrazide (P25a)



$C_6H_{10}N_2O$
MW: 126.15 g.mol⁻¹
Yield: quant
colorless oil

To compound **P25b** (100 mg 0.44 mmol, 1 equiv.) was added a solution of HCl in dioxane 4M (15 equiv.) and the mixture was stirred overnight. The mixture was then evaporated to give the desired product as a yellow oil (55 mg, 0.44 mmol, 99%)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 2.43 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.31 – 2.23 (m, 3H), 1.85 (p, $J = 7.1$ Hz, 2H). NH and NH₂ not observed

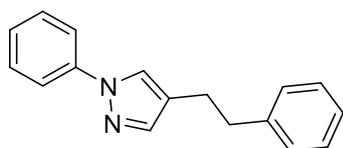
¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 173.9, 83.8, 70.5, 32.9, 25.0, 18.4

HRMS (ESI-TOF) m/z [M+H]⁺ Calcd for C₆H₁₁N₂O 127.0871; Found 127.0867.

Mp : 74-76 °C

Pyrazoles synthesis from sydnone

4-phenethyl-1-phenyl-1H-pyrazole (P1)



C₁₇H₁₆N₂
MW: 248.32 g.mol⁻¹
Yield: 99%
Beige oil

To a solution of phenyl sydnone A (30 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (2.96 mg, 0.0185 mmol, 0.1 equiv.), triethanolamine (27.5 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (2.30 mg, 0.0926 mmol, 0.05 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (7.4 mL, 0.025 M) was added 4-phenyl-1-butyne (24 mg, 26 μL, 0.185 mmol, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (73.3 mg, 0.370 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 14 h at 50 °C and then extracted with DCM (4 x 10 mL). Combined organic layers were washed with water and evaporated. The crude mixture was then purified by flash chromatographic column with Heptane/AcOEt (7/3) to give the desired product as a beige oil (45 mg, 0.183 mmol, 99%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.64 - 7.62 (m, 3H), 7.52 (s, 1H), 7.44 - 7.40 (m, 2H), 7.33 - 7.18 (m, 6H), 2.96 - 2.90 (m, 2H), 2.89 - 2.82 (m, 2H).

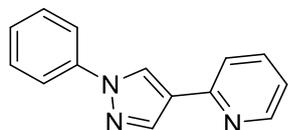
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 141.7, 141.1, 140.4, 129.5 (2C), 128.7 (2C), 128.6 (2C), 126.2, 126.2, 125.0, 123.2, 118.9 (2C), 37.3, 26.3.

HRMS (ESI-TOF) m/z [M+H]⁺ Calcd for C₁₇H₁₇N₂ 249.1392; Found 249.1391

LCMS (ESI) m/z [M+H]⁺ 249.

IR : 3082, 3026, 2924, 2851, 1596, 1567, 1494, 1408, 1391.

2-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)pyridine (P2)



$C_{14}H_{11}N_3$
MW: 221.26 g.mol⁻¹
Yield: 81%
Beige solid

To a solution of phenyl sydnone (30 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (2.96 mg, 0.0185 mmol, 0.1 equiv.), triethanolamine (27.5 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (2.30 mg, 0.0926 mmol, 0.05 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (7.4 mL, 0.025 M) was added ethynylpyridine (18.7 μL, 19 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (73.3 mg, 0.370 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at 50 °C and then evaporated under vacuum. The crude mixture was then purified by flash chromatographic column with Heptane/AcOEt (7/3) to give the desired product as a beige solid (33.2 mg, 0.15 mmol, 81%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.61 (ddd, *J* = 4.9, 1.8, 0.9 Hz, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.79 – 7.75 (m, 2H), 7.71 (td, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.56 (dt, *J* = 7.9, 1.0 Hz, 1H), 7.51 – 7.45 (m, 2H), 7.35 – 7.29 (m, 1H), 7.16 (ddd, *J* = 7.5, 4.9, 1.1 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 151.6, 149.7, 140.1, 139.3, 137.0, 129.7 (2C), 127.0, 125.5, 125.2, 121.7, 120.0, 119.3 (2C).

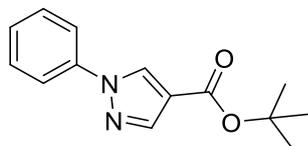
HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₁₄H₁₂N₃ 222.1031; Found 222.1036.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 222.4.

IR : 1647, 1591, 1554, 1499, 1410, 1262, 1149, 960, 951, 752.

Mp : 91-93 °C.

tert-butyl 1-phenyl-1H-pyrazole-4-carboxylate (P3)



$C_{14}H_{16}N_2O_2$
MW: 244.29 g.mol⁻¹
Yield: 77%
Beige solid

To a solution of phenyl sydnone (30 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (2.96 mg, 0.0185 mmol, 0.1 equiv.), triethanolamine (27.5 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (2.30 mg, 0.0926 mmol, 0.05 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (7.4 mL, 0.025 M) was added ethynylpropiolate (25.4 μL, 23.3 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (73.3 mg, 0.370 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at 50 °C and then evaporated under vacuum. The crude mixture was then purified by flash chromatographic column with Heptane/AcOEt (7/3) to give the desired product as a beige solid (34.8 mg, 0.142 mmol, 77%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.32 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.70 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.48 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.35 (q, *J* = 7.8 Hz, 1H), 1.58 (s, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 162.4, 142.4, 139.7, 130.0, 129.7 (2C), 127.6, 119.8 (2C), 118.7, 81.1, 28.5 (3C).

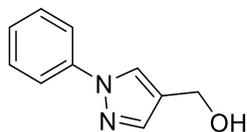
HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M-H]⁺ Calcd for C₁₄H₁₇N₂O₂ 243.1134; Found 243.1138.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 245.2.

IR : 3117, 2973, 2928, 1698, 1601, 1553, 1505, 1365, 1265, 1251, 1139.

Mp : 82-84 °C.

(1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methanol (P4)



$C_{10}H_{10}N_2O$
MW: 174.20 g.mol⁻¹
Yield: 96%
Beige solid

To a solution of phenyl sydnone (30 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (2.96 mg, 0.0185 mmol, 0.1 equiv.), triethanolamine (27.5 mg, 0.185 mmol, 1

equiv.), CuSO₄·5H₂O (2.30 mg, 0.0926 mmol, 0.05 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (7.4 mL, 0.025 M) was added propargylalcohol (10.8 μL, 10.4 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (73.3 mg, 0.370 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at 50 °C and then evaporated under vacuum. The crude mixture was then purified by flash chromatographic column with DCM/AcOEt (8/2) to give the desired product as a beige solid (30.8 mg, 0.177 mmol, 96%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.92 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.68 – 7.64 (m, 2H), 7.47 – 7.42 (m, 2H), 7.31 – 7.26 (m, 1H), 4.67 (s, 2H). OH not observable

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 140.5, 140.2, 129.6 (2C), 126.7, 125.9, 123.6, 119.3 (2C), 56.3.

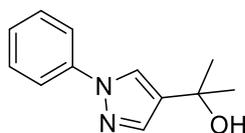
HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₁₀H₁₁N₂O 175.0871; Found 175.0873.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 175.3.

IR : 3026, 2930, 2857, 1602, 1513, 1443, 1314, 1242, 1169, 1044

Mp : 52-54 °C.

amine 2-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)propan-2-ol (P5)



C₁₂H₁₄N₂O
MW: 202.26 g·mol⁻¹
Yield: 94%
Brown solid

To a solution of phenyl sydnone (30 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (2.96 mg, 0.0185 mmol, 0.1 equiv.), triethanolamine (27.5 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (2.30 mg, 0.0926 mmol, 0.05 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (7.4 mL, 0.025 M) was added 2-methyl-3-butyn-2-ol (15.6 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (73.3 mg, 0.370 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 72 h at 50 °C and then evaporated under *vacuum*. The crude mixture was then purified by flash chromatographic column with Heptane/AcOEt (8/2 to 6/4) to give the desired product as a yellow oil (35.3 mg, 0.174 mmol, 94%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.88 (q, *J* = 1.1 Hz, 1H), 7.71 – 7.64 (m, 3H), 7.47 – 7.41 (m, 2H), 7.31 – 7.26 (m, 1H), 1.63 (t, *J* = 1.1 Hz, 6H), OH not observed.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 140.3, 138.4, 133.2, 129.6 (2C), 126.5, 123.5, 119.2 (2C), 68.4, 31.9 (2C).

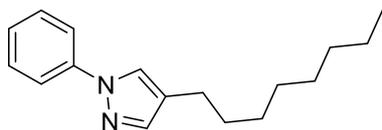
HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₁₂H₁₅N₂O 203.1184; Found 203.1183.

LCMS (ESI) m/z [M+H]⁺ 203.6.

IR : 3354, 3112, 2971, 2926, 1597, 1551, 1500, 1392, 1243, 1145, 950.

Mp : 70-72 °C.

4-octyl-1-phenyl-1H-pyrazole (P6)



$C_{17}H_{24}N_2$
MW: 256.39 g.mol⁻¹
Yield: 60%
Sticky oil

To a solution of phenyl sydnone (30 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (2.96 mg, 0.0185 mmol, 0.1 equiv.), triethanolamine (27.5 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (2.30 mg, 0.0926 mmol, 0.05 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (7.4 mL, 0.025 M) was added 1-decyne (26 mg, 33.4 μL, 0.185 mmol, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (73.3 mg, 0.370 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at 50 °C and then evaporated under *vacuum*. The crude mixture was then purified by flash chromatographic column with Heptane/AcOEt (7/3) to give the desired product as a yellow oil (28.4 mg, 0.11 mmol, 60%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.70 (d, J = 0.7 Hz, 1H), 7.68 – 7.64 (m, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.45 – 7.40 (m, 2H), 7.27 – 7.22 (m, 1H), 2.52 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 1.66 – 1.57 (m, 2H), 1.41 – 1.22 (m, 10H), 0.89 (t, J = 6.9 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 141.1, 140.5, 129.5, 126.1 (2C), 124.8, 124.3, 118.9 (2C), 32.0, 31.0, 29.6, 29.4, 29.4, 24.4, 22.8, 14.2.

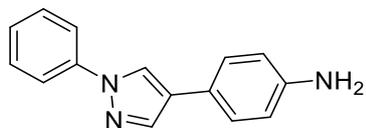
HRMS (ESI-TOF) m/z [M+H]⁺ Calcd for C₁₇H₂₅N₂ 257.2018; Found 257.2018.

LCMS (ESI) m/z [M+H]⁺ 257.5.

IR : 2954, 2924, 2853, 1600, 1571, 1503, 1463, 1395, 952, 753.

Mp : 41-43 °C.

4-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)aniline (P7)



$C_{15}H_{13}N_3$
MW: 235.29 g.mol⁻¹
Yield: 73%
Yellow solid

To a solution of phenyl sydnone (30 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (2.96 mg, 0.0185 mmol, 0.1 equiv.), triethanolamine (27.5 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (2.30 mg, 9,26 μmol, 0.05 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (7.4 mL, 0.025 M) was added ethynylaniline (21.6 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (73.3 mg, 0.370 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16h at 50 °C and then evaporated under vacuum. The crude mixture was then purified by flash chromatographic column with Heptane/AcOEt (7/3) to give the desired product as a yellow solid (31.7 mg, 0.135 mmol, 73 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.72 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 0.5 Hz, 1H), 7.89 – 7.83 (m, 2H), 7.53 – 7.46 (m, 2H), 7.40 – 7.34 (m, 2H), 7.33 – 7.25 (m, 1H), 6.63 – 6.57 (m, 2H), 5.10 (s, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 147.6, 139.7, 137.9, 129.5 (2C), 126.2 (2C), 125.8, 125.0, 122.5, 119.3, 117.9 (2C), 114.1 (2C).

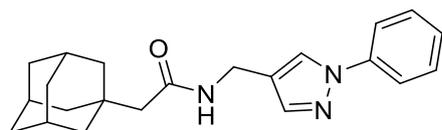
HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₁₅H₁₄N₃ 236.1188; Found 236.1191.

LC-MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 236.4.

IR : 3386, 3324, 2979, 1730, 1575, 1492, 1404, 1281.

Mp : 149-151 °C

2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)-N-((1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl)acetamide (P8)



$C_{22}H_{27}N_3O$
MW: 349.48 g.mol⁻¹
Yield: 88%
Beige solid

To a solution of phenyl sydnone (30 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (2.96 mg, 0.0185 mmol, 0.1 equiv.), triethanolamine (27.5 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (2.30 mg, 0.0926 mmol, 0.05 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (7.4 mL, 0.025 M) was added compound **8a** (47 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (73.3 mg, 0.370 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at 50 °C and then evaporated under *vacuum*. The crude mixture was then purified by flash chromatographic column with Heptane/AcOEt (6/4) to give the desired product as a beige solid (56.7 mg, 0.162 mmol, 88%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.90 (s, 1H), 7.68 – 7.62 (m, 3H), 7.44 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.28 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.62 (s, 1H), 4.37 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 1.96 (d, *J* = 9.1 Hz, 5H), 1.70 (d, *J* = 12.1 Hz, 3H), 1.63 (s, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 171.0, 140.7, 140.2, 129.6 (2C), 126.7, 126.2, 121.0, 119.2 (2C), 51.9, 42.9 (3C), 36.9 (3C), 34.0, 33.1, 28.8 (3C).

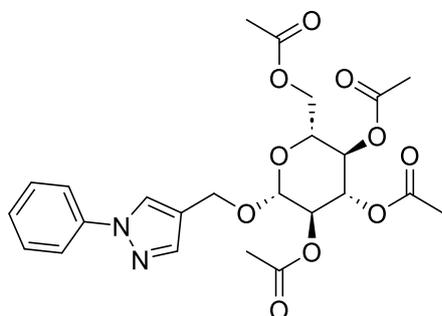
HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₂₂H₂₈N₃O 350.2232; Found 350.2231.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 350.5

IR : 3291, 2907, 2873, 2846, 1635, 1601, 1542, 1504, 1401, 1330.

Mp : 114-116 °C.

(2R,3R,4S,5R,6R)-2-(acetoxymethyl)-6-((1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methoxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate (P9)



C₂₄H₂₈N₂O₁₀
MW: 504.49 g·mol⁻¹
Yield: 96%
White solid

To a solution of phenyl sydnone (10 mg, 0.062 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (0.99 mg, 0.0062 mmol, 0.1 equiv.), triethanolamine (9.2 mg, 0.062 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (0.77 mg, 0.0031 mmol, 0.05 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (2.5 mL, 0.025 M) was added 2-Propynyl-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranoside (23.6 mg, 0.062 mmol, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (24.4 mg, 0.123 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at 50 °C and then evaporated under vacuum. The crude mixture was then purified by flash chromatographic column with Heptane/AcOEt (7/3) to give the desired product as a white solid (29.9 mg, 0.059 mmol, 96%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.90 (s, 1H), 7.67 (tt, *J* = 3.2, 1.7 Hz, 3H), 7.49 – 7.43 (m, 2H), 7.34 – 7.27

(m, 1H), 5.20 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H), 5.15 – 5.01 (m, 2H), 4.85 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 4.63 (dd, $J = 11.9, 10.1$ Hz, 2H), 4.28 (dd, $J = 12.3, 4.8$ Hz, 1H), 4.19 (dd, $J = 12.3, 2.5$ Hz, 1H), 3.72 (ddd, $J = 9.9, 4.8, 2.5$ Hz, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.00 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 170.8, 170.4, 169.6, 169.5, 141.1, 140.1, 129.7 (2C), 126.9, 126.7, 119.3 (2C), 119.1, 99.3, 73.0, 72.1, 71.4, 68.6, 62.2, 62.1, 20.9, 20.8, 20.8 (2C).

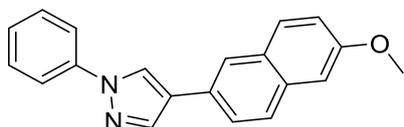
HRMS (ESI-TOF) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_{10}$ 505.1822; Found 505.1819.

LCMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 505.3.

IR : 1749, 1732, 1254, 1222, 1159, 1035, 999, 951, 757, 689.

Mp : 139-141 °C.

4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)-1-phenyl-1H-pyrazole (P10)



$\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$
MW: 300.36 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Yield: 72%
Beige solid

To a solution of phenyl sydnone (30 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (2.96 mg, 0.0185 mmol, 0.1 equiv.), triethanolamine (27.5 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2.30 mg, 0.0926 mmol, 0.05 equiv.) in H_2O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (7.4 mL, 0.025 M) was added 2-ethynyl-6-methoxynaphthalene (33.7 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (73.3 mg, 0.370 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 24 h at 50 °C and then evaporated under vacuum. The crude mixture was then purified by flash chromatographic column with Heptane/AcOEt (7/3) to give the desired product as a beige solid (40.0 mg, 0.133 mmol, 72%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.25 (d, $J = 0.5$ Hz, 1H), 8.10 (d, $mJ = 0.4$ Hz, 1H), 7.94 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 7.77 (m, 4H), 7.66 (dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, 1H), 7.53 – 7.47 (m, 2H), 7.37 – 7.29 (m, 1H), 7.20 – 7.13 (m, 2H), 3.94 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 157.8, 140.3, 139.1, 133.7, 129.7 (3C), 129.4, 127.6, 127.4, 126.7, 125.2, 125.1, 123.9, 123.4, 119.4, 119.2 (2C), 106.0, 55.5.

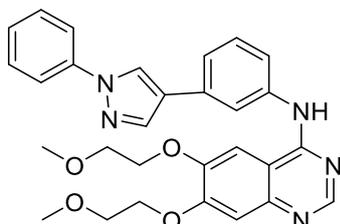
HRMS (ESI-TOF) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}$ 301.1341; Found 301.1342.

LCMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 301.3

IR: 3051, 3001, 2921, 2849, 1597, 1494, 1481, 1360, 1030, 950.

Mp : 185-187 °C

6,7-bis(2-methoxyethoxy)-N-(3-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)phenyl)quinazolin-4-amine (P11)



C₂₉H₂₉N₅O₄
MW: 511.58 g.mol⁻¹
Yield: 78%
Yellow solidifying solid

To a solution of phenyl sydnone (30 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (2.96 mg, 0.0185 mmol, 0.1 equiv.), triethanolamine (27.5 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (2.30 mg, 0.0926 mmol, 0.05 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (7.4 mL, 0.025 M) was added ertonilic (80 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (73.3 mg, 0.370 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at 50 °C and then evaporated under vacuum. The crude mixture was then purified by flash chromatographic column with DCM/MeOH (98/02) to give the desired product as a yellow solid (73 mg, 0.142 mmol, 78%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.69 – 8.67 (m, 1H), 8.18 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 0.5 Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.75 – 7.70 (m, 2H), 7.64 – 7.60 (m, 1H), 7.49 – 7.39 (m, 4H), 7.36 – 7.27 (m, 3H), 4.26 (dd, *J* = 9.6, 4.9 Hz, 4H), 3.82 (dd, *J* = 9.4, 5.6 Hz, 4H), 3.46 (s, 3H), 3.45 (s, 3H). NH not observable

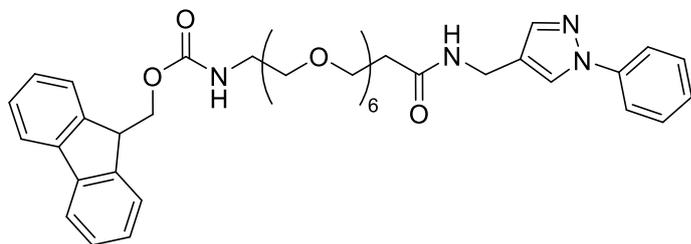
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 156.6, 154.8, 153.9, 153.7, 149.1, 140.2, 139.4, 139.0, 138.9, 133.2, 129.8, 129.6 (2C), 126.8, 124.8, 123.8, 121.7, 120.4, 119.3 (2C), 119.1, 109.1, 102.8, 71.2, 70.6, 69.5, 68.5, 59.5, 59.4.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₂₉H₃₀N₅O₄ 512.2298; Found 512.2301.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 513.0

IR : 3299, 2907, 2874, 1620, 1599, 1531, 1503, 1435, 1330.

(9H-fluoren-9-yl)methyl (3-oxo-1-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)-6,9,12,15,18,21-hexaoxa-2-azatricosan-23-yl)carbamate (P12)



$C_{40}H_{50}N_4O_9$
MW: 730.86 g.mol⁻¹
Yield: 69%
Yellow oil

To a solution of phenyl sydnone (20 mg, 0.123 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (1.97 mg, 0.0123 mmol, 0.1 equiv.), triethanolamine (18.4 mg, 0.123 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (1.53 mg, 0.0617 mmol, 0.05 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (5 mL, 0.025 M) was added **12a** (83 mg, 0.123 mmol, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (48.8 mg, 0.246 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at 50 °C and then evaporated under *vacuum*. The crude mixture was then purified by flash chromatographic column with DCM/MeOH (98/2) to give the desired product as a yellow oil (62.5 mg, 0.085 mmol, 69%).

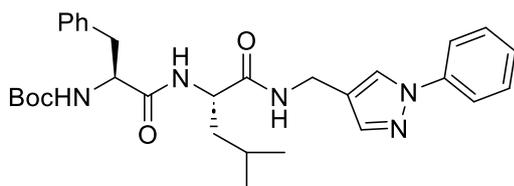
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.92 (s, 1H), 7.75 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.67 – 7.62 (m, 3H), 7.59 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.40 (dt, *J* = 11.9, 7.5 Hz, 4H), 7.33 – 7.22 (m, 3H), 7.01 (s, 1H), 5.59 (s, 1H), 4.37 (m, 4H), 4.20 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 3.72 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.61 – 3.51 (m, 22H), 3.40 – 3.35 (m, 2H), 2.48 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 190.8, 171.8, 144.2, 141.5, 140.7, 140.2, 129.6 (3C), 127.8, 127.8 (2C), 127.2 (2C), 126.5, 126.1, 125.2, 121.3, 120.1 (2C), 119.1 (3C), 70.7 (2C), 70.7 (2C), 70.7 (2C), 70.6, 70.5, 70.4, 70.3, 70.3, 70.2, 67.4, 53.6, 47.4, 37.1, 33.9.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₄₀H₅₁N₄O₉ 731.3658; Found 731.3656.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 732.4

Tert-butyl (1-((4-methyl-1-oxo-1-(((1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl)amino)pentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamate (P13)



$C_{30}H_{39}N_5O_4$
MW: 533.67 g.mol⁻¹
Yield: 99%
colorless oil

To a solution of phenyl sydnone (15 mg, 0.0926 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (1.48 mg, 0.0092 mmol, 0.1 equiv.), triethanolamine (13.8 mg, 0.0926 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (1.15 mg, 0.0046 mmol, 0.05 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (3.7 mL, 0.025 M) was added *tert*-butyl (1-((4-methyl-1-oxo-1-(prop-2-yn-1-ylamino)pentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamate **13b** (38.4 mg, 0.0926 mmol, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (36.7 mg, 0.185 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at 50 °C and then evaporated under *vacuum*. The crude mixture was then purified by flash chromatographic column with Heptane/AcOEt (2/8) to give the desired product as a colorless oil (48 mg, 0.091 mmol, 99%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.89 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 7.69 – 7.63 (m, 2H), 7.61 (s, 1H), 7.46– 7.41 (m, 2H), 7.29 - 7.27 (m, 3H), 7.25 - 7.24 (m, 1H), 7.20 – 7.15 (m, 2H), 6.62 (s, 1H), 6.16 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.88 (s, 1H), 4.46 – 4.39 (m, 1H), 4.33 - 4.29 (m, 2H), 3.07 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.80 - 1.72 (m, 1H), 1.56 - 1.44 (m, 2H), 1.36 (s, 9H), 0.91 (s, 3H), 0.89 (s, 3H).

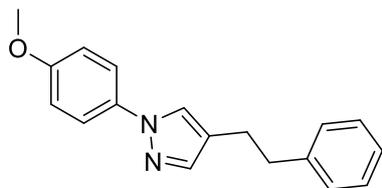
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 171.6 (2C), 156.0, 140.6, 140.2, 136.3, 129.5 (2C), 129.3 (2C), 128.9 (2C), 127.3, 126.5, 126.1, 120.6, 119.1 (2C), 80.9, 56.3, 52.0, 40.6, 37.7, 34.1, 28.3 (3C), 24.8, 23.1, 21.8.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₃₀H₄₀N₅O₄ 534.3080; Found 534.3083.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 534.8

IR : 3281, 2957, 1642, 1504, 1392, 1366, 1249, 1166, 953.

1-(4-methoxyphenyl)-4-phenethyl-1H-pyrazole (P14)



C₁₈H₁₈N₂O
MW: 278.35 g·mol⁻¹
Yield: 78%
 Solidifying oil

To a solution of 4-methoxyphenyl sydnone (35.5 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (2.96 mg, 0.0185 mmol, 0.1 equiv.), triethanolamine (27.5 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (2.30 mg, 0.0926 mmol, 0.05 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (7.4 mL, 0.025 M) was added 4-4-phenyl-1-butyne (24 mg, 0.185 mmol, 26 μL, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (73.3 mg, 0.370 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at 50 °C and then evaporated under *vacuum*. The crude mixture was then purified by flash chromatographic column with Heptane/AcOEt (7/3) to give the desired product as a solidifying oil (40 mg, 0.143 mmol, 78%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.56 – 7.51 (m, 3H), 7.50 (s, 1H), 7.34 – 7.28 (m, 2H), 7.24 - 7.19 (m, 3H), 6.97 – 6.93 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 2.96 – 2.90 (m, 2H), 2.89 – 2.83 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 158.1, 141.7, 140.5, 134.3, 128.6 (2C), 128.5 (2C), 126.2, 125.1, 122.7, 120.6 (2C), 114.6 (2C), 55.7, 37.3, 26.3.

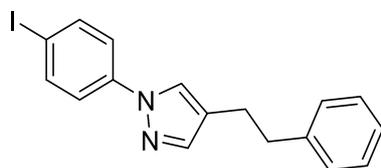
HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₁₈H₁₉N₂O 279,1497; Found 279,1499.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 279.8.

IR : 3084, 3029, 2921, 1514, 1396, 1240, 1310.

Mp : 50-52 °C.

1-(4-iodophenyl)-4-phenethyl-1H-pyrazole (P15)



C₁₇H₁₅I N₂
MW: 374.23 g.mol⁻¹
Yield: 91%
Beige solid

To a solution of 4-iodophenyl sydnone (53 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydroimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (2.96 mg, 0.0185 mmol, 0.1 equiv.), triethanolamine (27.5 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (2.30 mg, 0.0926 mmol, 0.05 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (7.4 mL, 0.025 M) was added 4-4-phenyl-1-butyne (24 mg, 0.185 mmol, 26 μL, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (73.3 mg, 0.370 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at 50 °C and then evaporated under *vacuum*. The crude mixture was then purified by flash chromatographic column with Heptane/AcOEt (7/3) to give the desired product as a beige solid (63 mg, 0.168 mmol, 91%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.75 – 7.71 (m, 2H), 7.58 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.42 – 7.37 (m, 2H), 7.33 – 7.18 (m, 5H), 2.96 – 2.87 (m, 2H), 2.89 – 2.82 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 141.5, 141.5, 140.1, 138.5 (2C), 128.7 (2C), 128.6 (2C), 126.3, 124.8, 123.6, 120.5 (2C), 90.1, 37.2, 26.2.

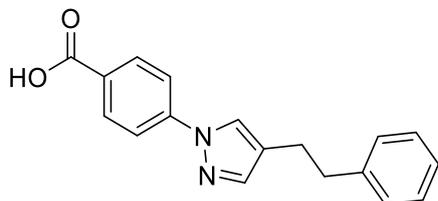
HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₁₇H₁₆I N₂ 375,0358; Found 375,0358.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 375.6.

IR : 2939, 1584, 1490, 1393, 1217.

Mp : 88-90 °C.

4-(4-phenethyl-1H-pyrazol-1-yl)benzoic acid (P16)



$C_{18}H_{16}N_2O_2$
MW: 292.33 g.mol⁻¹
Yield: 67%
White solid

To a solution of 4-benzoic acid sydnone (38 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (2.96 mg, 0.0185 mmol, 0.1 equiv.), triethanolamine (27.5 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (2.30 mg, 0.0926 mmol, 0.05 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (7.4 mL, 0.025 M) was added 4-4-phenyl-1-butyne (24 mg, 0.185 mmol, 26 μL, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (73.3 mg, 0.370 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at 50 °C and then evaporated. The crude mixture was then purified by reverse phase chromatographic column using Water/ACN 100/0 to 0/100% over 1 hour to give the desired product as a white solid (36 mg, 0.123 mmol, 67%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.14 – 8.08 (m, 2H), 8.06 (s, 1H), 7.83 – 7.75 (m, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.32 – 7.13 (m, 5H), 2.98 – 2.91 (m, 2H), 2.91 – 2.84 (m, 2H), COOH not observed. TPGS-750-M surfactant surfactant visible at 2.66 ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMF-D₇) δ 167.1, 143.6, 142.2, 131.4 (2C), 128.8 (2C), 128.7 (2C), 128.4, 126.3 (2C), 124.5 (2C), 117.8 (2C), 36.7, 26.2.

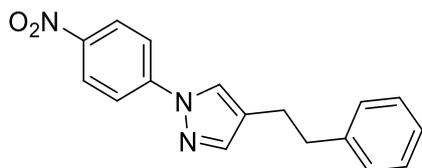
HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₁₈H₁₇N₂O₂ 293.1290; Found 293.1289.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 293.8.

IR : 2919, 1673, 1605, 1391, 1297, 1178.

Mp : 184-186 °C.

1-(4-nitrophenyl)-4-phenethyl-1H-pyrazole (P17)



$C_{17}H_{15}N_3O_2$
MW: 293.32 g.mol⁻¹
Yield: 74%
Yellow solid

To a solution of nitrophenyl sydnone (38 mg, 0.184 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (2.94 mg, 0.0184 mmol, 0.1 equiv.), triethanolamine (27.4 mg, 0.184 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (2.3 mg, 0.009 mmol, 0.05 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (7.4 mL, 0.025 M) was added 4-4-phenyl-1-butyne (24 mg, 0.185 mmol, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (73 mg, 0.37 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at 50 °C and then evaporated. The crude mixture was then purified by chromatographic column (SiO₂, Cyclohexane/AcOEt 8:2) to give the desired product as a yellow solid (37 mg, 0.126 mmol, 74%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.37 – 8.24 (m, 2H), 7.84 – 7.73 (m, 2H), 7.69 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.35 – 7.28 (m, 2H), 7.27 – 7.15 (m, 3H), 3.00 – 2.91 (m, 2H), 2.91 – 2.80 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 145.2, 144.6, 143.1, 141.2, 128.6 (2C), 128.6 (2C), 126.4, 125.5 (2C), 125.1, 124.9, 118.2 (2C), 36.9, 26.1.

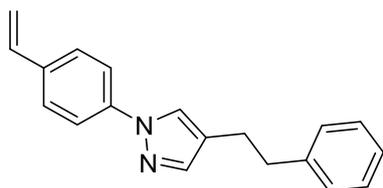
HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₁₇H₁₆N₃O₂ 294.1242; Found 294.1244.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 294.4.

IR : 2923, 2851, 1727, 1596, 1512, 1502, 1451, 1393, 1337.

Mp : 136-139 °C

4-phenethyl-1-(4-vinylphenyl)-1H-pyrazole (P18)



C₁₉H₁₈N₂
MW: 274.36 g.mol⁻¹
Yield: 59%
Yellow solid

To a solution of vinylphenyl sydnone (20 mg, 0.11 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (1.7 mg, 0.011 mmol, 0.1 equiv.), triethanolamine (15.8 mg, 0.11 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (1.3 mg, 0.005 mmol, 0.05 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (4.2 mL, 0.025 M) was added 4-4-phenyl-1-butyne (13.8 mg, 0.11 mmol, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (42 mg, 0.21 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at 50 °C and then evaporated. The crude mixture was then purified by chromatographic column (SiO₂, Cyclohexane/AcOEt 8:2) to give the desired product as a yellow solid (17 mg, 0.062 mmol, 59%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.63 – 7.56 (m, 3H), 7.52 (s, 1H), 7.50 – 7.43 (m, 2H), 7.34 – 7.27 (m, 2H), 7.25 – 7.18 (m, 3H), 6.72 (dd, *J* = 17.6, 10.9 Hz, 1H), 5.75 (dd, *J* = 17.6, 0.7 Hz, 1H), 5.26 (dd, *J* = 10.9, 0.7 Hz, 1H), 2.96 – 2.90 (m, 2H), 2.90 – 2.82 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 141.6, 141.1, 139.7, 136.0, 135.6, 128.7 (2C), 128.5 (2C), 127.3 (2C), 126.2,

124.9, 123.2, 118.8 (2C), 114.0, 37.2, 26.3.

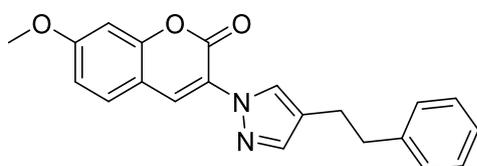
HRMS (ESI-TOF) m/z [M+H]⁺ Calcd for C₁₉H₁₉N₂ 275.1548; Found 275.1552.

LCMS (ESI) m/z [M+H]⁺ 275.6

IR : 3086, 3024, 2918, 2855, 1604, 1515, 1394.

Mp : 67-69 °C

7-methoxy-3-(4-phenethyl-1H-pyrazol-1-yl)-2H-chromen-2-one (P19)



C₂₁H₁₈N₂O₃
MW: 346.38 g.mol⁻¹
Yield: 45%
Yellow solid

To a solution of methoxycoumarinone (11 mg, 0.042 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (0.68 mg, 0.0042 mmol, 0.1 equiv.), triethanolamine (6.3 mg, 0.042 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (0.53 mg, 0.002 mmol, 0.05 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (1.8 mL, 0.025 M) was added 4-4-phenyl-1-butyne (6 mg, 0.042 mmol, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (16.7 mg, 0.084 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at 50 °C and then evaporated. The crude mixture was then purified by chromatographic column (SiO₂, Cyclohexane/AcOEt 8:2) to give the desired product as a yellow solid (6.5 mg, 0.0187 mmol, 45%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.39 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.47 (m, 2H), 7.30 (m, 2H), 7.22 (m, 3H), 6.94 – 6.86 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 2.97 – 2.89 (m, 2H), 2.88 - 2.85 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 162.6, 157.0, 153.7, 141.6, 141.5, 130.0, 129.2, 129.1, 128.6 (2C), 128.6 (2C), 126.2, 123.6, 122.9, 113.7, 112.6, 100.6, 56.0, 37.2, 26.3.

HRMS (ESI-TOF) m/z [M+H]⁺ Calcd for C₂₁H₁₉N₂O₃ 347.1396; Found 347.1396

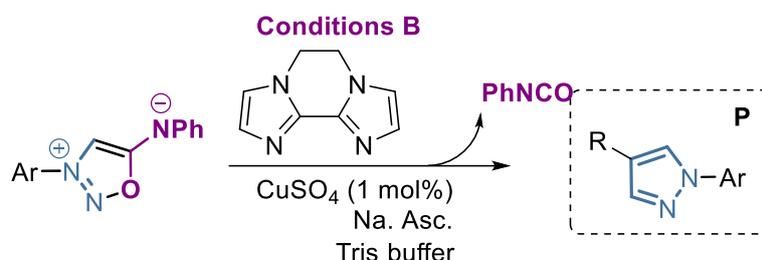
LCMS (ESI) m/z [M+H]⁺ 347.5.

IR : 3066, 2920, 2850, 1726, 1710, 1613, 1449.

Mp : 120-122 °C

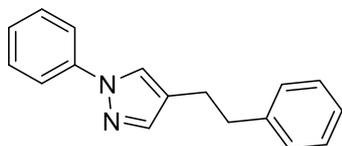
Pyrazoles synthesis from iminosydnone

General procedure GP1



To a solution of IminoSydnone F (60 mg, 0.171 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (0.54 mg, 3.42 μ mol, 0.02 equiv.), triethanolamine (25.5 mg, 0.171 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (0.42 mg, 1.71 μ mol, 0.01 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (6.8 mL, 0.025 M) was added alkyne (0.171 mmol, 1 equiv.), tris buffer (207 mg, 1.71 mmol, 10 equiv.) followed by sodium ascorbate (68 mg, 0.342 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at 37 °C and then evaporated. The crude mixture was then purified by chromatographic column to give the desired product.

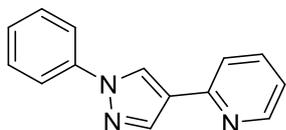
4-phenethyl-1-phenyl-1H-pyrazole (P1)



C₁₇H₁₆N₂
MW: 248.32 g·mol⁻¹
Yield: 79%
Beige oil

General procedure GP1. Chromatographic column SiO₂, Heptane/AcOEt 8:2 (33 mg, 0.133 mmol, 79%)

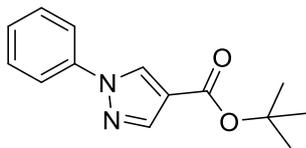
2-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)pyridine (P2)



$C_{14}H_{11}N_3$
MW: 221.26 g.mol⁻¹
Yield: 79%
Beige solid

General procedure GP1. Chromatographic column SiO₂, Heptane/AcOEt 85:15 (30 mg, 0.135 mmol, 79%)

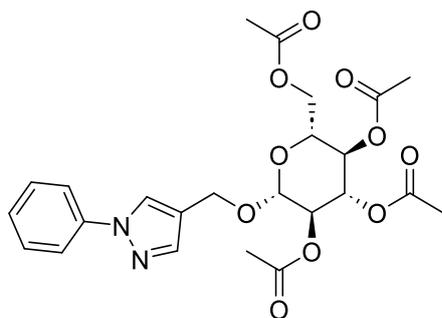
tert-butyl 1-phenyl-1H-pyrazole-4-carboxylate (P3)



$C_{14}H_{16}N_2O_2$
MW: 244.29 g.mol⁻¹
Yield: 55%
Beige solid

General procedure GP1. Chromatographic column SiO₂, Heptane/AcOEt 9:1 (23 mg, 0.094 mmol, 55%)

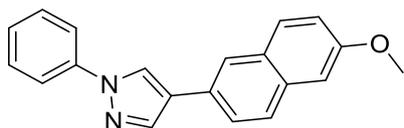
(2R,3R,4S,5R,6R)-2-(acetoxymethyl)-6-((1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methoxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate (P9)



$C_{24}H_{28}N_2O_{10}$
MW: 504.49 g.mol⁻¹
Yield: 58%
White solid

General procedure GP1. Chromatographic column SiO₂, AcOEt/Hept 7:3 (48.7 mg, 0.097 mmol, 58%)

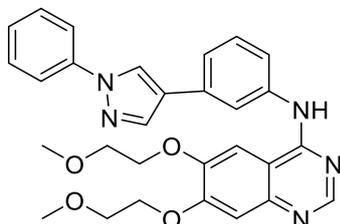
4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)-1-phenyl-1H-pyrazole (P10)



C₂₀H₁₆N₂O
MW: 300.36 g.mol⁻¹
Yield: 76%
Beige solid

General procedure GP1. Chromatographic column SiO₂, AcOEt/Hept 7:3 (38.7 mg, 0.129 mmol, 76%)

6,7-bis(2-methoxyethoxy)-N-(3-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)phenyl)quinazolin-4-amine (P11)

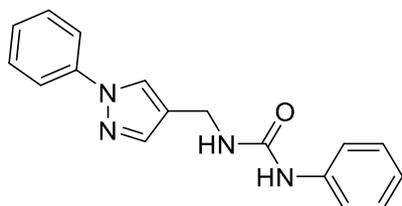


C₂₉H₂₉N₅O₄
MW: 511.58 g.mol⁻¹
Yield: 64%
Yellow solidifying solid

General procedure GP1. Chromatographic column SiO₂, AcOEt 100% (56 mg, 0.110 mmol, 64%)

Cascade synthesis from iminosydnone

1-phenyl-3-((1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl)urea (P20)



C₁₇H₁₆N₄O
MW: 292.34
Yield: 76%
Brown solid

To a solution of Iminosydnone F (60 mg, 0.171 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (0.54 mg, 0.0343 mmol, 0.02 equiv.), triethanolamine (24.8 mg, 0.171 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (0.41 mg, 0.0171 mmol, 0.01 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (6.7 mL, 0.025 M) was added propargylamine (9.4 mg, 10.9 μL, 0.171 mmol, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (68 mg, 0.34 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at room temperature and then evaporated. The crude mixture was then purified by puriflash using ACN/H₂O 0% to 100% over 1 hour to give the desired product as a brown solid. (38 mg, 0.130 mmol, 76%)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.17 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 7.73 – 7.66 (m, 3H), 7.51 – 7.44 (m, 2H), 7.38 – 7.34 (m, 2H), 7.34 – 7.29 (m, 1H), 7.28 – 7.22 (m, 2H), 7.01 – 6.94 (m, 1H), 4.34 (s, 2H), NH not observed.

¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 158.2, 141.6, 141.4, 140.9, 130.6 (2C), 129.8 (2C), 127.8, 127.8, 123.5 (2C), 120.3 (2C), 120.2 (2C), 35.0.

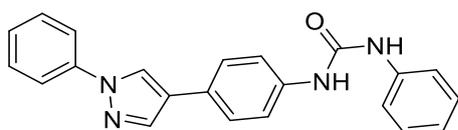
HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₁₇H₁₇N₄O 293.1402; Found 293.1402.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 293.7.

IR : 3385, 3315, 1729, 1632, 1494, 1562.

mp : 148-150 °C

1-phenyl-3-(4-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)phenyl)urea (P21)



C₂₂H₁₈N₄O
MW: 354.41 g·mol⁻¹
Yield: 75%
Yellow oil

To a solution of Iminosydnone F (60 mg, 0.171 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (0.54 mg, 0.0343 mmol, 0.02 equiv.), triethanolamine (24.8 mg, 0.171 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (0.41 mg, 0.0171 mmol, 0.01 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (6.7 mL, 0.025 M) was added ethynylaniline (20 mg, 0.171 mmol, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (68 mg, 0.34 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at room temperature and then evaporated. The crude mixture was then purified by puriflash using ACN/H₂O 0% to 100% over 1 hour to give the desired product as a yellow oil. (45.5 mg, 0.128 mmol, 75%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.98 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.22 (d, *J* = 0.5 Hz, 1H), 8.00 – 7.94 (m, 2H), 7.76 – 7.69 (m, 2H), 7.67 – 7.52 (m, 6H), 7.40 – 7.26 (m, 3H), 7.03 – 6.96 (m, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 153.3, 140.7, 140.5, 139.4, 138.7, 129.8 (2C), 129.0 (2C), 126.4, 126.3, 126.2 (2C), 125.0, 124.0, 122.1, 119.1 (2C), 118.7 (2C), 118.6 (2C).

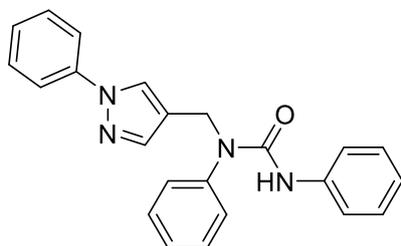
HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₂₂H₁₉N₄O 355.1559; Found 355.1562.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 355.7.

IR : 2924, 1618, 1577, 1499, 1438, 1418, 1389, 1216.

Mp : 234-236 °C.

propanoate 1,3-diphenyl-1-((1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl)urea (P22)



C₂₃H₂₀N₄O
MW: 368.44 g·mol⁻¹
Yield: 43%
 Yellow oil

To a solution of Iminosydnone F (30 mg, 0.086 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (0.27 mg, 0.017 mmol, 0.02 equiv.), triethanolamine (12.7 mg, 0.086 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (0.21 mg, 0.0086 mmol, 0.01 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (3.4 mL, 0.025 M) was added *N*-(prop-2-yn-1-yl)aniline (11.2 mg, 0.086 mmol, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (33.9 mg, 0.171 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at 37 °C and then evaporated. The crude mixture was then purified by puriflash using ACN/H₂O 0% to 100% over 1 hour to give the desired product as a yellow oil. (27 mg, 0.073 mmol, 43%)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.06 (s, 1H), 7.69 – 7.63 (m, 2H), 7.58 (s, 1H), 7.50 – 7.42 (m, 4H), 7.41 – 7.35 (m, 1H), 7.33 – 7.27 (m, 5H), 7.24 - 7.26 (m, 2H), 7.05 – 6.97 (m, 1H), 4.86 (s, 2H), NH not observed.

¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 157.3, 142.7, 142.3, 141.3, 140.3, 131.2 (2C), 130.6 (2C), 129.6 (2C), 129.6 (2C), 129.1, 128.6, 127.8, 124.4, 122.1 (2C), 121.7, 120.2 (2C), 45.0.

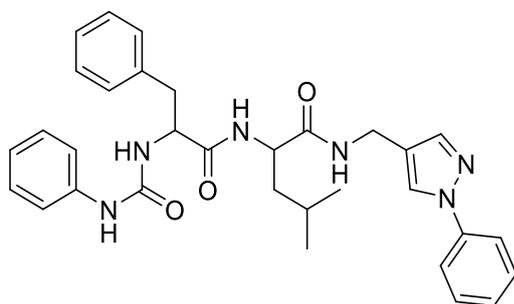
HRMS (ESI-TOF) m/z [M+H]⁺ Calcd for C₂₃H₂₁N₄O 369.1715; Found 369.1712.

LCMS (ESI) m/z [M+H]⁺ 369.4.

IR : 2919, 1667, 1601, 1515, 1494, 1392.

Mp : 144-146 °C.

4-methyl-N-((1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl)-2-(3-phenyl-2-(3-phenylureido)propanamido)pentanamide (P23)



C₃₂H₃₆N₆O₃

MW: 552.68 g.mol⁻¹

Yield: 47%

Beige solid

To a solution of Iminosydnone F (36.7 mg, 0.105 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (0.34 mg, 0.021 mmol, 0.02 equiv.), triethanolamine (15.6 mg, 0.105 mmol, 1 equiv.), CuSO₄·5H₂O (0.26 mg, 0.00105 mmol, 0.01 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (4.2 mL, 0.025 M) was added compound **23a** (33 mg, 0.105 mmol, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (41 mg, 0.209 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at room temperature and then evaporated. The crude mixture was then purified by reverse phase chromatographic column Puriflash using ACN/H₂O 0% to 100% over 1 hour to give the desired product as a beige solid. (44.5 mg, 0.081 mmol, 47%)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.28 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.67 – 7.61 (m, 3H), 7.45 (dd, *J* = 8.4, 7.6 Hz, 2H), 7.33 – 7.16 (m, 10H), 6.97 – 6.90 (m, 1H), 4.52 (dd, *J* = 8.0, 5.5 Hz, 1H), 4.43 – 4.24 (m, 3H), 3.13 (dd, *J* = 14.0, 5.5 Hz, 1H), 2.96 (dd, *J* = 14.0, 8.0 Hz, 1H), 1.62 (m, 3H), 0.95 – 0.87 (m, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 174.8, 174.5, 157.8, 141.6, 141.3, 140.6, 138.0, 130.6 (2C), 130.4 (2C), 129.8 (2C), 129.6 (2C), 128.0, 127.9, 127.7, 123.7, 122.4, 120.3 (2C), 120.1 (2C), 56.7, 53.4, 41.4, 39.1, 34.6, 25.8, 23.5, 21.9.

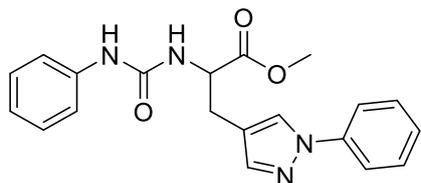
HRMS (ESI-TOF) m/z [M+H]⁺ Calcd for C₃₂H₃₇N₆O₃ 553.2927; Found 553.2924.

LCMS (ESI) m/z [M+H]⁺ 553.9.

IR : 3280, 1633, 1598, 1546, 1499, 1441, 1396.

Mp : 224-226 °C.

methyl 3-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)-2-(3-phenylureido)propanoate (P24)



$C_{20}H_{20}N_4O_3$
MW: 364.41 g.mol⁻¹
Yield: 34%
brown oil

To a solution of Iminosydnone F (60 mg, 0.171 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (0.54 mg, 0.034 mmol, 0.02 equiv.), triethanolamine (25.5 mg, 0.171 mmol, 1 equiv.), CuSO₄.5H₂O (0.43 mg, 0.017 mmol, 0.01 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (6.8 mL, 0.025 M) was added propargyl glycine methyl ester (22 mg, 0.171 mmol, 1 equiv.) followed by sodium ascorbate (67.9 mg, 0.342 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at room temperature and then evaporated. The crude mixture was then purified by puriflash using ACN/H₂O 0% to 100% over 1 hour to give the desired product as a brown oil. (32 mg, 0.058 mmol, 34%)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.08 (s, 1H), 7.72 – 7.65 (m, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.54 – 7.40 (m, 2H), 7.38 – 7.28 (m, 3H), 7.26 – 7.19 (m, 2H), 7.01 – 6.94 (m, 1H), 4.66 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.16 – 3.04 (m, 2H), NH not observed.

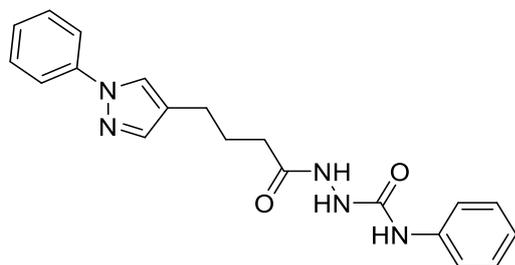
¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 174.1, 157.5, 142.4, 141.3, 140.6, 130.6 (2C), 129.8 (2C), 128.4, 127.7, 123.7, 120.2 (2C), 120.2 (2C), 119.3, 54.8, 52.8, 28.0.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₂₀H₂₁N₄O₃ 365.1614; Found 365.1616.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 365.6

IR : 3350, 1640, 1597, 1550, 1499, 1439, 1200, 1139.

N-phenyl-2-(4-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)butanoyl)hydrazine-1-carboxamide (P25)



$C_{20}H_{21}N_5O_2$
MW: 363.42 g.mol⁻¹
Yield: 23%
Yellow oil

To a solution of Iminosydnone F (30 mg, 0.086 mmol, 1 equiv.), 5,6-dihydrodiimidazo[1,2-a:2',1'-c]pyrazine **Ligand 2** (0.27 mg, 0.017 mmol, 0.02 equiv.), triethanolamine (12.7 mg, 0.086 mmol, 1 equiv.), CuSO₄.5H₂O (0.21 mg, 0.0086 mmol, 0.01 equiv.) in H₂O containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant (3.4 mL, 0.025 M) was added hex-5-ynehydrazide **25a** (10.8 mg, 0.086 mmol, 1 equiv.)

followed by sodium ascorbate (33.9 mg, 0.171 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 16 h at 37 °C and then evaporated. The crude mixture was then purified by puriflash using ACN/H₂O 0% to 100% over 1 hour to give the desired product as a yellow oil. (14 mg, 0.039 mmol, 23%)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.09 (s, 1H), 7.70 (dd, *J* = 8.6, 1.0 Hz, 2H), 7.61 (s, 1H), 7.49 – 7.43 (m, 2H), 7.41 (dd, *J* = 8.6, 1.0 Hz, 2H), 7.28 (dt, *J* = 13.9, 8.0 Hz, 3H), 7.02 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 2.65 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.35 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.03 – 1.94 (m, 2H), NH not observed.

¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 175.9, 158.1, 142.0, 141.5, 140.1, 130.5 (2C), 129.8 (2C), 127.5 (2C), 124.4, 124.2, 120.9 (2C), 120.1 (2C), 34.0, 27.5, 24.4.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₂₀H₂₂N₅O₂ 364,1773; Found 364,1773

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 364.2

IR : 3266, 1657, 1599, 1552, 1500, 1398.

▪ HTE Experiment

Material

The screening of conditions and scope evaluations were performed in a 96 well plate format using 1mL vials (8x30mm vials number 884001 from Analytical Sales and Services) in a Paradox reactor (96973 from Analytical Sales and Services). The homogeneous stirring was controlled thanks to Stainless Steel, Parylene C Coated stirring elements and a tumble stirrer (VP 711D-1 and VP 710 Series from V&P Scientific). The liquid dispensing was performed using calibrated manual pipettes and multipipettes (Fisher/Eppendorf). The heating control was performed thanks to a heating block from V&P scientific (VP 741DCE).

Sample preparation

To each well of the high-throughput plate (containing 100 μ L of reactions crude) were added 200 μ L of the internal standard solution (25 μ M in MeOH) and 200 μ L of MeOH. The resulting mixtures were stirred on a tumble stirrer for 10 minutes and then centrifuged for 3 minutes at 1200 rpm. To each well of a 96 1 mL-well plate were added 1000 μ L MeOH followed by 1 μ L of the centrifuged supernatants into each respective well. The high-throughput plate was sealed and placed in the autosampler for LC-MS quantitative analysis. For the solvent screening, the screening of sydnone A and iminosydnone F in organic solvent and the screening of iminosydnone F in organo/aqueous solvent, 100 μ L of reactions crude were added in a 96-well plate before the sample preparation procedure as reactions volume were higher.

Ligand Screening

25 μ L of a solution of mesoionic (0.1 M, 1 equiv.), 4-phenyl-1-butyne (0.1 M, 1 equiv.) and triethanolamine (0.1 M, 1 equiv.) in DMSO was added to each well. 25 μ L of a solution of ligand (0.04 M, 0.4 equiv.) in DMSO was added to each well (**L15**, BPDS = Supplier 1A). 25 μ L of a solution of copper sulfate (0.02 M, 0.2 equiv.) in water was added to each well, followed by 25 μ L of a solution of sodium ascorbate (0.2 M, 2 equiv.) in water.

Final concentrations:

- [mesoionic] = [4-phenyl-1-butyne] = [triethanolamine] = 25 mM;
- [CuSO₄] = 5 mM (0.2 equiv.),
- [ligand] = 10 mM (0.4 equiv.),
- [Na. Asc.] = 50 mM,
- Solvent = H₂O : DMSO (50 : 50), total volume = 100 μ L
-

(For **L15** reaction was performed once on 57 μ mol of mesoionic with same condition as other ligands)

The high-throughput plate was sealed and stirred on the Tumble Stirrer with heating plates at 37 °C during 16 hours. (For analysis procedure see: **Sample preparation**). All plates were performed as

duplicate (n=2).

Duplicate 1:

	-	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22	L23	
A	0	10	47	20	3	4	1	0	3	15	1	0	0	0	1	0	0	0	4	2	0	0	0	>50
B	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	6	0	0	0	41-50
C	0	5	4	59	10	2	0	0	22	13	0	1	0	1	37	0	0	0	1	5	0	0	0	31-40
D	0	1	4	7	0	0	0	0	9	5	0	0	0	0	17	0	0	0	1	1	0	0	1	21-30
E	0	0	0	0	1	0	0	0	0	11	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	11-20
F	9	52	43	62	46	44	33	53	80	62	40	43	6	2	39	17	14	11	38	29	1	2	25	0-10
G	1	24	23	28	25	23	17	18	33	17	16	20	1	1	9	11	1	1	15	17	0	0	8	0

Duplicate 2 :

	-	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22	L23	
A	0	5	47	18	4	0	1	2	10	14	1	0	1	0	1	2	0	0	4	3	1	1	0	>50
B	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	9	0	0	0	41-50
C	0	3	19	12	4	5	2	19	17	15	4	5	1	0	28	0	0	0	0	0	0	0	1	31-40
D	0	0	4	12	0	1	0	0	15	9	0	1	0	0	4	0	0	0	1	1	0	0	5	21-30
E	0	0	0	0	2	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11-20
F	13	46	43	54	46	13	40	45	37	52	47	37	14	1	40	8	19	7	40	49	3	3	37	0-10
G	7	16	23	15	31	7	20	26	26	27	25	7	16	3	14	10	6	0	20	20	1	2	4	0

Averages :

	-	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22	L23	L15	
A	0	7	47	19	3	2	1	1	7	15	1	0	0	0	1	1	0	0	4	3	0	0	0	45	>50
B	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	0	0	0	0	41-50
C	0	4	11	35	7	3	1	9	19	14	2	3	1	0	33	0	0	0	0	3	0	0	0	0	31-40
D	0	1	4	9	0	1	0	0	12	7	0	1	0	0	10	0	0	0	1	1	0	0	3	0	21-30
E	0	0	0	0	2	0	0	0	5	6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11-20
F	11	49	43	58	46	28	36	49	58	57	43	40	10	2	39	12	17	9	39	39	2	3	31	44	0-10
G	4	20	23	22	28	15	19	22	30	22	20	13	8	2	11	10	4	1	18	19	0	1	6	11	0

Catalytic charges Screening

General procedure for sydnone A

25 μ L of a solution of Sydnone A (0.1 M, 1 equiv.), 4-phenyl-1-butyne (0.1 M, 1 equiv.) and triethanolamine (0.1 M, 1 equiv.) in DMSO was added to each well. 25 μ L of a solution of ligand (0.04 M, 0.02 M, 0.01 M, 0.002 M, 0.001 M, 0.2 mM and 0.02 mM respectively for final concentrations of

40%, 20%, 10%, 2%, 1%, 0.2% and 0.02%) in DMSO was added to each well. 25 μ L of a solution of copper sulfate (0.02 M, 0.01 M, 0.005 M, 0.001 M, 0.5 mM, 0.1 mM and 0.01 mM respectively for final concentrations of 20%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.01%) in water was added to each well followed by 25 μ L of a solution of sodium ascorbate (0.2 M, 2 equiv.) in water.

Final concentrations:

- [mesoionic] = [4-phenyl-1-butyne] = [triethanolamine] = 25 mM,
- [Na. Asc.] = 50 mM,
- Solvent = H₂O : DMSO (50 : 50), total volume = 100 μ L

The high-throughput plate was sealed and stirred on the Tumble Stirrer with heating plates at 37 °C during 16 hours. (For analysis procedure see: **Sample preparation**)

%L2/%Cu	40%/20%	20%/10%	10%/5%	2%/1%	1%/0,5%	0,2%/0,1%	0,02%/0,01%	0%/0%	>50
n = 1	59	46	24	7	4	0	0	0	41-50
n = 2	52	55	28	8	3	0	0	0	31-40
n = 3	40	48	44	10	4	0	0	0	21-30
n = 4	50	52	43	14	4	1	0	0	11-20
Average	50	50	35	10	4	0	0	0	0-10
									0

General procedure for Iminosydnone F

25 μ L of a solution of IminoSydnone F (0.1 M, 1 equiv.), 4-phenyl-1-butyne (0.1 M, 1 equiv.) and triethanolamine (0.1 M, 1 equiv.) in DMSO was added to each well. 25 μ L of a solution of L1, L2, L3, L4, L8, L14, L19, (0.04 M, 0.02 M, 0.01 M, 0.002 M, 0.001 M, 0.2 mM, 0.1 mM and 0.02 mM respectively for final concentrations of 40%, 20%, 10%, 2%, 1%, 0.2%, 0.1% and 0.02%) in DMSO was added. 25 μ L of a solution of copper sulfate (0.02 M, 0.01 M, 0.005 M, 0.001 M, 0.5 mM, 0.1 mM 0.05 mM and 0.01 mM respectively for final concentrations of 20%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% and 0.01%) in water was added to each well followed by 25 μ L of a solution of sodium ascorbate (0.2 M, 2 equiv.) in water.

Final concentrations:

- [mesoionic] = [4-phenyl-1-butyne] = [triethanolamine] = 25 mM,
- [Na. Asc.] = 50 mM,
- Solvent = H₂O : DMSO (50 : 50), total volume = 100 μ L

The high-throughput plate was sealed and stirred on the Tumble Stirrer with heating plates at 37 °C

during 16 hours. (For analysis procedure see: **Sample preparation**)

All plates were performed as duplicate (n=2).

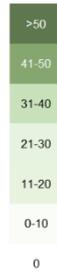
Duplicate 1:

%L2/%Cu	40%/20%	20%/10%	10%/5%	2%/1%	1%/0,5%	0,2%/0,1%	0,1%/0,05	0,02%/0,01%	0%/0%
-	14	11	32	4	1	0	0	0	0
L1	65	53	46	16	6	2	4	1	0
L2	55	54	57	45	36	5	1	1	0
L3	20	45	48	55	49	4	3	1	0
L4	58	56	56	28	13	8	2	1	0
L8	69	64	69	54	53	14	4	2	0
L14	67	68	61	38	25	12	2	1	0
L19	46	38	24	16	16	2	1	1	0



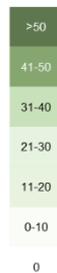
Duplicate 2:

%L2/%Cu	40%/20%	20%/10%	10%/5%	2%/1%	1%/0,5%	0,2%/0,1%	0,1%/0,05	0,02%/0,01%	0%/0%
-	36	19	21	7	1	0	0	10	0
L1	67	59	46	12	8	6	2	1	0
L2	59	57	57	46	36	20	4	0	0
L3	26	50	54	66	49	14	5	1	0
L4	67	60	60	55	18	19	2	1	0
L8	74	65	62	65	39	19	10	0	0
L14	66	63	56	55	50	14	5	1	0
L19	53	39	42	28	9	6	4	1	0



Average:

%L2/%Cu	40%/20%	20%/10%	10%/5%	2%/1%	1%/0,5%	0,2%/0,1%	0,1%/0,05	0,02%/0,01%	0%/0%
-	25	15	26	5	1	0	0	5	0
L1	66	56	46	14	7	4	3	1	0
L2	57	56	57	46	36	12	3	1	0
L3	23	47	51	60	49	9	4	1	0
L4	63	58	58	41	15	13	2	1	0
L8	71	64	65	59	46	16	7	1	0
L14	66	65	59	46	38	13	4	1	0
L19	50	39	33	22	12	4	3	1	0



Copper Source Screening

General procedure for sydnone A

25 μL of a solution of Sydnone A (0.1 M, 1 equiv.), 4-phenyl-1-butyne (0.1 M, 1 equiv.) and ligand 2 (0.01 M, 0.1 equiv.) in DMSO was added to each well. 25 μL of a solution of base (0.1 M, 1 equiv.) in DMSO was added to each well. 25 μL of a solution of copper (0.005 M, 0.05 equiv.) in water was added to each well. 25 μL of a solution of reductant (0.2 M, 2 equiv.) in water was added to each well.

Final concentrations:

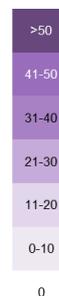
- [mesoionic] = [4-phenyl-1-butyne] = [triethanolamine] = 25 mM,
- [L2] = 2.5 mM,
- [copper] = 1.25 mM,
- [Na. Asc.] = 50 mM,
- Solvent = H_2O : DMSO (50 : 50), total volume = 100 μL .
-

The high-throughput plate was sealed and stirred on the Tumble Stirrer with heating plates at 37 $^{\circ}\text{C}$ during 16 hours. (For analysis procedure see: **Sample preparation**)

All plates were performed as duplicate (n=2).

Duplicate 1:

	Na. Ascorbate			Na ₂ S ₂ O ₄		
	(EtOH) ₃ N	NaOH	Collidine	(EtOH) ₃ N	NaOH	Collidine
CuSO ₄ ·5H ₂ O	28	7	16	0	0	0
Cu(OTf) ₂	25	8	15	0	0	0
CuCl ₂	26	9	14	0	0	0
Cu(OAc) ₂	32	10	13	0	1	0
CuTC	31	18	22	0	0	0
Cu(acac) ₂	29	29	20	0	0	0
Cu(MeCN) ₄ , PF ₆ ⁻	19	16	12	0	0	0
Cu(NO ₃) ₂	31	8	12	0	0	0



Duplicate 2:

	Na. Ascorbate			Na ₂ S ₂ O ₄		
	(EtOH) ₃ N	NaOH	Collidine	(EtOH) ₃ N	NaOH	Collidine
CuSO ₄ ·5H ₂ O	28	20	20	0	0	0
Cu(OTf) ₂	28	17	21	0	0	0
CuCl ₂	28	17	20	0	0	0
Cu(OAc) ₂	27	18	20	0	0	0
CuTC	10	23	16	0	0	0
Cu(acac) ₂	5	21	10	0	0	0
Cu(MeCN) ₄ , PF ₆	20	16	9	0	0	0
Cu(NO ₃) ₂	17	8	25	0	0	0

>50
41-50
31-40
21-30
11-20
0-10
0

Average:

	Na. Ascorbate			Na ₂ S ₂ O ₄		
	(EtOH) ₃ N	NaOH	Collidine	(EtOH) ₃ N	NaOH	Collidine
CuSO ₄ ·5H ₂ O	28	14	19	0	0	0
Cu(OTf) ₂	26	13	18	0	0	0
CuCl ₂	27	13	17	0	0	0
Cu(OAc) ₂	30	14	16	0	1	0
CuTC	21	20	19	0	0	0
Cu(acac) ₂	17	25	15	0	0	0
Cu(MeCN) ₄ , PF ₆	20	16	10	0	0	0
Cu(NO ₃) ₂	24	8	19	0	0	0

>50
41-50
31-40
21-30
11-20
0-10
0

General procedure for Iminosydnone F

25 µL of a solution of Iminosydnone F (0.1 M, 1 equiv.), 4-phenyl-1-butyne (0.1 M, 1 equiv.) and ligand 2 (0.2 mM, 0.002 equiv.) in DMSO was added to each well. 25 µL of a solution of base (0.1 M, 1 equiv.) in DMSO was added to each well. 25 µL of a solution of copper (0.1 mM, 0.001 equiv.) in water was added to each well. 25 µL of a solution of reductant (0.2 M, 2 equiv.) in water was added to each well.

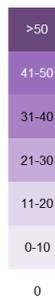
Final concentrations:

- [mesoionic] = [4-phenyl-1-butyne] = [triethanolamine] = 25 mM,
- [L2] = 0.05 mM,
- [copper] = 0.025 mM,
- [Na. Asc.] = 50 mM,
- Solvent = H₂O : DMSO (50 : 50), total volume = 100 µL.
-

The high-throughput plate was sealed and stirred on the Tumble Stirrer with heating plates at 37 °C during 16 hours. (For analysis procedure see: **Sample preparation**)
 All plates were performed as duplicate (n=2).

Duplicate 1:

	Na. Ascorbate			Na ₂ S ₂ O ₄		
	(EtOH) ₃ N	NaOH	Collidine	(EtOH) ₃ N	NaOH	Collidine
CuSO ₄ ·5H ₂ O	24	8	6	0	0	0
Cu(OTf) ₂	11	25	6	0	0	0
CuCl ₂	15	0	7	0	0	0
Cu(OAc) ₂	14	0	8	0	0	0
CuTC	15	14	11	0	0	0
Cu(acac) ₂	14	8	8	0	0	0
Cu(MeCN) ₄ , PF ₆ ⁻	14	0	8	0	0	0
Cu(NO ₃) ₂	15	0	9	0	0	0



Duplicate 2:

	Na. Ascorbate			Na ₂ S ₂ O ₄		
	(EtOH) ₃ N	NaOH	Collidine	(EtOH) ₃ N	NaOH	Collidine
CuSO ₄ ·5H ₂ O	17	0	0	0	0	0
Cu(OTf) ₂	27	0	1	0	0	0
CuCl ₂	20	0	11	0	0	0
Cu(OAc) ₂	22	0	4	0	0	0
CuTC	3	17	2	0	0	0
Cu(acac) ₂	4	22	1	0	0	0
Cu(MeCN) ₄ , PF ₆ ⁻	28	0	32	0	0	0
Cu(NO ₃) ₂	27	0	13	0	0	0



Average:

	Na. Ascorbate			Na ₂ S ₂ O ₄		
	(EtOH) ₃ N	NaOH	Collidine	(EtOH) ₃ N	NaOH	Collidine
CuSO ₄ ·5H ₂ O	20	0	3	0	0	0
Cu(OTf) ₂	19	13	3	0	0	0
CuCl ₂	18	0	9	0	0	0
Cu(OAc) ₂	18	0	6	0	0	0
CuTC	9	15	6	0	0	0
Cu(acac) ₂	9	15	4	0	0	0
Cu(MeCN) ₄ , PF ₆	21	0	20	0	0	0
Cu(NO ₃) ₂	21	0	11	0	0	0



Bases and reductant Screening

General procedure for sydnone A

25 μ L of a solution of Sydnone A (0.1 M, 1 equiv.), 4-phenyl-1-butyne (0.1 M, 1 equiv.) and ligand 2 (0.01 M, 0.1 equiv.) in DMSO was added to each well. 25 μ L of a solution of base (0.1 M, 1 equiv.) in DMSO was added to each well. 25 μ L of a solution of copper sulfate (0.005 M, 0.05 equiv.) in water was added to each well. 25 μ L of a solution of reductant (0.2 M, 2 equiv.) in water was added to each well.

Final concentrations:

- [mesoionic] = [4-phenyl-1-butyne] = [base] = 25 mM,
- [L2] = 2.5 mM,
- [CuSO₄] = 1.25 mM,
- [reductant] = 50 mM,
- Solvent = H₂O : DMSO (50 : 50), total volume = 100 μ L.

The high-throughput plate was sealed and stirred on the Tumble Stirrer with heating plates at 37 °C during 16 hours. (For analysis procedure see: **Sample preparation**)
All plates were performed as duplicate (n=2).

Duplicate 1:

	Na. Asc	D-Galactose	D-Glucose	Na ₂ SO ₃	Hydroquinone	Na. Lactate	>50
-	19	0	0	19	4	5	41-50
(EtOH) ₃ N	41	62	61	2	60	21	31-40
Pyridine	16	1	1	2	39	4	21-30
TBD	15	1	3	0	7	18	11-20
							0-10
							0

Duplicate 2:

	Na. Asc	D-Galactose	D-Glucose	Na ₂ SO ₃	Hydroquinone	Na. Lactate	>50
-	17	0	0	12	2	0	41-50
(EtOH) ₃ N	49	54	50	3	55	28	31-40
Pyridine	14	0	0	3	36	0	21-30
TBD	18	36	16	0	20	3	11-20
							0-10
							0

Average:

	Na. Asc	D-Galactose	D-Glucose	Na ₂ SO ₃	Hydroquinone	Na. Lactate	>50
-	18	0	0	16	3	2	41-50
(EtOH) ₃ N	45	58	56	2	58	24	31-40
Pyridine	15	0	0	2	38	2	21-30
TBD	16	19	9	0	14	11	11-20
							0-10
							0

General procedure for Iminosydnone F

25 µL of a solution of Iminosydnone F (0.1 M, 1 equiv.), 4-phenyl-1-butyne (0.1 M, 1 equiv.) and ligand 2 (0.002 M, 0.02 equiv.) in DMSO was added to each well. 25 µL of a solution of base (0.1 M, 1 equiv.) in DMSO was added to each well. 25 µL of a solution of copper sulfate (0.001 M, 0.01 equiv.) in water was added to each well. 25 µL of a solution of reductant (0.2 M, 2 equiv.) in water was added to each well.

Final concentrations:

- [mesoionic] = [4-phenyl-1-butyne] = [base] = 25 mM,
- [L2] = 0.5 mM,
- [CuSO₄] = 0.25 mM,
- [reductant] = 50 mM,
- Solvent = H₂O : DMSO (50 : 50), total volume = 100 µL.

The high-throughput plate was sealed and stirred on the Tumble Stirrer with heating plates at 37 °C during 16 hours. (For analysis procedure see: **Sample preparation**)

All plates were performed as duplicate (n=2).

Duplicate 1 :

	Na. Asc	D-Galactose	D-Glucose	Na ₂ SO ₃	Hydroquinone	Na. Lactate	>50
-	6	0	0	33	0	0	41-50
(EtOH) ₃ N	60	0	0	3	8	0	31-40
Pyridine	20	0	0	5	3	0	21-30
TBD	39	0	0	3	0	0	11-20
							0-10
							0

Duplicate 2 :

	Na. Asc	D-Galactose	D-Glucose	Na ₂ SO ₃	Hydroquinone	Na. Lactate	>50
-	7	0	0	31	0	0	41-50
(EtOH) ₃ N	76	0	0	3	14	0	31-40
Pyridine	21	1	0	2	3	0	21-30
TBD	27	0	0	2	0	0	11-20
							0-10
							0

Average :

	Na. Asc	D-Galactose	D-Glucose	Na ₂ SO ₃	Hydroquinone	Na. Lactate	>50
-	6	0	0	32	0	0	41-50
(EtOH) ₃ N	68	0	0	3	11	0	31-40
Pyridine	21	1	0	3	3	0	21-30
TBD	33	0	0	2	0	0	11-20
							0-10
							0

Temperature Screening

General procedure for sydnone A

25 µL of a solution of sydnones A (0.1 M, 1 equiv.), 4-phenyl-1-butyne (0.1 M, 1 equiv.) and triethanolamine (0.1 M, 1 equiv.) in DMSO was added to each well. 25 µL of a solution of Ligand 2 (0.04 M, 0.02 M, 0.01 M, 0.002 M, 0.001 M, 0.2 mM, 0.1 mM and 0.02 mM respectively for final concentrations of 40%, 20%, 10%, 2%, 1%, 0.2%, 0.1% and 0.02%) in DMSO was added to each well. 25 µL of a solution of copper sulfate (0.02 M, 0.01 M, 0.005 M, 0.001 M, 0.5 mM, 0.1 mM, 0.05 mM and 0.01 mM respectively for final concentrations of 20%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% and 0.01%) in water was added to each well. 25 µL of a solution of reductant (0.2 M, 2 equiv) in water was added to each well.

Final concentrations:

- [mesoionic] = [4-phenyl-1-butyne] = [triethanolamine] = 25 mM,
- [reductant] = 50 mM,
- Solvent = H₂O : DMSO (50 : 50), total volume = 100 μL.

The high-throughput plate was sealed and stirred on the Tumble Stirrer with heating plates at 37 °C or 50 °C or 100 °C during 16 hours. (For analysis procedure see: **Sample preparation in V.A**). All plates were performed as duplicate (n=2).

- **37 °C**

Duplicate 1 :

%L2/%Cu	40%/20%	20%/10%	10%/5%	2%/1%	1%/0,5%	0,2%/0,1%	0,1%/0,05	0,02%/0,01%	0%/0%	>50
Na. Asc	58	49	36	5	1	0	0	0	1	41-50
D-Glucose	25	23	6	0	0	0	0	0	0	31-40
Hydroquinone	53	26	48	4	1	0	0	0	0	21-30
D-Galactose	26	31	15	0	0	0	0	0	0	11-20
										0-10
										0

Duplicate 2:

%L2/%Cu	40%/20%	20%/10%	10%/5%	2%/1%	1%/0,5%	0,2%/0,1%	0,1%/0,05	0,02%/0,01%	0%/0%	>50
Na. Asc	53	45	35	4	2	0	0	0	0	41-50
D-Glucose	27	23	6	0	0	0	0	0	0	31-40
Hydroquinone	50	59	46	2	1	0	0	0	0	21-30
D-Galactose	24	26	15	0	0	0	0	0	0	11-20
										0-10
										0

Averages:

%L2/%Cu	40%/20%	20%/10%	10%/5%	2%/1%	1%/0,5%	0,2%/0,1%	0,1%/0,05	0,02%/0,01%	0%/0%	>50
Na. Asc	55	47	35	5	2	0	0	0	1	41-50
D-Glucose	26	23	6	0	0	0	0	0	0	31-40
Hydroquinone	51	43	47	3	1	0	0	0	0	21-30
D-Galactose	25	29	15	0	0	0	0	0	0	11-20
										0-10
										0

- **50 °C**

Duplicate 1 :

%L2/%Cu	40%/20%	20%/10%	10%/5%	2%/1%	1%/0,5%	0,2%/0,1%	0,1%/0,05	0,02%/0,01%	0%/0%	>50
Na. Asc	36	34	26	5	3	0	0	0	1	41-50
D-Glucose	17	13	20	1	0	0	0	2	0	31-40
Hydroquinone	42	60	38	3	1	0	0	0	0	21-30
D-Galactose	38	31	14	0	0	0	0	0	0	11-20
										0-10
										0

Duplicate 2:

%L2/%Cu	40%/20%	20%/10%	10%/5%	2%/1%	1%/0,5%	0,2%/0,1%	0,1%/0,05	0,02%/0,01%	0%/0%	>50
Na. Asc	65	34	25	5	3	0	0	0	0	41-50
D-Glucose	27	23	7	1	0	0	0	0	0	31-40
Hydroquinone	48	44	36	4	1	0	0	0	0	21-30
D-Galactose	21	25	9	0	0	0	0	0	0	11-20
										0-10
										0

Averages:

%L2/%Cu	40%/20%	20%/10%	10%/5%	2%/1%	1%/0,5%	0,2%/0,1%	0,1%/0,05	0,02%/0,01%	0%/0%	>50
Na. Asc	51	34	25	5	3	0	0	0	1	41-50
D-Glucose	22	18	13	1	0	0	0	1	0	31-40
Hydroquinone	45	52	37	4	1	0	0	0	0	21-30
D-Galactose	29	28	12	0	0	0	0	0	0	11-20
										0-10
										0

- **100 °C**

Duplicate 1 :

%L2/%Cu	40%/20%	20%/10%	10%/5%	2%/1%	1%/0,5%	0,2%/0,1%	0,1%/0,05	0,02%/0,01%	0%/0%	>50
Na. Asc	85	82	62	28	13	2	1	0	0	41-50
D-Glucose	67	67	75	15	4	1	0	1	1	31-40
Hydroquinone	84	80	70	20	12	1	1	1	1	21-30
D-Galactose	66	74	70	13	3	1	1	1	1	11-20
										0-10
										0

Duplicate 2:

%L2/%Cu	40%/20%	20%/10%	10%/5%	2%/1%	1%/0,5%	0,2%/0,1%	0,1%/0,05	0,02%/0,01%	0%/0%	>50
Na. Asc	88	78	68	29	13	3	3	1	0	41-50
D-Glucose	74	78	70	19	33	1	1	1	0	31-40
Hydroquinone	87	78	81	17	10	8	1	1	0	21-30
D-Galactose	60	74	71	40	3	1	1	0	1	11-20
										0-10
										0

Averages:

%L2/%Cu	40%/20%	20%/10%	10%/5%	2%/1%	1%/0,5%	0,2%/0,1%	0,1%/0,05	0,02%/0,01%	0%/0%	>50
Na. Asc	87	80	65	28	13	2	2	0	0	41-50
D-Glucose	70	73	73	17	19	1	1	1	1	31-40
Hydroquinone	85	79	76	19	11	5	1	1	1	21-30
D-Galactose	63	74	71	27	3	1	1	1	1	11-20
										0-10
										0

General procedure for Iminosydnone F

25 µL of a solution of Iminosydnone F (0.1 M, 1 equiv.), 4-phenyl-1-butyne (0.1 M, 1 equiv.) and triethanolamine (0.1 M, 1 equiv.) in DMSO was added to each well. 25 µL of a solution of Ligand 2 (0.04 M, 0.02 M, 0.01 M, 0.002 M, 0.001 M, 200 µM, 100 µM and 20 µM respectively for final concentrations of 40%, 20%, 10%, 2%, 1%, 0.2%, 0.1% and 0.02%) in DMSO was added to each well. 25 µL of a solution of copper sulfate (0.02 M, 0.01 M, 0.005 M, 0.001 M, 500 µM, 100 µM, 50 µM and 10 µM respectively for final concentrations of 20%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% and 0.01%) in water was added to each well. 25 µL of a solution of sodium ascorbate (0.2 M, 2 equiv) in water was added to each well.

Final concentrations:

- [mesoionic] = [4-phenyl-1-butyne] = [triethanolamine] = 25 mM,
- [L2] = 0.5 mM,
- [CuSO₄] = 0.25 mM,
- [Na. Asc] = 50 mM,
- Solvent = H₂O : DMSO (50 : 50), total volume = 100 µL.

The high-throughput plate was sealed and stirred on the Tumble Stirrer with heating plates at 37 °C or 50 °C or 100 °C during 16 hours. (For analysis procedure see: **Sample preparation**). All plates were performed as duplicate (n=2).

- **37 °C** (*those results comes from catalytic charge screening)

%L2/%Cu	40%/20%	20%/10%	10%/5%	2%/1%	1%/0,5%	0,2%/0,1%	0,1%/0,05	0,02%/0,01%	0%/0%
n = 1	55	54	57	45	36	5	1	1	0
n = 2	59	57	57	46	36	20	4	0	0
Average	57	56	57	46	36	12	3	1	0

- 50 °C

%L2/%Cu	40%/20%	20%/10%	10%/5%	2%/1%	1%/0,5%	0,2%/0,1%	0,1%/0,05	0,02%/0,01%	0%/0%
n = 1	54	72	59	48	35	0	0	0	0
n = 2	53	60	59	44	44	0	0	0	0
Average	53	66	59	46	39	0	0	0	0

- 100 °C

%L2/%Cu	40%/20%	20%/10%	10%/5%	2%/1%	1%/0,5%	0,2%/0,1%	0,1%/0,05	0,02%/0,01%	0%/0%
n = 1	43	40	37	29	17	0	0	0	0
n = 2	40	38	36	25	6	0	0	0	0
Average	42	39	37	27	12	0	0	0	0

Solvent screening

General procedure for sydnone A in organo/aqueous solvent

1 mL of a solution of L2 (4 mg, 25 mM) was prepared in organic solvent.

10 mL of a solution of CuSO₄ (30.8 mg, 12.5 mM) was prepared in water.

To a vial, was added sydnone A (10 mg, 0.062 mmol, 1 equiv.), triethanolamine (9.2 mg, 0.062 mmol, 1 equiv.), 4-phenyl-1-butyne (8.7 μL, 0.062 mmol, 1 equiv.), 250 μL of a solution of L2 (0.99mg, 0.1 equiv.) and 250 μL of a solution of CuSO₄ (0.77 mg, 0.05 equiv.). 1 mL of organic solvent and 1 mL of water was added followed by the corresponding reducer. Vials were sealed and stirred at 37 °C during 16 hours. (For analysis procedure see: **Sample preparation**)

Final concentrations:

- [mesoionic] = [4-phenyl-1-butyne] = [triethanolamine] = 25 mM,
- [L2] = 2.5 mM,
- [CuSO₄] = 1.25 mM,
- [reductant] = 50 mM,
- Total volume = 2.5 mL.

CuSO ₄													
Solvent	tBuOH/H ₂ O			DMSO/H ₂ O			H ₂ O + 5% TGPS-750-M			H ₂ O + 5% Tween			>50
Reductant	Na. Asc	D-Glucose	Hydroquinone	Na. Asc	D-Glucose	Hydroquinone	Na. Asc	D-Glucose	Hydroquinone	Na. Asc	D-Glucose	Hydroquinone	41-50
n = 1	13	4	8	42	45	56	51	19	51	29	14	12	31-40
n = 2	16	4	10	45	37	56	59	19	55	29	14	13	21-30
n = 3	16	4	10	42	41	63	48	13	59	29	15	13	11-20
Average	15	4	9	43	41	58	53	17	55	29	14	13	0-10
													0

General procedure for sydnone A in organic solvent

To a vial was added sydnone A (20 mg, 0.123 mmol, 1 equiv.), triethanolamine (18.3 mg, 0.123 mmol, 1 equiv.), 4-phenyl-1-butyne (17.3 μ L, 0.123 mmol, 1 equiv.), L2 (1.97 mg, 0.0123 mmol, 0.1 equiv.) and copper (0.006 mmol, 0.05 equiv.) 5 mL of the corresponding solvent was added. Vials were sealed and stirred at 37 °C during 16 hours. (For analysis procedure see: **Sample preparation**)

Final concentrations:

- [mesoionic] = [4-phenyl-1-butyne] = [triethanolamine] = 25 mM,
- [L2] = 2.5 mM,
- [Copper] = 1.25 mM,
- Total volume = 5 mL.

CuI							Cu(MeCN) ₄ PF ₆			>50
Solvent	EtOH	ACN	DMF	EtOH	ACN	DMF	EtOH	ACN	DMF	41-50
n = 1	0	0	16	4	3	7				31-40
n = 2	0	0	17	4	3	7				21-30
n = 3	0	0	17	4	3	7				11-20
Average	0	0	17	4	3	7				0-10
										0

General procedure for Iminosydnone F in organo/aqueous solvent

1 mL of a solution of L2 (1.83 mg, 10 mM) was prepared in organic solvent.

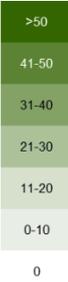
10 mL of a solution of CuSO₄ (14.2 mg, 5 mM) was prepared in water.

To a vial, was added Iminosydnone F (10 mg, 0.029 mmol, 1 equiv.), triethanolamine (4.3 mg, 0.029 mmol, 1 equiv.), 4-phenyl-1-butyne (4 μ L, 0.029 mmol, 1 equiv.), 50 μ L of a solution of L2 (91 μ g, 0.02 equiv.) and 50 μ L of a solution of CuSO₄ (0.71 μ g, 0.01 equiv.). 0.5 mL of organic solvent and 0.5 mL of water were then added, followed by the corresponding reducer. Vials were sealed and stirred at 37 °C during 16 hours. (For analysis procedure see: **Sample preparation**)

Final concentrations:

- [mesoionic] = [4-phenyl-1-butyne] = [triethanolamine] = 25 mM,
- [L2] = 0.5 mM,
- [CuSO₄] = 0.25 mM,
- [Na. Asc] = 50 mM,
- Total volume = 1.1 mL.

Solvent	tBuOH/H ₂ O	DMSO/H ₂ O	H ₂ O + 5% TGPS-750-M	H ₂ O + 5% Tween
n = 1	28	45	78	9
n = 2	27	46	53	6
n = 3	45	46	52	6
Average	33	46	61	7



General procedure for Iminosydnone F in organic solvent

To a vial was added iminosydnone F (20 mg, 0.057 mmol, 1 equiv.), triethanolamine (18.3 mg, 0.057 mmol, 1 equiv.), 4-phenyl-1-butyne (17.3 μ L, 0.057 mmol, 1 equiv.), L2 (0.18 mg, 1.14 μ mol, 0.02 equiv.) and copper (0.57 μ mol, 0.01 equiv.) 2.3 mL of the corresponding solvent was added. Vials were sealed and stirred at 37 °C during 16 hours. (For analysis procedure see: **Sample preparation in V.A**)

Final concentrations:

- [mesoionic] = [4-phenyl-1-butyne] = [triethanolamine] = 25 mM,
- [L2] = 0.5 mM,
- [Copper] = 0.25 mM,
- Total volume = 2.3 mL.

Solvent	CuI			Cu(MeCN) ₄ PF ₆			
	EtOH	ACN	DMF	EtOH	ACN	DMF	
n = 1	0	0	0	0	0	0	>50
n = 2	0	0	0	0	0	0	41-50
n = 3	0	0	0	0	0	0	31-40
Average	0	0	0	0	0	0	21-30
							11-20
							0-10
							0

Alkyne Screening

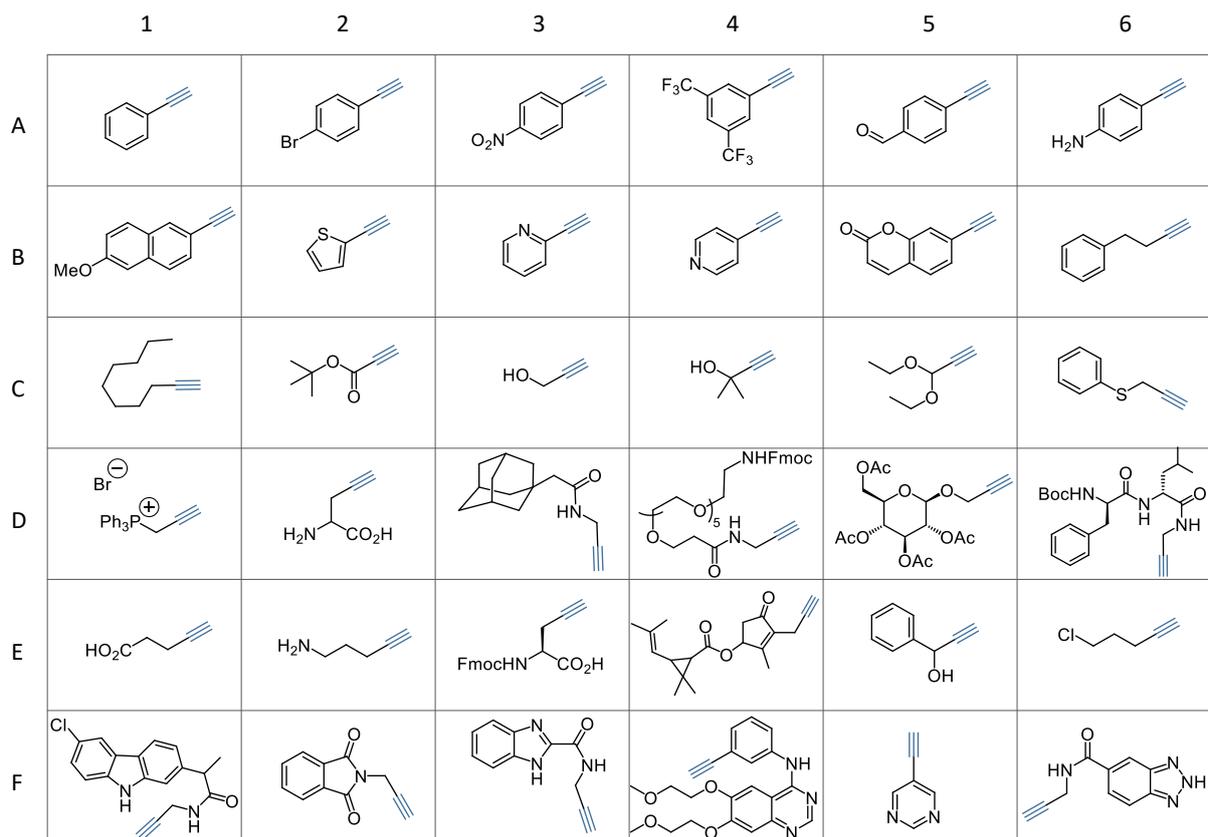
General Procedure (GP14)

5 μ L of a solution of mesoionic (0.5 M, 1 equiv.) and Ligand 2 (0.05 M, 0.1 equiv. for Sydnones and 0.01 M, 0.02 equiv. for Imino-sydnones) in DMSO was added in 36 well. 5 μ L of a solution of alkyne (0.5 M, 1 equiv.) in DMSO was added. 25 μ L of a solution of triethanolamine (0.1 M, 1 equiv.) in water containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant was added to each well. 25 μ L of a solution of copper sulfate (0.005 M, 0.05 equiv. for Sydnones and 0.001 M, 0.01 equiv. for iminosydnone) in water containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant was added to each well. A solution of sodium ascorbate (0.2 M, 2 equiv) in water containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant was added to each well. For sydnones, every well was filled up with 15 μ L of water containing 1% TGPS-750-M. For iminosydnone, every well was filled up with 15 μ L of tris-buffer (10 equiv.) in water containing 1%wt of TPGS-750-M surfactant. The high-throughput plate was sealed and stirred on an orbital shaker with heating plates at 50 °C for Sydnones and 37 °C for Iminosydnones during 16 hours.

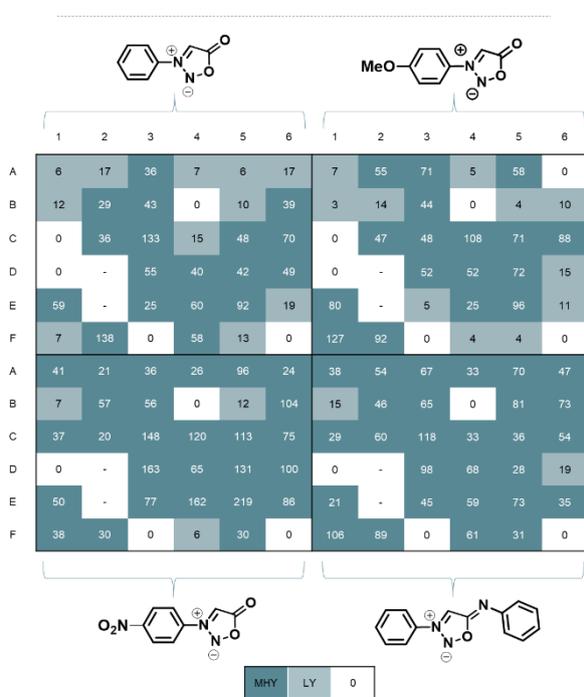
Final concentrations:

- [mesoionic] = [4-phenyl-1-butyne] = [triethanolamine] = 25 mM,
- [L2]_{Syd} = 2.5 mM, [L2]_{ImSyd} = 0.5 mM,
- [CuSO₄]_{Syd} = 1.25 mM, [CuSO₄]_{ImSyd} = 0.25 mM,
- [Na. Asc] = 50 mM,
- Solvent = Water + 1% TGPS-750-M,
- Total volume = 100 μ L.

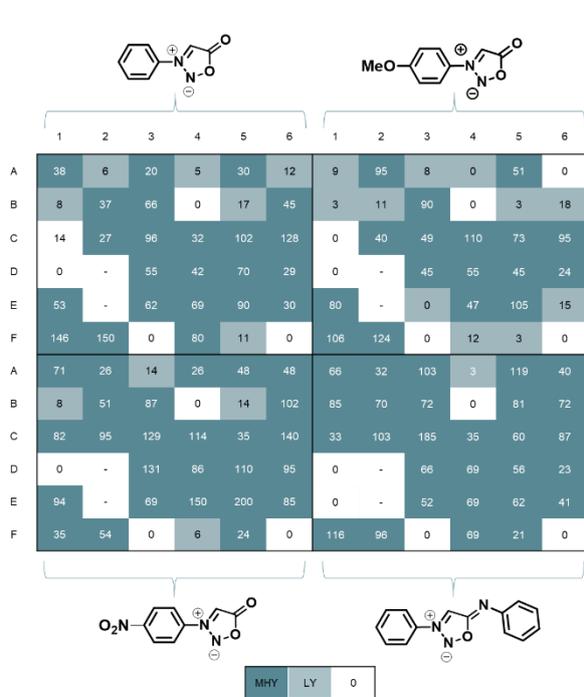
500 μ L of a solution of internal standard (di-*tert*-butylbiphenyl 0.002 M in MeOH) was added to each well and the plate was stirred 10 min. [pyrazole] = 2.5 [internal standard]. 40 μ L of each well was added to 700 μ L of MeOH. The crude mixtures were analysed by analytical SFC.



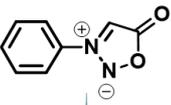
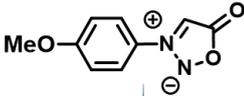
Duplicate 1:

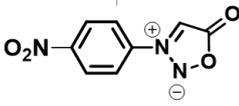
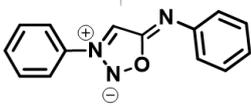


Duplicate 2:



Average:

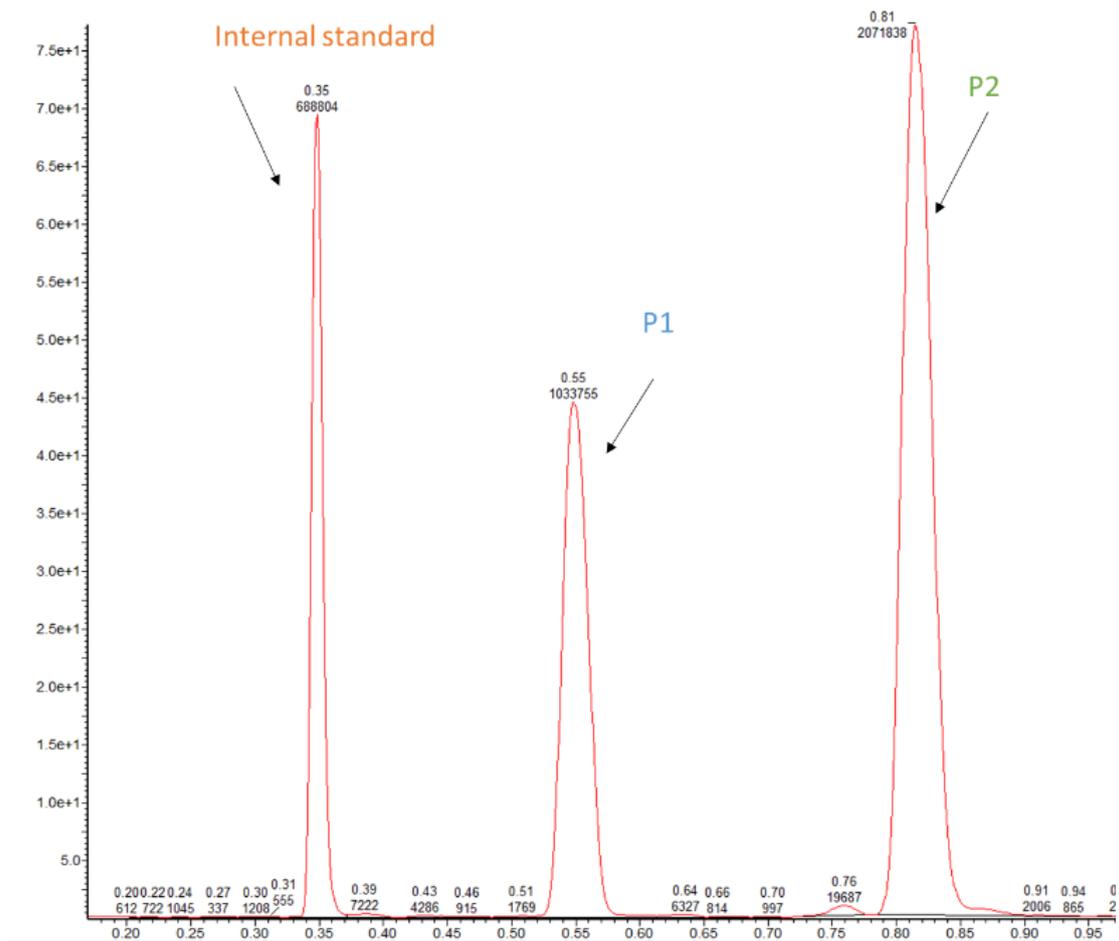
												
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
A	22	12	28	6	18	14	8	75	39	2	55	0
B	10	33	54	0	14	42	3	13	67	0	3	14
C	7	31	115	24	75	99	0	44	49	109	72	92
D	0	17*	55	41	56	19	0	9*	49	53	59	20
E	56	31*	43	64	91	24	80	22*	1	36	100	13
F	76	144	0	69	12	0	117	108	0	8	3	0
A	56	23	25	26	72	36	52	43	85	18	95	44
B	7	54	71	0	13	102	50	58	68	0	81	72
C	60	58	139	117	74	108	31	81	151	34	48	71
D	0	115*	147	75	120	98	0	0*	82	68	42	22
E	72	183*	73	156	210	85	11	13*	49	64	67	38
F	37	42	0	6	27	0	111	92	0	65	26	0

												
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
	MHY	LY	0									

Boxes annotated with * are reaction performed on 80 μmol s scale. 100 μL of the reaction mixture were added in a 96-well plate before the sample preparation procedure, as reactions volume were higher, and analyzed by LC-MS.

Yields approximations were determined by comparing the response factor (ratio of the integrated UV-area of pyrazole with internal standard) to a one point calibration shown below where $[\text{pyrazole}]/[\text{InternalStandard}] = 2.5$.

A solution of pyrazole **P1** (obtained from alkyne 6B) at 25 mM, pyrazole **P2** (obtained from 3B) at 25 mM, and internal standard (di-*tert*-butylbiphenyl) at 10 mM was injected in UPC².

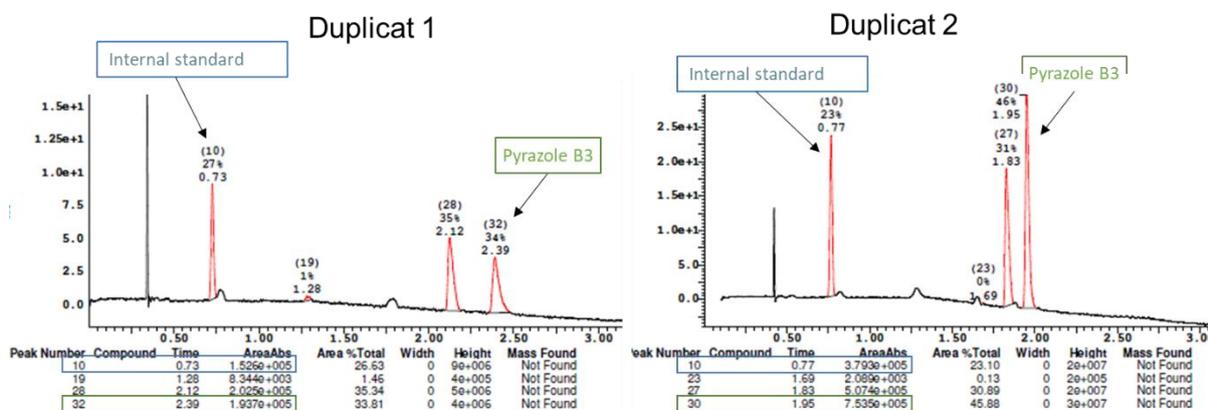


Results shows:

$$A_{\text{Arom}}/A_{\text{Aliph}} = 2.00.$$

$$A_{\text{Arom}}/A_{\text{InternalStandard}} = 3.00.$$

Example of yield determination for aromatic alkyne 3B with Sydnone **A** :



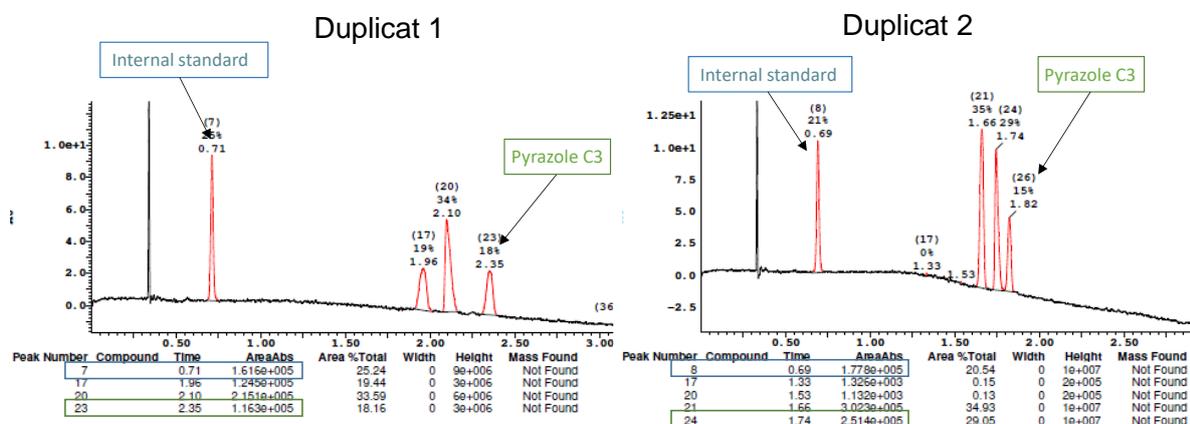
Duplicate 1: $A_{\text{Pyrazole B3}}/A_{\text{InternalStandard}} = 1.27$

Duplicate 2: $A_{\text{Pyrazole B3}}/A_{\text{InternalStandard}} = 1.99$

Average: $A_{\text{Pyrazole B3}}/A_{\text{InternalStandard}} = 1.63$

$$\text{Yield} = \frac{1.63 * 100}{3.00} = 54$$

Example of yield determination for aliphatic alkyne 3C with Sydnone-OMe



Duplicate 1 : $A_{\text{Pyrazole C3}}/A_{\text{InternalStandard}} = 0.72$

Duplicate 2 : $A_{\text{Pyrazole C3}}/A_{\text{InternalStandard}} = 0.94$

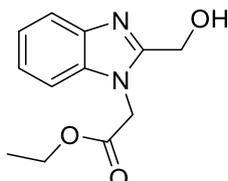
Average : $A_{\text{Pyrazole C3}}/A_{\text{InternalStandard}} = 0.73$

$$\text{Yield} = \frac{0.73 * 2.00 * 100}{3.00} = 49$$

Chapitre II : Click chemistry for the study of Myristoylome

SF2 Probe synthesis

Ethyl 2-(2-(hydroxymethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetate (II.2)



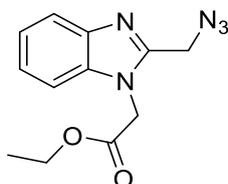
$C_{12}H_{14}N_2O_3$
MW: 234.25 g.mol⁻¹
Yield: 58%
orange solid

To a mixture of benzimidazolemethanol (0.2 g, 1.35 mmol, 1 equiv.) in ethanol (15 mL) was added Na₂CO₃ (286 mg, 2.69 mmol, 2 equiv.) and the mixture was stirred during 15 minutes. Then, ethyl-2-iodoacetate (0.288 mg, 159 μL, 1.35 mmol, 1 equiv.) in ethanol (10 mL) was added and the mixture was stirred at 80 °C overnight. The solvent was evaporated and the crude product was purified by by reversed phase on automatized Puriflash® (100% Water + 0,1% TFA to 100% MeCN + 0,1% TFA over one hour) to afford the desired product as an orange solid (185 g, 58%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.83 – 7.72 (m, 2H), 7.49 – 7.44 (m, 2H), 5.41 (s, 2H), 4.92 (s, 2H), 4.19 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). OH not observed.

According to E. M. Essassi, J. Fifani, I. Hamamsi, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1994**, 103, 83–84.

Ethyl 2-(2-(azidomethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetate (II.2a)



$C_{12}H_{13}N_5O_2$
MW: 259.27 g.mol⁻¹
Yield: 53%
White off solid

To a solution of ethyl 2-(2-(hydroxymethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetate **II.2** (185 mg, 0.789 mmol, 1 equiv.) in DMF (4 mL) was added triethylamine (109 μL, 0.789 mmol, 1 equiv.) and MsCl (61 μL, 0.789 mmol, 1 equiv.). The mixture was stirred 3 h at room temperature. Then, NaN₃ (154 mg, 2.37 mmol, 3 equiv.) was added and the solution was stirred overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Hept/AcOEt, 5/5 to 0/100) to afford the desired product as a white off solid (75 mg, 37%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.75 – 7.72 (m, 1H), 7.29 – 7.20 (m, 3H), 4.85 (s, 2H), 4.56 (s, 2H), 4.17 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

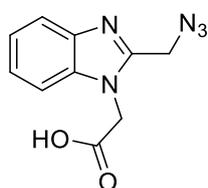
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 167.2, 148.5, 142.1, 135.7, 123.8, 122.8, 120.3, 109.2, 62.2, 47.3, 45.2, 14.0.

LCMS (ESI), m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 260.08.

IR (cm^{-1}) 3457, 3049, 3002, 2984, 2939, 1732, 1467, 1439, 1414, 1321, 1267, 1215, 1030, 862.

Mp. 100-102 °C.

2-(2-(azidomethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetic acid (II.3)



$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_5\text{O}_2$
MW: 231.21 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Yield: 53%
White solid

To a solution of ethyl 2-(2-(azidomethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetate **II.2.a** (75 mg, 0.288 mmol, 1 equiv.) in a mixture THF/ H_2O (1 mL : 0.2 mL) was added LiOH (13.6 mg, 0.576 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred 1 hour at room temperature. The mixture was diluted with H_2O and acidified with HCl (1M) until pH = 2. Then AcOEt was added and the organic layer was extracted, dried over MgSO_4 and the solvent was removed under reduced pressure to afford the product as a white solid without further purification (35 mg, 53%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 7.71 – 7.67 (m, 1H), 7.53 – 7.49 (m, 1H), 7.35 (pd, $J = 7.2, 1.3$ Hz, 2H), 5.11 (s, 2H), 4.73 (s, 2H), COOH unobserved.

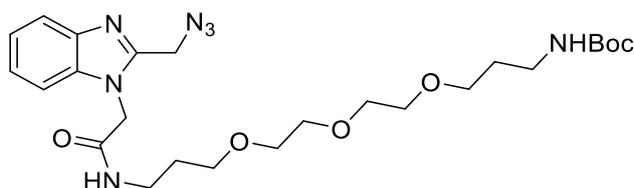
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, MeOD) δ 170.8, 150.9, 141.4, 136.7, 125.2, 124.4, 119.5, 111.4, 47.4, 46.1.

LCMS (ESI), m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 232.88.

IR (cm^{-1}) 3384, 2980, 2835, 2483, 2132, 1657, 1601, 1528, 1486, 1453, 1336, 1295, 1235, 1159, 1141, 1006, 958, 910.

Mp. 168–170 °C.

tert-butyl (1-(2-(azidomethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azahexadecan-16-yl)carbamate (II.4)



$\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}_6$
MW: 533.6 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Yield: 51%
yellow oil

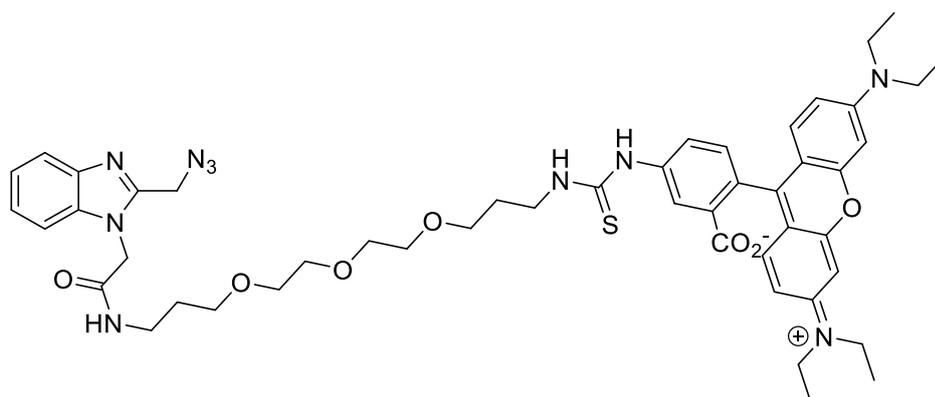
To a solution of 2-(2-(azidomethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetic acid **II.3** (35 mg, 0.151 mmol, 1 equiv.) in a mixture THF/DMF (1 mL : 0.5 mL) was added NHS (17 mg, 0.151 mmol, 1 equiv.) and DCC (31 mg, 0.151, 1 equiv.). The mixture was stirred 30 minutes at room temperature. tert-butyl (3-(2-(2-(3-aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)carbamate (48 mg, 0.151 mmol, 1 equiv.) was added and the mixture was stirred 1h30. The mixture was evaporated and purified by chromatographic column (SiO₂, DCM/MeOH 95/5) to give de desired product (41 mg, 51%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.80 – 7.76 (m, 1H), 7.37 – 7.29 (m, 3H), 4.84 (s, 2H), 4.70 (s, 2H), 3.56 – 3.36 (m, 12H), 3.16 (dd, *J* = 12.6, 6.4 Hz, 2H), 1.74 – 1.65 (m, 6H), 1.43 (s, 9H). NH not observed

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 166.0, 156.2, 148.9, 142.4, 135.7, 124.1, 123.1, 120.6, 109.7, 79.1, 70.5 (2C), 70.5, 70.2, 70.0, 69.5, 47.4, 47.2, 38.9, 38.5, 29.8, 28.6, 28.6 (3C).

LCMS (ESI), *m/z* [M+H]⁺ 535.2.

5-(3-(1-(2-(azidomethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azahexadecan-16-yl)thioureido)-2-(6-(diethylamino)-3-(diethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)benzoate (SF2)



C₄₉H₆₀N₁₀O₇S
 MW: 933.1 g.mol⁻¹
 Pink oil

To a solution of tert-butyl (1-(2-(azidomethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azahexadecan-16-yl)carbamate **II.4** (20 mg, 0.037 mmol, 1 equiv.) in DCM (400 μL) was added TFA (57.5 μL, 1.50 mmol, 40 equiv.) and the mixture was stirred during 1 hour. The mixture was evaporated to remove volatils. Crude mixture was dissolved in DCM (400 μL) and TAMRA-NCS (20 mg, 0.037 mmol, 1 equiv.) was added followed by few drops of DIPEA. The mixture was stirred 1 hour and evaporated. Purification by HPLC preparative to give a pink oil as desired product.

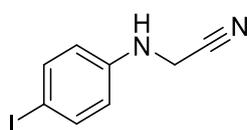
¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.44 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.66 (dt, *J* = 6.6, 2.6 Hz, 1H), 7.44 (dd, *J* = 6.2, 2.6 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 9.5 Hz, 2H), 7.29 (ddd, *J* = 11.3, 5.0, 3.5 Hz, 2H), 7.21 (d, *J*

= 8.2 Hz, 1H), 6.97 – 6.91 (m, 2H), 6.89 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 4.97 (s, 2H), 4.70 (s, 2H), 3.67 – 3.59 (m, 14H), 3.58 – 3.48 (m, 4H), 1.95 – 1.88 (m, 2H), 1.77 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 12H). 4 x CH₂ hidden by MeOD peak

¹³C NMR not obtained after degradation of compound **SF2**

Cleavable linker synthesis

2-((4-iodophenyl)amino)acetonitrile (**II-22a**)



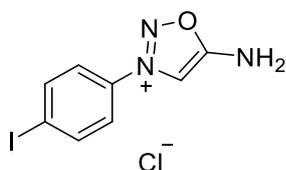
C₈H₇IN₂
MW: 258.06 g.mol⁻¹
Yield: 80%
Yellow powder

To a suspension of 4-iodoaniline (10 g, 46 mmol, 1 equiv.) in acetonitrile (115 mL), potassium carbonate (7.6 g, 55 mmol, 1 equiv.) and sodium iodide (6.8 g, 46 mmol, 1 equiv.) were added. Chloroacetonitrile (5.8 mL, 91 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred and was refluxed for 65 hours, under argon atmosphere. The dark mixture was allowed to cool down at room temperature and was filtered on a pad of celite (rinsing with ethyl acetate). The filtrate was washed with brine. The combined organic layers were dried over MgSO₄ before concentration under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (SiO₂, from 8/2 to 7/3 cyclohexane / ethyl acetate) to afford the desired product as a yellow powder (9.49 g, 80%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.56 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.52 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.11 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H).

Data in agreement with literature: S. Bernard, D. Audisio, M. Riomet, S. Bregant, A. Sallustrau, L. Plougastel, E. Decuypere, S. Gabillet, R. A. Kumar, J. Elyian, M. Nguyet Trinh, O. Koniev, A. Wagner, S. Kolodych, F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 15612–15616.

5-amino-3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride (**II-22**)



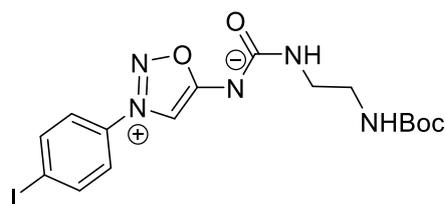
C₈H₇ClIN₃O
MW: 323.52 g.mol⁻¹
Yield: 87%
Beige solid

To a solution of 2-((4-iodophenyl)amino)acetonitrile **II-22a** (500 mg, 1.93 mmol, 1 equiv.) in dry THF (5 mL) were added ^tBuONO (0.688 mL, 5.79 mmol, 3 equiv.) and the mixture was stirred for 3 hours (until TLC showed the fully consumption of starting material) at room temperature. Then the solvent was removed under reduced pressure and the 1,4-dioxane (2 mL) was added following by HCl (4M in 1,4-dioxane) (3.1 mL) and the mixture was stirred overnight at room temperature. The solid was filtrated and washed with Et₂O. The product was dried under reduced pressure to afford the desired product as a beige solid (543 mg, 87%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 9.96 (s, 2H), 8.67 (s, 1H), 8.16 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.83 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H).

Data in agreement with literature: S. Bernard, D. Audisio, M. Riomet, S. Bregant, A. Sallustrau, L. Plougastel, E. Decuypere, S. Gabillet, R. A. Kumar, J. Elyian, M. Nguyet Trinh, O. Koniev, A. Wagner, S. Kolodych, F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 15612–15616.

((2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)(3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (II-24)



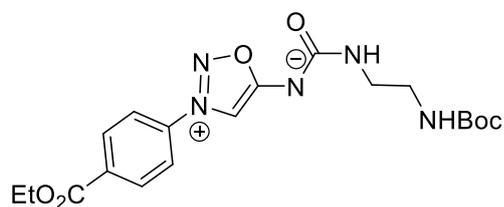
C₁₆H₂₀IN₅O₄
MW: 473.3 g.mol⁻¹
Yield: 50%
 Orange solid

To a solution of triphosgene (339 mg, 1.14 mmol, 0.33 equiv.), *tert*-butyl (2-aminoethyl)carbamate (556 mg, 3.47 mmol, 1 equiv.) in DCM (9 mL) was slowly added a solution of NaHCO₃ (875 mg, 10.4 mmol, 3 equiv.) in H₂O (14 mL). The mixture was stirred at 0 °C for 30 minutes. Then a solution of 5-amino-3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride **II-22** (1 g, 3.47 mmol, 1 equiv.) in 20 mL of DCM was added and the solution was stirred at room temperature for 3h30 hours. The reaction was quenched with brine (20 mL), and the DCM was evaporated under reduced pressure. The crude mixture is triturated in ether and filtered to give the desire product without further purification (820 mg, 50%)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 8.37 (s, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.81 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.95 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 6.78 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H), 3.09-3.06 (m, 2H), 3.01-2.98 (m, 2H), 1.37 (s, 9H).

Data in agreement with literature: S. Bernard, D. Audisio, M. Riomet, S. Bregant, A. Sallustrau, L. Plougastel, E. Decuypere, S. Gabillet, R. A. Kumar, J. Elyian, M. Nguyet Trinh, O. Koniev, A. Wagner, S. Kolodych, F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 15612–15616.

((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)(3-(4-(ethoxycarbonyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (II-21)



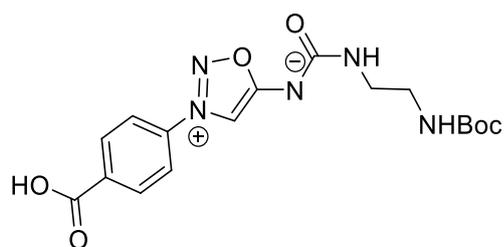
$C_{19}H_{25}N_5O_6$
MW: 419.44 g.mol⁻¹
Yield: 97%
Yellow solid

$PdCl_2(PPh_3)_2$ (14.8 mg, 0.021 mmol, 10 mol%) and ((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)(3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide **II-24** (100 mg, 0.21 mmol, 1 equiv.) were charged in a schlenk tube under argon and dissolved in a mixture of absolute ethanol (4 mL) and thiethylamine (4 mL). A balloon of CO was bubbled in the mixture and changed every 30 minutes during 2h30 hours at 50 °C. The solvent of the the dark brown solution was evaporated. The crude product was purified by flash column chromatography to avoid degradation (SiO_2 , 100% DCM to remove impurities then 100% AcOEt to give the product) to afford the desired product as a yellow solid (85 mg, 97%).

¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.33 – 8.29 (m, 2H), 8.22 (s, 1H), 7.89 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 5.64 (t, $J = 4.7$ 1H), 5.02 (t, $J = 4.4$ Hz, 1H), 4.45 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.39 (q, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.29 (q, $J = 5.3$ Hz, 2H), 1.44 (s, 12H).

Data in agreement with literature: S. Bernard, D. Audisio, M. Riomet, S. Bregant, A. Sallustrau, L. Plougastel, E. Decuypere, S. Gabillet, R. A. Kumar, J. Elyian, M. Nguyet Trinh, O. Koniev, A. Wagner, S. Kolodych, F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 15612–15616.

((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)(3-(4-carboxyphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (II-25)



$C_{17}H_{21}N_5O_6$
MW: 419.44 g.mol⁻¹
Yield: 97%
Yellow solid

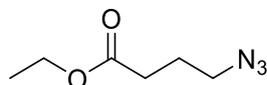
To a solution of ((2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)(3-(4-(ethoxycarbonyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide **II-21** (125 mg, 0.298 mmol, 1 equiv.) in a mixture THF/EtOH (2 mL : 2 mL) was added a solution of NaOH (47 mg, 1.192 mmol, 4 equiv.) in H₂O (2 mL). The mixture was stirred 15 min at room temperature. The mixture was diluted with H₂O and AcOEt and the aqueous layer was extracted and acidified with HCl (1M) until pH = 2. Then AcOEt was added and the organic layer was extracted, dried over MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure to afford the product as a yellow solid without further purification (106 mg, 92%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.33 (s, 1H), 8.28 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 8.00 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.30 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.21 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 1.45 (s, 9H).

Data in agreement with literature: S. Bernard, D. Audisio, M. Riomet, S. Bregant, A. Sallustrau, L. Plougastel, E. Decuypere, S. Gabillet, R. A. Kumar, J. Elyian, M. Nguyet Trinh, O. Koniev, A. Wagner, S. Kolodych, F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 15612–15616.

I-S1 probe synthesis

ethyl 4-azidobutanoate (II-16)



C₆H₁₁N₃O₂
MW: 157.2 g.mol⁻¹
Yield: 69%
Colorless oil

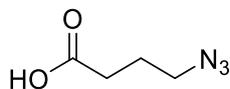
To a solution of ethylbromobutanoate (100 mg, 0.51 mmol, 1 equiv.) in DMSO (0.5 mL) was added NaN₃ (50 mg, 0.77 mmol, 1.5 equiv.). The mixture was stirred overnight at 45 °C. Then, water was added slowly followed the product was extracted with ether. Organic layers were evaporated to give the desired compound (55 mg, 69%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.14 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.35 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.40 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.90 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.8, 60.7, 50.8, 31.3, 24.4, 14.3.

Data in agreement with literature Sallustrau *et al.* *Chem. Commun.*, **2017**, *53*, 7890-7893

4-azidobutanoic acid (II-17)



$C_4H_7N_3O_2$
MW: 129.1 g.mol⁻¹
Yield: 88%
Colorless oil

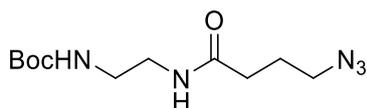
To a solution of ethyl 4-azidobutanoate **II-16** (40 mg, 0.25 mmol, 1 equiv.) in ethanol (1.5 mL) was added a solution of NaOH (20 mg, 0.51 mmol, 2 equiv.) in water (1.5 mL). The mixture was stirred overnight and ethanol was evaporated. aqueous layer was washed with diethyl ether and acidified with HCl 1M to pH = 1. The compound was extracted with diethyl ether to give the desired product without further purification (28 mg, 88%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.38 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.47 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.91 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H). COOH signal not observable.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 179.3, 50.6, 31.0, 24.0.

According to DeForest *et al. Nature Chemistry*, **2011**, 3, 925–931.

tert-butyl (2-(4-azidobutanamido)ethyl)carbamate (A1)



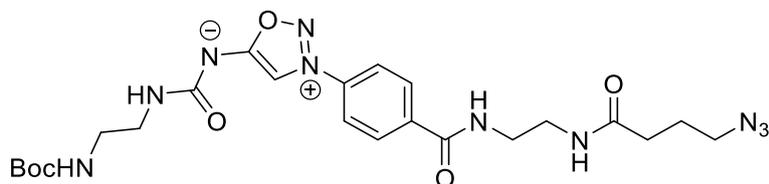
$C_{11}H_{21}N_5O_3$
MW: 271.3 g.mol⁻¹
Yield: 70%
Yellowish oil

To a solution of 4-azidobutanoic acid **II-17** (70 mg, 0.542 mmol, 1 equiv.) in a mixture DMF/THF (0.5/1 mL) was added NHS (62.4 mg, 0.542 mmol, 1 equiv.) and DCC (111 mg, 0.542, 1 equiv.). The mixture was stirred 1 hour. *tert*-butyl (2-aminoethyl)carbamate (87 mg, .542, 1 equiv.) was added and the mixture was stirred overnight. The solvent was evaporated and the mixture was purified by chromatographic column (SiO₂, Heptane/AcOEt 3/7 to 0/10) to give the desired product (100 mg, 88%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.58 (s, 1H), 5.12 (s, 1H), 3.37 – 3.29 (m, 4H), 3.24 (t, 5.4 Hz, 2H), 2.26 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.89 (p, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.41 (s, 9H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 172.5, 156.9, 80.1, 51.0, 41.1, 40.3, 33.3, 28.5 (3C), 24.9.

(3-(4-((2-(4-azidobutanamido)ethyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)amide (II-26A1)



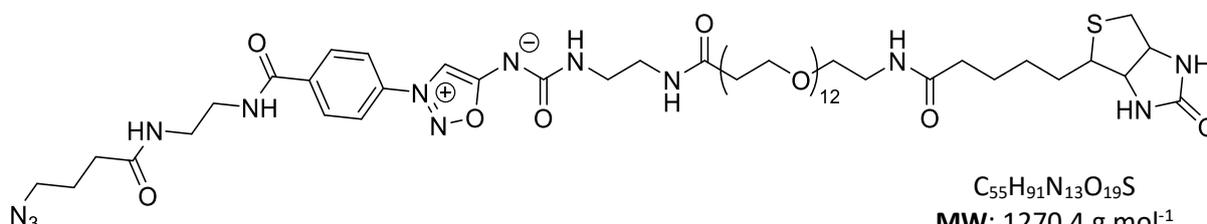
$\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_{10}\text{O}_6$
MW: 544.6 g.mol $^{-1}$
Yield: 52%
Yellowish oil

To a solution of tert-butyl (2-(4-azidobutanamido)ethyl)carbamate **A1** (20 mg, 0.078 mmol, 1 equiv.) in DCM (1 mL) was added TFA (168 mg, 113 μL , 20 equiv.) and the mixture was stirred 1 hour. Volatils were removed and the crude mixture was redissolved in DMF (2 mL). ((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)(3-(4-carboxyphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide **II-25** (28.9, 0.078 mmol, 1 equiv.), HATU (56 mg, 0.15 mmol, 2 equiv.) and DIPEA (19 mg, 26 μL , 0.15 mmol, 2 equiv.) were added and mixture was stirred 4 hours. Purification by chromatographic column (SiO_2 , DCM/MeOH 85/15) did not lead to a pure product. Second purification by preparative HPLC gave the desired product (20.9 mg, 52%).

^1H NMR (400 MHz, DMF) δ 8.91 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.25 (s, 4H), 8.14 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.81 (s, 1H), 3.42 (m, 6H), 3.32 – 3.24 (m, 2H), 3.25 – 3.14 (m, 2H), 2.28 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.85 (p, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.41 (s, 9H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMF) δ 173.4, 173.1, 166.2, 157.2, 139.6, 137.0, 130.2 (2C), 123.3 (2C), 103.5, 78.7, 55.8 (3C), 51.7, 41.9, 41.3, 40.9, 39.6, 33.5, 28.9, 25.8.

(3-(4-((2-(4-azidobutanamido)ethyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((4,4-dioxo-4,8-(2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-dodecaoxa-3,43-diazaoctatetracontyl)carbamoyl)amide (II-S1)



$C_{55}H_{91}N_{13}O_{19}S$
MW: 1270.4 $g \cdot mol^{-1}$
Yield: 27%
 Yellow oil

To a solution of (3-(4-((2-(4-azidobutanamido)ethyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)amide **II-26A1** (16 mg, 29 μmol , 1 equiv.) in DCM (2 mL) was added TFA (1.2 mmol, 90 μL , 40 equiv.). The mixture was stirred 3 hours then evaporated. Crude mixture was redissolved in DMF (1 mL) and Biotin-PEG₁₂-NHS (24.7 mg, 26 μmol , 0.9 equiv.) was added followed by triethylamine (18 mg, 24 μL , 0.74 mmol, 6 equiv.). The mixture was stirred 3 hours at room temperature and evaporated. Crude mixture was purified by preparative HPLC to give the desired product (10 mg, 27%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.33 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.16 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.91 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.25 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.84 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 6.16 (s, 1H), 5.69 (s, 1H), 4.55 – 4.50 (m, 1H), 4.35 – 4.30 (m, 1H), 3.72 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.63 (m, $J = 4.2, 1.9$ Hz, 46H), 3.57 – 3.50 (m, 4H), 3.40 (m, 6H), 3.32 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.15 (dd, $J = 11.8, 7.2$ Hz, 1H), 2.91 (dd, $J = 12.8, 4.9$ Hz, 1H), 2.75 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 2.47 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.31 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.19 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.94 – 1.84 (quint, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.78 – 1.56 (m, 4H), 1.46 – 1.39 (m, 2H).

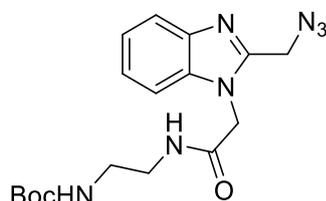
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 173.8, 173.5, 172.2, 138.5, 135.8, 129.7 (2C), 121.8 (2C), 70.6 (19C), 70.4, 70.3, 70.2, 70.0, 67.4, 62.0, 62.0, 60.3, 55.7, 51.0, 40.7, 40.2, 39.8, 39.3, 35.9, 33.2, 28.5, 28.3, 28.3, 25.7, 25.0, 24.9.

3 Carbonyl peak and 2 quaternary carbon from iminosydnone are not observable.

HRMS (ESI-TOF) m/z [M+H]⁺ Calcd for $C_{55}H_{91}N_{13}O_{19}S$ 1270.6353; Found 1270.6350

▪ II-S2 probe synthesis

Tert-butyl (2-(2-(2-(azidomethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetamido)ethyl)carbamate (CA2)



C₁₇H₂₃N₇O₃
MW: 373.42 g.mol⁻¹
Yield: 68%
 White solid

To a solution of 2-(2-(azidomethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetic acid **II-3** (50 mg, 0.216 mmol, 1 equiv.) in a mixture of DMF/THF (0.5 mL : 1.5 mL) was added NHS (25 mg, 0.216 mmol, 1 equiv.) and DCC (47 mg, 0.216 mmol, 1 equiv.). After 30 minutes of stirring at room temperature, *tert*-butyl (2-aminoethyl)carbamate (35 mg, 0.216 mmol, 1 equiv.) was added and the mixture was stirred overnight at room temperature and the solvent was evaporated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH, 95/05) to afford the desired product as a white solid (54 mg, 68%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (dd, *J* = 7.5, 2.4 Hz, 1H), 7.36 – 7.31 (m, 3H), 6.68 (bs, 1H), 4.85 (s, 2H), 4.79 (bs, 1H), 4.70 (s, 2H), 3.35 (dd, *J* = 10.8, 5.3 Hz, 2H), 3.19 (dd, *J* = 11.1, 5.8 Hz, 2H), 1.37 (s, 9H).

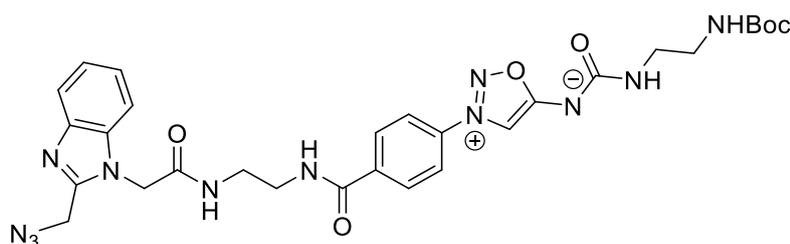
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 166.7, 148.7, 142.4, 135.6, 124.3, 123.4, 120.7, 120.1, 109.5, 80.3, 47.5, 47.4, 41.6, 40.3, 28.4 (3C).

LCMS (ESI), *m/z* [M+H]⁺ 374.

IR (cm⁻¹) 3352, 2984, 2936, 2856, 2350, 2159, 1710, 1589, 1453, 1311, 1269, 1111, 1052, 958, 910.

Mp. 170–172 °C.

(3-(4-((2-(2-(2-(azidomethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetamido)ethyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)amide (II-26CA2)



C₂₉H₃₄N₁₂O₆
MW: 646.67 g.mol⁻¹
Yield: 67%
 Yellow solid

To a solution of *tert*-butyl (2-(2-(2-(azidomethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)acetamido)ethyl)carbamate **CA2** (13 mg, 0.035 mmol, 1 equiv.) in DCM (1 mL) was added TFA (106 mL, 1.4 mmol, 40 equiv.). The mixture was stirred 2 h at room temperature and evaporated. The crude mixture was redissolved in DMF (5 mL). A solution of ((2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)(3-(4-carboxyphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide **II-25** (13.6 mg, 0.032 mmol, 1 equiv.) in DMF (0.5 mL) was added followed by HATU (19.8 mg, 0.052 mmol, 1.5 equiv.) and DIPEA (9 μ L, 0.052 mmol, 1.5 equiv.). The mixture was stirred 1 h and then evaporated. The crude product was purified by reversed phase chromatography on automatized Puriflash® (100% Water + 0,1% TFA to 100% MeCN + 0,1% TFA over one hour) to yield the desired product as a yellow solid (14 mg, 67%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.29 (s, 1H), 7.97 (s, 4H), 7.63 (dd, *J* = 6.2, 1.6 Hz, 1H), 7.39 (dd, *J* = 6.6, 2.1 Hz, 1H), 7.28 – 7.14 (m, 2H), 4.99 (s, 2H), 4.70 (s, 2H), 3.57 (m, 2H), 3.53 – 3.48 (m, 2H), 3.29 (m, 2H), 3.20 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 1.44 (s, 9H). NH unobserved.

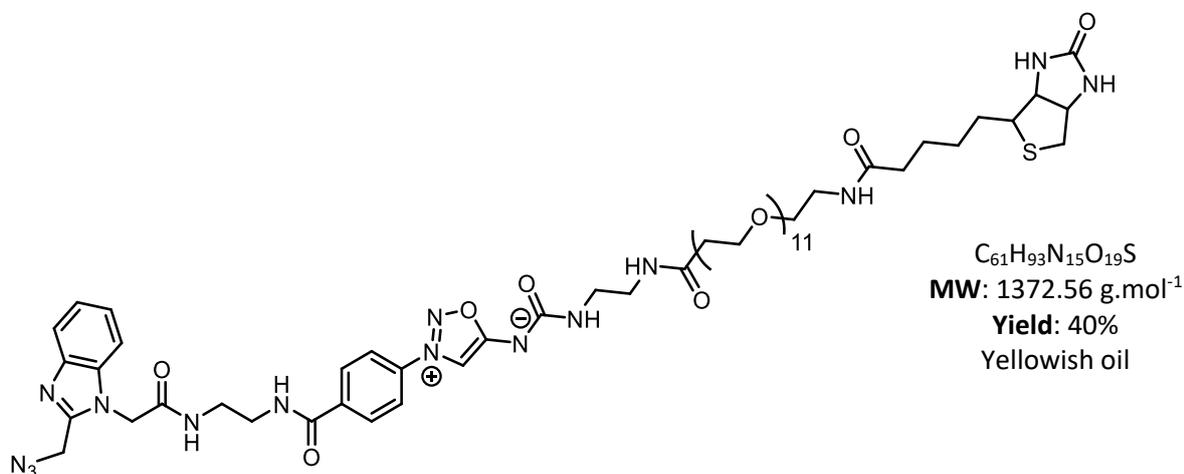
¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 174.2, 174.1, 169.4, 168.2, 158.9, 151.1, 142.4, 139.4, 137.1, 136.8, 130.4, 124.8, 123.9, 123.1, 119.9, 111.2, 104.3, 80.8, 49.8, 47.5, 47.0, 41.1, 40.9, 40.2, 28.7. In the spectra, presence of CF₃COOH due to the inverse phase purification δ 163.51 (q, *J* = 35.5 Hz), 117.91 (q, *J* = 291.9 Hz).

HRMS (ESI-TOF) *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₂₉H₃₅N₁₂O₆ 647.2803; Found 647.2805.

IR (cm⁻¹) 3084, 1984, 2836, 1699, 1687, 1633, 1511, 1093, 999.

Mp. 179–181 °C.

(3-(4-((2-(2-(2-(azidomethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)acetamido)ethyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((4,4-dioxo-48-(2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-dodecaoxa-3,43-diazaoctatetracontyl)carbamoyl)amide (II-S2)



To a solution of (3-(4-((2-(2-(2-(azidomethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetamido)ethyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)amide **II-26CA2** (22 mg, 0.034 mmol, 1 equiv.) in DCM (1 mL) was added TFA (104 μ L, 1.36 mmol, 40 equiv.). The mixture was stirred 1 h at room temperature and evaporated. The crude mixture was redissolved in DMF (0.5 mL) and a solution of Biotin-PEG₁₂-NHS (32 mg, 0.034 mmol, 1 equiv.) in DMF (0.5 mL) was added followed by Et₃N (21 mg, 29 μ L, 0.204 mmol, 6 equiv.) at 0 °C. The mixture was stirred 3 h at room temperature and then evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to afford the desired product as a yellowish oil (19 mg, 40%).

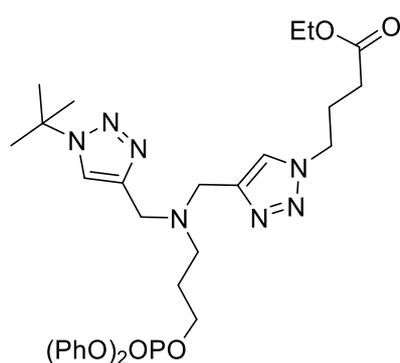
¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.47 (s, 1H), 8.03 – 7.93 (m, 4H), 7.65 (dd, J = 6.7, 1.9 Hz, 1H), 7.43 (dd, J = 6.7, 1.9 Hz, 1H), 7.30 – 7.21 (m, 2H), 5.02 (s, 2H), 4.75 (s, 2H), 4.48 (dd, J = 7.8, 4.4 Hz, 1H), 4.30 (dd, J = 7.9, 4.4 Hz, 1H), 3.73 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 3.65 – 3.59 (m, 4H), 3.55 – 3.49 (m, 4H), 3.39 – 3.33 (m, 4H), 3.23 – 3.16 (m, 1H), 2.92 (dd, J = 12.7, 5.0 Hz, 1H), 2.70 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 2.46 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.21 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.76 – 1.56 (m, 4H), 1.49 – 1.38 (m, 2H), NH unobserved.

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 176.1, 174.4, 174.3, 169.2, 168.2, 166.1, 155.5, 137.1, 136.6, 130.5 (4C), 125.2 (2C), 124.4 (2C), 123.5 (2C), 119.6, 111.4, 71.5 (20C), 71.4, 71.3, 71.3, 70.6, 68.3, 63.4, 61.6, 57.0, 47.5, 47.2, 41.1, 41.0, 40.5, 40.4, 40.4, 37.7, 36.7, 29.8, 29.5, 26.9.

HRMS (ESI-TOF) m/z [M+Na]⁺ Calcd for C₆₁H₉₃N₁₅NaO₁₉S 1394,6390; Found 1394,6394.

IR (cm⁻¹) 3299, 2869, 2409, 2103, 1687, 1633, 1455, 1094, 749.

Ethyl 4-(4-(((1-(*tert*-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)(3-((diphenoxyphosphoryl)oxy)propyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butanoate (II-14B)



C₃₁H₄₂N₇O₆P
MW: 639.69 g.mol⁻¹
Yield: 68%
 Yellowish oil

To a mixture of ethyl 4-(4-(((1-(*tert*-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)(3-hydroxypropyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butanoate **II-13** (0.2 g, 0.49 mmol, 1 equiv.) and trimethylamine (0.137 mL, 0.98 mmol, 2equiv.) in 5 mL of THF, was added diphenylchlorophosphate (1.26 mg, 0.74 mmol, 1.5 equiv.) dropwise at 0 °C under argon. After 20h, the solvent was evaporated

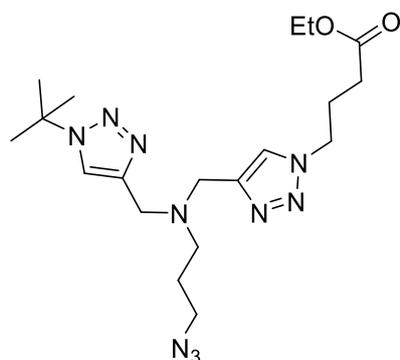
and the residue was purified by silica gel chromatography (EtOAc:MeOH 95:5) to afford the product as a yellowish oil (213 mg, 68%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.26 (t, $J = 7.8$ Hz, 4H), 7.12 (dd, $J = 16.2, 7.9$ Hz, 6H), 4.31 (dt, $J = 8.8, 4.9$ Hz, 4H), 4.05 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.66 (s, 2H), 3.63 (s, 2H), 2.54 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.25 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.19 – 2.08 (m, 2H), 1.95 (dd, $J = 12.5, 6.2$ Hz, 2H), 1.58 (s, 9H), 1.17 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

$^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ -11.79 (t, $J = 7.2$ Hz).

Data in agreement with literature: A. Sallustrau, S. Bregant, C. Chollet, D. Audisio, F. Taran, *Chem. Commun.*, **2017**, 53, 7890-7893.

Ethyl 4-(4-(((3-azidopropyl)((1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butanoate (II-14A)



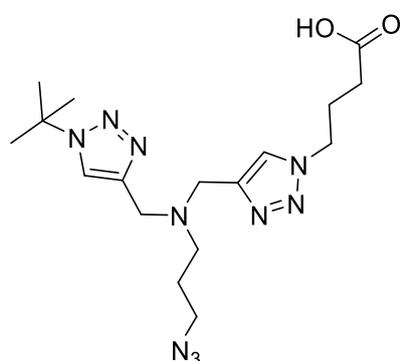
$\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_{10}\text{O}_2$
MW: 432.53 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Yield: 36%
Yellowish oil

To a solution of ethyl 4-(4-(((1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl) methyl) (3-((diphenylphosphoryl)oxy)propyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butanoate **II-14B** (213 mg, 0.332 mmol, 1 equiv.) in DMF (3 mL) was added sodium azide (65 mg, 1.0 mmol, 3 equiv.) under argon. The mixture was heated to 80 °C for 2 days under argon. The solvent was then evaporated and the residue was purified by silica gel chromatography (EtOAc:MeOH 95:5) to afford the product as a yellowish oil (51 mg, 36%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.68 (s, 1H), 7.65 (s, 1H), 4.43 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 4.14 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.75 (s, 2H), 3.72 (s, 2H), 3.36 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.57 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.34 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.29 – 2.20 (m, 2H), 1.88 (p, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.68 (s, 9H), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

Data in agreement with literature: A. Sallustrau, S. Bregant, C. Chollet, D. Audisio, F. Taran, *Chem. Commun.*, **2017**, 53, 7890-7893.

4-(4-(((3-azidopropyl)((1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butanoic acid (II.14)



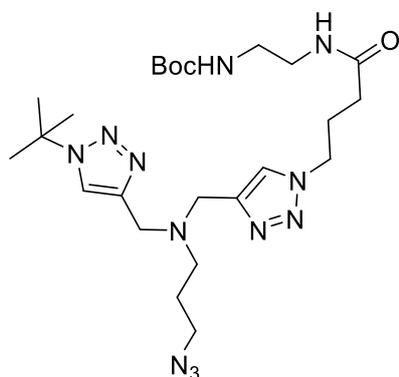
$C_{17}H_{28}N_{10}O_2$
MW: 404.46 g.mol⁻¹
Yield: 100%
Yellowish oil

To a solution of ethyl 4-(4-(((3-azidopropyl)((1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butanoate **II.14B** (51 mg, 0.118 mmol, 1 equiv.) in EtOH (0.5 mL) was added NaOH (7 mg, 0.176 mmol, 1.5 equiv.) under argon and the mixture was stirred 24 hours. The solvent was then evaporated and the residue was triturated in MeOH to precipitate the salts to afford the product as a yellowish oil (463 mg, 1.14 mmol, 99%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.05 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 4.44 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.75 (s, 2H), 3.74 (s, 2H), 3.37 – 3.33 (m, 2H), 2.52 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.18 (d, $J = 3.9$ Hz, 4H), 1.78 (p, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.68 (s, 9H). COOH not observed

Data in agreement with literature: A. Sallustrau, S. Bregant, C. Chollet, D. Audisio, F. Taran, *Chem. Commun.*, **2017**, 53, 7890-7893.

Tert-butyl (2-(4-(4-(((3-azidopropyl)((1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butanamido)ethyl)carbamate (CA3)



$C_{24}H_{42}N_{12}O_3$
MW: 546.68 g.mol⁻¹
Yield: 72%
 Yellowish oil

To a solution of 4-(4-(((3-azidopropyl)((1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butanoic acid **II-14** (48 mg, 0.118 mmol, 1 equiv.) in a mixture of DMF/THF (0.5 mL : 1 mL) was added NHS (13.6 mg, 0.118 mmol, 1 equiv.) and DCC (24.4 mg, 0.118 mmol, 1 equiv.). After 30 minutes of stirring at room temperature, *tert*-butyl (2-aminoethyl)carbamate (19 mg, 0.118 mmol, 1 equiv.) was added and the mixture was stirred overnight at room temperature and the solvent was evaporated. The crude product was purified by reverse phase column chromatography (100% H₂O to 100% ACN over 1 hour) to afford the desired product as a yellowish oil (46 mg, 72%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.36 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 4.56 – 4.51 (m, 6H), 3.50 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 3.3 – 3.2 (m, 4H), 3.14 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 2.28 – 2.11 (m, 6H), 1.71 (s, 9H), 1.42 (s, 9H). NH unobserved.

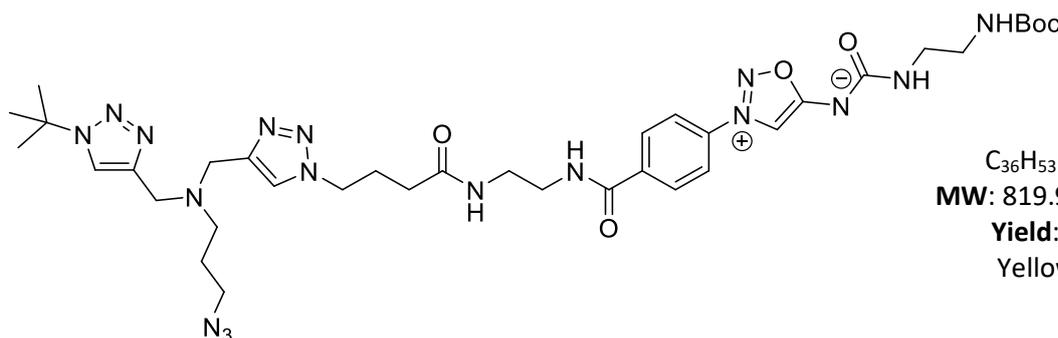
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.4, 157.0, 135.9, 135.3, 127.7, 124.5, 79.9, 60.6, 50.8, 50.3, 49.8, 48.5, 46.2, 45.8, 40.3, 32.3, 30.0 (3C), 28.4 (3C), 25.8, 23.8.

LCMS (ESI), m/z [M+H]⁺ 547.7

HRMS (ESI-TOF) m/z [M+H]⁺ Calcd for C₂₄H₄₃N₁₂O₃ 547.3581; Found 547.3584.

IR (cm⁻¹) 3299, 2869, 2409, 2103, 1687, 1633, 1455, 1094, 749.

(3-(4-((2-(4-(4-(((3-azidopropyl)((1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butanamido)ethyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl))((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)amide (II-26CA3)



$C_{36}H_{53}N_{17}O_6$
MW: 819.93 g.mol⁻¹
Yield: 29%
 Yellow oil

To a solution of *tert*-butyl (2-(4-(4-(((3-azidopropyl)((1-(*tert*-butyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)butanamido)ethyl)carbamate **CA3** (12 mg, 0.022 mmol, 1 equiv.) in DCM (1 mL) was added TFA (100 μ L, 1.31 mmol, 60 equiv.). The mixture was stirred 4 h at room temperature and evaporated. The crude mixture was redissolved in DMF (0.5 mL). A solution of ((2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)(3-(4-carboxyphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide **II-25** (8.1 mg, 0.021 mmol, 1 equiv.) in DMF (0.5 mL) was added followed by HATU (12.5 mg, 0.033 mmol, 1.5 equiv.) and DIPEA (11 μ L, 0.066 mmol, 3 equiv.). The mixture was stirred 2 h and then evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to afford the desired product as an orange oil (28 mg, 29%).

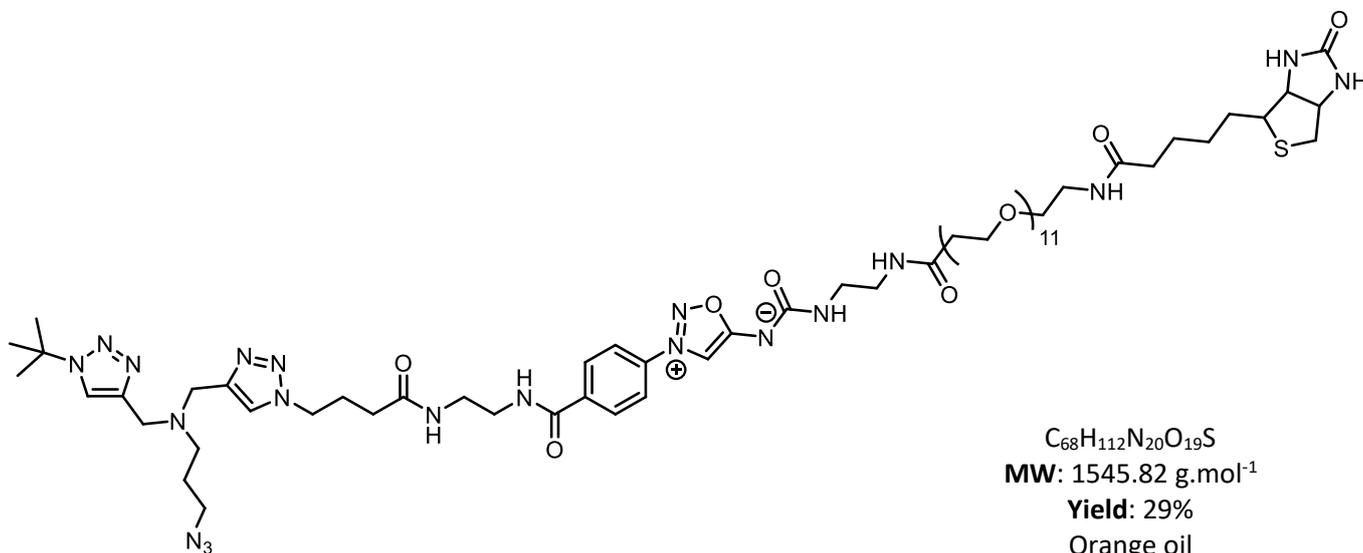
¹H NMR (400 MHz, DMF-*d*7) δ 9.11 (brs, 1H), 8.48 (brs, $J = 6.4$ Hz, 1H), 8.45 – 8.39 (m, 4H), 8.35 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.07 (brs, 1H), 6.99 (s, 1H), 4.65 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.93 (s, 2H), 3.91 (s, 2H), 3.74 – 3.67 (m, 2H), 3.65 – 3.56 (m, 4H), 3.49 – 3.44 (m, 2H), 3.40 – 3.36 (m, 2H), 2.69 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.43 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.36 (dd, $J = 13.1, 6.5$ Hz, 2H), 2.01 – 1.96 (m, 2H), 1.85 (s, 9H), 1.59 (s, 9H).

¹³C NMR (101 MHz, DMF-*d*7) δ 172.6, 172.0, 165.3, 156.3, 155.1, 144.3, 144.0, 138.8, 136.2, 129.4 (2C), 124.0, 122.5 (2C), 121.2, 102.7, 77.9, 59.1, 49.7, 49.4, 49.3, 48.2, 48.1, 41.1, 40.5, 40.1, 38.9, 32.5, 29.0 (3C), 28.1 (3C), 26.6, 26.6.

HRMS (ESI-TOF) m/z [M+H]⁺ Calcd for C₃₆H₅₄N₁₇O₆ 820,4443; Found 820,4445.

IR (cm⁻¹) 3296, 2958, 2878, 1702, 1692, 1649, 1589, 1478, 1461, 1300, 1104, 991.

(3-(4-((2-(4-(4-(((3-azidopropyl)((1-(*tert*-butyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)butanamido)ethyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((4,4-dioxo-48-(2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-dodecaoxa-3,43-diazaoctatetracontyl)carbamoyl)amide (II-S3)



To a solution of (3-(4-((2-(4-(4-(((3-azidopropyl)((1-(*tert*-butyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)butanamido)ethyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)amide **II-26CA3** (5.2 mg, 6.34 μ mol, 1 equiv.) in DCM (0.4 mL) was added TFA (19 μ L, 0.24 mmol, 40 equiv.). The mixture was stirred 3 h at room temperature and evaporated. The crude mixture was redissolved in DMF (0.2 mL) and a solution of Biotin-PEG₁₂-NHS (5.4 mg, 5.71 μ mol, 0.95 equiv.) in DMF (0.2 mL) was added followed by Et₃N (5.3 μ L, 0.038 mmol, 6 equiv.) at 0 °C. The mixture was stirred 1 h at room temperature and then evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to afford the desired product as an orange oil (2.9 mg, 25%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.32 (s, 1H), 8.15 – 8.07 (m, 4H), 8.03 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 4.49 (dd, J = 7.7, 4.5 Hz, 1H), 4.42 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 4.31 (dd, J = 7.9, 4.4 Hz, 1H), 3.75 (s, 2H), 3.73 (s, 2H), 3.65 – 3.60 (m, 48H), 3.56 – 3.50 (m, 4H), 3.46 – 3.40 (m, 2H), 3.39 – 3.32 (m, 8H), 3.23 – 3.18 (m, 1H), 3.00 – 2.86 (m, 1H), 2.71 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 2.52 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.46 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.27 – 2.15 (m, 6H), 1.82 – 1.74 (m, 2H), 1.67 (s, 9H), 1.65 – 1.58 (m, 2H), 1.50 – 1.40 (m, 2H), NH unobserved.

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 176.1, 175.0, 174.3, 168.2, 166.1, 166.1, 163.5, 145.5, 144.8, 139.9,

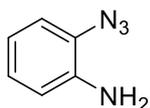
137.4, 130.5 (2C), 125.4, 123.4 (2C), 122.6, 104.1, 71.5 (22C), 71.4, 71.3, 71.3, 70.6, 68.3, 63.4, 61.6, 60.9, 57.0, 51.0, 50.6, 50.2, 41.1, 40.9, 40.6, 40.4, 40.0, 37.7, 36.7, 33.5, 30.1 (3C), 29.8, 29.5, 27.5, 27.2, 26.9.

HRMS (ESI-TOF) m/z [M+Na]⁺ Calcd for C₆₈H₁₁₂N₂₀NaO₁₉S 1567.8022; Found 1567.8031.

IR (cm⁻¹) 3301, 2925, 2871, 2096, 1692, 1689, 1589, 1505, 1461, 1288, 1102, 990.

Chapter 3 : Synthesis of indazolo[2,3-a]quinoxalines synthesis from tricyclic sydnone

2-azidoaniline (III-16)



$C_6H_6N_4$
MW: 134.14 g.mol⁻¹
Yield: 44%
Brown powder

To a solution of aniline (5.5 mL, 60 mmol, 1 equiv.) in ACN (20 mL) was added CuBr (861 mg, 6.0 mmol, 0.1 equiv.) followed by TMSN₃ (16.0 mL, 120.0 mmol, 2 equiv.) and TBHP (21.8 mL, 120.0 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred under argon atmosphere at room temperature for 3 hours. The reaction mixture was filtered over celite and evaporated under reduced pressure. The crude was purified by column of silica gel using CyHex/EtOAc (95:05) as eluent to afford the desired product as a brown powder (3.54 g, 26.4 mmol, 44%).

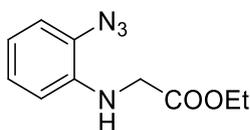
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.04 (dd, *J* = 7.9, 1.3 Hz, 1H), 6.96 (td, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H), 6.80 (td, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H), 6.71 (dd, *J* = 7.9, 1.2 Hz, 1H), 3.86 (br. s, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 138.1, 125.7, 125.4, 119.3, 118.5, 116.0.

IR (cm⁻¹) 3385, 3186, 2119, 1588, 1495, 1289, 1258, 1153, 740, 702, 648, 552.

LCMS (ESI) *m/z* C₆H₆N₄ [(M-N₂)+H]⁺ 106.9.

Ethyl 2-((2-azidophenyl)amino)acetate (III-17a)



$C_{10}H_{12}N_4O_2$
MW: 220.23 g.mol⁻¹
Yield: 80%
Orange oil

To a solution of 2-azidoaniline **5** (3.54 g, 26.4 mmol, 1 equiv.) in ACN (60 mL) was added NaHCO₃ (2.44 g, 29.0 mmol, 1.1 equiv.) followed by NaI (4.35 g, 29.0 mmol, 1.1 equiv.) and ethyl 2-bromoacetate (5.9 mL, 52.8 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred under an argon atmosphere at 50 °C for 2 days. The solvent was evaporated under reduced pressure to give the crude product. Purification by column of silica gel using CyHex/EtOAc (95:05) as eluent afforded the desired product as an orange oil (4.67 g, 21.2 mmol, 80 %).

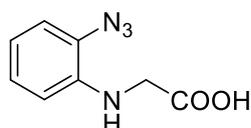
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.08 – 7.01 (m, 2H), 6.79 (td, *J* = 7.6, 1.3 Hz, 1H), 6.50 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 4.67 (br. s, 1H), 4.26 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.91 (s, 2H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.8, 138.8, 125.9, 125.4, 118.3, 118.2, 111.1, 61.5, 45.6, 14.3.

IR (cm⁻¹): 3407, 2982, 2122, 1741, 1602, 1519, 1289, 1208, 1153, 738.

LCMS (ESI) *m/z* C₁₀H₁₂N₄O₂ [M+H]⁺ 221.3.

2-((2-azidophenyl)amino)acetic acid (III-17)



C₈H₈N₄O₂
MW: 192.18 g.mol⁻¹
Yield: 99%
Yellow powder

To a solution of ethyl 2-((2-azidophenyl)amino)acetate (4.67 g, 21.2 mmol, 1 equiv.) in EtOH (100 mL) was added a solution of NaOH (1.27 g, 31.8 mmol, 1.5 equiv.) in EtOH/H₂O (05/35 mL). The mixture was stirred for one hour at room temperature. The aqueous phase was acidified to pH 1-3 and washed with 3 x 50 mL of EtOAc. The organic phase was then washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and evaporated to afford the crude product, as a yellow powder, which can be used without further purifications (4.1 g, 21.2 mmol, 99%).

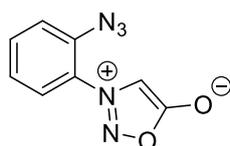
¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.06 (dd, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H), 7.01 (td, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 6.75 (td, *J* = 7.6, 1.3 Hz, 1H), 6.54 (dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 3.90 (s, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 174.5, 140.7, 126.9, 126.2, 118.9, 118.8, 112.1, 45.7.

IR (cm⁻¹): 3418, 2122, 1708, 1599, 1505, 1434, 1286, 1155, 741.

LCMS (ESI) *m/z* C₈H₈N₄O₂ [M+H]⁺ 193.2.

3-((2-azidophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olate (III-15)



C₈H₅N₅O₂
MW: 203.16 g.mol⁻¹
Yield: 68%
Beige powder

To a solution of 2-((2-azidophenyl)amino)acetic acid **6** (4.1 g, 21.2 mmol, 1 equiv.) in dry THF (100 mL) was added *t*-BuONO (2.77 mL, 23.3 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was stirred under argon atmosphere

at room temperature for 30 minutes. TFAA (3.25 mL, 23.3 mmol, 1.1 equiv.) was then added and the resulting mixture was stirred for an additional 30 minutes. EtOAc was added and the reaction was quenched using NaHCO₃. Aqueous layer was acidified to pH 1-3 and was then washed with 3 x 50 mL EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude was purified using a column of silica gel with Heptane/EtOAc (50:50) as eluent to afford the desired product as a white powder (2.92 g, 14.4 mmol, 68%).

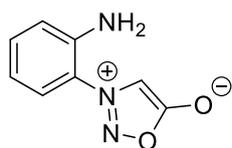
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.69 (ddd, *J* = 8.2, 7.6, 1.5 Hz, 1H), 7.62 (dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 1H), 7.42 (dd, *J* = 8.2, 1.0 Hz, 1H), 7.36 (dd, *J* = 7.6, 1.5 Hz, 1H), 6.69 (s, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168.8, 135.0, 133.5, 126.5, 125.8, 125.5, 120.1, 98.2.

IR (cm⁻¹): 3130, 2123, 1732, 1503, 1470, 1295, 1232, 943, 847, 768.

LCMS (ESI) *m/z* C₈H₅N₅O₂ [M+H]⁺ 204.2.

3-(2-aminophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olate (III-14)



C₈H₇N₃O₂
MW: 177.16 g.mol⁻¹
Yield: 72%
Yellow powder

To a solution of 3-(2-azidophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olate **1a** (100 mg, 0.492 mmol, 1 equiv.) in a mixture of THF/H₂O (2.1/0.9 mL) was added PPh₃ (258 mg, 0.984 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred during 3 hours at room temperature. After completion, the reaction was quenched by addition of water and extracted with CHCl₃. The organic layers were washed with water, dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude mixture was purified by chromatographic column using DCM/AcOEt (95/05) to give a yellowish powder (63 mg, 0.309 mmol, 72 %)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.39 – 7.29 (m, 2H), 6.94 – 6.85 (m, 2H), 6.59 (s, 1H), 4.52 (s, 2H).

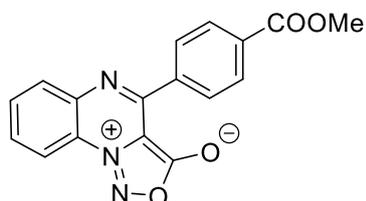
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168.9, 140.6, 133.0, 124.6, 120.4, 118.8, 118.4, 95.9.

IR (cm⁻¹): 3340, 1737, 1631, 1611, 1502, 1437, 1302, 1293, 1159, 1117, 933

LCMS (ESI) *m/z* C₈H₇N₃O₂ [M+H]⁺ 178.1.

Synthesis and analytical data of sydnone

4-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)-[1,2,3]oxadiazolo[3,4-a]quinoxalin-10-ium-3-olate (III-19a)



$C_{17}H_{11}N_3O_4$
MW: 321.29 g.mol⁻¹
Yield: 81%
White powder

To a solution of 3-(2-azidophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olate **1a** (20 mg, 0.10 mmol, 1 equiv.) in dry ACN (0.5 mL) were added PPh(Me)₂ (17 μL, 0.119 mmol, 1.2 equiv.) and the methyl 4-formylbenzoate (49.3 mg, 0.3 mmol, 3 equiv.). After 6 hours, AcOH (0.02 mL) and CuOTf₂ (72.3 mg, 0.2 mmol, 2 equiv.) were added and the reaction mixture was stirred for one additional hour. After evaporation, the crude product was triturated in MeOH, then isolated by centrifugation to afford the clean product as a white powder (24.1 mg, 0.075 mmol, 75%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.45 (dd, *J* = 8.4, 1.0 Hz, 1H), 8.18 (dd, *J* = 8.3, 0.9 Hz, 1H), 8.16 – 8.10 (m, 4H), 8.04 (ddd, *J* = 8.4, 7.3, 1.3 Hz, 1H), 7.89 (ddd, *J* = 8.5, 7.3, 1.3 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H).

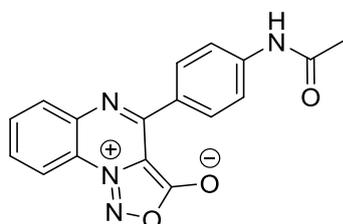
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 165.8, 162.9, 153.0, 140.3, 138.0, 133.5, 131.4, 130.2, 123.0, 129.8 (2C), 128.9 (2C), 121.6, 115.8, 103.1, 52.4.

IR (cm⁻¹): 1770, 1759, 1723, 1577, 1497, 1436, 1302, 1121, 1107, 964, 883, 764, 707, 730.

LCMS (ESI) *m/z* C₁₇H₁₁N₃O₄ [M+H]⁺ 322.3.

HRMS (ESI) calculated for C₁₇H₁₁N₃O₄ [M+H]⁺, 322.0828, found 322.0831

4-(4-(acetamidophenyl)-[1,2,3]oxadiazolo[3,4-a]quinoxalin-10-ium-3-olate (III-19b)



$C_{17}H_{12}N_4O_3$
MW: 320.31 g.mol⁻¹
Yield: 38%
Orange powder

To 3-(2-azidophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olate **1a** (50 mg, 0.246 mmol, 1.0 equiv.) in dry ACN (1.5 mL) were added PPh(Me)₂ (36 μL, 0.25 mmol, 1 equiv.) and the *N*-(4-formylphenyl)acetamide (61.2 mg, 0.375 mmol, 1.5 equiv.). After 3 hours, CuOTf₂ (136 mg, 0.375 mmol, 1.5 equiv.) was added and

the reaction mixture was stirred for an additional 12 hours. After evaporation, the crude product was triturated in MeOH, then isolated by centrifugation to afford the clean product as an orange powder. (29 mg, 0.093 mmol, 38%)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 10.25 (s, 1H), 8.40 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.12 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.00 (m, 3H), 7.85 – 7.80 (m, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 2.11 (s, 3H).

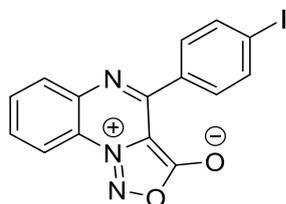
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ 169.2, 163.6, 153.8, 142.3, 140.9, 133.8, 130.7 (2C), 130.1, 129.8, 128.7, 121.8, 118.5 (2C), 116.1, 103.1, 24.6.

IR (cm⁻¹): 3368, 1753, 1709, 1597, 1530, 964, 841, 760.

LCMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ 321.7.

HRMS (ESI) calculated for C₁₇H₁₂N₄O₃ [M+H]⁺, 321,0988, found 321,0992.

4-(4-iodophenyl)-[1,2,3]oxadiazolo[3,4-*a*]quinoxalin-10-ium-3-olate (III-19c)



C₁₅H₈IN₃O₂
MW: 389.15 g.mol⁻¹
Yield: 55%
Yellow solid

To a solution of 3-(2-azidophenyl)-1,2,3-oxadiazolo-3-ium-5-olate **1a** (50 mg, 0.25 mmol, 1 equiv.) in dry ACN (1.5 mL) were added PPh(Me)₂ (36 μL, 0.25 mmol, 1 equiv.) and 4-iodobenzaldehyde (87 mg, 0.375 mmol, 1.5 equiv.). After 3 hours, CuOTf₂ (136 mg, 0.375 mmol, 1.5 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred for an additional 12 hours. After evaporation, the crude product was triturated in MeOH, then isolated by centrifugation to afford the clean product as a yellow powder (53.5 mg, 0.137 mmol, 55 %)

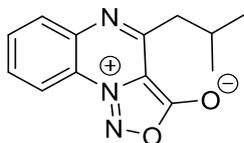
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.43 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.02 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.87 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ 163.0, 153.1, 140.3, 137.1(2C), 133.5, 133.3, 131.2 (2C), 129.9, 129.8, 125.9, 121.5, 115.7, 98.7.

IR (cm⁻¹): 1755, 1576, 1497, 960, 820, 764, 732.

LCMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ 390.6

HRMS (ESI) calculated for C₁₅H₈IN₃O₂ [M+H]⁺, 389,9740, found 389,9742

4-isobutyl-[1,2,3]oxadiazolo[3,4-a]quinoxalin-10-ium-3-olate (III-19d)

$C_{13}H_{13}N_3O_2$
MW: 243.27 g.mol⁻¹
Yield: 41%
White solid

3-(2-azidophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olate **1a** (20 mg, 0.1 mmol, 1.0 equiv.) and 3-methylbutanal (0.016 mL, 0.2 mmol, 2.0 equiv.) were dissolved in dry acetonitrile (0.5 mL) and stirred during 5 minutes. Dimethylphenylphosphine (0.017 mL, 0.119 mmol, 1.2 equiv.) was added and the mixture was stirred during 6 hours. AcOH (0.02 mL) and CuOTf₂ (72.3 mg, 0.2 mmol, 2 equiv.) were added and the mixture was stirred during 1 hour. The crude was evaporated and purified by chromatographic column (Heptane/AcOEt 90/10) to give the desired product (13.5 mg, 0.055 mmol, 41%).

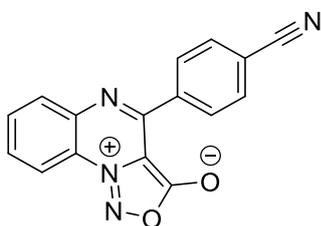
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.32 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 8.06 (dd, *J* = 8.4, 1.1 Hz, 1H), 7.88 (ddd, *J* = 8.5, 7.3, 1.4, 1H), 7.70 (ddd, *J* = 8.5, 7.3, 1.4, 1H), 3.08 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.35 (sept, *J* = 6.8 Hz, 1H), 1.05 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 163.8, 158.9, 141.3, 133.2, 130.1, 128.9, 121.9, 115.7, 102.9, 42.3, 28.6, 22.5 (2C).

IR (cm⁻¹): 3081, 2955, 2925, 2869, 1757, 1743, 1576, 1538, 1501.

LCMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ 244.7.

HRMS (ESI) calculated for C₁₃H₁₃N₃O₂ [M+H]⁺, 244.1084, found 244.1086.

4-(4-cyanophenyl)-[1,2,3]oxadiazolo[3,4-a]quinoxalin-10-ium-3-olate (III-19e)

$C_{16}H_8N_4O_2$
MW: 288.27 g.mol⁻¹
Yield: 57%
Brown solid

3-(2-azidophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olate **1a** (50 mg, 0.246 mmol, 1.0 equiv.) and 4-formylbenzonitrile (0.064 g, 0.492 mmol, 2.0 equiv.) were dissolved in dry acetonitrile (1.5 mL) and stirred during 5 minutes. Dimethylphenylphosphine (0.038 mL, 0.270 mmol, 1.1 equiv.) was added and the mixture was stirred during 4 hours. CuOTf₂ (181 mg, 0.492 mmol, 2 equiv.) was added and the mixture was stirred during 2 hours. The crude was evaporated and precipitated in 10 mL of a mixture of ether/methanol (70/30) and centrifuged twice to give the desired product (40 mg, 0.139 mmol,

57%).

¹H NMR (400 MHz, DMF): δ 8.52 (dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz, 1H), 8.31 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 8.24 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H), 8.12 (m, 3H), 7.98 (m, 1H).

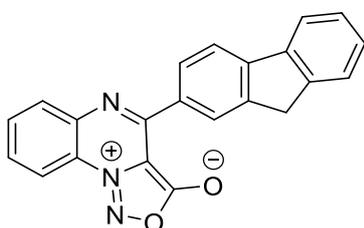
¹³C NMR: the compound was not soluble enough in any solvent to perform a ¹³C-NMR analysis

IR (cm⁻¹): 2233, 1758, 1577, 1495, 1452, 1290, 964, 831, 765, 549.

LCMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ 289.5.

HRMS (ESI) calculated for C₁₆H₈N₄O₂ [M+H]⁺, 289,0725, found 289,0722

4-(9H-fluoren-2-yl)-[1,2,3]oxadiazolo[3,4-a]quinoxalin-10-ium-3-olate (III-19f)



C₂₂H₁₃N₃O₂
MW: 351.37 g.mol⁻¹
Yield: 63%
Brown solid

3-(2-azidophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olate **1a** (50 mg, 0.246 mmol, 1.0 equiv.) and fluorene-2-carboxaldehyde (0.096 g, 0.492 mmol, 2.0 equiv.) were dissolved in dry acetonitrile (1.5 mL) and stirred during 5 minutes. Dimethylphenylphosphine (0.038 mL, 0.270 mmol, 1.1 equiv.) was added and the mixture was stirred during 4 hours. CuOTf₂ (181 mg, 0.492 mmol, 2 equiv.) was added and the mixture was stirred during 2 hours. The crude was evaporated and precipitated in 10 mL of a mixture of ether/methanol (70/30) and centrifuged twice to give the desired product. (54 mg, 0.154 mmol, 63%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.43 (dd, *J* = 8.4, 1.0 Hz, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.17 (dd, *J* = 8.3, 0.9 Hz, 1H), 8.12 – 8.06 (m, 2H), 8.05 – 7.99 (m, 2H), 7.85 (m, 1H), 7.67 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.49 – 7.38 (m, 2H), 4.07 (s, 2H).

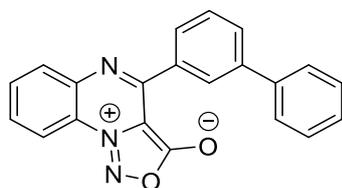
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ 163.1, 154.2, 144.0, 143.7, 142.7, 140.5, 140.3, 133.4, 132.3, 129.7, 129.6, 128.7, 127.7, 127.0, 126.0, 125.3, 121.4, 120.8, 119.6, 115.7, 102.9, 36.5.

IR (cm⁻¹): 1753, 1577, 1493, 1448, 978, 886, 826, 763, 729, 654.

LCMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ 352.6.

HRMS (ESI) calculated for C₂₂H₁₃N₃O₂ [M+H]⁺, 352.1087, found 352.1087.

4-([1,1'-biphenyl]-3-yl)-[1,2,3]oxadiazolo[3,4-a]quinoxalin-10-ium-3-olate (III-19g)



$C_{21}H_{13}N_3O_2$
MW: 339.35 g.mol⁻¹
Yield: 55%
Brown solid

3-(2-azidophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olate **1a** (50 mg, 0.246 mmol, 1.0 equiv.) and biphenyl-3-carboxaldehyde (0.090 g, 0.492 mmol, 2.0 equiv.) were dissolved in dry acetonitrile (1.5 mL) and stirred during 5 minutes. Dimethylphenylphosphine (0.038 mL, 0.270 mmol, 1.1 equiv.) was added and the mixture was stirred during 4 hours. CuOTf₂ (181 mg, 0.492 mmol, 2 equiv.) was added and the mixture was stirred during 2 hours. The crude was evaporated and precipitated in 10 mL of a mixture of ether/methanol (70/30) and centrifuged twice to give the desired product (46 mg, 0.136 mmol, 55%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 8.45 (dd, *J* = 8.4, 1.0 Hz, 1H), 8.32 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H), 8.19 (dd, *J* = 8.3, 0.9 Hz, 1H), 8.06 – 7.99 (m, 2H), 7.93 – 7.85 (m, 2H), 7.78 (m, 2H), 7.69 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.56 – 7.51 (m, 2H), 7.46 – 7.40 (m, 1H).

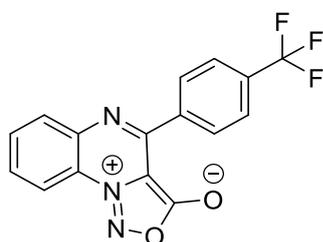
¹³C NMR (101 MHz, DMSO): δ 163.2, 153.8, 140.4, 139.8, 139.7, 134.3, 133.4, 129.9, 129.8, 129.2, 129.1 (2C), 129.9, 128.2, 128.1, 127.8, 126.8 (2C), 121.5, 115.7, 103.0.

IR (cm⁻¹): 1770, 1576, 1495, 1518, 1429, 1019, 968, 755, 726, 699.

LCMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ 340.6.

HRMS (ESI) calculated for C₂₁H₁₃N₃O₂ [M+H]⁺, 340.1087, found 340.1129.

4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-[1,2,3]oxadiazolo[3,4-a]quinoxalin-10-ium-3-olate (III-19h)



$C_{16}H_8N_3O_2$
MW: 331.25 g.mol⁻¹
Yield: 25%
Brown solid

3-(2-azidophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olate **1a** (50 mg, 0.246 mmol, 1.0 equiv.) and 4-(trifluoromethyl)benzaldehyde (0.086 g, 0.067 mL, 0.492 mmol, 2.0 equiv.) were dissolved in dry acetonitrile (1.5 mL) and stirred during 5 minutes. Dimethylphenylphosphine (0.038 mL, 0.270 mmol, 1.1 equiv.) was added and the mixture was stirred during 4 hours. CuOTf₂ (181 mg, 0.492 mmol, 2 equiv.) was added and the mixture was stirred during 2 hours. The crude was evaporated and purified by chromatographic column (Heptane/AcOEt 90/10) to give the desired product (20 mg, 0.060 mmol,

25%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.39 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 8.16 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.94 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.85 – 7.74 (m, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 163.1, 153.6, 141.0, 137.0, 133.6, 133.1 (q, *J*_{C-F} = 32.8 Hz), 130.8, 130.1 (2C), 130.0, 126.7 (q, *J*_{C-F} = 273.0 Hz), 125.6 (q, *J*_{C-F} = 3.5 Hz, 2C), 121.9, 115.8, 102.0.

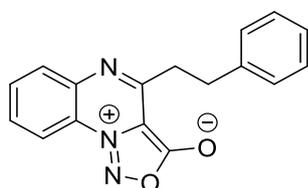
¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ 62.9.

IR (cm⁻¹): 2924, 2854, 1763, 1618, 1579, 1497, 1323, 1168, 1125, 963, 767.

LCMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ 332.5.

HRMS (ESI) calculated for C₁₆H₈F₃N₃O₂ [M+H]⁺, 332.0648, found 332.0650.

4-phenethyl-[1,2,3]oxadiazolo[3,4-a]quinoxalin-10-ium-3-olate (III-19i)



C₁₇H₁₃N₃O₂
MW: 291.31 g.mol⁻¹
Yield: 29%
Brown solid

3-(2-azidophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-olate **1a** (40 mg, 0.196 mmol, 1.0 equiv.) and 3-phenylpropanal (0.053 g, 0.394 mmol, 2.0 equiv.) were dissolved in dry acetonitrile (1.2 mL) and stirred during 5 minutes. Dimethylphenylphosphine (0.031 mL, 0.217 mmol, 1.1 equiv.) was added and the mixture was stirred during 4 hours. CuOTf₂ (142 mg, 0.394 mmol, 2 equiv.) was added and the mixture was stirred during 2 hours. The crude was evaporated and purified by Puriflash to give the desired product (18 mg, 0.062 mmol, 29%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.31 (dd, *J* = 8.4, 1.0 Hz, 1H), 8.07 (dd, *J* = 8.4, 0.9 Hz, 1H), 7.88 (ddd, *J* = 8.5, 7.2, 1.4 Hz, 1H), 7.70 (ddd, *J* = 8.5, 7.2, 1.3 Hz, 1H), 7.38 – 7.33 (m, 2H), 7.32 – 7.27 (m, 2H), 7.24 – 7.18 (m, 1H), 3.53 – 3.45 (m, 2H), 3.17 (m, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 163.7, 158.3, 141.4, 140.6, 133.3, 130.1, 129.1, 128.8 (2C), 128.6 (2C), 126.4, 122.1, 115.8, 102.6, 35.8, 34.0.

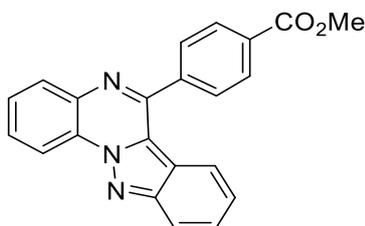
IR (cm⁻¹): 3027, 1772, 1579, 1541, 1503, 1436, 1017, 764, 700.

LCMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ 292.9.

HRMS (ESI) calculated for C₁₇H₁₃N₃O₂ [M+H]⁺, 292.1086, found 292.1084.

Synthesis and analytical data of indazolo[2,3-a]quinoxalines

methyl 4-(indazolo[2,3-a]quinoxalin-6-yl)benzoate (III-20a)



$C_{22}H_{15}N_3O_2$
MW: 353.38 g.mol⁻¹
Yield: 46%
Grey solid

To a solution of 4-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)-[1,2,3]oxadiazolo[3,4-a]quinoxalin-10-ium-3-olate **4a** (20 mg, 0.06 mmol, 1 equiv.) and aryne precursor 2-(trimethylsilyl)phenyl trifluoromethanesulfonate (27.9 mg, 0.093 mmol, 1.5 equiv.) in dry THF (400 μ L) was added dropwise, over a period of 5 minutes, TBAF (1M, 0.093 mL, 0.093 mmol, 1.5 equiv.). To go to completion, aryne precursor 2-(trimethylsilyl)phenyl trifluoromethanesulfonate (0.093 mmol, 1.5 equiv.) and TBAF (0.093 mmol, 1.5 equiv.) were successively added every hour for 4h. The mixture was then evaporated and purified by chromatographic column using Heptane/AcOEt (80/20) to give the desired product (9.7 mg, 0.028 mmol, 46%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.90 (dd, J = 8.2, 1.2 Hz, 1H), 8.37 – 8.30 (m, 2H), 8.27 (dd, J = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 8.08 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.05 – 7.99 (m, 2H), 7.88 – 7.73 (m, 2H), 7.62 – 7.52 (m, 2H), 7.25 – 7.19 (m, 1H), 4.02 (s, 3H).

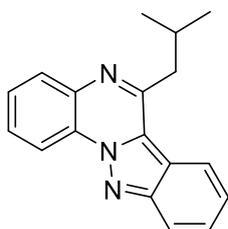
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 166.8, 153.2, 149.5, 142.2, 138.2, 131.9, 130.3 (2C), 130.2, 129.7, 129.2 (2C), 128.5, 128.4, 128.1, 125.7, 123.6, 121.1, 117.8, 117.2, 116.7, 52.6.

IR (cm⁻¹): 2963, 2876, 1723, 1474, 1263, 1152, 1031, 883, 759, 638.

LCMS (ESI) : m/z [M+H]⁺ 354.8.

HRMS (ESI) calculated for $C_{22}H_{15}N_3O_2$ [M+H]⁺, 354.1242, found 354.1248.

6-isobutylindazolo[2,3-a]quinoxaline (III-20d)



$C_{18}H_{17}N_3$
MW: 275.14 g.mol⁻¹
Yield: 86%
Grey solid

To a solution of 4-isobutyl-[1,2,3]oxadiazolo[3,4-a]quinoxalin-10-ium-3-olate **4d** (6 mg, 0.025 mmol, 1 equiv.) in dry ACN (0.5 mL) were added 2-(trimethylsilyl)phenyl trifluoromethanesulfonate (9.1 μ L, 0.0375 mmol) and TBAF (37.5 μ L, 0.0375 mmol) dropwise and the reaction mixture was stirred for 2 hours. The crude product was purified using a column of silica gel using Heptan/EtOAc (95:05) as eluent to afford the desired product as a white powder (5.9 mg, 86%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.86 – 8.81 (m, 1H), 8.21 – 8.16 (m, 2H), 8.10 (dt, J = 8.6, 0.9 Hz, 1H), 7.74 (dq, J = 7.2, 1.7 Hz, 2H), 7.64 (ddd, J = 8.6, 6.8, 1.0 Hz, 1H), 7.46 (ddd, J = 8.4, 6.8, 0.9 Hz, 1H), 3.37 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 2.52 (sept, J = 6.9 Hz, 1H), 1.15 (s, 3H), 1.13 (s, 3H).

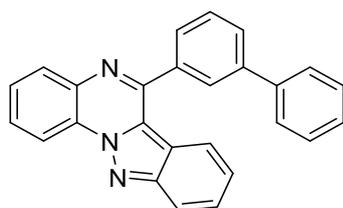
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 156.1, 149.3, 129.5, 128.7, 128.1, 128.0, 128.0, 126.7, 123.6, 121.1, 117.9, 117.1, 116.5, 77.4, 45.7, 27.8, 22.9 (2C).

IR (cm⁻¹): 2951, 1577, 1478, 1358, 1228, 768, 739.

LCMS (ESI) : m/z [M+H]⁺ 276.5.

HRMS (ESI) calculated for C₁₈H₁₇N₃ [M+H]⁺, 276.1501, found 276.1505.

6-([1,1'-biphenyl]-3-yl)indazolo[2,3-a]quinoxaline (III-20g)



C₂₆H₁₇N₃
MW: 371.44 g.mol⁻¹
Yield: 83%
Yellow solid

To a solution of 4-([1,1'-biphenyl]-3-yl)-[1,2,3]oxadiazolo[3,4-a]quinoxalin-10-ium-3-olate **4g** (16.9 mg, 0.05 mmol, 1 equiv.) and aryne precursor 2-(trimethylsilyl)phenyl trifluoromethanesulfonate (22.4 mg, 0.075 mmol, 1.5 equiv.) in dry THF (320 μ L) was added dropwise, over a period of 5 minutes, TBAF (1M, 0.075 mL, 0.075 mmol, 1.5 equiv.). To go to completion, aryne precursor 2-(trimethylsilyl)phenyl trifluoromethanesulfonate (0.075 mmol, 1.5 equiv.) and TBAF (0.075 mmol, 1.5 equiv.) were successively added every hour for 3h. The mixture was then evaporated and purified by chromatographic column (Heptane/AcOEt 90/10) to give the desired product (15.4 mg, 0.0415 mmol, 83 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.94 – 8.89 (m, 1H), 8.29 (dd, J = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 8.16 (t, J = 1.6 Hz, 1H), 8.10 (dt, J = 8.7, 0.9 Hz, 1H), 7.89 (ddt, J = 6.8, 1.8, 1.2 Hz, 2H), 7.85 – 7.74 (m, 2H), 7.74 – 7.68 (m, 4H), 7.60 (ddd, J = 8.6, 6.7, 1.1 Hz, 1H), 7.50 – 7.44 (m, 2H), 7.39 (dt, J = 9.4, 4.3 Hz, 1H), 7.28 – 7.23 (m, 1H).

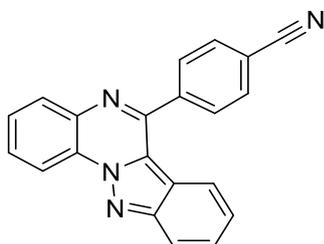
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 154.2, 149.5, 142.0, 140.6, 138.5, 138.3, 130.2, 129.5, 129.3, 129.1 (3C), 128.4, 128.3, 128.1, 127.9, 127.8, 127.7, 127.4 (2C), 126.0, 123.4, 121.4, 117.7, 117.5, 116.7.

IR (cm⁻¹): 3062, 2923, 2850, 1576, 1507, 1359, 1327, 1226, 756, 696.

LCMS (ESI) : m/z [M+H]⁺ 372.8.

HRMS (ESI) calculated for C₂₆H₁₇N₃ [M+H]⁺, 372.1501, found 372.1504.

Methyl 4-(indazolo[2,3-a]quinoxalin-6-yl)benzoate (III-20e)



$C_{21}H_{12}N_4$
MW: 320.36 g.mol⁻¹
Yield: 45%
Yellow solid

To a solution of 4-(4-cyanophenyl)-[1,2,3]oxadiazolo[3,4-a]quinoxalin-10-ium-3-olate **4e** (20 mg, 0.069 mmol, 1 equiv.) and aryne precursor 2-(trimethylsilyl)phenyl trifluoromethanesulfonate (31 mg, 25 μ L, 0.104 mmol, 1.5 equiv.)) in dry THF (400 μ L) was added dropwise, over a period of 5 minutes, TBAF (1M, 0.104 mL, 0.104 mmol, 1.5 equiv.). To go to completion, aryne precursor 2-(trimethylsilyl)phenyl trifluoromethanesulfonate (0.104 mmol, 1.5 equiv.) and TBAF (0.104 mmol, 1.5 equiv.) were successively added every hour for 6h. The mixture was then evaporated and purified by chromatographic column (Heptane/AcOEt 80/20) to give the desired product (10.9 mg, 0.031 mmol, 45 %)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.91 (dd, J = 8.3, 1.4 Hz, 1H), 8.26 (dd, J = 8.2, 1.3 Hz, 1H), 8.09 (ddd, J = 8.0, 6.0, 1.1 Hz, 3H), 7.99 – 7.95 (m, 2H), 7.83 (dddd, J = 9.5, 8.6, 7.2, 1.5 Hz, 2H), 7.62 (ddd, J = 8.7, 6.8, 1.0 Hz, 1H), 7.55 (dt, J = 8.5, 0.9 Hz, 1H), 7.29 (ddd, J = 8.5, 6.7, 0.9 Hz, 1H).

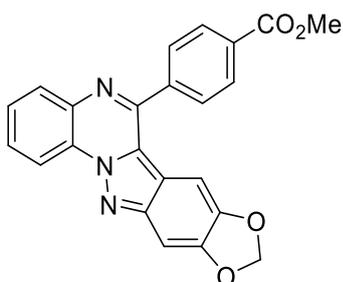
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 152.0, 149.5, 142.2, 138.0, 132.9 (2C), 130.23, 130.0, 129.9 (2C), 128.6, 128.6, 128.1, 125.3, 123.9, 120.7, 118.5, 118.0, 116.9, 116.7, 114.2.

IR (cm⁻¹): 2917, 2231, 1578, 1477, 1363, 1224, 841, 757, 747.

LCMS (ESI) : m/z [M+H]⁺ 321.3.

HRMS (ESI) calculated for C₂₂H₁₅N₃O₂ [M+H]⁺, 321.1140, found 321.1142.

Methyl 4-([1,3]dioxolo[4',5':5,6]indazolo[2,3-a]quinoxalin-6-yl)benzoate (III-20b)



$C_{23}H_{15}N_3O_4$
MW: 397.11 g.mol⁻¹
Yield: 22%
Yellow solid

To a solution of 4-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)-[1,2,3]oxadiazolo[3,4-a]quinoxalin-10-ium-3-olate **4a**

(20 mg, 0.06 mmol, 1 equiv.) and aryne precursor (Trimethylsilyl)benzo[d][1,3]dioxol-6-yl trifluoromethanesulfonate (31.9 mg, 0.093 mmol, 1.5 equiv.) in dry THF (400 μ L) was added dropwise, over a period of 5 minutes, TBAF (1M, 0.093 mL, 0.093 mmol, 1.5 equiv.). The mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was then evaporated and purified by chromatographic column (Heptane/AcOEt 90/10) to give the desired product as a yellow solid (5.5 mg, 0.014 mmol, 22%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ 8.70–8.66 (m, 1H), 8.30–8.22 (m, 2H), 8.14 (dd, J = 8.1, 1.1 Hz, 1H), 7.92–7.85 (m, 2H), 7.72 (ddd, J = 8.4, 7.2, 1.4 Hz, 1H), 7.63 (ddd, J = 8.5, 7.3, 1.4 Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 5.98 (s, 2H), 3.96 (s, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) : δ 166.8, 152.8, 150.5, 147.2, 146.7, 142.1, 137.2, 131.8, 130.4, 130.1, 129.6, 129.1 (2C), 128.4, 127.6, 125.5, 116.0, 112.7, 101.8, 96.9, 94.7, 52.6

IR (cm^{-1}): 2920, 1724, 1610, 1471, 1329, 1278, 1196, 1113, 1035.

LCMS (ESI) : m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 398.8

HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 398.1141, found 398.1142

Titre : Chimie click pour la synthèse de pyrazoles et l'étude du Myristoylome

Mots clés : Chimie click, chimie bioorthogonale, pyrazole, criblage haut débit.

Résumé : Le concept de chimie click, développé dans les années 2000 par Sharpless, repose sur des principes de réactivité, par lesquels une molécule est formée par une réaction rapide, chimiosélective, sans sous-produit et avec de bons rendements. Ce concept a été étendu aux milieux biologiques par Bertozzi pour l'étude de biomolécules d'intérêt qui nécessite des réactions n'interférant pas avec le milieu biologique. C'est le concept de chimie bioorthogonale.

Cette thèse a dans un premier lieu eu pour objectif d'améliorer, par une approche de criblage haut débit (HTE), une réaction de chimie click catalysée au cuivre entre un alcyne et une sydnone pour former des pyrazoles (CuSAC).

Lors de notre étude, cette réaction a été étendue à une nouvelle classe de composés mésoioniques : les iminosydnones, permettant de développer une nouvelle réaction de chimie click.

Dans un second temps, nous avons utilisé les propriétés des iminosydnones pour concevoir et synthétiser des sondes chimiques capables d'étudier le Myristoylome, l'ensemble des protéines ayant subies une myristoylation, et permettre l'isolation et l'identification de ces protéines d'intérêt. Pour cela, des sondes chimiques biotinylées portant un azoture chélatant et un lien clivable iminosydnone ont été synthétisées en plusieurs étapes et les premiers essais ont déjà permis d'identifier 54 protéines myristoylées.

Title : Click chemistry for the synthesis of pyrazoles and the identification of myristoylated proteome

Keywords : Click chemistry, bioorthogonal chemistry, pyrazole, High Throughput Experimentation

Abstract : The concept of click chemistry was developed in the 2000's by Sharpless and is based on reactivity principles whereby a molecule is formed through a rapid, chemoselective reaction without side-products and in good yields. Bertozzi has extended this concept to biological media for the study of biomolecules of interest. The involved reactions do not interfere with biological functions. This is the concept of bioorthogonal chemistry.

The aim of this thesis was to improve a copper-catalysed click reaction between an alkyne and a sydnone to form pyrazoles (CuSAC) with the help of a High Throughput Experimentation (HTE).

During this study, this copper catalysed reaction was investigated using a new class of mesoionic compounds: the iminosydnones. This work allowed us to develop a new click reaction.

Furthermore, we designed chemical probes able to react with myristoylated proteins and allowed their isolation and identification. To this end, we prepared biotinylated probes containing a chelating azides function and an iminosydnone cleavable linkers in multiple steps. Proof of concept experiments allowed us to identify 54 proteins.