



HAL
open science

Nouvelles réactions click in situ pour la découverte de molécules d'importances thérapeutiques

Chloe Puteaux

► **To cite this version:**

Chloe Puteaux. Nouvelles réactions click in situ pour la découverte de molécules d'importances thérapeutiques. Chimie organique. Normandie Université, 2023. Français. NNT : 2023NORMR108 . tel-04607860

HAL Id: tel-04607860

<https://theses.hal.science/tel-04607860v1>

Submitted on 11 Jun 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.



Normandie Université



THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité **CHIMIE**

Préparée au sein de l'**Université de Rouen Normandie**

Nouvelles réactions click in situ pour la découverte de molécules d'importances thérapeutiques

Présentée et soutenue par
CHLOE PUTEAUX

Thèse soutenue le 08/12/2023
devant le jury composé de :

MME MARIE LOPEZ	Chargé de Recherche - CTRE NAT RECH SCIENTIFIQUE	Rapporteur du jury
M. ALEXANDRE SPECHT	Directeur de Recherche - Université de Strasbourg	Rapporteur du jury
M. LUDOVIC JEAN	Professeur des Universités - UNIVERSITE PARIS CITE	Président du jury
M. CYRILLE SABOT	Directeur de Recherche - Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
M. PIERRE YVES RENARD	Professeur des Universités - Université de Rouen Normandie	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par **CYRILLE SABOT** (CHIMIE ORGANIQUE, BIOORGANIQUE, REACTIVITE, ANALYSE) et **PIERRE YVES RENARD** (CHIMIE ORGANIQUE, BIOORGANIQUE, REACTIVITE, ANALYSE)



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Chimie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Nouvelles réactions click in situ pour la découverte de molécules d'importances thérapeutiques

Présentée et soutenue par

Chloé PUTEAUX

Thèse soutenue publiquement le 8 décembre 2023
devant le jury composé de

Dr. Marie LOPEZ	Chargée de recherche CNRS, Institut de Biomolécules Max Mousseron, Montpellier	Rapportrice
Dr. Alexandre SPECHT	Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg	Rapporteur
Pr. Ludovic JEAN	Professeur des Universités, Université de Paris Cité	Examineur
Dr. Cyrille SABOT	Directeur de recherche CNRS, Université de Rouen	Directeur de thèse
Pr. Pierre-Yves RENARD	Professeur des Universités, Université de Rouen	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par le Dr. Cyrille SABOT et le Pr. Pierre-Yves RENARD, laboratoire COBRA UMR 6014

*A toi Noé, notre merveilleuse nouvelle qui viendra au Monde au même moment
que ce manuscrit.*

Remerciements

Avant toute chose, je souhaite remercier les Dr. Alexandre Specht (Directeur de recherche CNRS à l'Université de Strasbourg), Dr. Marie Lopez (Chargé de recherche CNRS à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron de Montpellier) et Pr. Ludovic Jean (Professeur des Universités à la Faculté de Pharmacie de Paris Cité) pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie également la région Normandie pour avoir financé ce projet de thèse.

Je remercie tout particulièrement le Dr. Cyrille Sabot, directeur de recherche CNRS et directeur de ces travaux de thèse, pour tout. Merci pour m'avoir transmis une partie de ton savoir et pour avoir été disponible à tout moment. Le doctorat est une épreuve qui n'est pas toujours simple, et tu as su m'accorder ta confiance et ton soutien hors pair dans les moments de faiblesse et de doute. Si je dois résumer ton encadrement, je dirais que « c'est pas mal ».

Un grand merci au Pr. Pierre-Yves Renard, co-directeur de cette thèse, pour tes conseils toujours pertinents vis-à-vis du projet et les corrections que tu as pu apporter à ce manuscrit.

Je remercie également le Pr. Laurent Joubert et le Dr. Vincent Tognetti pour les calculs théoriques apportés au projet d'optimisation de la réaction de thiol-yne et le Pr. Jana Sopkova (CERMN, UNICAEN EA 4258, Caen) pour avoir réalisé les études de *docking* et de RX dans le projet d'élaboration d'une réaction photoactivable en KTGS.

Le laboratoire COBRA est, à mon sens, un laboratoire particulièrement riche de connaissances et de personnes hors du commun. Je remercie donc, au sens large, toutes les personnes avec qui j'ai pu échanger dans un coin de couloir/labo et qui m'ont offert un sourire ou une aide.

Je remercie énormément l'ensemble des encadrants de l'équipe 2, à savoir Xavier F., Thibault G., Alexandre H., Sébastien B., Stéphane L. ou encore Niko H. pour votre bienveillance, votre soutien et vos conseils, et vos blagues parfois houleuses (ça c'est particulièrement pour toi Seb). Je remercie également par extension Marie-Laure B. qui m'a ouvert les portes du Curib et qui m'a permis de faire quelques manip dans son antre. Merci également pour ta bonté.

Un très grand merci à l'équipe d'analyse du laboratoire. Merci beaucoup Albert pour les nombreuses analyses HRMS. Merci Françoise, tout d'abord pour les analyses IR et Pf, mais aussi pour tes grands sourires, ta gaieté de cœur et tes histoires toujours plus folles les unes que les autres. Merci énormément à ma deuxième équipe de masse, et tout particulièrement à Marie H. pour avoir réussi à me vulgariser et à me faire comprendre comment fonctionnaient les différents appareils, pour ton aide

incommensurable, ta confiance et ta gentillesse. Un grand merci à Anaïs et Mathilde pour votre disponibilité face aux petits problèmes souvent rencontrés sur les spectros et pour vos sourires quelle que soit l'humeur du jour. Merci énormément au duo d'enfer, à savoir ma Tiatia et Emilie. Vous êtes tout simplement exceptionnelles. J'ai adoré passer des failles spatiotemporelles avec vous, que ce soit sur les histoires dingues de Tiatia ou sur toutes les explications que vous avez pu m'apporter en LC. Merci pour votre soutien dans les moments de galère (et il y en a eu !) et pour votre bonne humeur à toute épreuve.

Je remercie Alexis pour m'avoir passé le flambeau de la KTGS en bonne et due forme, ce qui m'a très certainement évité de longues heures d'incompréhension et d'optimisation dans ce domaine. Merci également pour ta disponibilité même une fois parti du labo.

A présent, place à ma famille élargie, à savoir le labo 228-229. Qu'est-ce que vous avez pu m'apporter ! On commencera tout d'abord avec ceux qui m'ont suivie pendant ces 3 ans. Madeleine, merci pour ton soutien inconditionnel tout au long de ma thèse, et surtout les deux dernières années (oui car avant tu ne voulais pas me prêter tes ballons de baudruche donc bon...). Tu es une personne géniale, ne change rien. Merci pour m'avoir offert une deuxième maison à Mont Saint' tout comme dans ton cœur. Tes post-it timides me manqueront où que j'aie. Maintenant, Etienne... Ahhh que dire ? Mon âme-sœur. Du rire, du love, du chant, des danses... Comment vont faire les membres du labo sans notre duo infernal ? Je te souhaite tout le bonheur du Monde et de la réussite dans la suite de ta vie. Aie confiance en tes talents, YOU ROCK! (Affronte mon regard...). Vient le tour de mon bébé chou AKA JEZ. Tu es la personne la plus douce et la plus bienveillante que je connaisse. Prend bien soin de toi pour la suite, n'oublie pas les expressions que je t'ai apprises, et fais bien attention à Clothilde et Gwenaëlle stp... A présent, place au bg VPA. Malgré ton abandon brutal pour un séjour en Australie (les larmes koolent encore), merci pour tout ce que tu m'as apporté. Je suis on ne peut plus heureuse d'avoir croisé la route d'un mec aussi top que toi. J'ai très très très hâte de ton retour in DA Normandie pour monter un gîte chez ton grand-père. Vixouille la fripouille, j'espère que tu continueras de me parler de tes bons plans Vente Privée et Ikea, sinon rien n'ira. Ton ballon de magnifique petite coumarine restera à jamais gravé dans ma mémoire. Viennent nos chers post-doc, à savoir Guigzouille la Fripouille et Mathieu. Malgré votre duo qui nous a bien... vous êtes des cœurs purs. Merci pour votre aide dans les manip tout comme dans la vie de tous les jours. Nos moments musique (à part quand Mathieu choisissait ce qu'on allait écouter) me manquent tous les jours. De Guinea Pig à Queen, c'était que du bonheur. Vient à présent Isabelle, ma princess qui ne veut pas grandir... Dans tes sauts d'humeur, ça a toujours été un pur bonheur de t'avoir comme voisine de paillasse. Ta folie et ta voix quand tu dis « non mais au bout d'un moment... » sont incroyables. Now my babies, DR Gábor and Karolina. Thanks for everything that you gave me during your post-doc in the lab. Karolina, in one day

we were already BFF. Thanks for your enthusiasm (despite your upset polish moments...), your joy and your spontaneity. You were a real light in the 228 lab and the atmosphere in it has definitely changed thanks to you. Gabz, I never thought I would have said that one day, but your “salut ça va ?” every time we crossed each other will be missed. You are incredibly incredible. Keep smiling and never let “la carte Vitale” change your mood. I definitely hope all the best to you and that one day you’ll win the lottery to give up with money. Maintenant, viennent mes stagiaires préférés. D’abord, mon bb Lélé, ou encore bb rôti. Tu es tellement mignonne que j’aimerais te protéger pour toujours. Maintenant tu commences ta thèse comme une grande. Je suis méga fière de la personne forte que tu es. Ne doute jamais de toi. Naomi, merci pour ton grand cœur et ces moments géniaux passés avec toi. Tu es une personne formidable et attachante. Tes longs ongles qui tapent sur ton tél me manquent (et tout le reste aussi). J’espère te revoir très vite et te souhaite plein de belles choses. Abbas, toi aussi tu es un réel cœur pur. Continue de croire en toi et bon courage pour cette nouvelle étape dans le Nord ! Tu peux être fier de toi. Et pour finir, une mention spéciale pour Patricia. Merci beaucoup pour ton soutien tout au long de ma thèse. Tu es une femme géniale et je souhaite que nos chemins se croisent encore et encore autour de crêpes et de cidre. Plein de belles choses.

La famille élargie s’étend jusqu’au bout du couloir en 255-256, cellule où des personnes en ont travaillé. Antoine, merci pour tout. Tes blagues sont presque toutes parfaites (à part celles de chimie, même en troisième année quand on craque ce n’est pas accepté) et j’en suis fan. J’ai adoré bitcher avec toi et je te souhaite que du bonheur (et par extension à Aubane aussi). Steven, AKA le mec le plus chill du labo, merci pour avoir accepté de faire de ton appart ma deuxième maison et merci pour ta bienveillance et tes « non mais ça c’est de la merde, on s’en fout ». Tu es vraiment une personne formidable et au grand cœur ! Pierre, merci pour tout ce que tu m’as apporté. Tes jugements me font mourir de rire. Au grand grand plaisir de se retrouver à la piscine comme à l’ancienne. Gros bisous à Marco et toi, vous êtes super. Enfin, Brice et Maxime, mes deux normands préférés. Vous ne vivez pas vos couleurs de la même façon (Brice = chauvain qui pêche des homards à mains nues, Maxime = je suis hyper ravi d’être là mais je ne sais pas le dire avec la forme) mais vous êtes tous les deux fantastiques et au grand cœur. A très vite pour de nouvelles aventures.

Enfin, côté 215-216, on y trouve Mathias, Laly et Antoine. Vous avez tous les trois un caractère bien différent mais vous avez tous le point commun d’être top. Merci pour ce que vous m’avez apporté.

La grande famille s’étend même au-delà du deuxième étage. Loïc, Klara, Gonnot et Valette, merci pour ces moments de pur plaisir passés ensemble. Vous êtes tous de sacrés personnages et j’ai énormément ri avec vous. Je vous souhaite que du bonheur et de bonnes choses. Au grand plaisir de repasser un séjour de folie comme en Auvergne ou au camping.

A tous ces membres de la famille, ce n'est qu'un aurevoir, soyez-en sûrs !

Maintenant, je souhaite remercier les personnes qui me suivent depuis bien longtemps dans ce périple.

Mme Ripoche, merci énormément pour tout ce que tu m'as apporté. Tout a commencé à SIGMA mais j'ai découvert à quel point tu étais une prof hors du commun à Amsterdam et dans la suite de mon aventure de chimiste. Tu es d'un soutien hors pair et je suis ravie d'avoir croisé ton chemin. Je te dois beaucoup et te choisirai 1000 autre fois en tant qu'enseignante référente si je le pouvais. Au plaisir de recroiser nos chemins quand nous le pourrons.

Gab, Thomas et Quent, merci énormément d'être des BFF hors du commun. Vous êtes la crème des crèmes et je souhaite que notre amitié dure pour toujours.

Et maintenant, le meilleur pour la fin, merci à ma famille pour me supporter dans toutes les épreuves de la vie, merci de m'accorder votre confiance au quotidien. Mention spéciale pour les trois personnes les plus importantes de ma vie, Maman, Pau et Val. Je vous aime inconditionnellement et je suis la plus heureuse des filles/sœurs/amoureuses à vos côtés. MERCI !

Table des matières

Remerciements	1
Abréviations et acronymes	11
Introduction générale	15
Chapitre 1 : Introduction bibliographique	17
1. De la molécule biologiquement active au développement d'un médicament	17
1.1. Etapes du développement d'un médicament	17
1.2. Vers la découverte du principe actif	19
1.2.1. Le criblage à haut-débit (HTS)	19
1.2.2. La chimie combinatoire	20
1.2.3. La conception de médicaments par la méthode des fragments (FBDD)	22
1.2.4. Synthèse assistée par la cible biologique	26
1.2.4.1. La chimie combinatoire dynamique (DCC)	26
1.2.4.2. La synthèse guidée par la cible sous contrôle cinétique (KTGS)	29
2. La KTGS, outil de choix pour la découverte de molécules actives	30
2.1. Les différents types de réactions décrites en KTGS	31
2.1.1. Formation de liaisons C-N	32
2.1.2. Formation de liaisons C-S	43
2.1.3. Formation de liaisons C-C	46
2.1.4. Formation de liaisons C-C combinées à des liaisons C-N	51
2.2. Aspects pratiques de la KTGS	54
2.3. La KTGS et sa place en chimie thérapeutique	55
2.4. Les limites de la KTGS	57
3. Objectifs des travaux de thèse	58
3.1. Amélioration des propriétés photophysiques d'un ligand obtenu par réaction de thiol-yne en KTGS	58
3.2. Amélioration du ligand obtenu par thiol-yne en KTGS en vue d'applications <i>in vivo</i>	59
3.3. Développement d'une réaction photoactivable en KTGS	59
Chapitre 2 : Amélioration des propriétés de photoisomérisation d'un ligand obtenu par réaction de thiol-yne en KTGS	61
1. Développement de la réaction de thiol-yne en KTGS	62
1.1. Choix de la réaction thiol-yne en KTGS	62
1.2. Elaboration de la thiol-yne en KTGS	65
1.2.1. L'anhydrase carbonique de type II	65

1.2.2.	Synthèse des molécules nécessaires à la thiol-yne en KTGS	68
1.2.2.1.	Préparation des fragments	68
1.2.2.2.	Préparation des références attendues	69
1.2.3.	Mise en œuvre des conditions de KTGS	70
1.2.4.	Propriétés du ligand éther de thiovinyle 88	72
1.2.4.1.	Propriétés biologiques.....	72
1.2.4.2.	Propriétés photophysiques	73
1.3.	Etude de la photoisomérisation du ligand éther de thiovinyle	74
1.3.1.	Introduction à la photoisomérisation.....	74
1.3.1.1.	Rappel du principe de photoisomérisation et exemples de composés photoisomérisables	74
1.3.1.2.	Photoisomérisation de l'azobenzène.....	75
1.3.1.3.	Applications de la photoisomérisation.....	76
1.3.2.	Propriété de photoisomérisation du ligand éther de thiovinyle 88	77
1.3.2.1.	Effet du solvant et de la concentration.....	77
1.3.2.2.	Effet de la longueur d'onde d'irradiation.....	77
1.3.2.3.	Réversibilité de la photoisomérisation.....	78
1.4.	Objectifs du projet.....	79
2.	Amélioration de la réversibilité de photoisomérisation du ligand éther de thiovinyle obtenu en KTGS.....	80
2.1.	Etudes préliminaires sur la photocommutation d'un système.....	80
2.1.1.	Etat de l'art	80
2.1.2.	Calculs théoriques	83
2.2.	Développement du ligand difluoré.....	84
2.2.1.	Synthèse du fragment coumarine	84
2.2.2.	Préparation du ligand et premières études spectrales.....	88
2.3.	Etude de la photoisomérisation des isomères du ligand 107.....	89
2.3.1.	Détermination du point isobestique	89
2.3.2.	Choix de la source lumineuse	91
2.3.2.1.	Utilisation des lampes LED EvoluChem™	91
2.3.2.2.	Irradiation avec un monochromateur Cornerstone™ 260.....	92
2.3.3.	Cinétique de photoisomérisation	93
2.3.3.1.	En fonction du solvant.....	93
2.3.3.2.	En fonction de l'irradiation.....	94
2.3.4.	Robustesse de la photoisomérisation.....	94
3.	Vers la modification structurale du ligand 107 pour différencier les IC ₅₀ des deux isomères Z et E	96

3.1.	Etat de l'art	96
3.1.1.	Introduction à la photoisomérisation en chémobiologie	96
3.1.2.	Photorégulation de l'activité enzymatique.....	97
3.1.3.	Exemples d'inhibiteurs photoisomérisables de l'anhydrase carbonique	98
3.2.	Modification structurale du ligand 107 en vue de différencier les activités biologiques de ses isomères <i>Z</i> et <i>E</i>	101
3.2.1.	Réflexion sur le type de modification à mettre en œuvre	101
3.2.2.	Synthèse du ligand 137.....	102
4.	Conclusion	104
Chapitre 3 : Modification du motif coumarinique du ligand 107 afin de décaler ses propriétés photophysiques vers le rouge		107
1.	Décalage vers le rouge de l'absorption du fragment coumarine.....	108
1.1.	Etat de l'art	108
1.1.1.	Modification de l'absorption de la coumarine	108
1.1.2.	Augmentation de l'effet <i>push-pull</i> de la coumarine	110
1.2.	Synthèse d'éthynylcoumarines analogues pour la réaction de thiol-yne.....	112
1.2.1.	Synthèse d'éthynylcoumarines substituées en position 3 ou 4.....	112
1.2.2.	Synthèse de l'éthynylcoumarine substituée par le difluorométhylène en position 1...	113
1.2.3.	Réaction de thiol-yne en présence de la N-acétyl-cystéine.....	114
1.3.	Vers la synthèse d'éthynylcoumarines photocommutables absorbant dans le domaine du visible	117
1.3.1.	Vers la synthèse de la 7-éthynyltrifluorométhylcoumarine 6,8-difluorée.....	117
1.3.2.	Vers la synthèse de la 7-éthynylcoumarine 6,8-difluorée substituée par un ester .	118
1.3.3.	Bromation en position 3 de la l'éthynylcoumarine protégée 105	120
1.3.4.	Vers la synthèse d'un dérivé tétrafluoroxanthène.....	121
2.	Conclusion	123
Chapitre 4 : Développement d'une réaction photoactivable en KTGS.....		125
1.	Choix du partenaire photoactivable	126
1.1.	Les fonctions photoréactives.....	126
1.1.1.	Le diazo.....	126
1.1.2.	L'azoture d'aryle.....	128
1.1.3.	La benzophénone	130
1.1.4.	La diazirine.....	131
1.2.	Choix de la fonction photoréactive.....	133
2.	Détermination des conditions optimales pour utiliser les diazirines en KTGS.....	136
2.1.	Etude des fragments diazirines	136

2.1.1.	Détermination des fragments diazirine d'intérêt	136
2.1.2.	Synthèse des diazirines choisies	138
2.1.3.	Synthèse de la trifluorométhylphényldiazirine portant la fonction sulfonamide ...	140
2.2.	Tests préliminaires	142
2.2.1.	Choix du meilleur partenaire nucléophile	142
2.2.1.1.	Synthèse des références réactionnelles entre la diazirine et le nucléophile respectif	143
2.2.1.2.	Etude du meilleur nucléophile en présence de la diazirine 154e	144
2.2.1.3.	Etude du meilleur nucléophile en présence de la diazirine 154f par analyse LC-MS	149
2.2.2.	Impact de la présence de l'eau sur le rendement de produit issu d'insertion S-H..	152
2.2.3.	Cinétique d'activation de la diazirine 154e.....	154
2.2.4.	Stabilité de la CA sous irradiation lumineuse	155
2.2.4.1.	En l'absence de diazirine	155
2.2.4.2.	En présence de la diazirine 154f.....	156
3.	Mise en œuvre de la réaction KTGS	158
3.1.	Préparation des ligands de référence	158
3.1.1.	Par substitution nucléophile.....	159
3.1.2.	Par activation de la diazirine.....	160
3.2.	Test de la réaction photoactivable en KTGS	163
3.2.1.	Criblage des fragments diazirine en KTGS	163
3.2.2.	Réactions de contrôle	165
3.2.3.	Désactivation du carbène triplet en présence de TEMPO.....	167
3.2.4.	Cinétique de la réaction photoactivable en KTGS	168
3.2.5.	Mise en œuvre de la KTGS sous conditions dénaturantes de l'enzyme	171
3.2.5.1.	Dénaturation de la CA-II – Approche qualitative.....	172
3.2.5.2.	Mise en œuvre de la KTGS sous conditions dénaturantes de la CA	173
3.3.	Diminution de la présence de faux positifs	175
3.3.1.	Par ajout d'un partenaire thiol	176
3.3.2.	Par expérience de FRET	177
3.3.3.	Diminution des quantités de fragment.....	179
4.	Etude du ligand 171 formé	180
4.1.	Impact du groupement trifluorométhyle sur l'activité du ligand	180
4.1.1.	Etat de l'art	180
4.1.2.	Synthèse du ligand 171 et de ses analogues	182
4.2.	Etude du centre asymétrique du ligand 171	184

4.2.1.	Etude de l'excès énantiomérique obtenu lors de la réaction de KTGS.....	184
4.2.1.1.	Problématique rencontrée sous analyse SIM.....	184
4.2.1.2.	Changement de méthode de spectrométrie de masse.....	185
4.2.1.3.	Etude de <i>docking</i>	187
4.2.2.	Synthèse énantiosélective des ligands (S)-171 ou (R)-171.....	188
4.2.2.1.	Réduction énantiosélective de la cétone trifluorométhylée 151.....	188
4.2.2.2.	Déracémisation de l'alcool 160.....	191
5.	Conclusion.....	194
	Conclusion générale et perspectives.....	197
	Partie expérimentale.....	207

Abréviations et acronymes

AB	Azobenzène
Ac	Acétyle
AChE	Acétylcholinestérase
ACN	Acétonitrile
AMK	Anti Markovnikov
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
Ar	Aromatique
ATZ	Acétazolamide
BLA	<i>Bond Length Alternation</i>
C	Concentration
C_f	Concentration finale
CA	Anhydrase carbonique
CBS	Corey-Bakshi-Shibata
CIS	Croisement intersystème
Cm	Concentration massique
CuAAC	<i>Copper (I)-catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition</i>
CuI	<i>Copper Iodide</i>
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCC	<i>Dynamic Combinatorial Chemistry</i>
DCL	<i>Dynamic Combinatorial Library</i>
DCM	Dichlorométhane
DIBALH	<i>Diisobutylaluminium hydride</i>
DIPEA	Diisopropyléthylamine
DLS	<i>Dynamic Ligation Screening</i>
DM1	Dystrophie Myotonique de type I
DMF	N,N-Diméthylformamide
DMP	<i>Dess-Martin Periodinane</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DSF	<i>Differential Scanning Fluorimetry</i>
EDCI.HCl	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
ee	Excès énantiomérique
EPS	Etat Photo-Stationnaire

Eq	Equivalent
ETHOX	Ethoxzolamide
Et	Ethyle
FBDD	<i>Fragment Based Drug Discovery</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRET	<i>Förster Resonance Energy Transfer</i>
GdmHCl	<i>Guanidinium Hydrochloride</i>
GSH	Glutathion
h	Heure
Hb	Hémoglobine
Het	Hétérocycle
HMTA	Hexaméthylènetétramine
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
IC₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
IDE	<i>Insuline-Degrading Enzyme</i>
iPrOH	Isopropanol
K_D	Constante de dissociation
K_i	Constante d'inhibition
LBB	<i>Ligation Building-Block</i>
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
m-AChE	<i>mouse Acetylcholinesterase</i>
MK	Markovnikov
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
NaBH₄	Borohydrure de sodium
NAC	N-Acétyl-Cystéine
NAD⁺	Nicotinamide Adénine Dinucléotide +
Na₂S₂O₃	Thiosulfate de sodium
NBS	N-Bromosuccinimide
NH₃	Ammoniac
NH₄OAc	Acétate d'ammonium
NHS	N-hydroxysuccinimide

NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
PB	<i>Phosphate Buffer</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PFBN	Pentafluorobenzonitrile
PIQ	PhényltétrahydroIsoQuinoline
pH	Potentiel Hydrogène
pKa	Constante d'acidité
PNPA	<i>Para NitroPhenyl Acetate</i>
Pr	Propyle
Pyr	Pyridine
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RP-HPLC	<i>Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography</i>
SAS	<i>Substrate Activity Screening</i>
SAR	<i>Structure-activity-relationships</i>
SIM	<i>Single Ion Monitoring</i>
SNC	Système Nerveux Central
SPAAC	<i>Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
ta	Température ambiante
TBAF	Fluorure de tétrabutylaluminium
TCEP.HCl	Hydrochlorure de tris(2-carboxyéthyl)phosphine
TD-DFT	<i>Time-Dependent Density Functional Theory</i>
TEP	Tomographie par Emission de Positons
TFA	Acide trifluoroacétique
TGS	<i>Target Guided Synthesis</i>
TGSOF	<i>Target Guided Screening Of Fragments</i>
THF	Tétrahydrofurane
TMS	Triméthylsilyl-
tQ	Triple quadripôle
UV	Ultra-Violet

Introduction générale

L'accès à de nouvelles molécules bioactives est un défi majeur dans le domaine pharmaceutique. En effet, la découverte d'un médicament, de l'identification d'un principe actif à son approbation de mise sur le marché, est un parcours long et particulièrement coûteux. Ce procédé dure souvent dix à quinze ans, parfois même plus en fonction du type de molécule ou de la cible étudiée, et peut coûter jusqu'à plusieurs centaines de millions d'euros. Malheureusement, il n'existe pas de solutions faciles pour parvenir à l'amélioration de ce système. Cependant, certaines techniques sont capables de simplifier cette quête, notamment dans la phase de recherche exploratoire de molécules innovantes dans ce domaine. Parmi celles-ci, nous retrouvons la chimie combinatoire et le criblage à haut débit, mais leur coût reste particulièrement élevé et requiert des techniques complexes.

Afin de pallier ces différents problèmes, de nouvelles approches ont vu le jour, comme par exemple la synthèse contrôlée par la cible biologique sous contrôle cinétique (KTGS). Cette méthode repose sur l'utilisation de la cible biologique pour sélectionner les fragments précurseurs affins qui pourront alors réagir ensemble par proximité spatiale au sein de la cible par la mise en jeu de liaisons covalentes et irréversibles et conduire ainsi à un ligand affiné. Pour ne pas dénaturer la biomolécule, les réactions utilisées doivent être bioorthogonales ou au moins biocompatibles, c'est-à-dire capables de réagir dans des conditions physiologiques de température et pH. De plus, il est particulièrement difficile d'accéder à la fenêtre de réactivité idéale entre les deux fragments. En effet, si les fonctions portées par les deux fragments sont trop réactives, la réaction aura également lieu en l'absence de la cible biologique conduisant ainsi à des faux positifs. A l'inverse, si la vitesse de réaction est trop lente, des temps d'incubation élevés seront requis et pourront causer la précipitation voire dénaturation de la biomolécule d'intérêt. Ainsi, la concentration en ligand obtenue sera trop faible pour être détectée par les méthodes d'analyses les plus communes, conduisant ainsi à de faux négatifs.

Du fait de ces critères exigeants, peu de réactions ont pu être développées en KTGS à ce jour. Ainsi, notre but sera d'élargir la gamme de réactions éligibles en KTGS tout en tentant de pallier les problèmes souvent rencontrés dans ce domaine, notamment de faibles réactivités des réactions utilisées. Pour ce faire, ce manuscrit sera divisé comme suit :

- 1) Le premier chapitre présentera le processus de développement d'un médicament en abordant notamment les différentes étapes et méthodes utilisées pour parvenir à la découverte d'une molécule bioactive. L'accent sera mis plus particulièrement sur la KTGS, objet principal de ces travaux de thèse, c'est-à-dire les différents types de réactions décrites à ce jour ainsi que les avantages et inconvénients d'une telle approche.

- 2) Le deuxième chapitre sera centré sur l'étude de la réaction de thiol-yne en KTGS, et plus particulièrement sur l'amélioration des propriétés de photoisomérisation du ligand éther de thiovinyle obtenu.
- 3) Le troisième chapitre sera dédié à l'amélioration des propriétés d'absorbance du ligand éther de thiovinyle identifié au chapitre précédent, afin que la photoisomérisation puisse se faire dans le visible. Ce domaine spectral est d'une part moins délétère pour les systèmes biologiques et d'autre part compatible avec les lasers qui équipent la plupart des microscopes confocaux (405 nm, 488 nm, 552 nm, 638 nm) permettant l'imagerie cellulaire.
- 4) Enfin, le quatrième chapitre portera sur le développement d'une réaction photoactivable en KTGS afin d'accélérer les temps d'incubation tout en minimisant voire évitant l'obtention de ligand dans le blanc qui peut être sujet à des faux positifs si la formation n'est pas suffisamment accélérée par la cible biologique.

Ces travaux de thèse ont été réalisés entre le 1^{er} décembre 2020 et le 30 novembre 2023 au sein du laboratoire COBRA (UMR CNRS 6014) à l'Université de Rouen-Normandie, au sein de l'équipe de Chimie Bioorganique. Cette thèse a été dirigée par le Dr. Cyrille SABOT (directeur de recherche, CNRS) et le Pr. Pierre-Yves Renard (professeur, Université de Rouen Normandie). Ce projet a été financé grâce à la région Normandie (RIN doctorant 100%) sous l'acronyme « PhotoBioAssembly » (CODE 2020-R100-20).

Chapitre 1 : Introduction bibliographique

1. De la molécule biologiquement active au développement d'un médicament

1.1. Etapes du développement d'un médicament

Un médicament est, pour la plupart d'entre eux, une substance ou préparation capable de traiter ou de prévenir une maladie. Dans le domaine de la recherche et du développement, il s'agit d'un principe actif formulé avec des excipients afin de faciliter son absorption dans l'organisme et améliorer sa durée de conservation. Derrière ce concept se cache un processus long, fastidieux, et même coûteux. En effet, le défi que doit relever l'industrie pharmaceutique est de découvrir de nouveaux principes actifs et de nouvelles cibles thérapeutiques afin de parvenir au traitement de nombreuses maladies, tout en conservant un avantage financier. Or, les différentes étapes nécessaires au développement d'un médicament avant sa mise sur le marché durent en général 15 à 20 ans (Figure 1).

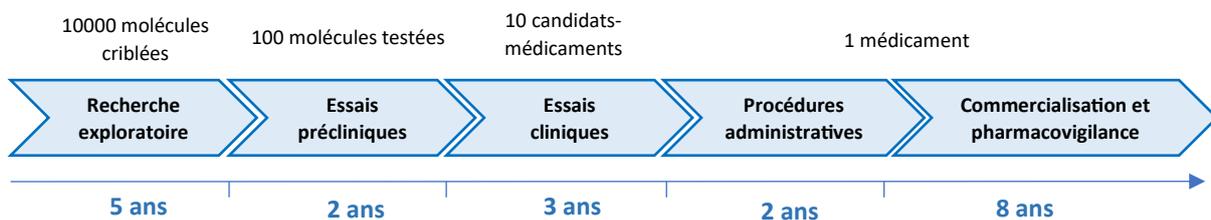


Figure 1 : Etapes nécessaires au développement d'un médicament

Sur la période de recherche exploratoire, il faut identifier une cible thérapeutique impliquée dans la pathologie visée afin de pouvoir concevoir la structure d'un futur principe actif interagissant avec cette biomolécule afin d'éliminer la pathologie. De nombreux tests biologiques sont effectués à partir d'une grande chimiothèque de molécules déjà synthétisées afin de parvenir aux *hits*, c'est-à-dire des molécules biologiquement actives pour la cible d'intérêt. Par la suite, ces molécules sont optimisées de façon à améliorer leurs propriétés biologiques et pharmacologiques. Leur squelette est donc modifié jusqu'à parvenir aux *leads*, à savoir les molécules les plus actives vis-à-vis de la cible thérapeutique. Ce procédé dure en général cinq ans.

Par la suite s'ensuit une nouvelle étape comprenant les différentes études précliniques et cliniques à réaliser sur les candidats-médicaments. Dans un premier temps, la phase préclinique vise à tester les *leads* sur des modèles animaux, d'abord pour confirmer leur activité, mais pour également

identifier les potentiels effets indésirables des molécules. Si ces derniers sont correctement tolérés, ils passent ensuite en évaluation clinique, composée de trois nouvelles phases.

La phase I est menée sur une petite population d'humains volontaires sains ou malades en fonction de la molécule évaluée. Celle-ci est testée pour la première fois afin d'observer son évolution dans l'organisme après son ingestion (pharmacocinétique) et d'évaluer sa toxicité pour ainsi déterminer la dose maximale administrable chez l'Homme.

La phase II permet de déterminer l'efficacité de la molécule chez des volontaires malades. L'objectif est d'accéder, dans un premier temps, à la dose maximale d'efficacité du médicament pour laquelle les effets indésirables sont inobservables ou minimales. Dans un second temps, cette dose est administrée à plusieurs personnes malades pour parvenir à une activité thérapeutique.

Enfin, la phase III, ou dernière phase avant la mise sur le marché, permet de tester le médicament sur un nombre plus large de patients afin de déterminer le rapport bénéfice/risque du traitement. En général, cette phase est la plus longue car les effets sont observés sur plusieurs années. Les volontaires sont généralement séparés en deux groupes afin de comparer l'efficacité du médicament à un traitement de référence ou à un placebo, ce dernier étant un traitement ne contenant pas de principe actif donné à titre expérimental dans le but de vérifier les effets psychologiques de la médication. Si les résultats sont probants, une demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) peut alors être déposée. Si le médicament est jugé comme suffisamment sûr et efficace pour en permettre sa commercialisation, celui-ci devient disponible sur le marché. Une phase de pharmacovigilance est également mise en place de façon à détecter tout effet secondaire grave et inattendu lors d'une prise sur un plus long terme. En moyenne, seuls cinq produits étudiés en laboratoire sur 4000 atteignent le stade de l'expérimentation clinique, et seul un médicament sur cinq étudiés chez les humains sera autorisé et prescrit.

Au moment où la production à grande échelle est lancée, plus de 15 ans peuvent s'être écoulés depuis les débuts de la recherche, pour un coût s'élevant à plusieurs centaines de millions d'euros. De plus, le taux d'échecs lors des études précliniques et cliniques est important, ce qui génère un coût supplémentaire non négligeable pour les industries pharmaceutiques. De ce fait, il est nécessaire de faciliter au mieux la démarche et les stratégies pour parvenir à un nouveau médicament par le biais d'outils robustes.

1.2. Vers la découverte du principe actif

1.2.1. Le criblage à haut-débit (HTS)

Le criblage à haut-débit est une stratégie utilisée pour mettre en évidence des molécules actives vis-à-vis d'une biomolécule ou d'un processus biologique d'intérêt, et ce à partir d'une librairie de 10^4 à 10^6 structures au faible poids moléculaire, c'est-à-dire en général inférieur à 500 Da¹. Plusieurs paramètres sont considérés afin de former la chimiothèque, tous répondant à la règle des cinq de Lipinski², ces caractéristiques étant associés à leur potentiel à devenir un médicament, par exemple :

- Leur masse molaire, majoritairement inférieure à 500 Da,
- Leur hydrophobicité, caractère important pour leur solubilité et leur biodisponibilité,
- Le nombre d'accepteurs ou de donneurs de liaisons hydrogène,
- L'absence de fonctions chimiques très réactives et hépatotoxiques.

A partir de cela, les collections de molécules sont réalisées en fonction de leurs similitudes puis testées une première fois sur la cible d'intérêt (stratégie basée sur la cible) ou sur une cellule/un organisme (stratégie basée sur le phénotype)³. Pour augmenter la chance d'avoir une molécule active, il est important d'avoir des chimiothèques les plus diverses et les plus grandes possibles, sans mentionner les critères de propriété intellectuelle, cruciaux pour les entreprises. Après un premier criblage, les *hits* identifiés sont confirmés puis resynthétisés afin de les retester et valider leur pureté. Plusieurs méthodes de détection spectroscopiques peuvent être utilisées pour cribler l'affinité de ces molécules, à savoir des méthodes basées sur la fluorescence, l'absorbance, et la bioluminescence pour les plus communes, mais aussi l'électrophysiologie⁴. En fonction de la méthode de criblage effectuée, les premiers *hits* sont validés par méthode différente. Enfin, l'activité de la molécule est déterminée par le biais d'un calcul de IC₅₀.

¹ V. Blay, B. Tolani, S. P. Ho, M. R. Arkin, *Drug Discovery Today* **2020**, 25, 1807–1821.

² C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 46, 3–26.

³ H. Deng, Q. Lei, Y. Wu, Y. He, W. Li, *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, 191, 112151.

⁴ M. S. Attene-Ramos, C. P. Austin, M. Xia, in *Encyclopedia of Toxicology*, Elsevier, **2014**, pp. 916–917.



Figure 2 : Plateforme de criblage à haut débit (source : www.ibisa.net)

Le criblage à haut débit étant capable de cribler plus de 100000 échantillons par jour, l'utilisation d'un robot et d'un processeur de données automatisé est essentiel (Figure 2). En général, les tests sont donc effectués sur des plaques 96-, 384- ou 1536-puits.

Malgré les nombreux avantages du criblage à haut débit, cette méthode utilise des outils particulièrement onéreux. De plus, il est nécessaire de détenir un nombre très important de molécules, synthétisées ou extraites de produits naturels, ce qui demande un réel travail en amont. Enfin, cette technologie peut être à l'origine de faux positifs et négatifs du fait d'interférences associées aux propriétés physiques des molécules testées en solution, à savoir l'auto-fluorescence, l'absorption ou encore l'agrégation du composé dans le puits.

1.2.2. La chimie combinatoire

La chimie combinatoire repose sur un principe basé sur la réaction simultanée de plusieurs composés de type A avec plusieurs composés de type B et C, chacune de ces classes de molécules ne réagissant pas entre eux. Un mélange exponentiel de produits est donc obtenu présentant toutes les combinaisons possibles A-B-C (Schéma 1). Ces mélanges sont ensuite testés sur une cible biologique sans purification ni analyse poussée de façon à y déterminer une éventuelle activité. Dans les cas positifs, une étape de déconvolution est entreprise, c'est-à-dire que l'on cherche à identifier le composé responsable de l'activité dans le mélange. Grâce à cette méthode, une librairie de plus de 1 million de composés peut être obtenue facilement et rapidement⁵. Cette méthode est également réalisée *in silico* de façon à simuler toutes les structures possibles d'un potentiel pharmacophore à partir des réactifs mis en œuvre⁶. Il reste que la diversité moléculaire est restreinte par le type de liaisons qui sont constitutives des réactions permettant de construire la librairie.

⁵ R. Liu, X. Li, K. S. Lam, *Current Opinion in Chemical Biology* **2017**, 38, 117–126.

⁶ A. Rasheed, R. Farhat, *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2013**, 4, 2502-2516.

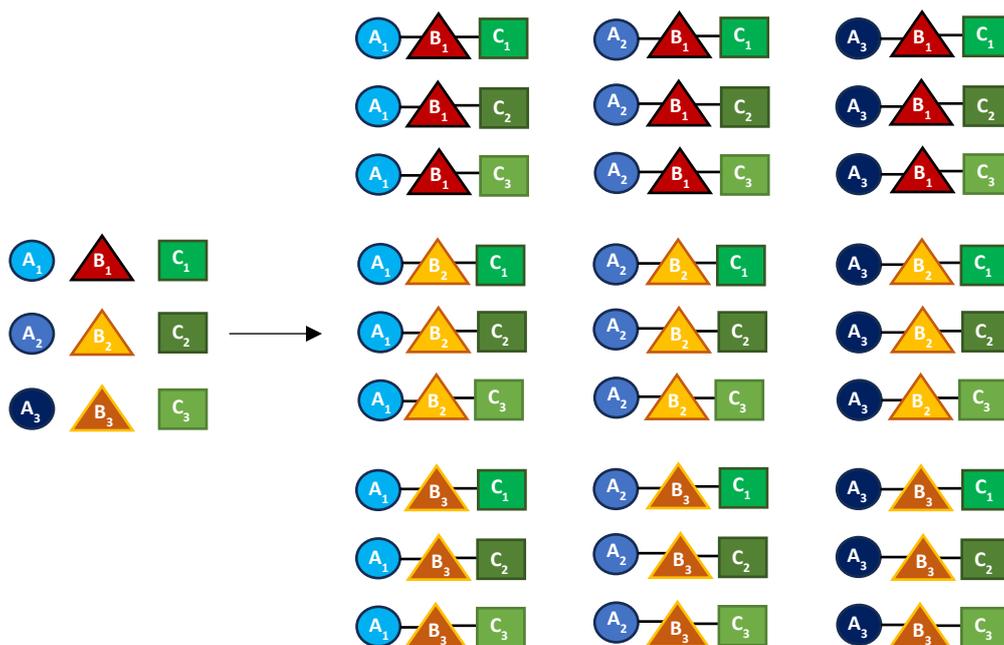


Schéma 1 : Principe de la chimie combinatoire

La chimie combinatoire a d'abord émergé sur phase supportée afin de créer une collection d'oligomères (peptides, oligonucléotides, oligosaccharides) comme par exemple la méthode « *one bead one compound* » de Knapp⁷ ou « *divide-recombine* » de Furka⁸. Dans ces méthodes, un support solide est divisé en plusieurs portions, et chaque portion est combinée à un unique réactif. Après réaction, ces portions individuelles sont lavées puis recombinaées. L'ensemble est mélangé et de nouveau divisé en différentes portions. Le processus est répété jusqu'à obtenir un mélange complexe de différents produits.

Cette méthode a été largement utilisée puis adaptée, notamment par Houghten et ses collaborateurs, de façon à générer une chimiothèque importante de polypeptides⁹. L'utilisation de supports solides se voit utile notamment pour séparer les produits supportés sur billes des excès de réactifs engagés. Cependant, seuls certains composés peuvent être supportés, ce qui limite l'approche. Par ailleurs, il est difficile de suivre la progression de la réaction lorsque le substrat et le produit sont attachés à la phase solide. De ce fait, certains groupes ont développé des bibliothèques de composés en solution, mais la purification des mélanges complexes obtenus est particulièrement difficile sans l'utilisation de systèmes automatisés sophistiqués. De plus, il est difficile de réaliser des synthèses plus complexes à partir de mélanges, et de nombreux faux positifs sont obtenus lors des étapes de

⁷ K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82–84.

⁸ Á. Furka, *Drug Discov. Today*, **2002**, *7*, 1–4.

⁹ R. A. Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1985**, *82*, 5131–5135.

déconvolution. Pour éviter cette problématique, des robots ont été élaborés afin de réaliser chacune de ces combinaisons individuellement et d'identifier directement les composés actifs.

La chimie combinatoire est largement associée au criblage à haut débit, qui peut par la suite tester en un temps record l'ensemble des produits formés. Cependant, ce processus reste très onéreux et le résultat obtenu nécessite toujours une nouvelle évaluation.

1.2.3. La conception de médicaments par la méthode des fragments (FBDD)

Une nouvelle approche, la conception de médicaments par la méthode des fragments (*Fragment-Based Drug Design*, FBDD), fait son apparition à la fin des années 1990 et apparaît aujourd'hui comme l'une des méthodes incontournables pour parvenir à un candidat-médicament dans le cas de cibles thérapeutiques complexes¹⁰ (Schéma 2). Celle-ci repose sur le criblage de petites molécules organiques de faible masse moléculaire. Ces petites molécules sont appelées fragments car elles ne constituent en général qu'une partie des molécules thérapeutiques. Ces fragments reposent sur des critères physico-chimiques rassemblés dans la « règle de trois » développée par Jhoti et ses collaborateurs¹¹ (par analogie à la « règle des cinq » de Lipinski²) sur la solubilité et la perméabilité dans la découverte de molécules à finalité thérapeutique. Pour rappel, la « règle des cinq » repose sur ces principes dans le but de favoriser l'absorption orale du principe actif :

- La molécule ne doit pas avoir plus de cinq donneurs de liaisons hydrogène,
- Elle ne doit pas avoir plus de dix accepteurs de liaisons hydrogène,
- Sa masse moléculaire doit être inférieure ou égale à 500 Da,
- Le logarithme du rapport des concentrations de la molécule étudiée dans l'octanol et dans l'eau, appelé logP, doit être inférieur à cinq,
- Les composés étant des substrats de transporteurs biologiques font exception à cette règle.

La « règle des trois », quant à elle, repose sur des principes similaires multiples de trois :

- La masse moléculaire du fragment doit être inférieure ou égale à 300 Da,
- Son nombre de donneurs/accepteurs de liaisons hydrogène ne doit pas excéder trois,
- Son logP doit être inférieur ou égal à trois,
- Son nombre de liaisons rotatives doit être inférieur ou égal à trois,

¹⁰ a) I. Krimm, *Med. Sci. (Paris)* **2015**, *31*, 197–202 ; b) A. Bancet, C. Raingeval, T. Lomberget, M. Le Borgne, J.-F. Guichou, I. Krimm, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 11420–11435 ; c) E. V. Bedwell, W. J. McCarthy, A. G. Coyne, C. Abell, *Chemical Biology & Drug Design* **2022**, *100*, 469–486.

¹¹ M. Congreve, R. Carr, C. Murray, H. Jhoti, *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 876–7.

- Sa surface polaire (à savoir la surface des atomes polaires) doit être inférieure ou égale à 60.

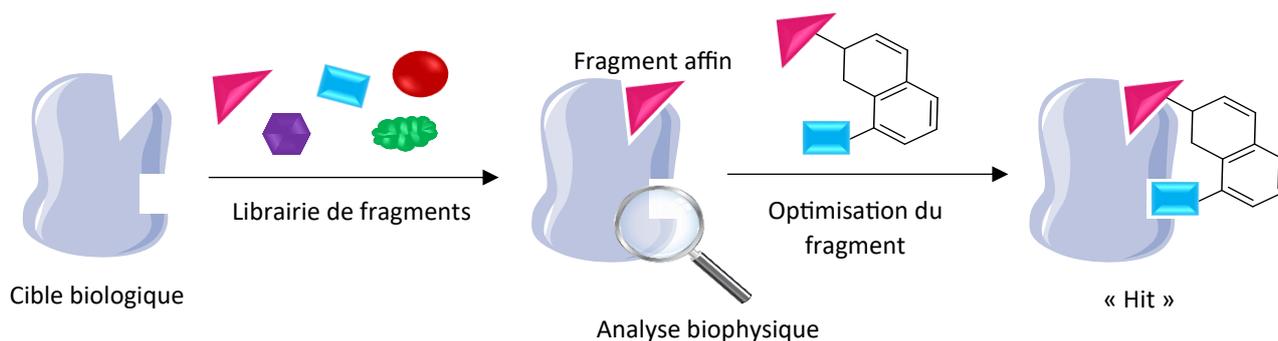


Schéma 2 : Principe de la FBDD

Ces fragments vont être criblés pour leur interaction avec une cible thérapeutique spécifique et serviront de point de départ pour élaborer un *lead*, en associant plusieurs fragments. En l'état, ces petits fragments n'ont pas de réelles affinités avec la biomolécule, mais plutôt des interactions de haute qualité avec la cible biologique. Celles-ci se basent sur leur efficacité de liaison, correspondant à l'énergie de liaison du complexe divisée par le nombre d'atomes de la molécule sans compter les hydrogènes¹². Cette valeur permet de comparer et relativiser l'affinité des molécules par rapport à leur taille. Cette stratégie permet de diminuer la masse molaire des principes actifs qui a tendance à augmenter au cours des décennies, posant des problèmes de biodisponibilité *in vivo*. Les méthodes de détection de ces faibles affinités doivent être sensibles. En effet, en comparaison des tests réalisés sur criblage à haut débit, de plus grandes concentrations en fragments sont requises pour compenser leur faible affinité. Ceci pose le problème supplémentaire de solubilité des fragments testés qui doivent être convenablement choisis pour demeurer hydrosolubles à de fortes concentrations.

Parmi les différentes méthodes de détection développées, la cristallographie aux rayons X est une technique de choix car elle permet de valider l'affinité avec la cible tout en apportant des informations structurales précises quant à la nature des interactions mises en jeu et au positionnement du fragment dans la cible, ce qui permet d'associer les fragments de façon plus rationnelle. Cependant, cela requiert un appareillage particulièrement coûteux et une mise en œuvre parfois délicate dépendamment de la biomolécule ciblée (dont la structure tridimensionnelle doit avoir été résolue avec une précision de quelques angströms). De ce fait, d'autres approches sont utilisées, telle que la résonance magnétique nucléaire (RMN) qui permet également de mettre en évidence le site de fixation du fragment sur la cible, tout en quantifiant les interactions en vue d'établir par exemple des relations structure-activité (*Structure-activity-relationships* SAR by NMR). D'autres techniques telles que la

¹² A. L. Hopkins, C. R. Groom, A. Alex, *Drug Discov. Today* **2004**, 9, 430–1.

résonance plasmonique de surface, la spectrométrie de masse (MS), la titration calorimétrique isotherme, la fluorimétrie différentielle à balayage (*Differential Scanning Fluorimetry*, DSF), le criblage virtuel ou encore la chromatographie à faible affinité peuvent aussi être utilisées¹³. En première approximation, on considère qu'un fragment mérite plus d'attention si sa constante de dissociation (K_D) se situe en deçà du millimolaire.

Une fois les fragments intéressants identifiés, des analogues souvent commercialement disponibles vont être également testés afin d'affiner la nature des interactions entre la biomolécule et le fragment et ainsi développer un candidat-médicament valable. Il existe trois grandes approches pour augmenter le caractère affin et actif du fragment envers la biomolécule (Schéma 3) :

- Evolution du fragment : Plusieurs groupements vont être ajoutés au fragment de façon à le rendre plus affin et actif envers la cible thérapeutique. C'est la méthode la plus commune pour parvenir à un candidat-médicament.
- Fusion des fragments : Elle est utilisée si deux poches du site actif identifiées par FBDD sont voisines l'une de l'autre et partagent des parties communes. Cette approche est la moins courante, elle consiste à combiner deux fragments (chacun identifié via ses interactions avec une des deux poches) dont les motifs se chevauchent pour générer un seul ligand hybride plus affin.
- Liaison des fragments : C'est la stratégie la plus attrayante mais qui reste assez rare. En effet, celle-ci requiert la jonction de deux fragments connus pour se lier à des poches du site différentes. Ainsi le composé issu de la jonction entre les deux fragments aura une énergie de liaison (énergie libre de Gibbs) aussi bonne voire meilleure que la somme des énergies de liaison de chaque fragment pris individuellement (effet de superadditivité)¹⁴.

¹³ D. E. Scott, A. G. Coyne, S. A. Hudson, C. Abell, *Biochemistry* **2012**, *51*, 4990–5003.

¹⁴ W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, *78*, 4046–4050.

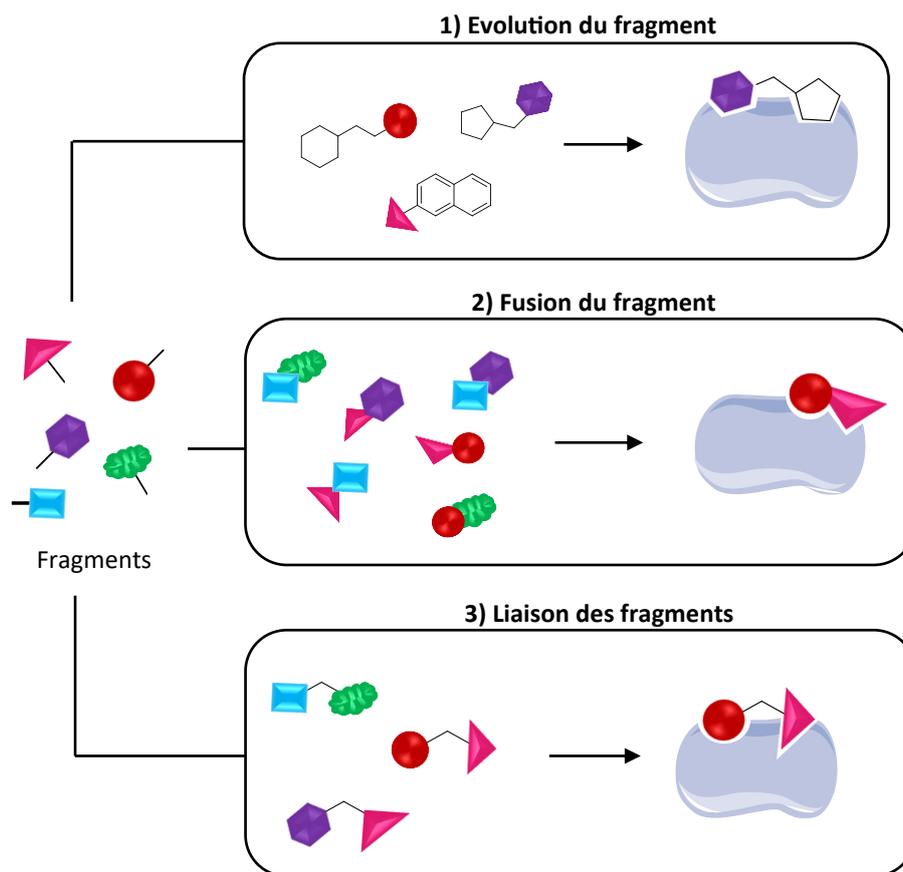


Schéma 3 : Approche par 1) Evolution du fragment, 2) Fusion des fragments, 3) Liaison des fragments

Là où une librairie traditionnelle de 500000 à 1 million de composés doit être synthétisée puis criblée pour parvenir à un *hit*, la FBDD ne nécessite qu'une librairie de 1000 fragments. Cette méthode est donc robuste et plus accessible pour les laboratoires académiques dont les moyens humains et financiers sont généralement plus limités. Le premier médicament issu de l'approche par fragments a été accepté par la FDA (*Food and Drug Administration*) en 2011. Il s'agit du Vemurafenib (Figure 3), molécule utilisée pour le traitement de mélanomes en phase avancée¹⁵.

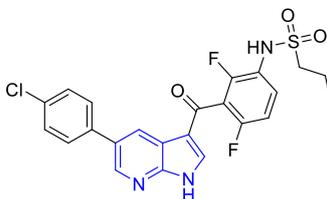


Figure 3 : Structure chimique du Vemurafenib issu du fragment 7-azaindole représenté en bleu

La FBDD, bien que prometteuse, a également ses limites. En effet, cette approche nécessite une quantité importante de cible thérapeutique, les interactions entre les fragments et cette dernière étant particulièrement faibles et difficiles à détecter. Un équipement de détection de pointe doit

¹⁵ J. Tsai, J. T. Lee, W. Wang, *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 3041–6.

également être utilisé, ce qui limite l'accès à cette approche. Pour finir, la FBDD ne donne pas d'accès direct à l'optimisation idéale d'un fragment affin pour parvenir à un candidat-médicament¹⁶.

1.2.4. Synthèse assistée par la cible biologique

Une autre approche permettant d'accéder à des molécules bioactives se base sur la synthèse assistée par la cible biologique, procédé dans lequel la biomolécule, cible thérapeutique est directement impliquée dans le processus de sélection, la stabilisation ou l'assemblage des ligands potentiels formés *in situ* à partir de fragments présents dans le milieu réactionnel¹⁷.

La réaction de formation du ligand en présence de la cible biologique peut être réversible ou irréversible en fonction de la nature de la réaction de ligation mise en jeu : la chimie combinatoire dynamique (*Dynamic Combinatorial Chemistry*, DCC) est sous contrôle thermodynamique, la formation du ligand est réversible et se fait sans l'assistance de la cible, mais l'équilibre entre les différentes espèces est déplacé si l'une des associations a une forte affinité pour la cible ; la synthèse guidée par la cible biologique (*Kinetic Target Guided Synthesis*, KTGS) est sous contrôle cinétique, elle permet d'identifier le ligand qui est formé *in situ* à partir de liaisons irréversibles entre les deux fragments affins au sein de la cible biologique d'intérêt, cette liaison se faisant très lentement voire pas en absence de la cible.

1.2.4.1. La chimie combinatoire dynamique (DCC)

La chimie combinatoire dynamique a été introduite par I. Huc et J.-M. Lehn en 1997¹⁸. Celle-ci repose sur la génération de molécules par l'interaction réversible d'un mélange de fragments (Schéma 4). Pour ce faire, les fragments aux réactivités complémentaires sont mélangés au sein d'une chimiothèque de molécules appelée librairie combinatoire dynamique (*Dynamic Combinatorial Library*, DCL) et le mélange ainsi formé est à l'équilibre thermodynamique. En effet, les différents fragments de la librairie interagissent entre eux par le biais de liaisons réversibles jusqu'à former les ligands les plus stables et ainsi atteindre un minimum thermodynamique. La composition de cet équilibre va dépendre des conditions externes appliquées à ce mélange et va se modifier si ces

¹⁶ M. F. Schmidt, J. Rademann, *Trends in Biotechnology* **2009**, 27, 512–521.

¹⁷ S. K. Mamidyala, M. G. Finn, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1252.

¹⁸ I. Huc, J.-M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94, 2106–2111.

conditions changent¹⁹. De ce fait, tous les paramètres tels que la biocompatibilité, le pH, la température, la solubilité et la stabilité peuvent avoir un impact significatif sur l'équilibre obtenu²⁰.

L'ajout d'une biomolécule à ce mélange à l'équilibre va favoriser la formation d'un nouvel équilibre selon le principe de Le Chatelier, en faveur du ou des ligands qui présentent de bonnes interactions avec la cible, on parle alors d'amplification²¹. La cible biologique peut être introduite pendant la formation de la librairie de ligands, ce qui donne lieu à une « DCC adaptive », ou après que la DCL a été établie, méthode appelée « DCC pré-équilibrée ». L'avantage de cette dernière est le fait que les conditions réactionnelles nécessaires à l'obtention de la librairie (pH, température, solubilité dans l'eau) n'ont pas spécialement besoin d'être tolérées par la cible. En revanche, avant de réaliser l'analyse du milieu réactionnel, l'équilibre doit être impérativement figé par des techniques physiques (congélation, centrifugation) ou chimiques (réduction, augmentation du pH, dénaturation de la cible) afin d'éviter une nouvelle évolution de cet équilibre.

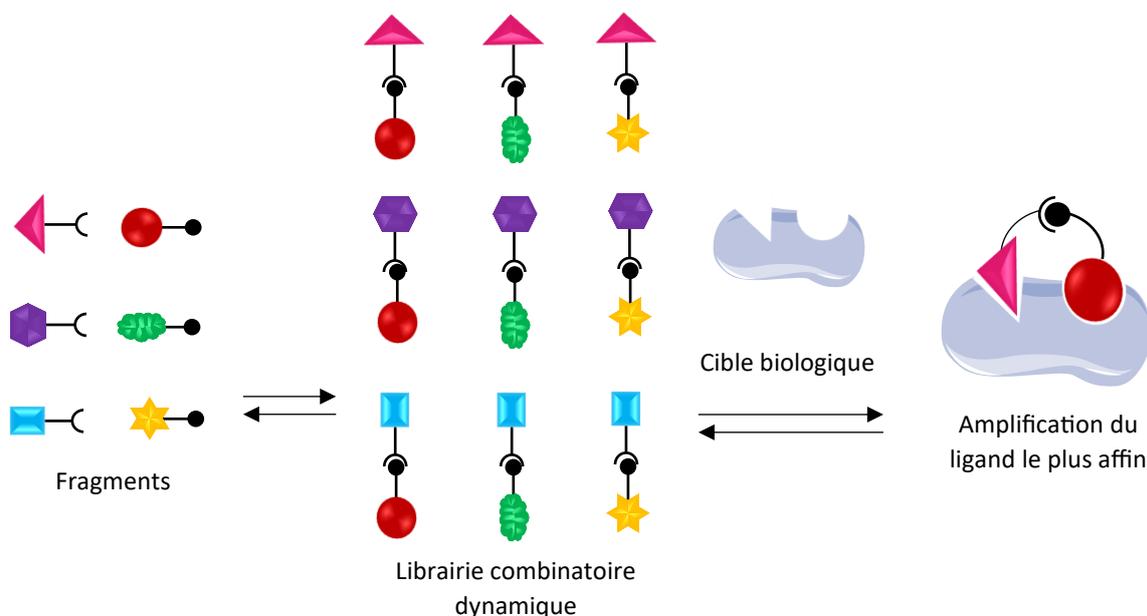


Schéma 4 : Principe de la DCC

L'amplification d'un ligand est déterminée en comparant la distribution de la DCL obtenue avant et après l'ajout de la cible biologique. Une fois l'équilibre figé, les différentes techniques d'analyse utilisées sont la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse, la spectroscopie RMN et de fluorescence ou encore la cristallographie par diffraction des rayons X.

¹⁹ A. Herrmann, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 1899–1933.

²⁰ A. M. Hartman, R. M. Gierse, A. K. H. Hirsch, *European J. Org. Chem.* **2019**, 2019, 3581–3590.

²¹ O. Ramström, J.-M. Lehn, *ChemBioChem* **2000**, 1, 41–48.

Bien que la DCC ait démontré son efficacité à bien des égards, cette méthode est limitée d'une part par la nécessité de devoir figer l'équilibre en fin de réaction et d'autre part par une analyse délicate du milieu réactionnel suite à la faible amplification du ou des ligands affins²².

Afin de pallier ces problèmes, Rademann et ses collaborateurs ont imaginé une nouvelle technique dite de criblage par couplage dynamique (DLS), basé sur la DCC combinée à la détermination de l'activité biologique du ligand formé²³.

Cette approche a été démontrée sur la protéase principale du SARS coronavirus dont le site actif est constitué de deux sous-cavités (Schéma 5). Un fragment aldéhyde peptidique affiné de la protéase du SARS coronavirus a été incubé avec différents nucléophiles aminés (en mélange monocomposant) en vue de favoriser la formation de ligands de type imine *in situ* stabilisés par la cible biologique. L'activité biologique résultante de la cible est alors déterminée *via* un substrat peptidique fluorogénique constitué d'une 7-amidocoumarine dont la fluorescence est désactivée par la présence du groupement électroattracteur sur l'aniline, ce qui diminue l'effet *push-pull* à l'origine de la fluorescence des 7-aminocoumarines. Ce pseudo-substrat peut être clivé par l'enzyme pour redonner la 7-aminocoumarine (clivage de la liaison amide), fluorescente. En l'absence d'un ligand affiné pour la cible, la sonde génère un signal de fluorescence correspondant à la vitesse initiale maximale (V_{max}) de l'enzyme pour le clivage de ce pseudo-substrat amide. En revanche, plus les ligands imines formés *in situ* sont affins pour la cible, moins l'enzyme sera capable de cliver la liaison amide, et donc plus le retour de la fluorescence est lent.

Cette méthode ne nécessite ni de figer l'équilibre ni d'analyser le milieu réactionnel. De plus, celle-ci ne requiert pas de grandes quantités de la biomolécule car seule une catalyse enzymatique permet d'activer la propriété fluorescente en question. En revanche, seule la famille des protéases a donné des résultats probants en DLS jusqu'à présent, comme avec la protéase aspartique β -secrétase (BACE-1)²⁴. Cette technique doit donc être généralisée pour être considérée comme un outil puissant et robuste dans le domaine de l'approche par fragments.

²² M. Y. Unver, R. M. Gierse, H. Ritchie, A. K. H. Hirsch, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 9395–9409.

²³ M. F. Schmidt, A. Isidro-Llobet, M. Lisurek, A. El-Dahshan, J. Tan, R. Hilgenfeld, J. Rademann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3275–3278.

²⁴ M. I. Fernández-Bachiller, A. Horatscheck, M. Lisurek, J. Rademann, *ChemMedChem* **2013**, *8*, 1041–1056.

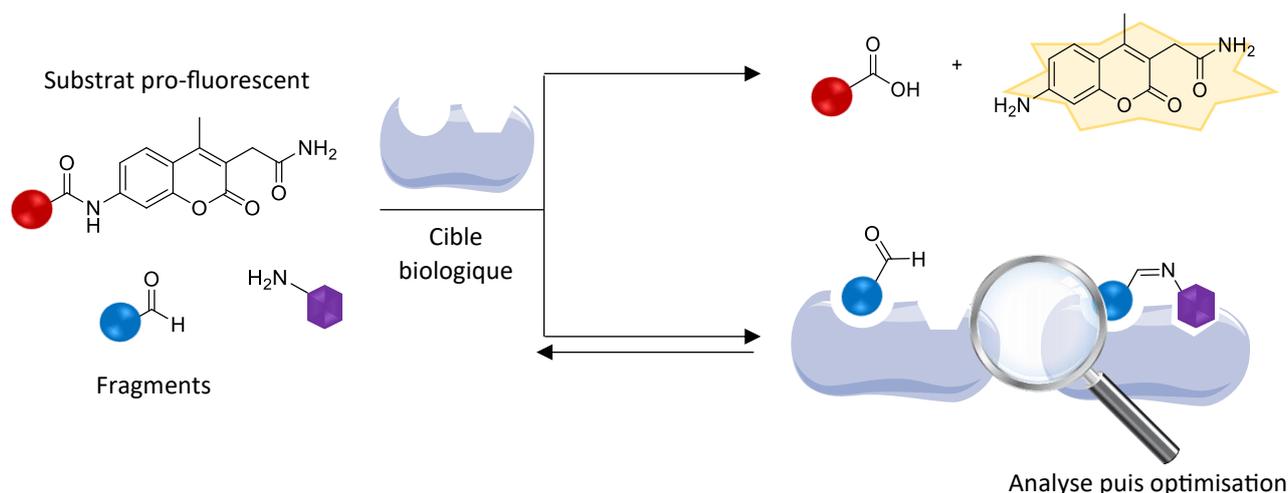


Schéma 5 : Concept de criblage par couplage dynamique

1.2.4.2. La synthèse guidée par la cible sous contrôle cinétique (KTGS)

La KTGS est une stratégie puissante qui met la cible biologique au centre de l'approche par fragments (Schéma 6). En effet, la biomolécule est utilisée pour assembler son propre ligand ou inhibiteur par la formation d'une liaison covalente irréversible entre deux fragments de réactivité complémentaire. Cette stratégie repose sur le fait que leur proximité spatiale au sein de la cible biologique accélère la ligation entre ces fragments à l'aide de contributions entropiques et enthalpiques. Cette méthode ne requiert pas la synthèse et purification d'une librairie de composés, ni le criblage des ligands finaux. Une réaction en présence et en l'absence de la cible biologique sera simplement mise en œuvre afin de déterminer la cinétique associée à chaque expérience et ainsi valider le caractère KTGS de la ligation. De ce fait, cette méthode est un outil très puissant face aux autres techniques au cœur de l'approche par fragments.

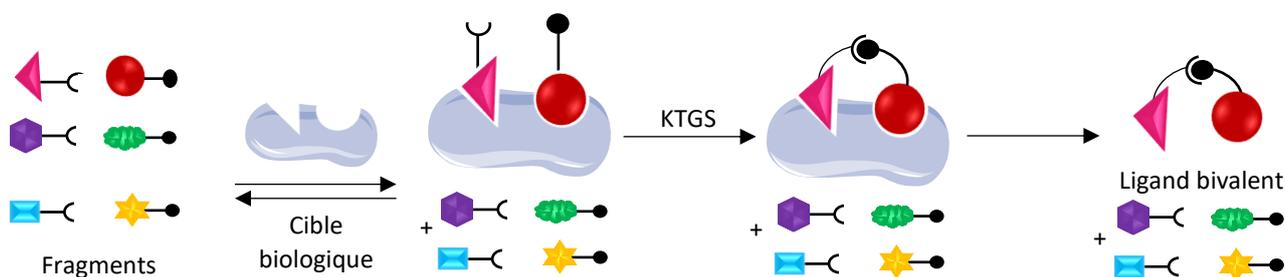


Schéma 6 : Principe de la synthèse guidée par la cible sous contrôle cinétique

2. La KTGS, outil de choix pour la découverte de molécules actives

Le premier exemple de KTGS fut découvert par hasard par l'équipe de Chase et Tubbs en 1969²⁵ (Schéma 7). Souhaitant initialement modifier les résidus près du site actif de la carnitine acétyltransférase (CAT), ils ont remarqué que cette enzyme pouvait être totalement inhibée après ajout successif de la coenzyme-A réduite (CoASH) puis de la bromoacétyl carnitine (BrAcCn). En effet, la BrAcCn étant électrophile et le CoASH nucléophile, une substitution nucléophile a lieu au sein de la cible biologique formant ainsi le ligand CoASAcCn très affiné pour la cible. De plus, ces auteurs ont pu mettre en évidence l'accélération drastique de la cinétique de cette substitution nucléophile en présence de la cible biologique, celle-ci se déroulant en seulement quelques secondes contre plus de 90 minutes en l'absence de la protéine. L'accélération de cette réaction peut donc être attribuée à la faculté que possède la biomolécule de rapprocher spatialement les deux fragments et de les positionner favorablement pour que la S_N2 puisse avoir lieu, diminuant l'énergie d'activation de la réaction, et donc l'accélérateur.

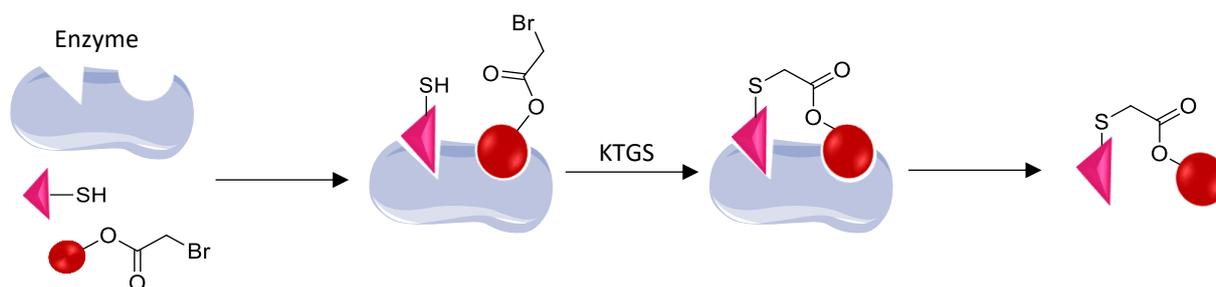


Schéma 7 : Première KTGS développée par Chase et Tubbs

Depuis cette découverte, la définition et les propriétés associées à la KTGS ont pu être affinées. En effet, afin de parvenir à cette ligation, différents critères doivent être respectés :

- La cible biologique d'intérêt doit avoir au moins deux sites d'interaction proches afin que les fragments qui interagissent avec chacun d'eux puissent bénéficier de leur proximité spatiale pour réagir préférentiellement. A noter qu'il est également plus souhaitable d'avoir un ligand dit « ancre », c'est-à-dire de bonne affinité pour la cible, afin d'optimiser les chances de succès de la KTGS.

- La ligation doit être biocompatible, voire bioorthogonale²⁶, c'est-à-dire qu'elle ne doit pas interférer avec les fonctions chimiques naturellement portées par la biomolécule.

²⁵ J. F. A. Chase, P. K. Tubbs, *Biochem. J.*, **1969**, *111*, 225–235.

²⁶ E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.

- L'état de transition réactionnel et le ligand formé doivent être relativement proches électroniquement et stériquement afin de permettre à la ligation de s'établir et ainsi conduire à un ligand affiné pour la cible biologique²⁷.

- Le lien formé à l'issue de la ligation doit être stable et irréversible dans les conditions physiologiques de KTGS et lors de l'analyse du produit formé (ou conduire à des fragments identifiables en spectrométrie de masse).

- La réaction doit être lente, voire ne pas avoir lieu en l'absence de la cible biologique.

- Le ligand formé possède en général une affinité supérieure à la somme des affinités des fragments, une caractéristique de la FBDD (effet de superadditivité).

A partir de ces différents critères contraignants, seulement 18 réactions différentes ont été utilisées en KTGS et reposent sur la formation de liaisons C-S, C-N, C-C ou enfin C-C combinées avec C-N²⁸.

2.1. Les différents types de réactions décrites en KTGS

Depuis la première découverte de Chase et Tubbs dans le domaine de la KTGS, le nombre de réactions éligibles en KTGS a augmenté de manière peu constante dans le temps. En effet, il faudra attendre 21 ans avant que la seconde réaction éligible à la KTGS voie le jour. Afin de présenter au mieux les différentes liaisons obtenues en KTGS jusqu'à aujourd'hui, celles-ci seront classées par type de liaison covalente formée (Schéma 8). A l'issue de la présentation des différentes réactions ayant été utilisées en KTGS, nous soulignerons ses aspects pratiques, sa place en chimie thérapeutique et ses limites.

²⁷ D. Bosc, J. Jakhilal, B. Deprez, R. Deprez-Poulain, *Future Medicinal Chemistry* **2016**, *8*, 381–404.

²⁸ a) X. Hu, R. Manetsch, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1316–1324 ; b) E. Oueis, C. Sabot, P.-Y. Renard, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 12158–12169 ; c) D. Bosc, V. Camberlein, R. Gealageas, O. Castillo-Aguilera, B. Deprez, R. Deprez-Poulain, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 3817–3833 ; d) P. T. Parvatkar, A. Wagner, R. Manetsch, *Trends in Chemistry* **2023**, S2589597423001454.

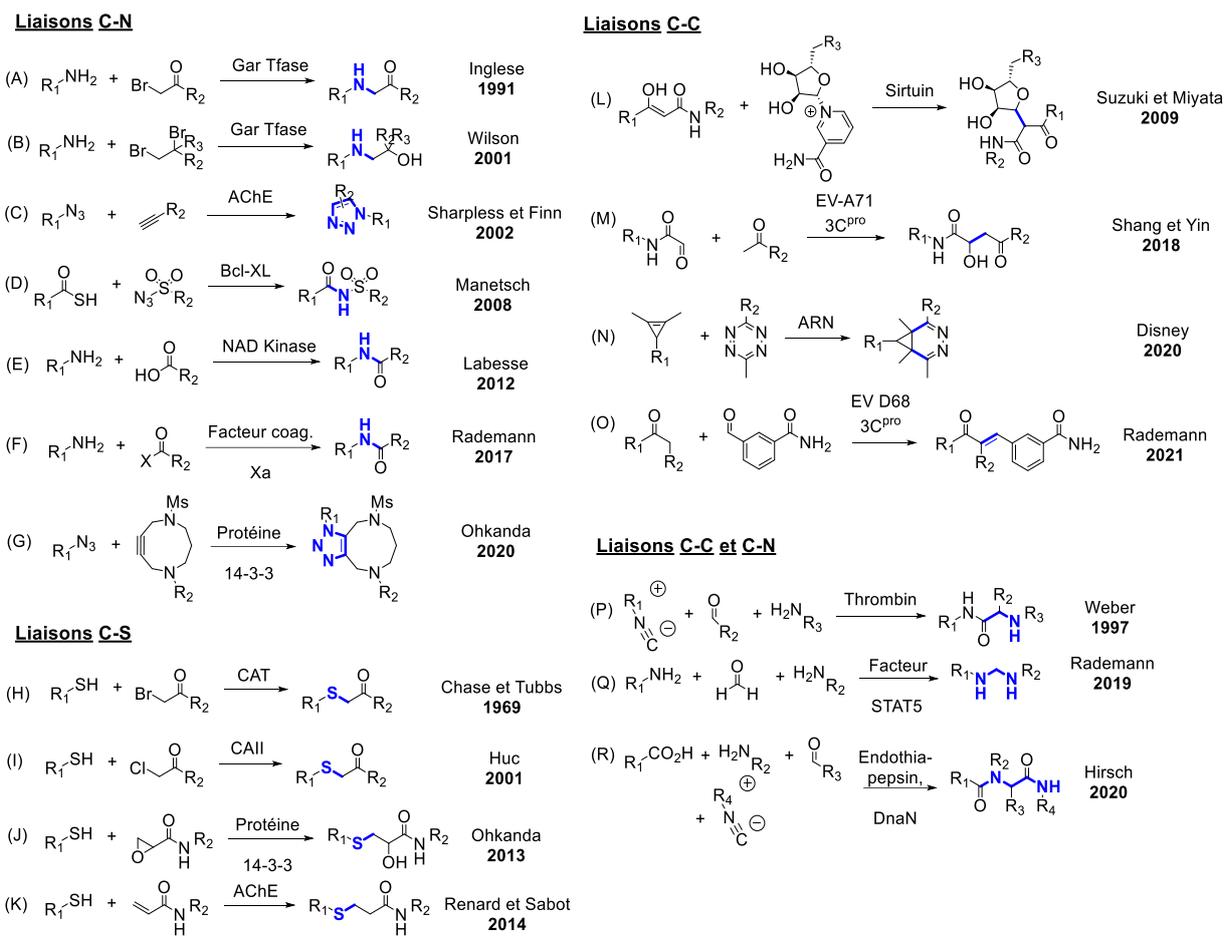


Schéma 8 : Différentes réactions décrites en KTGS

2.1.1. Formation de liaisons C-N

- Réaction de substitution nucléophile d'une amine primaire sur le bromoacétamide

En 1991, Inglese et Benkovic découvrent la première ligation de type C-N en KTGS à partir d'une substitution nucléophile entre un bromoacétamide, le glycine ribonucléotide (GAR) **1** et le N-10-(bromoacétyl)-dideazafolate **2** (Schéma 9)²⁹. Cette équipe explorait la possibilité d'utiliser la KTGS comme outil pour générer des inhibiteurs d'enzyme fondés sur une combinaison d'analogues de ses substrats (*Multisubstrate Analogue Inhibitors*, MAI)³⁰ afin d'inhiber la glycine ribonucléotide transformylase (GAR Tfase), une enzyme de biosynthèse purique *de novo* nécessitant du folate parmi les cosubstrats. Les produits formés présentent des activités inhibitrices de l'ordre du picomolaire, ce qui permet de valider le caractère puissant et le haut-potentiel de la KTGS.

²⁹ J. Inglese, S. J. Benkovic, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2351–2364.

³⁰ P. B. Le Calvez, C. J. Scott, M.E. Migaud, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2009**, *24*, 1291–1318.

Les auteurs ont mis l'accent sur le potentiel de leur KTGS à servir de vecteur d'administration de médicaments pour les composés possédant une perméabilité faible ou excédant les tailles standards de principes actifs habituels, via la synthèse *in vivo* de l'analogue multisubstrat. Malheureusement, l'utilisation de leur composé bromé **2** en tant que médicament a échoué du fait de sa réactivité trop importante et de l'instabilité des groupements fonctionnels bromoacétylés³¹.

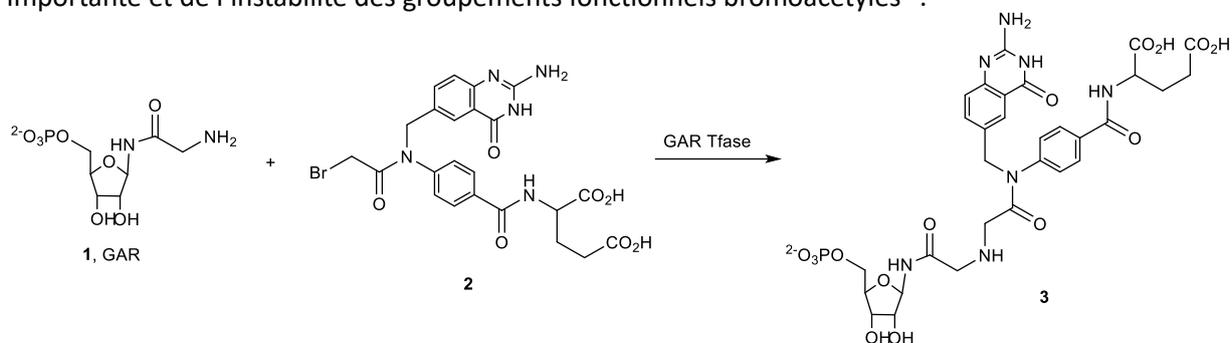


Schéma 9 : Substitution nucléophile du bromoacétamide par une amine primaire catalysée par la GAR Tfase

- Réaction d'ouverture d'époxyde par une amine primaire

A la suite de ces travaux, les équipes de Benkovic et de Wilson se sont associées afin de réaliser la même expérience que précédemment, mais cette fois-ci avec un analogue au folate dibromé, l'acide 10-bromo-10-bromométhyl-5,8,10-trideazafolique **4**, composé moins réactif³² (Schéma 10). Les mêmes conditions ont donc été mises en œuvre et la KTGS s'est avérée être un succès. Cependant, le produit monobromé en C10 **5** initialement attendu n'a pas été observé. A la place, c'est un alcool qui a été formé donnant le composé **5'**. Après des études analytiques, il s'est avéré que le composé **4** était instable en milieu aqueux, ce qui a généré la formation d'un pont bromonium **6** intermédiaire. En présence d'une molécule d'eau, l'époxyde **8** est formé *via* la bromohydrine **7** intermédiaire. Les synthèses des composés **5** et **8** permettent de remarquer que les propriétés cytotoxiques et inhibitrices des molécules sont très proches, ce qui souligne une utilisation potentielle d'époxydes dans l'élaboration efficace d'inhibiteurs GAR Tfase, ces derniers étant plus stables que les composés bromés et donc utilisables *in vivo*.

³¹ X. Hu, R. Manetsch, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1316–1324.

³² S. E. Greasley, T. H. Marsilje, H. Cai, S. Baker, S. J. Benkovic, D. L. Boger, I. A. Wilson, *Biochemistry* **2001**, *40*, 13538–13547.

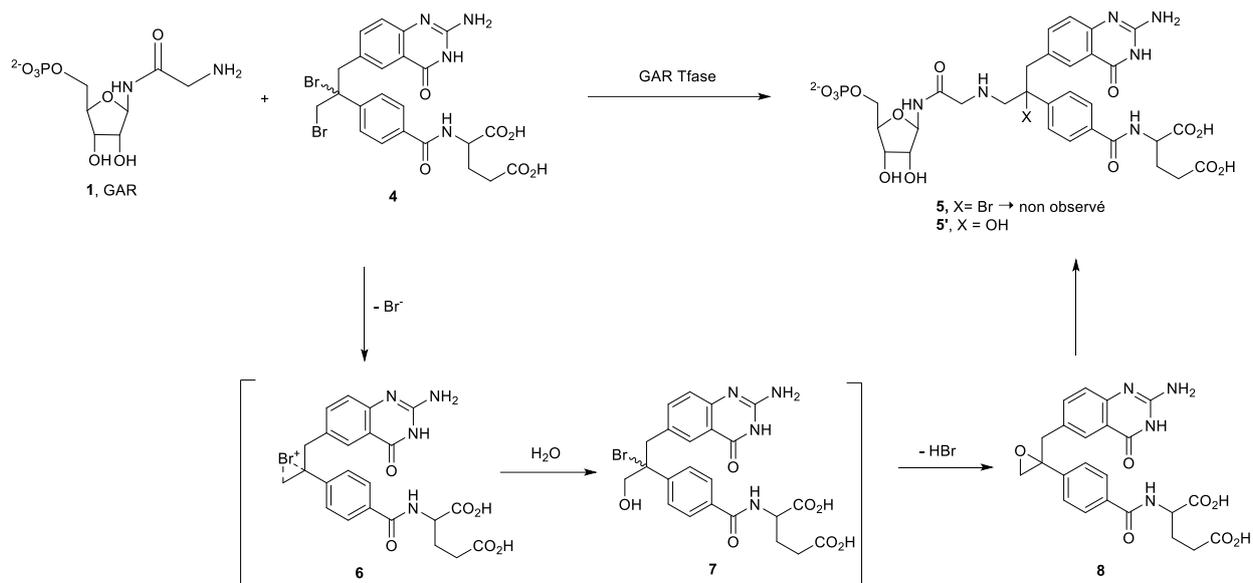


Schéma 10 : Ouverture d'époxyde par addition nucléophile d'amine primaire catalysée par la GAR Tfase

- La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen (dite réaction « click in situ »)

La cycloaddition 1,3-dipolaire conduisant à la liaison entre un azoture et un alcyne a été rapportée pour la première fois par Michael en 1893 (Schéma 11)³³. Celle-ci requiert des températures élevées et sa version non catalytique donne lieu à la formation d'un mélange de deux régioisomères *syn*- et *anti*-1,2,3-triazoles. Huisgen reprendra ces travaux et élucidera le mécanisme péricyclique et donc concerté de cette réaction 70 ans plus tard³⁴.

Les fonctions alcyne et azoture sont relativement inertes biologiquement (caractère bioorthogonal élevé). De plus, le motif 1,2,3-triazole formé peut être considéré comme un bioisostère de la liaison amide. Il est donc capable d'interagir avec une cible par des liaisons hydrogènes, mais aussi par des interactions π ou des interactions de Van der Waals, ce qui fait de cet hétérocycle un candidat de premier choix en chimie médicinale. De ce fait, de nombreuses recherches ont été entreprises de façon à synthétiser sélectivement chacun des régioisomères *syn*- ou *anti*-triazole.

En 2002, les équipes de Sharpless et de Meldal développent indépendamment la formation de 1,4-triazoles (*anti*) par le biais d'une catalyse au cuivre (I) (*Copper (I)-catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition*, CuAAC)³⁵, celle-ci étant totalement régiosélective et accélérant d'un facteur pouvant atteindre 10^6 fois la cycloaddition de Huisgen non catalysée. Cette méthode est particulièrement intéressante car elle peut être conduite dans différents solvants, y compris l'eau à température

³³ A. Michael, *J. Prakt. Chem.* **1893**, *48*, 94–95.

³⁴ R. Huisgen, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1963**, *2*, 633–645.

³⁵ a) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599 ; b) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.

ambiante et résiste à des variations de pH comprises entre 4 et 12. De plus, le catalyseur de cuivre (I) est abondant et très peu coûteux, ce qui rend cette réaction très accessible. Ces nombreux avantages ont fait que cette réaction est très utilisée en chimobiologie (marquage métabolique, chimie bioorthogonale, extension du code génétique, etc...)³⁶ même si la toxicité du Cu (I) limite l'utilisation de cette méthode *in vivo*.

Des alternatives sans cuivre reposant sur l'utilisation d'alcynes cycliques tendus plus réactifs ont par la suite été développées (*Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition, SPAAC*)³⁷ notamment par Caroline Bertozzi, afin de contourner la cytotoxicité du cuivre. Le développement de la chimie bioorthogonale et de la chimie click a été mise à l'honneur en 2022 avec l'attribution du prix Nobel de chimie aux trois pionniers à l'origine de ces travaux, à savoir Meldal, Sharpless et Bertozzi.

En 2005, l'équipe de Fokin et Jia démontrent également que le remplacement du cuivre par le ruthénium dans la cycloaddition (RuAAC) permet d'obtenir sélectivement les 1,5-triazoles (*syn*)³⁸, ce qui vient en complément de la CuAAC dans différentes applications médicales et biologiques (synthèse de peptidomimétiques, glycomimétiques, macrocycles ou analogues de nucléosides, nucléotides ou produits naturels...)³⁹. Cette stratégie permet d'élargir l'éventail des *syn*-triazoles antérieurement obtenus par l'utilisation d'organomagnésiens⁴⁰, composés incompatibles avec un large nombre de groupes fonctionnels.

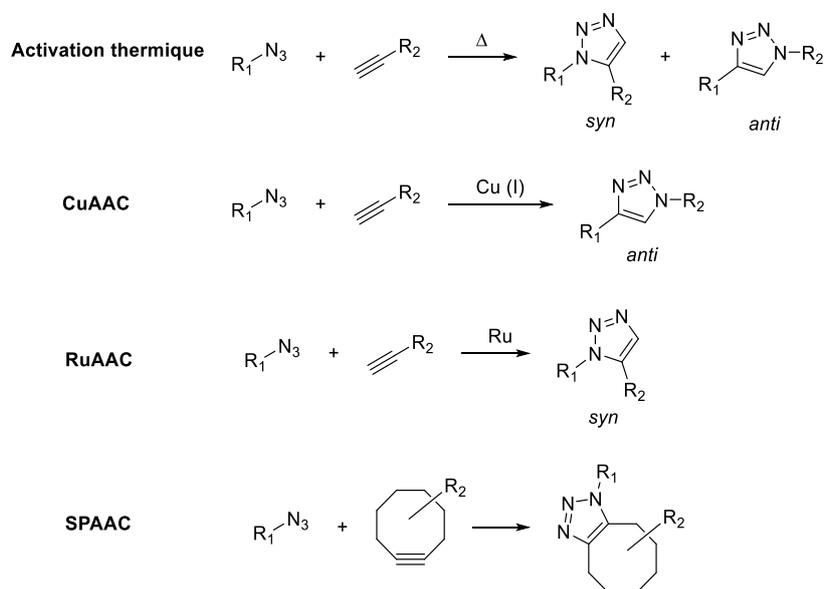


Schéma 11 : Réaction de click en vue d'obtenir les 1,2,3-triazoles par liaison entre un alcyne et un azoture

³⁶ P. Thirumurugan, D. Matosiuk, K. Jozwiak, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4905–4979.

³⁷ N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.

³⁸ L. Zhang, X. Chen, P. Xue, H. H. Y. Sun, I. D. Williams, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, G. Jia, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998–15999.

³⁹ J. R. Johansson, T. Beke-Somfai, A. Said Stålsmeden, N. Kann, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 14726–14768.

⁴⁰ A. Krasinski, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1237–1240.

type *torpedo californica*, anguille de type *electrophorus electricus* et souris), son K_i varie entre 77 et 410 fM.

A la suite de ce résultat important marquant la renaissance de la KTGS, de nombreux ligands et inhibiteurs ont été identifiés par chimie click *in situ*. En effet, cette stratégie offre un accès rapide à la fois aux précurseurs azotures et alcynes ainsi qu'aux produits triazoles *via* la catalyse au cuivre ou au ruthénium suivant le régioisomère formé.

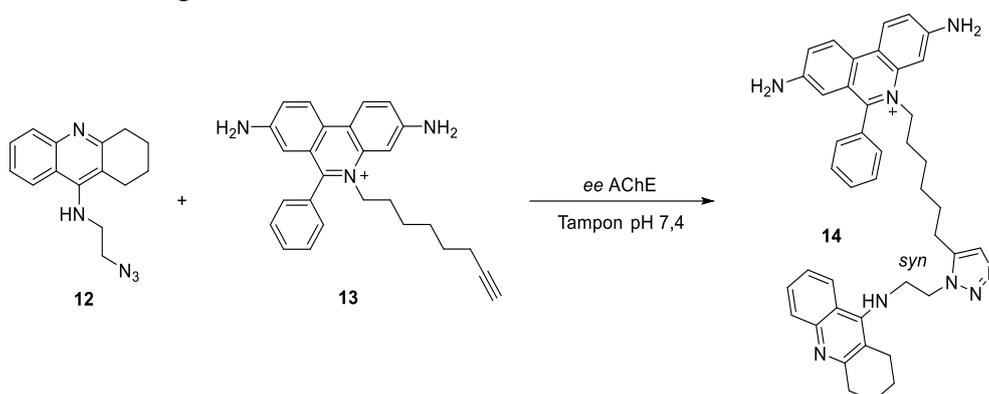


Schéma 12 : « Click-in-situ » catalysée par l'Electrophorus electricus AChE

A la suite de ces travaux, notre équipe s'est intéressée à utiliser la click *in situ* sur l'AChE d'origine humaine, *rh*-AChE, qui conserve les mêmes résidus que la *m*-AChE en son site actif⁴³. Pour cela, l'**huprine**, un inhibiteur hybride de l'**huperzine A** et de la **tacrine** dont l'activité est 270 fois plus importante que la tacrine, a été utilisé comme ligand du site actif (Figure 5), et ancre pour les réactions de KTGS, et la phényltétrahydroisoquinoline (PIQ) comme ligand du site périphérique également utilisé par Sharpless en click *in situ*⁴⁴.

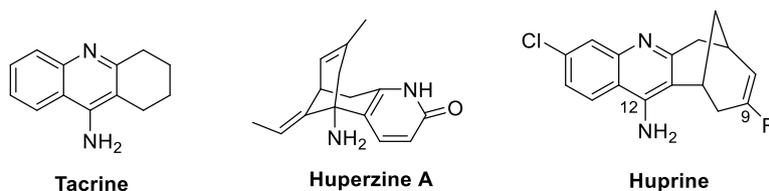


Figure 5 : Structure de l'huprine, inhibiteur de l'AChE hybride de l'hyperzine A et de la tacrine

A l'issue de cette étude, les auteurs remarquent qu'en fonction de la position du bras azoture sur l'huprine (position 12 ou 9), la KTGS donne des résultats totalement différents. En effet, lorsque la chaîne hydrocarbonée portant l'azoture est en position 12 de l'huprine, soit une position analogue à la position de la chaîne de la tacrine des travaux de Sharpless, le cycle carbobicyclique additionnel de l'huprine encombre l'accès au site estératique, ce qui empêche la ligation de se faire *in situ*. En

⁴³ E. Oueis, C. Sabot, P.-Y. Renard, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 12158–12169.

⁴⁴ A. Krasiński, Z. Radić, R. Manetsch, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless, H. C. Kolb, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 6686–6692.

revanche, lorsque l’huprine est fonctionnalisée en position 9, une position qui pointe vers l’entrée de la gorge, la KTGS a bien lieu mais dans un autre site de liaison de l’enzyme, et celle-ci permet la formation du régioisomère *anti*-triazole **15**. Cette différence de régiosélectivité avec celle observée par Sharpless peut s’expliquer par le fait que la ligation ne se fait plus à proximité du site d’acylation, mais plus haut dans la gorge dans le site périphérique de l’AChE, ce qui permet la pré-orientation antiparallèle des fonctions azoture et alcyne (Figure 6).

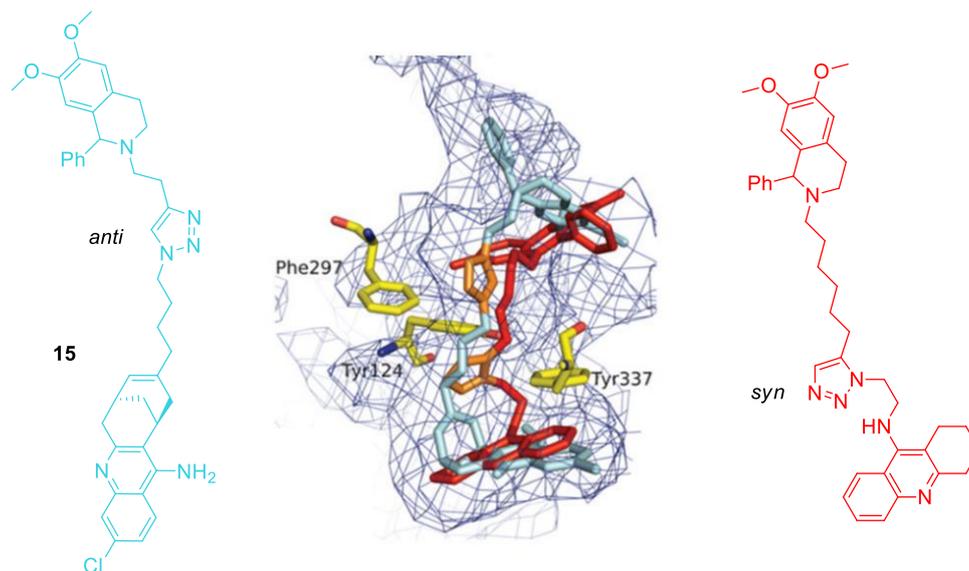


Figure 6 : Superposition des ligands obtenus par KTGS, d’une part par notre équipe (en bleu) et par l’équipe de Sharpless (en rouge) (figure extraite et modifiée de l’article⁴³)

En 2020, Ohkanda et ses collaborateurs s’intéressent également à la ligation click *in situ* et la modifient en se rapprochant de la SPAAC⁴⁵. En effet, leurs études se basent sur les molécules de taille moyenne, celles-ci offrant une base robuste pour le développement d’agents capables de contrôler les interactions intracellulaires entre les protéines. Les cyclooctynes qui pourraient être de bons candidats pour cette nouvelle KTGS ont été écartés de l’étude car ils sont instables et surtout réagissent avec les thiols des cystéines et du glutathion. De plus, leur cinétique de réaction « à blanc », donc sans effet *template* de la cible (10^{-3} à $1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)⁴⁶ est trop rapide avec les azotures pour être applicable dans ce domaine. A la place, l’équipe décide de travailler avec la 4,8-diazacyclononyne moins réactive que les cyclooctynes (Schéma 13). Quant à la cible, ce sont les protéines 14-3-3 ζ qui sont étudiées, c’est-à-dire des protéines dimériques exprimées dans les cellules eucaryotes qui se lie à différentes protéines cibles contenant une sérine phosphorylée ou des motifs thréonine. Cela joue donc un rôle dans l’altération structurale de ces protéines et dans le trafic cellulaire des protéines phosphorylées. La dérégulation des protéines 14-3-3 ζ peut impliquer le développement de cancers ou de maladies

⁴⁵ R. Masuda, Y. Kawasaki, K. Igawa, Y. Manabe, H. Fujii, N. Kato, K. Tomooka, J. Ohkanda, *Chem. Asian J.* **2020**, *15*, 742–747.

⁴⁶ M. F. Debets, S. S. van Berkel, J. Dommerholt, A. (Ton) J. Dirks, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 805–815.

neurologiques. De ce fait, un analogue azoture **16** au produit naturel **fusicoccine A** a été imaginé, ce métabolite étant connu pour se lier à la cavité hydrophobe du complexe formé par la protéine 14-3-3 ζ et le **PMA2 phosphopeptide**, motif retrouvé dans l'enzyme liée au métabolisme énergétique ATPase. Ce dernier servira de modèle pour concevoir l'alcyne partenaire **17** ou **18**.

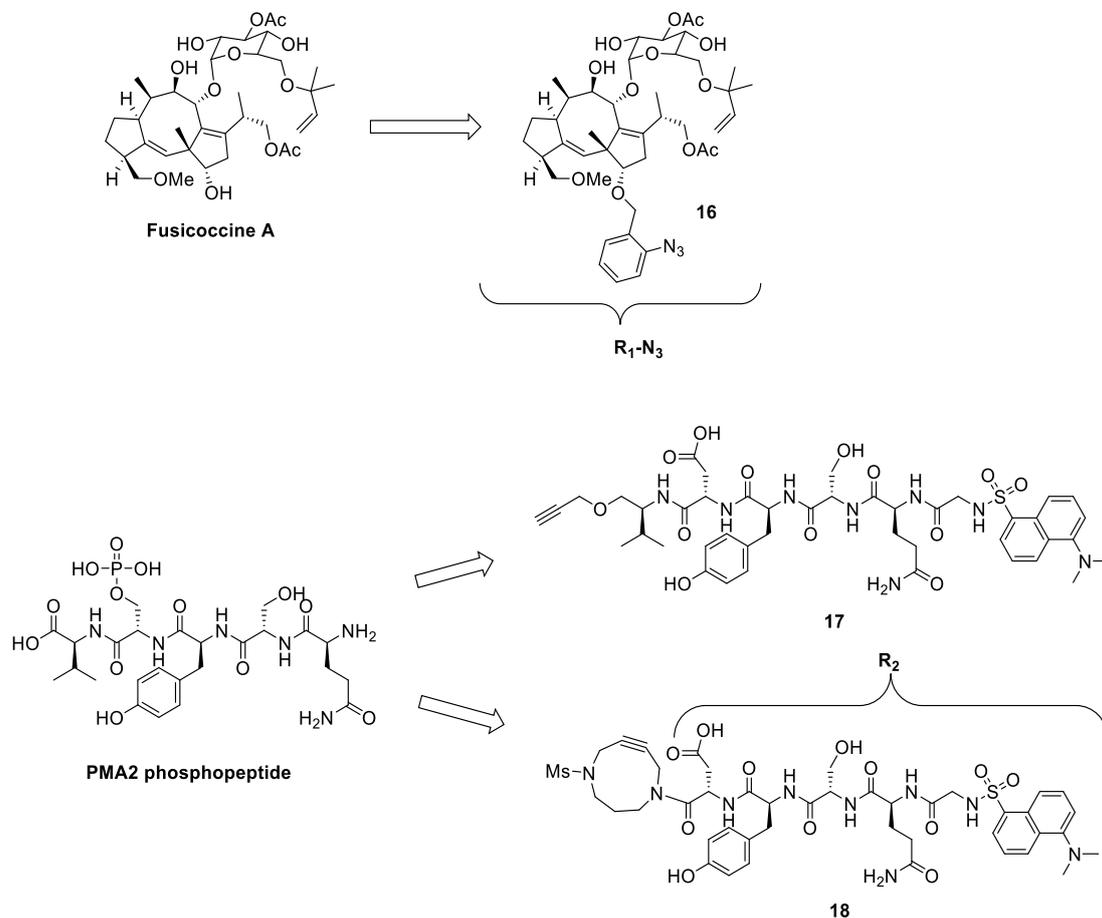


Schéma 13 : Conception des deux partenaires de la future KTGS

Dans un premier temps, l'alcyne terminal analogue **17** est incubé à 37 °C avec son fragment azoture complémentaire **16** en présence de la protéine 14-3-3 ζ . Aucune trace de produit issu de la potentielle click *in situ* n'a été détectée après 20 h d'incubation. En revanche, en présence de cuivre et sans la biomolécule, la cycloaddition de ces deux composés s'effectue totalement dans un délai de 2 h.

Dans un second temps, la cyclononyne **18** et son fragment azoture **16** sont eux aussi incubés à 37 °C avec la cible biologique et une accélération drastique de la ligation a lieu (Schéma 14). En effet, seules des traces de produit **19** sont obtenues au bout de 80 h à 37 °C en l'absence de cible tandis qu'environ 68% de produit est formé avec la protéine 14-3-3 ζ dans ces mêmes conditions. De plus, la ligation se fait de façon régiosélective car le ratio des deux isomères obtenu est estimé à 1:18.

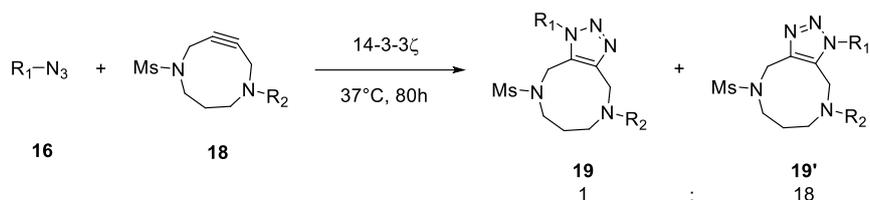


Schéma 14 : Modification de la click-in-situ catalysée par la protéine 14-3-3 ζ

Malgré le besoin de modifier, dans la suite de l'étude, la structure de la cyclononyne utilisée afin d'améliorer ses propriétés pharmacocinétiques et la solubilité du produit final, son emploi s'est avéré très efficace dans ce cas précis de KTGS, comparativement à son analogue alcyne terminal et à la cyclooctyne. En effet, la structure plus étendue du 4,8-diazacyclononyne permet d'occuper davantage l'espace contenu dans le site actif des biomolécules, particulièrement dans le but d'étudier les interactions protéine-protéine, et possède une réactivité intrinsèque intermédiaire entre l'alcyne terminal et la cyclooctyne.

De nombreux exemples de KTGS utilisant la cycloaddition de Huisgen ont été rapportés depuis dans la littérature et ne seront pas repris ici. Il s'agit de la réaction ayant donné le plus de résultats en KTGS.

- Réaction d'amidation entre un thioacide et un azoture de sulfonyle (réaction de « sulfo-click »)

Les interactions protéine-protéine sont au centre de nombreux processus biologiques. Il est donc important de mieux les comprendre afin de parvenir au traitement d'un large nombre de maladies. Cependant, il est difficile de développer des composés bioactifs prenant en considération les différentes dimensions des surfaces des deux protéines. Le caractère ambitieux pour ce type de cibles a donc généré de l'intérêt dans le domaine de la KTGS. Ainsi, Manetsch et ses collaborateurs ont développé la réaction d'amidation entre un thioacide et un azoture de sulfonyle, ligation communément appelée « sulfo-click », sur la protéine Bcl-X_L, protéine anti-apoptotique qui sert de centre régulateur de la mort programmée de cellules⁴⁷. Pour la première fois, cet exemple démontre que la KTGS ne se limite pas seulement à des cibles enzymatiques aux sites de fixation bien définis, mais permet aussi la découverte de petites molécules modulant les interactions protéine-protéine.

⁴⁷ X. Hu, J. Sun, H.-G. Wang, R. Manetsch, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13820–13821.

En plus de montrer que la protéine Bcl-X_L a la capacité de servir d’empreinte pour guider la synthèse de son propre inhibiteur, cette étude rappelle qu’il est possible de réaliser la KTGS avec un mélange de plusieurs fragments (mélange multicomposants), cela ayant déjà été démontré par Sharpless et ses collaborateurs avec la click *in situ*⁴⁸. Ici, cinq azotures de sulfonyle et un thioacide ont été incubés et l’inhibiteur **23-25** le plus affiné a pu être détecté sans ambiguïté en LC/MS-SIM (Schéma 15), alors que c’est le seul qui ne se forme pas significativement sans la protéine.

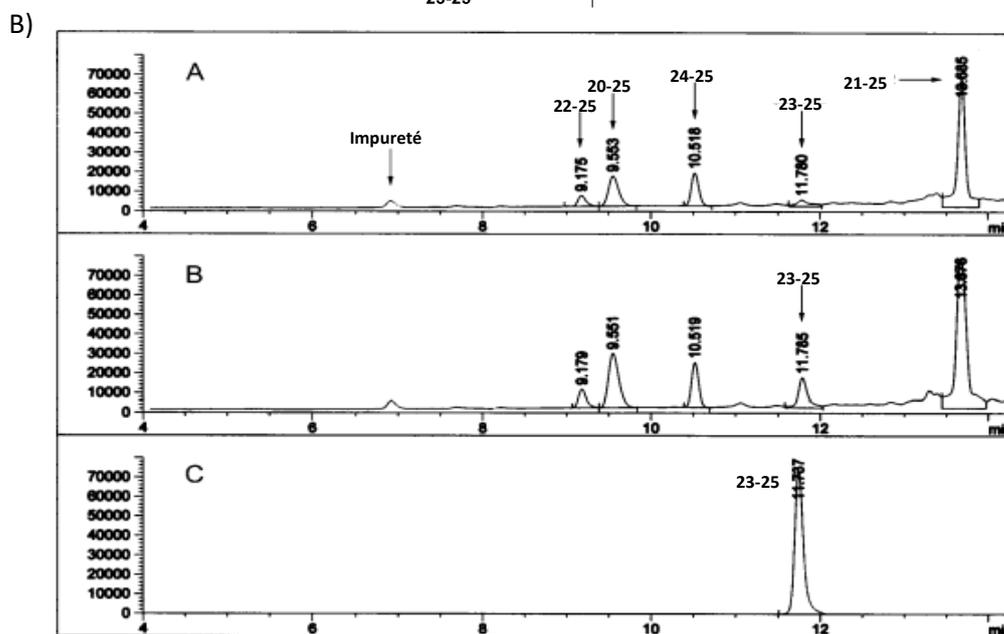
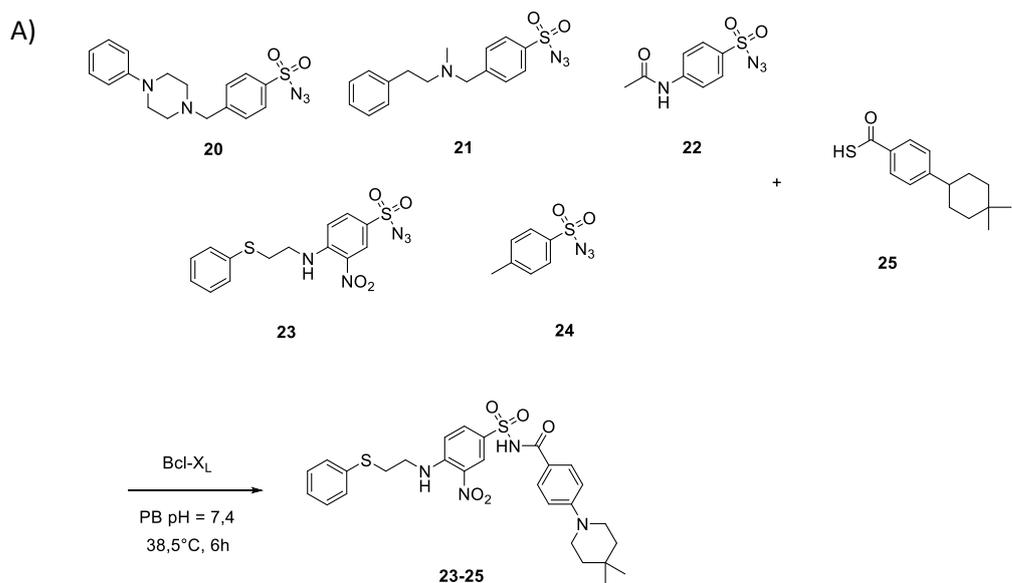


Schéma 15 : Développement de la « sulfo-click » en KTGS, A) KTGS multicomposantes mise en œuvre, B) Analyses LC/MS correspondantes, A. en l’absence de Bcl-X_L, B. en présence de Bcl-X_L, C. Référence associée au produit **23-25** (figure extraite et modifiée de la revue^{30a})

⁴⁸ R. Manetsch, A. Krasinski, Z. Radić, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless, H. C. Kolb, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, **126**, 12809–12818.

- Réaction d'amidation entre un acide carboxylique et une amine

En 2012, Labesse et ses collaborateurs parviennent à démontrer que la NAD kinase de la *Listeria monocytogenes* (LmNADK1), un pathogène humain qui pourrait être l'objet du développement d'antibiotiques, est capable de générer la réaction d'amidation entre un acide carboxylique non activé et une amine portée par une adénosine⁴⁹. En effet, par analyse structurale des clichés de diffraction aux rayons X, il a été montré que le site actif de la cible est composé de deux sous-poches d'interactions avec l'adénosine et le N-ribosylnicotinamide (Schéma 16). La co-cristallisation de la LmNADK1 avec des dérivés adénosines substitués a montré que ces deux poches étaient particulièrement proches dans l'espace.

A partir de ces observations, les substrats **26** et **27** portant respectivement les fonctions acide carboxylique et amine primaire ont été incubés avec la cible d'intérêt. Dans le but de générer une potentielle réaction click *in situ*, le substrat acide **26** avait également été substitué par un azoture au préalable. Cependant, une analyse cristallographique a pu démontrer la formation du motif amide entre l'acide carboxylique et l'amine. Cette liaison est inédite et l'exemple est remarquable, car toute réaction d'amidation établie dans un système biologique requérait l'activation préalable de l'acide carboxylique. De plus, le dinucléoside **28** ainsi formé a pu montrer une activité antistaphylococcale particulièrement prometteuse.

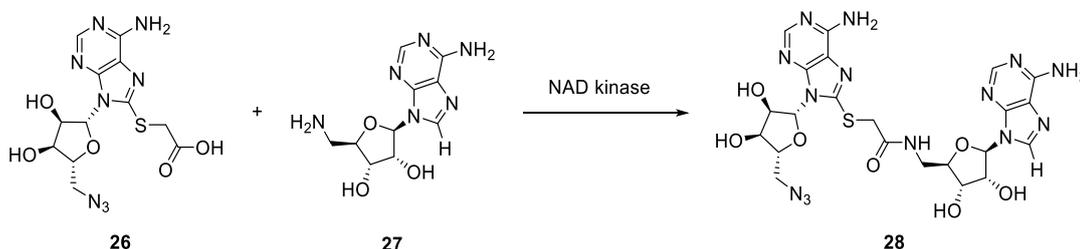


Schéma 16 : Amidation en KTGS générée par la NAD kinase en présence d'un acide carboxylique non activé

Par la suite, Rademann et ses collaborateurs ont développé en 2017 une méthode d'amidation par KTGS plus généralisable⁵⁰. En effet, l'équipe a utilisé des esters plus ou moins activés et la 4-aminométhylbenzamidine **29** comme fragments afin de parvenir à la formation d'un lien amide grâce à l'effet *template* de la protéine facteur Xa, une sérine protéase associée à la coagulation en cascade du sang et cible de premier choix pour les médicaments antithrombotiques. Le produit **32** issu de la ligation de ces deux fragments (Schéma 17) offre des propriétés inhibitrices très importantes ($K_i = 29$ nM) alors que les deux fragments précurseurs présentent des constantes d'inhibition de l'ordre du millimolaire. Ces propriétés inhibitrices ont pu être suivies pendant la ligation en ajoutant un substrat

⁴⁹ M. Gelin, G. Poncet-Montange, L. Assairi, L. Morellato, V. Huteau, L. Dugué, O. Dussurget, S. Pochet, G. Labesse, *Structure* **2012**, *20*, 1107–1117.

⁵⁰ M. Jaegle, T. Steinmetzer, J. Rademann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 3718–3722.

fluorogénique dont les propriétés fluorescentes sont recouvrées une fois clivé par cette dernière, méthode proche de la DLS dont les liaisons formées sont irréversibles. De plus, les esters de phényle **30** et de 2,2,2-trifluoroéthyle **31** montrent peu voire pas de produit formé en l'absence de la cible biologique.

Dans cette même étude, des co-cristaux obtenus entre le facteur de coagulation Xa et l'inhibiteur **32** ont démontré que la structure de la protéine facteur de coagulation Xa était favorable à la KTGS, car elle est composée de deux sites de fixation très proches qui permettent aux deux fragments d'avoir une proximité et une orientation des fonctions réactives favorables à la ligation. Enfin, l'effet superadditif observé entre les constantes d'inhibition des fragments (mM) et celle du ligand formé *in situ* (nM) ne provient pas du lien amide, comme initialement postulé par Rademann, mais bien d'une pénalité entropique plus importante (rotation et translation) de chacun des fragments que celle du ligand.

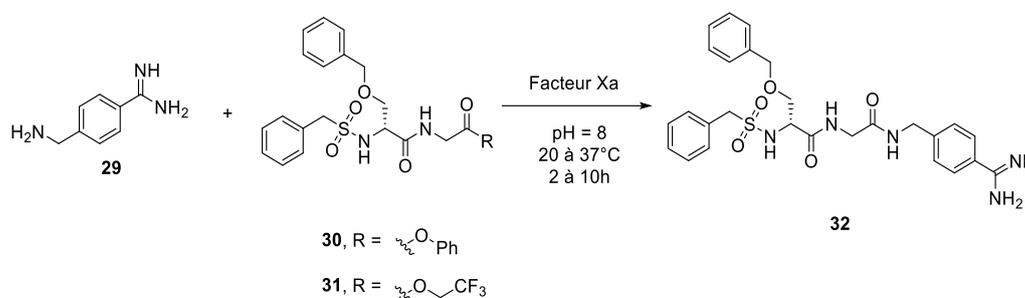


Schéma 17 : Amidation en KTGS générée par le facteur de coagulation Xa en présence d'esters activés

2.1.2. Formation de liaisons C-S

- Réaction de substitution nucléophile de thiols sur des halogénures d'alkyle

Comme indiqué précédemment, la première KTGS ayant vu le jour repose sur la substitution nucléophile d'un bromure d'alkyle par un thiol, réaction découverte par Chase et Tubbs en 1969²⁷.

En s'inspirant de ces travaux, l'équipe de Huc a développé une autre substitution nucléophile, cette fois-ci entre un chlorure d'alkyle et une fonction thiol en présence d'anhydrase carbonique II (CA-II), une métalloenzyme à cofacteur Zn (II) permettant notamment de réguler la valeur du pH dans le sang⁵¹. Ses propriétés seront davantage explicitées par la suite, cette cible biologique faisant l'objet de l'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit.

⁵¹ R. Nguyen, I. Huc, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1774–1776.

A partir du thiol **33** et de différents chlorures d'alkyle (**34 a-e**), 5 ligands inhibiteurs de la CA-II (**35 a-e**) ont été synthétisés et leur formation a été accélérée en présence de l'enzyme d'intérêt (Schéma 18). Plus le caractère hydrophobe du substituant en *para* du groupement sulfonamide augmente, plus la constante d'inhibition K_i augmente. Néanmoins, la réaction étant totale dans tous les cas étudiés, c'est-à-dire que cela soit en présence ou en absence de l'enzyme, il a été nécessaire de mettre en œuvre des réactions compétitives impliquant deux chlorures d'alkyle pour un thiol et de comparer la proportion des deux produits obtenus avec et sans enzyme. De ce fait, le « caractère purement KTGS » de cette réaction est discutable car la réaction procède parfaitement en l'absence d'enzyme, ce qui nécessite de réaliser des réactions compétitives plus difficiles à mettre en œuvre.

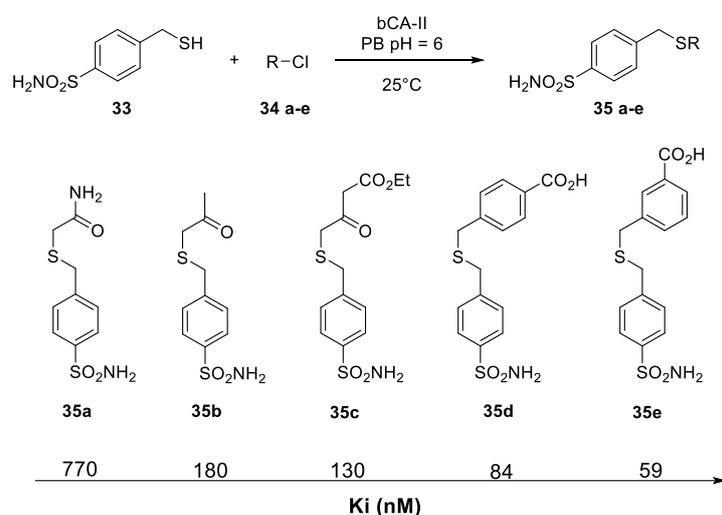


Schéma 18 : Substitution nucléophile de chlorures d'alkyle par un thiol en KTGS

- *Ouverture d'époxydes par des thiols*

L'ouverture d'époxydes par un nucléophile (aminé en l'occurrence) avait déjà été étudiée par hasard par l'équipe de Wilson en 2001³² (*vide supra*). En 2013, l'équipe d'Ohkanda développe une nouvelle KTGS basée la réaction entre un fragment portant initialement un époxyde et un fragment thiol⁵², une fois de plus sur la protéine 14-3-3 ζ . De la même façon que précédemment, les fragments sont des analogues de la fusicoccine A et du PMA2 phosphopeptide, portant respectivement la fonction époxyde et la fonction thiol (Schéma 19).

Cette étude est intéressante car elle montre l'importance du positionnement d'une fonction par rapport à sa fonction complémentaire pour que celles-ci puissent réagir en KTGS. En effet,

⁵² T. Maki, A. Kawamura, N. Kato, J. Ohkanda, *Mol. BioSyst.* **2013**, *9*, 940–943.

l'efficacité de la KTGS est variable en fonction du nombre de carbones séparant l'époxyde du noyau fusicoccine A sur le fragment **36**.

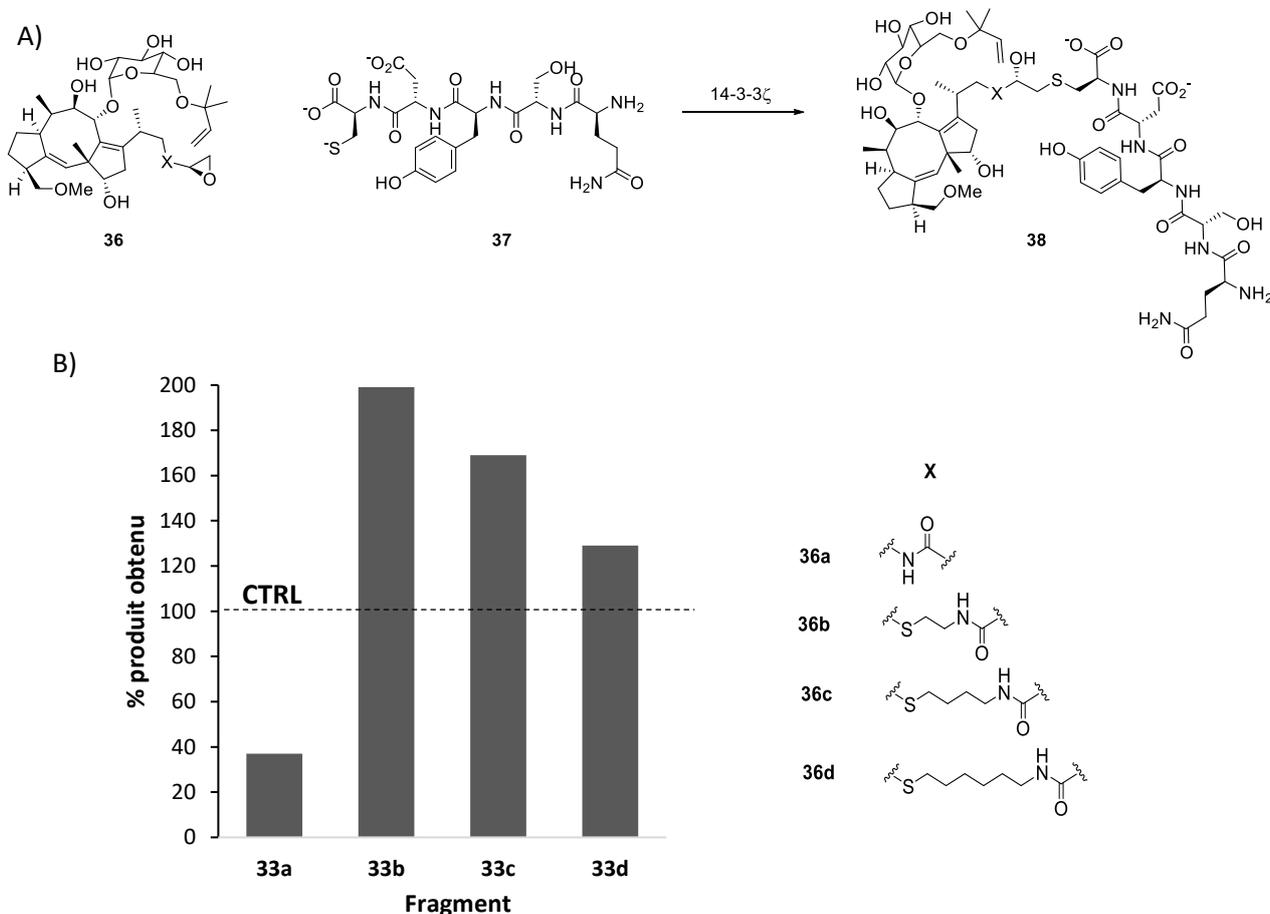


Schéma 19 : A) Ouverture d'époxyde par un thiol en KTGS, B) Efficacité de la ligation en KTGS en fonction de la nature de R_1 par rapport au contrôle (CTRL) sans protéine

- Réaction d'addition de thio-Michael sur des acrylamides

L'addition de thio-Michael sur des dérivés maléimides est une réaction courante en bioconjugaison car elle est très rapide (10^2 à 10^3 $M^{-1}.s^{-1}$)⁵³, chimiosélective et forme une liaison C-S relativement robuste bien qu'elle puisse être réversible ou que le maléimide soit susceptible d'être hydrolysé dans le temps. Cette réaction a donc inspiré notre équipe dans le but de la transposer en KTGS. Les maléimides étant trop réactifs pour ce domaine, des dérivés acrylamides moins bons accepteurs de Michael ont été envisagés. Cela limiterait l'addition 1,4 en l'absence de la cible biologique tout en conduisant à la formation d'un lien covalent irréversible.

⁵³ K. Renault, J. W. Fredy, P.-Y. Renard, C. Sabot, *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 2497–2513.

En 2014, notre équipe rapporte donc la première utilisation de la réaction de thio-Michael avec des acylamides en KTGS en utilisant l'AChE comme enzyme cible⁵⁴.

Bien que la KTGS donne de bons résultats en présence d'un thiol libre, cette fonction est particulièrement contraignante puisqu'elle a tendance à rapidement dimériser en conditions basiques ou oxydantes. Une fois dimérisé, le thiol est donc désactivé et ne peut plus réagir. L'AChE étant une estérase à sérine, l'équipe s'est servie de cette propriété pour générer le thiol *in situ* à partir du thioacétate correspondant. L'acrylamide **40** mis en réaction avec le thioacétate **39** a effectivement conduit, en présence de *m*-AChE, au thio-adduit **41** par cascade catalytique hydrolyse enzymatique/thio-Michael (Schéma 20). De plus, la réaction de contrôle a démontré que la formation non-spécifique du ligand était presque inexistante. Cependant, cette cascade réactionnelle est plus lente que l'addition de Michael seule réalisée directement à partir du thiol libre, même si l'accélération de la ligation par la cible est visible après quelques heures.

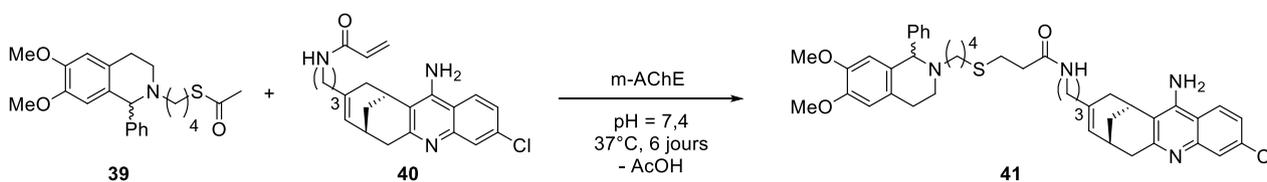


Schéma 20 : Cascade enzymatique hydrolyse/thio-Michael avec l'AChE

Peu de temps après la publication de ces travaux, l'équipe de Soellner a utilisé cette réaction de KTGS pour identifier des inhibiteurs de c-Src, une tyrosine kinase⁵⁵.

2.1.3. Formation de liaisons C-C

- *Substitution nucléophile par un énol stabilisé*

La première formation de liaisons C-C en KTGS est réalisée par l'équipe de Suzuki et Miyata, qui utilisent cette approche afin d'inhiber les sirtuines humaines⁵⁶. Cette classe d'enzymes est impliquée dans une variété de fonctions cellulaires, comme l'homéostasie glucidique, la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation d'ADN ou encore la neurodégénération. Les résidus lysines acétylés des protéines sont désacétylés par les sirtuines en utilisant le coenzyme **NAD⁺**, celui-ci assurant les échanges d'acétyle tout en libérant le **nicotinamide**. Le mécanisme catalytique de cette réaction étant bien connu, les auteurs ont imaginé leur KTGS en s'inspirant de ce modèle en utilisant pour cible la sirtuine SIRT1 (Schéma 21). En effet, ils ont imaginé des analogues à la lysine acétylée capables de

⁵⁴ E. Oueis, F. Nachon, C. Sabot, P.-Y. Renard, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 2043.

⁵⁵ F. E. Kwarcinski, M. E. Steffey, C. C. Fox, M. B. Soellner, *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, 6, 898–901.

⁵⁶ T. Asaba, T. Suzuki, R. Ueda, H. Tsumoto, H. Nakagawa, N. Miyata, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 6989–6996.

former des nucléophiles carbonés tels que des énols dans le but de les faire réagir avec le NAD^+ . Cette combinaison génère un ligand **43** stable à partir de l'analogue **42** occupant le site actif, celui-ci comportant deux poches affines pour le groupement acétoacétyle et pour le coenzyme NAD^+ respectivement.

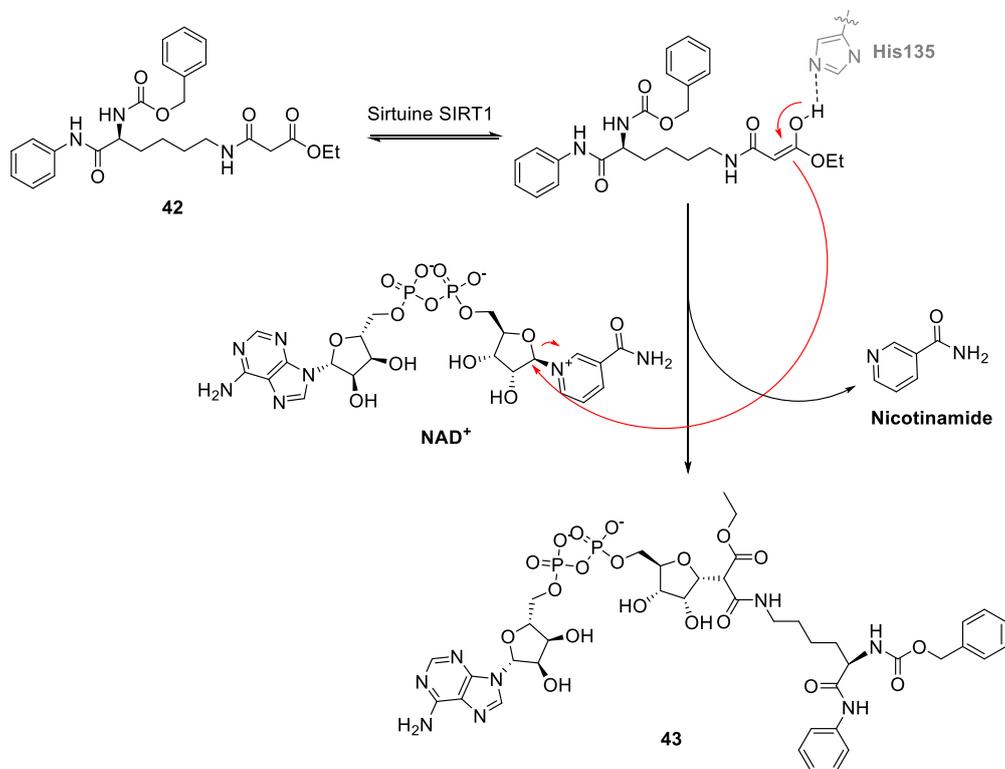


Schéma 21 : Substitution nucléophile du nicotinamide du NAD^+ par l'énol catalysée par la sirtuine

- Réaction d'aldolisation

En 2018, l'équipe de Yin et Shang introduit le principe du criblage de fragments guidé par la cible (*Target Guided Screening Of Fragments*, TGSO^F)⁵⁷. Ce principe se base dans un premier temps sur le criblage de différents fragments en fonction de la cible étudiée. A la suite de ce criblage, deux fragments de réactivité complémentaire vont être associés et générer un premier morceau du ligand affiné (*Ligation Building-Block*, LBB) (Schéma 22). Par la suite, celui-ci est introduit dans le site actif de la protéine d'intérêt. Ensuite, un troisième fragment est criblé sur ce complexe formé par la cible et le LBB afin de rendre le ligand final encore plus affiné. Une fois celui-ci obtenu, les trois fragments sont associés pour ainsi potentiellement obtenir directement un *lead*.

⁵⁷ S. Fu, Q. Nie, Y. Ma, P. Song, X. Ren, C. Luo, L. Shang, Z. Yin, *Chem. Commun.* **2018**, 54, 2890–2893.

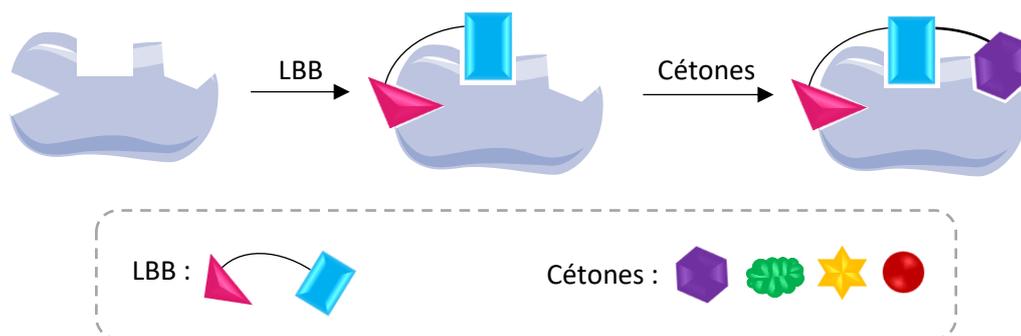


Schéma 22 : Principe de la TGSOF

Grâce à cette nouvelle méthode, l'équipe développe la réaction d'aldolisation en KTGS à partir de la protéase EV-A71 3C, protéine non structurale de l'entérovirus humain A71 connu comme étant l'agent étiologique du syndrome pieds-mains-bouche. Dans un premier temps, le **LBB** est constitué à partir de différentes requêtes associées à la cible, comme la présence d'un ester α,β -insaturé pour se lier par une liaison covalente irréversible avec une cystéine du site actif de la cible, d'un cycle lactame et d'un groupement benzylique afin d'occuper les poches du site (Schéma 23). Enfin, un aldéhyde est introduit en position terminale afin de pouvoir réagir avec le troisième fragment qui sera inséré. A partir de 28 cétones criblées, seuls les produits **44** et **45** issus des réactions entre le LBB et les 4- et 3-acétylpyridines ont pu être détectés avec des taux de conversion estimés à 40,5% et 29,8% respectivement. En remplaçant finalement l'ester α,β -insaturé par un aldéhyde, la liaison entre la cystéine et cette fonction devient réversible mais l'aldéhyde s'intègre parfaitement dans la sous-poche qui lui est destinée, ce qui rend l'interaction plus favorable qu'avec l'ester α,β -insaturé. Ainsi, l'inhibition est multipliée par 10, c'est-à-dire à l' IC_{50} de l'ordre du submicromolaire.

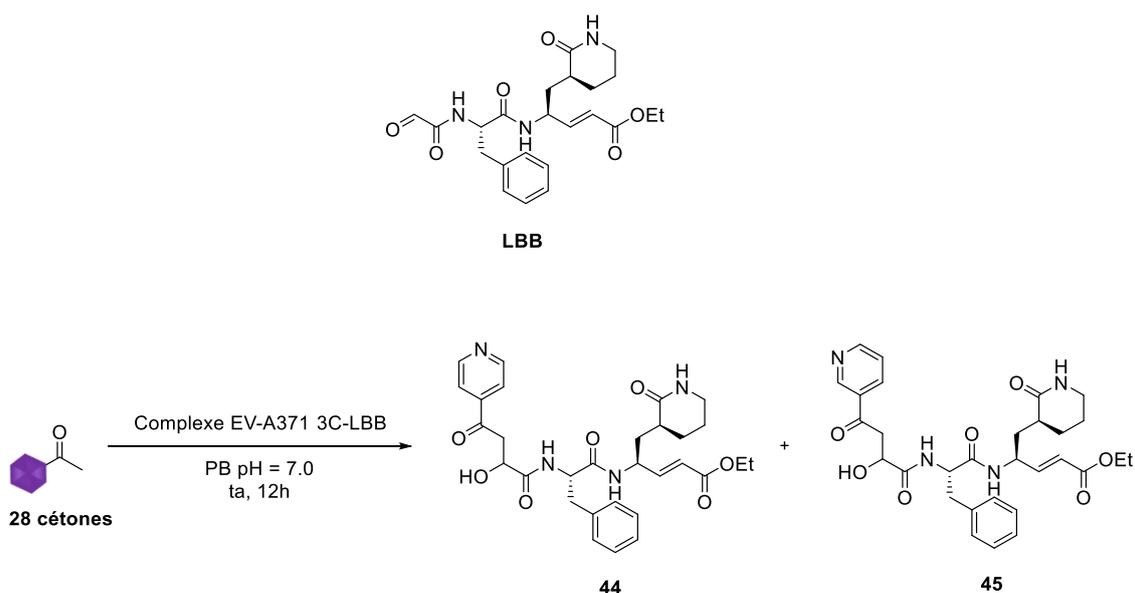
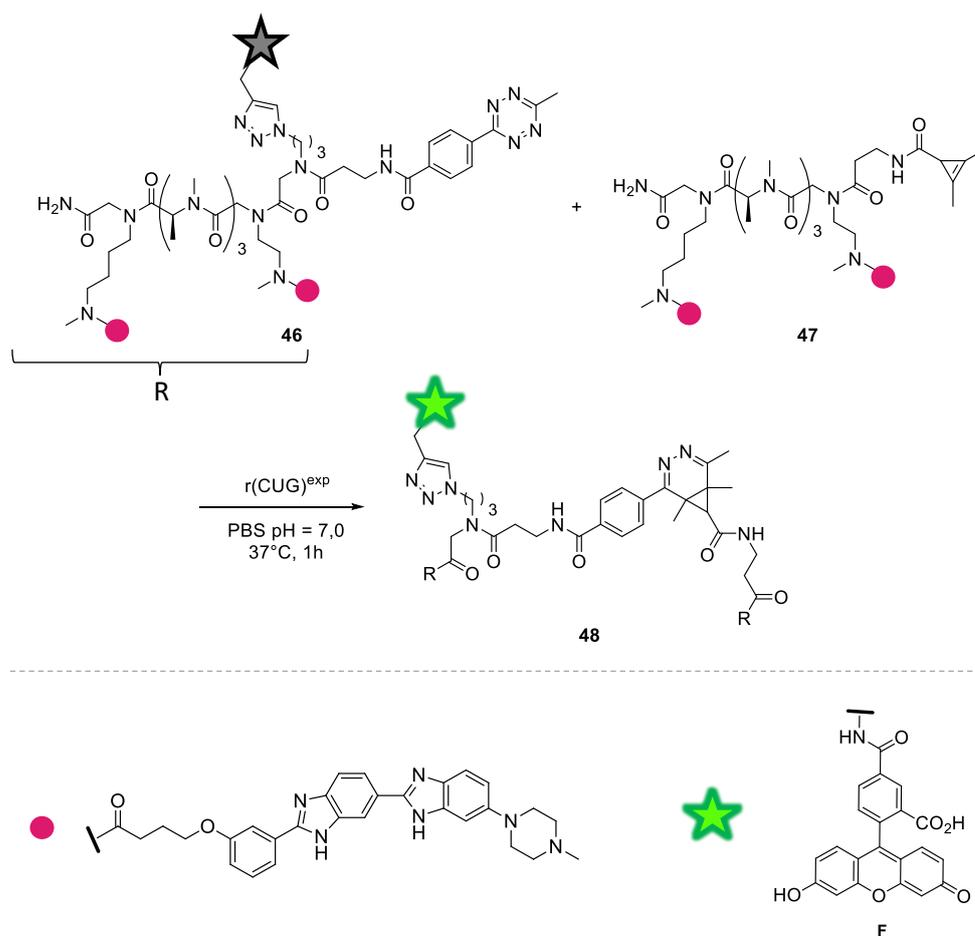


Schéma 23 : Aldolisation obtenue en KTGSOF en présence de l'EV-A371 3C

- Réaction de cycloaddition d'hétéro-Diels-Alder à demande électronique inverse

La réaction de cycloaddition d'hétéro-Diels-Alder à demande électronique inverse a été utilisée pour la première fois en KTGS en 2020 par Disney. Elle se fait entre une fonction cyclopropène et 3-aryl-6-méthyl-1,2,4,5 tétrazine en présence de la r(CUG)^{exp}, une séquence d'ARN toxique causant la dystrophie myotonique de type I (DM1)⁵⁸. C'est une réaction de KTGS particulièrement rapide puisqu'elle s'établit en seulement 1 h.

En plus de cette nouveauté réactionnelle, les propriétés de désactivateur de fluorescence de la tétrazine (accepteur) par processus FRET d'un fluorophore émettant dans le vert (donneur), ont permis, via l'incorporation du fluorophore **F** (fluorescéine) sur le réactif tétrazine **46**, de suivre l'avancement de la réaction KTGS (Schéma 24). En effet, en réagissant, le motif tétrazine à l'origine du FRET disparaît, ce qui permet de recouvrer l'émission de la fluorescéine. Cette stratégie a une double fonction, elle permet d'une part d'identifier des inhibiteurs et d'autre part de détecter spécifiquement la cible thérapeutique dans des cellules biologiques par imagerie de fluorescence.



⁵⁸ A. J. Angelbello, M. D. Disney, *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 1820–1825.

- Réaction de condensation de Knoevenagel

La condensation de Knoevenagel a été développée en KTGS par Rademann et ses collaborateurs sur la protéase 3C de l'enterovirus EV D68, enzyme reconnue comme cible de choix pour le traitement d'infections entérovirales ou rhinovirales⁵⁹. Cette protéase 3C clive les liaisons amides *via* une première addition du résidu cystéine (Cys147) du site actif sur l'atome de carbone du carbonyle. Cette réaction est rendue possible par l'activation du carbonyle de l'amide par des liaisons hydrogène (trou oxyanionique). De ce fait, les auteurs ont inséré l'aldéhyde **49** dans le site actif de la protéase afin que celui-ci soit activé de la même façon. Ainsi, des carbones nucléophiles tels que des énols peuvent s'ajouter sur l'aldéhyde activé de façon à établir une liaison de type C-C (Schéma 25).

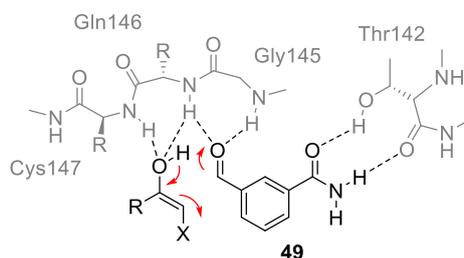


Schéma 25 : Réaction d'aldolisation entre l'aldéhyde **49** et le tautomère énol tous deux liés à la protéase EV D68 3C

Afin de parvenir à ce type de réactions, 13 fragments carbonylés susceptibles de former des énols stables suite à la présence d'un groupement électroattracteur en α ont été testés et ont engendré un système réactionnel dynamique (Schéma 26). En effet, en fonction du fragment testé, une cascade de réactions réversibles peut avoir lieu. Dans la protéase, dans un premier temps, la réaction d'aldolisation entre l'aldéhyde **49** et les énols stabilisés prend place (A, B). Certains de ces ligands évolueront vers la formation du produit de condensation de Knoevenagel (C) qui donne lieu à des inhibiteurs puissants envers la protéase, d'autres en revanche, seront dissociés de la cible biologique (D). De même, certains produits issus de la condensation de Knoevenagel réagiront avec le résidu Cys147 pour conduire au thioéther correspondant (F) alors que d'autres adduits de Knoevenagel seront libérés de la protéine (E).

Il en est de même avec les produits en solution. Cependant, au lieu de réagir avec le résidu Cys147, certains peuvent subir une réaction de Michael avec des thiols nucléophiles dans la solution (F'), ce qui réduit l'activité antivirale des produits issus de la Knoevenagel. Il est également possible que ceux-ci soient hydratés (C'), ce qui favorise la réaction rétro-aldol (B', A').

⁵⁹ C. Tauber, R. Wamser, C. Arkona, M. Tügend, U. B. Abdul Aziz, S. Pach, R. Schulz, D. Jochmans, G. Wolber, J. Neyts, J. Rademann, *Angew Chem Int Ed* **2021**, *60*, 13294–13301.

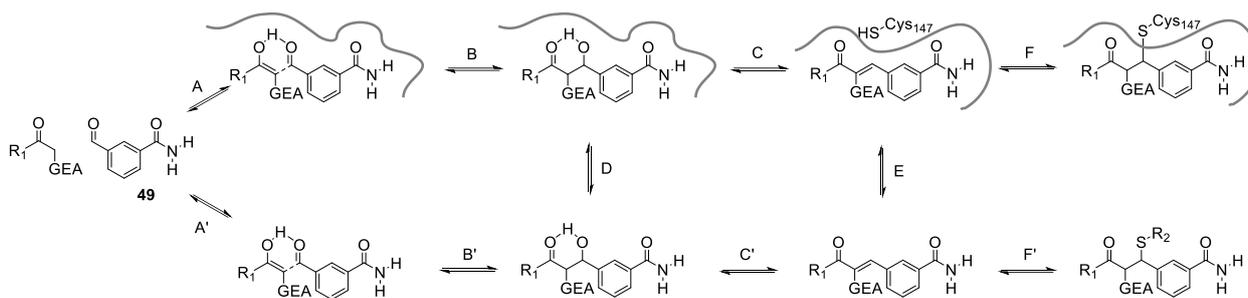


Schéma 26 : Evolution chimique des molécules antivirales dans un système de réactions dynamique en KTGS

Le mécanisme multi-étape associé à cette KTGS semble assez complexe mais il montre la compétition entre des étapes catalysées par la cible et d'autres en solution au cours de l'évolution d'une molécule active. En revanche, le caractère réversible des liaisons formées par les fragments ne répond pas aux propriétés associées à la KTGS, ce qui la rend discutable dans ce domaine.

2.1.4. Formation de liaisons C-C combinées à des liaisons C-N

- Réaction de Ugi

La première réaction multicomposante en KTGS est attribuée à Weber en 1997⁶⁰. Celle-ci s'inspire d'une réaction de Ugi, normalement composée de quatre réactifs différents : un isonitrile, un acide carboxylique, une amine et un composé carbonylé, donnant ainsi accès à un motif diamide. Ici, en l'absence de l'acide carboxylique, c'est l'eau environnante qui a réagi sur l'intermédiaire nitrilium, conduisant à un α -amino-amide. La cible utilisée pour cette réaction est la thrombine sous la forme de cristaux, celle-ci étant stabilisée par des liaisons covalentes avec le glutardialdéhyde (Thrombin-CLEC). Les cristaux d'enzyme réticulée sont des catalyseurs de choix puisqu'ils sont plus stables et actifs même en présence de solvants organiques.

Trois isonitriles, trois aldéhydes et deux amines ont été incubés ensemble pendant une semaine en présence ou en l'absence de la cible biologique d'intérêt. Dans la réaction de contrôle, aucun produit n'est obtenu. En revanche, en présence d'enzyme, l'inhibiteur **50** à la constante d'inhibition de l'ordre du nanomolaire est obtenu (Schéma 27).

⁶⁰ L. Weber, *Drug Discovery Today: Technologies* **2004**, *1*, 261–267.

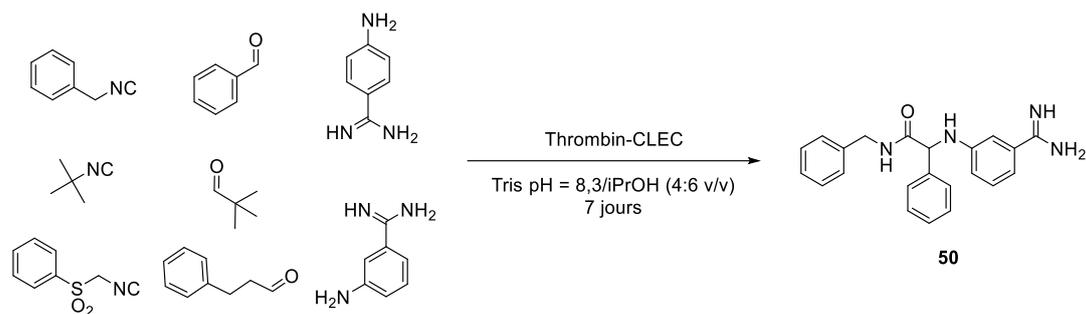


Schéma 27 : Réaction de Ugi à trois composantes en KTGS

L'étude de la réaction de Ugi sera reprise par l'équipe de Hirsch en 2020, cette fois-ci avec les 4 fonctions composantes initiales⁶¹. Cette nouvelle réaction multicomposante sera appliquée sur deux cibles biologiques distinctes, à savoir sur l'endothiasepsine (protéase aspartique jouant un rôle dans différentes pathologies telles que la malaria, le VIH, la maladie d'Alzheimer et l'hypertension) et la DnaN (enzyme impliquée dans la synthèse et la réparation de l'ADN).

Dans un premier temps, une librairie de fragments a été synthétisée ainsi que les références associées aux produits escomptés. Si c'est la réaction de Ugi à 4 composantes qui est attendue, il est également possible d'obtenir des produits issus de la réaction de Passerini, réaction subsidiaire la plus réputée (Schéma 28). De ce fait, les potentiels produits obtenus lors de cette réaction ont également été pris en considération.

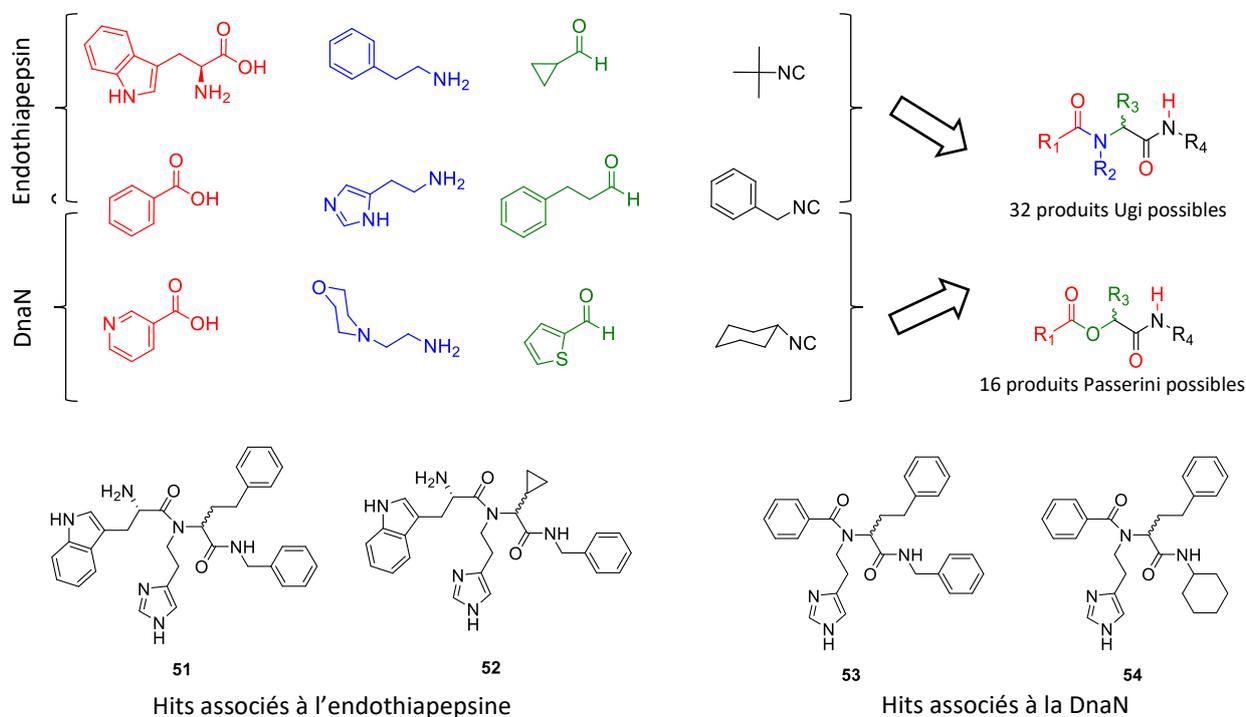


Schéma 28 : Réaction de Ugi à quatre composantes en KTGS

⁶¹ F. Mancini, M. Y. Unver, W. A. M. Elgaher, V. R. Jumde, A. Alhayek, P. Lukat, J. Herrmann, M. D. Witte, M. Köck, W. Blankenfeldt, R. Müller, A. K. H. Hirsch, *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 14585–14593.

Quelle que soit la cible biologique utilisée, seule la formation de deux produits de Ugi a été détectée. Cela démontre que seule la réaction de Ugi donne des résultats probants en KTGS. En revanche, en présence de la DnaN, une autre réaction a pu être observée en parallèle à la réaction de Ugi : la cyclisation de Pictet-Spengler (Figure 7). Bien que le produit issu de cette réaction ait été obtenu en présence et en l'absence de l'enzyme, sa formation semble cependant quelque peu accélérée par la DnaN. Cela ouvre donc la porte vers une nouvelle réaction potentiellement éligible en KTGS.

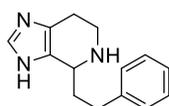


Figure 7 : Produit obtenu par la cyclisation de Pictet-Spengler

- *Réaction de Mannich à deux amines*

Une deuxième réaction multicomposante a pu être développée en KTGS par Rademann⁶². Celle-ci est inspirée de la réaction de Mannich nécessitant initialement un nucléophile carboné du type cétone énolisable, une amine secondaire et un aldéhyde afin de former des β -aminocarbonyles. Dans cette réaction KTGS, la cétone énolisable est remplacée par une deuxième amine de façon à conduire à un aminal. La cible utilisée dans cette étude est le facteur de transcription STAT5 qui sert de plateforme de signalement de beaucoup de cellules cancéreuses.

Dans un premier temps, un criblage de 17000 fragments a été réalisé afin d'identifier des inhibiteurs de la protéine STAT à l'efficacité de liaison importante. Grâce à cela, l'amine **55** a pu être validée comme fragment de départ pour tester la KTGS (Schéma 29). Par la suite, le fragment **55** a été placé en présence de formaldéhyde et différents N-hétérocycles à pH = 5 (pH favorisant la réaction de Mannich) afin de générer les différents produits attendus par cette réaction à deux amines. Après cette étape, la cible biologique a été introduite dans chaque milieu afin d'évaluer l'inhibition des différentes combinaisons testées. Grâce à cela, l'équipe a pu découvrir que les motifs tétrazoles étaient particulièrement actifs pour la STAT, candidats donc de choix pour la KTGS. Notamment, le tétrazole **56** permet d'accéder à l'inhibiteur **57** le plus affiné en réagissant avec le fragment **55** et le formaldéhyde. Ces trois fragments ont donc été choisis pour tester la KTGS.

⁶² E. L. Wong, E. Nawrotzky, C. Arkona, B. G. Kim, S. Beligny, X. Wang, S. Wagner, M. Lisurek, D. Carstanjen, J. Rademann, *Nat Commun* **2019**, *10*, 66.

Les tests de KTGS ont été conduits à pH = 7,4 en présence de la cible biologique, pH permettant de ralentir significativement la réaction de Mannich en l'absence de la biomolécule. En effet, le produit **57** est seulement obtenu avec le facteur STAT5, ce qui valide le concept d'utiliser cette réaction de Mannich en KTGS. Dans cette étude, les auteurs ont démontré que la présence du fragment **55** était essentielle afin d'établir des liaisons hydrogène avec la cible, notamment avec son résidu Asn642, et ainsi permettre à la KTGS de fonctionner. Les auteurs prouvent également l'importance de la présence de ce résidu en générant des enzymes mutantes ou analogues du facteur STAT5 qui ne possèdent pas ce résidu. En effet, en son absence, la réaction de Mannich n'est pas catalysée par la cible, et le produit **57** présente une activité inhibitrice bien moindre ($IC_{50} = 1,5 \mu\text{M}$ avec la forme sauvage contre $IC_{50} = 30 \mu\text{M}$ avec la forme mutante). Cette étude prouve donc l'importance de la nature du site actif dans le but de réaliser une réaction en KTGS.

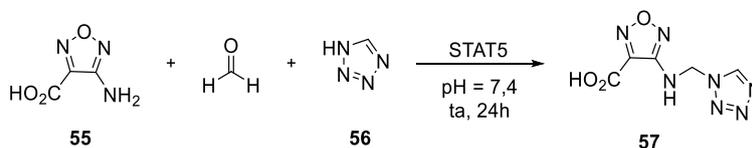


Schéma 29 : Réaction de Mannich à deux amines catalysée par le facteur STAT5

En conclusion, même si une majorité des exemples de KTGS décrits l'ont été avec la cycloaddition de Huisgen, de nombreuses réactions semblent éligibles, à condition d'être biocompatibles et d'avoir des constantes cinétiques adaptées. Le lecteur intéressé pourra se rapporter aux dernières revues pour avoir des exemples plus exhaustifs^{28c,d}.

2.2. Aspects pratiques de la KTGS

Une analyse des différentes études précédentes met en évidence un certain nombre de points communs. Les réactions en KTGS sont souvent conduites à température physiologique qui est la plus adaptée aux systèmes biologiques en termes de stabilité et activité. La concentration des réactifs employés est souvent élevée (de 10 à 500 μM) et celle de la cible est quasiment stœchiométrique afin de favoriser la formation du produit et d'en faciliter sa détection (et *de facto*, la réaction de KTGS est inhibée par la formation du produit si celui-ci est très affiné pour la cible. Il faut donc que la cible soit en quantité suffisante pour que le produit de KTGS puisse être détecté). Cela limite donc le dimensionnement du criblage KTGS ainsi que la cible biologique employée qui doit pouvoir être produite en quantité non négligeable (jusqu'à plusieurs dizaines de mg pour certaines cibles).

En général, la méthode de détection employée est la LC-MS, dont la spectrométrie de masse est utilisée via différents modes (SIM, MRM, HRMS) afin d'augmenter la sensibilité de la détection. Ces techniques ont des propriétés différentes, notamment en termes de résolution et de sensibilité de

détection. Il est donc difficile voire impossible de comparer deux expériences de KTGS sur leur temps de réaction si celles-ci n'ont pas été analysées par le même appareil. De ce fait, les techniques analytiques ne cessent d'être améliorées de façon à limiter au maximum les faux négatifs, c'est-à-dire des produits non détectés car formés à l'état de trace.

La KTGS nécessite des expériences de contrôle afin d'être validée. La plus commune est l'expérience en l'absence d'enzyme, ce contrôle étant nécessaire afin de valider que la cible biologique catalyse bien la réaction. Il est également possible d'utiliser un inhibiteur connu de la cible afin d'empêcher l'accès du site actif aux fragments, ce qui permet de vérifier que la réaction n'est pas catalysée par les résidus à la surface de la protéine. Des protéines dites non-cibles (*off-target proteins*) peuvent également être utilisées afin de vérifier la sélectivité de la KTGS développée. Il peut même parfois s'agir de protéines mutantes de la biomolécule d'intérêt à laquelle on aurait ôté les résidus nécessaires à l'ancrage du fragment⁶².

Enfin, il est important de synthétiser les références associées aux produits attendus afin de pouvoir les caractériser dans la méthode de détection choisie, et de les identifier sans ambiguïté dans le milieu réactionnel.

2.3. La KTGS et sa place en chimie thérapeutique

Depuis son essor, la KTGS a permis la découverte de nombreux inhibiteurs, et cela sur une trentaine de cibles thérapeutiques différentes^{28c,d}. Cela couvre un large spectre d'aires thérapeutiques telles que le cancer, l'ophtalmologie, les maladies métaboliques, les troubles du système nerveux central (SNC) et même les maladies infectieuses (SIDA, tuberculose...)²⁷. 73% de ces cibles sont des enzymes, 8% des interactions protéine-protéine, 8% des transcritteurs et 4% des canaux ioniques.

Alors que la KTGS est essentiellement utilisée pour identifier des inhibiteurs d'enzymes, elle a également permis de mettre au point un agent d'imagerie utilisé en tomographie par émission de positons (TEP)⁶³. Cet agent cible de la CA-II inspiré des travaux de Sharpless⁶⁴ d'abord marqué au fluor 19 a été identifié *in vitro* par click *in situ*, puis a été marqué au fluor 18 pour détecter la CA-II dans les souris par le biais de la sonde **58** (Figure 8). La click *in situ* a également permis de former le précurseur

⁶³ V. P. Mocharla, J. C. Walsh, H. C. Padgett, H. Su, B. Fueger, W. A. Weber, J. Czernin, H. C. Kolb, *ChemMedChem* **2013**, *8*, 43–48.

⁶⁴ V. P. Mocharla, B. Colasson, L. V. Lee, S. Röper, K. B. Sharpless, C.-H. Wong, H. C. Kolb, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 116–120.

59 pour une sonde TEP pour la cyclooxygénase-2 humaine (COX-2), une cible pour les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (Celecoxib, Celebrex™).

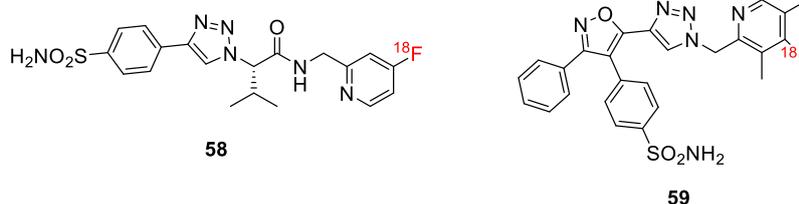


Figure 8 : Sondes pour la TEP développées par la click in situ

La KTGS a aussi permis de développer le premier inhibiteur **60** *in vivo* du site catalytique de l'enzyme dégradant l'insuline (IDE), qui est une métalloprotéase particulièrement ciblée pour le traitement du diabète (Figure 9)⁶⁵. En effet, une fois cet inhibiteur identifié par KTGS, son activité a été évaluée dans les cellules puis dans des modèles souris. Ce composé a montré, une fois administré, que la signalisation de l'insuline augmentait et que la tolérance en glucose dégradait de façon dépendante à l'IDE. Ces travaux confirment donc que l'IDE est bien impliquée dans la régulation du taux de glucose à court-terme.

Par la suite, Wuest et ses collaborateurs ont développé une expérience multicomposantes pour identifier deux inhibiteurs puissants **61** et **62** de la COX-2⁶⁶, qui se sont également avérés actifs sur des lignées cellulaires du cancer colorectal HCA-7. De ce fait, les composés les plus actifs ont pu être testés sur un œdème d'une patte de rat et ont montré une activité encore plus forte que le Celecoxib, médicament de référence précédemment cité.

Enfin, le produit de la réaction de Mannich à deux amines de Rademann⁶² a pu également être testé dans des lignées de cellules cancéreuses. Deux analogues au composé **57**, les composés **63** et **64**, ont montré des résultats performants. En effet, le composé **63** est capable d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses après 48 h d'incubation, et le composé **64** induit une régression tumorale à une dose de 200 mg/kg.

⁶⁵ R. Deprez-Poulain, N. Hennuyer, D. Bosc, W. G. Liang, E. Enée, X. Marechal, J. Charton, J. Totobenazara, G. Berte, J. Jahklal, T. Verdelet, J. Dumont, S. Dassonneville, E. Woittrain, M. Gauriot, C. Paquet, I. Duplan, P. Hermant, F.-X. Cantrelle, E. Sevin, M. Culot, V. Landry, A. Herledan, C. Piveteau, G. Lippens, F. Leroux, W.-J. Tang, P. van Endert, B. Staels, B. Deprez, *Nat Commun* **2015**, *6*, 8250.

⁶⁶ A. Bhardwaj, J. Kaur, M. Wuest, F. Wuest, *Nat Commun* **2017**, *8*, 1.

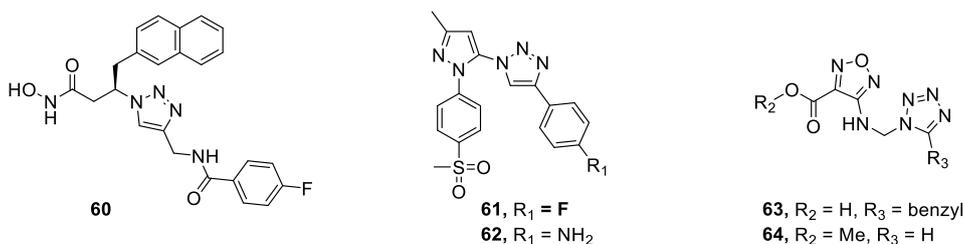


Figure 9 : Ligands obtenus par KTGS et aux propriétés *in vivo* efficaces

2.4. Les limites de la KTGS

Le nombre de réactions décrites en KTGS, bien qu'en constante augmentation ces dernières années, demeure très faible. En effet, celles-ci doivent répondre à des critères exigeants de biocompatibilité imposés par la cible biologique. De plus, elles présentent également quelques limites pratiques.

Tout d'abord, les quantités de la cible biologique soluble nécessaire sont élevées. De ce fait, certaines cibles comme les récepteurs membranaires n'ont pas pu être étudiées jusqu'à présent.

Les expériences de KTGS nécessitent des temps d'incubation parfois longs, pouvant durer jusqu'à une semaine, temps pendant lequel l'intégrité de la cible biologique considérée peut être impactée. De ce fait, le pouvoir catalytique de la cible peut en être réduit, générant une diminution de la quantité de ligand formée et ainsi conduire à des faux négatifs, c'est-à-dire des produits affins qui ne se forment pas.

Il est parfois difficile d'accéder à une réactivité idéale entre les deux fragments (Figure 10). En effet, les constantes de vitesse des réactions de KTGS doivent être suffisamment faibles afin d'éviter les faux positifs, c'est-à-dire la formation de produit en l'absence de la cible, rendant l'accélération de la réaction due à la présence de la cible difficile à évaluer. C'est le cas de la réaction développée par Huc et qui nécessite la réalisation de réactions de compétition⁵¹. A l'inverse, des réactions trop lentes comme la click *in situ* nécessitent des temps d'incubation très élevés avec le risque de voir la cible biologique s'altérer au cours du temps. En effet, la faible concentration de ligand formé, notamment à la suite de l'empoisonnement de la cible par le ligand formé, rend difficile leur détection analytique, ce qui donne lieu à de faux négatifs et biaise ainsi l'exploitation des résultats.

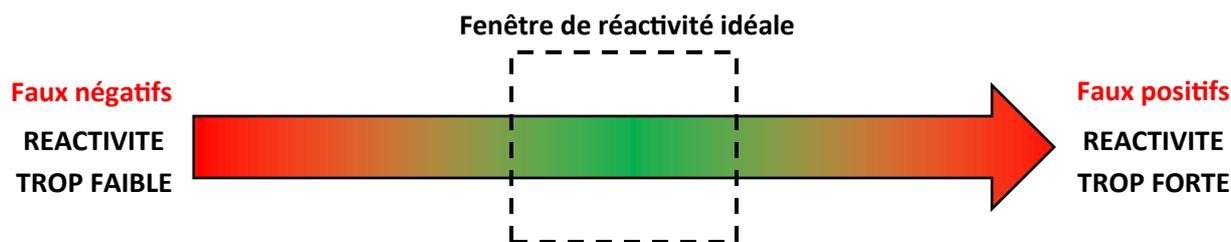


Figure 10 : Fenêtre de réactivité idéale en KTGS

3. Objectifs des travaux de thèse

Malgré le caractère robuste et puissant de la KTGS pour la découverte de nouvelles molécules et cibles thérapeutiques, le nombre de ligations rapporté dans la littérature par cette approche reste faible. Afin de généraliser cet outil et de le rendre universel, il est nécessaire de découvrir de nouvelles liaisons KTGS et ainsi élargir son spectre d'utilisation. De ce fait, le sujet de thèse présenté ici tente de répondre à cette problématique sous trois formes. Dans un premier temps, les travaux se concentreront sur l'amélioration des propriétés photophysiques d'un ligand obtenu par une nouvelle réaction KTGS développée au laboratoire : la thiol-yne. Dans un second temps, ces travaux seront repris afin d'améliorer le squelette du ligand de façon à pouvoir potentiellement l'utiliser *in vivo* ou pour le photomarquage de biomolécules. Enfin, dans un troisième temps, une nouvelle réaction KTGS sera développée à partir d'un fragment photoactivable en vue de diminuer drastiquement le temps d'incubation nécessaire à la ligation.

3.1. Amélioration des propriétés photophysiques d'un ligand obtenu par réaction de thiol-yne en KTGS

La réaction de thiol-yne est une réaction largement étudiée en bioconjugaison, et il a été démontré qu'elle pouvait être cinétiquement plus rapide si celle-ci s'effectuait au sein d'enzymes. De ce fait, cette réaction s'est avérée être un réel candidat en vue de l'obtention d'une nouvelle KTGS. Lors d'une thèse réalisée précédemment au laboratoire par le Dr. Alexis Lossouarn, il a été décidé d'étudier cette réaction en KTGS en employant comme cible modèle l'anhydrase carbonique bovine de type II (*bCA-II*).

Après avoir validé cette réaction en KTGS, les ligands éthers de thiovinyle *Z* et *E* formés par la thiol-yne se sont avérés être photoisomérisables (Schéma 30). Cette propriété peut être très intéressante car elle pourrait permettre de réguler l'inhibition de l'activité de la CA-II en passant d'un

isomère à un autre. Notons pour que pour cela, il faudrait par la suite augmenter significativement leur différence d'activité vis-à-vis de cette cible d'au moins un facteur dix, alors qu'il n'est que d'un facteur d'environ deux pour le moment.

Cependant, les spectres UV-visible des deux isomères sont quasi identiques. Ainsi, la réversibilité de photoisomérisation est peu efficace car les deux maximas d'absorption se superposent, rendant difficile l'excitation d'un isomère et pas de l'autre. L'objectif serait donc d'augmenter la réversibilité de photoisomérisation du ligand en ne changeant que très peu sa structure, de façon à garder des affinités du même ordre pour la bCA-II.

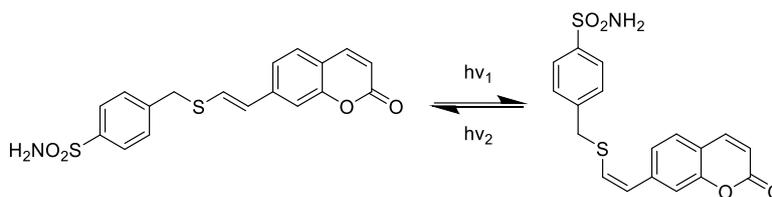


Schéma 30 : Photoisomérisation du ligand obtenu par réaction de thiol-yne en KTGS

Enfin, la structure du ligand formé par KTGS peut être modifiée afin d'envisager des constantes d'inhibition significativement différentes pour les deux isomères. Dans ce cas, la propriété de photocommutation prendrait son réel intérêt et l'activité du ligand pourrait être photomodulée.

3.2. Amélioration du ligand obtenu par thiol-yne en KTGS en vue d'applications *in vivo*

A partir des travaux présentés dans la partie précédente, la photocommutation des isomères d'un ligand éther de thiovinyle fluorescent obtenu par KTGS a pu être améliorée. Cependant, la longueur d'onde nécessaire à la photoisomérisation de l'isomère Z se situe dans le domaine de l'UV.

Afin d'ajouter de la plus-value à cette propriété fort intéressante en vue d'applications biologiques, le développement d'éthers de thiovinyle fluorescents capables de photocommuter exclusivement dans des longueurs d'onde du visible sont à envisager, ceux-ci étant moins néfastes pour les cibles d'intérêt.

3.3. Développement d'une réaction photoactivable en KTGS

Les réactions développées en KTGS sont de plus en plus nombreuses. Cependant, certaines limites subsistent, notamment le temps d'incubation long des fragments au sein de la cible, pouvant

l'endommager structurellement et ainsi fausser les résultats finaux. Paradoxalement, les fragments utilisés en KTGS ne doivent pas être trop réactifs afin qu'ils ne réagissent pas à l'extérieur de la cible biologique, conduisant à de faux positifs.

Afin de remédier à ces problèmes, l'élaboration d'une réaction photoactivable est envisagée, c'est-à-dire qu'un fragment composé d'une fonction photoréactive sera élaboré, celui-ci ne pouvant réagir qu'après irradiation lumineuse (Schéma 31). Cela permettra d'accélérer de façon drastique la formation du ligand attendu et de contrôler temporellement sa synthèse. De plus, les fragments qui ne sont pas fixés à la biomolécule et donc non voisins immédiats réagiront avec les molécules d'eau abondantes dans le milieu environnant. Ainsi, l'obtention de faux positifs sera limitée tout en accélérant la formation du ligand dans la cible biologique. La cible étudiée en premier lieu sera, une fois de plus, la *bCA-II*, celle-ci ayant déjà fait ses preuves en KTGS au laboratoire.

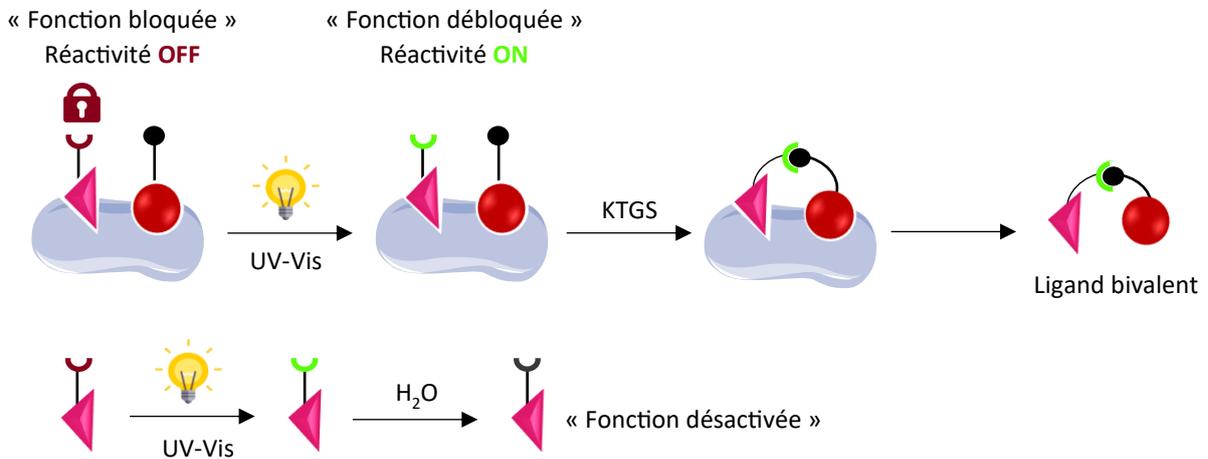


Schéma 31 : Développement d'une réaction photoactivable en KTGS

Chapitre 2 : Amélioration des propriétés de photoisomérisation d'un ligand obtenu par réaction de thiol-yne en KTGS

La recherche de nouvelles ligations en KTGS est un objectif ambitieux, les contraintes associées à ces réactions étant particulièrement importantes. En effet, les fonctions réactives de petite taille sont à privilégier afin de limiter leur impact sur l'affinité des fragments. La réaction doit être biocompatible de façon à éviter toute dégradation de la cible biologique, avoir une cinétique suffisamment lente en l'absence de la cible biologique afin d'éviter tout faux positif. Récemment, dans le cadre de la thèse soutenue par Alexis Lossouarn le 11 décembre 2020 intitulée « Développement de nouvelles réactions de click séquentielles appliquées à la synthèse contrôlée par la cible d'inhibiteurs de protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer », notre équipe a pu mettre en lumière que la réaction thiol-yne pouvait répondre à ces critères et donc élargir la liste des quelques réactions ainsi disponibles en KTGS.

La KTGS a été réalisée avec l'enzyme modèle anhydrase carbonique bovine II (*bCA-II*), conduisant à la formation *in situ* d'un inhibiteur de type éther de thiovinyle sous forme d'un mélange de diastéréoisomères *Z* et *E*. En essayant de séparer ces deux isomères pour étudier leurs propriétés (biologiques et optiques) individuellement, il a été observé qu'ils étaient capables de photoisomériser. Cette propriété est particulièrement intéressante en chimie thérapeutique afin de contrôler l'activité du ligand par irradiation lumineuse si et seulement si les propriétés inhibitrices des isomères diffèrent suffisamment⁶⁷. Malheureusement, ce n'est pas le cas pour cette étude. De plus, il a été remarqué que la réversibilité de photoisomérisation de l'isomère *E* en isomère *Z* en fonction de la longueur d'onde d'irradiation était peu efficace notamment suite à la superposition des spectres UV-visible des deux isomères qui empêche de les irradier sélectivement. L'objectif des travaux de ce chapitre est donc d'améliorer la réversibilité de photoisomérisation du ligand afin de former préférentiellement l'un ou l'autre des deux diastéréoisomères en fonction du stimulus lumineux utilisé, et cela en modifiant méticuleusement le squelette du ligand.

Pour ce faire, l'éligibilité de la réaction de thiol-yne en KTGS sera tout d'abord abordée de façon à contextualiser les travaux précédemment réalisés au laboratoire par Alexis Lossouarn lors de sa thèse. Dans un deuxième temps, une étude de relation structure-propriétés photophysiques réalisée en

⁶⁷ W. A. Velema, W. Szymanski, B. L. Feringa, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2178–2191.

collaboration avec l'équipe d'Analyse et Modélisation du laboratoire sera présentée. Elle a permis de sélectionner un ligand analogue dont la synthèse et les propriétés photophysiques (fluorescence et photoisomérisation) seront abordées.

1. Développement de la réaction de thiol-yne en KTGS⁶⁸

1.1. Choix de la réaction thiol-yne en KTGS

Pour être éligibles en KTGS, les réactions doivent répondre à différents critères. Tout d'abord, comme indiqué précédemment, les fonctions chimiques utilisées doivent être de petite taille afin de minimiser leur impact sur l'affinité des fragments. Leur réactivité doit être faible en l'absence de la cible biologique afin d'éviter les faux positifs. Une étude rétrospective réalisée par notre équipe a recensé que les constantes de vitesse de telles réactions étaient généralement comprises entre 10^{-2} et $10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ et que les ligations utilisées étaient issues de réactions de bioconjugaison ou de réactions bioorthogonales⁶⁹. Toutefois, ces deux dernières classes de réactions étant généralement trop rapides ($>10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) pour la KTGS (la réaction a lieu sans la biomolécule cible), des aménagements sont nécessaires pour que les réactions de bioconjugaison ou bioorthogonales utilisées en chémobiologie deviennent éligibles à la KTGS. Il est possible d'utiliser des fonctions chimiques moins réactives (chlorure au lieu de bromure comme électrophile pour une $\text{S}_{\text{N}}2$ par exemple ou amide α - β -insaturé au lieu d'un maléimide comme électrophile mou)^{45,50,51,54}, ou retirer le catalyseur de la réaction comme c'est le cas avec la click *in situ*⁴² (Figure 11).

⁶⁸ Les travaux rapportés dans cette partie ont été effectués par A. Lossouarn dans sa thèse intitulée « Développement de nouvelles réactions de click séquentielles appliquées à la synthèse contrôlée par la cible d'inhibiteurs de protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer » et soutenue le 11 décembre 2020.

⁶⁹ A. Lossouarn, P.-Y. Renard, C. Sabot, *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32*, 63–72.

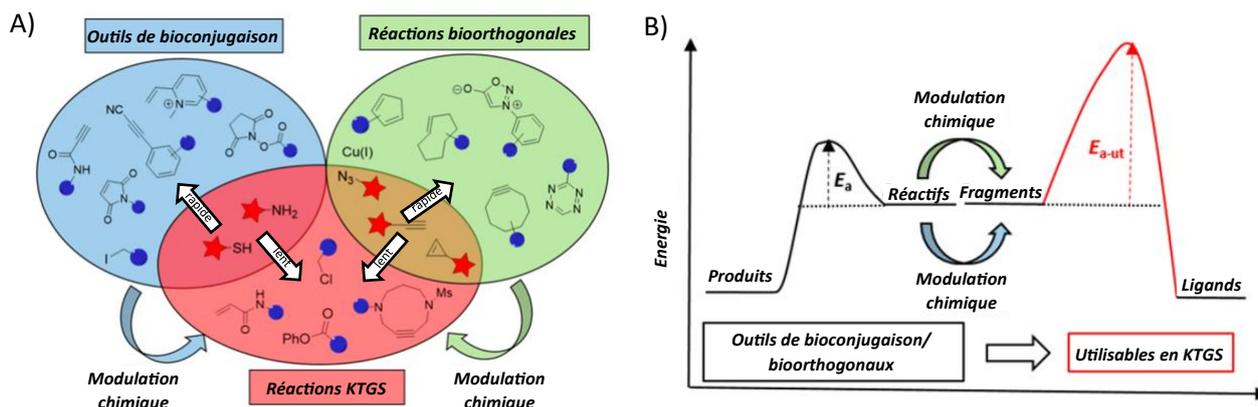


Figure 11 : Aménagement des réactions de bioconjugaison ou bioorthogonales pour les rendre éligible en KTGS (Figures extraites et modifiées de l'article⁶⁹)

Cette analyse rétrospective a également permis de proposer un certain nombre de réactions potentiellement éligibles en KTGS, la réaction de thiol-yne étant l'une d'entre elles. Celle-ci permet d'accéder à un éther de thiovinyle de régiosélectivité Markovnikov (MK) ou anti-Markovnikov (AMK) par réaction entre un alcyne et son partenaire nucléophile thiol. En synthèse organique, cette réaction est, le plus souvent, conduite en présence de bases organiques et inorganiques ou catalysée par des métaux de transition ou des photoinitiateurs⁷⁰. Cela met donc en évidence la nécessité d'activer la réaction pour qu'elle ait lieu.

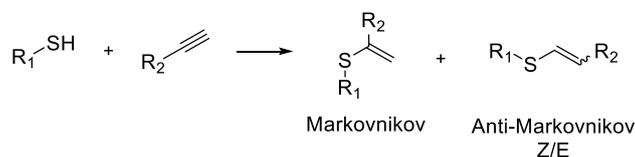


Schéma 32 : Réaction de thiol-yne

Cette réaction a fait ses preuves en bioconjugaison, notamment pour le marquage de cystéines. L'équipe de Bernardes démontre en effet qu'il est possible de moduler la réactivité de la thiol-yne en utilisant le 2-éthynylpyridinium comme partenaire électrophile⁷¹ (Schéma 33). Par activation de l'alcyne grâce à l'effet électroattracteur du groupement pyridinium, ce système permet la modification rapide et sélective de la cystéine par la 2-éthynylpyridine quaternarisée.

⁷⁰ a) J. C. Worch, C. J. Stubbs, M. J. Price, A. P. Dove, *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 6744–6776 ; b) C. E. Hoyle, A. B. Lowe, C. N. Bowman, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1355.

⁷¹ M. J. Matos, C. D. Navo, T. Hakala, X. Ferhati, A. Guerreiro, D. Hartmann, B. Bernardim, K. L. Saar, I. Compañón, F. Corzana, T. P. J. Knowles, G. Jiménez-Osés, G. J. L. Bernardes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 6640–6644.

En revanche, cette réaction peut être drastiquement ralentie en remplaçant le pyridinium par la pyridine, la cinétique passant de $1\text{-}10\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ à $10^{-4}\text{-}10^{-3}\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, rentrant ainsi dans le domaine d'éligibilité de la KTGS. Ces différences de cinétique ont été démontrées avec le 1-propanethiol, modèle simplifié de la cystéine.

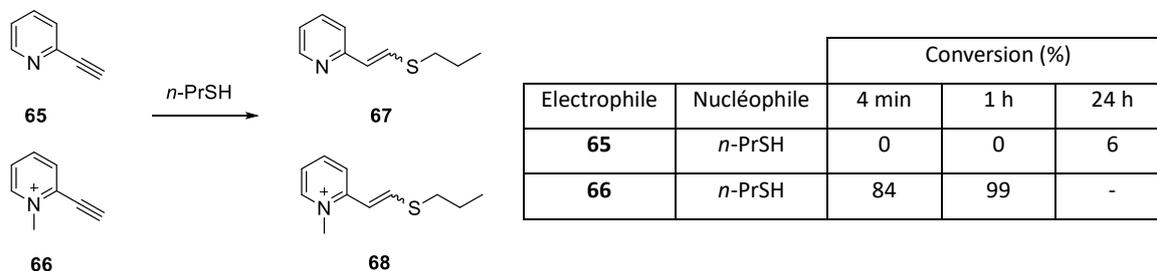


Schéma 33 : Modulation de la réactivité de la thiol-yne en fonction du groupement électroattracteur choisi

De plus, les travaux réalisés indépendamment par Ovaa⁷² et Mootz⁷³ ont montré que la thiol-yne peut aussi avoir lieu au sein d'une cible biologique, celle-ci permettant de rapprocher l'alcyne aliphatique du biothiol présent dans leur site actif et ainsi augmenter les chances de rencontre de ces deux fonctions. Ces travaux ont été effectués sur l'enzyme de désubiquitination (DUB), une protéase à cystéine qui clive l'ubiquitine des protéines et empêche la régulation de leur dégradation. En effet, en fonctionnalisant la partie C-terminale des ubiquitines par un motif propargyle, celles-ci réagissent avec une cystéine présente dans l'enzyme et inhibent l'activité de cette dernière par liaison covalente. En revanche, la réaction n'a pas lieu sans effet de matrice, c'est-à-dire en présence de biothiols GSH ou Cys à la place de la protéase à cystéine (Schéma 34).

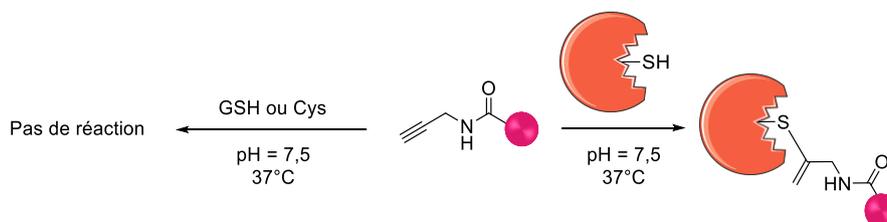


Schéma 34 : Réaction de thiol-yne par effet de matrice de la cible

Suite à ces différentes études, la thiol-yne a été choisie comme axe d'étude pour valider son éligibilité à la KTGS.

⁷² a) E. Mons, I. D. C. Jansen, J. Loboda, B. R. van Doodewaerd, J. Hermans, M. Verdoes, C. A. A. van Boeckel, P. A. van Veelen, B. Turk, D. Turk, H. Ovaa, *J Am Chem Soc* **2019**, *141*, 3507–3514, b) R. Ekkebus, S. I. van Kasteren, Y. Kulathu, A. Scholten, I. Berlin, P. P. Geurink, A. de Jong, S. Goerdayal, J. Neefjes, A. J. R. Heck, D. Komander, H. Ovaa, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2867–2870.

⁷³ S. Sommer, N. D. Weikart, U. Linne, H. D. Mootz, *Bioorg Med Chem* **2013**, *21*, 2511–2517.

1.2. Elaboration de la thiol-yne en KTGS

1.2.1. L'anhydrase carbonique de type II

Dans le but utiliser cette nouvelle ligation en KTGS, l'anhydrase carbonique bovine de type II (*bCA-II*) a été choisie comme cible biologique. Les anhydrases carboniques (CA) sont des métalloenzymes ubiquitaires d'environ 30 kDa. Leur site actif composé d'un atome de zinc II est coordonné aux imidazoles de trois histidines et un ion hydroxyde (ou une molécule d'eau) (Figure 12)⁷⁴.

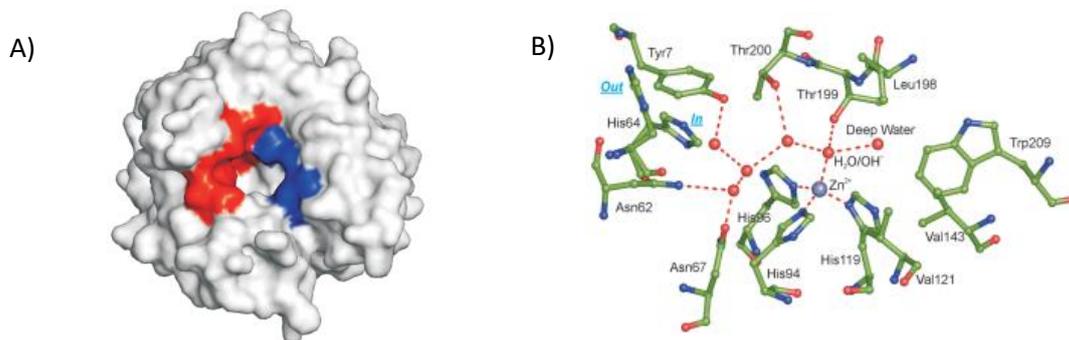


Figure 12 : Représentation de l'anhydrase carbonique II humaine, A) Surface accessible par les solvants de l'enzyme, B) Site actif de la hCA-II (Figure extraite de la revue⁷⁵)

Cette famille d'enzymes est capable de catalyser réversiblement l'hydratation du dioxyde de carbone (CO₂) en ion bicarbonate. Cette réaction simple est impliquée dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques tels que la régulation du pH, l'échange de gaz ou le transport d'ions⁷⁶. La famille des α -CA, présente majoritairement chez les mammifères, est composée de 16 protéines isoformes, toutes localisées dans différentes parties de la cellule : dans le cytosol (CA-I, II, III, VII et XIII), dans la région membranaire (CA-IV, IX, XII, XIV et XV), au niveau des mitochondries (CA-VA/VB) ou dans les sécrétions salivaires (CA-VI).

La CA est particulièrement attrayante en tant que cible biologique car elle est peu coûteuse, disponible, elle a une bonne stabilité (thermique) et est compatible avec différents tampons⁷⁴. Sa structure et son site actif sont également bien décrits dans la littérature (84 co-cristaux disponibles dans la banque de données des protéines), et son mécanisme d'activité catalytique est largement étudié et appréhendé. Du fait de son implication dans différents procédés physiologiques, la quantité ou l'activité anormale de la CA dans le corps est très souvent facteur de différentes maladies⁷⁵.

⁷⁴ a) V. M. Krishnamurthy, G. K. Kaufman, A. R. Urbach, I. Gitlin, K. L. Gudiksen, D. B. Weibel, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 946–1051 ; b) M. Lopez, H. Vu, C. K. Wang, M. G. Wolf, G. Groenhof, A. Innocenti, C. T. Supuran, S.-A. Poulsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18452–18462.

⁷⁵ V. Alterio, A. Di Fiore, K. D'Ambrosio, C. T. Supuran, G. De Simone, *Chem Rev* **2012**, *112*, 4421–4468.

⁷⁶ C. T. Supuran, *Nat Rev Drug Discov* **2008**, *7*, 168–181.

Les inhibiteurs de la CA sont d'ordinaire utilisés comme diurétiques, comme agents contre les glaucomes, l'épilepsie, l'obésité, les tumeurs et même contre le mal de montagne. Récemment, il a même été démontré que la surexpression de la CA pouvait être associée à des maladies cérébrales telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou encore l'angiopathie amyloïde cérébrale⁷⁷.

La majorité des inhibiteurs de la CA sont des molécules portant la fonction sulfonamide (-SO₂NH₂) ou ses bioisostères, tels que le sulfamate (-OSO₂NH₂) ou le sulfamide (-NHSO₂NH₂)⁷⁸. En effet, ces fonctions peuvent se lier à l'ion Zn²⁺ empêchant ainsi le dioxyde de carbone de s'y fixer (Figure 13).

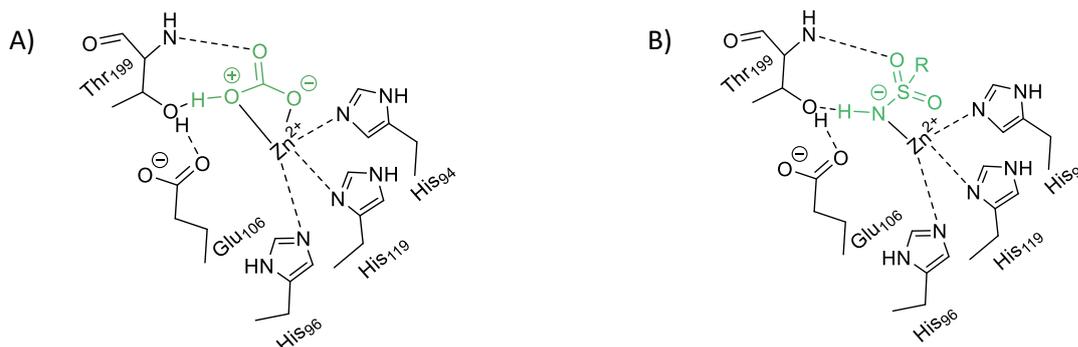


Figure 13 : Site actif de l'anhydrase carbonique humaine montrant : A) l'état de transition comportant l'ion Zn²⁺ lié au bicarbonate ; B) le groupement sulfonamide lié à l'ion Zn²⁺ (Figure extraite et modifiée de la revue^{74b})

Il existe aujourd'hui un certain nombre d'inhibiteurs de la CA qui ont été approuvés par la FDA et qui figurent sur le marché (Figure 14)⁷⁶. L'acétazolamide (ATZ) **65**, l'ethoxzolamide (ETHOX) **66** ou le métazolamide **67** qui sont des diurétiques utilisés pour traiter les œdèmes causés par une insuffisance cardiaque, mais ils sont aussi extensivement utilisés pour le traitement du glaucome. Cependant, l'administration orale des sulfonamides et de ses bioisostères génère une inhibition non spécifique de la CA, causant beaucoup d'effets secondaires tels que l'engourdissement des extrémités, un goût métallique dans la bouche, la dépression, la fatigue, la perte de poids, la diminution de libido, l'irritation gastrointestinale, l'acidose métabolique, les calculs rénaux ou encore la myopie transitoire. De ce fait, des inhibiteurs à administration locale ont été développés, à savoir le dorzolamide **68** ou le brinzolamide **69**, composés solubles dans l'eau et suffisamment liposolubles pour pénétrer la cornée par exemple.

⁷⁷ a) M. E. Solesio, P. M. Peixoto, L. Debure, S. M. Madamba, M. J. de Leon, T. Wisniewski, E. V. Pavlov, S. Fossati, *Aging Cell* **2018**, *17*, e12787 ; b) G. Provensi, F. Carta, A. Nocentini, C. T. Supuran, F. Casamenti, M. B. Passani, S. Fossati, *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 4724 ; c) A. Pollard, F. Shephard, J. Freed, S. Liddell, L. Chakrabarti, *Aging* **2016**, *8*, 2425–2436.

⁷⁸ M. Bozdog, A. S. A. Altamimi, D. Vullo, C. T. Supuran, F. Carta, *Current Medicinal Chemistry* **2019**, *26*, 2558–2573.

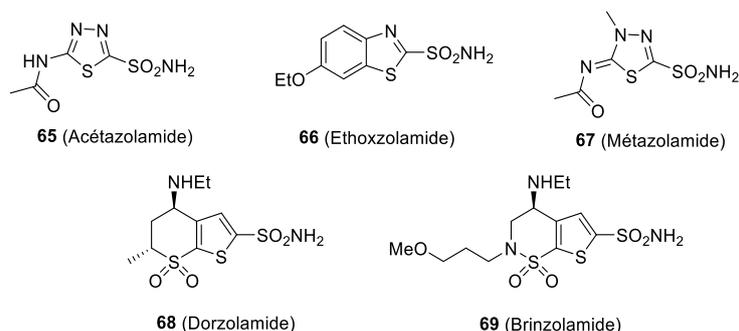


Figure 14 : Exemples d'inhibiteurs de la CA présents sur le marché

La synthèse d'inhibiteurs de la CA-II par KTGS a déjà été obtenue, dans un premier temps par l'équipe de Huc⁵¹ par réaction de thioalkylation, mais aussi par Sharpless à partir de la célèbre réaction click *in situ*⁴². A partir de ces deux études, deux ligands ont été retenus en raison de leur simplicité structurale et de leur facilité d'accès synthétique (Figure 15). Ainsi, des structures générales de ligands potentiellement issues de réaction thiol-yne, comprenant des liens éthers de thiovinyle ont été proposées par l'équipe en vue d'élaborer une chimiothèque de fragments thiol et alcyne à tester en KTGS, à savoir des régioisomères de type MK ou AMK, avec dans ce dernier cas de figure la possible formation des diastéréoisomères *Z* et *E*.

N'ayant pas la possibilité de modéliser la CA-II au laboratoire et donc de comparer les résultats de *docking* des structures proposées au sein du site actif de l'enzyme avec celui des ligands connus, quatre points de corrélation ont été définis afin de comparer les distances interatomiques entre les structures des ligands potentiels et celles de référence : 1) la fonction sulfonamide, 2) le premier cycle aromatique, 3) la ligation formée *in situ* et 4) le second cycle aromatique/hétéroaromatique. Cela a permis d'établir un profil type de ligands dont la formation *in situ* serait adaptée à la poche enzymatique de la *bCA-II*.

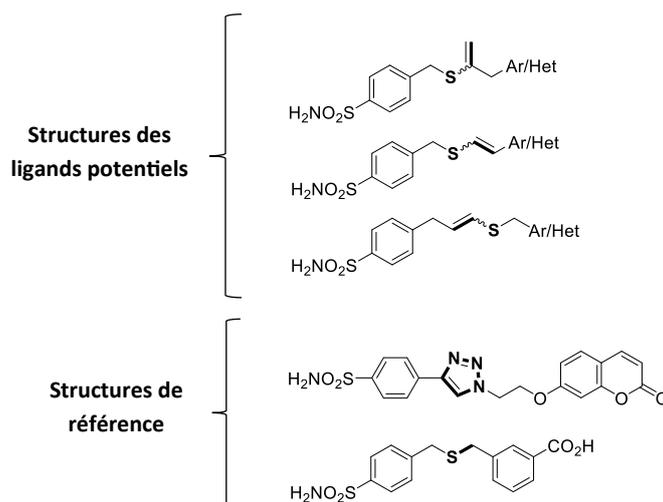


Figure 15 : Comparaison des structures de ligands potentiels avec celles des ligands de référence

1.2.2. Synthèse des molécules nécessaires à la thiol-yne en KTGS

1.2.2.1. Préparation des fragments

Dans le but de parvenir à ces ligands, deux fragments portant la fonction sulfonamide ont été imaginés pour servir de point d'ancrage avec la cible biologique : le fragment thiol benzylque et le fragment alcyne associé (Schéma 35). Le fragment thiol **33** a été synthétisé en se basant sur les travaux de Huc précédemment décrits⁵¹. Comme évoqué précédemment, tous les travaux décrits dans la partie 1 de ce chapitre sont issus de la thèse d'Alexis Lossouarn.

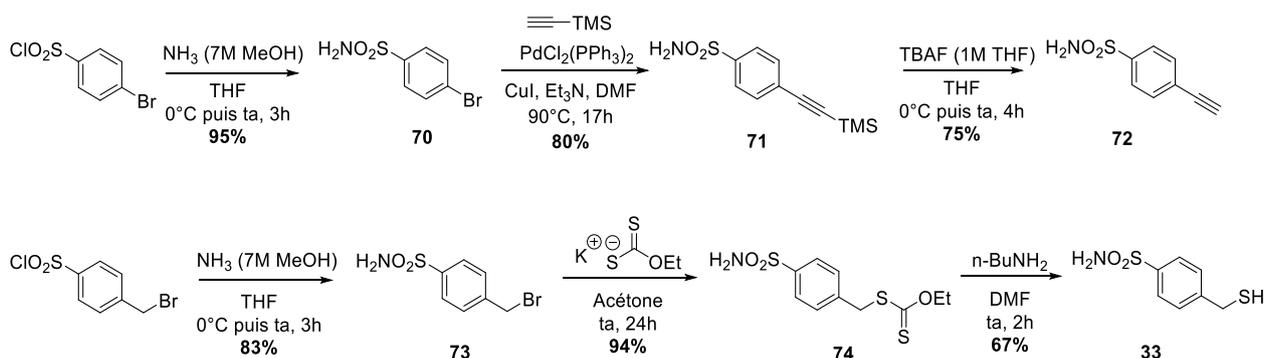


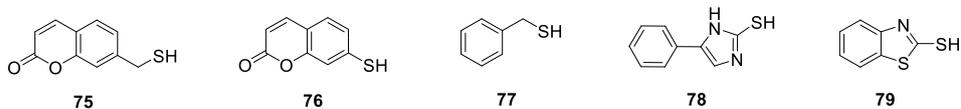
Schéma 35 : Synthèse des fragments portant la fonction sulfonamide

La première étape pour accéder aux deux fragments attendus se fait à partir d'un chlorure de thionyle en présence d'une solution d'ammoniac (7 N) dans le méthanol afin d'obtenir la fonction sulfonamide **70** ou **73**. Par la suite, le composé **71** est obtenu avec un rendement de 80% par un couplage de Sonogashira entre le bromophényle **70** et le triméthylsilylacétylène. Enfin, l'alcyne **71** ainsi obtenu est déprotégé par le TBAF afin d'obtenir l'alcyne terminal **72** avec un rendement satisfaisant de

75%. Le 4-(bromométhyl)benzènesulfonamide **73** quant à lui subit une substitution nucléophile par un groupement xanthate afin d'obtenir le composé **74** avec un rendement global de 52%. Quand ce fragment doit être utilisé, la fonction thiol est déprotégée par la n-butylamine afin de parvenir au thiol libre **33**. Cette dernière étape doit être faite au dernier moment afin d'éviter la formation de ponts disulfures.

Par ailleurs, d'autres fragments partenaires dans les réactions de thiol-yne ont été imaginés, certains portant des motifs coumariniques afin de se rapprocher de ligands développés par Sharpless, d'autres des motifs aromatiques ou hétérocycliques afin d'exemplifier la librairie de fragments possibles (Figure 16).

Fragments thiol



Fragments alcyne

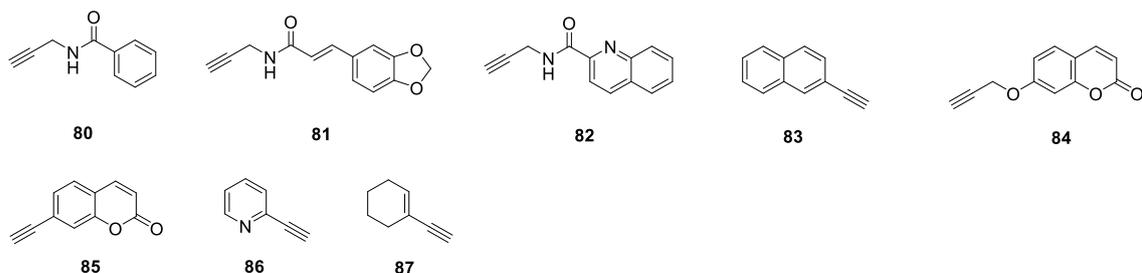


Figure 16 : Fragments imaginés pour la réaction de thiol-yne

1.2.2.2. Préparation des références attendues

Afin de pouvoir analyser les mélanges obtenus lors de la mise en œuvre de la réaction de KTGS, il est fortement conseillé de synthétiser au préalable la référence des ligands inhibiteurs attendus. En effet, la quantité de produit formé lors d'une réaction en KTGS est souvent faible. Ainsi, par l'obtention préalable des références attendues, les méthodes analytiques pourront être optimisées plus rapidement.

Dans le but de réaliser la réaction de thiol-yne, il a fallu imaginer une méthode de synthèse permettant d'obtenir les isomères de type MK et AMK, ce qui exclut l'emploi de conditions radicalaires car elles ne permettent pas d'accéder à la formation d'éthers de thiovinyle de type MK. De plus, l'utilisation de catalyseurs métalliques s'est avérée non fructueuse. De ce fait, des conditions basiques ont été privilégiées, notamment l'emploi du DBU, base réputée pour sa faible nucléophilie (Schéma

36). En fonction de la réactivité des fragments, les quantités de base vont varier. Il en est de même pour la température et le solvant utilisé.

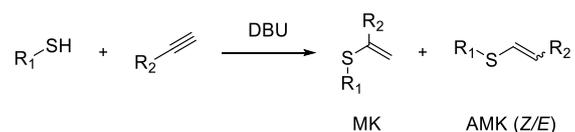


Schéma 36 : Synthèse des références par la réaction de thiol-yne en présence de DBU

1.2.3. Mise en œuvre des conditions de KTGS

Après avoir synthétisé les références associées aux ligations d'intérêt, les expériences KTGS ont été effectuées en tests binaires, c'est-à-dire entre un fragment alcyne et un fragment thiol seulement. Afin de maximiser les chances de succès, des conditions expérimentales similaires à celles décrites dans la littérature ont été choisies⁵¹, à savoir celles présentées dans le Tableau 1, dans des conditions physiologiques de pH et température (tampon phosphate 0,25 M, pH 7,4, 37°C).

Les expériences de contrôle effectuées en l'absence d'enzyme (« Blanc ») et en présence d'enzyme et d'inhibiteur (« Inhibiteur ») ont été menées en parallèle des expériences de KTGS en présence d'enzyme (« Enzyme ») afin de vérifier que la réaction est bien promue par la bCA-II et que la formation du ligand a bien lieu au sein du site actif connu de l'enzyme. Afin d'éliminer toute photoactivation/photoisomérisation potentielle, les expériences ont été menées dans l'obscurité par incubation dans un four thermostaté à 37 °C pendant 36 h dans des eppendorfs noirs (opacité de 100%), chaque expérience ayant été réalisée en triplicata.

Nom de la manipulation	Fragment thiol (μM)	Fragment alcyne (μM)	Enzyme (μM)	ATZ ou ETHOX (μM)
Blanc	400	60	0	0
Enzyme	400	60	30	0
Inhibiteur	400	60	30	200

Tableau 1 : Conditions expérimentales de la KTGS

Dans un premier temps, des combinaisons entre le thiol **33** et différents alcynes aromatiques (**72**, **83**, **85**, **86**) ou aliphatiques (**80**, **81**, **82**, **84**, **87**) ont été mises en place. De la même façon, diverses combinaisons entre l'alcyne **72** en présence de différents thiols aliphatiques (**75**, **77**) et aromatiques (**76**, **78**, **79**) ont également été effectuées. Sur 14 combinaisons possibles, seules 11 ont pu être conduites en KTGS, soit car les ligands de référence n'ont pas pu être obtenus par voie synthétique, soit car l'optimisation des méthodes analytiques (LC-MS et transitions MRM) à partir des bruts réactionnels n'a pas pu être effectuée. Parmi celles-ci, seule la ligation entre le thiol **33** et l'éthynylcoumarine **85** a pu être obtenue par KTGS, donnant accès au ligand éther de thiovinyle **88** (Schéma 37).

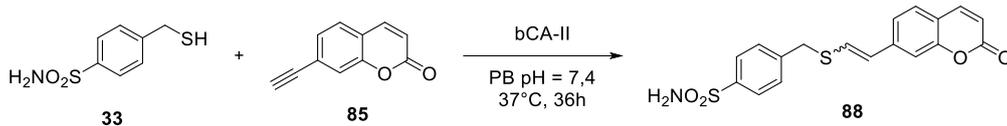


Schéma 37 : Réaction de thiol-yne en KTGS obtenue avec succès

En effet, la comparaison des aires des signaux obtenus lors des analyses par LC-MS/MRM des expériences « Blanc » et « Enzyme » a permis de confirmer que la *bCA-II* favorisait la ligation entre ces deux fragments, avec une accélération de formation de produit jusqu'à dix fois plus importante en présence de l'enzyme (Figure 17). Un mélange de diastéréoisomères *Z/E* du ligand **88** est obtenu (*Z/E* 89 :11), tandis qu'aucune trace du produit MK n'est observée. La quantité de ligand formé est également fortement impactée en présence d'inhibiteur ATZ ou ETHOX, ce qui valide que le site actif nécessaire à la KTGS correspond à celui qui a été inhibé.

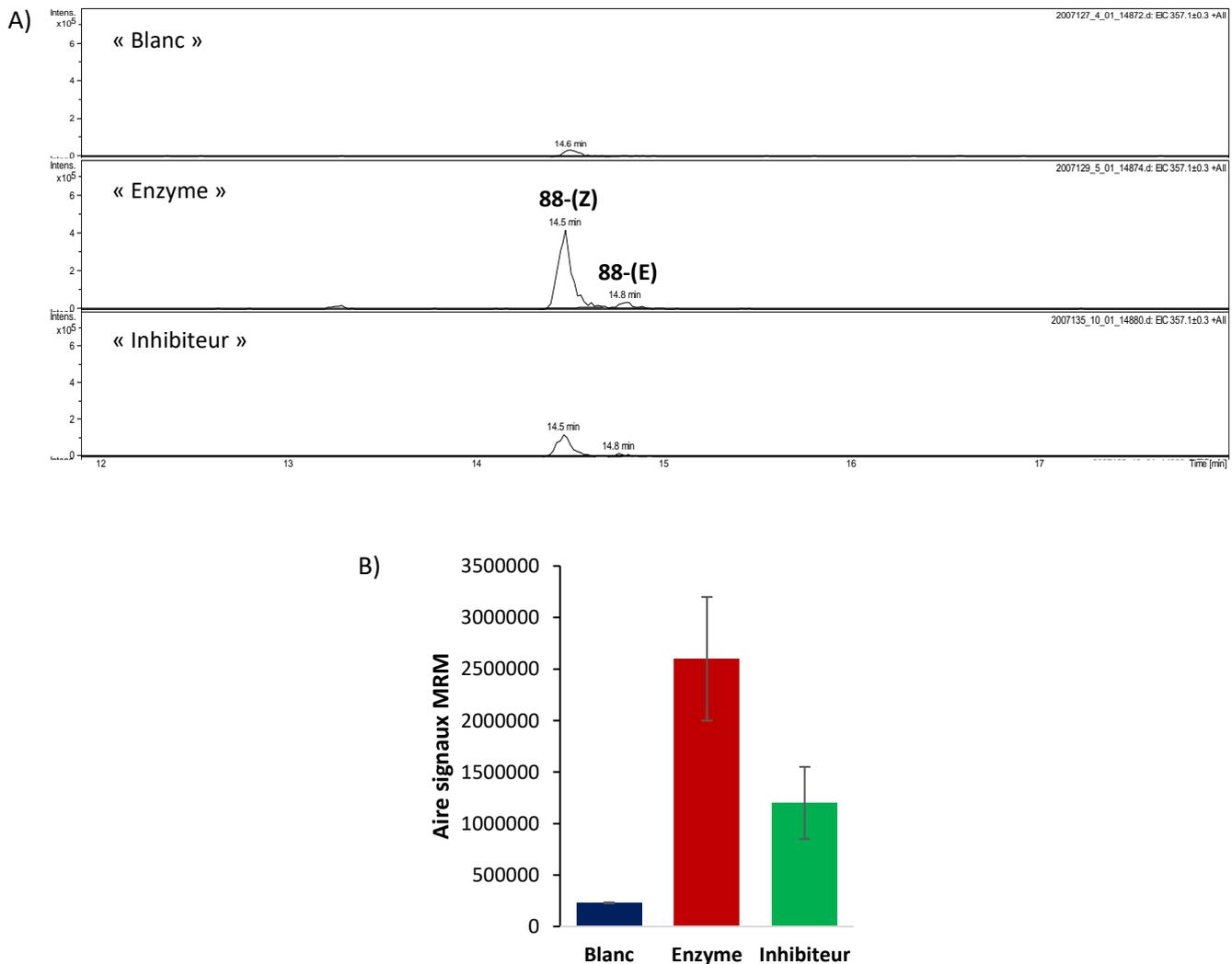


Figure 17 : A) Résultats LC-MS/MRM après 36 h d'incubation de la ligation thiol-yne par KTGS comparée aux références *Z/E* (transition MRM m/z 374.4 $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 357.1 $[M2+H]^+$), B) Aires des signaux obtenus en transition MRM pour chaque expérience

La même expérience en KTGS a été conduite en présence du mercaptobenzyle **77**, analogue au thiol **33** qui n'interagit pas avec le zinc présent dans le site actif de la bCA-II du fait de son absence de fonction sulfonamide. Ici, aucune accélération de ligation n'est observée, ce qui valide l'utilisation du sulfonamide comme point d'ancrage avec l'anhydrase carbonique.

1.2.4. Propriétés du ligand éther de thiovinyle **88**

1.2.4.1. Propriétés biologiques

Les anhydrases carboniques possédant également une activité d'estérase^{74b}, il est possible de mesurer l'activité biologique des ligands obtenus vis-à-vis de ces cibles, comme les IC₅₀. D'ailleurs, Pocker et Stone ont développé une méthode permettant de la déterminer grâce à l'acétate de 4-nitrophényle (PNPA), servant de substrat⁷⁹ (Schéma 38). En effet, le PNPA est incolore, mais une fois hydrolysé par l'anhydrase carbonique, le 4-nitrophénolate (pKa = 7,14) est formé et libère une couleur jaune intense. Il est donc possible de suivre la vitesse de l'hydrolyse promue par la bCA-II en mesurant l'absorbance d'un mélange de l'enzyme avec le ligand inhibiteur et le PNPA à 348 nm. En effet, plus la bCA-II est inhibée, plus la quantité de PNPA hydrolysé sera faible, donc l'absorbance à 348 nm sera faible également.

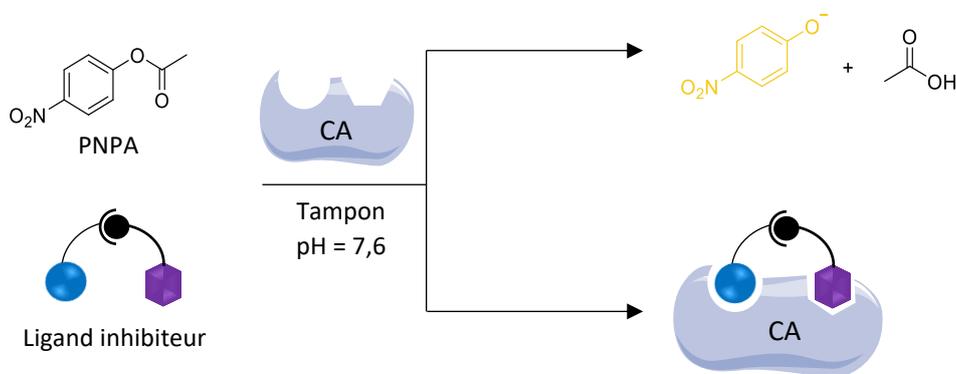


Schéma 38 : Méthode de Pocker et Stone pour la détermination d'IC₅₀ avec la CA

L'activité biologique des isomères *Z* et *E* du ligand **88** a ainsi été déterminée après séparation des deux isomères, et celle-ci est respectivement de $0,33 \pm 0,01$ et $0,55 \pm 0,07$ μM , tandis que l'ATZ a un IC₅₀ de $0,14 \pm 0,02$ μM . Les valeurs des IC₅₀ des isomères sont de l'ordre de grandeur de celle du thiol **33** (IC₅₀ = $0,68 \pm 0,04$ μM) mais l'écart est suffisant pour constater un effet additif sur l'activité via la formation la liaison entre les fragments **33** et **85**. A noter que l'impact de la rigidité du lien éther de

⁷⁹ Y. Pocker, J. T. Stone, *Biochemistry* **1967**, 6, 668–678.

thiovinyle sur l'activité biologique a été étudiée en préparant l'analogue thioéther à chaîne saturée dont l'IC₅₀ de $0,36 \pm 0,07 \mu\text{M}$ est proche du diastéréoisomère Z.

Enfin, la stabilité du lien éther de thiovinyle a été étudiée en présence de dérivés de biothiols (N-acétyl cystéine, glutathion) ainsi que dans le plasma sanguin humain après plusieurs jours d'incubation à 37 °C. Aucune dégradation n'a été observée, ce qui confirme la stabilité de l'éther de thiovinyle **88** et l'irréversibilité de sa réaction dans des conditions physiologiques.

1.2.4.2. Propriétés photophysiques

Les propriétés spectrales des isomères du composé **88** ont été étudiées et tous deux ont révélé leur fluorescence par excitation à 350 nm. Nous remarquons que leur absorbance et leur émission sont très similaires, avec un déplacement de Stokes assez large (δ_{Stokes}) ($\lambda_{\text{Abs max}} = 354 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{Em max}} = 513 \text{ nm}$ dans le PBS à pH = 7,4 donc $\delta_{\text{Stokes}} = 159 \text{ nm}$). Seul leur rendement quantique diffère significativement, avec une valeur de 0,16 et 0,52 pour les isomères Z et E, respectivement (Figure 18). Le solvatochromisme en absorption et émission des deux isomères a aussi été étudié. Si aucun effet de solvant n'est observé sur l'absorbance des deux isomères, un déplacement hypsochrome de l'émission de fluorescence est observé lorsque la polarité du solvant diminue. Ce solvatochromisme positif est caractéristique des coumarines qui sont des fluorophores à transfert de charge.

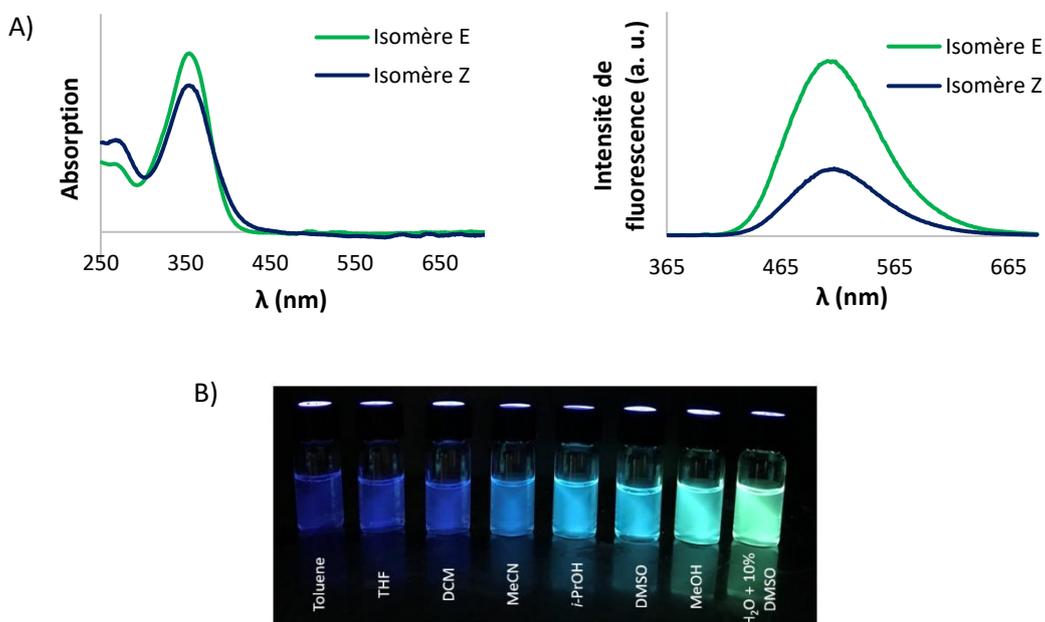


Figure 18 : A) Spectres d'absorption et d'émission des isomères Z et E du ligand **88** (50 μM) dans le PBS à pH = 7,4 à 25°C, B) Photographie de l'isomère E du ligand **88** (10 μM) dans différents solvants sous irradiation à $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$

Lors de la première tentative de séparation de ces isomères par RP-HPLC semi-préparative, une photoisomérisation Z→E a été constatée, qui se produit lorsque l'échantillon est placé à la lumière

blanche. Ce phénomène a été étudié plus en détail par la suite afin de mettre en évidence la réversibilité de ce processus et les optimisations possibles.

1.3. Etude de la photoisomérisation du ligand éther de thiovinyle

1.3.1. Introduction à la photoisomérisation

1.3.1.1. Rappel du principe de photoisomérisation et exemples de composés photoisomérisables

La photoisomérisation, ou isomérisation photoinduite, peut principalement avoir lieu par isomérisation de doubles liaisons (*Z/E*), par réaction d'électrocyclisation ou cyclisation et peut être réversible ou non. C'est un phénomène clé qui intervient dans le cycle de la vision qui est régi par la photoisomérisation du rétinal⁸⁰. Les grandes classes de composés photoisomérisables aussi appelés photocommutables sont les azobenzènes⁸¹, les stilbènes⁸², les diaryléthènes⁸³, les spiropyranes⁸⁴, et plus récemment les hydrazones⁸⁵ ou iminothioindoxyles⁸⁶ (Schéma 38). De manière intéressante, la photoisomérisation de ces composés est réversible et permet d'accéder à l'un ou l'autre isomère de manière prédominante en fonction de la longueur d'onde utilisée. A noter que l'isomérisation de la forme de plus haute énergie vers la forme métastable peut également être réalisée thermiquement comme dans le cas des azobenzènes dont l'isomérisation $Z \rightarrow E$ est également observée en l'absence de lumière. L'isomère *E* est l'isomère métastable, et la photoisomérisation $Z \rightarrow E$ peut alors être en compétition avec la relaxation thermique. De nombreux paramètres entrent en compte pour obtenir un phénomène de photoisomérisation efficace tels que le mode d'excitation, les longueurs d'onde d'irradiation, les propriétés des solvants, les substituants sur la molécule, la température ou encore la pression⁸¹.

⁸⁰ G. Wald, *Science* **1968**, *162*, 230–239.

⁸¹ H. M. D. Bandara, S. C. Burdette, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1809–1825.

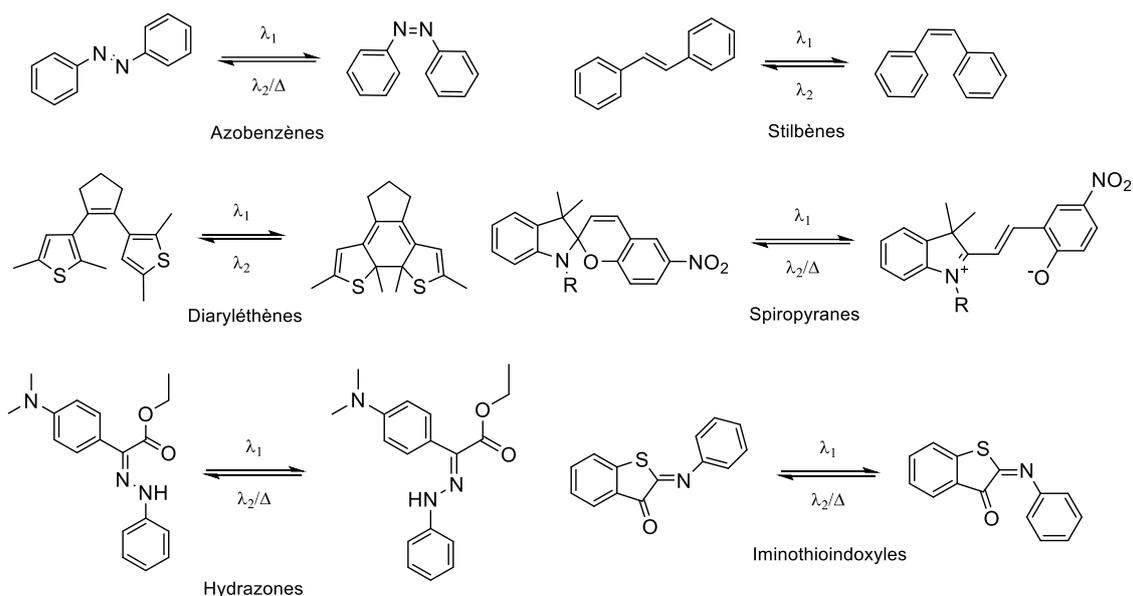
⁸² D. H. Waldeck, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 415–436.

⁸³ M. Irie, T. Fukaminato, K. Matsuda, S. Kobatake, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 12174–12277.

⁸⁴ R. Klajn, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *43*, 148–184.

⁸⁵ B. Shao, M. Baroncini, H. Qian, L. Bussotti, M. Di Donato, A. Credi, I. Aprahamian, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 12323–12327.

⁸⁶ M. W. H. Hoorens, M. Medved', A. D. Laurent, M. Di Donato, S. Fanetti, L. Slappendel, M. Hilbers, B. L. Feringa, W. Jan Buma, W. Szymanski, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2390.



Afin de mieux comprendre le mécanisme associé à la photoisomérisation *Z/E* concernant le système éther de thiovinyle précédemment développé, nous aborderons le cas de l'azobenzène. En effet, cette famille de molécules est la plus étudiée dans ce domaine et adopte également une photoisomérisation *Z/E*. Cette étude servira donc d'appui pour illustrer la problématique rencontrée lors de ces travaux.

1.3.1.2. Photoisomérisation de l'azobenzène

L'azobenzène (AB) possède un spectre d'absorption contenant deux bandes bien séparées dans le domaine UV-Visible, à savoir une large bande UV correspondant à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ et une bande dans le domaine du visible plus faible, celle-ci étant associée à la transition $n \rightarrow \pi^*$. Ces transitions excitent le système à l'état $S_2(\pi \rightarrow \pi^*)$ et $S_1(n \rightarrow \pi^*)$ respectivement.

Si l'on considère le système AB présenté dans le Schéma 39, les deux isomères *Z* et *E* possèdent quelques différences spectrales. En effet, la bande $\pi \rightarrow \pi^*$ localisée aux environs de 320 nm est plus forte pour le *E*-AB, tandis que la bande $n \rightarrow \pi^*$ située aux alentours de 440 nm est plus faible. Ainsi, en irradiant la bande $\pi \rightarrow \pi^*$, le *E*-AB subit une photoisomérisation *E*→*Z* plus importante qu'en irradiant la bande $n \rightarrow \pi^*$, et inversement pour le *Z*-AB. De plus, une isomérisation thermique réalisée à l'abri de la lumière permet souvent d'accéder à l'isomérisation *Z*→*E*, le produit *E* étant plus stable thermodynamiquement (il est dit métastable). Dans le cas où les bandes d'absorption correspondant aux deux isomères se recouvrent, il n'est pas possible de photoisomériser totalement l'un des isomères en l'autre. De ce fait, après irradiation prolongée, le mélange converge vers un état photostationnaire (EPS) qui dépendra des valeurs respectives des coefficients d'extinction molaire (ϵ) et des rendements quantiques de photoisomérisation des deux isomères à la longueur d'onde utilisée.

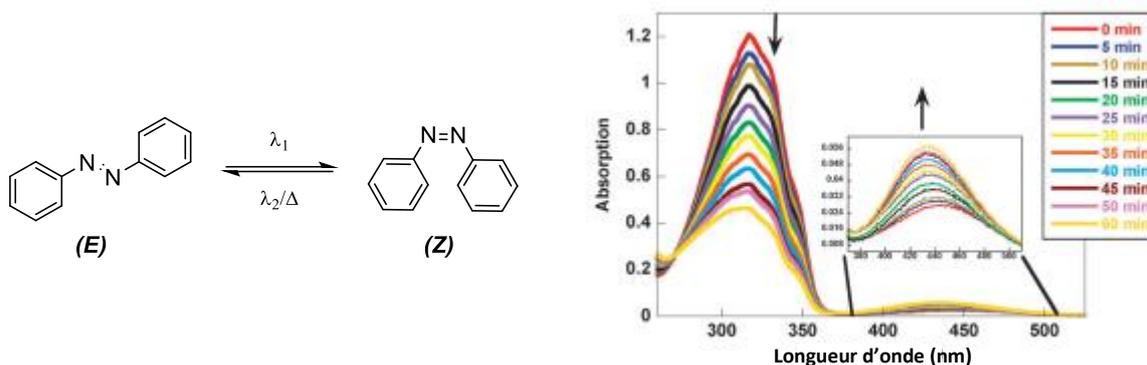


Schéma 39 : Photoisomérisation $E \rightarrow Z$ de l'azobenzène sous irradiation à 316 nm (Schéma extrait et modifié de l'article⁸⁷)

Dans le cas où la molécule photocommutable a pour but d'être utilisée dans des milieux biologiques, la bande $n \rightarrow \pi^*$ se voit particulièrement intéressante car elle est majoritairement présente dans le domaine du visible, donc pénétrante et peu invasive.

1.3.1.3. Applications de la photoisomérisation

Les molécules photoisomérisables sont particulièrement intéressantes puisque la seule action de la lumière permet de moduler leur géométrie et leurs propriétés physicochimiques, biologiques voire optiques.

A titre d'exemple, elles peuvent être intégrées dans des matériaux et nanostructures de façon à moduler de façon réversible leurs propriétés micro- et macroscopiques. C'est le cas des hydrogels photochromiques qui, par photoisomérisation, peuvent voir la taille de leurs pores, leur élasticité, leur viscosité ou leur gonflement à l'eau se modifier drastiquement⁸⁷. Ces hydrogels peuvent donc se dissiper réversiblement par irradiation lumineuse et ainsi libérer les molécules qu'ils encapsulaient.

La lumière est également considérée comme un « réactif » qui ne contamine pas le milieu dans lequel l'irradiation se produit et qui détient une précision spatiotemporelle accrue. De ce fait, les molécules photoisomérisables sont devenues très importantes pour l'étude et le contrôle de systèmes biologiques, puisque l'activité des biomolécules avec lesquelles ces systèmes interagissent peut être contrôlée sélectivement sans ajout de quelconque réactif, additif ou catalyseur⁸⁸ autre qu'une irradiation lumineuse. Néanmoins, pour tirer profit de cette propriété, il faut que l'activité biologique de l'un des deux isomères soit significativement différente de celle de l'autre isomère et que les photoconversions en isomères Z et E soient élevées. Ce point crucial sera abordé plus loin dans le chapitre.

⁸⁷ Z. L. Pianowski, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 5128–5144.

⁸⁸ W. Szymański, J. M. Beierle, H. A. V. Kistemaker, W. A. Velema, B. L. Feringa, *Chem. Rev.* **2016**, *113*, 6114–6178.

1.3.2. Propriété de photoisomérisation du ligand éther de thiovinyle 88

1.3.2.1. Effet du solvant et de la concentration

Une fois la propriété de photoisomérisation du ligand **88** découverte, son étude a été approfondie. Dans un premier temps, l'effet du solvant a été étudié sur l'isomère Z (>99,9%) en conduisant la photoisomérisation dans une gamme de solvants apolaires à polaires protiques (Schéma 40). En effet, les solvants peuvent avoir un impact important sur cette propriété du fait des liaisons hydrogènes qu'ils peuvent former avec les molécules et ainsi stabiliser le système⁸⁹. Cette étude et les suivantes ont été réalisées avec une concentration en ligand fixée à $C_m = 0,1$ mg/mL soit $C = 268$ μ M. Par ailleurs, le ligand étant faiblement soluble dans l'eau, il a été étudié dans un mélange H₂O/DMSO (1:1 v/v). Les solvants polaires protiques tels que le méthanol et l'eau conduisent aux photoconversions les plus élevées avec la formation de 88% d'isomère E après une heure d'irradiation dans H₂O/DMSO (1 :1 v/v). De ce fait, le mélange H₂O/DMSO (1:1 v/v) a été gardé pour la suite des expériences avec la concentration $C = 268$ μ M.

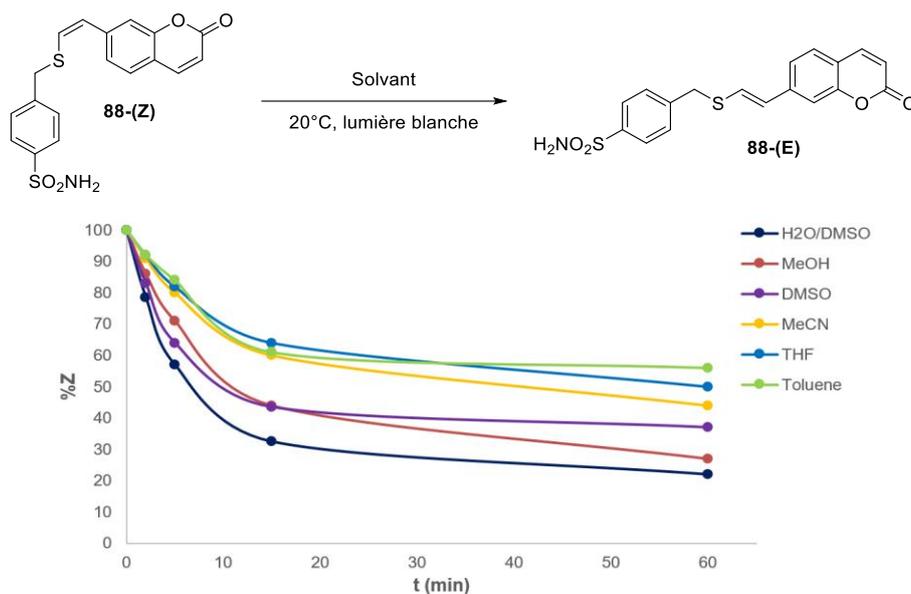


Schéma 40 : Etude de l'effet du solvant sur la cinétique de photoisomérisation de l'isomère **88-(Z)**

1.3.2.2. Effet de la longueur d'onde d'irradiation

Les EPS d'un mélange Z/E 99:1 irradié à différentes longueurs d'onde à l'aide de lampes LED (spots EvoluChem™ équipés d'un filtre lumineux d'opacité égale à 90%), ont également été étudiés (Figure 19). Il a été démontré que la photoisomérisation Z→E était la plus efficace en présence de la

⁸⁹ a) N. K. Joshi, M. Fuyuki, A. Wada, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 1891–1899 ; b) S. Smith, F. B. Abdallah, *J Thermodyn Catal* **2017**, *8*, 1–6.

LED à $\lambda_{\max} = 365$ nm, puisqu'elle a permis d'accéder à un EPS de 19:81 Z/E après une heure d'irradiation. En revanche, l'isomérisation Z→E la moins efficace (36:64 Z/E) est obtenue avec une LED à $\lambda_{\max} = 450$ nm. Quelle que soit la longueur d'onde étudiée, l'isomère E est obtenu préférentiellement (sans qu'il ne soit possible d'obtenir une photocommutation totale). Ce système ne permettra donc pas d'obtenir l'isomère Z préférentiellement à partir de l'isomère E, la réversibilité de photoisomérisation étant peu efficace, pouvant même être qualifiée de « pseudo-irréversible ». Ceci pourrait s'expliquer par la superposition des deux maxima d'absorption, rendant difficile l'excitation sélective d'un des deux isomères (cf Figure 18, Page 73). De ce fait, les propriétés de photoréversibilité ne sont pas pleinement satisfaisantes dans l'optique de pouvoir à terme contrôler réversiblement et efficacement, par exemple, l'activité biologique de l'anhydrase carbonique.

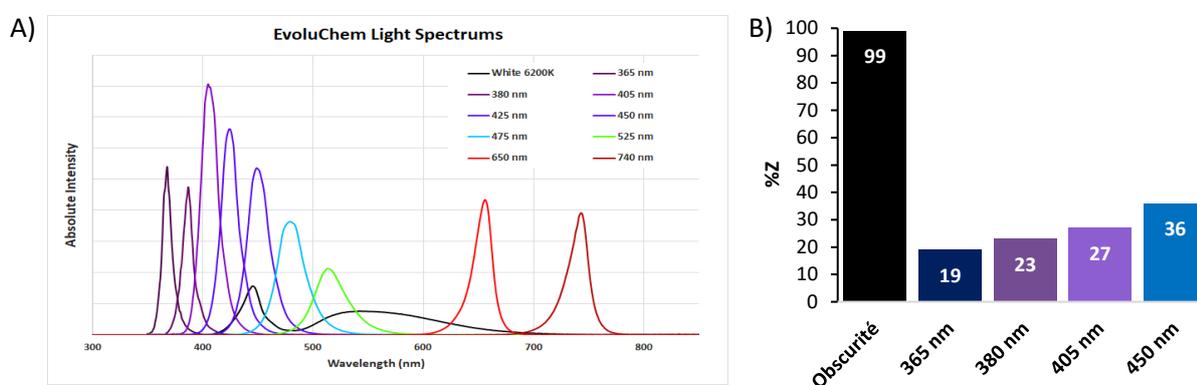


Figure 19 : A) Spectres d'émission des lampes utilisées (18W) extraits du site www.hepatochem.com, B) Etats photostationnaires d'un mélange Z/E 99/1 pour différentes longueurs d'onde

1.3.2.3. Réversibilité de la photoisomérisation

Dans le but d'étudier la réversibilité de la photoisomérisation du ligand **88**, sa résistance à la photofatigue a été testée. Pour cela, une solution de l'isomère **88-(Z)** a été préparée dans les mêmes conditions que précédemment dans un mélange H₂O/DMSO (1:1, v/v) et a été irradiée pendant une heure à 365 nm puis à 450 nm de façon alternative. Après chaque heure d'irradiation, le mélange obtenu est analysé par HPLC de façon à vérifier que les EPS restent identiques. Après six cycles de photoisomérisation, aucun photoblanchiment n'est observé, ce qui montre une bonne résistance à la photofatigue du ligand et valide donc le caractère réversible de photoisomérisation bien que celui-ci ne soit pas particulièrement bon (17%) (Figure 20).

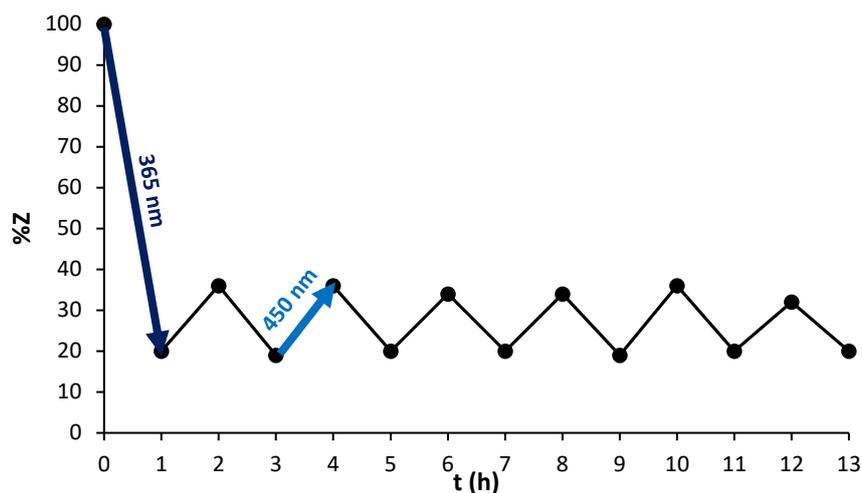


Figure 20 : Etude de la photofatigue associée à l'isomérisation du ligand **88**

1.4. Objectifs du projet

La réaction de thiol-yne a pu être développée en KTGS avec la *bCA-II* avec une accélération de la ligation allant jusqu'à un facteur dix en présence de l'enzyme. Un ligand de type éther de thiovinyle est ainsi obtenu avec des propriétés inhibitrices satisfaisantes ($IC_{50 \text{ 88-(Z)}} = 0,33 \pm 0,01$ et $IC_{50 \text{ 88-(E)}} = 0,55 \pm 0,07 \mu\text{M}$). De plus, outre ses propriétés de fluorescence, celui-ci a révélé des propriétés photophysiques particulièrement intéressantes qui pourraient permettre à terme de moduler l'activité de la *bCA-II* par simple irradiation lumineuse si une nette amélioration de la photoisomérisation $E \rightarrow Z$ est réalisée. D'autre part, les IC_{50} des deux isomères sont relativement proches (ratio inférieur à 2), ce qui n'est pas suffisant pour avoir une réelle différence d'activité de la cible par photoisomérisation. Ainsi, il est nécessaire d'améliorer ces paramètres de façon à pouvoir utiliser ce ligand comme réel outil dans le domaine de la chimie thérapeutique.

Le but de mes travaux dans ce chapitre sera donc d'améliorer la réversibilité de photoisomérisation du ligand éther de thiovinyle **88** par l'introduction de substituant(s) sur le motif coumarinique, tout en vérifiant l'impact de ces modifications structurales sur l'activité biologique de chacun des deux isomères.

2. Amélioration de la réversibilité de photoisomérisation du ligand éther de thiovinyle obtenu en KTGS

2.1. Etudes préliminaires sur la photocommutation d'un système

2.1.1. Etat de l'art

Dans le but d'améliorer la réversibilité de photoisomérisation du ligand éther de thiovinyle **88**, nous nous sommes demandés si une optimisation de sa structure pourrait être effectuée afin de différencier l'absorbance de ces deux isomères. Ce type d'étude a déjà été réalisé sur l'azobenzène dont les propriétés de photoisomérisation ont été décrites précédemment. En effet, bien qu'étant la structure la plus utilisée dans le domaine de la photoisomérisation, l'azobenzène conduit souvent à une photoisomérisation $Z \rightarrow E$ incomplète. Cela s'explique principalement par la superposition des bandes $n \rightarrow \pi^*$ des deux isomères qui empêche l'obtention d'EPS riches en isomère E .

Dans le but d'améliorer la réversibilité de photocommutation de l'azobenzène, des groupements électrodonneurs ou électroattracteurs peuvent être incorporés en position *ortho* ou *para* de l'aromatique⁹⁰. La position *para* de l'aromatique du ligand **88** étant déjà occupée, seuls les travaux associés aux substitutions en position *ortho* seront étudiés.

Ces travaux ont tout d'abord été entrepris par l'équipe de Renth, Temps et Herges qui s'est intéressée aux propriétés de photocommutation du dihydrodibenzodiazocine **89**, un azobenzène dont la position *ortho* de deux aromatiques a été pontée⁹¹ (Schéma 41). Pour cette molécule, la présence du cycle à huit atomes comprenant la liaison diazo induit que la forme métastable est l'isomère Z , et non l'isomère E . Les deux isomères Z et E de cette molécule montrent des différences d'absorption importantes puisque les maxima des bandes $n \rightarrow \pi^*$ sont séparés de 86 nm. La photoisomérisation $Z \rightarrow E$ est donc efficace à plus de 90% et la réversible photoisomérisation $E \rightarrow Z$ se rapproche des 100%. Bien que la réversibilité du système soit nettement améliorée, cette étude présente une limite majeure : la forme fermée Z est la plus stable thermodynamiquement, ce qui ne permet pas d'utiliser ce système en tant que pince moléculaire comme imaginée initialement par les auteurs.

⁹⁰ H. A. Wegner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4787–4788.

⁹¹ R. Siewertsen, H. Neumann, B. Buchheim-Stehn, R. Herges, C. Näther, F. Renth, F. Temps, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15594–15595.

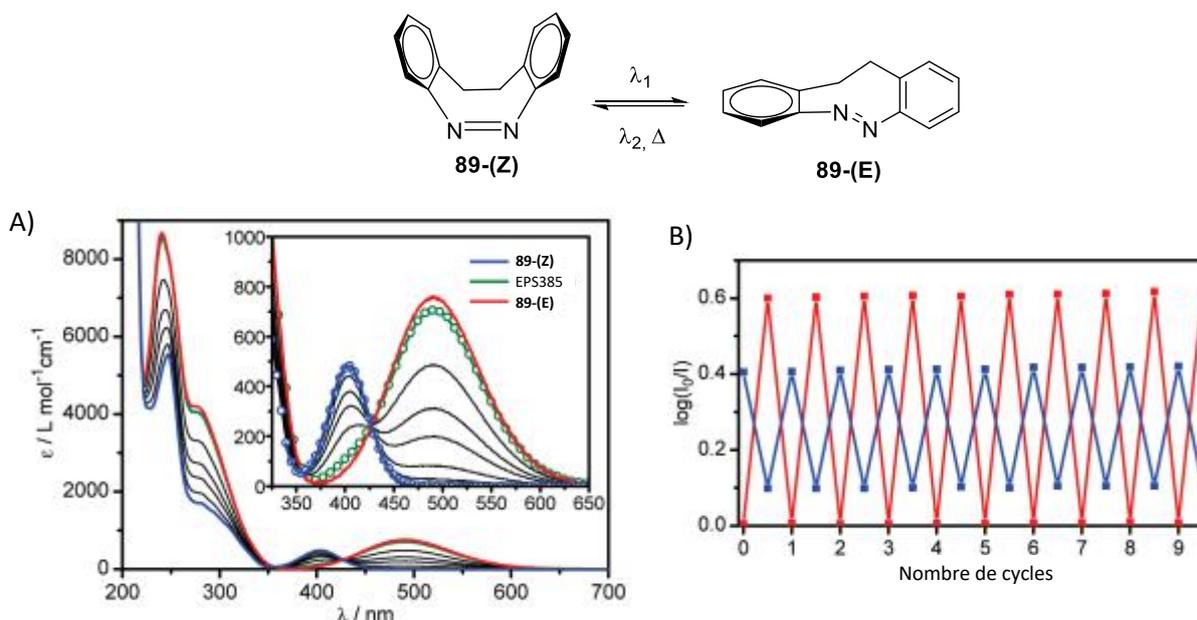


Schéma 41 : A) Spectre d'absorption des isomères Z et E de la molécule **89** (rouge et bleu respectivement) ainsi que l'EPS obtenu après irradiation de **89-(Z)** à 385 nm dans le n-hexane (vert), B) Absorbance d'une solution de la molécule **89** à $\lambda_1 = 400 \text{ nm}$ (bleu) et $\lambda_2 = 490 \text{ nm}$ aux EPS après irradiation alternative à $\lambda = 385$ et $\lambda = 520 \text{ nm}$ (Schémas extraits et modifiés de l'article⁹²)

Par la suite, l'équipe de Woolley a développé un amidoazobenzène dont les quatre positions *ortho* du système ont été substituées par des fonctions méthoxy⁹². Cela permet à nouveau d'obtenir une photoisomérisation bidirectionnelle du système du fait d'une séparation des maxima d'absorbance des bandes $n \rightarrow \pi^*$ d'environ 35 nm, avec cette fois-ci l'isomère E le plus stable thermodynamiquement (Schéma 42).

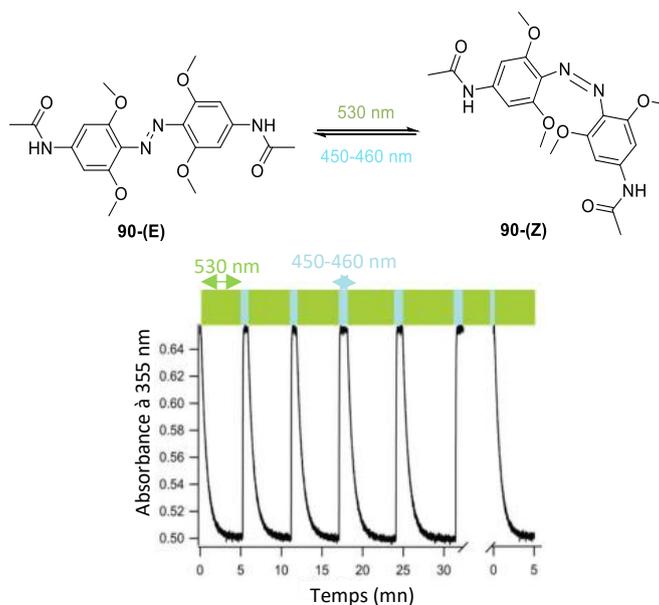


Schéma 42 : Variation de l'absorbance d'une solution de l'amidoazobenzène **90** à 355 nm aux EPS après irradiation alternative à $\lambda = 530$ et $\lambda = 450-460 \text{ nm}$ (Figure extraite et modifiée de l'article⁹²)

⁹² A. A. Beharry, O. Sadovski, G. A. Woolley, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 19684–19687.

Afin de mieux comprendre les raisons de ce décalage, les orbitales moléculaires occupées les plus hautes (*Highest Occupied Molecular Orbital*, HOMO) correspondant aux orbitales n des deux isomères ont été modélisées (Figure 21). Ici, les deux HOMO sont centrées sur le doublet non liant des atomes d'azote du groupement azo. Or, pour l'isomère *E*, cette HOMO est particulièrement proche des atomes d'oxygène des groupements méthoxy qui par répulsion électrostatique⁹³ augmentent son énergie relative. De ce fait, la barrière énergétique entre les orbitales n et π^* devient plus faible, d'où le décalage vers le rouge du maximum d'absorbance de la bande $n \rightarrow \pi^*$ de l'isomère *E*. En revanche, l'HOMO de l'isomère *Z* ne présente pas cette interaction et garde donc la même énergie qu'en l'absence des groupements méthoxy.

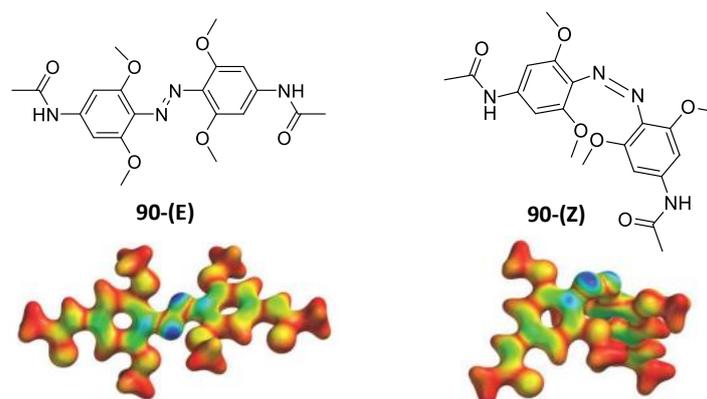


Figure 21 : Structure des isomères *cis* et *trans* de l'amidobenzène **90**. La valeur absolue de l'HOMO de chaque isomère est cartographiée sur la surface de la densité des liaisons, la couleur bleue représentant la valeur maximale de l'HOMO (Figure extraite puis modifiée de l'article⁹²)

Plus récemment, il a été démontré que la substitution des quatre positions *ortho* de l'azobenzène par des halogènes pouvait conduire à une perte d'énergie de l'orbitale n uniquement pour l'isomère *Z*. De ce fait, l'absorption maximale de la bande $n \rightarrow \pi^*$ est décalée vers le bleu seulement pour l'isomère *Z*. Dans les travaux de Hecht, Brouwer et Bléger, l'ajout de quatre atomes de fluor sur l'azobenzène permet une séparation des bandes $n \rightarrow \pi^*$ de chaque isomère de 42 nm (Figure 22)⁹⁴. En effet, la densité des électrons n de l'isomère *Z* est réduite du fait de la présence voisine de ces groupes inductifs électroattracteurs. De ce fait, l'énergie de l'orbitale n est moins élevée, ce qui augmente la transition $n \rightarrow \pi^*$. Or, pour l'isomère **91-E**, la transition reste intacte, les atomes de fluor étant plus éloignés. Ceci a également été observé avec des atomes de chlore, mais la séparation des bandes $n \rightarrow \pi^*$ est moindre (16 nm)⁹⁵.

⁹³ C. L. Forber, E. C. Kelusky, N. J. Bunce, M. C. Zerner, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5885–5890.

⁹⁴ a) D. Bléger, J. Schwarz, A. M. Brouwer, S. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20597–20600 ; b) C. Knie, M. Utecht, F. Zhao, H. Kulla, S. Kovalenko, A. M. Brouwer, P. Saalfrank, S. Hecht, D. Bléger, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 16492–16501.

⁹⁵ L. N. Lameijer, S. Budzak, N. A. Simeth, M. J. Hansen, B. L. Feringa, D. Jacquemin, W. Szymanski, *Angew. Chem.* **2020**, *132*, 21847–21854.

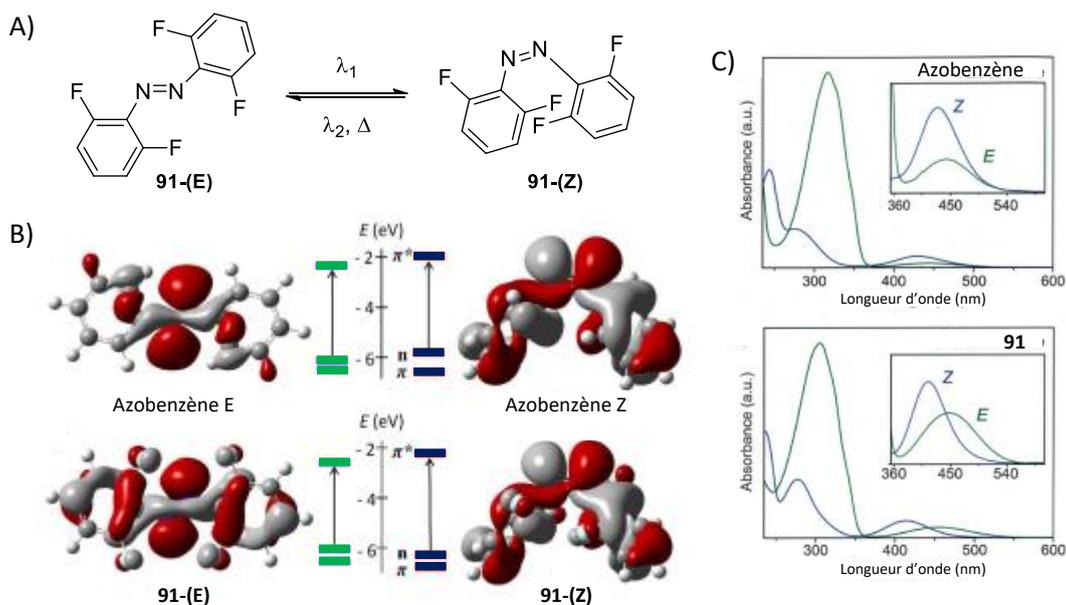


Figure 22 : A) Isomérisation de l'*o*-fluoroazobenzène **91**, B) Diagramme d'énergie des orbitales π , n et π^* des deux isomères de l'azobenzène et de la molécule **91**, C) Spectre d'absorption des deux isomères de l'azobenzène et de la molécule **91** (Figures extraites et modifiées des articles⁹⁴)

2.1.2. Calculs théoriques

A partir de ces résultats, des calculs théoriques ont été effectués par le Dr. V. Tognetti de l'équipe Analyse et Modélisation de notre laboratoire, de façon à observer l'impact qu'aurait l'ajout de substituants au niveau des positions *ortho* du lien éther de thiovinyle **88** sur les maxima d'absorbance des deux isomères. En effet, cette modification pourrait causer une distorsion spécifique de l'isomère *Z*, affectant ainsi sa transition $\pi \rightarrow \pi^*$. De ce fait, huit substituants ont été choisis pour représenter une gamme variée de fonctions aux propriétés électroattractrices ou électrodonneuses par effet mésomère ou inductif. Ces calculs théoriques ont été effectués par TD-DFT (*time-dependent density functional theory*) en utilisant le logiciel Gaussian 16. Ensuite, l'écart entre les longueurs d'onde associées aux maxima d'absorbance des deux isomères ($\Delta\lambda$) a été évalué pour chaque substituant en position *ortho*, notées R₆ et R₈ (Figure 23). A noter que les positions R₃ et R₄ de la coumarine ont également été étudiées car de telles modifications sont connues pour moduler ses maxima d'absorption et d'émission⁹⁶. Ce dernier paramètre sera particulièrement développé dans la suite du manuscrit.

Parmi les différentes modifications étudiées *in silico*, les fonctions nitrile (CN) et fluor (F) en position 6 se sont révélées être les plus intéressantes, les valeurs $\Delta\lambda$ étant respectivement de 35 nm (composé 2, Figure 23) et 19 nm (composé 4). Cependant, malgré la valeur $\Delta\lambda$ importante associée à

⁹⁶ a) X. Liu, Z. Xu, J. M. Cole, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 16584–16595 ; b) S. J. Sharma, N. Sekar, *Dyes and Pigments* **2022**, *202*, 110306.

la fonction CN, celle-ci n'a pas pu être choisie du fait de la longueur d'onde d'absorption théorique de l'isomère Z se positionnant dans l'UV-B (297 nm) et ne pouvant donc pas être utilisée à des fins biologiques. Ainsi, l'atome de fluor s'est révélé être le plus approprié. De ce fait, la synthèse du composé **92** contenant deux atomes de fluor car plus accessible synthétiquement (tout en conservant un $\Delta\lambda$ important) a été entreprise pour la suite de l'étude (composé numéro 29 dans l'étude Figure 23), celle-ci montrant les meilleurs résultats tout en se rapprochant au maximum de la structure du ligand **88**.

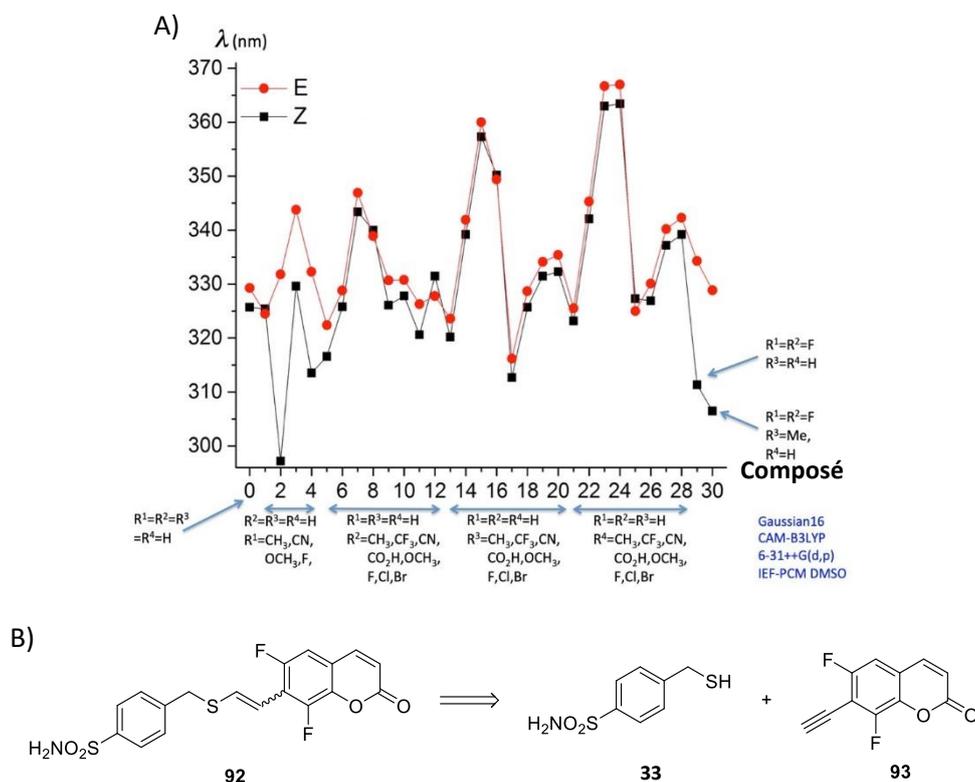


Figure 23 : A) Longueurs d'onde d'absorption théoriques pour la transition $S_0 \rightarrow S_1$ en fonction des substituants en position ortho du lien éther de thiovinyle **88**, niveau de théorie CAM-B3LYP/6-31++G(d,p), B) Structure choisie pour l'amélioration de la photocommutation du système éther de thiovinyle et ses fragments associés

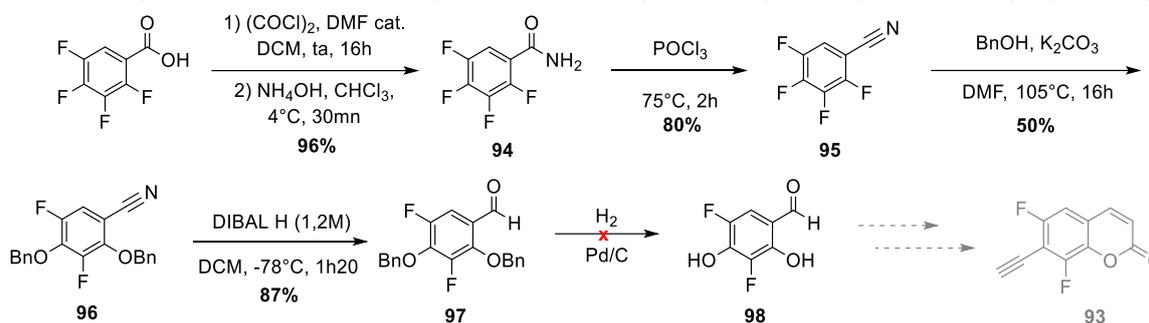
2.2. Développement du ligand difluoré

2.2.1. Synthèse du fragment coumarine

A la suite de ces calculs théoriques, une première voie de synthèse a été envisagée pour parvenir à la 6,8-difluoro-7-hydroxycoumarine **93**, principalement basée sur la synthèse décrite du fluorophore Pacific Blue⁹⁷ (Schéma 43). Ainsi, l'amide **94** est obtenu avec un rendement de 96% à partir

⁹⁷ M. M. Lee, B. R. Peterson, *ACS Omega* **2016**, *1*, 1266–1276.

de l'acide tétrafluorobenzoïque par formation d'un chlorure d'acyle intermédiaire suivie par la réaction de substitution nucléophile par l'ammoniac. L'amide est ensuite déshydraté par le trichlorure de phosphore (POCl_3) pour parvenir au nitrile **95** avec un rendement de 80%. L'introduction de deux groupements éthers de benzyle est effectuée par substitution nucléophile aromatique, puis le nitrile est réduit à l'aide de l'hydrure de diisobutylaluminium (DIBAL H) pour parvenir à l'aldéhyde **97**. La déprotection des groupements phénols a ensuite été entreprise en catalyse hétérogène, sous atmosphère de dihydrogène en présence de palladium sur charbon. Cependant, dans ces conditions, l'aldéhyde a également été réduit, et ce même en présence du catalyseur de Lindlar (catalyseur au palladium déposé sur carbonate de potassium et empoisonné par du plomb) aux propriétés plus



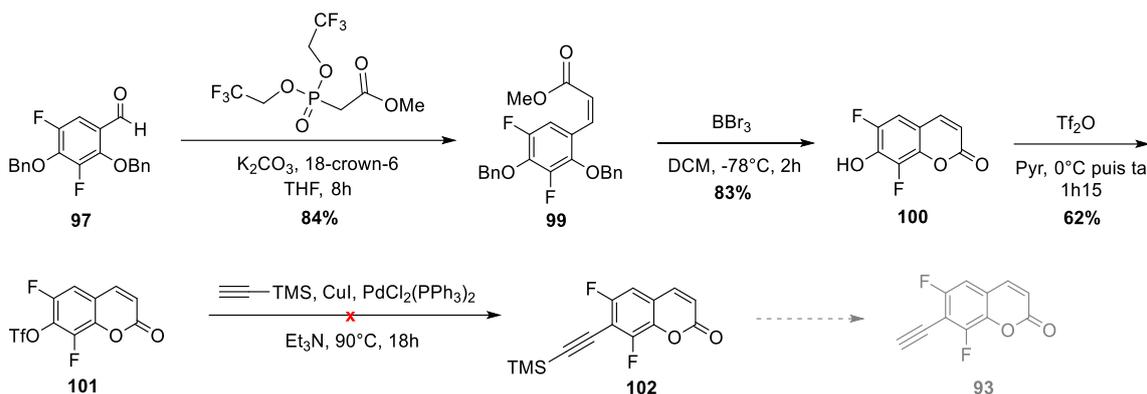
douces.

Schéma 43 : Voie de synthèse du fragment **93** inspirée de la synthèse du Pacific Blue

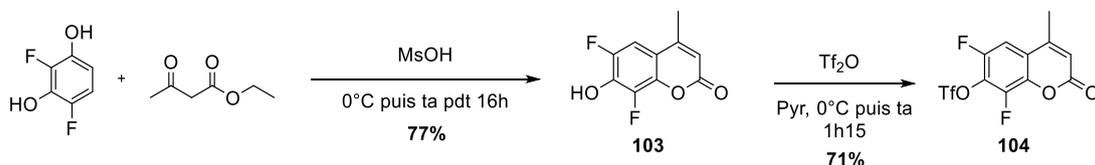
De ce fait, la stratégie de synthèse a été retravaillée pour parvenir au fragment **93** attendu (Schéma 44). A la place, il a été décidé d'effectuer une oléfination de Still-Gennari afin d'obtenir l'alcène **99-(Z)** avec un rendement de 84%⁹⁸. Ensuite, la débenzylation a été réalisée avec le tribromure de bore (BBr_3) pour éviter la réduction de l'alcène formé et ainsi accéder à la coumarine **100**⁹⁹. L'activation du phénol en triflate suivie du couplage de Sonogashira ont ensuite été mises en œuvre dans les conditions développées précédemment au laboratoire pour la synthèse de la coumarine **85**. Malheureusement, l'alcyne protégé **102** n'a pas pu être obtenu, les conditions utilisées dégradant le triflate **101**.

⁹⁸ I. Janicki, P. Kiełbasiński, *Adv. Synth. Catal.* **2020**, 362, 2552–2596.

⁹⁹ Z. Xia, R. G. Correa, J. K. Das, L. Farhana, D. J. Castro, J. Yu, R. G. Oshima, J. A. Fontana, J. C. Reed, M. I. Dawson, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 233–249.

Schéma 44 : Nouvelle stratégie de synthèse pour parvenir au fragment **93**

Suite aux difficultés rencontrées pour obtenir rapidement le composé **93**, nous avons finalement opté pour la synthèse de l'analogue méthylé en position 4 a priori plus facilement accessible. Cette modification supplémentaire ne devrait pas affecter l'écart $\Delta\lambda$ des maxima d'absorption des deux isomères au regard des résultats obtenus en chimie théorique (cf composé **30**, Figure 23). Par ailleurs, le groupement méthyle étant situé sur le fragment coumarine soit à l'entrée de la gorge catalytique de la CA-II, il ne devrait pas significativement impacter l'activité du ligand, tout comme les deux atomes de fluor. De ce fait, le 2,4-difluororésorcinol commercial (ou accessible synthétiquement en 4 étapes¹⁰⁰) a permis d'accéder à la 7-triflyloxycoumarine difluorée **104** en seulement deux étapes, via une première réaction de condensation de Pechmann¹⁰¹ suivie par la formation du triflate sur le phénol résultant comme décrit précédemment (Schéma 45).

Schéma 45 : Synthèse de l'analogue méthylé **104**

A partir de l'analogue méthylé, différentes conditions de couplage de Sonogashira (variation de la charge du catalyseur, du nombre d'équivalents de l'alcyne vrai, présence ou non d'un solvant, du nombre d'équivalents de base, de la température de réaction) ont été testées et les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau 2. Il a été remarqué que des conditions trop rudes dégradent le composé de départ, ce qui nous a amené à ajouter le diméthylformamide (DMF) comme solvant dans nos conditions et à travailler à température ambiante. De plus, la quantité de triméthylsilylacétylène a été augmentée de façon à favoriser le couplage.

¹⁰⁰ S. K. Pedersen, J. Holmehave, F. H. Blaikie, A. Gollmer, T. Breitenbach, H. H. Jensen, P. R. Ogilby, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3079–3087.

¹⁰¹ C. Hedberg, F. J. Dekker, M. Rusch, S. Renner, S. Wetzels, N. Vartak, C. Gerding-Reimers, R. S. Bon, P. I. H. Bastiaens, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9832–9837.

Entrée	Produit initial	Alcyne	Solvant	Base	Pd	Cu	Température	Temps	Résultats
1	101 (15 mg)	1,5 éq	x	NEt ₃ (600 µL)	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (10 mol%)	CuI (20mol%)	TA	20h	Pas de produit obtenu
2	101 (15 mg)	1,5 éq	x	NEt ₃ (600 µL)	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (10 mol%)	CuI (20mol%)	90°C	18h	Pas de produit obtenu
3	104 (15 mg)	1,5 éq	x	NEt ₃ (600 µL)	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (5 mol%)	CuI (20mol%)	TA	64h	Pas de produit obtenu
4	104 (30 mg)	3 éq	DMF (260 µL)	NEt ₃ (157 µL → 13 éq)	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (10 mol%)	x	TA	18h	Produit isolé (3 mg)
5	104 (30 mg)	3 éq	DMF (260 µL)	NEt ₃ (157 µL → 13 éq)	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (10 mol%)	x	40°C	15h	Pas de produit obtenu
6	104 (30 mg)	10 éq	DMF (260 µL)	NEt ₃ (157 µL → 13 éq)	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (10 mol%)	x	TA	15h	Produit obtenu mais impur
7	104 (30 mg)	3 éq	DMF (260 µL)	NEt ₃ (157 µL → 13 éq)	PdCl₂(PPh₃)₂ (1 mol%)	CuI (1 mol%)	TA	15h	70% réactif + 30% produit attendu et impuretés
8	104 (30 mg)	10 éq	DMF (260 µL)	NEt ₃ (157 µL → 13 éq)	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (10 mol%)	CuI (10 mol%)	TA	15h	Produit attendu : 11 mg purs

Tableau 2 : Développement des conditions du couplage de Sonogashira

Ainsi, les conditions optimales développées ont permis de parvenir à la 7-éthynylcoumarine difluorée désirée **106** après déprotection de l'alcyne **105** (Schéma 46). Au global, cet intermédiaire clé est obtenu avec un rendement de 34% en quatre étapes à partir du 2,4-difluororésorcinol.

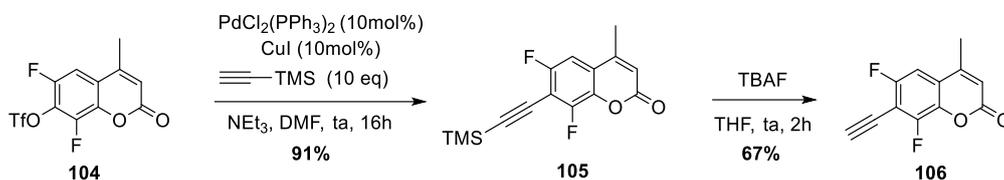


Schéma 46 : Synthèse du fragment alcynylcoumarine méthylé **106**

2.2.2. Préparation du ligand et premières études spectrales

Une fois la coumarine **106** en main, la réaction de thiol-yne a été réalisée avec le sulfonamide **33**. Pour cela, les conditions précédemment développées ont été utilisées, à savoir l'utilisation du DBU comme base afin de promouvoir la réaction de thiol-yne (Schéma 47). Un mélange *Z/E* de 63/37 du ligand **107** est obtenu. Les deux isomères sont séparés par RP-HPLC.

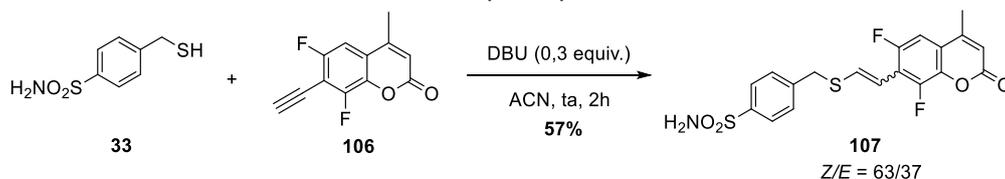


Schéma 47 : Réaction de thiol-yne entre le sulfonamide **33** et l'alcynylcoumarine **106**

Afin de vérifier l'impact des modifications réalisées sur la coumarine (atomes de fluor et groupement méthyle) sur l'activité biologique, les IC_{50} sont déterminées par la méthode de Pocker et Stone. On obtient des valeurs proches de celles des isomères du ligand **88** ($0,30 \pm 0,05$ et $0,99 \pm 0,11$ μ M pour les isomères *Z* et *E* respectivement), ce qui confirme que la présence d'atomes de fluor et du groupement méthyle n'impactent pas significativement les propriétés inhibitrices du ligand **107**, voire qu'elles permettent une meilleure différenciation de l'activité des deux isomères, même si elle reste insuffisante (ratio proche de 3).

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux propriétés photophysiques des deux isomères **107-(Z)** et **107-(E)**, notamment leurs spectres d'absorption et d'émission. Du fait de la faible solubilité de ces composés dans l'eau, les mesures des rendements quantiques de fluorescence ont été faites dans le DMSO uniquement (Figure 24, A). Comme les calculs théoriques l'avaient anticipé, un décalage hypsochrome de 18 nm sur le $\lambda_{Abs\ max}$ de l'isomère *Z* a été observé. En revanche, le $\lambda_{Abs\ max}$ de l'isomère *E* n'a pas changé. Ainsi, une distorsion spécifique de l'isomère *Z* a bien eu lieu et cause un décalage hypsochrome de son maximum d'absorbance (Figure 24, B). De plus, les deux isomères conservent

leurs propriétés de fluorescence avec un $\lambda_{Em\ max}$ de 495 nm et un rendement quantique plus faible de 0,06 pour l'isomère Z et 0,22 pour l'isomère E.

A)

Isomère	$\lambda_{Abs\ max}$ (nm)	$\lambda_{Em\ max}$ (nm)	Déplacement de Stokes (nm)	Φ_F^a	ϵ (L/mol/cm)
107-(Z)	337	493	156	0.06	15109 ^b
107-(E)	355	495	140	0.22	28194 ^c

Toutes les mesures ont été faites à 25°C. ^a Déterminé dans le DMSO à $\lambda_{Ex} = 350$ nm en utilisant le sulfate de quinine ($\Phi_F = 0.52$ in H_2SO_4 (0.005M))¹⁰² pour standard. ^b Déterminé à $\lambda_{Abs} = 337$ nm. ^c Déterminé à $\lambda_{Abs} = 355$ nm.

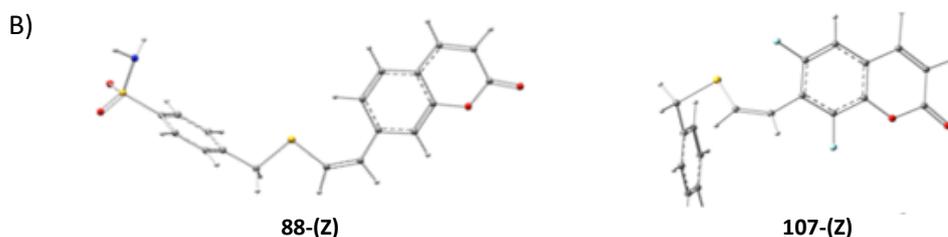


Figure 24 : A) Propriétés photophysiques des isomères du ligand éther de thiovinyle difluoré **107**, B) Distorsion de l'isomère **107-(Z)** par rapport à l'isomère **88-(Z)**

2.3. Etude de la photoisomérisation des isomères du ligand 107

2.3.1. Détermination du point isobestique

Compte tenu des résultats spectroscopiques encourageants, nous nous sommes intéressés aux propriétés de photoisomérisation du nouveau système développé. Afin de pouvoir déterminer les EPS avec précision par HPLC en utilisant le moins de ligand possible, nous avons tout d'abord cherché à déterminer le point isobestique du système. En effet, le point isobestique est une longueur d'onde à laquelle l'absorbance totale d'un échantillon reste constante au cours de la réaction. En ce point, toutes les espèces chimiques possèdent le même coefficient d'extinction molaire. Nous serions donc capables d'observer les différences d'EPS par analyse HPLC où la longueur d'onde d'observation utilisée serait celle du point isobestique de façon à déterminer facilement et directement le ratio molaire des deux espèces d'un mélange sans utiliser la spectroscopie RMN 1H qui nécessiterait des quantités de ligand plus importantes.

Pour ce faire, nous avons cherché à déterminer une première longueur d'onde à laquelle nous pourrions effectuer un premier test de photoisomérisation. Nous avons donc superposé les spectres

¹⁰² A. M. Brouwer, Pure Appl. Chem. 2011, 83, 2213–2228.

d'absorption des deux isomères et observé les gammes de longueur d'onde auxquelles l'un des isomères absorbe très majoritairement par rapport à l'autre (Figure 25). Nous avons donc pu mettre en évidence que sur la gamme 410-430 nm, l'isomère *E* absorbait significativement plus que l'isomère *Z*. A partir du spectre d'émission des lampes utilisées présenté à la Figure 19, nous avons pu identifier que la lampe LED centrée sur $\lambda_{\max} = 450$ nm était la plus adéquate, celle-ci émettant sur une large bande comprise entre 400 et 500 nm.

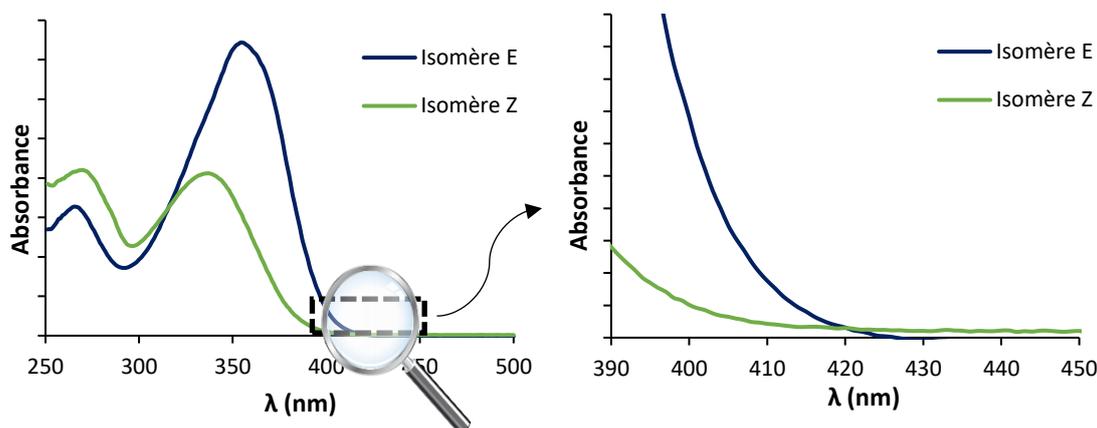


Figure 25 : Superposition des spectres d'absorption des deux isomères du ligand **107** (55 μ M) effectués dans un mélange H₂O/DMSO 1:1 (v/v) à 25°C

Les variations de l'absorption d'une solution de l'isomère **107-(E)** (55 μ M) en fonction du temps dans un mélange H₂O/DMSO 1:1 (v/v) ont donc été déterminées après irradiation lumineuse par une LED EvoluChem™ à $\lambda_{\max} = 450$ nm équipée d'un filtre lumineux d'opacité égale à 90% (Figure 26). Un point isobestique a ainsi pu être déterminé. Il s'agit du point $\lambda = 303$ nm, où chaque absorption relevée à un instant *t* d'irradiation se croise. Cette longueur d'onde sera donc celle utilisée pour l'observation des EPS par analyse HPLC.

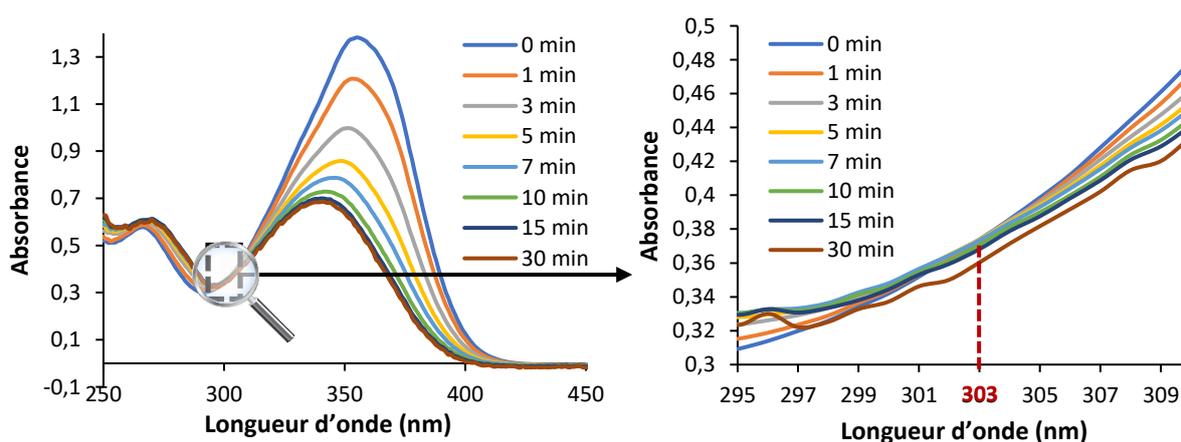


Figure 26 : Détermination du point isobestique des isomères *Z* et *E* du ligand **107**

2.3.2. Choix de la source lumineuse

2.3.2.1. Utilisation des lampes LED EvoluChem™

Nous nous sommes ensuite intéressés à la composition des EPS après irradiation du ligand **107** à différentes longueurs d'onde. Dans un premier temps, nous avons testé la gamme de LED EvoluChem™ spot précédemment utilisées lors de l'irradiation du ligand **88**. Un filtre lumineux d'opacité égale à 90% a également été ajouté, la puissance maximale de la LED dégradant la molécule.

L'irradiation a été réalisée sur un vial HPLC contenant un mélange Z/E 88:12 du ligand **107** dans le DMSO/H₂O (1:1) à la concentration $C_m = 0,1 \text{ mg/mL}$ soit $C = 236 \text{ } \mu\text{M}$, conditions très similaires à celles optimisées précédemment. La réaction a été réalisée à 20 °C à l'abri de la lumière émise par la pièce et les photoisomérisations ont été observées et quantifiées par HPLC ($\lambda_{\text{obs}} = 303 \text{ nm}$).

Malheureusement, les premiers résultats obtenus sont décevants (Figure 27). On observe seulement une légère photoisomérisation Z→E en irradiant l'échantillon avec les lampes centrées sur $\lambda_{\text{max}} = 365, 380 \text{ et } 405 \text{ nm}$ (15%, 8% et 8% respectivement), ce qui n'améliore pas le système de photoisomérisation précédent. Comme le décalage entre les deux maxima d'absorption des deux isomères n'est que de 18 nm, il est peut-être difficile d'irradier sélectivement l'un des deux isomères avec une source de type LED dont les bandes d'émissions des lampes LED sont assez larges (100 nm en moyenne). De ce fait, nous nous sommes tournés vers l'utilisation d'un monochromateur qui permet de sélectionner plus précisément les longueurs d'onde d'irradiation.

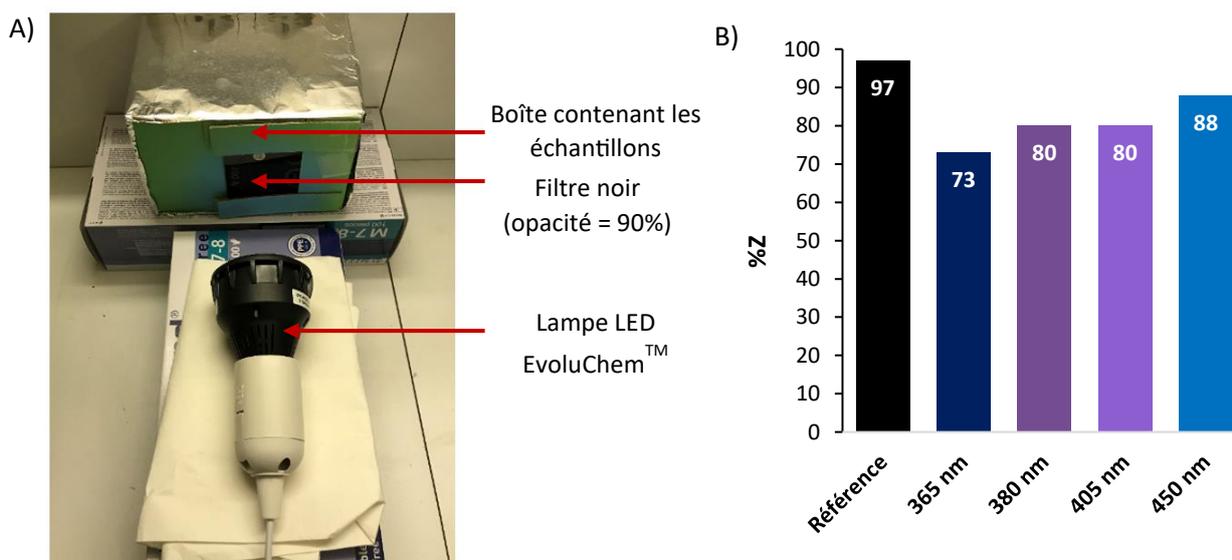


Figure 27 : Irradiation d'un mélange Z/E = 88:12 du ligand **107** avec différentes LED, A) Montage associé à l'expérience, B) Résultats obtenus

2.3.2.2. Irradiation avec un monochromateur Cornerstone™ 260

Afin de pallier l'irradiation du composé avec des sources lumineuses aux larges bandes d'émission, un monochromateur Cornerstone™ 260 a été utilisé, celui-ci permettant de sélectionner une longueur d'onde d'irradiation à la précision de 1 nm à partir de la séparation par le phénomène de diffraction des différentes raies d'un faisceau lumineux provenant d'une lampe Xenon.

Le monochromateur en question n'étant pas disponible au laboratoire lors des résultats obtenus par Alexis Lossouarn, nous avons tout d'abord étudié les variations d'EPS du ligand **88** par irradiation avec cette source et ainsi observer la photocommutation des deux isomères. Un échantillon de l'isomère **88-(Z)** ($C = 268 \mu\text{M}$) a donc été préparé dans le système $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (1:1, v/v) dans un vial HPLC. La manipulation a été entreprise à l'abri de la lumière de la pièce, à 20°C , et les résultats ont été observés par HPLC ($\lambda_{\text{obs}} = 350 \text{ nm}$, longueur d'onde adaptée au ligand **88**). Ici encore, les résultats confirment que la commutation n'est pas efficacement réversible. En effet, un mélange riche en isomère *E* est obtenu jusqu'à la longueur d'onde de 400 nm (Figure 28, A). Quant aux irradiations à 450 et 500 nm, celles-ci ne permettent pas d'exciter l'isomère *Z* qui n'absorbe que très peu voire plus à ces longueurs d'onde.

Ces mêmes conditions ont été utilisées pour l'irradiation du ligand **107**, et les résultats obtenus sont bien plus appréciables (Figure 28, B). En effet, en fonction de la longueur d'onde d'irradiation, un mélange composé majoritairement de l'isomère *Z* peut être obtenu de 350 nm à 450 nm. Cela s'explique par la précision de la bande d'émission du monochromateur qui permet d'irradier beaucoup plus sélectivement. L'irradiation à 500 nm ne permet pas, une fois de plus, d'exciter l'isomère *Z* car celui-ci n'absorbe pas à cette longueur d'onde. Ainsi, les propriétés de photocommutation semblent nettement améliorées.

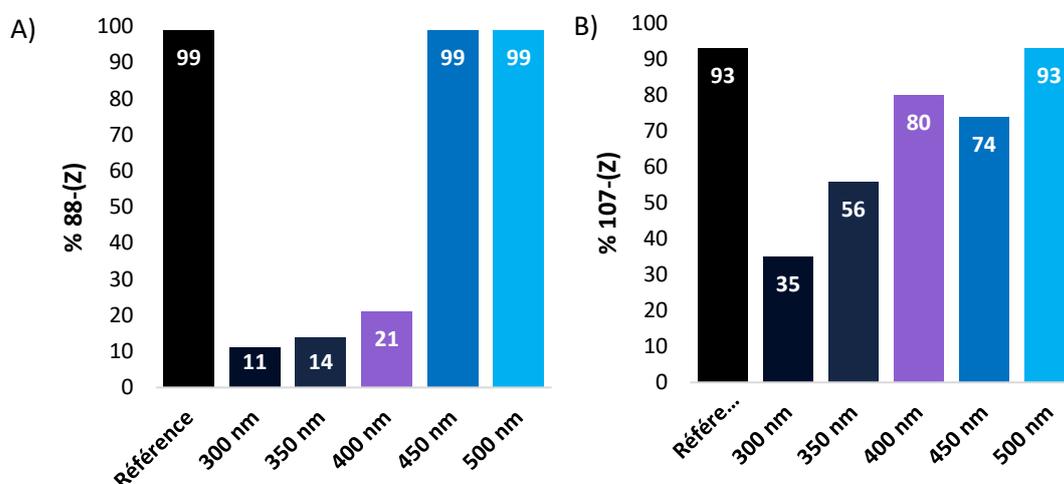


Figure 28 : Irradiation de l'isomère A) **88-(Z)**, B) **107-(Z)** à différentes longueurs d'onde choisies sur le monochromateur Cornerstone™ 260

En considérant les résultats obtenus sous irradiation par différentes sources lumineuses, nous garderons l'irradiation à 300 nm au monochromateur pour la photoisomérisation $Z \rightarrow E$ et l'irradiation à la LED centrée sur $\lambda_{\max} = 450$ nm pour la photoisomérisation $E \rightarrow Z$, ces deux résultats donnant les meilleurs EPS respectifs.

2.3.3. Cinétique de photoisomérisation

2.3.3.1. En fonction du solvant

Dans le but d'étudier l'impact du solvant sur la cinétique de photoisomérisation du système formé par les deux isomères, trois solvants dans lesquels le ligand **107** est soluble ont été choisis, à savoir l'acétate d'éthyle, le DMSO et le mélange H₂O/DMSO (1:1, v/v) rangés par ordre de polarité croissante. L'isomère **107-(Z)** a donc été irradié au monochromateur à $\lambda_{\max} = 300$ nm dans le solvant désiré à la même concentration que précédemment, le tout étant à l'abri de la lumière environnante et placé à température ambiante. Le système de solvant polaire protique H₂O/DMSO donne les meilleurs résultats (Figure 29). En effet, l'EPS est atteint le plus rapidement (15 minutes) et la photoisomérisation est la plus efficace, avec un milieu plus enrichi en isomère *E* (EPS = *Z*/*E* 37:63).

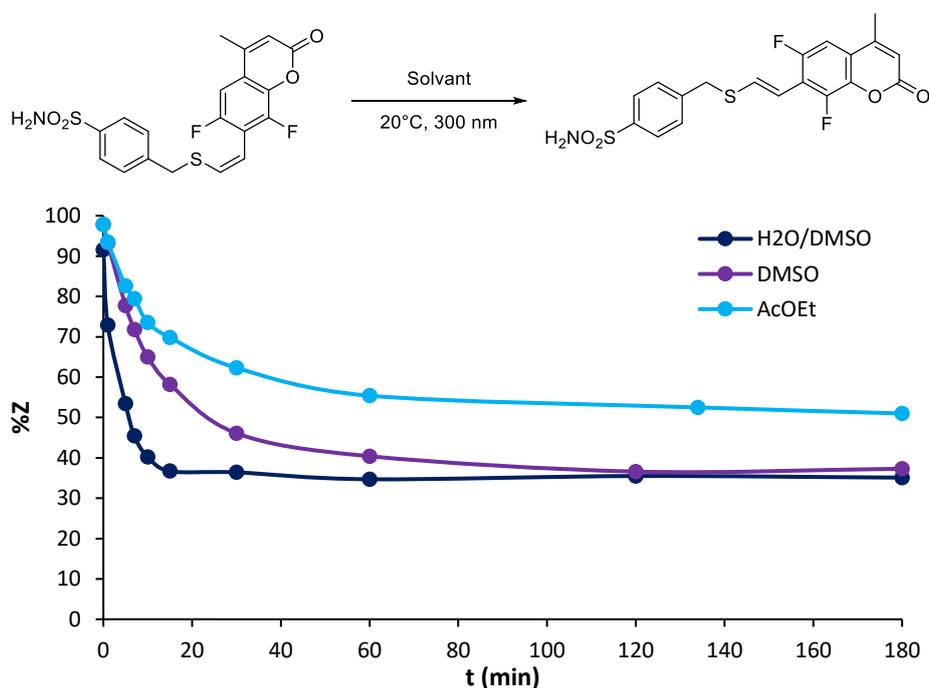


Figure 29 : Etude du solvant sur la photoisomérisation $Z \rightarrow E$ de l'isomère **107-(Z)**

2.3.3.2. En fonction de l'irradiation

Puis, une solution de chaque isomère du ligand **107** ($C = 236 \mu\text{M}$) dans le mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (1:1, v/v) a été préparée dans un vial HPLC dans le but d'observer la cinétique de photoisomérisation $Z \rightarrow E$ et $E \rightarrow Z$. L'isomère Z a donc été irradié à $\lambda_{\text{max}} = 300 \text{ nm}$ à l'aide du monochromateur et l'isomère E à $\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$ avec la lampe LED associée, tous deux à l'abri de la lumière environnante et à température ambiante. Dans les deux cas, le palier associé à l'EPS est rapidement obtenu (15 minutes) avec une valeur Z/E de 35:65 après deux heures d'irradiation à 300 nm et de 84:16 après deux heures d'irradiation à 450 nm (Figure 30).

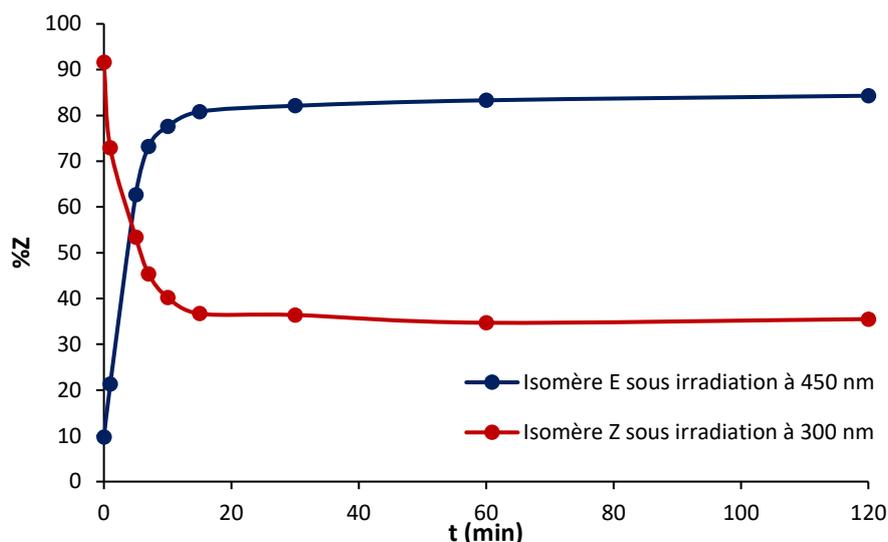
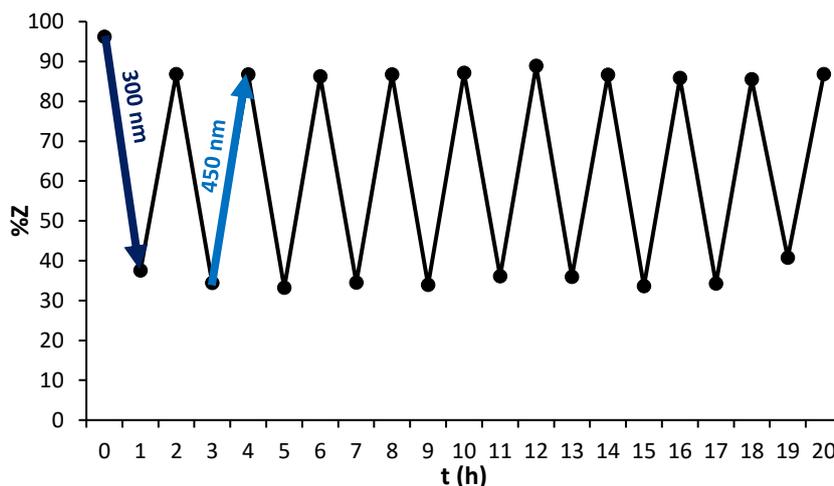


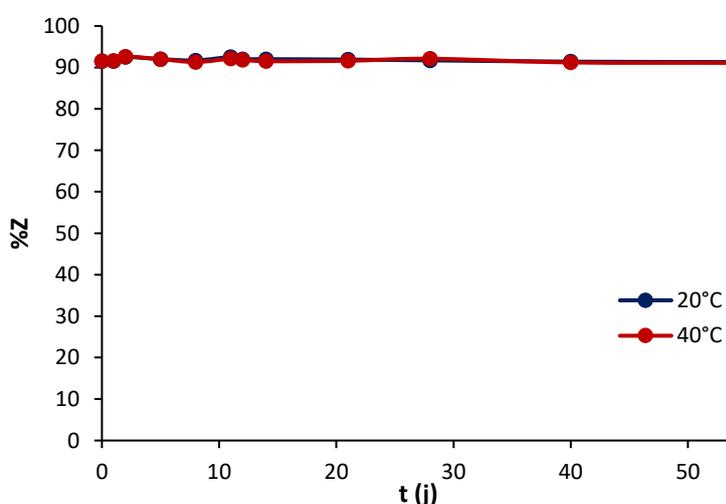
Figure 30 : Cinétique de photoisomérisation pour chaque isomère Z et E du ligand **107**

2.3.4. Robustesse de la photoisomérisation

Dans le but d'étudier les limites de la photoisomérisation du ligand **107**, la résistance à la photo-fatigue et la stabilité thermique dans le noir doivent être testées. Pour cela, deux expériences ont été mises en œuvre. Dans un premier temps, une solution du ligand **107** à Z/E 96:4 préparée dans les mêmes conditions que précédemment dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (1:1, v/v) a été irradiée pendant une heure à 450 nm puis à 300 nm de façon alternative. Après chaque heure d'irradiation, le mélange obtenu est analysé par HPLC de façon à contrôler que les EPS restent identiques. Après dix cycles de photoisomérisation, aucun photoblanchiment n'est observé, ce qui montre une bonne résistance à la photo-fatigue du ligand (Figure 31).

Figure 31 : Etude de la photo-fatigue associée à l'isomérisation du ligand **107**

La stabilité thermique dans le noir est par la suite testée en préparant deux solutions du ligand **107** à Z/E 90:10 dans un mélange H₂O/DMSO (1:1, v/v). L'une est placée dans un environnement à 20°C et l'autre dans un four chauffé à 40°C, tous deux à l'abri total de la lumière. Le ratio est contrôlé au fur et à mesure du temps sur une période de plus de 50 jours. Ici encore, la robustesse de l'éther de thiovinyle est validée car aucune isomérisation n'est observée (Figure 32).

Figure 32 : Stabilité thermique dans le noir du ligand **107**

Pour conclure, nous avons pu montrer que l'introduction d'atomes de fluor en position *ortho* du lien éther de thiovinyle permettait de décaler d'environ 20 nm le maximum d'absorption de la bande $\pi \rightarrow \pi^*$ de l'isomère Z spécifiquement. Ainsi, une photoconversion bidirectionnelle efficace d'isomères thermiquement bistable est obtenue. En vue de contrôler l'activité enzymatique de la CA par irradiation lumineuse, nous nous proposons à présent de modifier la structure du ligand formé par KTGS afin d'avoir des constantes d'inhibition significativement différentes pour les deux isomères. Dans ce cas, la

propriété de photocommutation prendrait son réel intérêt et l'activité du ligand pourrait être photomodulée.

3. Vers la modification structurale du ligand 107 pour différencier les IC₅₀ des deux isomères *Z* et *E*

3.1. Etat de l'art

3.1.1. Introduction à la photoisomérisation en chémobiologie

L'utilisation de la lumière semble idéale dans le domaine de la chémobiologie, ce stimulus externe offrant une résolution spatiotemporelle particulièrement importante. De plus, en fonction de la longueur d'onde d'irradiation, celle-ci se veut non invasive sur les systèmes biologiques et ne cause aucune contamination chimique ou biologique dans ces derniers.

La mise en œuvre d'une certaine réponse à la lumière dans les biomolécules se fait particulièrement *via* l'introduction d'un système moléculaire photocommutable. En effet, cette propriété permet de photoréguler de nombreux processus biologiques tels que la fonction et structure d'acides nucléiques ou peptides, la transcription et traduction, le repliement de protéines, les interactions protéine-ligand, le transport dans les membranes, la modulation d'un récepteur ou encore l'activité enzymatique (Figure 33)¹⁰³. Nous nous focaliserons seulement sur ce dernier procédé, celui-ci faisant l'objet de nos travaux.

¹⁰³ W. Szymański, J. M. Beierle, H. A. V. Kistemaker, W. A. Velema, B. L. Feringa, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6114–6178.

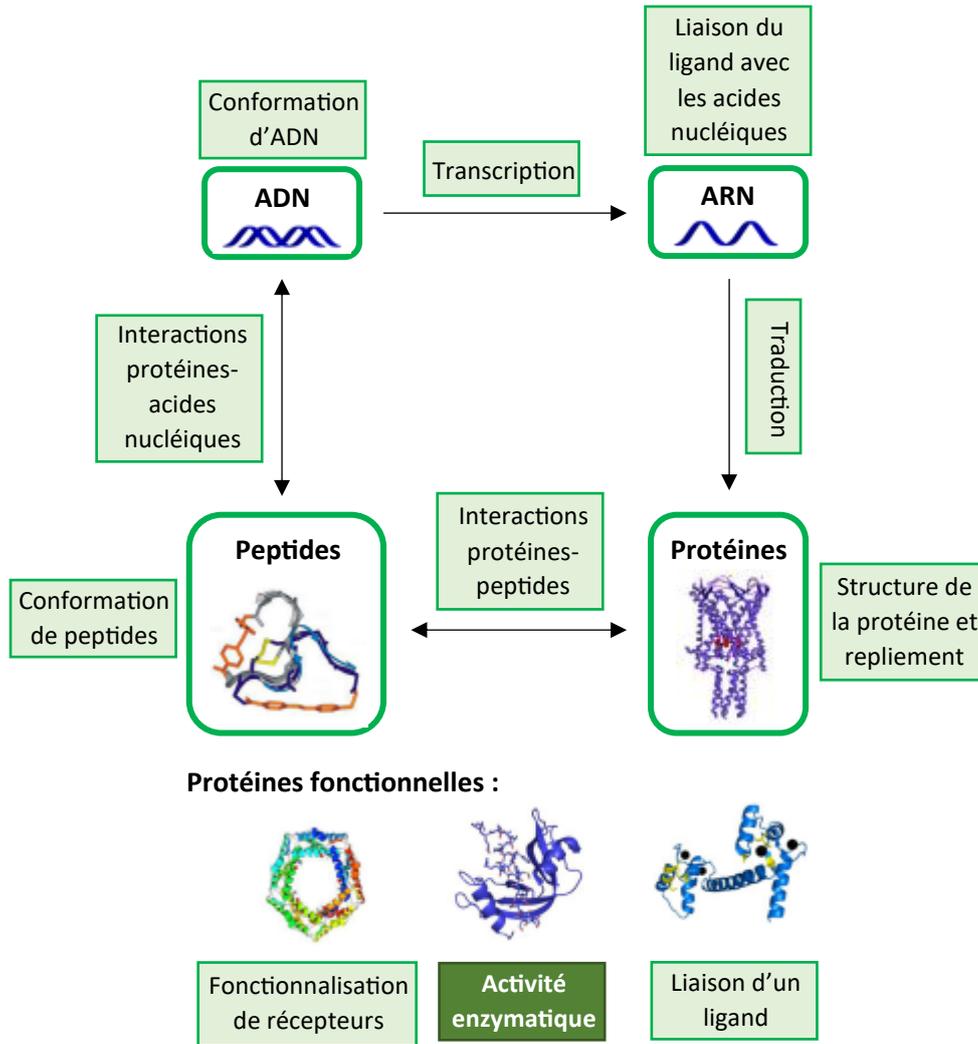


Figure 33 : Procédés biologiques pouvant être photorégulés par l'incorporation d'un système moléculaire photomodulable (l'encadré vert foncé met l'accent sur l'objet de ces recherches) (figure extraite et modifiée de la revue¹⁰³)

3.1.2. Photorégulation de l'activité enzymatique

L'activité d'une enzyme peut être régulée par la présence d'un ligand ayant la propriété de photoisomériser, celui-ci jouant le rôle « d'interrupteur » une fois associé à une irradiation. En effet, l'introduction d'une fonction détenant la capacité de photocommuter au sein d'une biomolécule permet de modifier spatio-temporellement l'alignement et la distance entre les groupes de son site actif. Les modifications structurales obtenues par photoisomérisation du système peuvent donc être à l'origine d'une variation réversible de l'activité de la cible biologique.

Deux stratégies découlent de ce principe (Schéma 48). La première vise à incorporer dans la biomolécule un ligand photomodulable qui, par irradiation, adoptera une structure différente. En

fonction de la forme qu'elle aura, elle pourra s'insérer ou non dans le site actif de la molécule (Stratégie A). La seconde vise à insérer un ligand photoisomérisable qui interagit avec deux sites actifs d'une biomolécule. Sous irradiation, la distance et l'alignement entre ces deux sites actifs sont modifiés, ce qui a donc un impact direct sur l'activité de la cible (Stratégie B).

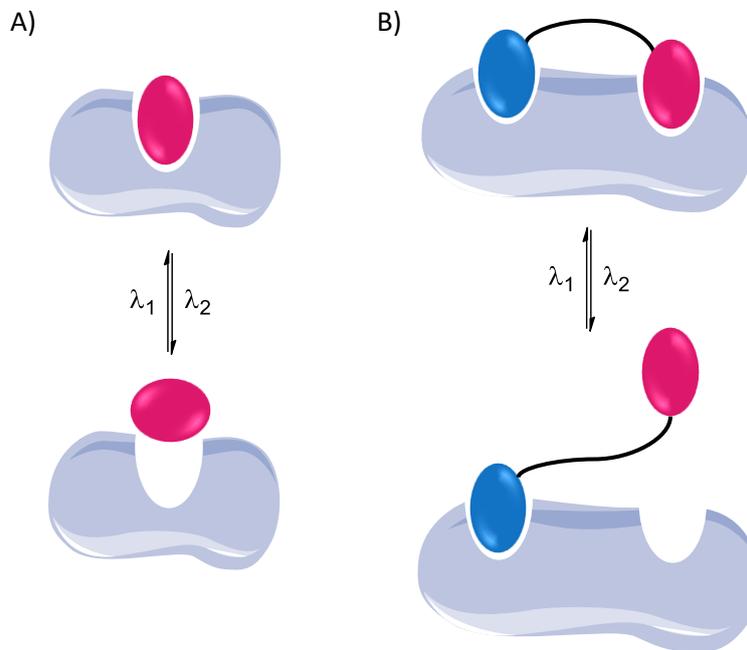


Schéma 48 : Deux stratégies principales dans la mise en place d'un système photocommutable dans une biomolécule

Pour que ces stratégies fonctionnent, les deux états photostationnaires obtenus par irradiation optimale doivent être riches en un isomère et inversement. De plus, les activités biologiques correspondant aux deux formes doivent être significativement différentes. Malgré la puissance de cette propriété, peu de systèmes répondent à ces deux attentes. De ce fait, l'introduction de molécules photomodulables impacte souvent l'activité de l'enzyme, l'isomère le moins actif interagissant tout de même avec celle-ci.

3.1.3. Exemples d'inhibiteurs photoisomérisables de l'anhydrase carbonique

Parmi les cibles dans lesquelles la propriété de photoisomérisation a pu fonctionner, nous retrouvons l'anhydrase carbonique, enzyme d'intérêt de nos projets.

En 2008, Trauner et Harvey développent une stratégie de marquage d'affinité de la bCA-II en présence d'un ligand de type azobenzène portant d'un côté la fonction sulfonamide et de l'autre une

fonction époxyde électrophile (Schéma 49)¹⁰⁴. En se servant de l'hydrolyse de la PNPA pour contrôler l'activité de *bCA-II*, l'équipe découvre que le passage de l'isomère *Z* à *E* par irradiation permet d'inhiber l'activité enzymatique d'un facteur deux. Bien que cette différence d'activité ne soit pas importante, cette preuve de principe a ouvert la voie vers de nouvelles études en ce sens.

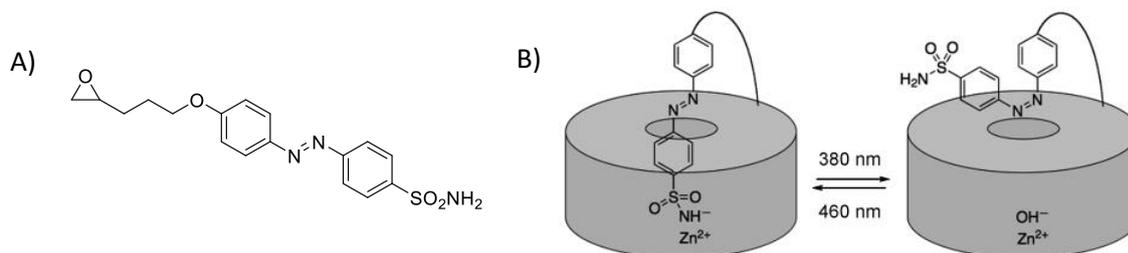
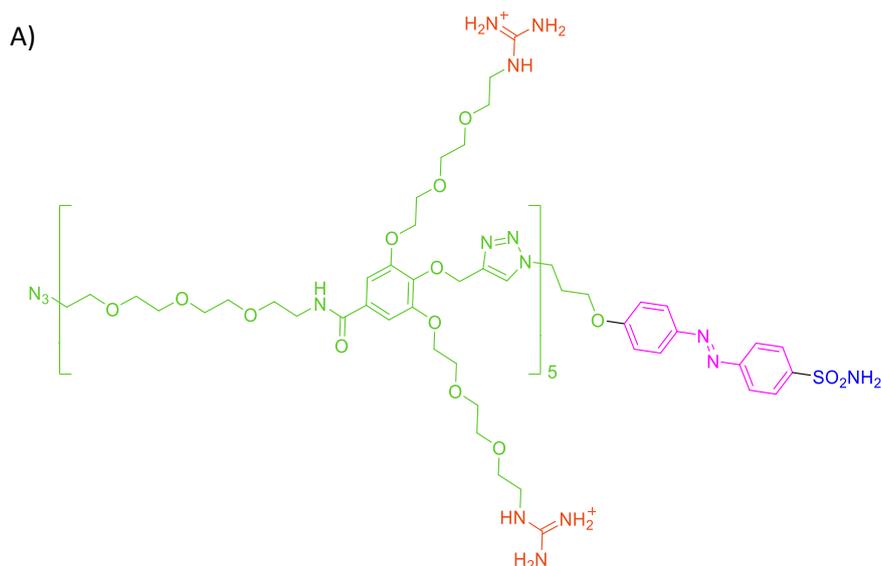


Schéma 49 : A) Ligand photomodulable développé par Trauner et Harvey, B) Photocontrôle de l'activité de la *bCA-II* en présence du ligand (schéma extrait de l'article¹⁰⁴)

Par la suite, un système moléculaire photocommutable et adhésif à la CA a pu être développé par l'équipe d'Aida et Okuro¹⁰⁵. Ici, l'azobenzène est fonctionnalisé d'un côté par un sulfonamide nécessaire à l'inhibition de l'activité de la cible par liaison avec son site actif, et de l'autre par une partie dite « collante » composée de multiples ions guanidinium Gu⁺ prêts à adhérer à la surface de l'enzyme (Schéma 50). Les fonctions Gu⁺ ne pouvant pas facilement se décoller de la paroi de la cible, la photoisomérisation du motif azo va générer un mouvement de « ressort » du sulfonamide, résultant en son insertion/désinsertion dans le site actif avec des EPS de 7/93 et 76/24 *E/Z* par irradiation à 365 nm et 425 nm respectivement. En l'absence de la partie collante, l'inhibition peut toujours se faire mais sa photomodulation n'a plus lieu.



¹⁰⁴ J. H. Harvey, D. Trauner, *ChemBioChem* **2008**, 9, 191–193.

¹⁰⁵ R. Mogaki, K. Okuro, T. Aida, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 10072–10078.

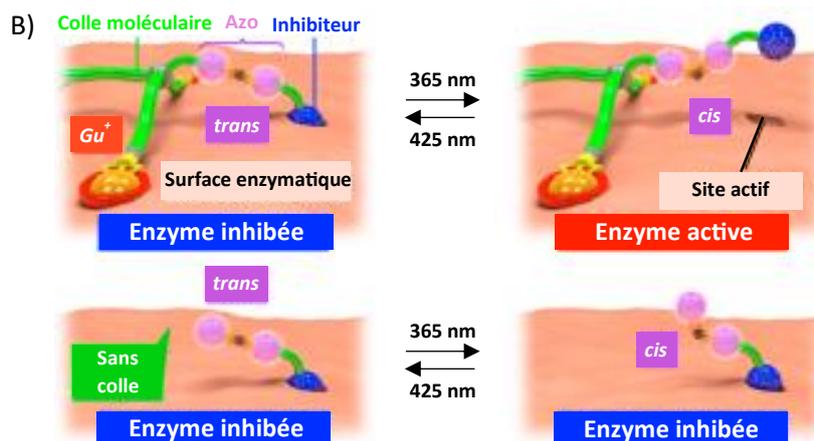


Schéma 50 : A) Système moléculaire adhésif photomodulable sur la CA, B) Principe associé (schéma extrait puis modifié de l'article¹⁰⁵)

Plus récemment, l'équipe d'Emilie Que a développé un ligand composé d'un azobenzène portant un motif sulfonamide qui ne nécessite pas d'être attaché à la CA pour que son activité soit photorégulée (Schéma 51)¹⁰⁶. En effet, sous la forme *E*, la molécule entre dans le site actif de l'enzyme, se lie à l'ion Zn²⁺ et inhibe ainsi son activité. En revanche, l'isomère *E* étant trop encombré stériquement, celui-ci n'est plus capable de s'insérer dans le site. De ce fait, l'activité de la CA est recouvrée. Les deux IC₅₀ associées aux deux isomères étant relativement différents (ratio de 5 pour **CAP1** et de 2 pour **CAP2**) et leurs EPS enrichis en l'un des isomères en fonction de l'irradiation (pour le **CAP1** : 93/7 et 30/70 Z/E par irradiation à 365 et 410 nm respectivement ; pour le **CAP2** : 62/38 et 42/58 Z/E par irradiation à 410 et 460 nm), leur photomodulation a permis de modérément réguler le pH cytosolique de cellules vivantes par inhibition de la CA-II.

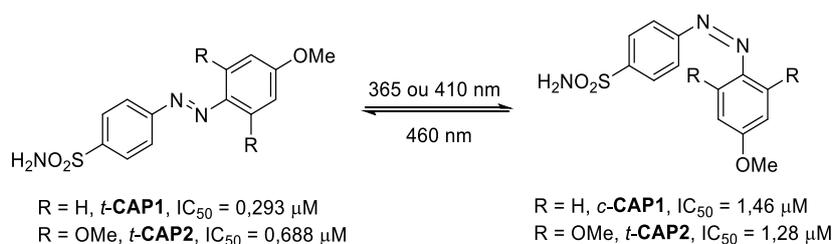


Schéma 51 : Structure et activité des ligands photocommutables **CAP1** et **CAP2** développés dans l'article¹⁰⁶

A la suite de ces résultats prometteurs, la même équipe a développé, de la même façon que dans les travaux présentés dans le chapitre précédent, un ligand azobenzènesulfonamide dont les positions *ortho* de la molécule ont été substituées par des atomes de fluor (Schéma 52)¹⁰⁷. En effet, cette modification permet de séparer les deux bandes d'absorption n→π* des isomères de façon à obtenir une meilleure réversibilité de photoisomérisation. De plus, on observe que les deux isomères

¹⁰⁶ K. Aggarwal, M. Banik, B. Medellin, E. L. Que, *Biochemistry* **2019**, *58*, 48–53.

¹⁰⁷ K. Aggarwal, T. P. Kuka, M. Banik, B. P. Medellin, C. Q. Ngo, D. Xie, Y. Fernandes, T. L. Dangerfield, E. Ye, B. Bouley, K. A. Johnson, Y. J. Zhang, J. K. Eberhart, E. L. Que, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 14522–14531.

sont thermiquement stables avec des temps de vie de plusieurs jours, et leur affinité avec la cible est particulièrement distincte avec des valeurs de K_D différentes d'un ratio 12. Le ligand présentant les meilleurs résultats *in vitro* a ensuite été testé avec succès sur des cellules HeLA, lignée cellulaire cancéreuse, puis *in vivo* sur des embryons de poissons zèbres. Ces travaux ouvrent donc la porte vers de nouvelles recherches pour la lutte contre le cancer grâce au contrôle du pH intracellulaire par inhibition de la CA-II, enzyme responsable de ce phénomène.

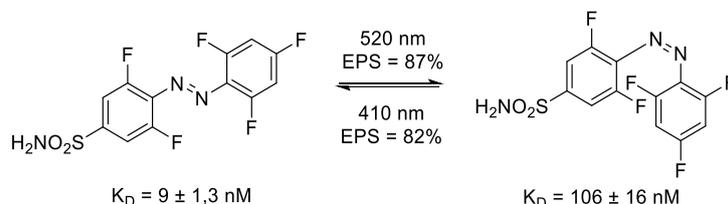


Schéma 52 : Structure et activité des ligands photoisomérisables testés *in vitro*, *in cellulo* puis *in vivo*

3.2. Modification structurale du ligand 107 en vue de différencier les activités biologiques de ses isomères Z et E

3.2.1. Réflexion sur le type de modification à mettre en œuvre

Les exemples susmentionnés montrent la possibilité de photoréguler efficacement l'activité biologique de la CA à partir de motif azobenzène. Dans cette étude, la synthèse d'un analogue du ligand **107** dont les IC_{50} des deux isomères seraient suffisamment différents a été entreprise.

Le fragment mercaptotoluène **33** a une bonne activité envers la CA-II ($IC_{50} = 0,36 \pm 0,04 \mu\text{M}$), la fonction sulfonamide servant à chélater l'ion Zn^{2+} présent au cœur du site actif de l'enzyme. En revanche, le fragment éthynylcoumarine n'est pas actif envers celle-ci, son IC_{50} étant supérieur à $500 \mu\text{M}$. Le fragment **33** se liant dans le site actif de la cible dans un emplacement plus profond et plus étroit, des modifications de sa structure pourraient drastiquement impacter son activité.

Comme nous avons pu le voir sur les ligands présentés dans la partie précédente, le motif azobenzène à l'origine de la photoisomérisation se situe toujours en position phénylique du mercaptotoluènesulfonamide. Du fait de la proximité de cette fonction photocommutable avec la fonction à l'origine de l'inhibition, l'isomérisation aura plus de chances de générer une gêne stérique entre le ligand et la biomolécule pour l'un des isomères. Or, la fonction vinylique du ligand **107** est plus éloignée de deux atomes (CH_2 et S) du mercaptotoluènesulfonamide. Nous avons donc pensé que le raccourcissement du bras séparant la coumarine du sulfonamide pourrait nous permettre de parvenir à ce même résultat de différenciation entre les deux isomères. Ainsi, en utilisant un motif thiophénol

à la place d'un mercaptotoluène, le ligand **108** serait obtenu. Nous pourrions imaginer que la molécule ne pourrait plus rentrer sous sa forme Z, le coude formé par le vinyle empêchant l'insertion du benzènesulfonamide dans la gorge de la CA-II.

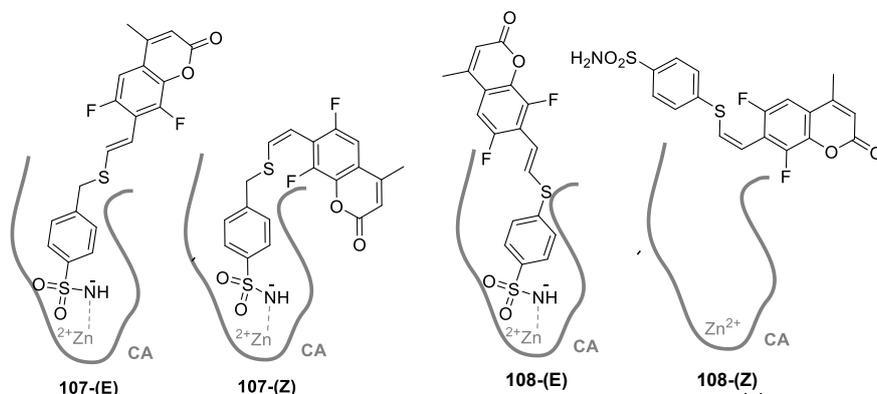


Schéma 53 : Hypothèse d'affinité des ligands **107** et **108** en fonction de leur isomère Z ou E

3.2.2. Synthèse du ligand 137

A partir de cette hypothèse, la synthèse du ligand **108** est envisagée par réaction de thiol-yne entre les fragments **106** et **109** (Schéma 54).

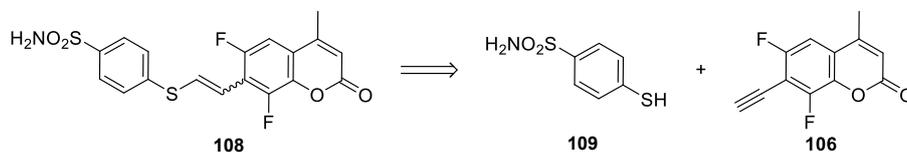


Schéma 54 : Rétrosynthèse du ligand **108**

Pour cela, la synthèse du fragment **109** est envisagée par une première réaction d'addition d'ammoniac sur le chlorure de 4-bromobenzène sulfonyle (Schéma 55). Le sulfonamide **110** obtenu avec un rendement de 85% est ensuite soumis à une réaction de couplage de type C-S réalisé en présence du thiosulfate de sodium¹⁰⁸. Le pont disulfure ainsi obtenu est ensuite réduit en présence d'une solution de zinc dans l'acide chlorhydrique de façon à obtenir le thiol libre **109**. Malheureusement, le thiophénol résultant dimérise immédiatement, ce qui permet seulement d'isoler le produit **111** avec un rendement de 63%.

¹⁰⁸ J. Yi, Y. Fu, B. Xiao, W.-C. Cui, Q.-X. Guo, *Tetrahedron Letters* **2011**, 52, 205–208.

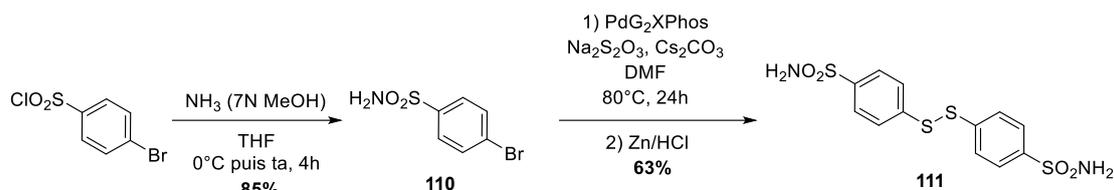
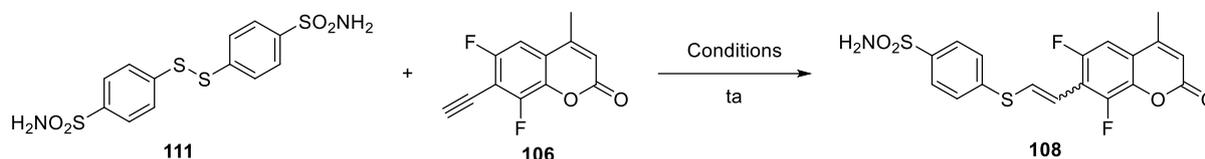


Schéma 55 : Synthèse du fragment thiol nécessaire à la réaction de thiol-yne

Malgré l'obtention du dimère, la réaction de thiol-yne peut néanmoins être testée en présence d'un réducteur afin de réduire le pont disulfure *in situ* et générer ainsi le thiol nécessaire à la réaction thiol-yne. Pour cela, plusieurs conditions ont été testées en faisant varier le réducteur (zinc, NaBH₄, TCEP.HCl) tout en adaptant les conditions réactionnelles (conditions basiques ou photochimiques) (Tableau 4). En fonction des conditions, le produit **108** est obtenu mais la purification des deux isomères purs n'a pas été rendu possible, des impuretés co-éluant toujours avec l'isomère **108-(Z)** quel que soit la méthode de purification choisie (chromatographie sur phase inverse ou normale).



Réducteur	Type de thiol-yne	Solvant	Temps	Résultat
Zn (15 eq)	Basique (DBU, 2,1 eq)	DMF	24h	Conversion partielle, isomères non isolables
NaBH ₄ (3 eq)	x	MeOH	4h	Pas de produit obtenu
TCEP.HCl (1,3 eq)	Photochimique ([Ru(bpz) ₃][PF ₆] ₂ , 0,04 eq ; p-toluidine, 0,8 eq ; 450 nm)	ACN/PB (0,25 M, pH = 7,4)	30 mn	Conversion totale, isomères non isolables

Tableau 4 : Conditions entreprises pour l'obtention du ligand **108** à partir du pont disulfure **111**

La voie de synthèse photochimique semble donner les meilleurs résultats. Or, la méthode de purification n'est peut-être pas assez bien optimisée pour parvenir aux isomères Z et E purs. Ces travaux nécessitent d'améliorer la voie de synthèse, et de comprendre l'origine des impuretés obtenues de façon à potentiellement pouvoir éviter leur formation. Une étude de *docking* pourrait être pertinente de façon à valider ou non l'intérêt de la structure imaginée. Par manque de temps, cela n'a pas pu être réalisé.

4. Conclusion

Ce chapitre met en évidence le développement de la réaction de thiol-yne entre deux fragments thiol et alcyne terminal en KTGS à partir de la *bCA-II* comme enzyme modèle. En plus de posséder des propriétés inhibitrices satisfaisantes, le ligand éther de thiovinyle formé présente également des propriétés photophysiques remarquables, notamment la photoisomérisation. Cependant, la réversibilité de photocommutation n'est pas probante et donne seulement accès à des mélanges riches en isomère *E* quelle que soit l'irradiation.

Cette propriété a pu, par la suite, être améliorée. En effet, en ajoutant deux atomes de fluor sur la partie coumarinique en position *ortho* du lien éther de thiovinyle, un décalage hypsochrome d'environ 20 nm de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ spécifique à l'isomère *Z* du ligand **107** a pu être observé, ce qui a pu augmenter la réversibilité de photoconversion des deux isomères thermiquement bistables.

Les résultats présentés à ce propos dans ce chapitre ont été publiés dans la revue *Chemistry - a European Journal* en 2022 : Metalloenzyme-Mediated Thiol-Yne Addition Towards Photoisomerizable Fluorescent Dyes, Alexis Lossouarn, Chloé Puteaux, Laetitia Bailly, Vincent Tognetti, Laurent Joubert, Pierre-Yves Renard and Cyrille Sabot, *Chem. Eur. J.* **2022**, *28*, e202202180¹⁰⁹.

Afin d'ajouter de la plus-value à cette propriété fort intéressante en vue d'applications biologiques, nous avons également tenté de modifier la structure du ligand formé par KTGS afin d'envisager des différences significatives d'activité pour les deux isomères. Nos travaux se sont donc axés sur la réduction de la taille du bras espaçant le motif coumarine de la fonction sulfonamide afin de générer un encombrement stérique entre l'un des isomères du ligand et la biomolécule par photoisomérisation. Malheureusement, la synthèse de la molécule escomptée s'est avérée plus compliquée en partie due à une purification du produit difficile. Il conviendrait de réaliser une étude de *docking* permettant d'abord de confirmer l'intérêt du ligand **108**. Par ailleurs, une optimisation de purification pourrait ensuite être entreprise dans le but de parvenir à la purification de chacun des deux isomères de la molécule en question. Dans le cas où le ligand **108** ne détient pas les propriétés attendues, d'autres structures photocommutables seront à envisager afin de différencier davantage les IC_{50} des deux diastéréoisomères *Z* et *E* et ainsi permettre d'utiliser ce type de molécules comme véritable outil de contrôle de l'activité de la *CA-II*.

Bien que les travaux présentés soient à l'origine du développement d'un système photocommutable novateur, la photoisomérisation $Z \rightarrow E$ requiert l'usage de longueurs d'ondes dans le

¹⁰⁹ A. Lossouarn, C. Puteaux, L. Bailly, V. Tognetti, L. Joubert, P.-Y. Renard, C. Sabot, *Chem. Eur. J.* **2022**, *28*, e202202180.

domaine UV, ce qui peut être délétère pour les cibles biologiques. Cependant, le décalage bathochrome de l'absorption et l'émission d'une coumarine fait l'objet de nombreux travaux¹¹⁰. De ce fait, le développement de motifs éthers de thiovinyle conjugués à des coumarines capables de photoisomériser exclusivement par excitation à des longueurs d'onde dans le visible a fait l'objet d'études présentées dans le chapitre suivant.

¹¹⁰ S. J. Sharma, N. Sekar, *Dyes and Pigments* **2022**, 202, 110306.

Chapitre 3 : Modification du motif coumarinique du ligand 107 afin de décaler ses propriétés photophysiques vers le rouge

La réaction de thiol-yne précédemment développée en KTGS avec la *bCA-II* a conduit à un ligand éther de thiovinyle *via* une réaction entre une éthynylcoumarine et un mercaptosyle. Outre ses propriétés inhibitrices de la *bCA-II*, ce ligand présente également des propriétés de fluorescence et de photoisomérisation.

Cette dernière propriété, optimisée une première fois par l'introduction d'atomes de fluor en position *ortho* du fragment coumarine (cf. chapitre 2), pourrait présenter à terme, un réel intérêt pour le contrôle de l'activité biologique d'enzymes avec une précision spatiotemporelle, à des fins thérapeutiques. Or, deux problématiques se posent. Dans un premier temps, l'une des irradiations nécessaires à l'isomérisation $Z \rightarrow E$ est située dans l'UV, ce qui peut être délétère pour la cible ou le système biologique étudié. Par ailleurs, les deux IC_{50} associés aux isomères du ligand éther de thiovinyle sont assez proches (ratio d'environ trois), ce qui ne permet pas de réguler pleinement l'activité de la *CA-II* par photoisomérisation.

Les travaux présentés dans ce chapitre viseront donc à développer des éthers de thiovinyle fluorescents capables de photocommuter exclusivement dans des longueurs d'onde du visible de façon à minimiser l'impact des radiations utilisées sur les systèmes biologiques. Pour cela, dans un premier temps, nous développerons la synthèse d'éthynylcoumarines ayant reçu des modifications structurales dans le but de décaler vers le rouge l'absorption de l'éther de thiovinyle formé. Par la suite, nous présenterons les résultats concernant les tentatives d'ajout des deux atomes de fluor aux nouvelles structures coumarine identifiées dans la première partie afin de retrouver la propriété de photocommutation et ainsi remplir entièrement le premier objectif fixé.

1. Décalage vers le rouge de l'absorption du fragment coumarine

1.1. Etat de l'art

Depuis plusieurs années, de nombreuses recherches sont effectuées de façon à décaler vers le rouge l'absorption des composés nécessitant une activation par irradiation lumineuse dans des milieux biologiques. En effet, l'irradiation UV est peu efficace (diffraction) et phototoxique puisqu'une large partie des biomolécules absorbent à cette longueur d'onde (Figure 34). De plus, cela peut induire un phénomène de fluorescence de la part des fluorophores endogènes¹¹¹, ce qui rend difficile la distinction de la fluorescence générée par des marqueurs ajoutés artificiellement.

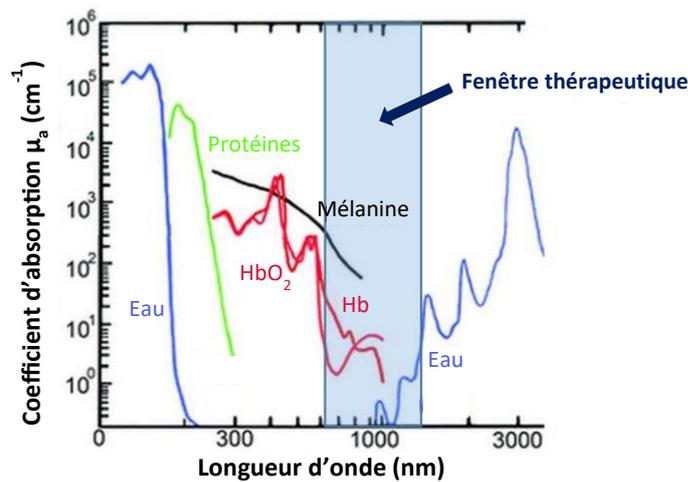


Figure 34 : Domaine d'absorption des principaux composants d'un tissu biologique (Figure extraite et modifiée de la thèse¹¹²)

1.1.1. Modification de l'absorption de la coumarine

La coumarine est un fluorophore d'origine naturelle particulièrement étudié, celle-ci étant utilisée dans un large nombre d'applications pharmacologiques telles que le développement d'antiviraux, anticancéreux, anti-leucémiques, anti-diabétiques ou encore anti-inflammatoires. De plus, cette famille présente une photostabilité élevée, peu de toxicité et une très bonne perméabilité cellulaire, ce qui fait d'elle un candidat de choix pour des applications biologiques¹¹⁰.

¹¹¹ M. Monici, *Biotechnology Annual Review* **2005**, 11, 227–256.

¹¹² J. Ogien, thèse intitulée « Développement de systèmes de microscopie par cohérence optique pour l'imagerie de la peau », novembre 2017.

Alors que la coumarine non substituée ne présente pas de fluorescence (Figure 35), sa dérivatisation en position 7 à l'aide d'un groupement électrodonneur tel qu'un phénol ou une aniline active cette propriété. En effet, un effet *push-pull* est alors généré entre cette fonction et le carbonyle de la lactone qui agit comme un groupement électroattracteur¹¹³.

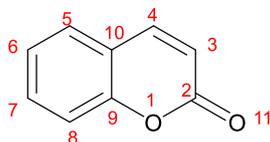


Figure 35 : Structure de la coumarine et numérotation de ses positions

Ses propriétés photophysiques sont particulièrement intéressantes puisqu'elle présente souvent un rendement quantique de fluorescence important et un large déplacement de Stokes. La 7-hydroxy-4-méthyl-coumarine absorbant cependant dans le proche UV (360 nm), de nombreuses études ont été effectuées dans le but de décaler son absorption vers le rouge pour ainsi l'utiliser à des fins biologiques.

Si l'on considère la relation de Planck-Einstein, à savoir $E = \frac{hc}{\lambda}$, la longueur d'onde associée à l'absorption d'un système est inversement proportionnelle à l'énergie séparant la HOMO de la LUMO de celui-ci. Ainsi, si l'on souhaite décaler vers le rouge l'absorption d'une molécule, l'énergie séparant ces deux états doit être plus faible. L'écart entre ces deux bandes d'énergie dépend particulièrement de cinq facteurs¹¹⁴ :

- Le pouvoir électrodonneur/électroattracteur d'un substituant qui joue un rôle important dans l'effet *push-pull* d'une molécule. Plus cet effet est important, plus le décalage vers le rouge l'est également ;
- L'alternance de la longueur des liaisons (*Bond Length Alternation*, BLA) qui calcule la différence entre la moyenne des longueurs d'une liaison simple et la moyenne des longueurs d'une double liaison. Une petite valeur de BLA correspond à un plus grand degré de délocalisation d'électrons et donc un plus petit écart entre les deux bandes d'énergie ;
- L'énergie de résonance d'un système aromatique. En effet, l'excitation d'un cycle aromatique le fait basculer vers sa forme *para*-quinoïdale. Plus les substituants contribuent à cette forme de résonance, plus l'énergie de résonance est faible ;
- L'angle dièdre θ entre le substituant et la structure de la coumarine. Un petit angle dièdre conduit à une structure plus plane et donc à une délocalisation d'électrons π plus importante, soit une énergie plus faible ;

¹¹³ K. Colas, S. Doloczeki, M. P. Urrutia, C. Dyrager, *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, 15, 2133–2144.

¹¹⁴ X. Liu, Z. Xu, J. M. Cole, *J. Phys. Chem. C* **2013**, 117, 16584–16595.

- Les interactions intermoléculaires, notamment avec le solvant qui l'entoure.

A partir de ces différents facteurs, deux paramètres ont particulièrement été étudiés, à savoir l'augmentation de l'effet *push-pull* de la molécule par l'ajout supplémentaire de groupements électrodonneurs ou électroattracteurs de part et d'autre de la structure, ou l'expansion du système π -conjugué qui aplanit et rigidifie la structure résultante¹¹⁵. Dans le but de modifier le moins possible la structure de la coumarine, nos études se pencheront particulièrement sur le premier paramètre évoqué.

1.1.2. Augmentation de l'effet *push-pull* de la coumarine

Afin de mieux comprendre l'impact de l'ajout de groupements électroniques sur l'absorption d'une molécule, rappelons les principes de base de la fluorescence (Figure 36). Par irradiation lumineuse, un électron de la HOMO d'un fluorophore passe de son état fondamental S_0 à un état excité S_1 . De façon immédiate, l'espèce excitée relaxe vers l'état fondamental en émettant un photon lumineux. C'est ce qui génère la fluorescence. Dans le cas où les fluorophores présentent une structure de type donneur-accepteur (*push-pull*), un transfert de charge intramoléculaire (*Intramolecular Charge Transfer*, ICT) peut avoir lieu de l'état S_1 à un autre état excité S_1 -ICT à l'énergie plus faible. Ainsi, l'énergie séparant ce dernier de l'état fondamental est plus faible, ce qui génère un décalage de l'émission vers le rouge.

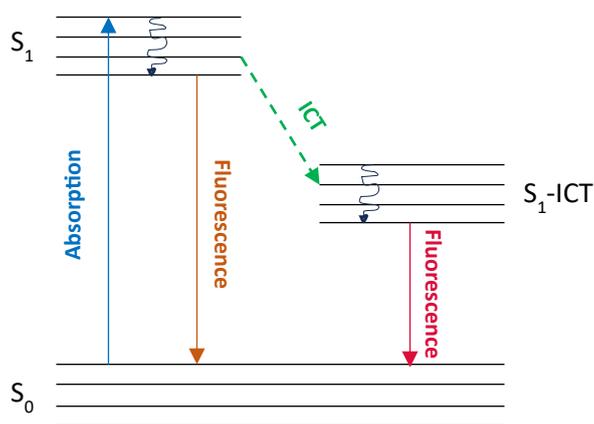


Figure 36 : Diagramme de Jablonski simplifié illustrant le phénomène de fluorescence (figure extraite et modifiée de l'article¹¹³)

De façon générale, l'augmentation de l'effet *push-pull* modifie l'absorption et l'émission de la molécule de la même façon puisque les niveaux d'énergie de l'HOMO et la LUMO sont tous les deux amenés à changer.

¹¹⁵ J. Roncali, *Macromolecular Rapid Communications* **2007**, 28, 1761–1775.

Dans la majorité des cas, la substitution d'une coumarine se fait de la façon suivante dans cet objectif^{110,116} (Figure 37) :

- Les groupements électrodonneurs (hydroxyle ou aminodialkyle) sont introduits sur la partie benzylque riche en électrons (positions 6, 7 et 8),
- Le pouvoir électroattracteur du cycle pyrone est amélioré par l'introduction de groupements CF₃, aldéhydes, cétones, acides ou ester en positions 3 et 4.

Ainsi, en fonction de la force du donneur ou de l'accepteur, l'absorption et l'émission peuvent être plus ou moins contrôlées.

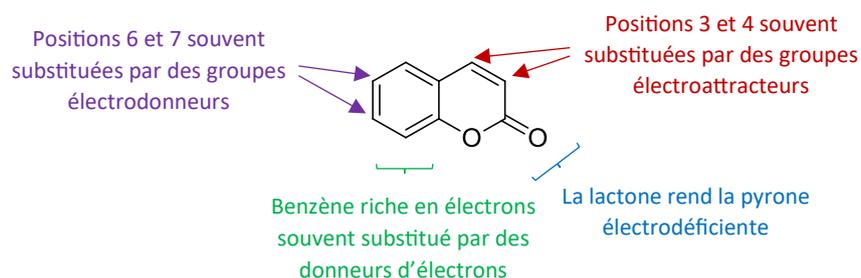


Figure 37 : Modifications de la structure de la coumarine pour décaler vers le rouge son absorption et son émission (Figure extraite et modifiée de la revue¹¹⁰)

Des travaux récents montrent que la modification de la position 1 peut aussi être intéressante dans ce même but. Par exemple, l'introduction de groupements électroattracteurs tels que le difluorométhylène (CF₂) a permis de décaler de 120 nm vers le rouge l'absorbance de la coumarine¹¹⁷. En effet, lorsque cette position est substituée par un atome oxygène, deux électrons sont ajoutés au système π , ce qui déstabilise la LUMO. Au contraire, sa substitution par le groupement CF₂ augmente la densité en électrons π , ce qui la stabilise (Figure 38). L'HOMO, quant à elle, ne se voit pas affectée et garde la même valeur d'énergie. Le gap entre ces deux niveaux est donc réduit, d'où le décalage vers le rouge de la longueur d'onde d'absorption.

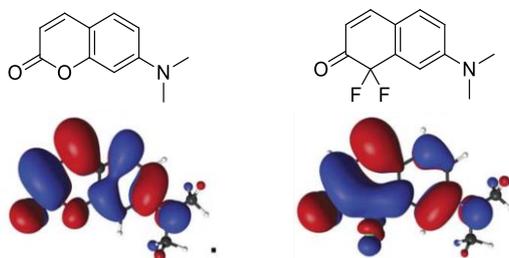


Figure 38 : Modification de la LUMO par modification de la position 1 de la coumarine avec le difluorométhylène

¹¹⁶ K. Renault, P.-Y. Renard, C. Sabot, *European Journal of Organic Chemistry* **2022**, 2022, e202201314.

¹¹⁷ S. S. Matikonda, J. Ivanic, M. Gomez, G. Hammersley, M. J. Schnermann, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 7302–7307.

1.2. Synthèse d'éthynylcoumarines analogues pour la réaction de thiol-yne

Dans le but de développer de nouveaux ligands éther de thiovinyle dont l'absorption serait décalée vers le rouge, nous proposons dans un premier temps de synthétiser de nouvelles éthynylcoumarines sans nous intéresser pour le moment à leur propriété de photocommutation.

1.2.1. Synthèse d'éthynylcoumarines substituées en position 3 ou 4

Pour commencer, nous nous intéressons au développement d'éthynylcoumarines substituées en position 3 ou 4 par des groupements électroattracteurs. Les synthèses de la 7-éthynyl-4-trifluorométhyl-coumarine et de la 7-éthynyl-3-benzothiazole-coumarine sont donc entreprises, les précurseurs 7-hydroxy ayant précédemment été synthétisés au laboratoire par notre équipe (Schéma 56).

De la même façon que précédemment, le groupement hydroxyle est triflé dans le but d'effectuer un couplage de Sonogashira et ainsi insérer la fonction éthynyle protégée par un groupement TMS. L'alcyne est ensuite déprotégé dans le fluorure de tétra-n-butylammonium (TBAF) pour ainsi obtenir les fragments **118** et **119**.

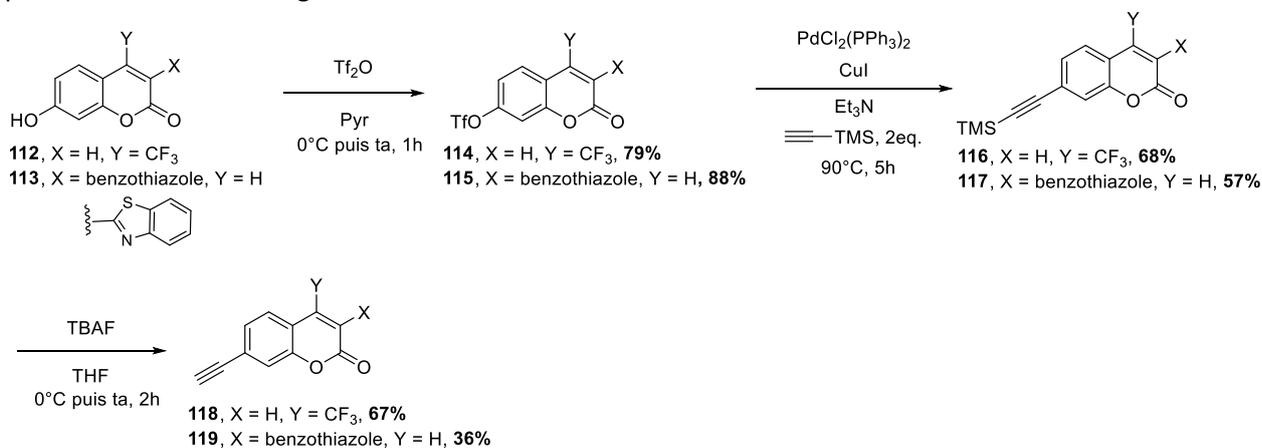


Schéma 56 : Synthèse d'éthynylcoumarines substituées en position 3 ou 4

Les deux premiers analogues **118** et **119** ont été obtenus avec des rendements convenables de 36% et 18% respectivement sur trois étapes.

1.2.2. Synthèse de l'éthynylcoumarine substituée par le difluorométhylène en position 1

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la modification de la lactone par l'insertion du difluorométhylène en position 1, cette fluorocoumarine ayant montré un décalage vers le rouge de l'absorption particulièrement important ($\lambda_{\text{Abs max}} = 461 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{Em max}} = 578 \text{ nm}$ dans le PBS contenant 10% de sérum bovin fœtal (FBS))¹¹⁷. La synthèse de ce motif est réalisée à partir des travaux de la littérature (Schéma 57). La difluorocoumarine **120** ayant déjà été synthétisée au laboratoire, sa triflation est entreprise de la même façon que précédemment. En revanche, des difficultés de synthèse sont révélées lors du couplage de Sonogashira. En effet, les analyses par spectroscopie RMN ^1H , ^{19}F et HRMS montrent que la fonction triméthylsilylacétylène a bien été couplée au motif coumarinique, mais un atome de fluor semble avoir été remplacé par un proton dans la molécule obtenue.

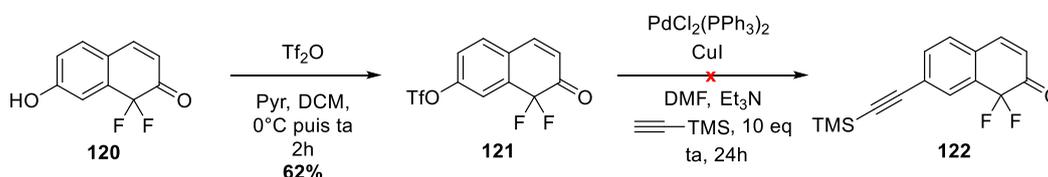


Schéma 57 : Première voie de synthèse développée pour l'obtention de la 7-éthynyl-1,1-difluorocoumarine

Le groupement difluorométhylène semblant être instable dans les conditions de couplage mises en œuvre, une nouvelle voie de synthèse a été développée de façon à ne le former qu'à la dernière étape (Schéma 58). A partir du 2,7-naphtalènediol, une monotriflation est donc entreprise pour parvenir au composé **123** avec un faible rendement de 37%¹¹⁸. Par la suite, un couplage de Sonogashira est effectué et permet cette fois-ci de former l'alcyne protégé **124** avec un bon rendement de 76%. Cette fonction est ensuite déprotégée en présence de TBAF et le produit **125** est donc obtenu avec 80% de rendement. Enfin, l'ajout de Selectfluor® dans le DMF permet de fluorer sélectivement la position 1 du naphtalène pour ainsi former le fragment **126** attendu avec un bon rendement de 83%¹¹⁷.

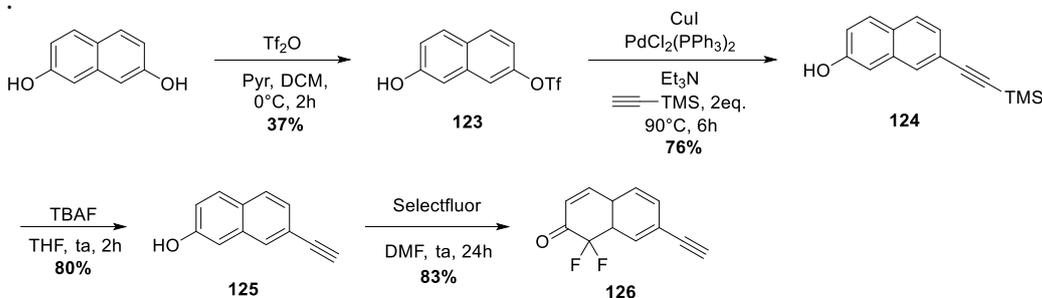


Schéma 58 : Voie de synthèse développée permettant l'obtention de la 7-éthynyl-1,1-difluorocoumarine

¹¹⁸ M. Frigoli, C. Moustrou, A. Samat, R. Guglielmetti, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2003, 2799–2812.

1.2.3. Réaction de thiol-yne en présence de la N-acétyl-cystéine

Dans le but de tester les différences d'absorption et d'émission obtenues par modification de la structure du fragment éthynylcoumarine, la réaction de thiol-yne doit être entreprise avec un partenaire thiol.

Lors du développement de ces fragments, notre équipe a élaboré, dans un projet annexe, des conditions nécessaires à la réalisation de la réaction de thiol-yne en présence de dérivés de biothiols. En effet, à la place d'utiliser une base forte comme précédemment (i.e. DBU) incompatible avec les fonctions portant un proton acide (phénol, thiol, etc...), une catalyse photoredox réalisée dans le domaine du visible a été mise en place. Cette technique douce, biocompatible et réalisable dans les systèmes aqueux, a été développée en s'inspirant de la réaction de thiol-ène développée par Yoon et ses collaborateurs¹¹⁹.

Dans cette étude, un photocatalyseur au ruthénium II, $[\text{Ru}(\text{bpz})_3][\text{PF}_6]_2$, est irradié à 450 nm dans l'acétonitrile en présence de p-toluidine, cette dernière assurant le transfert d'électrons entre le photocatalyseur excité et le thiol (Schéma 59). Le radical thiyle généré réagit ensuite avec l'alcène pour donner lieu à la réaction de thiol-ène. Le complexe, quant à lui, est réoxydé grâce à la présence d'oxygène dans le milieu.

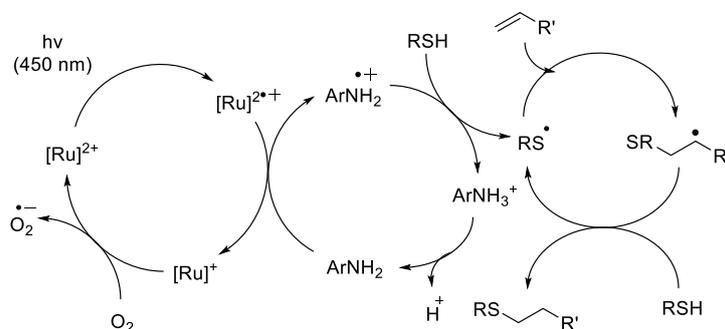
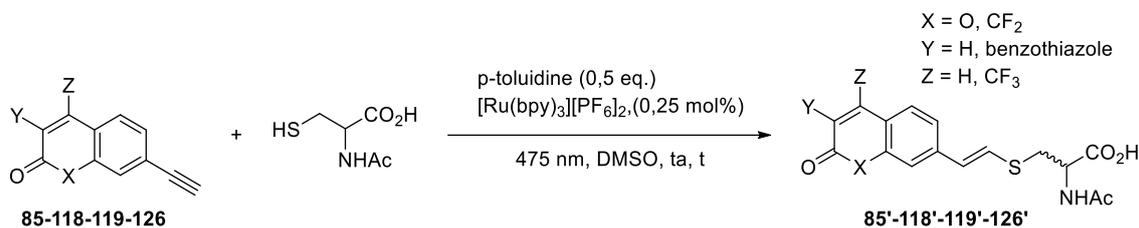


Schéma 59 : Réaction de thiol-ène radicalaire générée sous conditions redox (schéma extrait et modifié de l'article¹¹⁹)

Ces conditions ont été optimisées par la postdoctorante Dr. Isabelle Toubia entre la coumarine **85** et la N-acétyl-cystéine qui présente donc une fonction acide carboxylique libre (NAC), avec pour photocatalyseur le plus performant le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3][\text{PF}_6]_2$ (Schéma 60) sous une excitation à 475 nm, dans le DMSO. Une fois ces conditions en main, les différentes éthynylcoumarines préalablement synthétisées ont été testées avec ce même acide aminé. Les rendements chimiques d'éthers de thiovinyle obtenus sont variables mais globalement moins bons que celui obtenu avec la coumarine **85**. En revanche, un décalage de l'absorption vers le rouge est bel et bien observé en présence des trois

¹¹⁹ E. L. Tyson, Z. L. Niemeyer, T. P. Yoon, J. Org. Chem. **2014**, 79, 1427–1436.

coumarines développées, ce qui est en accord avec la théorie ICT. A titre d'exemple, le composé **126** est particulièrement intéressant car il permet d'exciter au-delà de 400 nm la coumarine correspondante.



A)

Coumarine	Rendement thiol-yne (%)	Temps réaction (min)	$\lambda_{\text{Abs max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{Em max}}$ (nm)
85	64	5	362	512
118	39	15	373	577
119	27	60	412	561
126	5	5	420	-

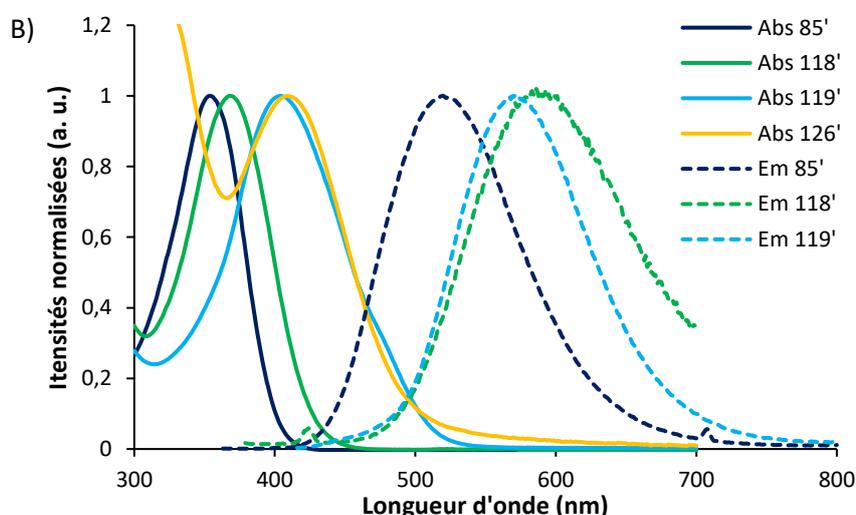


Schéma 60 : Réaction de thiol-yne photoredox entre un fragment éthynylcoumarine et la NAC, A) Longueurs d'onde d'absorption et d'émission du ligand éther de thiovinyle formé (mesures faites dans le tampon PB pH = 7,4), B) Spectres d'absorption et d'émission associés

Comme nous pouvons le voir, le ligand formé par la coumarine **126** et la NAC ne présente pas de fluorescence dans un milieu aqueux. En effet, comme l'indique la littérature¹¹⁷, seul l'ajout de 10% de FBS permet l'exaltation de la fluorescence de la fluorocoumarine substituée en position 7 par des groupements électrodonneurs de type hydroxyle ou amine. C'est aussi ce que nous observons avec la fluorocoumarine éther de thiovinyle **126** dont la fluorescence a également été mesurée dans le FBS, et

une exaltation notable (x 13) a été observée (Figure 39). En effet, un environnement apolaire comme celui créé par les chaînes latérales aromatiques ou aliphatiques des résidus des protéines contenues dans le sérum bovin est donc nécessaire pour recouvrer les propriétés de fluorescence de la coumarine **126**. Parmi ces protéines, la BSA, séralbumine bovine, est connue pour présenter des sites de liaison peu sélectifs pour les dérivés aromatiques, et pour exalter la fluorescence des fluorophores peu solubles en milieu aqueux et ayant tendance à s'autoagréger.

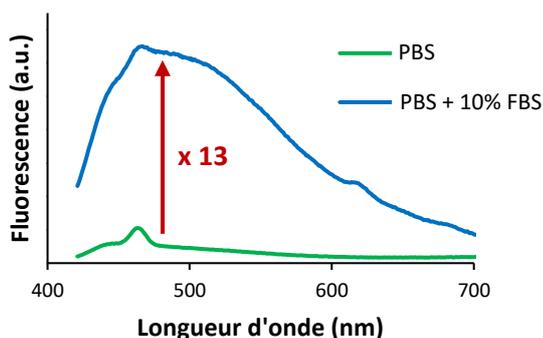


Figure 39 : Exaltation de la fluorescence du ligand éther de thiovinyle formé par la coumarine **126** et la NAC par ajout de 10% FBS dans le PBS

Les fragments coumarine présentés dans cette étude ne permettant pas de former par réaction de thiol-yne un ligand photocommutable, celles-ci n'ont pas été testées en présence du partenaire thiol **33**. Seul leur maximum d'absorbance une fois le ligand éther de thiovinyle formé nous intéresse. En revanche, par acquis de conscience, les conditions ont tout de même été testées avec le fragment **33** et l'éthynylcoumarine **85**. En cinq minutes d'irradiation, le ligand **88** est obtenu avec un rendement de 60% (Schéma 61).

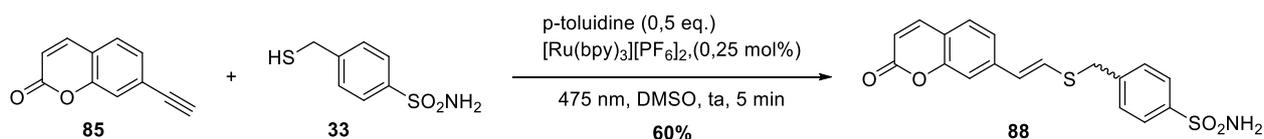


Schéma 61 : Réaction de thiol-yne photoredox entre la coumarine **85** et le thiol **33**

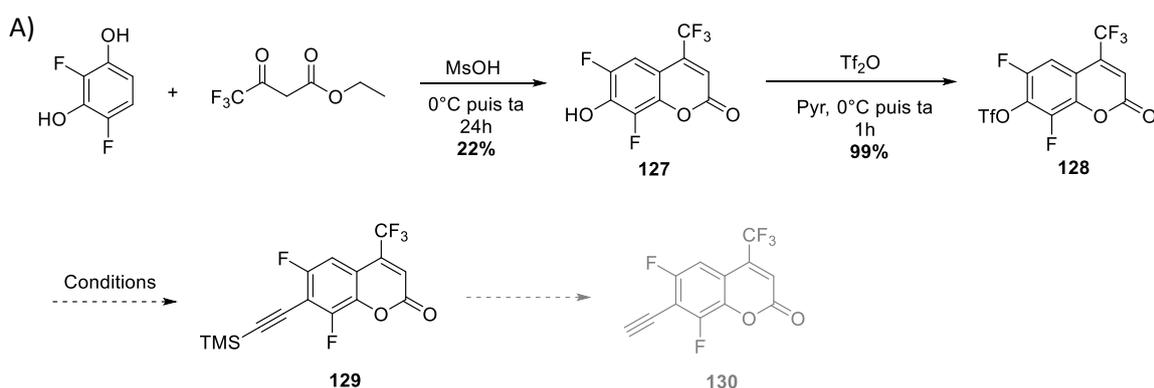
En conclusion de cette étude, nous avons opté pour la préparation de la version 6,8-difluorée de la 4-trifluorométhylcoumarine **118**, cet analogue étant *a priori* synthétiquement plus accessible que ceux des autres coumarines présentées précédemment. Bien que son maximum d'absorption soit toujours situé dans le domaine proche du visible, un effet bathochrome d'environ 25 nm par rapport au composé **107** pourrait tout de même être observé, décalage non négligeable.

1.3. Vers la synthèse d'éthynylcoumarines photocommutables absorbant dans le domaine du visible

Après avoir démontré que de simples modifications du noyau coumarine pouvaient conduire à un déplacement bathochrome de l'absorbance des éthers de thiovinyle, nous avons cherché à synthétiser l'analogue 6,8-difluoré de la 4-trifluorométhylcoumarine **118** afin d'obtenir un ligand éther de thiovinyle photocommutable dont les absorbances des deux isomères se rapprocheraient du visible.

1.3.1. Vers la synthèse de la 7-éthynyltrifluorométhylcoumarine 6,8-difluorée

La synthèse de la version 6,8-difluorée du fragment **118** a été entreprise à partir des études présentées précédemment (Schéma 62). Dans un premier temps, une condensation de Pechmann est réalisée entre le difluororésorcinol et le trifluoroacétoacétate d'éthyle de façon à obtenir la coumarine 7-hydroxy **127** avec un très faible rendement de 22%. Par la suite, le triflate du phénol est formé dans le but d'effectuer un couplage de Sonogashira. Cependant, quelles que soient les conditions utilisées pour la réaction de Sonogashira (présence ou non de solvant ou de CuI, variation de température, nombres d'équivalents d'alcyne, type de catalyseur au palladium), le triflate est dégradé, celui-ci étant particulièrement déstabilisé par les effets électroattracteurs des atomes de fluor en position 6 et 8 conjugués à la présence du groupement CF₃. De ce fait, il n'a pas été possible de parvenir au fragment coumarine **130** imaginé de cette façon.



B)

Pd	CuI	Solvant	Base	Alcyne (eq.)	Température	Temps
PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (10 mol%)	10 mol%	DMF	Et ₃ N (13eq.)	10	ta	24h
PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (10 mol%)	10 mol%	x	Et ₃ N (65eq.)	10	ta	24h
PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (10 mol%)	10 mol%	x	Et ₃ N (65eq.)	2	90°C	5h
PdG ₂ XPhos (10 mol%)	x	THF	Et ₃ N (13eq.)	10	65°C	2h30

Schéma 62 : A) Voie de synthèse imaginée en vue de l'obtention de la 7-éthynyl-4-trifluorométhylcoumarine 6,8-difluorée **130**, B) Conditions de couplage de Sonogashira entreprises

Une post-fonctionnalisation de l'éthynylcoumarine protégée **105** a été testée en présence du réactif de Togni II de façon à insérer un groupement trifluorométhyle en position 3 (Schéma 63)¹²⁰. A noter que dans cette approche, l'incorporation du substituant trifluorométhyle aurait lieu en position 3 et non 4, mais qu'elle conduirait également à un déplacement bathochrome de l'absorbance. Malheureusement, le groupement TMS n'a pas résisté à ces conditions oxydantes et les analyses par spectroscopie RMN ¹H et ¹⁹F ne présentent pas de spectres aux multiplicités attendues. La réaction n'a donc pas fonctionné.

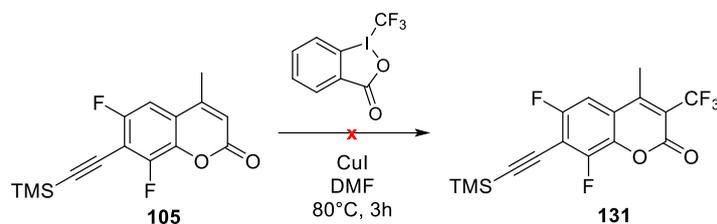


Schéma 63 : Test de trifluorométhylation en présence du réactif de Togni II

1.3.2. Vers la synthèse de la 7-éthynylcoumarine 6,8-difluorée substituée par un ester

Par la suite, nous avons cherché à synthétiser un fragment 7-éthynyl-4-méthylcoumarine difluoré portant une fonction ester en position 3, l'analogue 7-hydroxyle rapportée par l'équipe de Sun permettant d'obtenir un décalage bathochrome de l'absorbance de 45 nm (Schéma 64)¹²¹. Ainsi, une

¹²⁰ Z. Fang, Y. Ning, P. Mi, P. Liao, X. Bi, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1522–1525.

¹²¹ W.-C. Sun, K. R. Gee, R. P. Haugland, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, *8*, 3107–3110.

condensation de Pechmann est donc entreprise en présence de 2-acétylmalonate de diéthyle pour parvenir à la forme 7-hydroxy de la coumarine. Or, en conditions acides, l'un des esters s'est hydrolysé, ce qui a généré la libération de dioxyde de carbone et formé l'acétoacétate d'éthyle. Le composé **103** est ainsi réobtenu.

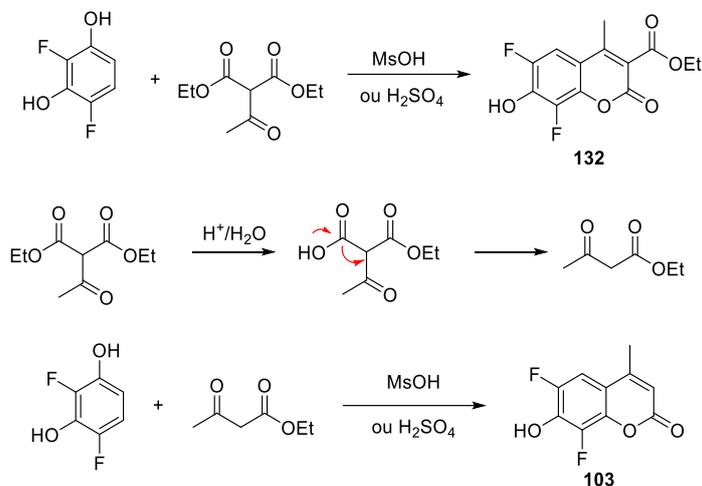


Schéma 64 : Test de synthèse d'un fragment 7-éthynyl-4-méthylcoumarine difluoré portant une fonction ester en position 3 et réaction subsidiaire obtenue

Afin de construire le squelette coumarinique d'une autre manière, une réaction tandem condensation de Knoevenagel/cyclisation est envisagée. Tout d'abord, la formylation du difluororesorcinol est réalisée par la réaction de Duff conduisant au composé **133** avec un rendement acceptable de 53% (Schéma 65). La réaction de condensation de Knoevenagel entre l'aldéhyde **133** et le malonate de diéthyle a conduit à la coumarine ester **134** avec un faible rendement de 26%¹²². L'hydroxyle est une fois de plus triflé dans le but d'effectuer de nouveau un couplage de Sonogashira. Or, les mêmes problèmes de dégradation du triflate sont rencontrés.

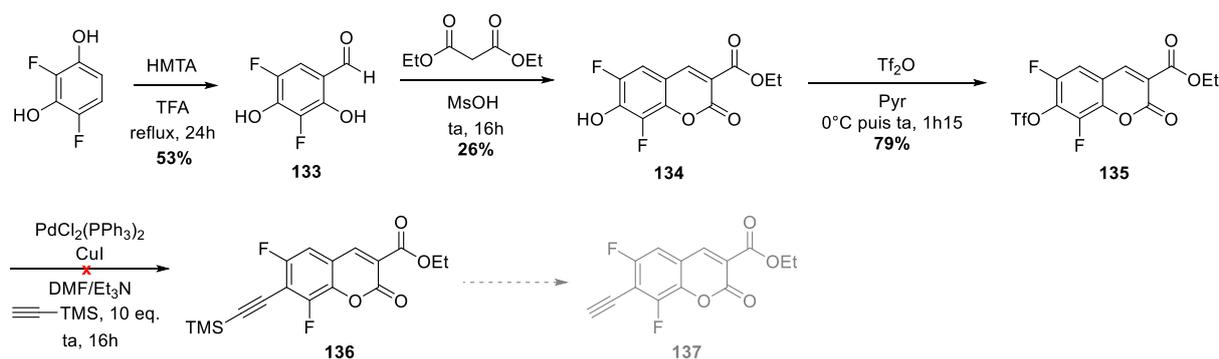
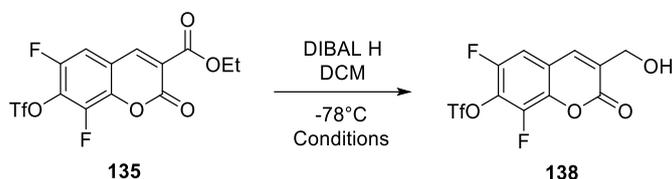


Schéma 65 : Nouvelle voie de synthèse pour parvenir à la 7-éthynylcoumarine difluorée portant une fonction ester en position 3

¹²² J. Kerkovius, F. Menard, *Synthesis* **2016**, *48*, 1622–1629.

Les groupements électroattracteurs déstabilisant le triflate, nous avons tenté de réduire l'ester en alcool (Schéma 66). Ainsi, le couplage de Sonogashira pourrait être facilité dans ces conditions et une réoxydation de l'alcool serait entreprise par la suite. Cependant, les différents tests visant à réduire l'ester se sont avérés être très mitigés, un mélange d'aldéhyde, d'alcool et autres impuretés ayant été obtenus.



DIBAL H	Temps de réaction	Traitement	Résultat
1 eq	1h	Eau + DCM	6:1 alcool/aldéhyde + impuretés
2 eq	1h	HCl + AcOEt	Dégradation
2 eq	2h	Eau + AcOEt	4:1 alcool/aldéhyde + impuretés

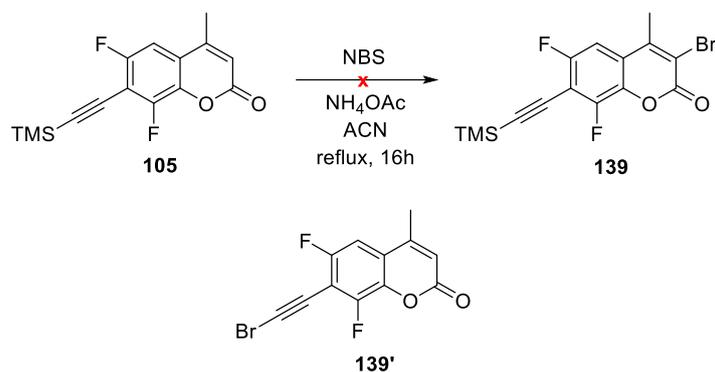
Schéma 66 : Conditions de réduction de l'ester en présence de DIBAL H

1.3.3. Bromation en position 3 de la l'éthynylcoumarine protégée 105

Une dernière stratégie de post-fonctionnalisation du fragment **105** a été entreprise. Elle repose sur une première étape de la bromation de la position 3 de la coumarine difluorée permettant potentiellement d'insérer de nouvelles fonctions électroattractrices ou d'étendre le système π conjugué par des couplages organométalliques (ex. Heck). Des conditions douces en présence de l'agent bromant N-bromosuccinimide (NBS) ont été choisies, celles-ci ne semblant pas interférer avec les fonctions présentes sur le réactif coumarine (Schéma 67)¹²³. Malheureusement, dans notre cas, les analyses par spectroscopie RMN ¹H et ¹⁹F montrent l'absence du pic associé au groupement TMS ou de l'alcyne terminal, et la présence du pic associé au proton éthylénique. Une bromation de l'alcyne semble donc avoir eu lieu¹²⁴.

¹²³ J. Chaud, C. Morville, F. Bolze, D. Garnier, S. Chassaing, G. Blond, A. Specht, *Org. Lett.* **2021**, *23*, 7580–7585.

¹²⁴ C. Sabot, D. Bérard, S. Canesi, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4629–4632.

Schéma 67 : Test de bromation en position 3 du fragment **105** et produit **139'** finalement obtenu

Compte tenu des difficultés rencontrées pour préparer un dérivé photoisomérisable de coumarines difluorées, nous avons décidé de nous écarter des coumarines et de nous orienter vers la synthèse d'un dérivé tétrafluoroxanthène.

1.3.4. Vers la synthèse d'un dérivé tétrafluoroxanthène

Les xanthènes sont des composés tricycliques constitués d'un pyrane conjugué à deux cycles benzéniques (Figure 40). Les dérivés du xanthène forment une classe importante de fluorophores pouvant émettre de 500 à 600 nm tels que les rhodamines, les fluorescéines ou les éosines. Ceux-ci sont connus pour leurs excellents coefficients d'extinction molaire et rendements quantiques de fluorescence, tout comme leur bonne photostabilité¹²⁵.

Ces fluorophores ont particulièrement attiré notre attention car leurs voies de synthèse proviennent également du résorcinol. De plus, la 6-hydroxy-9-méthyl-3*H*-xanthèn-3-one absorbe dans le visible, avec un $\lambda_{\text{Abs max}}$ proche de 450 nm¹²⁶. La synthèse de difluoroéthynylcoumarines photoisomérisables dont l'absorbance est décalée vers le rouge étant particulièrement complexe, nous nous sommes alors proposés d'effectuer une dernière étude avec la synthèse de la 2,4,5,7-tétrafluoro-6-hydroxy-9-méthyl-3*H*-xanthèn-3-one (Figure 40). Cette dernière, une fois synthétisée, pourrait potentiellement être transformée sous la forme alcyne à l'image de la stratégie utilisée avec les coumarines.

¹²⁵ S. Kamino, M. Uchiyama, *Org. Biomol. Chem.* **2023**, *21*, 2458–2471.

¹²⁶ M. Gangopadhyay, R. Mengji, A. Paul, Y. Venkatesh, V. Vangala, A. Jana, N. D. P. Singh, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 9109–9112.

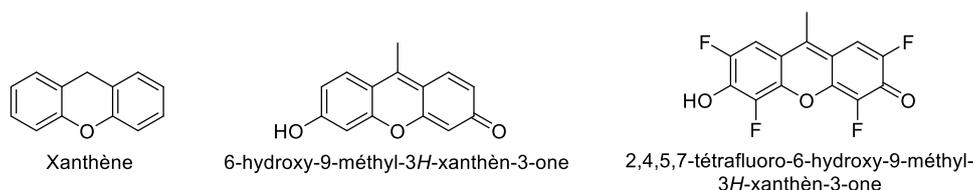


Figure 40 : Structure du xanthène et des analogues d'intérêt

Avant de nous intéresser à sa synthèse, nous avons tout d'abord souhaité savoir si l'éther de thiovinyle obtenu à partir de la xanthénone tétrafluorée conduirait à des diastéréoisomères *Z* et *E* aux propriétés optiques suffisamment distinctes pour pouvoir contrôler la photoisomérisation. Pour cela, les deux formes *Z* et *E* envisagées ont été soumises à des calculs théoriques réalisés par le Dr. Vincent Tognetti de l'équipe Analyse et Modélisation du laboratoire dans le but de déterminer les maxima d'absorbance théoriques des deux isomères (Figure 41). Grâce à ces travaux, nous avons pu observer que les maxima d'absorption des deux isomères étaient décalés d'environ 20 nm, ce qui semble favorable quant à l'observation d'un phénomène de photoisomérisation réversible. Il est également à noter que le coefficient d'extinction molaire semble plus important pour l'isomère *E* que l'isomère *Z* si l'on considère l'intensité d'absorption de chaque diastéréoisomère générée par ces calculs.

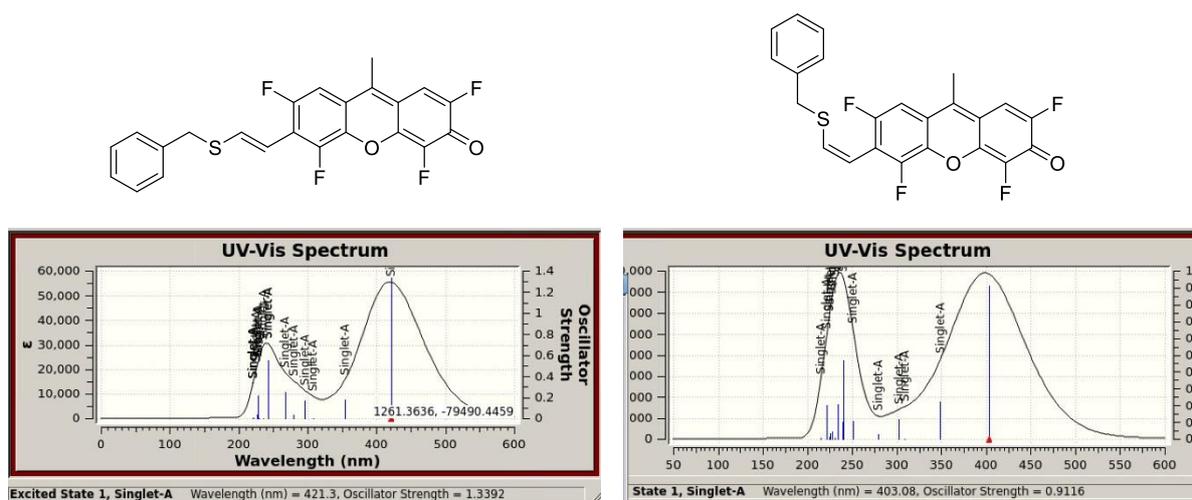


Figure 41 : Spectres d'absorption simulés des deux isomères résultant de la réaction de thiol-yne entre un fragment de type tétrafluoroxanthénone et le mercaptotoluène

La synthèse du motif 2,4,5,7-tétrafluoro-6-hydroxy-9-méthyl-3H-xanthèn-3-one a donc été entreprise en présence de difluororésorcinol dans des conditions acides décrites dans la littérature pour l'obtention de l'analogue non fluoré (Schéma 68)¹²⁵. Malheureusement, aucune réaction n'est observée dès la première étape et seul le réactif est obtenu.

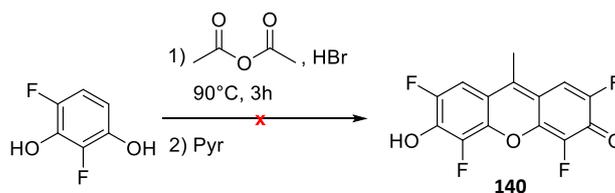


Schéma 68 : Synthèse du xanthène **140** imaginée à partir de la littérature¹²⁵

Par manque de temps, nous n'avons malheureusement pas pu tester de nouvelles conditions permettant de parvenir à ce composé.

2. Conclusion

La photoisomérisation est une propriété particulièrement attrayante. En effet, l'insertion d'un ligand présentant cette qualité dans un système permet d'accéder à des modifications structurales réversibles régies par simple irradiation lumineuse. Notamment, cela pourrait même gouverner l'activité d'une biomolécule.

En revanche, pour que cette propriété soit utilisée à des fins biologiques, des critères stricts doivent être respectés, notamment la nécessité d'utiliser des longueurs d'onde dans le domaine du visible pour la photoisomérisation bidirectionnelle.

Le système photocommutable développé dans le chapitre précédent nécessitait l'usage de la lumière UV pour parvenir à la photoisomérisation $Z \rightarrow E$. Nous avons donc essayé de modifier la structure du motif éthynylcoumarine de façon à décaler vers le rouge son maximum d'absorption, celle-ci étant à l'origine de la bande irradiée. Malheureusement, la présence des atomes de fluor en position *ortho* de l'éther de thiovinyle modifie drastiquement la réactivité du fragment, rendant difficile la génération des molécules imaginées dans ce but. Par ailleurs, peu d'exemples associés au squelette 6,8-difluorocoumarine sont rapportés dans la littérature, ce qui complique l'amélioration du système. De nouvelles voies de synthèse sont donc à envisager dans le but de parvenir aux fragments imaginés ou à des analogues, comme par exemple substituer le triflate par un halogène (iode, brome) pour réaliser l'étape clé de couplage de Sonogashira.

Enfin, les travaux effectués en collaboration avec le Dr. Isabelle Toubia montrent la possibilité de marquer des dérivés de biothiols de type NAC ou GSH par réaction de thiol-yne avec des éthynylcoumarines aux absorptions décalées vers le rouge, dans des conditions réactionnelles photocatalytiques douces.

Chapitre 4 : Développement d'une réaction photoactivable en KTGS

Le nombre de réactions développées en KTGS augmente au fur et à mesure du temps, ce qui montre le potentiel de cette technique en vue d'accéder à la découverte de nouvelles cibles ou molécules thérapeutiques (Figure 42). Cependant, ce nombre demeure encore trop faible suite aux critères exigeants de biocompatibilité à respecter et aux contraintes cinétiques auxquelles doivent répondre ces réactions.

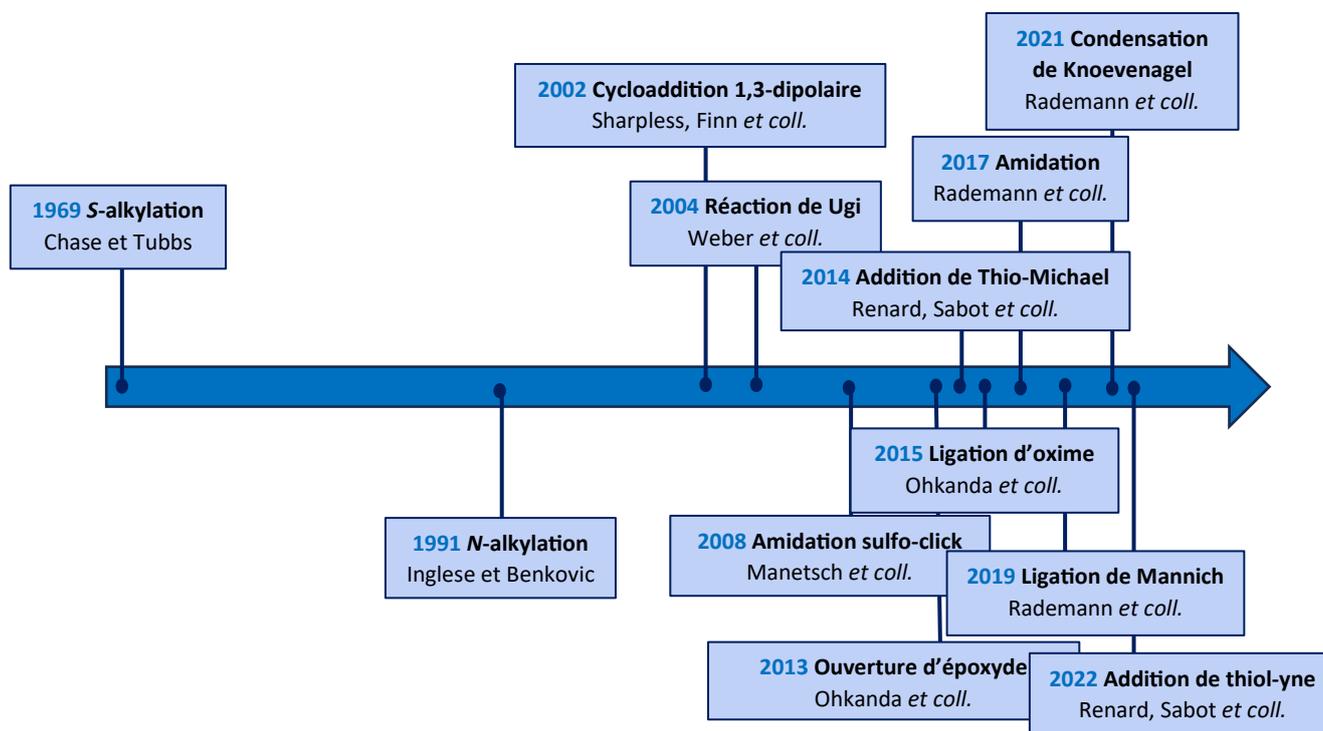


Figure 42 : Chronologie des premiers exemples de ligations décrites en KTGS (Figure extraite et modifiée de la revue^{28c})

En effet, il est difficile d'accéder à la fenêtre de réactivité idéale en vue d'obtenir une réaction KTGS, la constante de vitesse devant se situer entre 10^{-2} et $10^{-4} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ comme nous l'avons observé précédemment. Ceci limite aussi drastiquement le nombre de réactions disponibles. En effet, des temps d'incubation trop élevés nécessaires avec des réactions aux cinétiques trop lentes peuvent conduire à la précipitation voire à la dégradation de la cible biologique, conduisant ainsi à des faux négatifs. A l'inverse, des réactions trop rapides conduiraient potentiellement à des faux positifs, c'est-à-dire à la formation du ligand à l'extérieur de la biomolécule, sans l'assistance de cette dernière.

Afin de répondre à cette problématique, l'utilisation de réactions photochimiques peut être envisagée. En effet, après sélection par la biomolécule des différents couples de ligands susceptibles

de se lier simultanément voire en synergie sur la biomolécule, une irradiation lumineuse permettrait d'activer la formation d'une fonction réactive sur l'un des deux fragments et ainsi conduire à la ligation attendue si la fonction réactive a un temps de demi-vie et une réactivité tous deux adaptés. De ce fait, leur utilisation permettrait à la fois un contrôle spatiotemporel de l'activation de cette fonction et une accélération drastique de la synthèse du ligand attendu, les réactions utilisées dans ce contexte pouvant présenter des cinétiques bien supérieures à $10^{-2} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. En effet, si les réactivités sont adaptées, le fragment photoréactif présent à l'extérieur de la protéine devrait être rapidement neutralisé par les molécules d'eau environnantes sans interagir avec le second fragment, évitant ainsi l'obtention de faux positifs.

Dans la partie introductive de ce chapitre, une description des différentes fonctions photochimiques rapportées dans la littérature sera effectuée et nous expliciterons notre choix pour l'une d'entre elles. Par la suite, nous déterminerons le partenaire nucléophile le plus adapté à cette fonction dans le cadre d'une réaction KTGS. La fonction photoréactive nécessitant une irradiation lumineuse pour être activée, des études préliminaires seront établies de façon à nous assurer que ces conditions ne soient pas délétères pour la cible biologique utilisée, à savoir la *bCA-II*, enzyme maintenant bien appréhendée au laboratoire. Par la suite, des manipulations de contrôle seront effectuées de façon à valider le caractère KTGS de la réaction et de mieux comprendre sa réactivité. La concentration en ligand obtenu en présence et en l'absence de la biomolécule sera optimisée de façon à ce que le ratio entre ces deux valeurs soit le plus élevé possible. Le ligand obtenu par KTGS présentant un centre stéréogène, nous regarderons si la présence de la *bCA-II* favorise l'obtention de l'un ou l'autre des deux énantiomères. Enfin, nous tenterons de les synthétiser par une approche énantiosélective afin d'étudier leur activité et leur affinité respectives envers la cible.

1. Choix du partenaire photoactivable

1.1. Les fonctions photoréactives

1.1.1. Le diazo

Le diazo est une fonction reconnue comme particulièrement polyvalente en chimie organique. En effet, depuis la première découverte du diazoacétate d'éthyle par Curtius en 1883¹²⁷, cette fonction peut être utilisée dans les réactions de cyclopropanation, des réactions d'insertion de type C-H ou X-H,

¹²⁷ T. Curtius, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1883**, 16, 2230–2231.

le réarrangement de Wolff ou encore l'addition du carbène intermédiaire sur le doublet non liant d'un hétéroatome pour former un ylure. De plus, ceux-ci peuvent être insérés au sein de la structure d'un produit par une réaction de cycloaddition [3+2] (Schéma 69)¹²⁸.

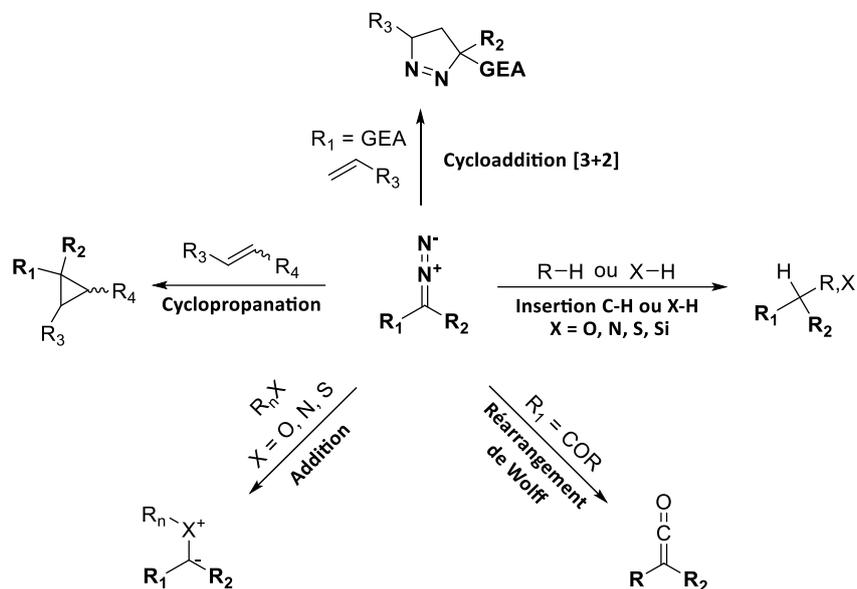


Schéma 69 : Réactivité des diazo (Schéma extrait et modifié de l'article¹²⁸)

La plupart de ces réactions impliquant le diazo comme précurseur du carbène, trois méthodes peuvent être utilisées pour générer cette espèce réactive¹²⁹ :

- Par activation thermique, méthode la plus ancienne. Cependant, celle-ci n'est que très peu utilisée du fait des conditions drastiques employées ;
- Par catalyse en présence de métaux de transition donnant accès aux métallocarbènes. Cette méthode développée par Casanova¹³⁰ permet de travailler dans des conditions plus douces, mais les catalyseurs (Rh, Au, Pd, Ru, Ag) sont souvent chers et nocifs pour l'environnement ;
- Par activation photochimique, méthode développée par Meerwein en 1942¹³¹. Celle-ci permet par irradiation UV ($\lambda_{\text{Abs max}} \approx 300 \text{ nm}$) d'accéder au carbène correspondant.

Dans cette dernière méthode, l'état de spin du composé diazo impacte beaucoup sa réactivité (Schéma 70). En général, la photoexcitation d'un composé diazo génère un carbène à l'état singulet. Dans ce cas, deux électrons non liants au spin antiparallèle occupent une orbitale hybridée, laissant une orbitale p vide. De ce fait, l'espèce peut être directement impliquée en tant qu'électrophile ou nucléophile dans des insertions C-H ou X-H ou dans l'addition stéréospécifique d'alcènes. A l'état

¹²⁸ Ł. W. Ciszewski, K. Rybicka-Jasińska, D. Gryko, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 432–448.

¹²⁹ J. Durka, J. Turkowska, D. Gryko, *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2021**, *9*, 8895–8918.

¹³⁰ R. Casanova, T. Reichstein, *Helvetica Chimica Acta* **1950**, *33*, 417–422.

¹³¹ H. Meerwein, H. Rathjen, H. Werner, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1942**, *75*, 1610–1622.

singulet, un croisement intersystème (CIS) peut aussi avoir lieu, ce qui génère l'état triplet dans lequel deux électrons non liants au spin parallèle sont distribués dans deux orbitales différentes. On considère donc cette espèce comme un diradical pouvant être impliqué dans l'abstraction d'atomes d'hydrogène, dans des additions non stéréospécifiques sur des alcènes ou même dans une réaction avec l'oxygène moléculaire triplet présent dans l'air qui désactive l'espèce par formation de la cétone correspondante.

De plus, les composés diazo peuvent réagir avant leur dédiazonisation, formant des produits très similaires à ceux obtenus par la chimie du carbène¹³². En effet, l'irradiation de ceux-ci peut également générer des espèces excitées de diazo qui peuvent être *quenchées* par les espèces environnantes dans le système réactionnel (par exemple, le réarrangement de Wolff peut provenir du carbène ou par réarrangement-dédiazonisation concertés). De plus, ceux-ci sont très sensibles à la protonation ou aux attaques nucléophiles.

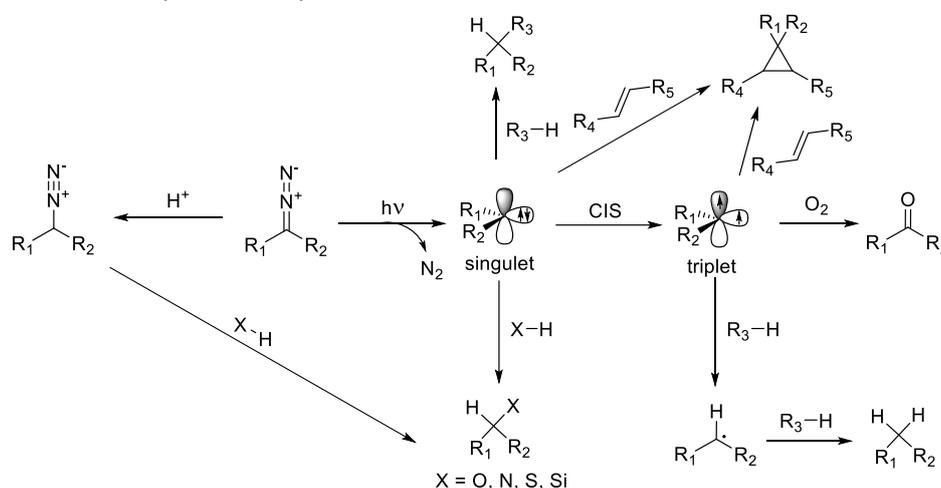


Schéma 70 : Réactivité du diazo par activation photochimique

1.1.2. L'azoture d'aryle

Les azotures d'aryle sont une famille de composés introduite en tant que fonction photoréactive après les composés diazo. Leur décomposition génère majoritairement un goudron polymérique¹³³. Cependant, l'équipe de Huisgen découvre qu'une activation thermique de l'azoture d'aryle en présence d'aniline génère le départ d'azote moléculaire, formant ainsi un intermédiaire C_6H_5N , dont la structure n'est pas encore élucidée, puis l'azépine **141**¹³⁴ (Schéma 71). Plus tard, Doering et Odum démontrent que cette famille de composés est également obtenue par irradiation lumineuse

¹³² N. Candeias, C. Afonso, *Current Organic Chemistry* **2009**, *13*, 763–787.

¹³³ E. W. Meijer, S. Nijhuis, F. C. B. M. Von Vroonhoven, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7209–7210.

¹³⁴ a) R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1955**, *67*, 756; b) R. Huisgen, D. Vossius, M. Appl, *Chem. Ber.* **1958**, *91*, 1–12; c) R. Huisgen, M. Appl, *Chem. Ber.* **1958**, *91*, 12–31.

dans la diéthylamine en passant également par l'intermédiaire $C_6H_5N^{135}$. Les structures imaginées pour le « C_6H_5N » ont été le nitrene singulet **142**, le nitrene triplet **143**, la benzazirine **144** ou la cétèneimine **145**¹³⁶.

Finalement, il a été démontré que la photolyse UV ($\lambda_{Abs\ max} \approx 250\ nm$) de l'azoture d'aryle conduisait tout d'abord au nitrene de phényle singulet **142** ainsi qu'à la libération d'azote moléculaire. Le nitrene peut réagir directement avec des nucléophiles environnants ou par réaction d'insertion C-H. En revanche, du fait de son temps de demi-vie particulièrement court, il peut être également soumis à des réarrangements et donner la cétèneimine **145** puis l'azépine **141** en passant par la forme intermédiaire benzazirine **144**. Autrement, le composé **142** peut être relaxé par CIS à l'état triplet **143**. Le nitrene triplet dimérise assez facilement et forme le composé **Azobenzène**, ou réagit également avec l'oxygène moléculaire, ce qui rend la molécule inactive dans les deux cas¹³⁷.

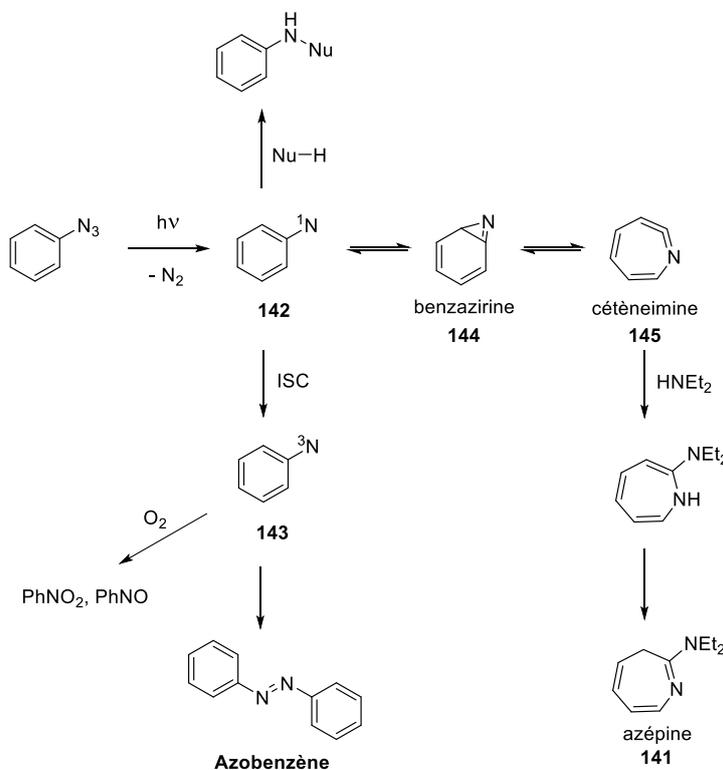


Schéma 71 : Comportement photochimique des azotures d'aryle (schéma extrait et modifié de l'article¹³⁶)

¹³⁵ W. von E. Doering, R. A. Odum, *Tetrahedron* **1966**, 22, 81–93.

¹³⁶ N. P. Gritsan, M. S. Platz, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3844–3867.

¹³⁷ N. Gritsan, M. Platz, in *Organic Azides*, John Wiley & Sons, Ltd, **2009**, pp. 311–372.

1.1.3. La benzophénone

La benzophénone est une fonction développée à la fin du XX^e siècle et est à ce jour l'un des photophores les plus utilisés en chimie organique et bioorganique ou en science des matériaux du fait de ses propriétés photochimiques particulières et de sa robustesse dans différentes conditions chimiques. En effet, sa longueur d'onde d'activation se situe aux environs de 360 nm, longueur d'onde moins néfaste aux milieux biologiques. De plus, elle a une faible réactivité dans l'eau et se voit particulièrement stable à la lumière ambiante¹³⁸.

Par irradiation lumineuse, un diradical est formé par le passage d'un électron dans l'orbitale inoccupée de plus basse énergie π^* du carbonyle (Figure 43). Deux transitions sont possibles, à savoir une transition de haute énergie $\pi \rightarrow \pi^*$ ($\lambda_{\text{Abs max}} = 270 \text{ nm}$) ou une transition de plus basse énergie $n \rightarrow \pi^*$ ($\lambda_{\text{Abs max}} = 360 \text{ nm}$). Dans le cas général, l'irradiation à 360 nm cause la transition $n \rightarrow \pi^*$ et génère l'état singulet S1. Par la suite, un CIS particulièrement rapide se produit avec l'état triplet T2 ($\pi \rightarrow \pi^*$) énergétiquement proche, pour ensuite passer à un état triplet T1 ($n \rightarrow \pi^*$) d'énergie plus faible. Ce triplet est le plus réactif des états excités de la benzophénone. C'est donc celui-ci qui réagira avec les molécules environnantes.

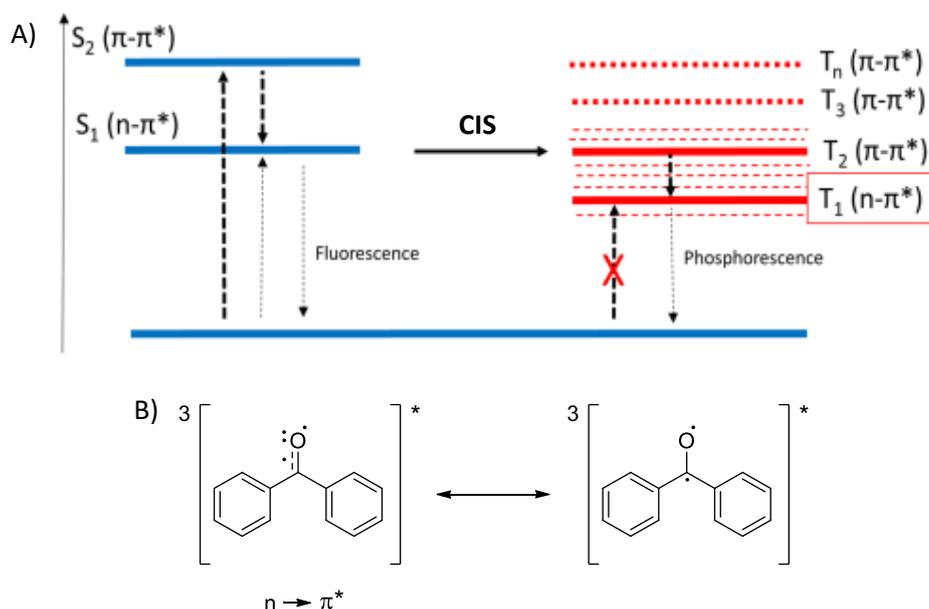


Figure 43 : A) Diagramme de Jablonski des états excités de la benzophénone (figure extraite et modifiée de la revue¹³⁸, B) Structure correspondant à l'état triplet T1 ($n \rightarrow \pi^*$)

La relaxation de l'état triplet T1 ($n \rightarrow \pi^*$) peut se faire de différentes façons, à savoir par réaction de photoinitiation, mais surtout par abstraction d'un hydrogène permettant une insertion de type C-H ou l'addition sur des doubles liaisons de type C-C, menant dans ce dernier cas à la formation d'un

¹³⁸ G. Dormán, H. Nakamura, A. Pulsipher, G. D. Prestwich, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 15284–15398.

oxétane par la réaction de Paterno-Büchi (Schéma 72). Si le diradical ne se trouve pas suffisamment proche d'un partenaire de réaction, celui-ci va réagir avec l'eau et former un hydrate, lui-même régénérant la benzophénone. De ce fait, son irradiation prolongée en milieu aqueux permet parfois d'augmenter les chances de réaction avec un partenaire environnant, la réaction de la benzophénone avec l'eau étant de ce fait dégénérée.

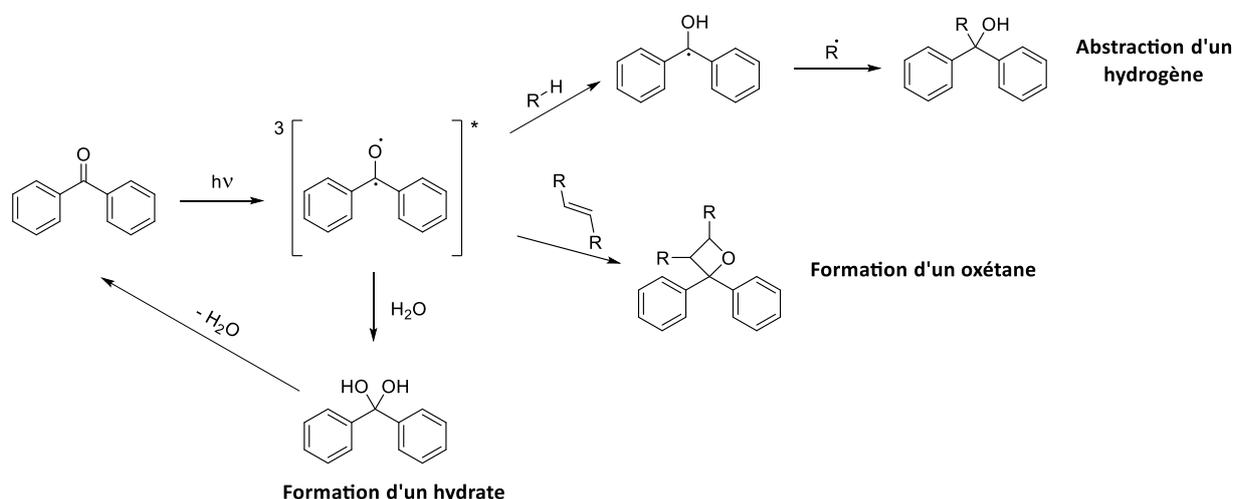


Schéma 72 : Réactions photochimiques de la benzophénone à l'état triplet T1 ($n \rightarrow \pi^*$)

1.1.4. La diazirine

La diazirine greffée sur un cycle aromatique ou une chaîne aliphatique est une fonction photoréactive décrite à la même période que la benzophénone¹³⁹. Il s'agit d'une petite fonction ayant une longueur d'onde maximale d'absorption située aux alentours de 350 nm. De la même façon que la benzophénone, cela permet donc de pouvoir l'utiliser en milieu biologique en minimisant la dégradation des biomolécules présentes qui absorbent dans le domaine de l'UV.

Par irradiation lumineuse de la diazirine, une molécule de diazote est libérée et le carbène singulet est généré (Schéma 73, A). Cet état a un temps de vie particulièrement court ($t_{1/2} \approx 1$ ns) et réagit très rapidement en tant qu'électrophile ou nucléophile avec les molécules environnantes¹⁴⁰. Même si la réactivité de cette fonction est difficilement contrôlable du fait de son instabilité, une insertion de type O-H donnera de meilleurs rendements qu'une insertion C-H.

¹³⁹ a) S. R. Paulsen, *Angewandte Chemie* **1960**, 72, 781–782 ; E. Schmitz and R. Ohme, *Angew. Chem.*, **1961**, 73, 115.

¹⁴⁰ P. P. Geurink, L. M. Prely, G. A. van der Marel, R. Bischoff, H. S. Overkleeft, in *Activity-Based Protein Profiling* (Ed.: S.A. Sieber), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2011**, pp. 85–113.

L'état singulet peut aussi être relaxé à l'état triplet par CIS qui réagira alors comme un diradical. De ce fait, l'abstraction d'un hydrogène d'une liaison C-H formera un radical qui pourra réagir avec le carbone radical obtenu et générer une insertion C-H, ou abstraira un second hydrogène ce qui génèrera le produit de réduction. L'état triplet peut aussi, de la même façon que le nitrène, réagir avec l'oxygène moléculaire et former la cétone correspondante. En général, les diazirines dont les positions *alpha* sont polysubstituées seront préférées car les carbènes obtenus par irradiation des 3,3-dialkyl-3H-diazirines sont sensibles à la formation d'une oléfine par déplacement d'hydrogène 1,2 (Schéma 73, B).

De façon compétitive, au moins 30% de la diazirine est également convertie en son isomère diazo décrit précédemment. Celui-ci est également capable de générer un carbène. Or, sa conversion est plus lente. De ce fait, le composé diazo a tendance à être hydrolysé ou à réagir de façon non spécifique avant toute photoactivation. De ce fait, l'équipe de Brunner a très vite trouvé une solution au problème en insérant un groupement trifluorométhyle en position *alpha* de la diazirine¹⁴¹. L'effet électroattracteur de cette fonction va stabiliser le diazo généré, ce qui le rendra résistant à tout type de réaction non induite par irradiation. Ce sont particulièrement les diazirines greffées sur des cycles aromatiques qui subiront cette modification car des études ont montré qu'elles génèrent plus de carbènes et moins de dérivé diazo que les diazirines aliphatiques (Schéma 73, C)¹⁴².

Enfin, les diazirines sont stables dans de nombreuses conditions réactionnelles telles que des conditions acides, basiques, oxydantes ou réductrices.

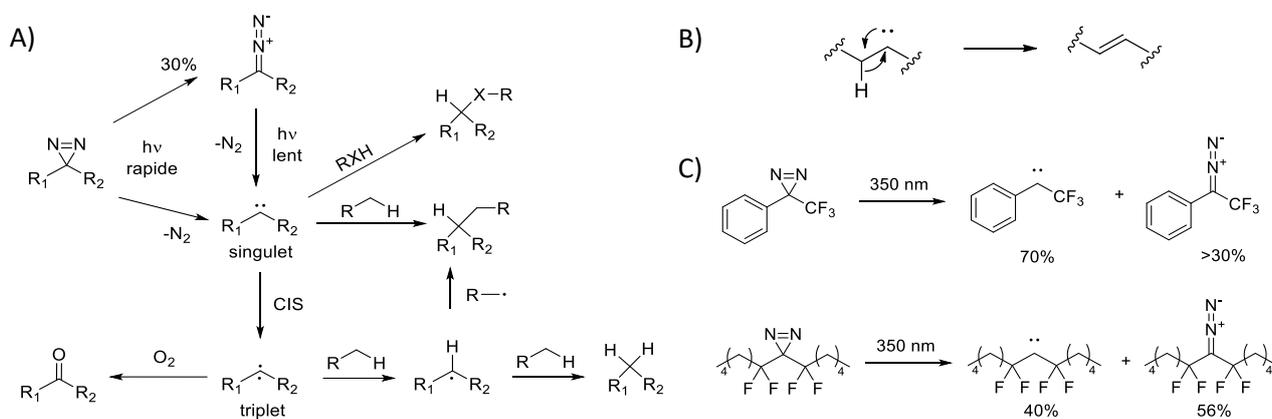


Schéma 73 : A) Réactions possibles des intermédiaires formés par la diazirine après irradiation, B) Formation d'une oléfine dans le cas d'une diazirine non substituée, C) Répartition carbène/diazo (%) en fonction de la nature de la diazirine par stabilisation

¹⁴¹ J. Brunner, H. Senn, F. M. Richards, *Journal of Biological Chemistry* **1980**, 255, 3313–3318.

¹⁴² a) B. Erni, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 3888–3896 ; b) R. Bonneau, M. T. H. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7229–7230.

1.2. Choix de la fonction photoréactive

Dans le cadre du développement d'une nouvelle ligation KTGS, la fonction photoréactive doit répondre à différents critères. Dans un premier temps, cette fonction doit être accessible et son activation doit être biocompatible. De ce fait, plus la longueur d'onde nécessaire à l'excitation de la molécule est éloignée du maximum d'absorption des biomolécules (environ 250 nm), moins celle-ci leur sera néfaste. De plus, cette fonction doit être capable de réagir rapidement avec son fragment complémentaire une fois activée. Cela nous permettrait d'éviter au maximum la formation de sous-produits mais surtout d'empêcher le photomarquage de la cible avec laquelle nous travaillons. Enfin, afin de réduire l'obtention de faux positifs, la désactivation de la fonction photoréactive par réaction avec le solvant utilisé, à savoir l'eau, est également un point crucial.

Si l'on considère l'ensemble des fonctions photoréactives développées précédemment, la diazine semble se démarquer des autres (Tableau 5). En effet, elle est de petite taille, absorbe aux alentours de 350 nm et a un temps de demi-vie très court, ce qui lui permet donc de réagir très rapidement avec les molécules environnantes. Cette fonction présente néanmoins des inconvénients. En effet, elle génère plus de 30% de diazo après avoir été irradiée. De ce fait, nous choisirons de travailler avec les diazirines aromatiques afin de limiter au maximum cette isomérisation, et nous les substituerons avec un groupement trifluorométhyle de façon à stabiliser le diazo généré par irradiation et empêcher les réactions subsidiaires associées. Cette fonction est donc particulièrement stable dans les conditions chimiques les plus communes¹⁴³.

¹⁴³ S.-S. Ge, B. Chen, Y.-Y. Wu, Q.-S. Long, Y.-L. Zhao, P.-Y. Wang, S. Yang, *RSC Adv.* **2018**, *8*, 29428–29454.

Fonctions photoréactives	$\lambda_{\text{Abs max}}$	Espèce générée ($t_{1/2}$)	Accessibilité	Réactivité
Diazo	300 nm	Carbène (10 ns)	Simple, peu commercialisé	Activation lente Diazo : Protonation, substitution nucléophile Carbène singulet : - Insertion X-H - Insertion C-H - Cyclopropanation Carbène triplet : - Génération du produit de réduction - Formation de cétone
Azoture d'aryle	< 280 nm	Nitrène (0,1 ns)	Simple, commercialisé	Activation rapide Nitrène singulet : - Insertion Nu-H - Isomérisations Nitrène triplet : - Dimérisation - Formation de cétone
Benzophénone	360 nm	Diradical (100 ns)	Simple, commercialisée	Activation lente Insertion C-H Réaction de Paterno-Büchi Faible réactivité dans l'eau
Diazirine	360 nm	Carbène (1-10 ns)	Complexe, peu commercialisée	Diazo (>30%) : Protonation, substitution nucléophile Activation rapide Carbène singulet : - Insertion X-H - Insertion C-H - Cyclopropanation Carbène triplet : - Génération du produit de réduction - Formation de cétone

Tableau 5 : Caractéristiques des fonctions photoréactives (rouge : inconvénients, vert : avantages, orange : correct)

La synthèse de la diazirine aromatique trifluorométhylée est vue comme assez délicate car elle s'obtient en un nombre d'étapes plus important que les autres fonctions photoréactives (Schéma 74). En effet, à partir d'une fonction cétone, sa synthèse s'effectue généralement en quatre étapes. Dans un premier temps, une oxime intermédiaire est générée puis activée en sulfonamide de façon à obtenir un bon groupe partant pour y additionner l'ammoniac et former la diaziridine correspondante. Ensuite, cette fonction est oxydée et la diazirine associée est obtenue. La source d'ammoniac la plus souvent utilisée est l'ammoniac liquide, réactif particulièrement délicat à utiliser du fait de la basse température requise pour son utilisation (-33 °C). Pour s'en affranchir, notre équipe en collaboration avec celle du Dr. Reboul (LCMT, UMR 6507 CNRS, Caen) a développé une méthode *one-pot* de synthèse de diazirines aromatiques ou aliphatiques en utilisant une solution d'ammoniac (7N dans le méthanol) et un agent d'oxydation (hypochlorite de *tert*butyle ou diacétate de iodobenzène)¹⁴⁴. Toutefois, cette approche s'est montrée non fructueuse pour la synthèse de dérivés 3-phényl-3-trifluorométhyl-diazirines. Par ailleurs, l'équipe de Reboul a également montré l'accès aux diazirines à partir d'acides aminés¹⁴⁵ via une réaction d'oxydation décarboxylante réalisée en présence de diacétate de iodobenzène dans une solution d'ammoniac (7N dans le méthanol).

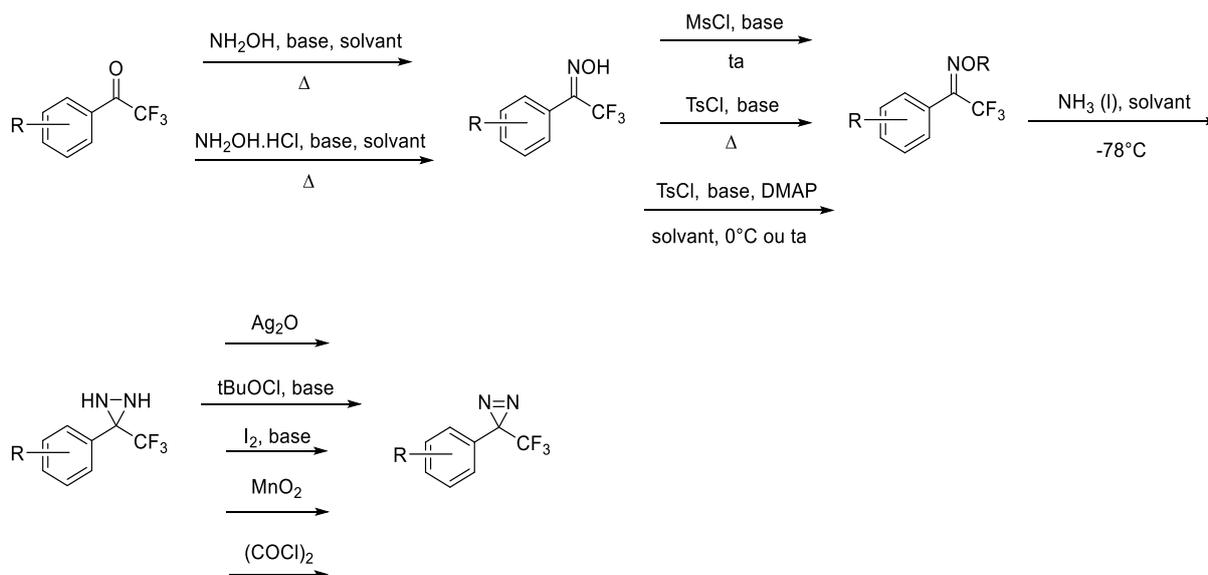


Schéma 74 : Conditions classiques de la synthèse de la trifluorométhylphényldiazirine¹⁴³

¹⁴⁴ Q. Ibert, M. Cauwel, T. Glachet, T. Tite, P. Le Nahenec-Martel, J. Lohier, P. Renard, X. Franck, V. Reboul, C. Sabot, *Adv. Synth. Catal.* **2021**, 363, 4390–4398.

¹⁴⁵ T. Glachet, H. Marzag, N. Saraiva Rosa, J. F. P. Colell, G. Zhang, W. S. Warren, X. Franck, T. Theis, V. Reboul, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141, 13689–13696.

2. Détermination des conditions optimales pour utiliser les diazirines en KTGS

2.1. Etude des fragments diazirines

2.1.1. Détermination des fragments diazirine d'intérêt

Après avoir choisi la trifluorométhylphényldiazirine comme partenaire photoréactif en vue d'une future utilisation en KTGS, nous souhaitons faire en sorte que la ligation obtenue en KTGS soit le fruit d'une réaction entre le carbène singulet et son partenaire nucléophile, le carbène triplet conduisant très souvent à la formation de produits indésirables. De plus, l'insertion C-H sera à éviter de façon à empêcher de quelconques photomarquages sur la CA, cela pouvant impacter son activité lors de la mise en œuvre de la réaction KTGS. Pour cela, les substituants présents sur le noyau aromatique de la phényldiazirine seront méticuleusement choisis, ceux-ci pouvant avoir un réel impact à cet effet.

En 2011, Song et Sheridan étudient les *meta*-méthoxy et *para*-méthoxyphényltrifluorométhyl diazirines et démontrent que le carbène *para*-méthoxy avait pour état fondamental la forme singulet du fait de sa stabilisation par résonance (à 7K dans une matrice d'azote liquide) (Schéma 75)¹⁴⁶. En effet, la donation π du doublet non liant du méthoxy abaisse le niveau d'énergie du singulet. En revanche, cela n'est pas possible lorsque la fonctionnalisation est en *meta*. De ce fait, l'état fondamental du carbène associé reste l'état triplet.

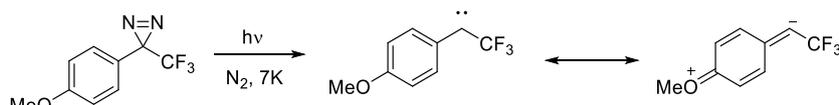


Schéma 75 : Stabilisation de la forme singulet de la diazirine par résonance causée par la substitution de la position *para* par un groupement méthoxy (mésomère donneur)

Peu de temps après, Raimer et Lindel confirment que l'activation de cette diazirine mène bien à la formation du carbène singulet désiré dans le but d'effectuer des réactions d'insertion C-H ou O-H avec différents phénols¹⁴⁷. En revanche, ces réactions semblent d'abord procéder à la formation d'un cation benzylique par protonation du singulet, réaction apparemment très rapide, dans le but de réagir par la suite avec le phénol par insertion O-H ou alkylation de Friedel Craft.

¹⁴⁶ M.-G. Song, R. S. Sheridan, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19688–19690.

¹⁴⁷ B. Raimer, T. Lindel, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 6551–6555.

A la suite de ces résultats, un travail très complet sur l'impact des substituants de la phényldiazirine sur la stabilisation de son état singulet a été effectué par Wulff et ses collaborateurs¹⁴⁸. Pour cela, les auteurs ont choisi des substituants variés en position *para* selon les paramètres d'Hammett, paramètres à valeur positive si les substituants augmentent le caractère acide de l'acide benzoïque par effets inductif et mésomère, et inversement si la valeur est négative¹⁴⁹. Ils démontrent ensuite par calculs théoriques que l'incorporation de groupes à caractère π donneur permettent de stabiliser l'orbitale p vide du carbène singulet. De ce fait, l'énergie libre d'activation de la diazirine sera plus faible dans ce cas (Figure 44, A). De la même façon, l'énergie de l'état triplet, quant à elle, reste assez constante dans ces mêmes variations. De ce fait, l'état singulet devient le plus bas en énergie par ajout de groupements électrodonneurs en position *para* (Figure 44, B).

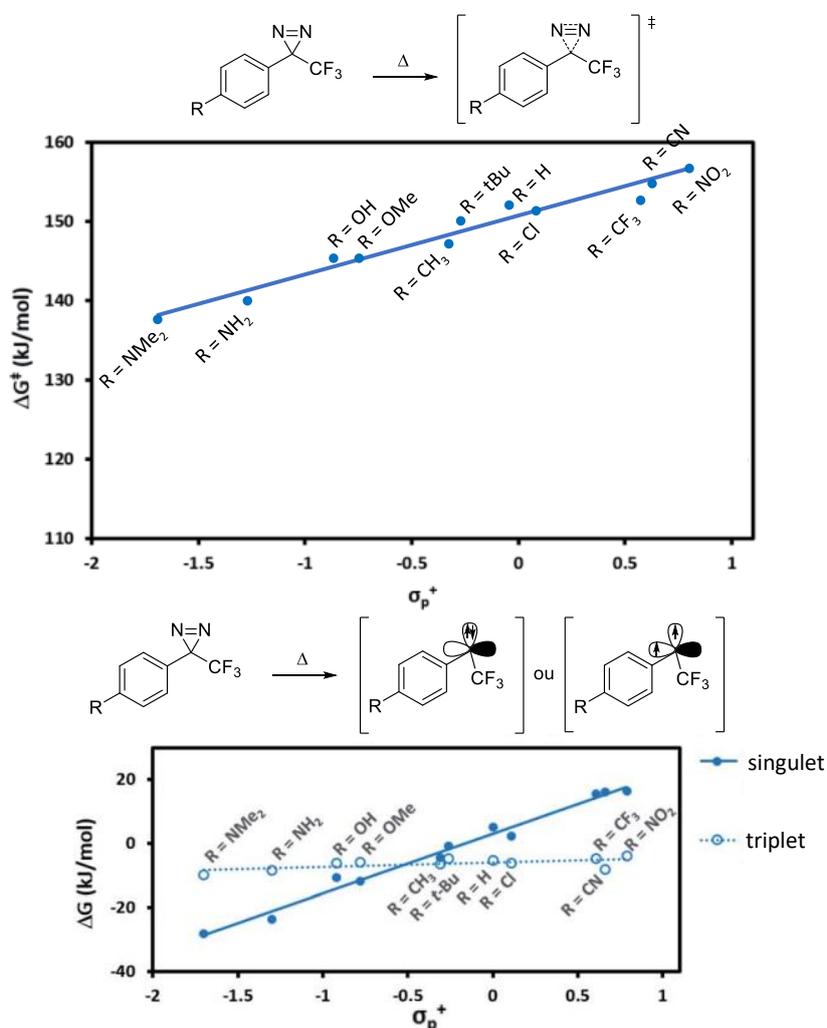


Figure 44 : A) Variation de l'énergie libre d'activation de la trifluorométhylphényldiazirine en fonction du paramètre de Hammett des substituants en *para*, B) Energies des états singulet/triplet en fonction du paramètre de Hammett des substituants en *para* (figure extraite et modifiée de l'article¹⁴⁸)

¹⁴⁸ S. F. Musolino, Z. Pei, L. Bi, G. A. DiLabio, J. E. Wulff, *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 12138–12148.

¹⁴⁹ L. P. Hammett, *J. Am. Chem. Soc.* **1937**, *59*, 96–103.

En revanche, la stabilisation de l'état singulet peut également favoriser la réaction d'insertion C-H, ce qui est d'ailleurs valorisé dans cette publication. Ainsi, un photomarquage de l'enzyme d'intérêt aura plus de chances d'être obtenu. De ce fait, il est nécessaire de trouver un juste milieu où l'état singulet est suffisamment stabilisé de façon à éviter les produits issus de réactions subsidiaires formées par le carbène triplet, mais dont l'énergie va permettre de générer moins d'insertion C-H pour un rendement d'insertion X-H plus important avec le partenaire nucléophile. Ainsi, différents substituants ont été choisis en fonction de leur paramètre de Hammett (Tableau 6) et des réactifs accessibles au laboratoire dans le but de synthétiser les diazirines associées.

Substituant	Paramètre de Hammett
<i>p</i> -CO ₂ tBu	0,45
<i>p</i> -CO ₂ H	0,45
<i>p</i> -Cl	0,23
<i>p</i> -Br	0,23
2-naphtyl	0,13
<i>p</i> -tBu	-0,26

Tableau 6 : Substituants choisis en vue de la synthèse des fragments diazirines et paramètre de Hammett associé¹⁵⁰

2.1.2. Synthèse des diazirines choisies

A partir des réactifs présents au laboratoire, une voie de synthèse générale des diazirines a été entreprise à partir du benzaldéhyde substitué ou de la cétone trifluorométhylée. Dans un premier temps, la trifluorométhylation du 2-naphtaldéhyde et du 4-bromobenzaldéhyde a été entreprise en présence du réactif de Ruppert-Prakash dans le but de parvenir à l'alcool associé (Schéma 76). Par la suite, celui-ci a été oxydé en présence du réactif périodinane Dess-Martin DMP pour parvenir à la cétone d'intérêt¹⁵¹.

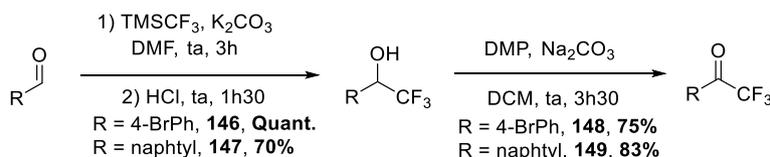


Schéma 76 : Synthèse de la cétone trifluorométhylée à partir de l'analogue aldéhyde

¹⁵⁰ Corwin. Hansch, A. Leo, R. W. Taft, *Chem. Rev.* **1991**, 91, 165–195.

¹⁵¹ T. He, C. Liang, S. Huang, *Chem. Sci.* **2023**, 14, 143–148.

Dans l'optique d'accéder à la phényldiazirine substituée en *para* par un acide ou un tert-butylester, l'acide 4-(trifluoroacétyl)benzoïque est utilisé comme réactif de départ et une estérification de Steglich est entreprise avec le *tert*-butanol¹⁵² de façon à protéger l'acide pour la suite de la voie de synthèse (Schéma 77).

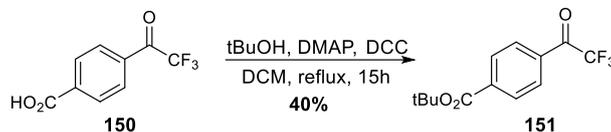


Schéma 77 : Estérification de Steglich sur l'acide 4-(trifluoroacétyl)benzoïque

Une fois l'ensemble des cétones préparées, la formation de l'oxime intermédiaire est mise en œuvre (Schéma 78). Par la suite, une tosylation est entreprise dans le but de générer un bon groupe partant nécessaire à l'addition d'ammoniac pour former la diazirine correspondante. Enfin, celle-ci est oxydée en présence de diode pour parvenir au motif diazirine attendu avec un rendement global allant de 12% à 56%.

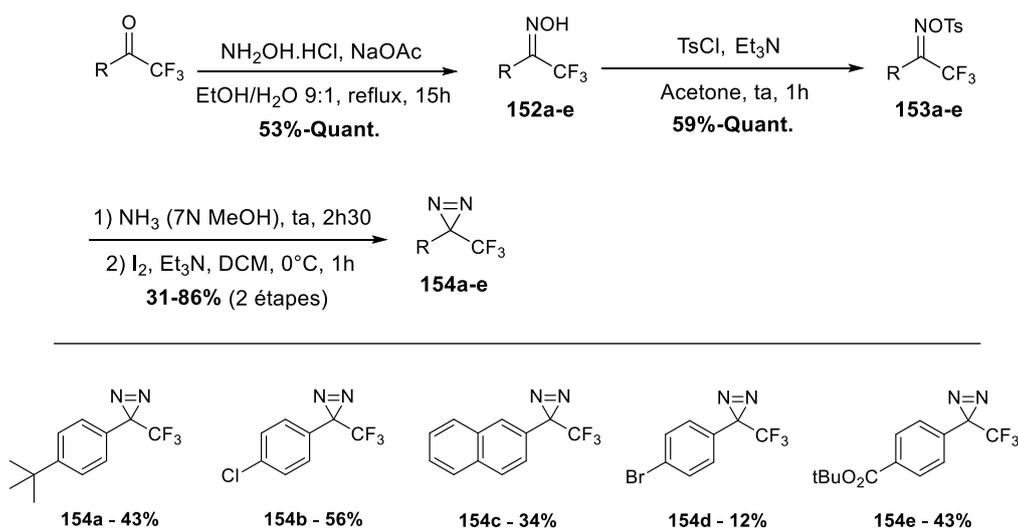


Schéma 78 : Voie de synthèse générale des trifluorométhylphényldiazirines et rendements globaux associés

Enfin, pour parvenir à l'analogue acide, une dernière étape de déprotection dans le TFA est nécessaire dans le but d'obtenir la diazirine **154f** (Schéma 79).

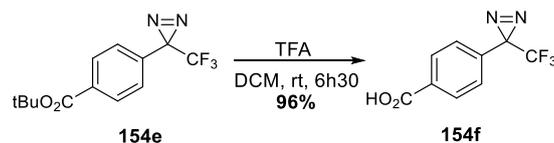


Schéma 79 : Déprotection de l'ester en présence de TFA

¹⁵² K. Sakurai, T. Yasui, S. Mizuno, *Asian Journal of Organic Chemistry* **2015**, 4, 724–728.

2.1.3. Synthèse de la trifluorométhylphényldiazirine portant la fonction sulfonamide

La KTGS ayant pour but d'être testée en présence de la CA, une diazirine portant la fonction sulfonamide a été imaginée, cette fonction étant connue pour chélater l'ion zincique présent au cœur du site actif de l'enzyme. De ce fait, la majorité des inhibiteurs connus de cette enzyme possèdent une telle fonction.

Dans le but de former la diazirine d'intérêt, nous avons tout d'abord souhaité parvenir à la cétone trifluorométhylée pour utiliser par la suite la voie de synthèse générale précédemment développée. De ce fait, nous avons testé l'oxydation de Kornblum à partir du bromobenzène sulfonamide **73** permettant d'accéder à l'aldéhyde correspondant en présence de DMSO (Schéma 80)¹⁵³. Cependant, un mélange d'aldéhyde et d'alcool (1:3) a été obtenu, qui peut s'expliquer par une substitution nucléophile potentielle de la base carbonatée sur le bromobenzyle suivie d'une réaction de décarboxylation. L'utilisation de la DIPEA, base peu nucléophile, a conduit à la formation d'un mélange complexe. Une autre voie de synthèse a alors été imaginée.

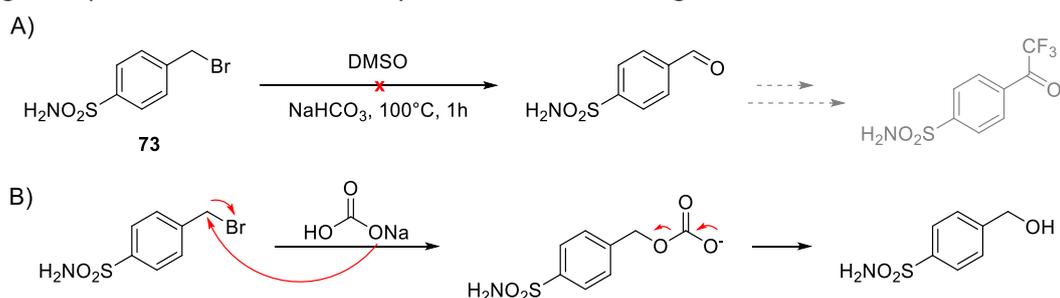


Schéma 80 : A) Oxydation de Kornblum du bromobenzène, B) Réaction subsidiaire potentielle générant l'alcool

Par la suite, la synthèse de la cétone trifluorométhylée a été testée à partir de l'analogue acide carboxylique par l'intermédiaire d'un arène électrodéficient pentafluoré, ici le pentafluorobenzonitrile (PFBN), ce dernier activant la fonction acide carboxylique de façon à générer la source de fluorure *in situ* nécessaire à l'activation du réactif de Ruppert-Prakash et donc à la réaction de trifluorométhylation (Schéma 81)¹⁵⁴. Malheureusement dans notre cas, seul le réactif de départ est obtenu, le caractère électroattracteur du sulfonamide étant peut-être trop important pour une activation efficace de l'acide.

¹⁵³ D. C. Ellinwood, M. F. El-Mansy, L. S. Plagmann, J. F. Stevens, C. S. Maier, A. F. Gombart, P. R. Blakemore, *J Label Compd Radiopharm* **2017**, *60*, 639–648.

¹⁵⁴ M. S. Said, N. S. Khonde, P. Kumar, J. M. Gajbhiye, *Org. Lett.* **2023**, *25*, 1094–1098.

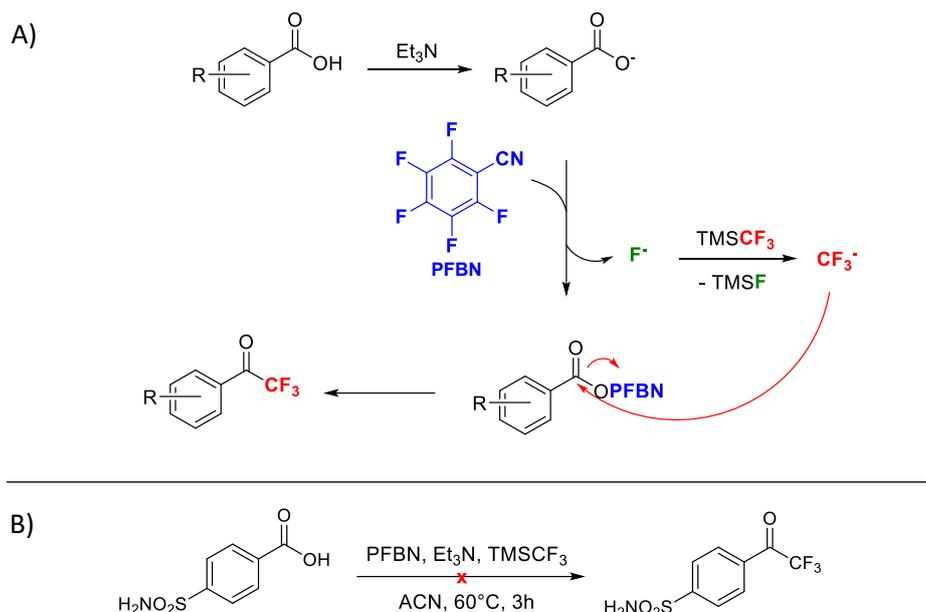


Schéma 81 : A) Trifluorométhylation d'un acide benzoïque par l'intermédiaire du PFBN (schéma extrait et modifié de l'article¹⁵⁴), B) Test en présence du 4-carboxybenzènesulfonamide

Après ces résultats non fructueux, une voie de synthèse plus classique a été imaginée pour parvenir à la cétone trifluorométhylée attendue, c'est-à-dire la synthèse de l'aldéhyde **157** par le biais de l'amide de Weinreb **156**. Pour cela, deux tests ont été effectués, à savoir la synthèse de l'amide *via* un chlorure d'acyle intermédiaire ou en présence d'un agent de couplage (ici, l'EDC.HCl), respectivement (Schéma 82). Le dernier test a donné l'amide de Weinreb avec un rendement de 67% contre 12% par l'intermédiaire chlorure d'acyle. De ce fait, cette voie a été privilégiée par la suite.

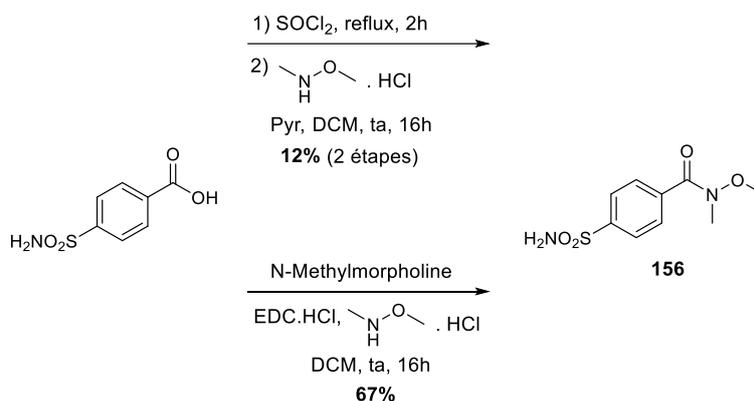


Schéma 82 : Voies de synthèse de l'amide de Weinreb **156**

Une fois l'amide de Weinreb obtenu, sa réduction a été entreprise en présence de DIBAL-H de façon à parvenir à l'aldéhyde **157** (Schéma 83). Puis, la réaction de trifluorométhylation de **157** a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. L'alcool **158** a potentiellement pu être obtenu car nous pouvons observer l'apparition d'un quadruplet à 5,16 ppm par analyse RMN ^1H correspondant au proton en *alpha* du groupement $-\text{CF}_3$ du produit attendu, mais des impuretés co-éluant avec celui-ci n'ont pas permis d'isoler le produit attendu propre, et ce quel que soit le système de purification testé. La déprotection du groupement silylé a également été testée en présence de carbonate de potassium mais les résultats sont encore moins bons. De ce fait, l'oxydation de cet alcool impur a tout de même été testée avec le réactif DMP, mais un mélange complexe et difficilement purifiable est formé, dans lequel il n'est pas aisé de confirmer la présence de la cétone attendue **159**.

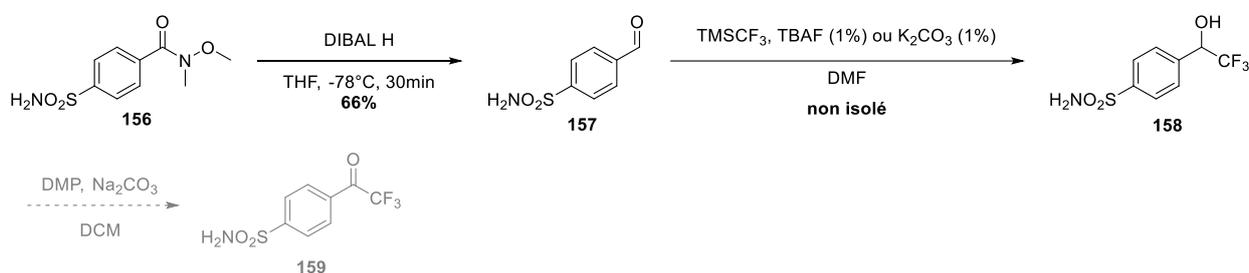


Schéma 83 : Voie de synthèse dans l'optique d'accéder à la cétone **159**

L'accès à cette diazirine s'avérant être particulièrement complexe, nos efforts se sont concentrés sur l'utilisation des diazirines **154a-f** précédemment obtenues dans le but de tester la nouvelle réaction en KTGS.

2.2. Tests préliminaires

2.2.1. Choix du meilleur partenaire nucléophile

La réaction de KTGS doit, pour avoir lieu de la façon imaginée, faire appel à un nucléophile capable de réagir avec le carbène formé par la phényldiazirine utilisée. Le photomarquage de la protéine et les réactions subsidiaires du carbène étant les principaux écueils à éviter dans cette stratégie, le nucléophile devra être particulièrement efficace et situé à proximité de la diazirine pour que la réaction se fasse de façon majoritaire.

Pour cela, trois hétéronucléophiles ont été choisis, à savoir l'octanethiol, le dodecylamine et l'octanol. Tous trois portent une chaîne aliphatique de longueur semblable de façon à ce qu'aucune fonction ne modifie leur réactivité et ainsi favorise l'un d'entre eux. L'amine primaire étant réputée

pour sa nucléophilie, il est à noter que celle-ci peut donner lieu à des réactions subsidiaires avec la trifluorométhylphényldiazirine¹⁵⁵. En effet, après l'insertion N-H, le départ de fluorure d'hydrogène HF peut avoir lieu par réarrangement et donner la forme énamine en équilibre avec l'imine. En environnement aqueux, l'hydrolyse de cette fonction donne la cétone associée (Schéma 84).

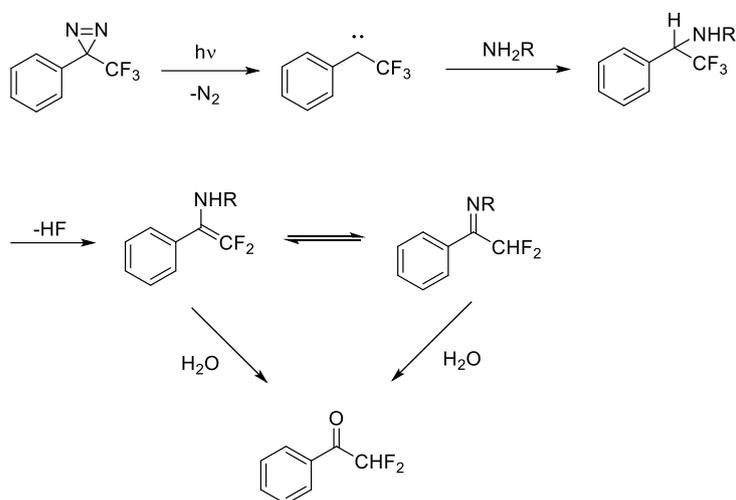


Schéma 84 : Réaction subsidiaire de la trifluorométhylphényldiazirine avec les amines primaires et secondaires (schéma extrait et modifié de la revue¹⁴⁰)

2.2.1.1. Synthèse des références réactionnelles entre la diazirine et le nucléophile respectif

Dans cette étude, les diazirines **154e** et **154f** ont été choisies comme modèles, leur réactivité faisant l'objet de questionnement du fait de leur substitution par un groupement électroattracteur particulièrement fort. La réaction d'irradiation a été suivie par analyse HPLC afin d'utiliser le moins de réactifs possibles et d'observer le nombre de produits formés après irradiation. Pour cela, il a été nécessaire de synthétiser en amont les références associées aux produits issus d'insertions O-H, N-H ou S-H afin d'effectuer une courbe de calibration pour quantifier le produit formé dans la réaction.

Pour cela, la cétone **151** a été utilisée comme réactif de départ, réactif commun à l'ensemble des synthèses des trois références. Elle a tout d'abord été réduite de façon à générer l'alcool **160** correspondant avec un rendement de 57% (Schéma 85, A). Par la suite, deux schémas réactionnels se divisent. Dans le but de parvenir au produit d'insertion O-H, l'alcool **160** a alors été soumis à une substitution nucléophile avec le 1-bromooctane de façon à donner l'éther **161** avec un rendement de 67%. En revanche, pour générer les produits issus d'insertion N-H ou S-H, l'activation de l'alcool en triflate correspondant a été nécessaire de façon à effectuer une substitution nucléophile avec le

¹⁵⁵ M. Platz, A. S. Admasu, S. Kwiatkowski, P. J. Crocker, N. Imai, D. S. Watt, *Bioconjugate Chem.* **1991**, 2, 337–341.

dodecylamine d'une part, conduisant au produit **163**, et avec l'octanethiol d'autre part, formant le produit **164** avec des rendements respectifs de 73 et 30%. Pour parvenir aux références provenant de la diazirine **154f** avec les différents nucléophiles, l'acide carboxylique des produits **161**, **163** et **164** est déprotégé dans le TFA pour parvenir aux produits **165a**, **165b** et **165c** respectivement (Schéma 85, B).

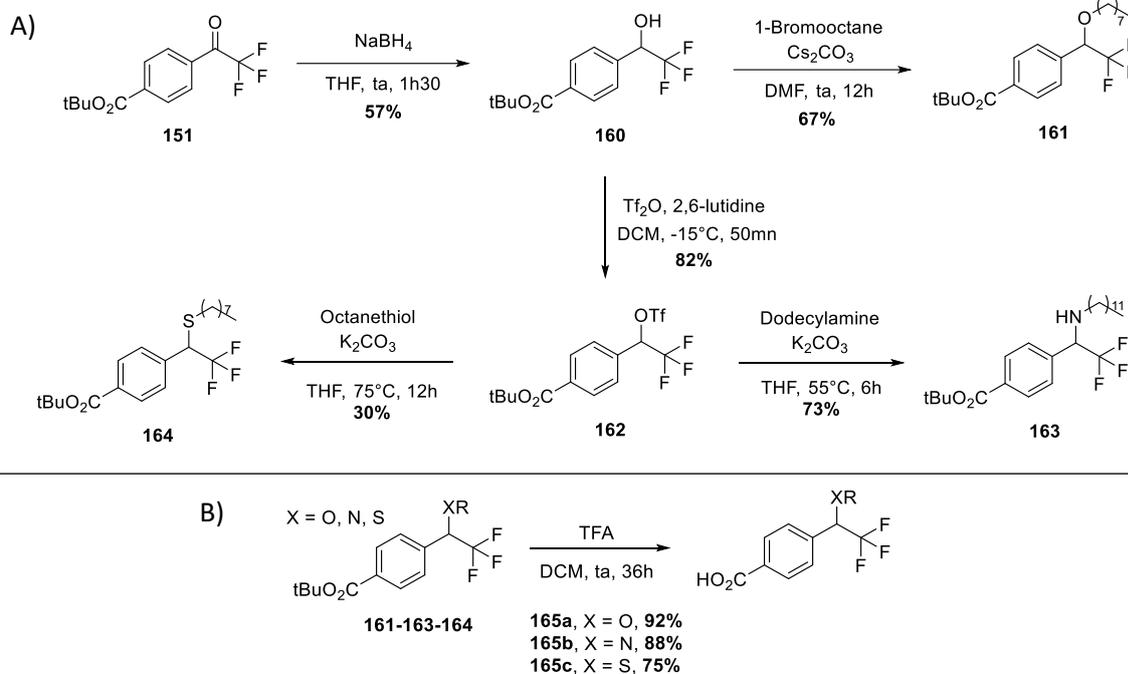


Schéma 85 : A) Voie de synthèse des références de la réaction entre la diazirine **154e** et différents nucléophiles, B) Synthèse des références de la réaction entre la diazirine **154f** et différents nucléophiles

2.2.1.2. Etude du meilleur nucléophile en présence de la diazirine 154e

Dans le but de déterminer le meilleur partenaire nucléophile pour la mise en œuvre de la réaction de KTGS, nous avons commencé l'étude avec la diazirine **154e**. Afin de déterminer la quantité de produit formé, nous avons décidé de travailler en présence d'un étalon interne, la 6-nitroquinoline, dont l'intensité de l'absorbance à 240 nm est relativement proche de celle des produits **161**, **163** et **165**. Pour cela, une courbe de calibration présentant le ratio des aires des pics HPLC à $\lambda_{\text{obs}} = 240$ nm ($A_{\text{référence}}/A_{6\text{-nitroquinoline}}$) en fonction des ratios de concentration réelle ($[\text{référence}]/[6\text{-nitroquinoline}]$) a été tracée pour chaque référence. Un exemple est présenté à la Figure 45 avec le partenaire thioéther **164**.

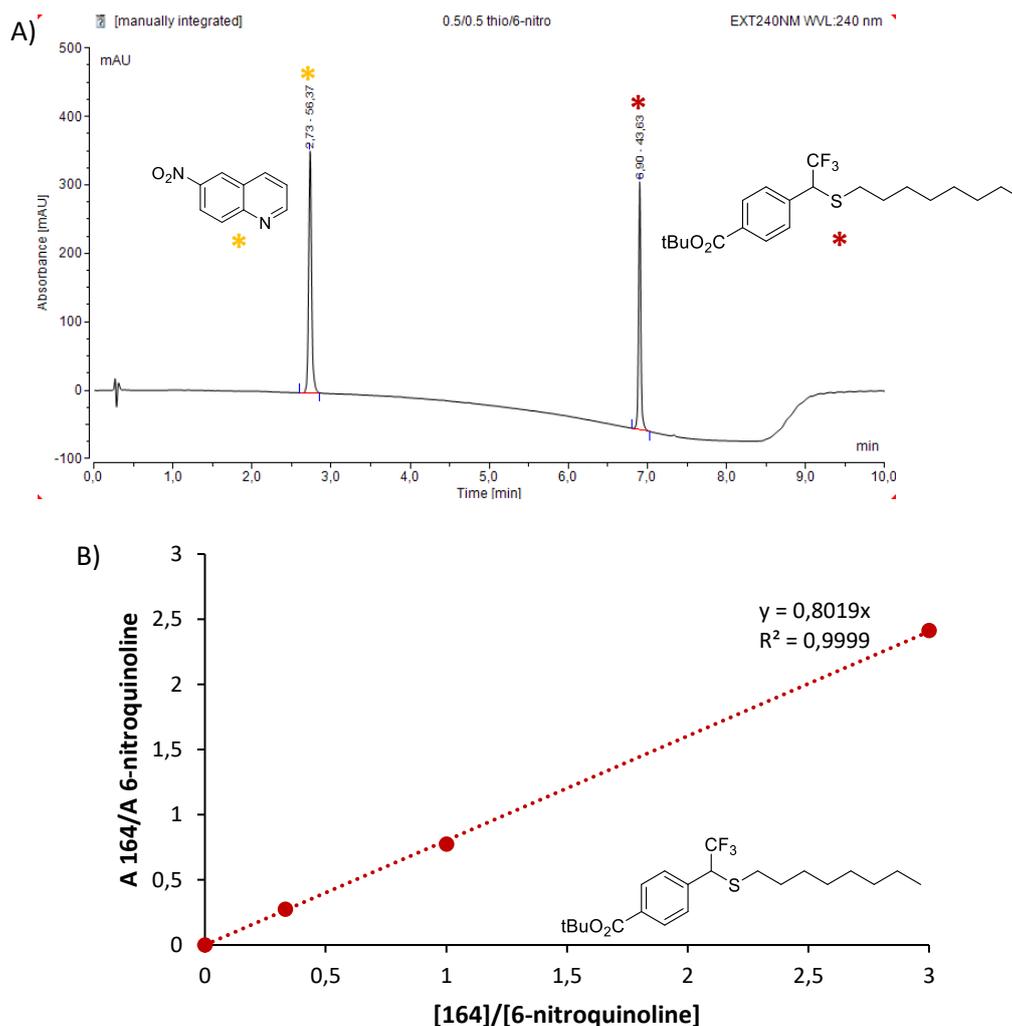
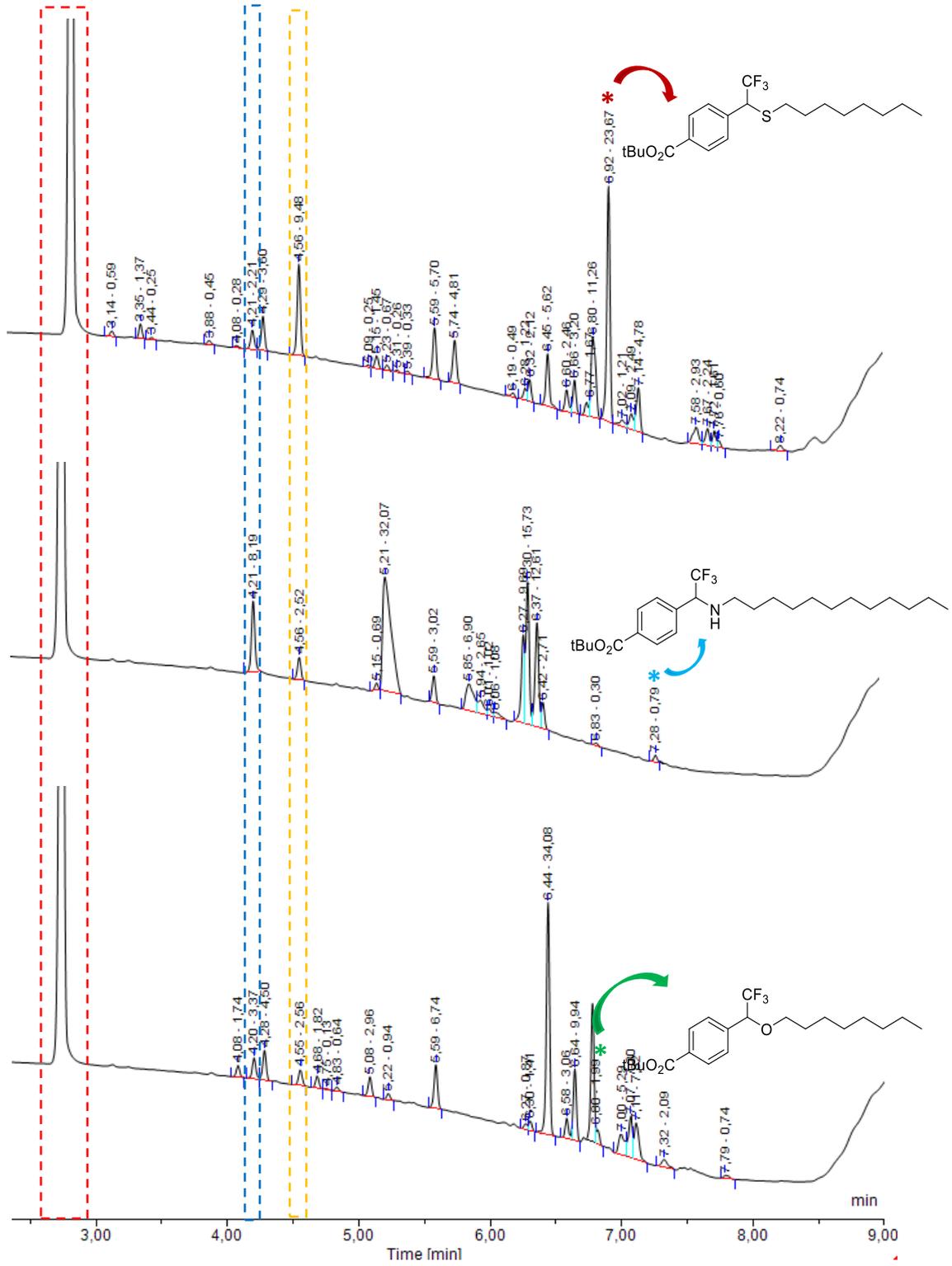


Figure 45 : Exemple de la référence **164**, A) Chromatogramme ($\lambda_{obs} = 240 \text{ nm}$) d'un mélange équimolaire de 6-nitroquinoline et du produit **164**, B) Courbe de calibration nécessaire à la détermination de la concentration du produit issu d'une insertion S-H

Ensuite, des solutions stock de chaque nucléophile, de la diazirine **154e** et de la 6-nitroquinoline sont préparées. Une solution d'un équivalent de diazirine pour dix équivalents du nucléophile étudié est ensuite préparée dans l'ACN ($C_f \text{ diazirine} = 0,04 \text{ M}$). Ensuite, le vial est irradié pendant cinq minutes avec agitation avec une lampe LED HepatoChem de 365 nm dans une PhotoRedOx BoxTM puis l'étalon interne est ensuite ajouté. La solution finale est analysée par HPLC ($\lambda_{obs} = 240 \text{ nm}$) et les résultats sont rassemblés dans la Figure 46. La présence d'adduit de l'eau et de la cétone **151** a pu être identifiée facilement, les produits ayant déjà été synthétisés au laboratoire.

A)



- Etalon interne
- Cétone 151
- Adduit de l'eau soit alcool 160

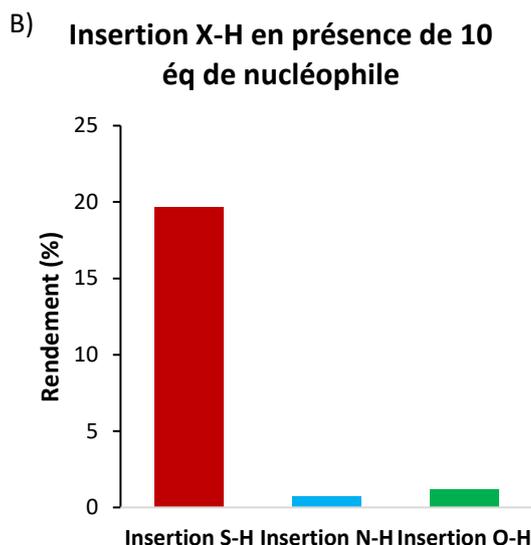
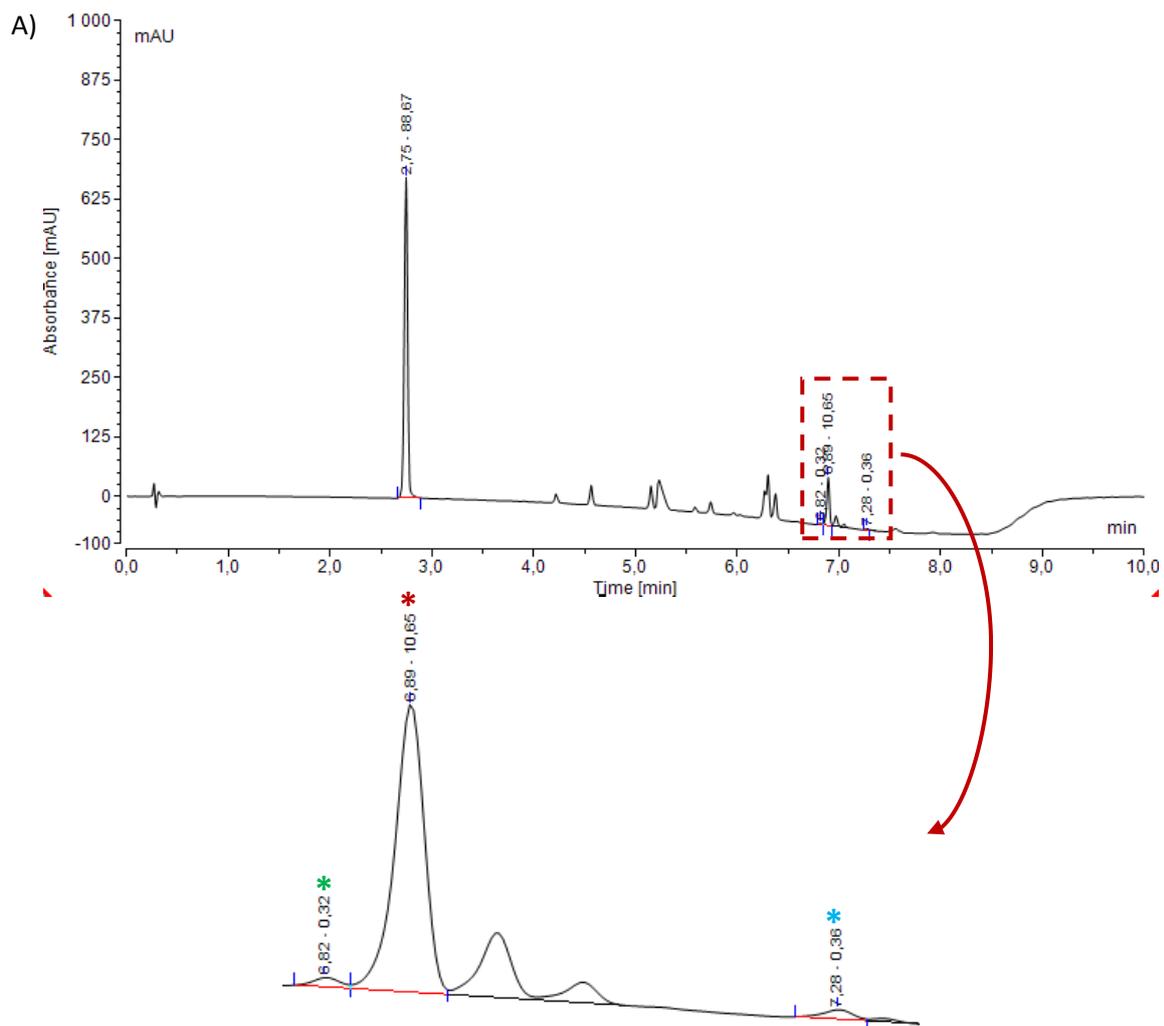


Figure 46 : A) Chromatogrammes ($\lambda_{obs} = 240 \text{ nm}$) de l'irradiation ($t = 5 \text{ min}$) de la diazirine **154e** ($C = 0,05 \text{ M}$ dans l'ACN) en présence de 10 éq de nucléophile, B) Insertion X-H résultant de la même expérience en comparaison avec l'étalon interne

Les résultats démontrent ici que l'insertion S-H se produit avec de meilleurs rendements finaux. En effet, plus de 20% de produit **164** sont formés contre environ 1% de produit **161** et **163**. De plus, la réaction en présence du thiol forme le produit **164** de façon majoritaire face aux autres produits présents dans le milieu. On remarque cependant la présence de la cétone **151** dans chaque mélange final, produit caractéristique de la réaction du carbène triplet avec l'oxygène moléculaire environnant. L'adduit d'eau est également obtenu, celui-ci provenant potentiellement de la présence de traces d'eau dans les réactifs utilisés ou dans le solvant.

Afin de confirmer que l'insertion S-H se fait majoritairement face aux autres, une réaction de compétition entre les trois nucléophiles a été réalisée. Dix équivalents d'octanethiol, de dodecylamine et d'octanol sont ajoutés dans le même vial en présence d'un équivalent de la diazirine dans l'ACN à la même concentration que précédemment. Le tout est ensuite irradié et traité de la même façon puis analysé par HPLC ($\lambda_{obs} = 240 \text{ nm}$). Les résultats sont mis en évidence dans la Figure 47.



B) **Compétition de 10 éq de chaque nucléophile et insertion associée**

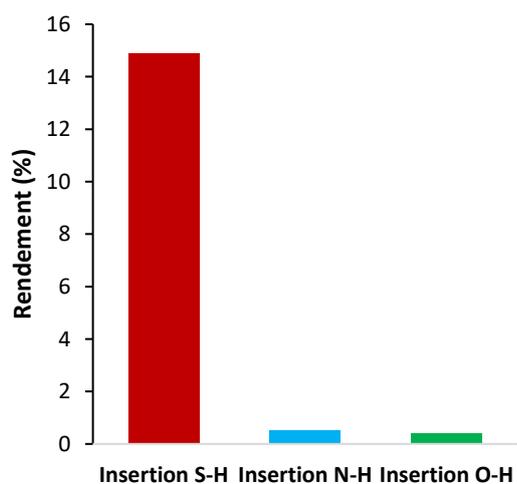


Figure 47 : A) Chromatogrammes ($\lambda_{obs} = 240 \text{ nm}$) de l'irradiation ($t = 5 \text{ min}$) de la diazirine **154e** ($C = 0,05 \text{ M}$ dans l'ACN) en présence de 10 éq de chaque nucléophile, B) Insertion X-H résultant de la même expérience en comparaison avec l'étalon interne

Avec 30 fois plus de produit issu d'insertion S-H que les autres, le thiol semble être le meilleur partenaire nucléophile pour la mise en place d'une nouvelle réaction KTGS photoactivable. Cependant, le produit formé par la réaction entre la diazirine **154e** et les nucléophiles n'étant pas ionisable, ces résultats ne peuvent pas être validés par spectrométrie de masse. De ce fait, l'utilisation de la diazirine **154f** comportant une fonction acide carboxylique *a priori* facilement ionisable en mode négatif, a été étudiée.

2.2.1.3. Etude du meilleur nucléophile en présence de la diazirine 154f par analyse LC-MS

Les travaux précédemment présentés concernant le meilleur nucléophile en présence de la diazirine **154e** ont mis en avant l'octanethiol, dont l'insertion S-H correspondante s'effectue 30 fois plus que les insertions O-H et N-H. Afin d'ajouter plus de poids à ces résultats, nous avons effectué la même étude avec la diazirine **154f** dont la présence d'un acide a permis de suivre les résultats par analyse LC-MS.

De la même façon que précédemment, une courbe de calibration a été effectuée avec pour même étalon interne la 6-nitroquinoline et pour $\lambda_{\text{obs}} = 230$ nm. Les mêmes études ont été entreprises et confirment par analyse MS que l'octanethiol est le meilleur nucléophile (Figure 48). En effet, lorsque chaque nucléophile est inséré séparément dans le milieu, l'insertion S-H est plus efficace avec un rendement de 22% face à 5% pour l'insertion N-H et 1% pour l'insertion O-H. Une fois ceux-ci mis en compétition, la même tendance est observée avec 26% de produit d'insertion S-H formé contre 1% pour l'insertion N-H et 2% pour l'insertion O-H.

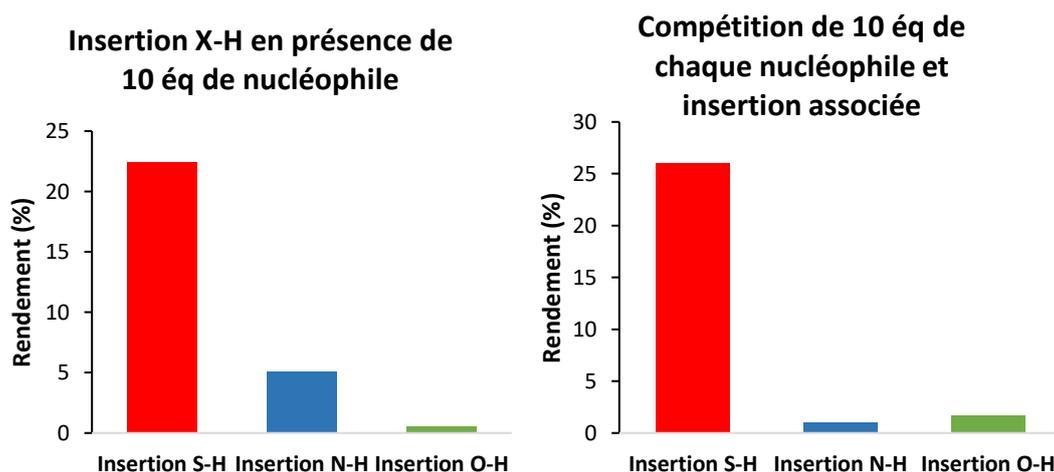


Figure 48 : Etude par LC-MS de la détermination du meilleur partenaire nucléophile en présence de la diazirine **154f** ($C = 0,05$ M) irradiée pendant 5min, d'abord en présence des nucléophiles un à un (10 éq) puis par compétition

L'analyse MS a pu confirmer la présence de la cétone et de l'adduit d'eau, composés présents lors de l'étude précédente, mais aussi la présence du composé diazo ayant la même masse molaire que la diazine mais dont le profil d'absorbance différent est caractérisé par une bande d'absorption intense vers 300 nm (Figure 49).

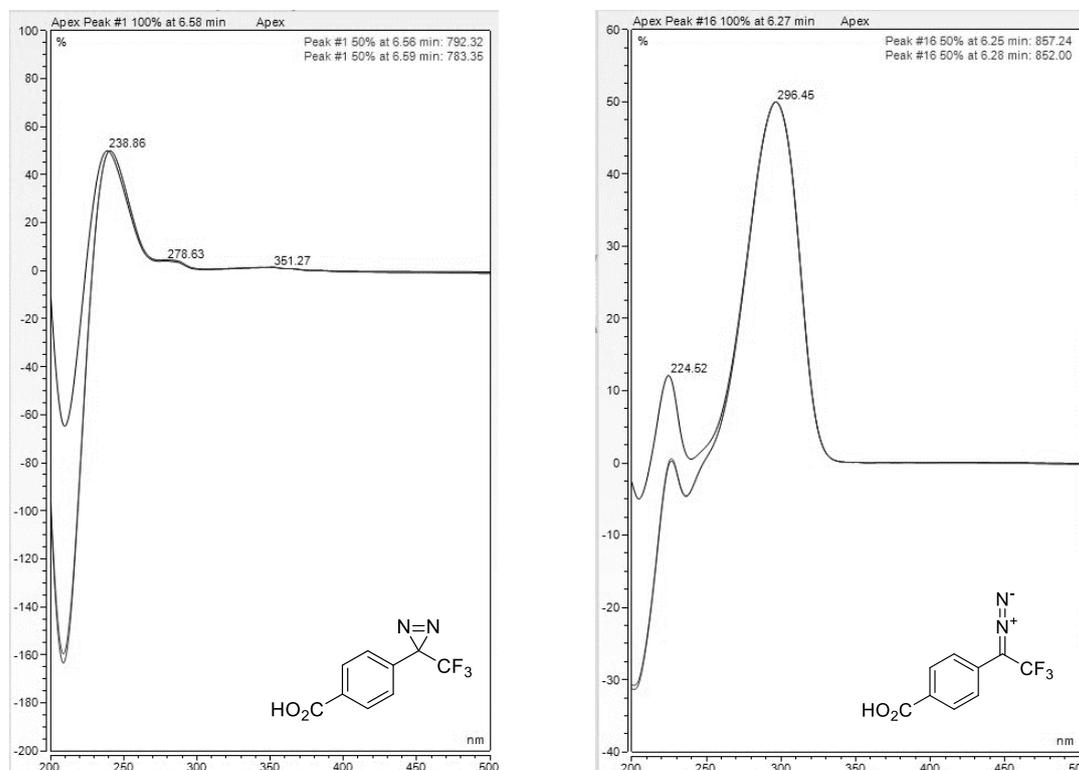


Figure 49 : Profil d'absorbance de la diazine **154f** et de son diazo correspondant (spectres obtenus par traitement des chromatogrammes sur le logiciel Chromeleon)

De plus, un produit de masse molaire de $[M-H]^- = 405$ g/mol est obtenu au même temps de rétention sur l'ensemble des analyses LC-MS effectuées lors de la détermination du meilleur nucléophile en présence de la diazine **154f**. Cette masse pourrait correspondre au produit **166** issu de la réaction de dimérisation des carbènes¹⁵⁵ (Figure 50).

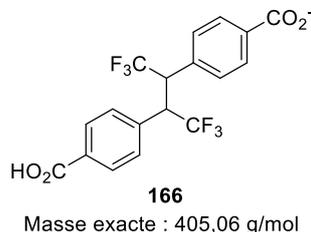


Figure 50 : Structure potentielle de la molécule obtenue lors de l'irradiation de la diazine **154f**

L'ensemble de ces travaux confirment donc que l'insertion S-H prône sur les autres. Le thiol se voit donc être le meilleur candidat nucléophile dans le cadre d'une réaction KTGS photoactivable. Cette étude vient s'ajouter aux travaux effectués par l'équipe de Woo quant au marquage préférentiel

effectué par les diazirines avec les acides aminés¹⁵⁶. En effet, l'équipe a démontré que la trifluorométhylphényldiazirine forme le plus d'insertions avec la cystéine par rapport aux 19 autres acides aminés en l'absence de solvant (Figure 51, A). Cependant, en présence d'eau, il faudra au moins 250 équivalents de mercaptoéthanol, composé remplaçant ici la cystéine car plus soluble, pour que les premières traces de produit issues d'insertion S-H soient observées (Figure 51, B). De ce fait, une étude en présence d'eau se voit nécessaire dans notre cas, les tampons aqueux étant utilisés dans les réactions de KTGS.

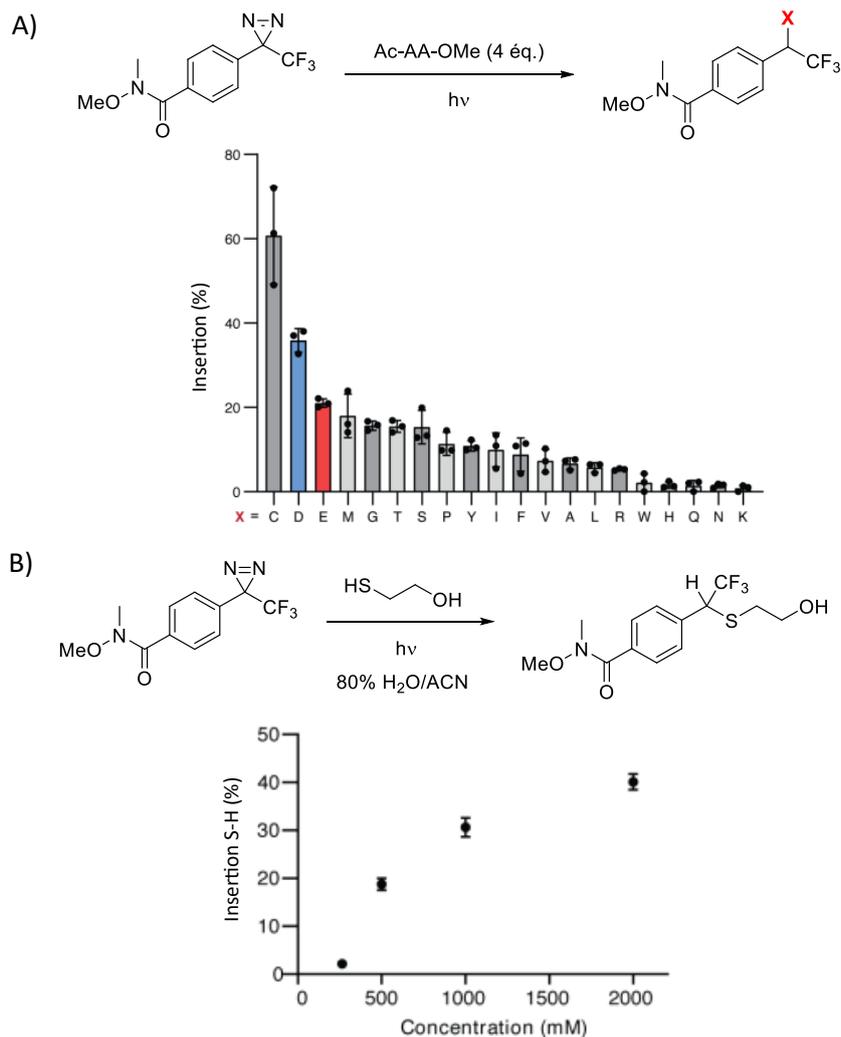


Figure 51 : A) Réactivité de la trifluorométhylphényldiazirine avec les 20 acides aminés protégés (4 éq.) en l'absence de solvant (rendements calculés en présence d'un étalon interne par RMN ¹⁹F), B) Réaction de la trifluorométhylphényldiazirine (C = 1 mM) avec des concentrations variables de mercaptoéthanol en conditions aqueuses

¹⁵⁶ A. V. West, G. Muncipinto, H.-Y. Wu, A. C. Huang, M. T. Labenski, L. H. Jones, C. M. Woo, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 6691–6700.

2.2.2. Impact de la présence de l'eau sur le rendement de produit issu d'insertion S-H

La KTGS devant s'établir sous conditions physiologiques, celle-ci est effectuée dans un tampon aqueux. Dans notre cas, l'eau peut également réagir avec le carbène généré par l'excitation de la diazirine et former l'alcool correspondant, produit présent dans les manipulations précédentes. De ce fait, nous pouvons imaginer que la présence d'eau pourrait entrer en compétition avec le fragment thiol partenaire et ainsi générer moins de produit issu d'insertion S-H.

Dans le but d'étudier cette problématique, nous nous sommes proposés d'irradier la diazirine **154f** en présence d'un partenaire thiol, dans un mélange d'eau MilliQ et d'ACN au ratio variant de 100% d'ACN à 50/50 eau/ACN, l'ACN étant nécessaire pour la solubilisation des composés. L'octanethiol n'étant pas soluble dans les conditions choisies, nous avons choisi le méthylmercaptopropionate comme partenaire thiol, composé dont l'ester le composant génère une absorption UV négligeable à 230 nm (Figure 52) qui ne contribuera donc pas sensiblement à l'absorbance du produit.

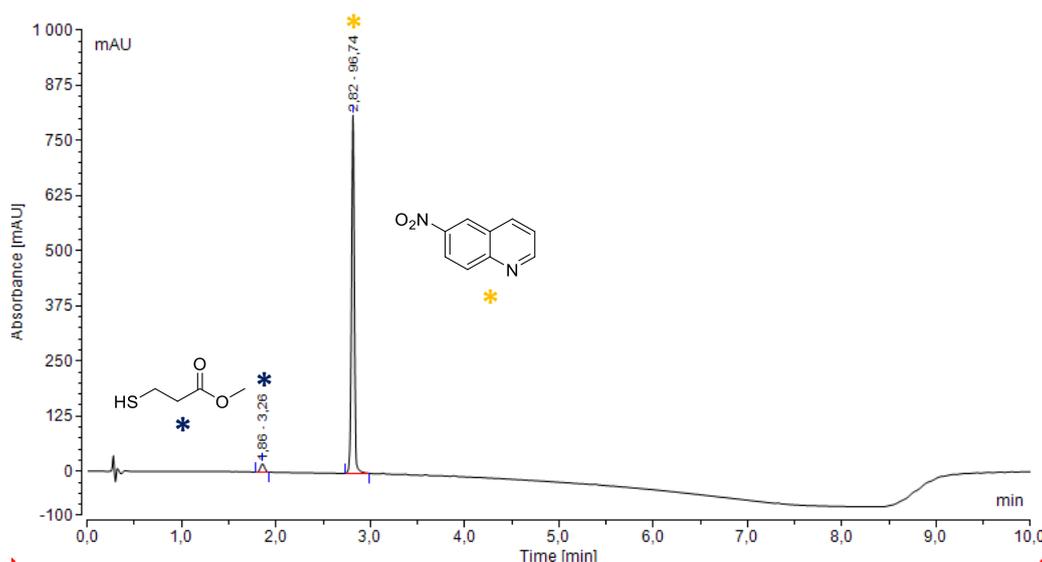
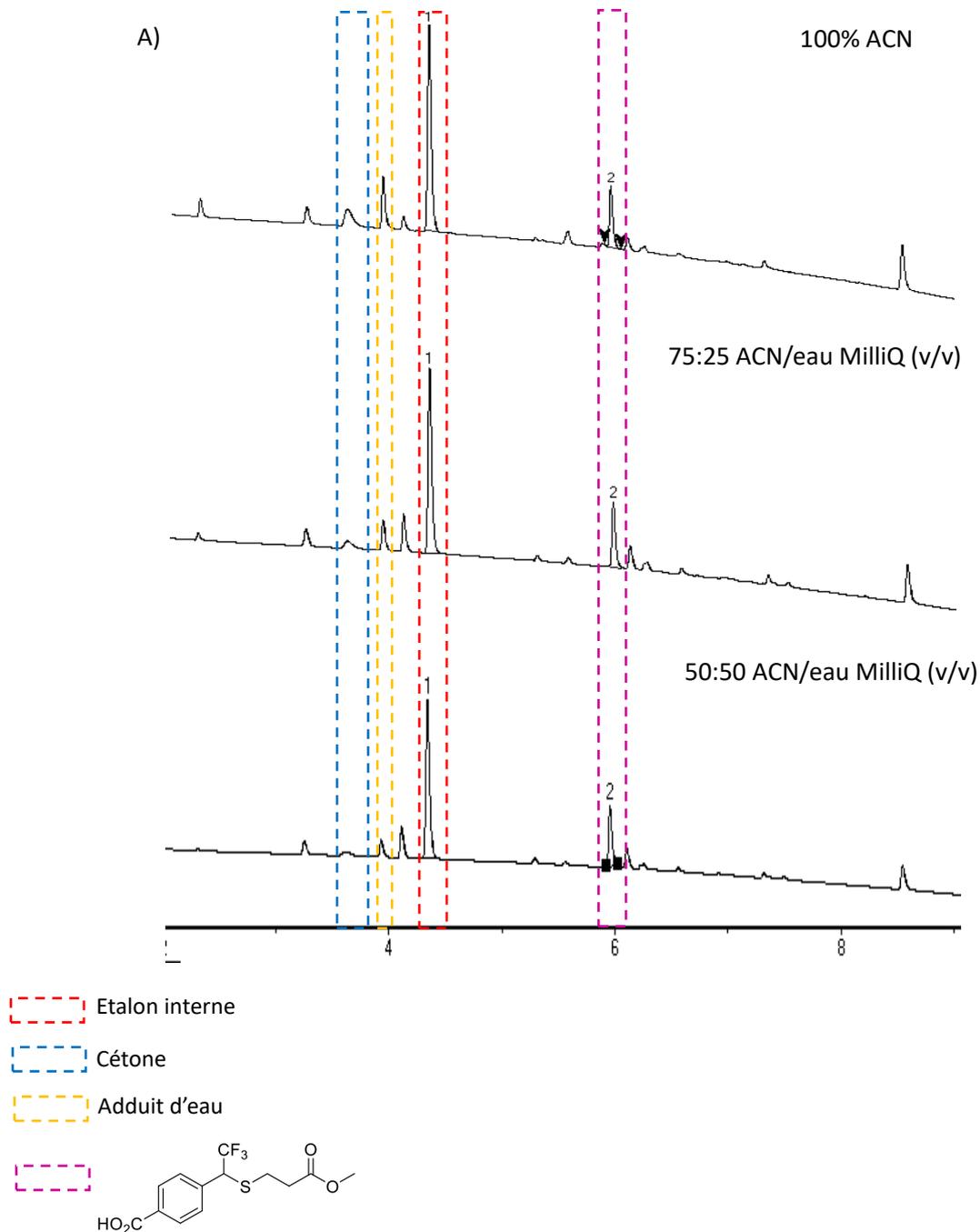


Figure 52 : Chromatogramme ($\lambda_{\text{obs}} = 230 \text{ nm}$) de 10 éq de méthylmercaptopropionate mélangés à 1 éq de l'étalon interne 6-nitroquinoline

De la même façon que précédemment, des solutions stock du méthylmercaptopropionate, de la diazirine **154f** et de la 6-nitroquinoline ont été préparées. Un mélange d'un équivalent de diazirine pour 10 équivalents de nucléophile a ensuite été effectué dans un mélange d'eau/ACN ($C_{\text{f diazirine}} = 0,04 \text{ M}$). Ensuite, le vial est irradié pendant 5 min avec agitation avec une lampe LED HepatoChem de 365 nm dans une PhotoRedOx BoxTM. Après irradiation, l'étalon interne a été ajouté et chaque solution finale est analysée par LC-MS ($\lambda_{\text{obs}} = 230 \text{ nm}$).

Comme le montre la Figure 53, le rendement de produit résultant d'une insertion S-H ne semble pas impacté par la présence d'eau. Au contraire, ce mélange de solvants permet même d'améliorer le profil du mélange irradié, la présence d'ACN étant potentiellement à l'origine de réactions secondaires.



B) **Insertion S-H avec 10 éq de méthylmercaptopropionate dans 0.04 M ACN/eau MilliQ**

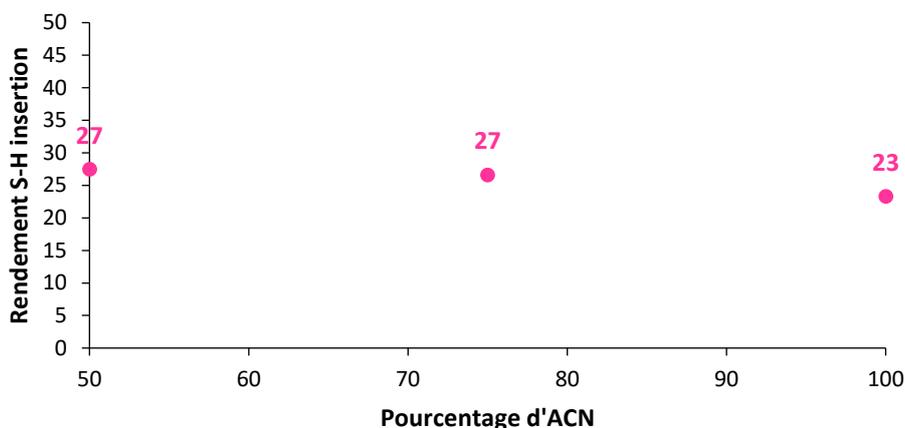


Figure 53 : A) Chromatogramme ($\lambda_{obs} = 230 \text{ nm}$) issu de l'irradiation ($t = 5 \text{ min}$) de la diazidine **154f** ($C = 0,04 \text{ M}$) en présence d'une solution contenant 10 éq de méthylmercaptopropionate et d'un mélange d'ACN/eau MilliQ, B) Rendement de produit d'insertion S-H résultant de la même expérience

2.2.3. Cinétique d'activation de la diazidine 154e

Afin de déterminer plus précisément le temps nécessaire à la photolyse totale de la diazidine, qui est vraisemblablement inférieur à cinq minutes (temps d'irradiation utilisé précédemment) du fait de son absence lors de l'analyse des expériences précédentes, nous nous proposons de suivre la disparition de la diazidine ainsi que la formation du produit issu d'insertion S-H en présence d'octanethiol et de la diazidine **154e** par analyse HPLC. Cela nous permettra donc de déterminer plus précisément le temps requis pour consommer entièrement la diazidine et générer l'espèce photoréactive nécessaire à la ligation. Pour ce faire, la même expérience que précédemment a été effectuée en présence d'un équivalent de diazidine pour dix équivalents de thiol.

Comme le démontre le profil cinétique rapporté dans la Figure 54, la diazidine **154e** semble être entièrement consommée à partir de trois minutes où un plateau est obtenu. La formation du thioéther s'effectue au fur et à mesure que la diazidine est consommée, le carbène singulet se générant par irradiation, jusqu'à atteindre un plateau à 18% de rendement. De ce fait, cinq minutes sont largement suffisantes pour activer complètement la diazidine. C'est le temps d'irradiation qui sera choisi pour la suite des travaux.

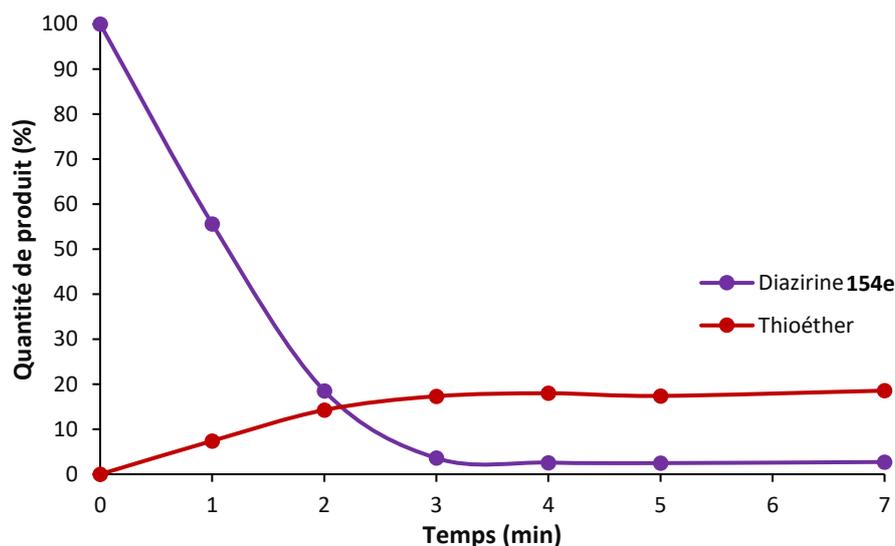


Figure 54 : Cinétique d'activation de la diazirine **154e** au profit de la formation du produit d'insertion S-H

2.2.4. Stabilité de la CA sous irradiation lumineuse

2.2.4.1. En l'absence de diazirine

Maintenant que le temps d'irradiation nécessaire à l'activation de la diazirine a été déterminé, nous nous intéressons à la stabilité de l'enzyme d'intérêt quant à la future réaction de KTGS, à savoir la *bCA*-II. En effet, la longueur d'onde de la LED utilisée étant dans l'UV-A, celle-ci peut s'avérer quelque peu délétère envers l'enzyme et ainsi réduire son activité. De ce fait, nous avons suivi son activité qualitative avec la méthode de Pocker et Stones⁷² précédemment décrite.

Nous avons, pour cela, préparé une solution de 37,5 μM de *bCA*-II dans le tampon Tris ($C = 0,05$ M, $\text{pH} = 7,5$) contenant la quantité de DMSO nécessaire à l'ajout des fragments dans le cadre d'une réaction de KTGS dans un vial HPLC. Cette solution a été incubée pendant 30 min à température ambiante puis a été irradiée avec la lampe LED HepatoChem centrée à 365 nm dans la PhotoredOx BoxTM. D'autre part, la même solution initiale n'a pas été irradiée de façon à servir de contrôle. A $t = 5$, 10 puis 20 min, 10 μL de chaque solution ont été prélevés puis placés dans une plaque 96-puits, les puits correspondants contenant déjà 70 μL de tampon Tris. A l'aide du lecteur de plaques Tecan, 20 μL d'une solution de PNPA a été ajoutée. Nous avons donc pu observer les variations de la cinétique d'hydrolyse de la PNPA par observation de l'absorbance du milieu à 348 nm en fonction du temps d'irradiation de la CA (Figure 55). Celle-ci, même après 20 min d'irradiation à 365 nm, semble moyennement altérée, ce qui démontre que la CA conserve sa structure tertiaire nécessaire à son activité dans ces conditions.

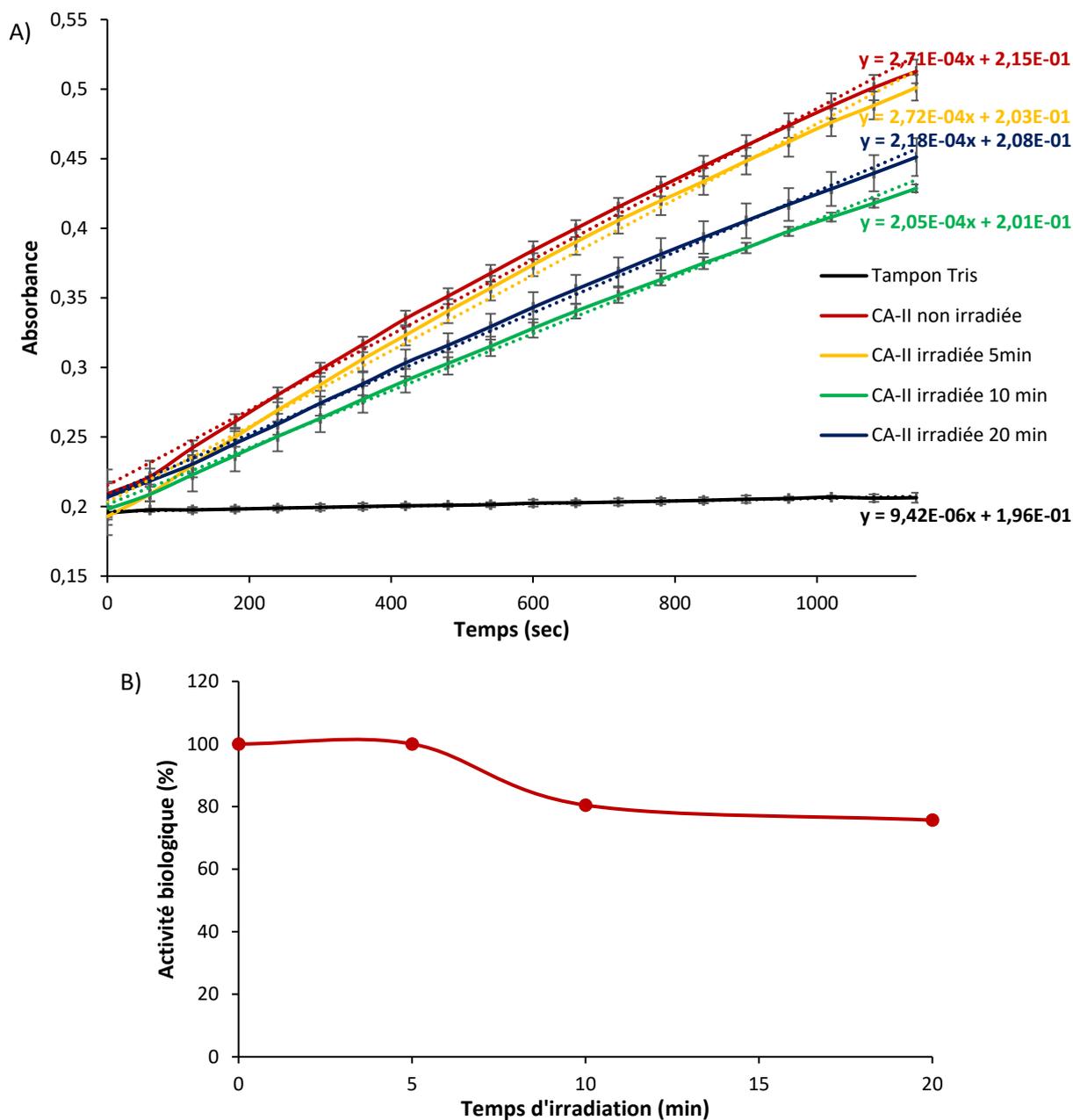


Figure 55 : A) Variation de l'absorbance d'un mélange de bCA-II et de PNPA sous irradiation à 365 nm, B) Variation de l'activité biologique de la bCA-II en fonction du temps d'irradiation

2.2.4.2. En présence de la diazirine 154f

La diazirine est une fonction photoréactive particulièrement étudiée dans le domaine du photomarquage, celle-ci étant de petite taille et pouvant réagir très rapidement avec les composés à proximité jusqu'à même effectuer de l'insertion C-H¹⁵⁷. Dans notre cas, cette réaction pourrait s'avérer

¹⁵⁷ E. Smith, I. Collins, *Future Medicinal Chemistry* **2015**, 7, 159–183.

néfaste pour la mise en œuvre de la KTGS, le photomarquage pouvant être à l'origine de modifications structurales de la cible biologique et ainsi bloquer l'accès à son site actif.

De ce fait, la même expérience que précédemment a été mise en place, cette fois-ci en présence de la diazirine **154f**. Des solutions stock en *bCA-II* (60 μM dans le tampon Tris) et de diazirine **154f** (43 mM dans le DMSO) ont été préparées. Une solution stock d'un inhibiteur connu de la *bCA-II*, l'éthoxzolamide (19,4 mM dans le DMSO), a également été réalisée afin d'effectuer une manipulation de contrôle. Par la suite, trois expériences ont été conduites, à savoir en présence de l'enzyme seulement « CA-II », en présence de l'enzyme et de la diazirine **154f** « Diazirine » et en présence de l'enzyme, de la diazirine et de l'inhibiteur « Inhibiteur ». La composition et les concentrations finales sont rassemblées dans les tableaux 7 et 8, valeurs qui seront également utilisées lors de la mise en œuvre de la réaction en KTGS.

Expérience	Tris pH 7.5 (μL)	<i>bCA-II</i> (μL)	DMSO (μL)	Ethoxzolamide (μL)	Diazirine (μL)
« CA-II »	468	500	19,3	/	/
« Diazirine »	468	500	10,3	/	9,3
« Inhibiteur »	468	500	/	10,3	9,3

Tableau 7 : Composition de chaque expérience

Expérience	<i>bCA-II</i> (μM)	Ethoxzolamide (μM)	Diazirine (μM)
« CA-II »	30	/	/
« Diazirine »	30	/	400
« Inhibiteur »	30	200	400

Tableau 8 : Concentration finale en chaque composante dans les expériences menées

Chaque solution a ensuite été incubée pendant 30 min à température ambiante puis a été irradiée pendant 5 min avec la lampe LED HepatoChem centrée à 365 nm dans la PhotoRedOx Box™. Cette manipulation a également été faite sans irradiation afin de servir de contrôle. Les puits et l'analyse ont ensuite été réalisés de la même façon que précédemment afin d'observer les variations de la cinétique d'hydrolyse de la PNPA par observation de l'absorbance du milieu à 348 nm en fonction de la présence de diazirine sous irradiation lumineuse (Figure 56). Ici encore, la présence de la diazirine n'altère pas l'activité biologique de la CA-II. Son site actif reste donc accessible et opérationnel, ce qui valide sa future utilisation en KTGS.

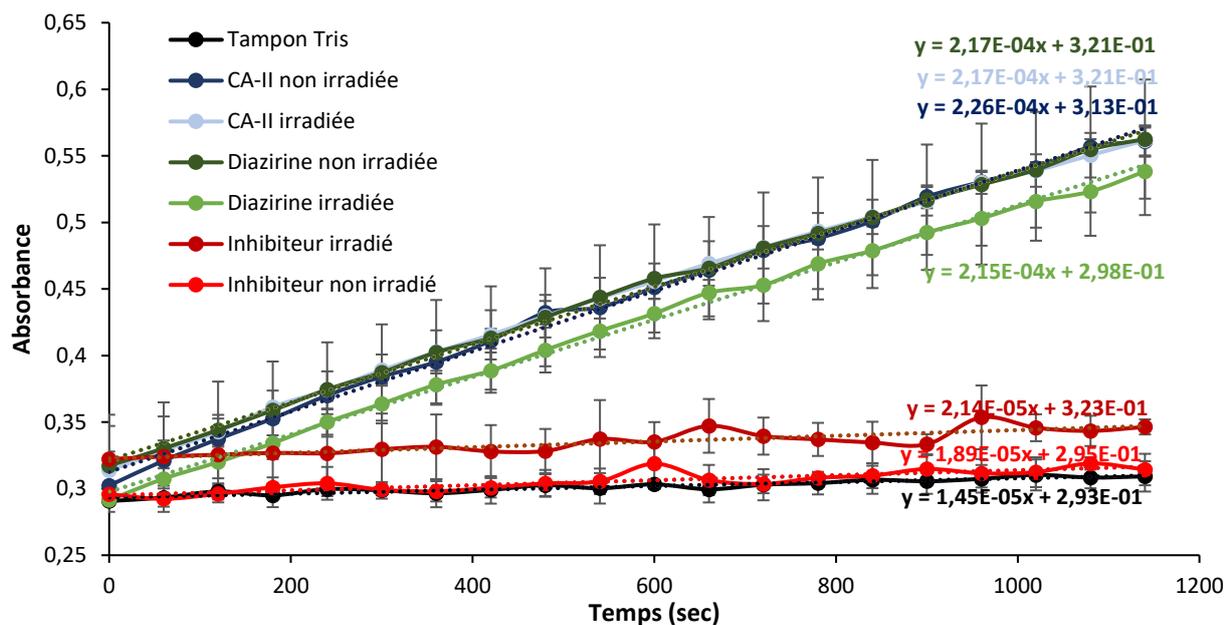


Figure 56 : Variation de l'absorbance d'un mélange de bCA-II et de PNPA en présence de la diazirine **154f** sous irradiation à 365 nm

La réaction photoactivable en KTGS va donc pouvoir être testée, tous les tests préliminaires se montrant favorables à celle-ci. Ce test sera effectué dans des conditions décrites dans la littérature en click *in situ* avec cette enzyme⁶⁴, à l'exception du temps d'incubation rapporté de 40 h, qui pourra être drastiquement réduit par l'approche photochimique envisagée.

3. Mise en œuvre de la réaction KTGS

3.1. Préparation des ligands de référence

Dans le but de tester la réaction photoactivable en KTGS, la synthèse des ligands attendus est nécessaire afin de les utiliser comme références lors des analyses LC-MS. Les fragments diazirine ayant au préalable été synthétisés, nous avons utilisé le mercaptotoluène sulfonamide **33** pour fragment complémentaire préalablement utilisé dans la réaction de thiol-yne. En effet, ce fragment portant la fonction thiol nécessaire à l'élaboration de la KTGS photoréactive est également doté de la fonction affine à l'anhydrase carbonique, à savoir le groupement sulfonamide. Ainsi, les ligands auront la structure générale présentée dans le Schéma 86. Dans le but de parvenir à ces références, deux possibilités s'offrent à nous, à savoir la synthèse par substitution nucléophile ou par activation de la diazirine.

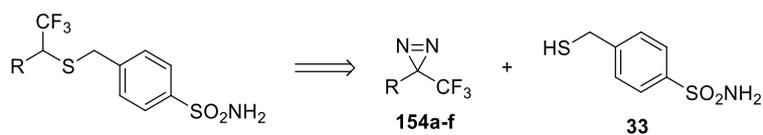


Schéma 86 : Rétrosynthèse des ligands attendus en KTGS

3.1.1. Par substitution nucléophile

La formation du lien thioéther peut se faire par substitution nucléophile du thiol sur un groupement partant, voie utilisée pour la synthèse des références nécessaires à la détermination du meilleur partenaire nucléophile (cf. Schéma 83). Afin d'obtenir les meilleurs rendements possibles, plusieurs nucléofuges ont été testés, à savoir le tosyloxy, le triflate et le brome. Leur synthèse découle du même réactif initial : l'alcool. Dans cette étude, c'est le 4-bromophényltrifluoroéthanol **146** qui a été utilisé, celui-ci ayant pu être synthétisé en grande quantité.

A partir de ce réactif, trois voies de synthèse sont proposées (Schéma 87). La triflation de l'alcool¹⁵⁸ a conduit au composé **167** non isolé. La bromation de l'alcool en présence de triphénylphosphite et de NBS¹⁵⁹ donne le composé **168** avec un rendement de 60%. Enfin, la tosylation de l'alcool conduit au produit désiré **169** avec un rendement convenable de 72%.

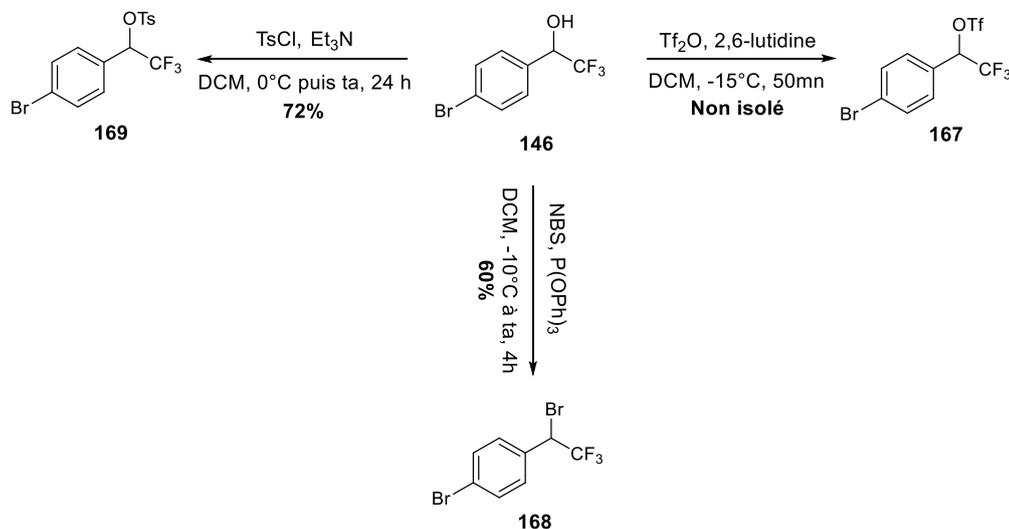


Schéma 87 : Synthèse des espèces nucléofuges

¹⁵⁸ G. Hughes, P. O'Shea, J. Goll, D. Gauvreau, J. Steele, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 3189–3196.

¹⁵⁹ S.-Y. He, X.-G. Zhang, *Org. Chem. Front.* **2020**, *7*, 3174–3178.

La substitution nucléophile par le fragment thiol **33** est ensuite entreprise dans les mêmes conditions que développées précédemment (c.f. Schéma 85, A), à savoir à température ambiante en présence de DIPEA dans le THF (Schéma 88). Si le triflate permet l'obtention du ligand **170** avec un taux de conversion RMN de 50%, les composés bromés et tosylés donnent de très faibles conversions en produit avec 4% et 0%, respectivement. Le triflate semble donc être le meilleur candidat dans ces conditions douces développées.

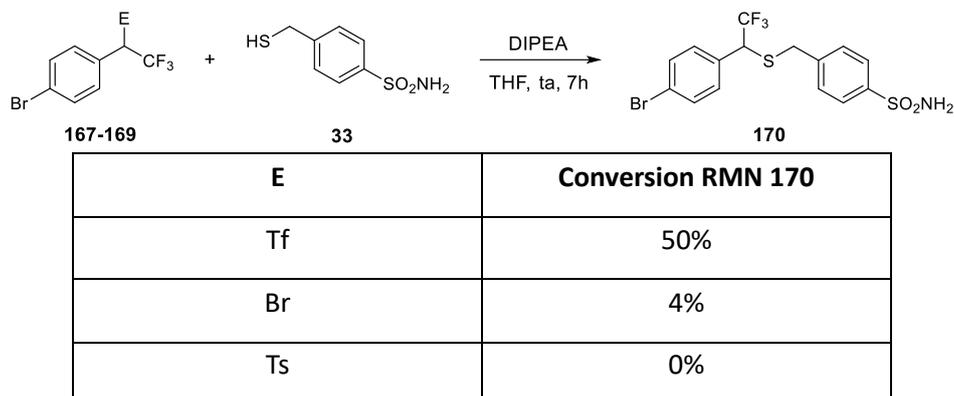


Schéma 88 : Optimisation de la substitution nucléophile en vue de l'obtention de la référence **170**

Cette méthode donnant un mélange nécessitant une purification complexe, une autre voie de synthèse a été imaginée : par activation de la diazirine.

3.1.2. Par activation de la diazirine

Dans le but de parvenir aux références sans avoir à synthétiser de nouvelles molécules, une voie photochimique plus directe a été imaginée à partir de la diazirine **154f** et du fragment thiol **33**. En effet, l'accès à la liaison thioéther devrait pouvoir se faire par irradiation de la diazirine en présence d'un milieu concentré en son partenaire nucléophile et ainsi former le ligand **171** (Schéma 89). En revanche, le choix du solvant doit être méticuleusement établi, celui-ci devant être inerte lors de l'irradiation de la diazirine et capable de solubiliser les deux fragments. Le fragment **33** étant polaire et particulièrement peu soluble dans la plupart des solvants, le champ des solvants possibles se réduit donc au méthanol, au DMF et au DMSO. Le méthanol pouvant donner des produits d'insertion O-H avec le carbène généré par irradiation de la diazirine, le DMSO et le DMF ont donc été les solvants utilisés. Les conditions testées sont rassemblées dans le Tableau 9. Afin de déterminer les produits présents après irradiation du mélange, des analyses LC-MS ont été effectuées en parallèle. La diazirine étant dans la majorité des cas entièrement consommée, la quantité de produit formé est déterminée par le rapport de produit **171**/thiol **33** obtenu en RMN ^1H .

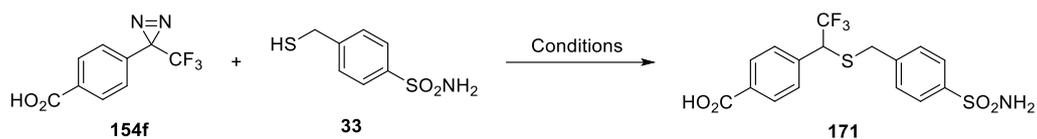


Schéma 89 : Synthèse du ligand **171** par activation de la diazirine

Dans un premier temps, la concentration en diazirine a été optimisée. Plus celle-ci est concentrée, plus les chances de rencontre entre le carbène et le thiol sont importantes. Celle-ci a donc été fixée à 0,7 M dans le DMSO (entrée 2). Cependant, une concentration plus importante nécessite très souvent une irradiation plus longue, ce qui a pu être confirmé par analyse HPLC. Celle-ci a donc été fixée à 20 min. Dans ces conditions, la quantité de produit **171** observée est bien supérieure à celle observée en entrée 1 (Schéma 90).

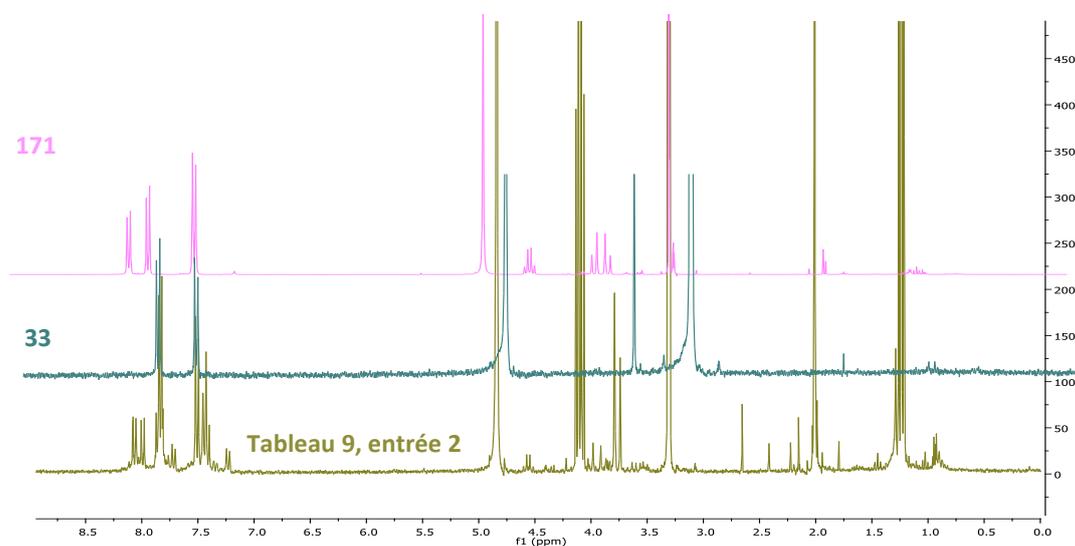


Schéma 90 : Spectre RMN de l'expérience présentée dans l'entrée 2 du tableau 9 superposé avec celui du thiol **33** et du ligand **171** isolés

Entrée	m _{154f}	33	Solvant (concentration)	Conditions	Résultats LC-MS
1	10 mg	2 éq, 17,5 mg	DMSO (0,1 M)	Irradiation pendant 10 mn à 365 nm (LED)	154f + diazo + 33 + pont disulfure + traces 171
2	10 mg	2 éq, 17,5 mg	DMSO (0,7 M)	Irradiation pendant 20 mn à 365 nm (LED)	171/33 (0,26:1 ; RMN ¹ H) + diazo + pont disulfure
3	10 mg	2 éq, 17,5 mg	DMSO (0,7 M)	Irradiation pendant 1 h avec une lampe UV-A et B Reptisun® 10.0	154f + diazo + 33 + pont disulfure
4	10 mg	2 éq, 17,5 mg	DMSO (0,7 M)	Irradiation pendant 20 mn à 365 nm (LED) + 2 éq Cs₂CO₃	154f + pont disulfure
5	10 mg	2 éq, 17,5 mg	DMSO (0,7 M)	Irradiation pendant 20 mn à 365 nm (LED) + 1 h à 296 nm avec le fluorimètre (largeur fentes 14 nm)	Identiques entrée 2
6	10 mg	2 éq, 17,5 mg	DMSO (0,7 M)	Bullage d'Ar pendant 10 mn + irradiation pendant 20 mn à 365 nm (LED)	171/33 (0,40:1 ; RMN ¹ H) + diazo + pont disulfure
7	10 mg	2 éq, 17,5 mg	DMSO (0,7 M)	Méthode Freeze Pump Thaw + irradiation pendant 20mn à 365 nm (LED)	Identiques entrée 6
8	10 mg	2 éq, 17,5 mg	DMF (0,7 M)	Bullage d'Ar pendant 10 mn + irradiation pendant 20 mn à 365 nm (LED) +	Quantité moins importante en 171
9	10 mg	2 éq, 17,5 mg	DMSO (0,7 M)	Bullage d'Ar pendant 10 mn + chauffage à 150°C pendant 20 mn	Pont disulfure seulement
10	50 mg	2 éq, 89,4 mg	DMSO (1,1 M)	Bullage d'Ar pendant 10 mn + irradiation pendant 30 mn à 365 nm (LED)	171/33 (0,34:1 ; RMN ¹ H) + diazo + pont disulfure – Mélange difficilement purifiable

Tableau 9 : Optimisation des conditions d'obtention du ligand **171** par activation de la diazirine **154f** et produits observés en LC-MS

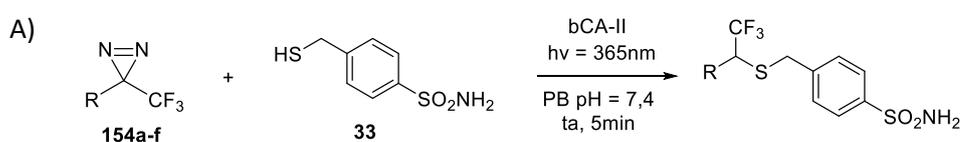
Le diazo étant toujours présent en quantités observables en HPLC, le mode d'irradiation a été modifié. Par exemple, une lampe UV-A et B Reptisun® a été utilisée, celle-ci émettant sur le domaine d'absorption du diazo et de la diazirine, mais elle n'est pas assez puissante pour permettre une correcte excitation du système (entrée 3). Une irradiation supplémentaire à 296 nm a ainsi été réalisée après l'irradiation LED à 365 nm initiale afin de convertir le diazo intermédiaire formé en carbène, mais la quantité de diazo est restée constante (entrée 5). Seul le dégazage du milieu s'est avéré être utile pour améliorer la quantité de produit formé (entrée 6 et 7). La méthode de bullage à l'argon étant plus rapide que la méthode *Freeze Pump Thaw*, celle-ci a été conservée pour tester les conditions à plus grande échelle (entrée 10).

Bien que les conditions aient été optimisées, la purification s'avère être tout aussi complexe. En effet, la présence de pont disulfure pose problème, celui-ci ayant une polarité très similaire à celle du produit **171**, rendant difficile sa purification en phase normale et en phase inverse. De ce fait, il a été décidé d'utiliser les conditions présentées entrée 6 dans le but d'établir une référence brute en LC-MS et ainsi déterminer son temps de rétention. En revanche, si la KTGS était amenée à fonctionner, la synthèse de la référence par substitution nucléophile serait choisie afin d'isoler le produit en quantité et avec un niveau de pureté suffisant pour en déterminer l'activité biologique.

3.2. Test de la réaction photoactivable en KTGS

3.2.1. Criblage des fragments diazirine en KTGS

A partir des conditions développées dans la littérature⁶⁴ et utilisées précédemment dans le chapitre 2, le criblage des fragments diazirine en KTGS a été entrepris en présence de la *bCA-II* (Schéma 91). De même, les expériences de contrôle (« Blanc » et « Inhibiteur ») dans les mêmes conditions ont aussi été effectuées en parallèle de l'expérience KTGS attendue (« Enzyme »), toujours dans le but de prouver que la réaction est bien promue par la présence de l'enzyme et que la réaction a bien lieu en son site actif. Seul le temps d'incubation change. En effet, une fois l'ensemble des réactifs mis en solution dans le PB, le tout est incubé pendant 30 minutes à température ambiante puis irradié pendant 5 minutes avec la lampe LED HepatoChem centrée à 365 nm dans la PhotoRedOx Box™.



Nom de la manipulation	Fragment 33 (μM)	Fragment 154a-f (μM)	bCA-II (μM)	ETHOX (μM)
Blanc	60	400	0	0
Enzyme	60	400	30	0
Inhibiteur	60	400	30	200

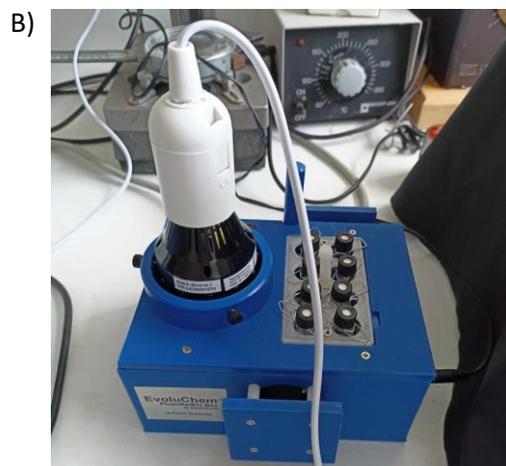
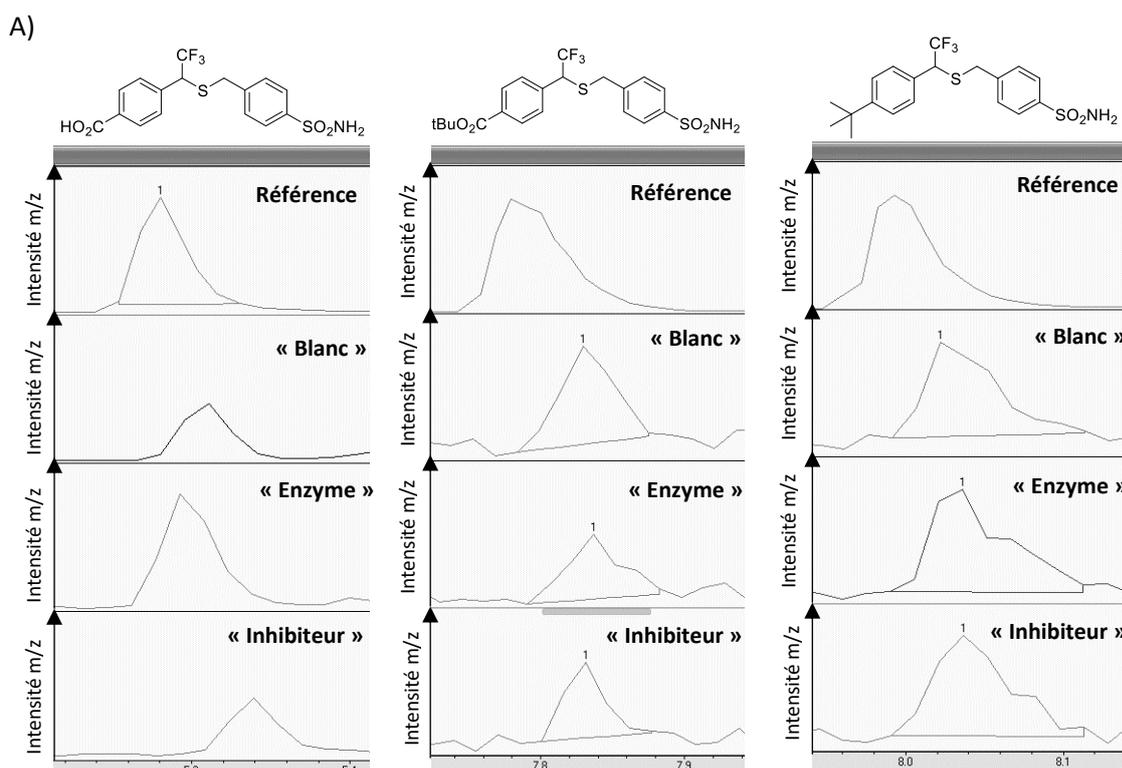


Schéma 91 : A) Conditions de KTGS utilisées pour la ligation photoactivable, B) Montage associé

Les diazirines ont donc été testées une à une dans ces conditions puis analysées par méthode LC-MS/SIM. Parmi les six analogues testés, seul l'analogue **154f** donne des résultats probants en KTGS, avec 3,4 fois plus de composé obtenu en présence d'enzyme qu'en son absence (Figure 57). Pour les autres analogues, la formation de produit est soit non détectable, soit non catalysée par la présence de la bCA-II.



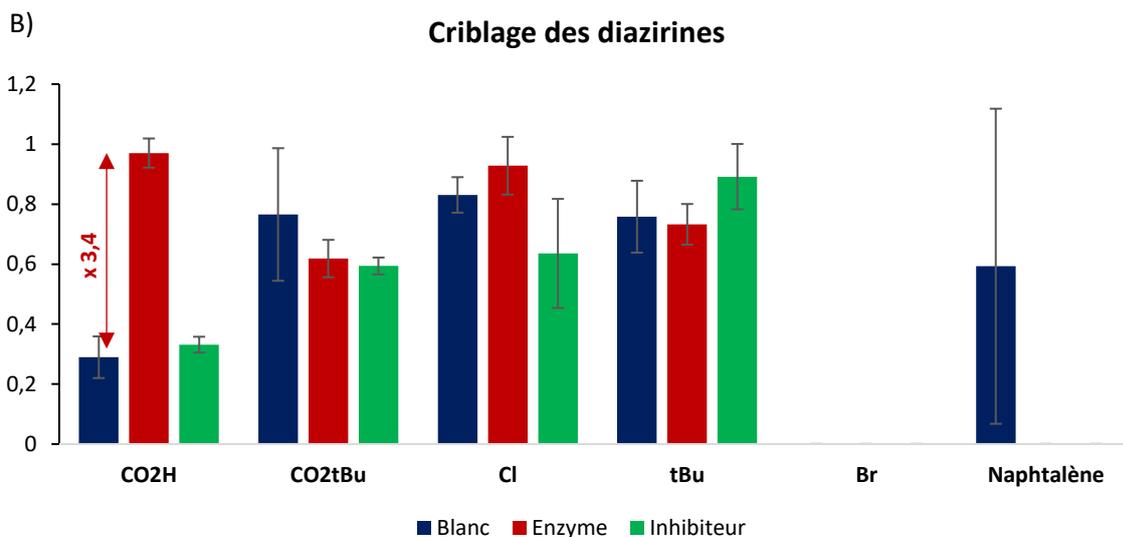
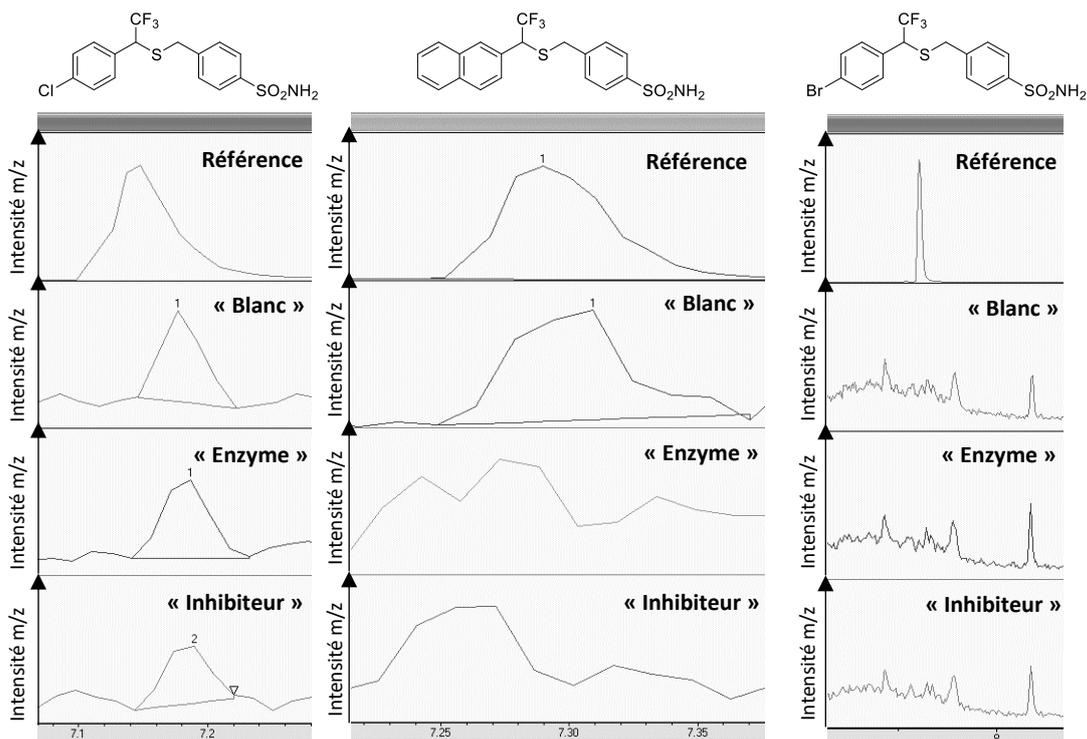


Figure 57 : A) Analyses LC-MS/SIM obtenues après 5 min d'irradiation de chaque diazirine en présence du thiol **33** (« Blanc », « Enzyme », « Inhibiteur ») comparé avec la référence thioéther brute obtenue par activation de la diazirine (SIM [M-H⁻]), B) Aires des pics SIM + EIC normalisées de la concentration de ligand obtenu pour chaque expérience

3.2.2. Réactions de contrôle

Suite à ces résultats encourageants, deux types de réactions de contrôle ont été entreprises (Figure 58) avec la diazirine **154f**. Tout d'abord, la réaction de KTGS a été réalisée en présence du

mercaptotoluène **77**, analogue au thiol **33** utilisé dans le chapitre 2 qui n'interagit pas avec le zinc présent dans le site actif de la *bCA-II* du fait de l'absence de sulfonamide dans sa structure. Ici encore, la ligation n'est pas accélérée, ce qui valide l'utilisation du sulfonamide comme point d'ancrage avec l'anhydrase carbonique.

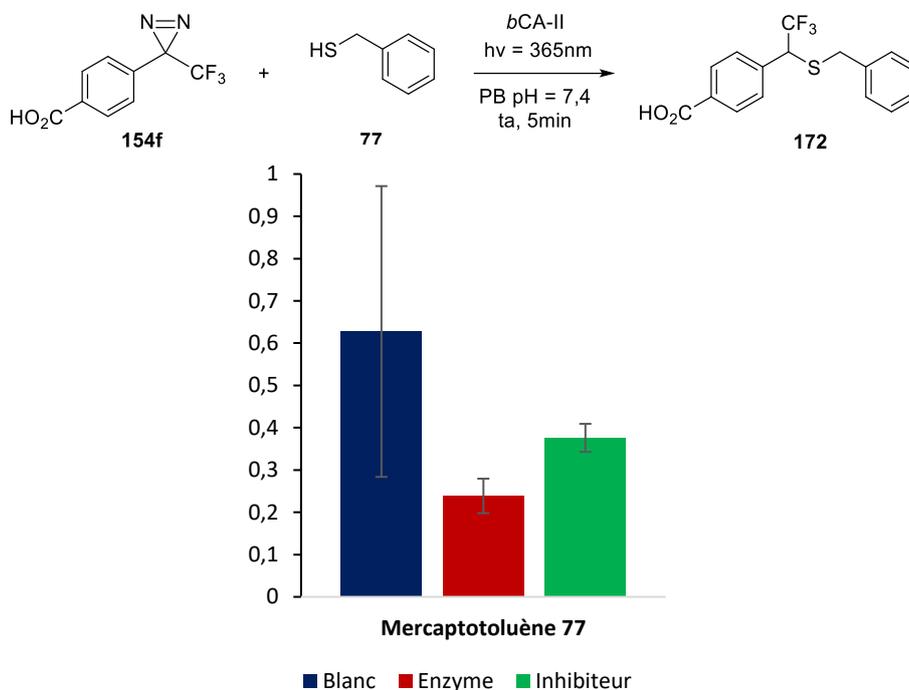


Figure 58 : Aires SIM normalisées du ligand **172** obtenues pour chaque expérience « Blanc », « Enzyme » et « Inhibiteur » (SIM m/z 207,9 $[\text{M-H}]^-$)

Dans un second temps, l'anhydrase carbonique bovine a été remplacée par deux autres enzymes non-cibles, la carboxylestérase de foie de porc (*pCE*) et l'albumine de sérum bovin (BSA), dans le but de confirmer que l'interaction avec la CA est bien nécessaire pour parvenir à une accélération de la ligation (Figure 59). Tandis qu'aucun effet de la *pCE* n'est observé, la BSA, quant à elle, semble quelque peu catalyser la réaction puisque 1,6 fois plus de produit est obtenu en présence d'enzyme qu'en son absence. En effet, cette dernière est une protéine de transport connue pour interagir avec les molécules organiques²⁷. Cependant, cet effet reste moindre comparativement à celui de la *bCA-II*.

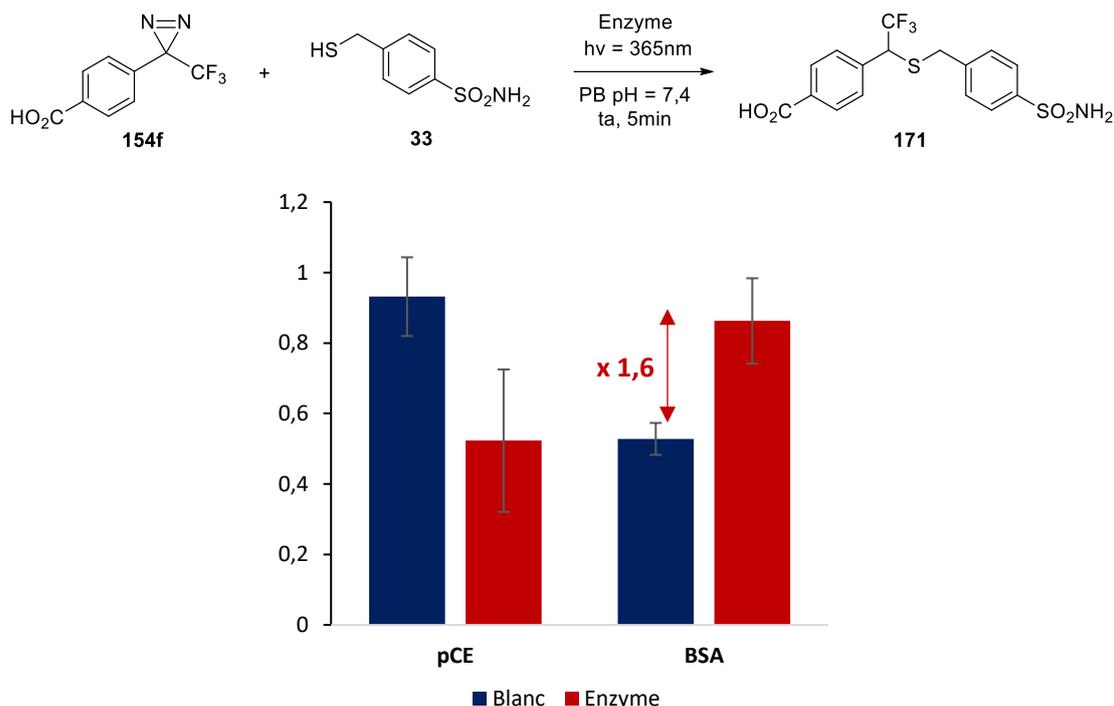


Figure 59 : Aires SIM normalisées du ligand **171** obtenues pour chaque expérience « Blanc », « Enzyme » et « Inhibiteur » (SIM m/z 403,9 [M-H]⁻)

3.2.3. Désactivation du carbène triplet en présence de TEMPO

La diazirine, une fois irradiée, forme un carbène singulet qui, par CIS, devient un carbène triplet. Bien que ce dernier soit souvent à l'origine de produits indésirables, celui-ci peut aussi être capable de générer un produit de type insertion X-H. Cependant, contrairement au carbène singulet, un mécanisme diradicalaire entre en compte (Schéma 92).

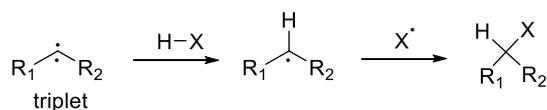


Schéma 92 : Insertion X-H en présence du carbène triplet

Afin de comprendre le mécanisme à l'origine de l'insertion S-H obtenue dans la réaction de KTGS entre la diazirine **154f** et le thiol **33**, nous nous proposons d'ajouter un réactif capable de piéger le carbène triplet et ainsi comparer les pourcentages en produit **171** formé avec ceux obtenus en l'absence de *quencher*. Notre étude se portera donc en présence de **TEMPO**, piège de radicaux libres particulièrement efficace même en présence de carbènes triplets à la stabilité considérable¹⁶⁰ donnant

¹⁶⁰ J. Nakajima, K. Hirai, H. Tomioka, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 1500–1503.

la cétone correspondante à l'image des résultats obtenus par l'équipe de Tomioka à partir d'un carbène diradicalaire (Schéma 93).

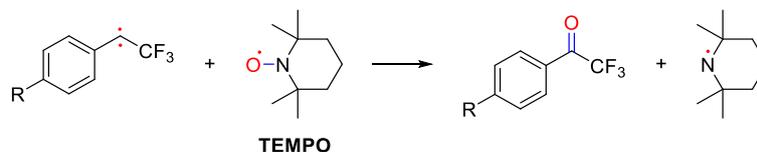


Schéma 93 : Produit de piégeage du carbène triplet par le TEMPO proposé en comparaison avec les résultats de Tomioka¹⁶⁰

Pour ce faire, les mêmes conditions de KTGS que précédemment décrites ont été utilisées. Simplement, deux équivalents de TEMPO par rapport à la diazirine **154f** sont ajoutés aux réactions « Blanc », « Enzyme » et « Inhibiteur ». Le mode d'irradiation et le traitement de chaque manipulation reste le même et les résultats sont analysés par LC-MS/SIM. Comme présenté dans la Figure 60, la présence de TEMPO n'impacte aucunement le ratio d'insertion S-H obtenu. Nous pouvons donc supposer que le produit obtenu en KTGS résulte d'une réaction entre le carbène singulet issu de la diazirine **154f** et le thiol **33**.

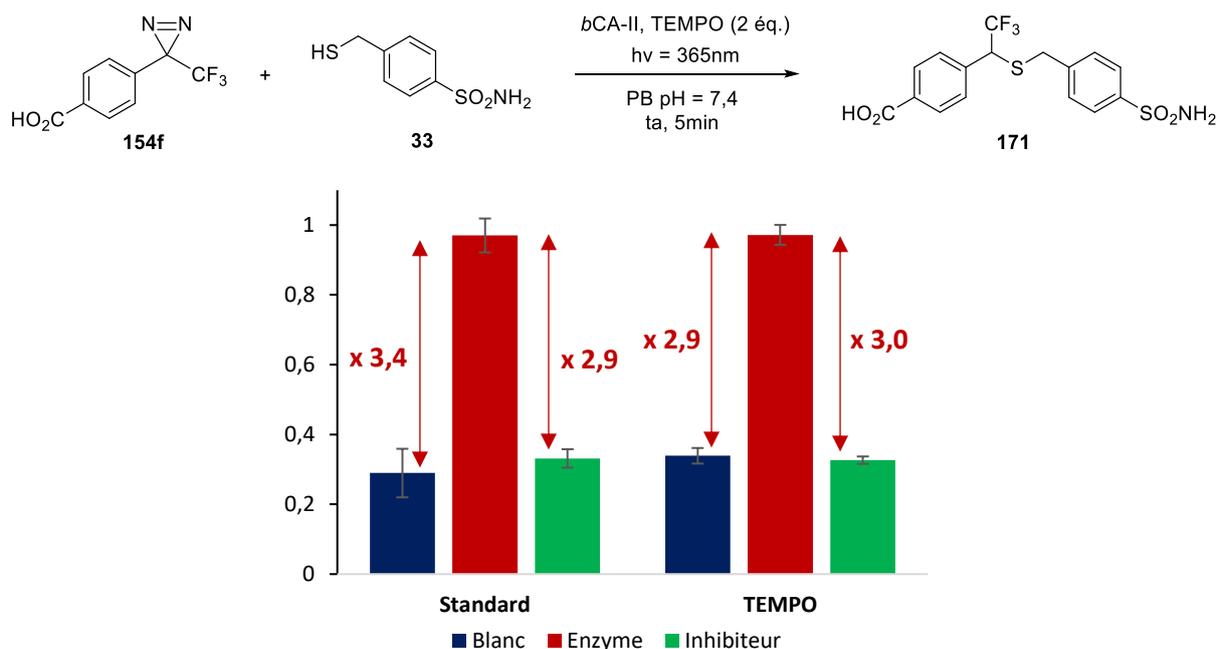


Figure 60 : Aires SIM normalisées du ligand **171** obtenues pour chaque expérience « Blanc », « Enzyme » et « Inhibiteur » (SIM m/z 403,9 [M-H]⁻) en présence de TEMPO comparées à la réaction standard

3.2.4. Cinétique de la réaction photoactivable en KTGS

Une expérience en KTGS peut avoir des temps d'incubation particulièrement longs en présence de la cible, pouvant parfois durer jusqu'à deux semaines (Figure 61). Dans ces conditions, la structure de la cible biologique peut être impactée, ce qui peut plus ou moins la dénaturer. De ce fait, la quantité

de ligand formé peut s'avérer trop faible pour être détectée, conduisant ainsi à de faux négatifs comme mentionné précédemment.

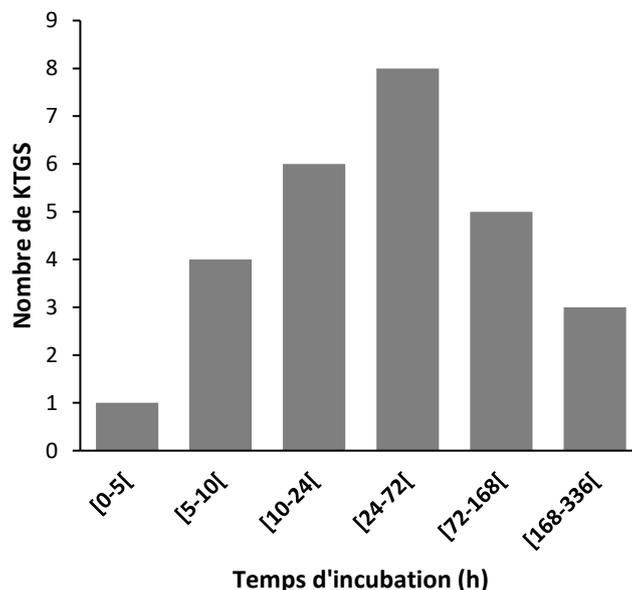


Figure 61 : Temps d'incubation requis pour les différentes KTGS décrites dans la littérature^{27,28d}

Ce projet ayant été imaginé dans le but de pallier ce problème fréquent, nous nous proposons à présent de déterminer la cinétique de la réaction photoréactive envisagée en KTGS. Pour cela, celle-ci a été conduite de la même façon que précédemment, avec 30 minutes d'incubation avant l'irradiation. Simplement, 150 μ L des solutions ont été prélevés à $t = 30$ s, 1, 3, 5, 10, 30 et 60 minutes d'irradiation à 365 nm puis traités et analysés en LC-MS/SIM. A l'aide d'une courbe de calibration, la variation de concentration en ligand **171** a pu être déterminée en fonction du temps d'irradiation (Figure 62). Nous remarquons que dix minutes d'irradiation semblent nécessaires pour parvenir à un plateau à une concentration en ligand **171** d'environ 140 nM. Ce temps d'irradiation semble être plus élevé que dans le cadre de la cinétique effectuée dans les expériences préliminaires (Figure 54). Cela pourrait potentiellement s'expliquer du fait que la *bCA-II* absorbe quelque peu la lumière et génère un effet écran à la diazirine.

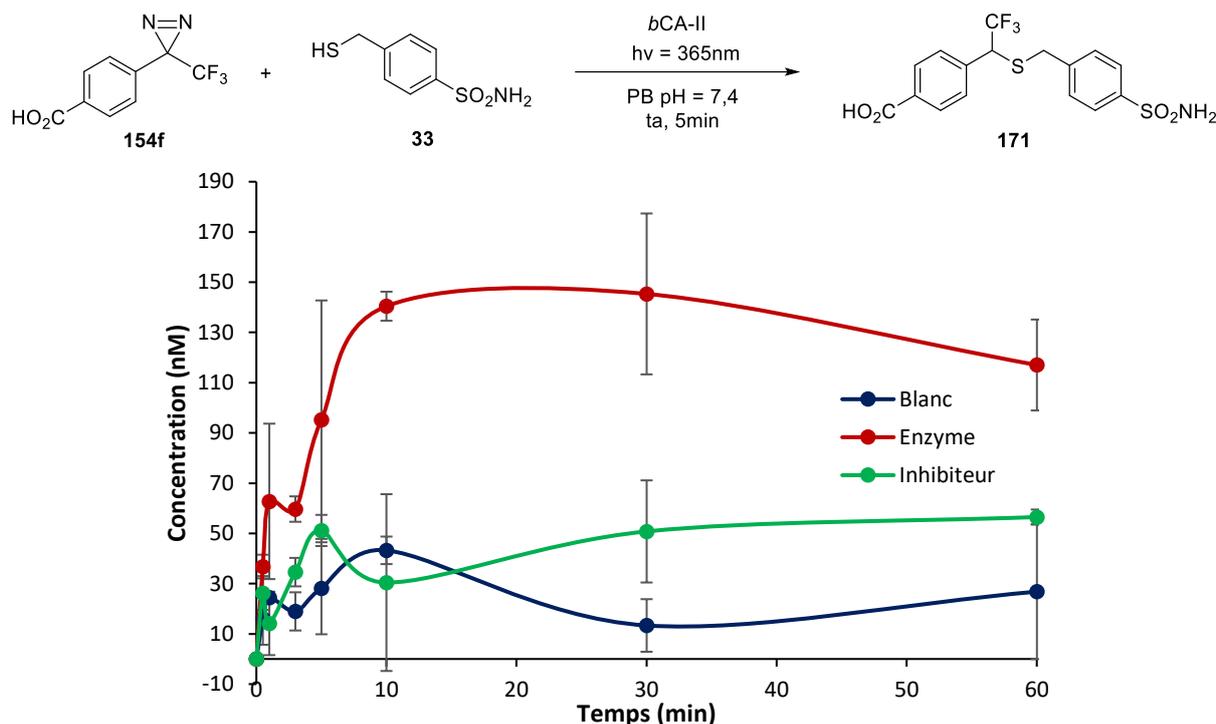


Figure 62 : Cinétique des expériences KTGS « Blanc », « Enzyme » et « Inhibiteur » réalisées par réaction entre la diazirine **154f** et le thiol **33**

Afin d'ajouter de la plus-value à ce temps de réaction particulièrement court, nous avons comparé ce temps de réaction avec la click *in situ*, KTGS de référence. De ce fait, l'expérience de formation d'un ligand de la CA-II par KTGS décrite par l'équipe de Kolb en 2005 a été reproduite à partir de fragments alcyne et azoture dans les mêmes conditions que la réaction photochimique, qui par ailleurs reposent sur celles développées dans cet article⁶⁴. Seulement, 200 μ L des solutions ont été prélevés après 8.5, 33, 58 h, 3, 5, 7 et 9 jours d'incubation à 37 °C puis traités et analysés en LC-MS/MRM. Une courbe de calibration a également été effectuée dans le but de transposer les aires de pics obtenus par analyse LC-MS en concentration (Figure 63, A).

Si l'on compare ces deux cinétiques, la réaction photoactivable atteint le plateau de formation du ligand en quelques minutes alors que le plateau n'est pas atteint après 10 jours de réaction avec la click *in situ*. En effet, le ligand attendu n'est observable qu'à partir de 33 h d'incubation (Figure 63, B). A noter que la réaction photochimique n'a été suivie que sur une échelle de temps de 1 h (trait plein en rouge), l'axe en pointillé ayant été rajouté afin de visualiser la concentration de produit formé par la réaction photochimique sur la même échelle de temps que la click *in situ* et ainsi en faciliter l'étude comparative. En conclusion, le temps de réaction en KTGS se voit drastiquement réduit, ce qui diminue les risques de dénaturation voire précipitation de la cible par un temps d'incubation trop long qui pourrait nous exposer à l'obtention de faux négatifs. Il est donc important de rappeler ici, que le temps d'incubation est très important avec l'outil KTGS, et que des expériences ont pu se révéler infructueuses

par un temps d'incubation trop court. Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'aucun produit de click *in situ* n'est observé en l'absence de CA-II, ce qui constitue un point fort de la KTGS mais pas toujours vérifié²⁷.

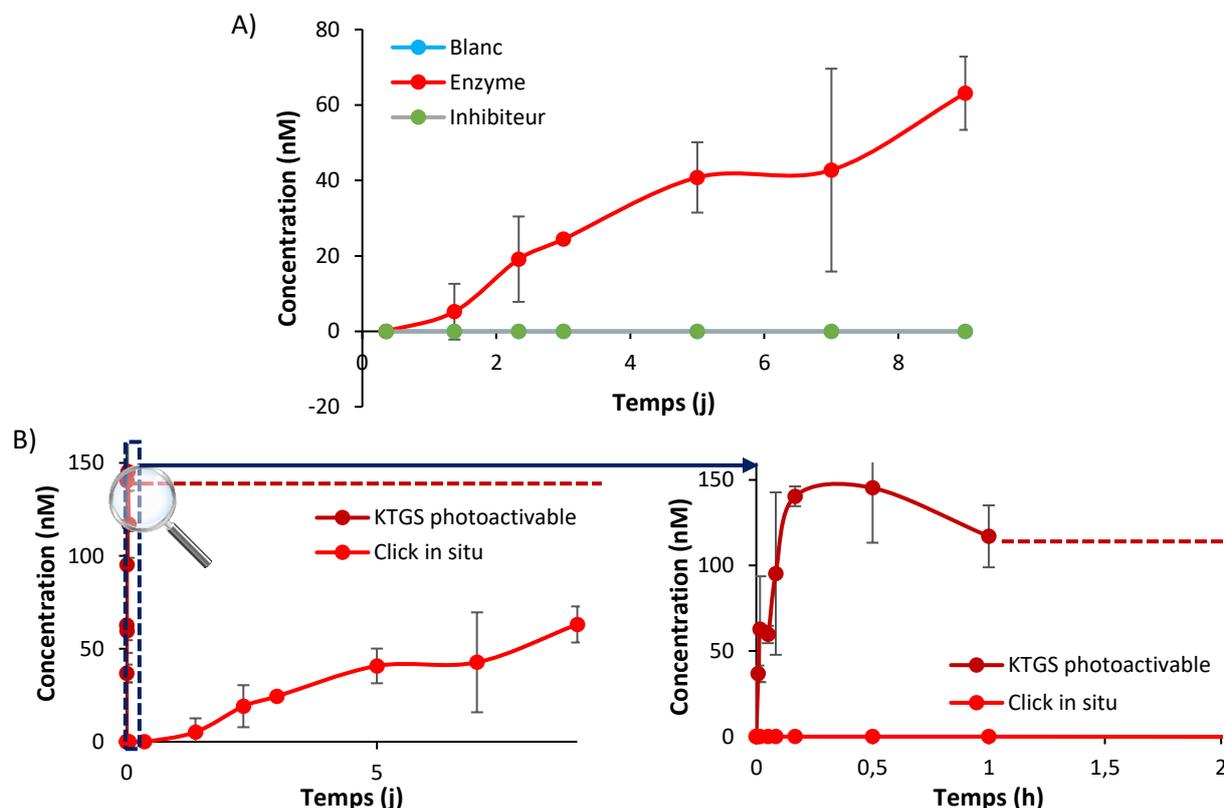
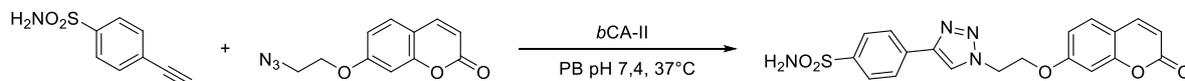


Figure 63 : A) Cinétique des expériences KTGS « Blanc », « Enzyme » et « Inhibiteur » réalisées par réaction de click *in situ*⁶⁴, B) Comparaison des expériences KTGS « Enzyme » de la click *in situ* de Sharpless et la réaction photoactivable développée au laboratoire

3.2.5. Mise en œuvre de la KTGS sous conditions dénaturantes de l'enzyme

Du fait de la vitesse de réaction de la KTGS photoactivable, nous souhaitons à présent étudier la réaction de KTGS en conditions dénaturantes. Cette étude a deux objectifs : 1) d'une part elle permettrait de confirmer *via* une nouvelle approche (complémentaire à celle de l'ajout d'un inhibiteur testé précédemment) de la spécificité de la ligation, c'est-à-dire que la réaction a bien lieu dans le site actif de la CA-II ; 2) simuler une dégradation progressive de la protéine, qui pourrait avoir lieu avec une biomolécule plus délicate à manipuler *in vitro*, et vérifier si la ligation, compte tenu de sa vitesse, peut tout de même avoir lieu.

Pour cela, un agent chaotropique, le chlorhydrate de guanidine (GdmHCl), sera utilisé afin de détruire la structure tertiaire de la protéine. En effet, en présence de ce composé, les protéines perdent leur structure native et vont s'enrouler de façon aléatoire. Cela s'expliquerait par le fait que le GdmHCl ait des interactions favorables avec les parties polaires de la protéine mais pas avec ses parties apolaires, ce qui désordonne sa structure¹⁶¹. Ce composé a également fait ses preuves en présence de la CA. En effet, à partir d'une concentration de 2M en GdmHCl, l'absorption de la biomolécule va être amenée à changer, notamment aux alentours de 230 nm du fait de la modification de l'environnement des chromophores aromatiques tels que l'indole (Trp) et le phénol (Tyr)¹⁶².

3.2.5.1. Dénaturation de la CA-II – Approche qualitative

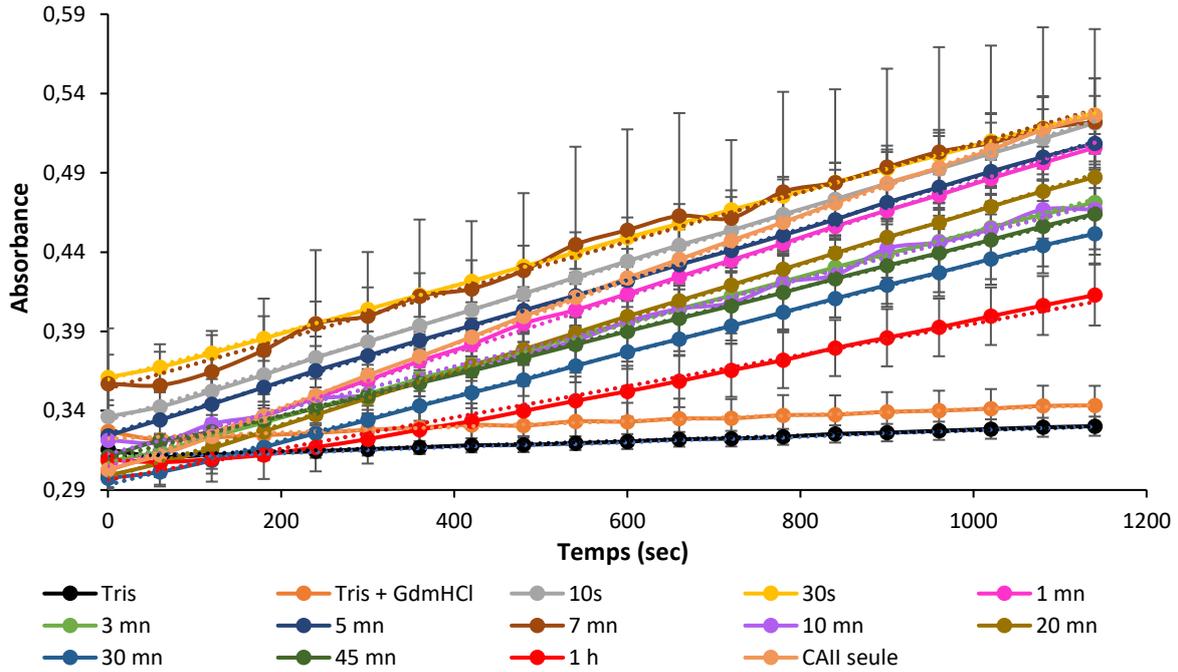
Dans un premier temps, nous nous proposons d'observer qualitativement la perte d'activité de la CA-II en fonction de son temps de résidence dans un milieu concentré à 5M de GdmHCl. Nous avons donc eu recours à la méthode de Pocker et Stones⁷² précédemment décrite.

Pour cela, des solutions stocks en *bCA-II* (60 μ M) et en GdmHCl (12 M) ont été préparées dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,5). Ensuite, une solution à 30 μ M de *bCA-II* a pu être préparée dans les mêmes conditions que celles de la KTGS, à la différence qu'une quantité de la solution stock en GdmHCl a été ajoutée à la dernière minute de façon à obtenir un milieu concentré à 5M en ce sel. A $t = 10$ s, 30s, 1, 3, 5, 7, 10, 20, 30 min, et 1h, un volume de la solution finale a été prélevé puis dilué dans le tampon Tris de façon à analyser son activité biologique résiduelle à l'aide du lecteur de plaques Tecan. Pour cela, 20 μ L d'une solution de PNPA ont ensuite été ajoutés de façon à observer les variations de la cinétique d'hydrolyse de la PNPA par observation de l'absorbance du milieu à 348 nm en fonction du temps d'incubation de la CA dans un milieu concentré à 5M en GdmHCl (Figure 64). Nous pouvons ainsi remarquer qu'une heure d'incubation est nécessaire pour que les 30 μ M de *bCA-II* présentent une différence d'activité visible, en l'occurrence divisée par deux.

Cette même manipulation a ensuite été conduite dans un milieu concentré à 2M en GdmHCl. Ici, aucune variation de l'activité de la CA-II n'est observée après 1 h d'incubation.

¹⁶¹ M. A. Qasim, M. Taha, *Protein & Peptide Letters* **2013**, 20, 187–191.

¹⁶² K.-P. Wong, C. Tanford, *Journal of Biological Chemistry* **1973**, 248, 8518–8523.



Expérience	Equation de la droite
Tampon Tris	$1,65 \cdot 10^{-5} + 3,11$
Tampon Tris + GdmHCl (5M)	$1,84 \cdot 10^{-5} + 3,22$
10 s d'incubation	$1,65 \cdot 10^{-4} + 3,34$
30 s d'incubation	$1,47 \cdot 10^{-4} + 3,60$
1 min d'incubation	$1,79 \cdot 10^{-4} + 3,05$
3 min d'incubation	$1,46 \cdot 10^{-4} + 3,07$
5 min d'incubation	$1,62 \cdot 10^{-4} + 3,25$
7 min d'incubation	$1,54 \cdot 10^{-4} + 3,54$
10 min d'incubation	$1,38 \cdot 10^{-4} + 3,13$
20 min d'incubation	$1,68 \cdot 10^{-4} + 2,98$
30 min d'incubation	$1,39 \cdot 10^{-4} + 2,93$
45 min d'incubation	$1,34 \cdot 10^{-4} + 2,93$
1 h d'incubation	$9,84 \cdot 10^{-5} + 3,10$
CA-II seule	$2,00 \cdot 10^{-4} + 3,02$

Figure 64 : Variation de l'absorbance d'un mélange de bCA-II et de PNPA en présence de GdmHCl (5M)

3.2.5.2. Mise en œuvre de la KTGS sous conditions dénaturantes de la CA

A partir de ces résultats, une réaction de KTGS a été conduite en présence de GdmHCl (5M). Les différents composants de chaque expérience « Blanc », « Enzyme » et « Inhibiteur » ont tout d'abord été incubés pendant 30 minutes. Puis, une solution de GdmHCl a été ajoutée au dernier moment de façon à atteindre une concentration de 5M en ce sel dans le mélange final. Une première série d'expériences (triplicat) a été irradiée à 365 nm pendant cinq minutes immédiatement après cet

ajout, puis une deuxième au bout d'une heure et une dernière série au bout de cinq heures. Chaque série a été traitée dans les conditions habituelles puis analysée en LC-MS/SIM et comparée à une analyse KTGS faite le même jour dans les conditions classiques. D'après les résultats présentés en Figure 65, le GdmHCl semble dénaturer presque immédiatement la CA-II à cette concentration. En effet, même directement après ajout, la cible ne semble plus catalyser aussi efficacement la KTGS. De plus, une diminution de la concentration en ligand dans les expériences « Blanc », « Enzyme » et « Inhibiteur » est observée, ce qui peut potentiellement induire que les fragments sont instables à de trop longs temps d'incubation sous ces conditions.

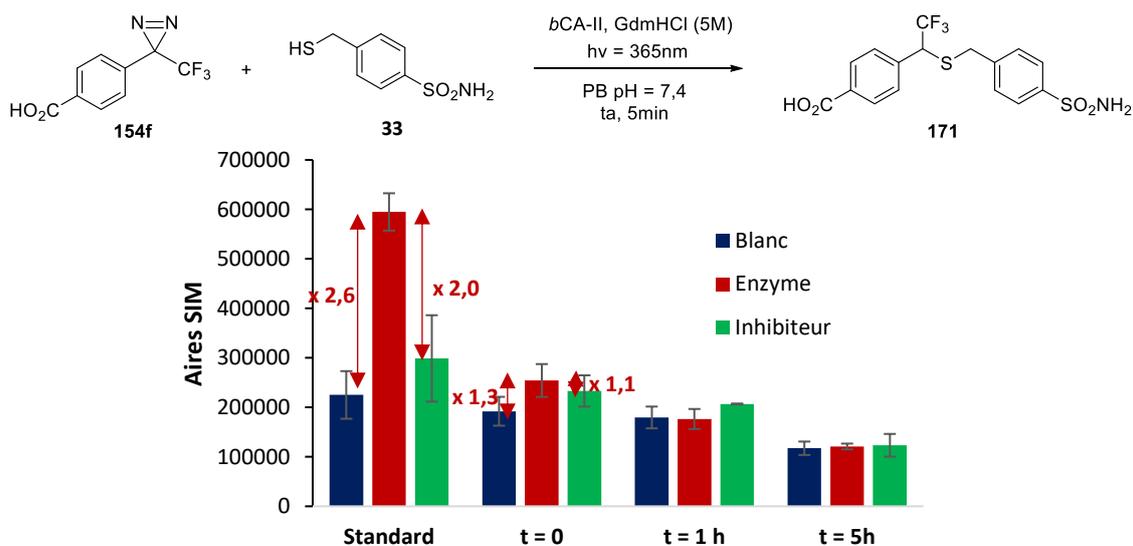


Figure 65 : Aires SIM du ligand **171** obtenues pour chaque expérience « Blanc », « Enzyme » et « Inhibiteur » (SIM m/z 403,9 $[M-H]^+$) en fonction du temps d'incubation en présence de GdmHCl (5M) comparées à la réaction standard

De ce fait, la même réaction a été entreprise, cette fois-ci en présence de GdmHCl à 2M (Figure 66). A l'inverse, ici, cette concentration ne semble pas suffisante pour dénaturer la CA-II. En effet, la tendance reste sensiblement identique même après cinq heures d'incubation. En revanche, une diminution de la concentration en ligand dans les expériences « Blanc », « Enzyme » et « Inhibiteur » est également observée sous ces conditions.

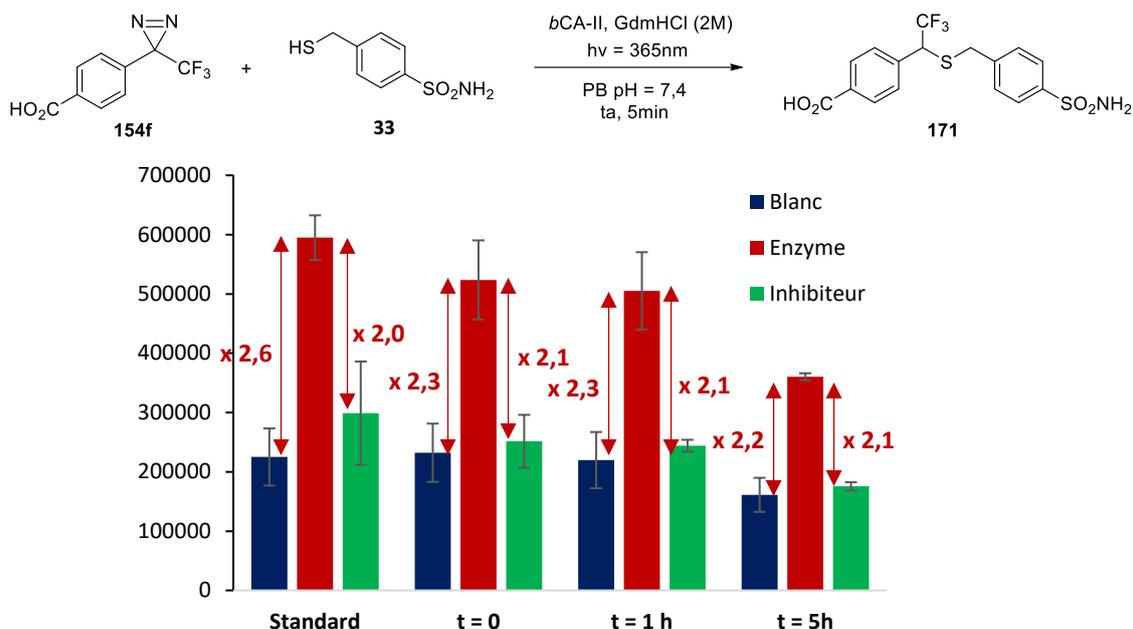


Figure 66 : Aires SIM du ligand **171** obtenues pour chaque expérience « Blanc », « Enzyme » et « Inhibiteur » (SIM m/z 403,9 [M-H]⁻) en fonction du temps d'incubation en présence de GdmHCl (2M) comparées à la réaction standard

Ainsi, une concentration située entre 2M et 5M pourrait donc s'avérer optimale dans le but de démontrer que la KTGS photoactivable peut fonctionner malgré l'environnement non favorable dans lequel se trouve la biomolécule. Une fois cette concentration idéale identifiée, la même expérience pourrait alors être réalisée sur la click *in situ* de Sharpless, KTGS qui requiert un temps d'incubation particulièrement long et dont la dénaturation progressive de l'enzyme pourrait impacter les rendements de formation du ligand escompté. Malheureusement, par manque de temps, nous n'avons pas pu conduire cette étude.

3.3. Diminution de la présence de faux positifs

Grâce à l'élaboration d'une réaction photoactivable en KTGS, les temps d'incubation au sein de la cible se voient drastiquement réduits, permettant ainsi de limiter la dénaturation de la biomolécule sous ces conditions. Cependant, la quantité de ligand formée dans les expériences « Blanc » et « Inhibiteur » n'est pas négligeable au regard de celle catalysée par la CA-II dans la réaction « Enzyme ». Afin de limiter cette problématique, plusieurs modifications des conditions de KTGS ont été imaginées.

3.3.1. Par ajout d'un partenaire thiol

Afin de diminuer la quantité de ligand **171** dans l'expérience « Blanc », différents partenaires thiol ont été ajoutés un à un à la réaction de KTGS. Ces partenaires ne présentant *a priori* aucune affinité particulière envers la cible biologique, leur réaction avec la diazirine **154f** ne devrait pas être promue par sa présence. En revanche, ceux-ci sont mis en compétition avec le thiol **33** dans le milieu environnant, ce qui pourrait permettre de diminuer la quantité de ligand **171** formé à l'extérieur de la biomolécule.

Différents thiols ont été testés un à un dans les conditions classiques, à savoir le mercaptoéthanol, la NAC et le thiophénol, aux pKa RSH/RS⁻ respectifs dans l'eau de 9,5, 8,7 et 5,8 contre 9,1 pour le mercaptotoluène sulfonamide **33** (valeurs déterminées sur MolGpKa). Tous trois ont été ajoutés dans les mêmes proportions que le thiol **33** dans le milieu (2 éq. par rapport à la bCA-II) et l'impact de leur ajout a été déterminé en comparant la quantité de ligand **171** formée dans les expériences « Blanc » et « Enzyme » en fonction du thiol supplémentaire ajouté (Figure 67). Les résultats obtenus avec la NAC et le 2-mercaptoéthanol ne diffèrent pas sensiblement de la réaction standard. Il se peut que ces deux thiols réagissent moins vite que le thiol **33** dont l'acidité plus élevée de ce dernier génère une certaine proportion de thiolate beaucoup plus réactif. En revanche, avec le thiophénol, une nette diminution de la formation du ligand est observée spécifiquement en présence de l'enzyme. En effet, dans les réactions de contrôle « Blanc » et « Inhibiteur », la quantité de produit formée est similaire à celle formée dans le standard. Il se peut que le thiophénol dont le pKa est nettement plus bas que celui de **33** soit un bon ligand de la CA-II et non pas seulement un meilleur nucléophile. En effet, dans cette dernière hypothèse, une diminution de la formation du ligand serait observée spécifiquement dans les expériences « Blanc » et « Inhibiteur », ce qui n'est pas le cas dans notre expérience. Kaiser a effectivement montré dans un article de 1971 que le 4-nitrothiophénol et le 2,4-dinitrothiophénol étaient de bons ligands de la bCA alors que leurs analogues oxygénés, nitrophénols, ne présentent pas d'activités inhibitrices¹⁶³. Il en est de même pour les sélénols, analogues aux thiophénols dont la nucléophilie est plus importante¹⁶⁴. Il conviendrait donc de vérifier si le thiophénol non substitué, dans notre cas, est un bon ligand de la bCA-II.

¹⁶³ J. Olander, E. T. Kaiser, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, *45*, 1083–1088.

¹⁶⁴ A. Angeli, D. Tanini, A. Nocentini, A. Capperucci, M. Ferraroni, P. Gratteri, C. T. Supuran, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 648–651.

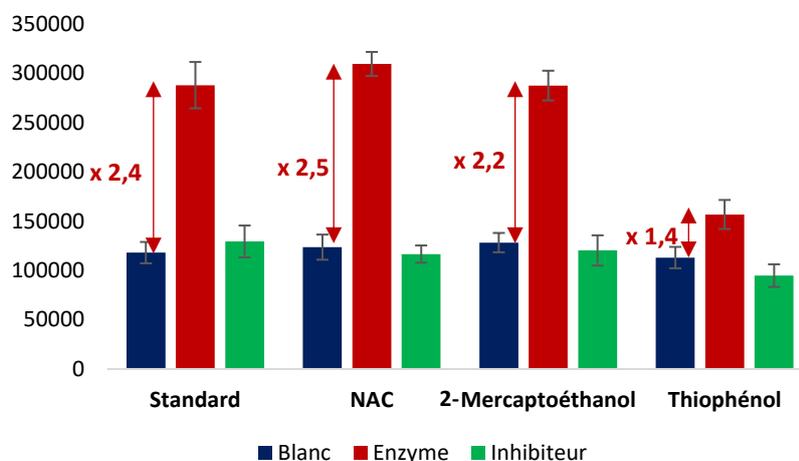
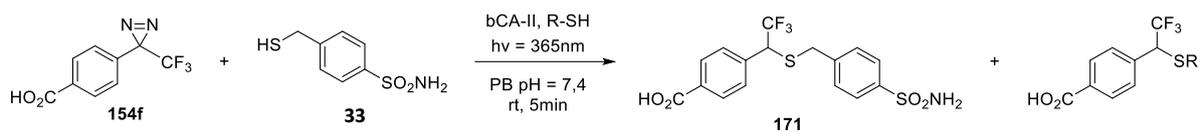


Figure 67 : Aires SIM du ligand **171** obtenues pour chaque expérience « Blanc », « Enzyme » et « Inhibiteur » (SIM m/z 403,9 [M-H]) en présence de R-SH comparées à la réaction standard

3.3.2. Par expérience de FRET

La bCA-II possède en son site actif trois résidus tryptophane absorbant à 280 nm et émettant aux alentours de 350 nm¹⁶⁵. De ce fait, en excitant la biomolécule à 280 nm, celle-ci peut être capable d'émettre dans la zone d'absorption du fragment diazirine **154f**, permettant de l'exciter à son tour et ainsi former le carbène correspondant (Schéma 94). Ce phénomène est appelé le transfert d'énergie par résonance de Förster (FRET)¹⁶⁶. Il s'agit d'un procédé de transfert d'énergie non radiatif à partir d'interactions entre un donneur et un accepteur. Par photoexcitation, l'énergie d'excitation du donneur dans son état excité peut être transférée à l'accepteur, lui-même à son état fondamental, si et seulement si ces derniers sont suffisamment proches l'un de l'autre (généralement 10-100 Å). Ainsi, l'activation de la diazirine ne devrait avoir lieu qu'au sein de l'enzyme, voire au voisinage de celle-ci dans une certaine limite de distance mentionnée précédemment, ce qui pourrait ainsi éviter la formation du ligand **171** dans l'expérience « Blanc ».

¹⁶⁵ H. Liu, H. Zhang, B. Jin, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2013**, 106, 54–59.

¹⁶⁶ L. Wu, C. Huang, B. P. Emery, A. C. Sedgwick, S. D. Bull, X.-P. He, H. Tian, J. Yoon, J. L. Sessler, T. D. James, *Chem. Soc. Rev.* **2020**, 49, 5110–5139.

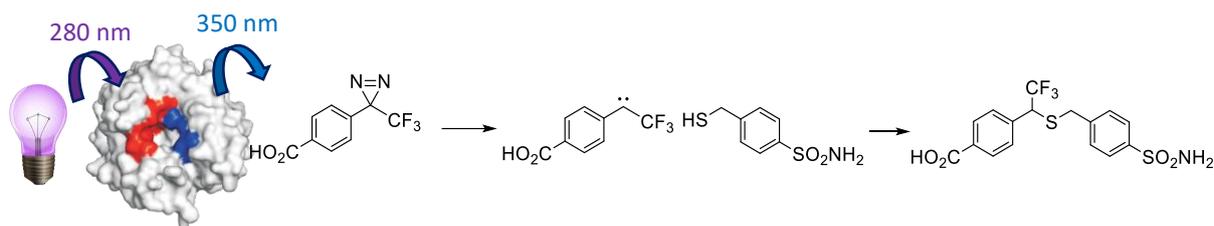


Schéma 94 : Expérience de FRET imaginée en KTGS pour réduire la quantité de ligand **171** dans l'expérience « Blanc »

De ce fait, l'expérience en KTGS a été conduite dans les conditions dites standards. Seul le mode d'irradiation change. En effet, les échantillons ont été irradiés dans une cuve en quartz par le fluorimètre Fluorolog à 280 nm, le verre absorbant les rayons UV-C. Malheureusement, les résultats sont peu probants. En effet, l'irradiation à 280 nm permet tout de même d'exciter la diazirine **154f** en l'absence de la biomolécule, le noyau aromatique positionné en *alpha* absorbant à cette longueur d'onde et transmettant ainsi son énergie à la fonction photoactivable (Figure 68, A). Cela a d'ailleurs pu être observé par mesure de l'absorption du système. En effet, la bande d'absorption correspondant à la diazirine disparaît sous irradiation à 280 nm en l'absence d'enzyme (Figure 68, B).

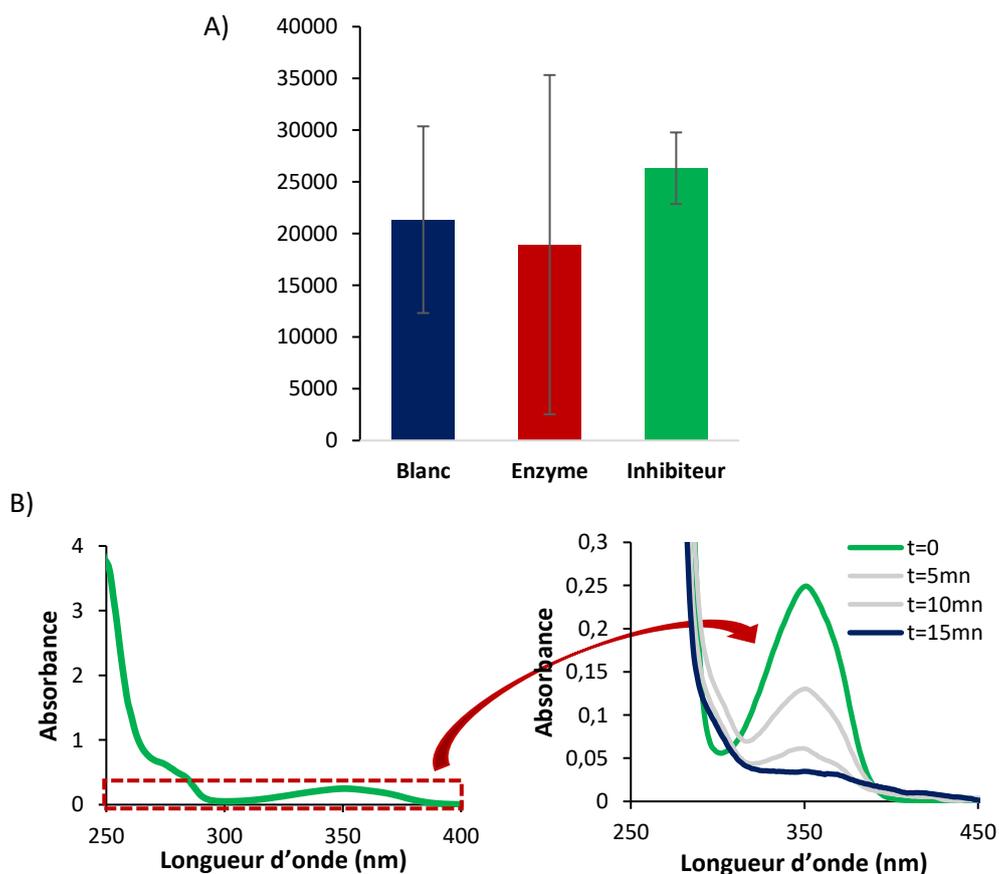


Figure 68 : A) Aires SIM du ligand **171** obtenues pour chaque expérience « Blanc », « Enzyme » et « Inhibiteur » (SIM m/z 403.9 [M-H]⁻) lors de l'expérience FRET, B) Disparition de la bande d'absorption de la diazirine **154f** ($C = 600 \mu\text{M}$ dans le tampon PB (0,25 M, $\text{pH} = 7,4$)) sous irradiation à 280 nm

3.3.3. Diminution des quantités de fragment

Pour finir, la concentration des fragments utilisés en réaction de KTGS a été réduite dans le but d'augmenter l'écart entre l'expérience « Blanc » et « Enzyme » en diminuant la formation non spécifique du ligand. En effet, la concentration en fragments sera moindre dans le tampon, minimisant ainsi leurs chances de rencontre, alors qu'elle devrait rester élevée dans l'enzyme où l'ancrage des fragments sur la bCA-II leur permettra d'être assez proches pour réagir ensemble. Trois expériences ont été mises en œuvre, la première avec une concentration en diazirine **154f** divisée par trois, la deuxième avec une concentration en thiol **33** divisée par trois et la troisième avec les concentrations en ces deux fragments divisées par trois. Pour le reste, les conditions réactionnelles restent les mêmes.

Tandis que la limite de détection n'est pas atteinte dans les première et troisième conditions, l'expérience où la quantité de thiol est divisée par trois nous permet d'accéder à 6,1 fois plus de ligand **171** dans l'expérience « Enzyme » que dans l'expérience « Blanc » (Figure 69). L'écart est donc deux fois plus important que dans les conditions classiques. Ces résultats sont assez cohérents avec ce à quoi l'on pourrait s'attendre quant à l'impact d'une diminution du fragment ancre thiol **33** ou fragment non-ancre diazirine **154f**. En effet, une diminution du fragment thiol ancre permet de diminuer drastiquement sa concentration à l'extérieur de l'enzyme, car avec un IC_{50} de $0,36 \pm 0,04 \mu M$, l'enzyme est probablement entièrement complexée à celui-ci aux concentrations de la KTGS. En revanche, le fragment diazirine ne présentant pas d'activité biologique ($IC_{50} > 800 \mu M$), une réduction de sa concentration va réduire sa concentration au voisinage de l'enzyme de la même manière que dans le milieu extérieur, et donc autant impacter la formation du ligand dans l'expérience « Blanc » que dans l'expérience « Enzyme ».

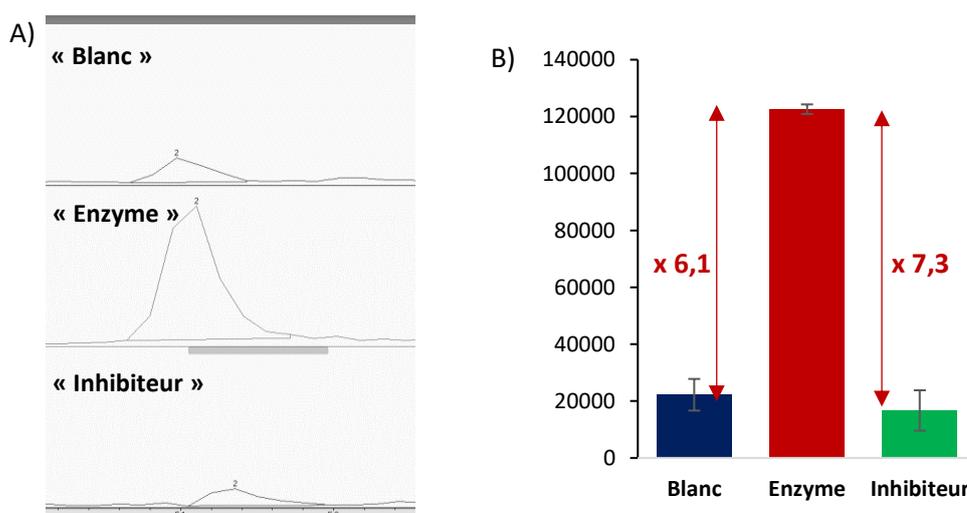


Figure 69 : A) Analyses LC-MS/SIM obtenues après 5 min d'irradiation de la diazirine **154f** en présence du thiol **33** dont la concentration a été divisée par 3 (« Blanc », « Enzyme », « Inhibiteur ») (SIM + EIC m/z 403,9 [M-H]⁻), B) Aires SIM + EIC de la concentration de ligand obtenu pour chaque expérience

Suite à ces résultats, les deux réactions de contrôle effectuées précédemment ont été entreprises avec une concentration en thiol divisée par trois, à savoir avec le mercaptotoluène **77** ou en remplaçant l'anhydrase carbonique par une autre enzyme, ici le lysozyme d'œuf (Figure 70). Dans ces deux cas, l'expérience « Enzyme » montre des résultats similaires à l'expérience « Blanc », ce qui valide la nécessité de travailler en présence de la fonction sulfonamide et de l'anhydrase carbonique pour que la réaction en KTGS soit un succès.

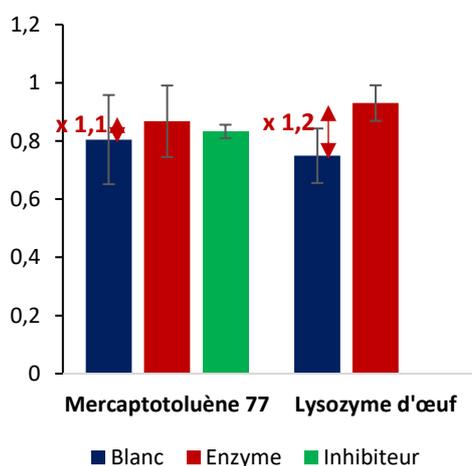


Figure 70 : Aires SIM normalisées du ligand **171** obtenues pour chaque expérience « Blanc », « Enzyme » et « Inhibiteur » (SIM m/z 403.9 [M-H]⁺) dont la concentration en thiol a été divisée par 3 lors des réactions de contrôle en présence de mercaptotoluène **77** ou de lysozyme d'œuf

4. Etude du ligand 171 formé

4.1. Impact du groupement trifluorométhyle sur l'activité du ligand

4.1.1. Etat de l'art

Le fluor est le plus petit substituant capable de remplacer l'hydrogène, et la liaison C-F semble pouvoir remplacer la liaison C-H sans pour autant affecter significativement la taille de la molécule. En revanche, cet atome est l'élément le plus électronégatif. De ce fait, la liaison C-F est courte, forte et grandement polarisée¹⁶⁷.

Auparavant, l'introduction de fluors était vue comme incompatible avec les milieux biologiques. C'est seulement depuis les années 70 que les molécules actives fluorées ont pris une place importante dans le monde de la chimie médicinale, et à présent 20% des médicaments disponibles en

¹⁶⁷ B.-C. Wang, L.-J. Wang, B. Jiang, S.-Y. Wang, N. Wu, X.-Q. Li, D.-Y. Shi, *Mini Rev Med Chem* **2017**, *17*, 683–692.

pharmacie présentent un atome de fluor dans leur squelette.¹⁶⁸ En effet, l'introduction de fluors au sein de principes actifs peut permettre de moduler les propriétés physicochimiques de la molécule, telles que sa lipophilie moyenne qui se voit augmenter de 0,6 lorsque le groupement trifluorométhyle remplace le méthyle. De plus, le caractère électroattracteur de ce groupement joue un rôle important dans la stabilité de la molécule. En effet, la stabilité métabolique est améliorée, les atomes de fluor permettant de bloquer métaboliquement les sites labiles ou oxydables. Par exemple, la substitution d'un des hydrogènes de l'érythromycine, un antibactérien particulièrement utilisé, par un fluor, donnant la flurithromycine, a pu augmenter son temps de vie et sa stabilité à plus de deux semaines dans les conditions acides présentes dans l'estomac¹⁶⁹ (Figure 71).

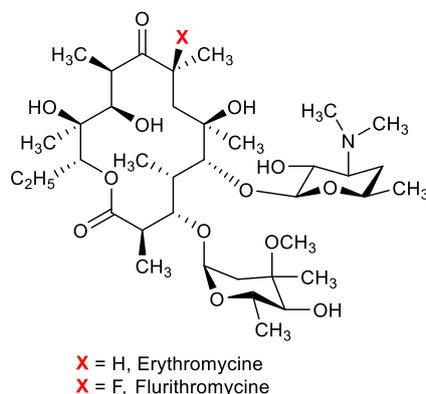


Figure 71 : Remplacement d'un hydrogène par un fluor dans la molécule d'érythromycine

Le remplacement du $-CH_3$ par le $-CF_3$ ne permet pas forcément d'améliorer la bioactivité de la molécule active. En effet, sur 28003 paires de composés, seuls 9,19% voient leur activité biologique augmenter par cette substitution. En effet, un groupement trifluorométhyle va se lier préférentiellement avec des résidus phénylalanine, méthionine, leucine et tyrosine, tandis que le méthyle se lie plutôt avec la leucine, la méthionine, la cystéine et l'isoleucine¹⁷⁰. Ainsi, d'après la Figure 72, la substitution du $-CH_3$ par le $-CF_3$ autour de la phénylalanine, histidine ou arginine pourrait avoir un effet positif sur l'affinité de la molécule envers sa cible biologique. Cela peut s'expliquer par la haute électronégativité du groupement $-CF_3$ qui va pouvoir changer la distribution électronique de petites molécules et ainsi influencer les interactions avec les résidus de protéines.

¹⁶⁸ N. A. Meanwell, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 14, 5822–5880.

¹⁶⁹ G. Blandino, A. M. Lo Bue, I. Milazzo, D. V. M. Nicolosi, G. Calì, V. Cannavò, B. Rossetti, *Journal of Chemotherapy* **2004**, *16*, 151–155.

¹⁷⁰ A. Abula, Z. Xu, Z. Zhu, C. Peng, Z. Chen, W. Zhu, H. A. Aisa, *J. Chem. Inf. Model.* **2020**, *60*, 6242–6250.

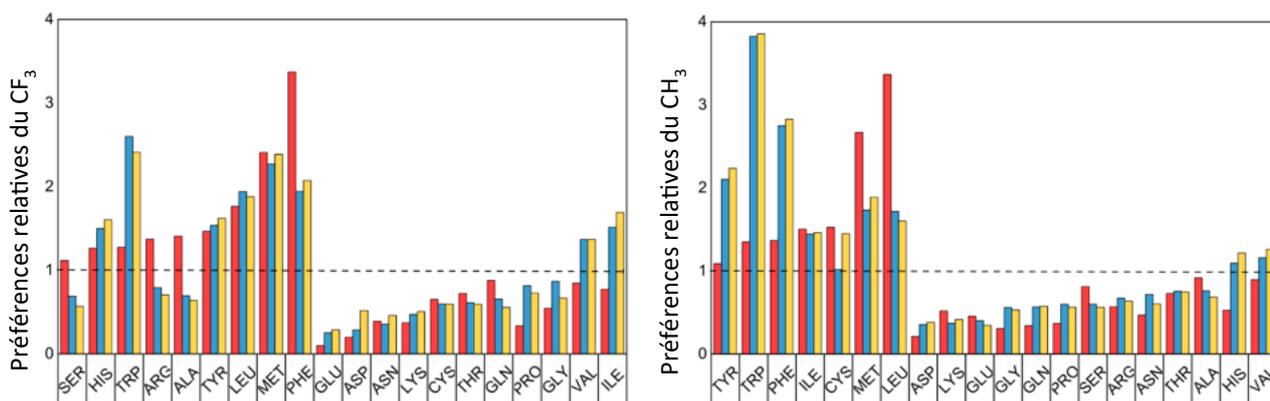


Figure 72 : Distribution des résidus autour du $-CF_3$ et du $-CH_3$ à une distance de 3 \AA (rouge), $3 \text{ \AA} < d < 4 \text{ \AA}$ (bleu) et $4 \text{ \AA} < d < 5 \text{ \AA}$ (jaune) (Figure extraite et modifiée de l'article¹⁷⁰)

Ainsi, la présence de groupements trifluorométhyle peut s'avérer utile dans le cadre de la découverte du médicament et de son élaboration.

4.1.2. Synthèse du ligand 171 et de ses analogues

A partir de cette étude, nous nous proposons d'étudier l'impact du groupement trifluorométhyle sur l'activité du ligand **171**. Dans un premier temps, nous avons synthétisé le ligand en question par substitution nucléophile décrite dans la partie 3. 1. 1. (Schéma 95). A partir d'un gramme de la molécule **162**, une substitution nucléophile en présence du thiol **33** est effectuée avec de la DIPEA dans le but de parvenir au thioéther **173**, dont l'acide est déprotégé en présence d'acide trifluoroacétique (TFA) de façon à obtenir le ligand **171** avec un rendement global de 15%.

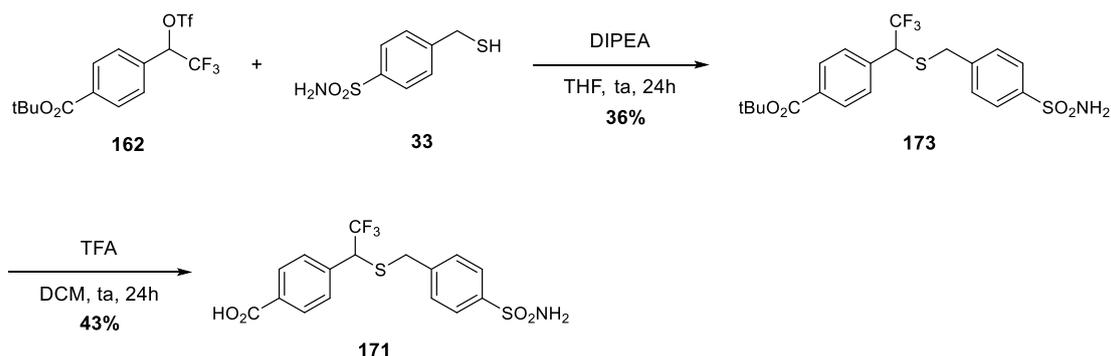
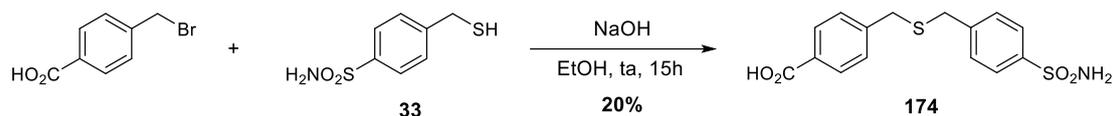


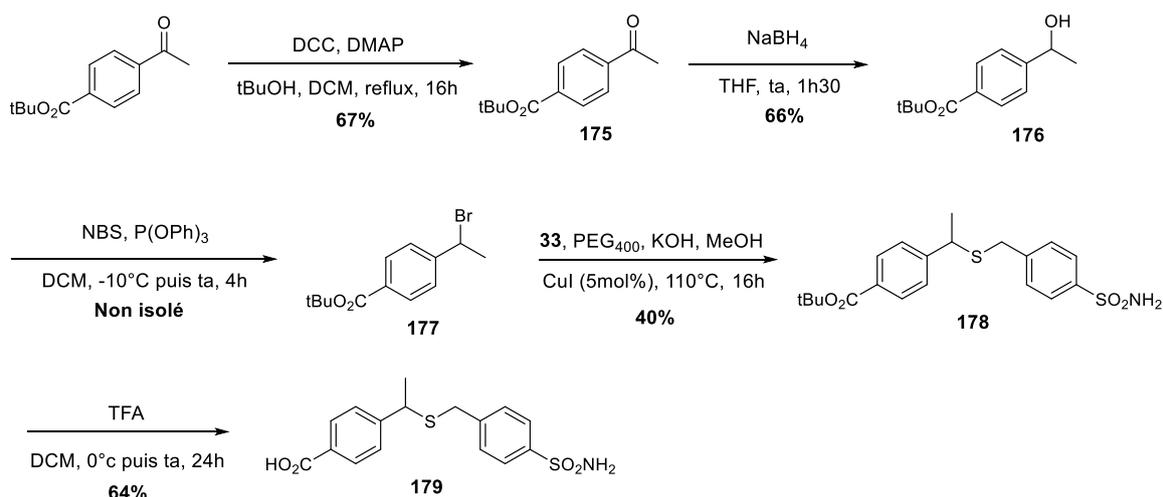
Schéma 95 : Voie de synthèse du ligand **171**

Nous avons ensuite souhaité comparer son activité à son analogue monosubstitué, le composé **174** (Schéma 96). En effet, ce ligand est bien étudié puisqu'il a déjà été obtenu par Huc lors de la mise en œuvre de la KTGS entre un chlorure d'alkyle et un thiol, inhibiteur de CA-II à la constante d'inhibition K_i de 84 nM^{51} . Sa synthèse se fait en une étape, à savoir par substitution nucléophile de l'acide 4-bromométhylbenzoïque par le thiol **33** en présence de soude.

Schéma 96 : Synthèse de l'analogue monosubstitué **174**

Les deux IC_{50} de ces composés ont pu être calculés, une fois de plus par la méthode de Pocker et Stones⁷², et donne des activités similaires de 244 ± 25 nM pour le ligand **171** et 433 ± 25 nM pour le ligand **174**. Le groupement CF_3 ne semble pas avoir, ici, un impact significatif sur l'activité du ligand. En revanche, du fait de ses potentielles interactions supplémentaires avec les acides aminés qui l'entourent, il serait plus intéressant de déterminer la constante de dissociation K_D de ces ligands, cette constante rendant compte de l'affinité de la molécule. Ne possédant pas le temps et les moyens nécessaires à cette mesure, la détermination des affinités sera externalisée.

Pour compléter l'étude et l'envoi des molécules d'intérêt, la version méthylée a elle aussi été synthétisée (Schéma 97). Pour cela, l'acide 4-acétylbenzoïque a d'abord été protégé par une réaction d'estérification de Steglich de façon à obtenir le composé **175** avec un rendement de 67%. La cétone a ensuite été réduite au $NaBH_4$ et l'alcool **176** résultant a ensuite été bromé en présence de NBS et de triphénylphosphite, méthode décrite précédemment, pour parvenir au composé **177**. Enfin, la substitution nucléophile du composé bromé par le thiol **33** a été entreprise en présence de potasse et d'iodure de cuivre (CuI)¹⁷¹ pour former le ligand **178** avec un rendement de 40%. Enfin, l'acide carboxylique est déprotégé en présence de TFA pour parvenir à l'analogue méthylé **179** avec un rendement global assez faible de 4% sur cinq étapes.

Schéma 97 : Voie de synthèse du ligand méthylé **179**

La comparaison des différentes constantes de dissociation de chaque analogue nous permettra donc de conclure quant à l'impact du groupement trifluorométhyle sur l'affinité du ligand **171** formé.

¹⁷¹ W.-Y. Zhou, M. Chen, P.-Z. Zhang, A.-Q. Jia, Q.-F. Zhang, *J. Chem. Crystallogr.* **2021**, *51*, 301–310.

4.2. Etude du centre asymétrique du ligand 171

4.2.1. Etude de l'excès énantiomérique obtenu lors de la réaction de KTGS

4.2.1.1. Problématique rencontrée sous analyse SIM

Le ligand **171** est chiral car il possède en sa structure un centre stéréogène. Il s'agit du carbone portant la fonction trifluorométhyle. Ce composé se formant au sein du site actif de l'anhydrase carbonique donc dans un environnement chiral, nous nous sommes intéressés à la stéréosélectivité que pourrait éventuellement conférer la géométrie de la biomolécule lors de la formation de ce ligand. Pour cela, les réactions de KTGS ont été analysées par le spectromètre de masse à piège d'ions Bruker HCT (utilisé jusqu'à présent en KTGS) couplé à une colonne chirale (ChiralCel® OD-RH). La réaction standard est mise en œuvre puis analysée en LC-MS/SIM par ce système quelque peu changé. Dans ce cas de figure, les résultats sont peu probants. Tandis que la référence présente bel et bien un chromatogramme composé de deux pics bien distincts, les trois expériences « Blanc », « Enzyme » et « Inhibiteur » effectuées ne présentent qu'un seul pic. Il ne s'agit pas des deux énantiomères du ligand **171** attendus, mais du pont disulfure **180** formé en grande quantité par le thiol **33** dans les conditions de KTGS, celui-ci présentant une masse molaire différente de 1 g/mol et dont son massif isotopique comprend la masse molaire du composé **171** (Figure 73). La méthode SIM n'est donc pas la plus appropriée dans ce cas de figure, ce qui nous a amené à étudier un autre système d'analyse.

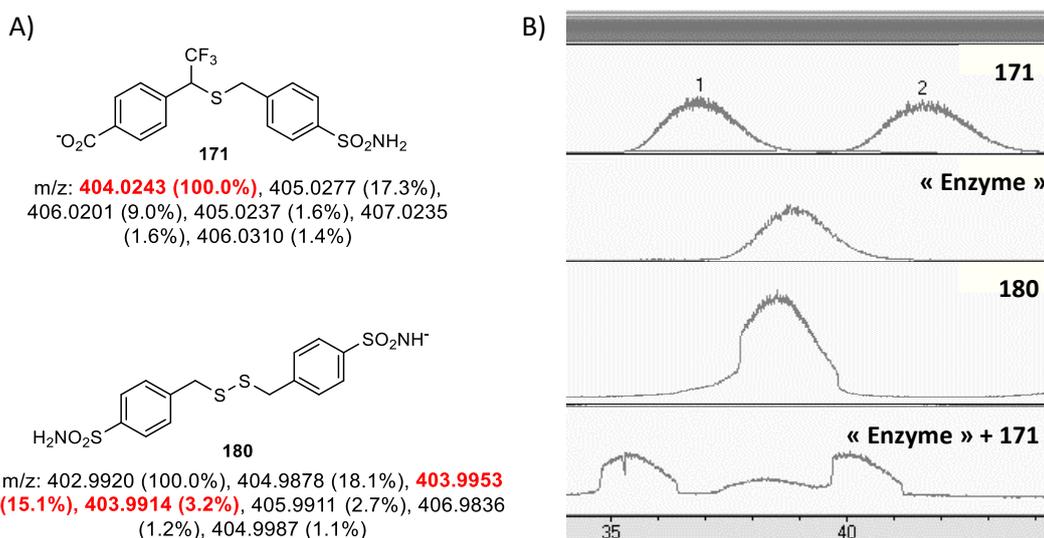


Figure 73 : A) Détermination des massifs isotopiques des fragments [M-H] des composés **171** et **180** (en rouge, les pics isotopiques se superposent), B) Analyses LC-MS/SIM des composés **171** et **180**, de l'expérience « Enzyme » en KTGS, et d'un mélange « Enzyme » + **171** (SIM m/z 403,9 [M-H])

4.2.1.2. Changement de méthode de spectrométrie de masse

Une autre méthode de détection en masse est utilisée : la dite *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) (Schéma 98). Il s'agit d'une méthode de spectrométrie de masse *tandem* dans laquelle l'ion d'une masse particulière dit « parent » est sélectionné dans un premier temps. Celui-ci va ensuite subir une fragmentation, et l'un des fragments dits « fils » sera ensuite sélectionné. La détection se concentrera donc seulement sur cette transition, ce qui nous permettra donc de différencier le composé **171** du composé **180**.

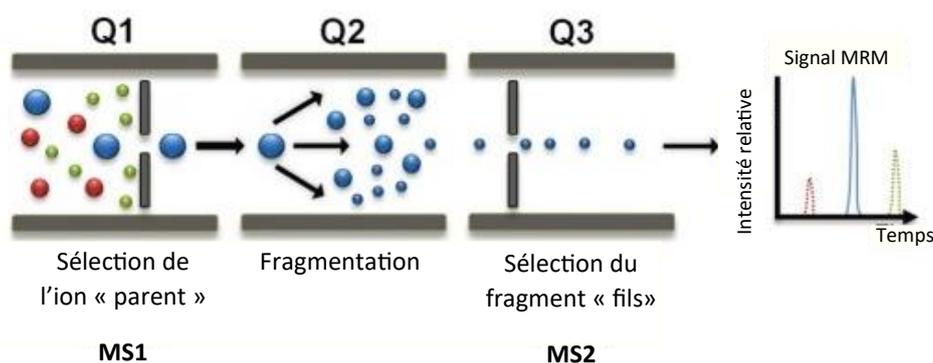


Schéma 98 : Principe de la MRM présenté sur un spectromètre triple quadripôle (Schéma extrait et modifié de l'article¹⁷²)

Une première analyse MS/MS est effectuée sur les composés **171** et **180** afin de déterminer les fragments du ligand **171** qui lui sont propres. Le fragment correspondant à la masse molaire 359,9 g/mol est le premier obtenu. Il s'agit de la perte de la fonction acide carboxylique sur la structure du ligand (Figure 74). La suite des analyses s'est donc faite à partir de la transition m/z 403,9 [M-H]⁻ → m/z 359,9 [M2-H]⁻.

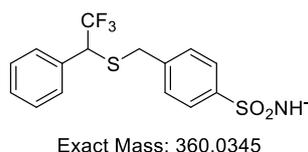


Figure 74 : Fragment d'intérêt du ligand **171**

Grâce à cela, les pics correspondant aux énantiomères du ligand **171** peuvent être discriminés de l'impureté **180** (Figure 75). En revanche, l'appréciation des chromatogrammes n'est pas optimale, la sensibilité de cet appareil étant moindre. De ce fait, nous avons pu observer cette même transition sur deux autres types de spectromètres de masse : le triple quadripôle Xevo (TQ) de Waters et l'Orbitrap™ Exploris 120 de Thermo Fisher. Ces deux appareils offrent de meilleurs résultats pour des raisons différentes. D'abord, la présence de trois quadripôles dans le TQ permet d'isoler chaque sélection dans un compartiment différent, ce qui diminue les collisions entre les ions et permet d'accéder à une

¹⁷² E. S. Boja, H. Rodriguez, *Annals of Laboratory Medicine* **2011**, 31, 61–71.

sensibilité optimale. L'Orbitrap quant à lui permet de sélectionner avec haute résolution la masse molaire du ligand, permettant de ce fait de davantage discriminer ses ions des autres. Ainsi, des chromatogrammes optimisés sont obtenus dans les deux cas.

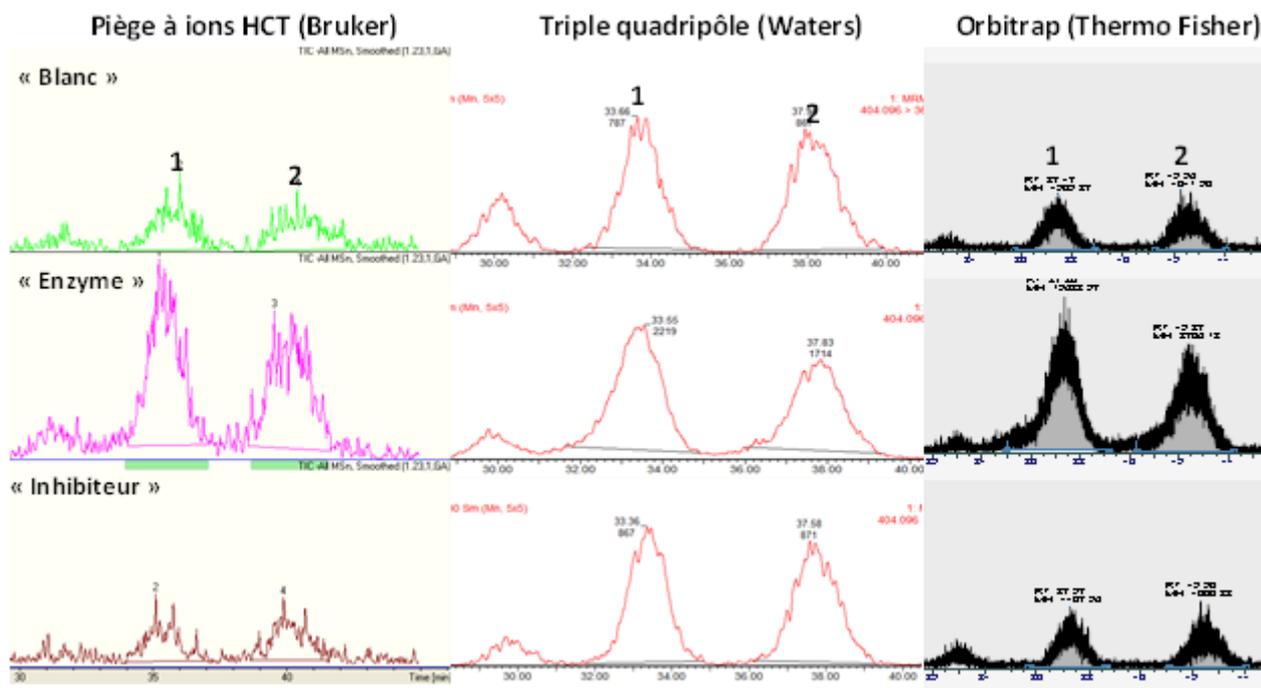


Figure 75 : Analyses LC-MS/MRM obtenues pour chaque expérience de KTGS standard (« Blanc », « Enzyme », « Inhibiteur ») (transition MRM m/z 403,9 [M-H]⁻ → m/z 359,9 [M2 -H]⁻) sous différents analyseurs

La détermination des excès énantiomériques (ee) a ensuite pu se faire à partir des trois types d'analyseurs utilisés (Tableau 10). Les chromatogrammes obtenus à partir du HCT nous donnent une tendance de la stéréosélectivité conférée par la CA. En revanche, les analyses « Blanc » et « Inhibiteur » devraient donner des mélanges racémiques du fait de l'absence de conditions favorisant l'un ou l'autre des énantiomères. Or, ce n'est pas le cas, ce qui invalide cette étude. En revanche, les analyses obtenues à partir du triple quadripôle et de l'Orbitrap semblent interprétables, les analyses « Blanc » et « Inhibiteur » présentant des mélanges quasi racémiques et l'analyse « Enzyme » un résultat bien différent. Ainsi, l'anhydrase carbonique semble favoriser l'obtention du produit 1 avec un ee de 12 à 16% en fonction de l'analyseur utilisé. Ces excès n'ont malheureusement pas pu être améliorés par variation de température du système ou par excès d'enzyme présente lors de la réaction. Par ailleurs, ils sont à prendre avec précaution compte tenu de la faible résolution des pics obtenus par les différents analyseurs.

	HCT	Triple quadripôle	Orbitrap
« Blanc »	4% produit 2	2% produit 2	2% produit 1
« Enzyme »	2% produit 1	12% produit 1	16% produit 1
« Inhibiteur »	18% produit 2	2% produit 2	2% produit 1

Tableau 10 : Détermination des ee du produit majoritaire de chaque expérience « Blanc », « Enzyme » et « Inhibiteur » en fonction du type d'analyseur utilisé

4.2.1.3. Etude de *docking*

De façon à déterminer quel énantiomère la CA pourrait sélectivement former, une étude de *docking* a d'abord été entreprise par le Pr. Jana Sopkova (CERMN, UNICAEN EA 4258, Caen). Dans un premier temps, un ligand de référence de type sulfonamide co-cristallisé dans la CA-II a été modélisé afin de vérifier que le positionnement issu du *docking* était conforme à celui issu du RX et donc valider les paramètres utilisés pour cette famille de molécules. Ensuite, les deux énantiomères possibles du ligand **171**, **(S)-171** et **(R)-171** ont été *dockés* afin de connaître lequel des deux complexes alors formé avec la protéine serait le plus stabilisé par la métalloenzyme. Pour faire ce calcul, les acides des formes (R) et (S) ont été déprotonés, le tampon phosphate utilisé lors de la manipulation étant à pH = 7,4. Enfin, à partir de la position offrant les meilleurs résultats pour chaque énantiomère (Figure 76), l'énergie d'interaction (E_{inte}) avec la biomolécule a pu être déterminée. Ainsi, il s'avère que l'énantiomère (S) interagirait davantage avec l'anhydrase carbonique ($E_{\text{inte (R)}} = -23,6 \pm 5,0$ kcal/mol contre $E_{\text{inte (S)}} = -37,6 \pm 5,4$ kcal/mol). Ainsi, la configuration (S) devrait être favorisée par la présence de la CA lors de la KTGS.

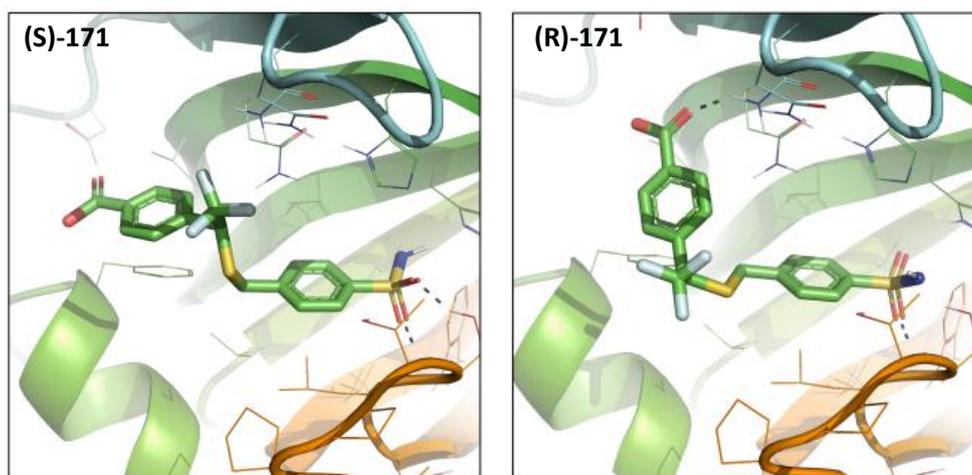


Figure 76 : Positions des énantiomères du ligand **171** offrant les meilleures interactions avec l'anhydrase carbonique II (PDB : 6SKT)

4.2.2. Synthèse énantiosélective des ligands (S)-171 ou (R)-171

Dans le but de valider les calculs théoriques proposés par le *docking*, la synthèse des deux énantiomères (R) et (S) a été étudiée. Nous avons donc choisi d'établir la configuration absolue du carbone asymétrique de la molécule à partir de la synthèse de l'alcool trifluorométhylé. Différentes méthodes peuvent permettre d'accéder sélectivement à l'un des deux énantiomères, à savoir la réduction asymétrique de la cétone **151** de départ ou la déraccémisation de l'alcool **160**. Ces deux techniques ont donc été testées.

4.2.2.1. Réduction énantiosélective de la cétone trifluorométhylée 151

La première réduction asymétrique de cétone trifluorométhylée a été réalisée en 1978 à partir de levure du boulanger commerciale dans le but de synthétiser sélectivement l'alcool de configuration (R)¹⁷³. Or, l'excès énantiomérique obtenu à partir de cette voie de synthèse en présence d'un noyau acétophénone n'est que de 44%, ce qui nécessite l'ajout d'additifs tels que la poudre d'acétone provenant du *Geotrichum candidum*, champignon faisant partie du microbiome humain, pour augmenter ce pourcentage¹⁷⁴. De ce fait, d'autres voies de synthèse ont été imaginées.

- Réduction de Corey-Bakshi-Shibata

La réduction de Corey-Bakshi-Shibata (CBS) a été développée en 1987 et permet d'accéder à l'alcool de configuration (R) avec un ee de 80 à 97% à partir de l'utilisation d'un borane comme réducteur et d'un catalyseur chiral oxazaborolidine (appelé le catalyseur CBS)¹⁷⁵ (Schéma 99).

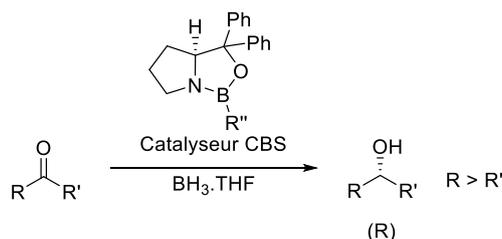


Schéma 99 : Réduction de Corey-Bakshi-Shibata

Les réductions asymétriques en présence de borane peuvent être particulièrement affectées par la présence de groupements électroattracteurs en *alpha* de la cétone utilisée. En effet, en présence d'une cétone trifluorométhylée, espèce très réactive, la réduction au borane en l'absence de catalyseur va être entreprise avant que la coordination du composé au catalyseur CBS n'influe sur la

¹⁷³ M. Bucciarelli, A. Forni, I. Moretti, G. Torre, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, 456–457.

¹⁷⁴ T. Fujisawa, Y. Onogawa, A. Sato, T. Mitsuya, M. Shimizu, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4267–4276.

¹⁷⁵ E. J. Corey, R. K. Bakshi, S. Shibata, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5551–5553.

stéréosélectivité de la réduction. Un mélange racémique sera donc obtenu. L'utilisation de catécholborane, moins réactif (Figure 77) peut permettre de contourner cette problématique et nous permettra d'obtenir l'alcool de configuration S avec un ee de 90%¹⁷⁶.

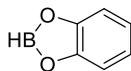


Figure 77 : Structure du catécholborane

- Réduction sélective de Brown

Brown et son équipe développent en 1993 la réduction sélective de cétones trifluorométhylées à partir du catalyseur (-)-DIP-ChlorideTM, réactif utilisé dans la synthèse de plusieurs composés d'intérêt pharmaceutique¹⁷⁷ (Schéma 100, A). Grâce à la présence de ce catalyseur, l'alcool (S) est obtenu avec des ee allant jusqu'à 90% en présence du groupement trifluorométhyle tandis que la réduction de l'acétophénone dans ces conditions favorisera la configuration (R), cela s'expliquant par le fait que le groupement trifluorométhyle soit considéré comme le groupement volumineux comparativement au groupement phényle (Schéma 100, B). De plus, les ee ont pu être grandement améliorés jusqu'à ≥99% par la recristallisation du produit obtenu dans le pentane à 0°C. Ainsi, cette étude se voit particulièrement pertinente dans le but d'accéder à l'alcool (S)-160. Malheureusement, elle n'a pas pu être testée par manque de temps mais fait l'objet d'un grand intérêt de la part de notre équipe.

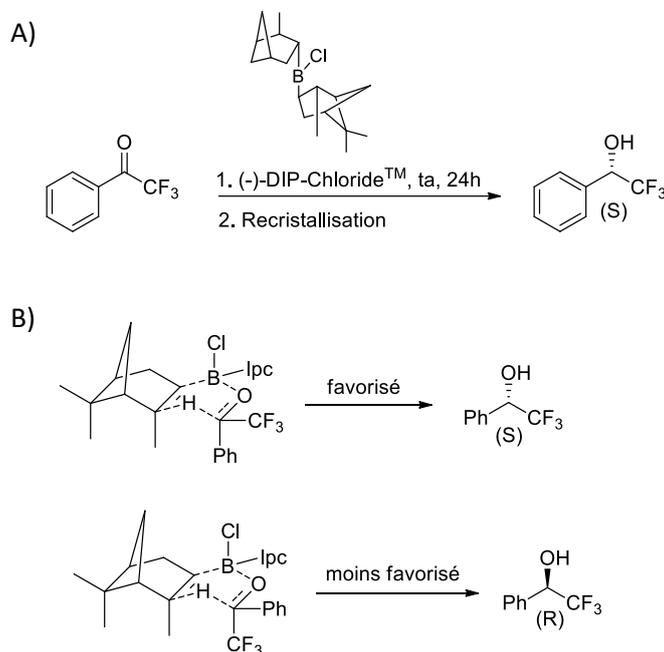


Schéma 100 : A) Réduction sélective de Brown de la trifluoroacétophénone en présence de (-)-DIP-ChlorideTM, B) Etats de transition de cette réaction (Schéma extrait et modifié de l'article¹⁷⁷)

¹⁷⁶ a) E. J. Corey, J. O. Link, *Tetrahedron Letters* **1992**, 33, 4141–4144 ; b) T. Korenaga, K. Nomura, K. Onoue, T. Sakai, *Chem Commun (Camb)* **2010**, 46, 8624–8626.

¹⁷⁷ P. Veeraraghavan Ramachandran, A. V. Teodorovic', H. C. Brown, *Tetrahedron* **1993**, 49, 1725–1738.

- Hydrogénation asymétrique de Noyori

En 1998, Noyori et son équipe développent l'hydrogénation asymétrique d'arylcétones et notamment de cétones trifluorométhylées en utilisant un catalyseur au ruthénium, le $\text{RuCl}_2(\text{xylbinap})(1,2\text{-diamine})$ (Figure 78)¹⁷⁸. En fonction de la configuration de ses ligands, l'alcool (R) ou (S) sera généré sans réduire les doubles liaisons présentes dans la molécule. Dans le cas des trifluoroacétophénones, le catalyseur (S,S) favorisera l'obtention de l'énantiomère (S) et inversement en présence du catalyseur (R,R) avec des ee de 94 à 96%.

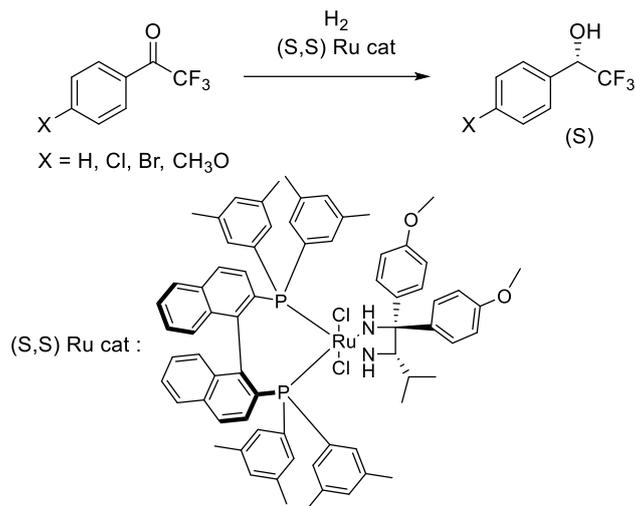
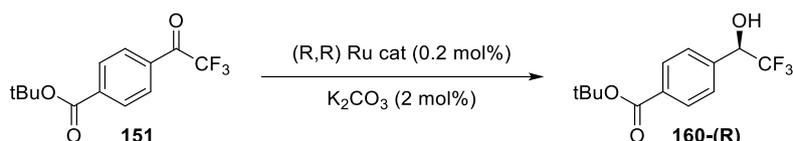


Figure 78 : Hydrogénation asymétrique de Noyori

Les excès énantiomériques issus de l'hydrogénation asymétrique de Noyori étant très bons, celle-ci a été testée au laboratoire à partir du catalyseur (R,R) avec le modèle trifluoroacétophénone. Différentes conditions ont pu être testées, notamment à des pressions en hydrogène différentes et des solvants variables. Les meilleurs résultats sont obtenus dans l'isopropanol, le dichlorométhane et l'éthanol. Ainsi, ces solvants ont été utilisés pour l'hydrogénation de la cétone **151** (Tableau 11). Des conditions plus drastiques ont été mises en œuvre au fur et à mesure, le solvant/eau s'additionnant sur la cétone de départ. Ainsi, le meilleur résultat est obtenu dans l'isopropanol à 20 bars de H₂ pendant sept jours, ce qui nous permet d'accéder au composé (**R**)-**160** avec un ee de 80%. L'excès n'étant pas aussi bon qu'escompté, une première recristallisation a été réalisée conduisant à un ee de 96%. Un premier test de triflation puis de substitution nucléophile sera entrepris à partir de cet alcool énantiomériquement enrichi afin de connaître l'ee final du composé **173** obtenu. Sinon, l'étude d'autres solvants de recristallisation sera à étudier afin de réduire la vitesse de cristallisation qui est sans doute trop rapide (échelle d'une heure).

¹⁷⁸ T. Ohkuma, M. Koizumi, H. Doucet, T. Pham, M. Kozawa, K. Murata, E. Katayama, T. Yokozawa, T. Ikariya, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13529–13530.



Solvant	Conditions	Temps	Rdt RMN brut (%)	Rdt isolé (%)	ee (%)
DCM	20 bars H ₂ , 35°C, C = 0,54 M	7 h	2	N. D.	N. D.
DCM	40 bars H ₂ , 35°C, C = 0,8 M	7 jours	100	85	53 (R)
iPrOH	10 bars H ₂ , 30°C, C = 3,4 M	4 h	0	N. D.	N. D.
iPrOH	20 bars H₂, 35°C, C = 0,8 M	7 jours	100	68	80 (R)*
EtOH	20 bars H ₂ , 35°C, C = 0,8 M	7 jours	80	68	36 (R)

*Rendement avant recristallisation, 96% après.

Tableau 11 : Conditions d'hydrogénation asymétrique de la cétone **151** (en gras les meilleures conditions)

Quand les conditions optimales seront établies, le catalyseur capable de donner sélectivement l'énantiomère (S) pourra être testé. En attendant, nous nous sommes focalisés sur une autre méthode : la déracémisation enzymatique de l'alcool **160**.

4.2.2.2. Déracémisation de l'alcool 160

Dans le but de parvenir à l'alcool (**S**)-**160**, nous nous intéressons à une nouvelle méthode : son dédoublement cinétique enzymatique par l'acétylation énantiosélective de l'alcool (S) en présence de la lipase provenant de la *Candida antarctica* (CAL B), enzyme connue pour la haute énantiosélectivité qu'elle présente. En effet, à partir de l'alcool trifluorométhylé racémique dérivé de la trifluorométhylacétophénone dans le toluène, l'acétylation de l'énantiomère (S) est obtenue avec un ee de 99%¹⁷⁹, tandis que le mélange restant est énantioenrichi en alcool (R) avec un ee de 62% (Schéma 101).

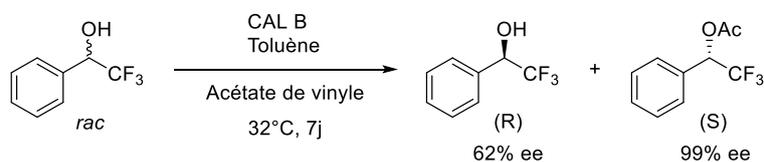


Schéma 101 : Dédoublement cinétique enzymatique de la trifluoroacétophénone en présence de CAL B

Cette méthode a donc été testée avec l'alcool **160**, et l'acétyle (**S**)-**181** correspondant est obtenu avec un rendement isolé de 47% et un ee de 99% validé par analyse HPLC (Schéma 102, A). L'alcool (**S**)-**160** est ensuite désacétylé en présence de K₂CO₃ et sa configuration a pu être conservée avec un ee de 99% (Schéma 102, B). Le produit **160** a été recristallisé dans un système

¹⁷⁹ S. S. Ribeiro, C. Raminelli, A. L. M. Porto, *Journal of Fluorine Chemistry* **2013**, *154*, 53–59.

DCM/cyclohexane afin de déterminer sa structure par diffraction des rayons X. Cette étude a montré qu'il s'agissait bien de l'énantiomère (S), ce qui est cohérent avec le résultat attendu du dédoublement cinétique enzymatique. Néanmoins, les tests statistiques ne sont pas suffisamment pertinents pour avoir une conclusion catégorique. Il faudrait réaliser la recristallisation sur un échantillon plus important.

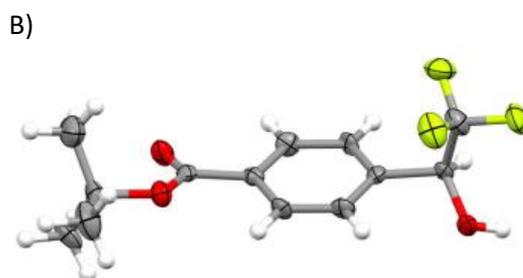
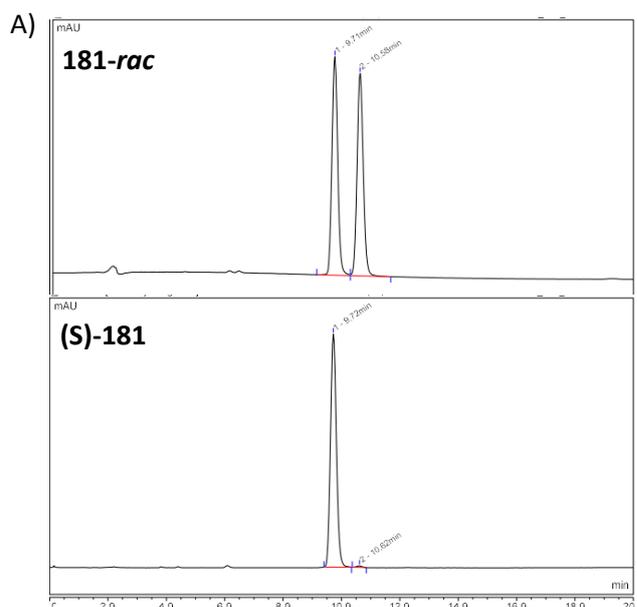
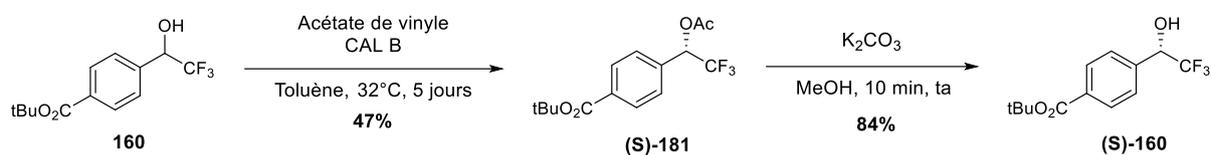


Schéma 102 : Voie de synthèse de l'alcool (S)-160 par acétylation énantiosélective en présence de la CAL B, A) Chromatogrammes HPLC de l'acétyle **181-rac** et de l'énantiomère **(S)-181** réalisés sur colonne chirale (ChiralCel® OD-RH), B) DRX d'un cristal de l'alcool **(S)-160**

Dans le but de déterminer lequel des énantiomères serait sélectivement obtenu lors de la réaction de KTGS, nous nous proposons de poursuivre la voie de synthèse du ligand **171** à partir de l'alcool dont **160** dont la configuration serait *a priori* (S). Les mêmes conditions de formation du thioéther sont entreprises, à savoir tout d'abord la triflation de l'alcool **160** (Schéma 103). Le triflate n'ayant pas pu être purifié convenablement du fait des petites quantités manipulées, ce mélange a directement été engagé par la suite dans la substitution nucléophile de type 2 (S_N2) en présence du thiol **33**, générant une inversion de centre stéréogène. Du fait des petites quantités de produit engagé dans la S_N2 , sa purification est rendue très compliquée. La fonction acide carboxylique est tout de même déprotégée dans le TFA, et le thioéther **(R)-171** a ainsi pu être obtenu et « isolé » sous la forme d'un mélange (1:1) avec une espèce inconnue non présente dans le mélange brut. Cependant, une analyse HPLC du mélange a pu être effectuée sur colonne chirale (ChiralCel® OD-RH) afin de déterminer l'excès énantiomérique du ligand. Le thioéther **(R)-171** serait obtenu avec un ee de 96%. Il y aurait donc

une petite érosion de l'ée lors des deux dernières étapes, ce qui reste toutefois acceptable dans la mesure où la synthèse de l'autre énantiomère sera réalisée et leurs constantes de dissociation comparées.

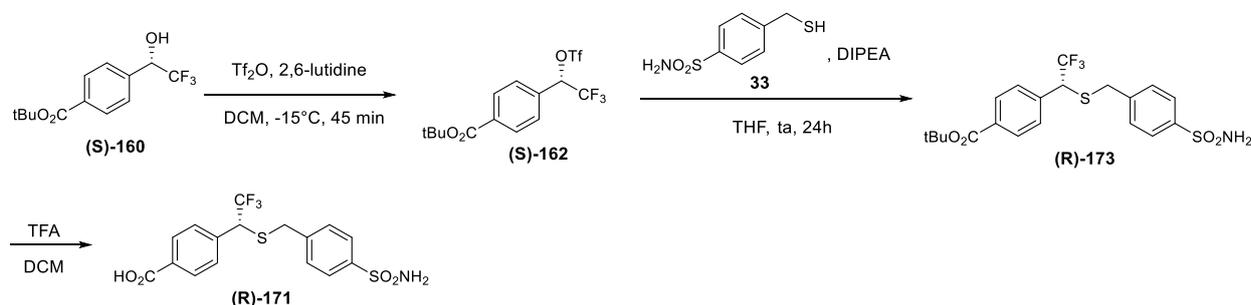


Schéma 103 : Voie de synthèse du thioéther **(R)-171**

Si l'on considère que les analyses HPLC sont exploitables malgré la présence d'une impureté visible en RMN ^1H , il semblerait que l'énantiomère **(R)-171** soit sélectivement obtenu lors de la KTGS (Figure 79), à savoir l'énantiomère présentant le moins d'affinité avec la biomolécule par rapport à l'étude de *docking*. La synthèse de deux énantiomères et la détermination de leur K_D est donc nécessaire afin de savoir si l'étude de *docking* ou le résultat de la KTGS est en accord avec les résultats des tests biologiques. Par manque de temps, cette étude n'a pu être finalisée.

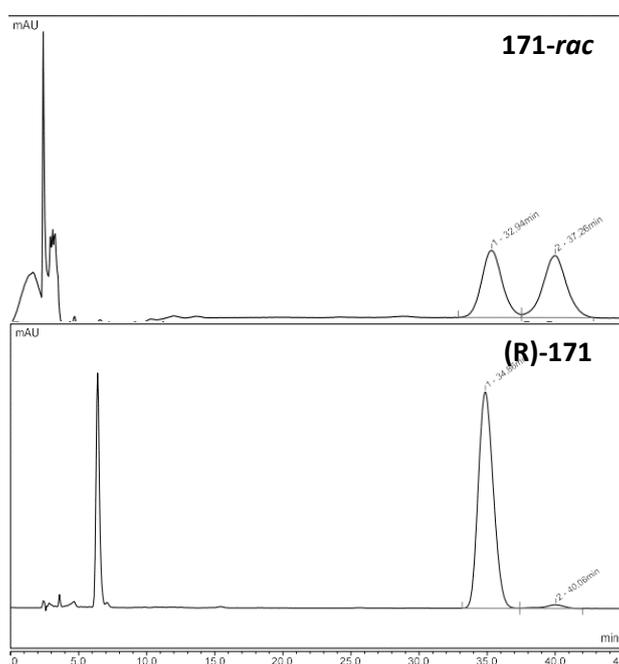


Figure 79 : Chromatogrammes HPLC de l'acétyle **171-rac** et de l'énantiomère **(R)-171** réalisés sur colonne chirale (ChiralCel® OD-RH)

Ainsi, la nouvelle réaction de KTGS pourrait potentiellement permettre d'accéder à des mélanges énantiomériques. Cependant, du fait de la résolution des chromatogrammes LC-MS, la détermination du K_D est nécessaire pour donner du poids à cette hypothèse.

5. Conclusion

Une nouvelle réaction de KTGS a été mise en place à partir d'une réaction entre une fonction photoactivable, la diazirine **154f**, et son partenaire nucléophile, le thiol **33**. Cette réaction permet d'accéder à un contrôle spatiotemporel de la ligation et pourrait pallier à la fois le problème de faux négatifs souvent observé et ouvrir de nouvelles perspectives à des réactions dont les constantes de vitesse ne sont pas strictement comprises entre 10^{-2} et $10^{-4} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Des temps d'incubation élevés parfois néfastes envers la cible biologique sont ainsi évités et la longueur d'onde d'irradiation étudiée ne semble pas être délétère envers l'anhydrase carbonique, enzyme d'intérêt dans cette étude.

Les conditions standards utilisées lors de la KTGS permettent d'accéder à environ 3,5 fois plus de produit en présence de la cible qu'en son absence. En revanche, la formation de produit dans le « Blanc » est non négligeable, ce qui a nécessité une optimisation. Plusieurs conditions ont ainsi été testées, à savoir l'utilisation d'un système FRET, l'ajout de thiols supplémentaires dans le milieu pour ainsi induire une compétition entre ceux-ci et le fragment **33** ou encore la réduction de la quantité de fragments introduits dans le milieu de façon à diminuer les chances de rencontre de ces partenaires en l'absence de cible. Seule la diminution de la quantité de thiol **33** a été pertinente, le rapport entre l'expérience « Enzyme » et « Blanc » se voit amélioré jusqu'à maintenant un facteur six. L'expérience FRET n'ayant pas fonctionné du fait de la trop grande proximité entre le noyau aromatique et la diazirine, cette stratégie pourrait être envisagée avec les diazirines aliphatiques qui absorbent elles aussi vers 350 nm, tout en évitant un phénomène de transfert d'énergie avec les noyaux aromatiques contenus dans le fragment (résultat non rapporté dans le manuscrit).

La réaction entre l'aryltrifluorométhyl-diazirine **154f** et le thiol **33** génère un centre asymétrique. En présence de la CA, l'énantiomère (**R**)-**171** semble être obtenu préférentiellement avec un excès énantiomérique d'environ 15%. Cette propriété est très intéressante car aucune réaction à partir de carbènes, à notre connaissance, n'a permis d'accéder à des mélanges énantiomériquement enrichis. Cependant, le produit est formé en faible quantité, ce qui rend le bruit de fond non négligeable. Afin de confirmer ces résultats, une voie de synthèse permettant d'accéder aux énantiomères (R) et (S) purs est à prévoir. Par exemple, la recristallisation des produits dont l'ee est supérieur à 70% pourrait permettre d'augmenter l'excès. La réduction sélective de Brown peut aussi être testée dans ce même but et la déracémisation enzymatique pourrait également être mise en œuvre sur de plus grosses quantités. Ainsi, le K_D de chacun des énantiomères pourrait être déterminé avec certitude.

Enfin, la voie d'accès aux ligands de référence est à améliorer, les conditions préalablement étudiées n'étant pas optimales dans ce but. En KTGS, l'accès aux références par la réaction entre les deux fragments utilisés est toujours préféré car cela ne nécessite aucune synthèse supplémentaire et permet ainsi une économie d'atomes et de temps conséquente. L'usage par exemple d'un photocatalyseur pourrait donc être envisagé de façon à favoriser la réaction entre la diazirine et le thiol par transfert d'énergie. Dans un premier temps, nous pourrions travailler avec le $[\text{Ir}(\text{dFCF}_3\text{ppy})_2(\text{dtbpy})]\text{PF}_6$ qui permettrait d'exciter la diazirine par transfert d'énergie si celle-ci se trouve à proximité (Schéma 104)¹⁸⁰.

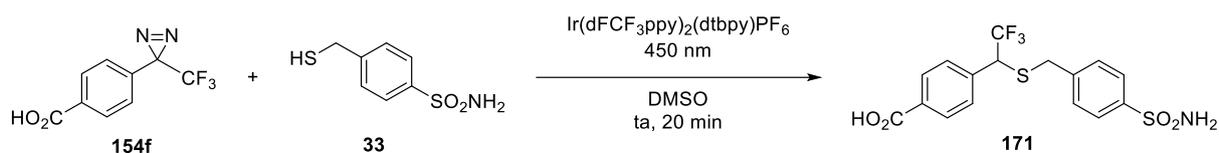


Schéma 104 : Synthèse du ligand **171** en présence d'un photocatalyseur

¹⁸⁰ J. B. Geri, J. V. Oakley, T. Reyes-Robles, T. Wang, S. J. McCarver, C. H. White, F. P. Rodriguez-Rivera, D. L. Parker, E. C. Hett, O. O. Fadeyi, R. C. Oslund, D. W. C. MacMillan, *Science* **2020**, 367, 1091–1097.

Conclusion générale et perspectives

La KTGS est une technique permettant d'accéder à la formation d'une molécule capable de se lier sur une biomolécule, et donc d'être dotée d'une propriété pharmacologique (inhibiteur d'enzyme, agoniste/antagoniste de récepteur, inhibiteur ou éliciteur d'interaction protéine-protéine ou protéine-acide nucléique...). Cette molécule se forme *via* une ligation covalente et irréversible entre deux fragments de réactivité complémentaire au sein de la cible thérapeutique étudiée si cette dernière est capable de les lier dans une conformation réactive à proximité l'un de l'autre (effet *template* ou gabarit). Bien qu'en plein essor ces dernières années, cette stratégie possède des limites associées aux critères exigeants de biocompatibilité et de cinétiques réactionnelles. Dans ce manuscrit de thèse, nous avons tenté de répondre à plusieurs problématiques : 1) l'amélioration des propriétés photophysiques d'un ligand obtenu par KTGS (en l'occurrence l'efficacité de la photoisomérisation ainsi que le déplacement des longueurs d'onde d'absorption dans le visible) ; 2) la mise en place d'une réaction de KTGS photoactivable de façon à contrôler spatiotemporellement la ligation par irradiation lumineuse (temps de ligation diminué, plus large choix de partenaires, diminution des faux négatifs...) afin de libérer la fonction réactive dans la cible biologique.

Après avoir introduit la place de la KTGS au sein du processus long qu'est la découverte de molécules actives (Chapitre 1), nous nous sommes concentrés sur l'amélioration des propriétés de photoisomérisation d'un ligand obtenu par réaction de thiol-yne en KTGS. En effet, cette ligation développée précédemment au laboratoire par le Dr. Alexis Lossouarn sur la bCA-II a permis de donner accès à un éther de thiovinyle fluorescent photocommutable dont les spectres d'absorption des deux isomères *Z-E* sont très proches. De ce fait, il est difficile d'irradier sélectivement l'un des deux diastéréoisomères, ce qui impacte ainsi la réversibilité de photoisomérisation du système (15%). A partir d'études bibliographiques préalablement effectuées sur la molécule d'azobenzène⁹⁴ et d'une collaboration avec le Dr. V. Tognetti de l'équipe Analyse et Modélisation de notre laboratoire, nous avons pu remarquer que l'introduction d'atomes de fluors en position *alpha* à la liaison éther de thiovinyle permettrait potentiellement de décaler le maximum d'absorbance de l'isomère *Z*. Ainsi, le ligand **107** a été synthétisé et un décalage de 18 nm a été observé par cette modification, ce qui nous a permis d'augmenter la réversibilité à 53%. Un mélange riche en isomère *E* ou *Z* peut donc être obtenu en fonction de la longueur d'onde d'irradiation utilisée (Schéma 104). Ces résultats ont été publiés dans le journal *Chemistry – A European Journal* en 2022¹⁰⁹.

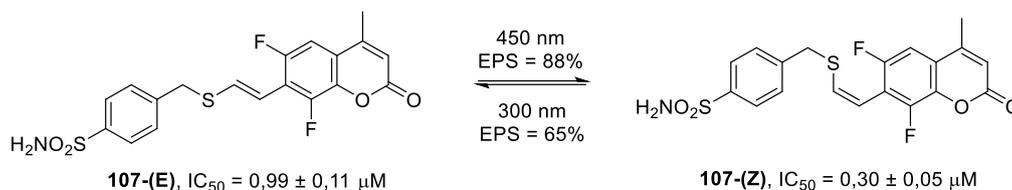


Schéma 104 : Photoisomérisation du ligand **107** obtenu par réaction de thiol-yne

La photoisomérisation est une propriété particulièrement attrayante dans le domaine de la chimie thérapeutique. En effet, lorsque l'activité envers la cible d'intérêt des deux isomères photocommutables est suffisamment différente, l'irradiation de la molécule responsable de la photoisomérisation peut permettre de contrôler l'activité de la biomolécule, ce qui permet d'étudier son rôle biologique de façon plus complète. Or, sur le système préalablement développé, les deux IC_{50} ne diffèrent que d'un ratio de 3, ce qui ne permettrait sans doute pas de contrôler efficacement l'activité par irradiation lumineuse. De ce fait, nous avons tenté d'augmenter cet écart en diminuant le bras espaceur entre le fragment ancre, le mercaptotoluène sulfonamide, et la fonction photocommutable éther de thiovinyle du ligand **107** (Schéma 105). Ainsi, l'isomérisation aurait plus de chances de générer une gêne stérique entre le ligand et la biomolécule pour l'un des isomères, et donc de conduire à une différence des propriétés d'inhibition de l'activité enzymatique d'un des deux isomères pour la cible.

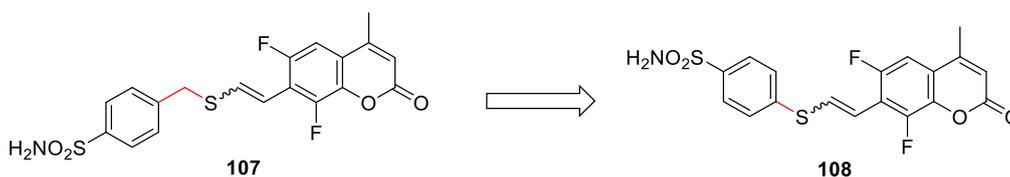


Schéma 105 : Modifications du squelette du ligand **107** pour différencier davantage l'activité de ses deux isomères

La synthèse de la molécule **108** a donc été entreprise. Malheureusement, sa purification s'est avérée particulièrement complexe. De ce fait, l'isolement des deux isomères n'a pas pu être effectué.

Par ailleurs, d'autres modifications structurales pourraient être considérées, notamment plus proches de la partie « ancre » du ligand qui se situe dans la cavité étroite du site actif de la molécule. Par exemple, l'ajout de substituants en position *ortho* du thioéther de la molécule **108** aurait peut-être un impact sur l'activité et l'affinité de l'un des isomères si l'on se réfère à l'étude de Que et ses collaborateurs sur les azobenzènes dont toutes les positions *ortho* à la liaison azo de son ligand **CAP-F5** ont été substituées par un atome de fluor pour des questions de stabilité¹⁰⁷ (Schéma 106).

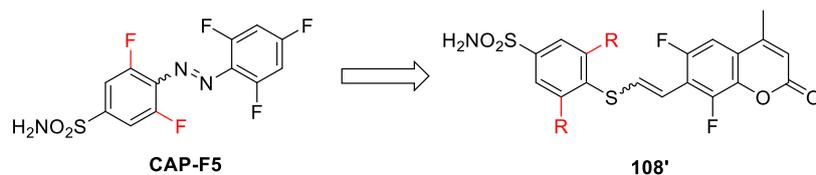


Schéma 106 : Optimisation du ligand **108** à partir du ligand **CAP-F5** déterminé par Que et ses collaborateurs¹⁰⁷

Une fois une molécule détenant ces propriétés obtenue, le système pourrait être testé dans une solution aqueuse saturée en dioxyde de carbone en présence d’anhydrase carbonique. En effet, la *bCA*-II catalyse l’hydrolyse du CO_2 en HCO_3^- , ce qui permet de réguler le pH de l’environnement dans lequel elle se trouve¹⁸¹. Ainsi, en suivant les variations du pH de cette solution saturée, nous pourrions suivre la variation d’activité de la CA par photoisomérisation.

Pour faire suite aux travaux présentés dans le chapitre 2, le chapitre 3 est dédié au décalage vers le rouge du maxima d’absorbance des deux isomères *Z* et *E* du ligand **107**. En effet, jusqu’à présent, la photoisomérisation $Z \rightarrow E$ se faisait sous irradiation à 300 nm. Or, les protéines absorbent également à cette longueur d’onde, ce qui peut donc les dénaturer. La modification du squelette du ligand a donc été envisagée, notamment sur sa partie fluorophore. Dans un premier temps, l’ajout de groupements électroattracteurs en position 3 ou 4 du noyau coumarinique du fragment **85** a été effectué, cette modification étant connue pour augmenter le caractère *push-pull* de la molécule¹¹⁰. L’introduction du difluorométhylène en position 1 a également été entreprise dans ce même but, de récents travaux démontrant que cela permettait de décaler de 120 nm vers le rouge l’absorbance de la coumarine¹¹⁷. Grâce à ces analogues, il a pu être possible de marquer des biothiols de type NAC ou GSH par réaction de thiol-yne avec des éthynylcoumarines ayant des absorptions décalées vers le rouge, dans des conditions réactionnelles photocatalytiques douces développées par le Dr. Isabelle Toubia (Schéma 107).

¹⁸¹ R. G. Khalifah, *Journal of Biological Chemistry* **1971**, 246, 2561–2573.

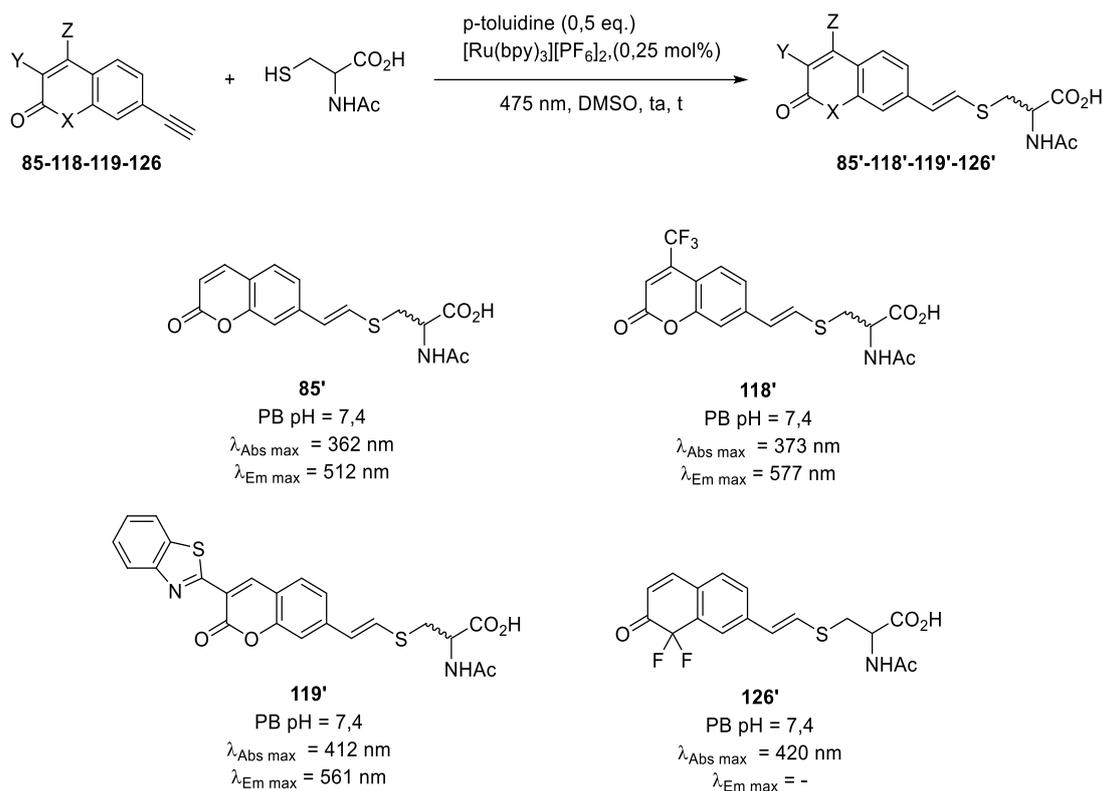


Schéma 107 : Réaction de thiol-yne photoredox entre un fragment éthynylcoumarine et la NAC et produits obtenus

Nous avons ensuite tenté de reporter ces modifications, notamment la substitution de la position 4 par un groupement trifluorométhyle ou l'insertion d'un ester en position 3, sur le fragment 7-éthynyl-6,8-difluoro-4-méthyl-2H-chromèn-2-one **106** afin de recouvrer les propriétés de photoisomérisation précédemment développées. Malheureusement, le composé attendu n'a pas pu être obtenu du fait du caractère électroattracteur des fluors en positions 6 et 8 qui modifie drastiquement la réactivité du fragment (Schéma 108). De nouvelles voies de synthèse sont donc à envisager dans le but de parvenir aux fragments imaginés ou à des analogues, comme remplacer le triflate par un halogène (iode, brome) pour réaliser l'étape clé de couplage de Sonogashira.

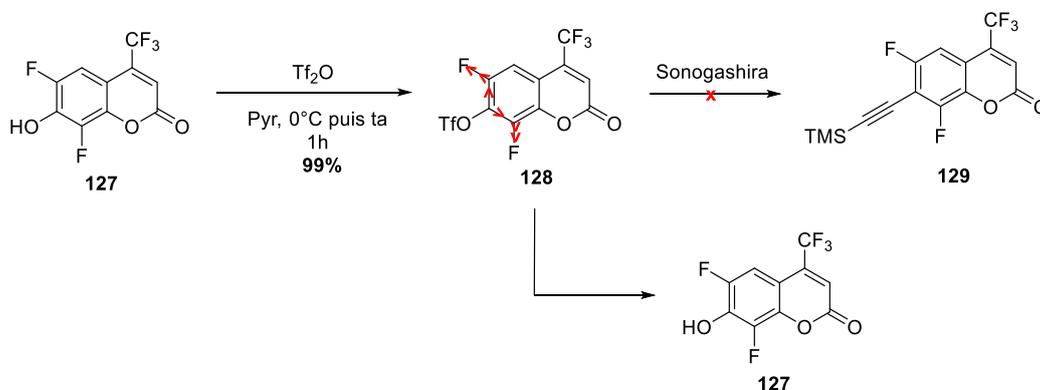


Schéma 108 : Modification de la réactivité du fragment coumarinique en présence de fluors en position ortho au triflate **128**

Par ailleurs, à partir des fragments **118** et **119** précédemment développés, nous pouvons potentiellement imaginer la mise en place d'une KTGS au sein d'une cellule surexprimant la CA-IX, qui est une protéine transmembranaire, en présence du fragment sulfonamide **33**. En effet, dans un premier temps, le fragment **33** serait incubé en présence de la cellule de façon à chélater l'ion Zn^{2+} présent dans la CA-IX située dans la membrane. Pour que le processus soit efficace, il faut que le fragment **33** ne soit pas capable de traverser la membrane cellulaire. Ensuite, le milieu serait lavé de façon à retirer l'excès de thiol présent à l'extérieur de la cellule. Puis les fragments coumariniques seraient insérés de façon à réagir par réaction de thiol-yne avec les thiols **33** sur la membrane de la cellule. Ainsi, la membrane pourrait être visualisée au microscope confocal car le produit de ligation est fluorescent dans le domaine du visible *via* une excitation au laser 405 nm (Schéma 109).

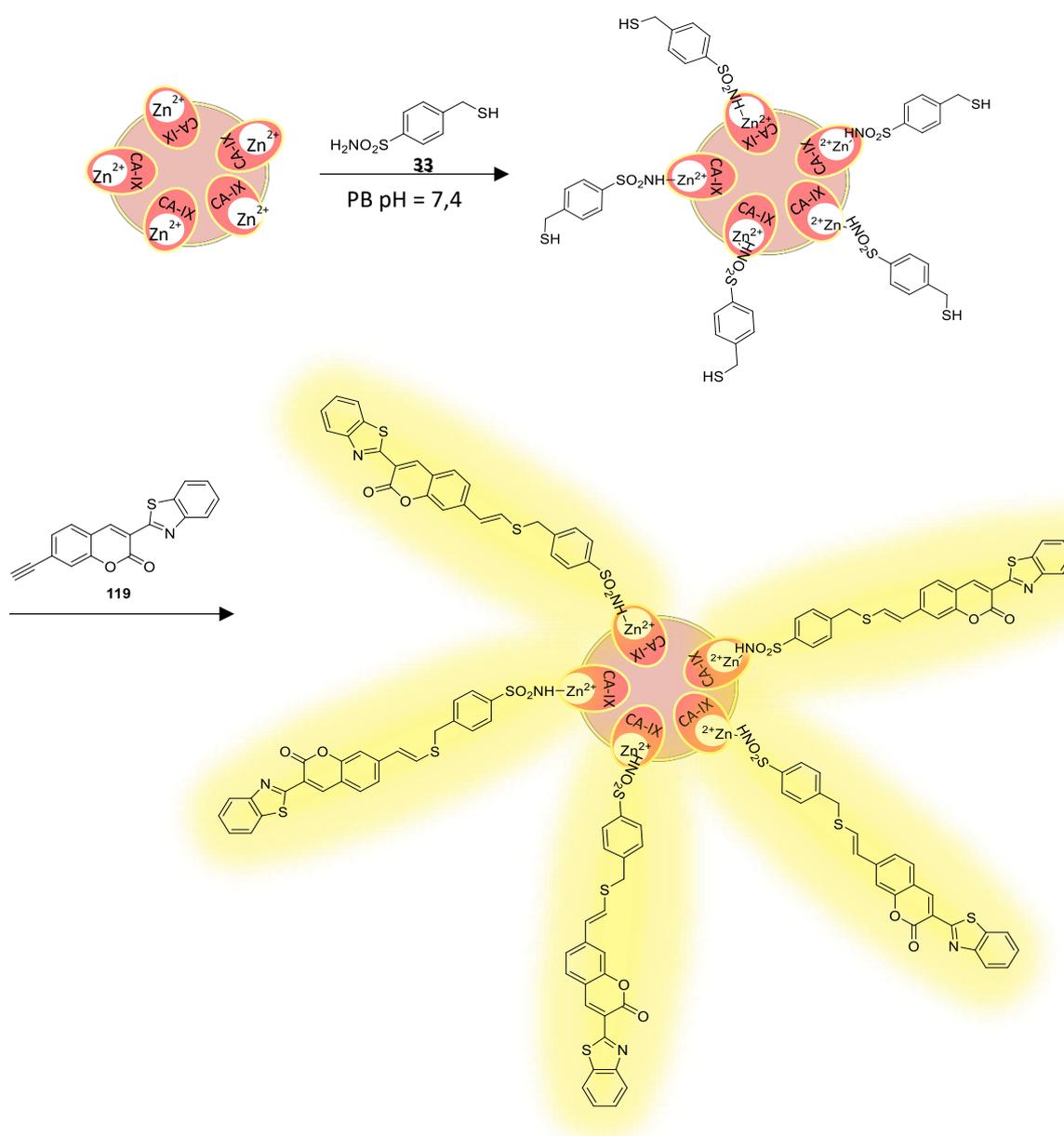


Schéma 109 : Réaction de KTGS entre l'éthynylcoumarine **119** et le thiol **33** au sein d'une cellule surexprimant la CA-IX transmembranaire

Enfin, dans le chapitre 4, une nouvelle réaction de KTGS a pu être mise en évidence à partir d'un fragment photoactivable diazirine et son partenaire nucléophile le plus adéquat : le thiol. Cette réaction permet de contrôler de façon spatiotemporelle la ligation. Du fait de la réactivité du carbène généré par irradiation de la diazirine, la réaction entre les fragments est particulièrement rapide (environ cinq minutes), ce qui permet de raccourcir drastiquement les temps d'incubation parfois trop longs nécessaires en click *in situ*, cela pouvant potentiellement conduire à une dénaturation de la cible biologique dans le temps d'incubation. La *bCA-II*, enzyme d'intérêt dans cette étude, a permis d'accéder à six fois plus de ligand qu'il se forme en son absence après optimisation des paramètres réactionnels. De plus, des études supplémentaires seraient nécessaires afin de vérifier si la géométrie de son site actif permet de former un énantiomère préférentiellement, en l'occurrence l'énantiomère (R). Le cas échéant, ce résultat serait particulièrement intéressant puisqu'aucune réaction à partir de carbènes, à notre connaissance, n'a permis d'accéder à des mélanges énantiomériquement enrichis.

A partir de ces résultats, plusieurs limites peuvent être soulignées. Différentes améliorations sont proposées pour chacune d'entre elles :

- 1) La longueur d'onde d'irradiation utilisée se trouve dans le domaine UV (UV-A). Si nous souhaitons généraliser cet outil à d'autres cibles biologiques plus sensibles, cela pourrait poser problème car la plupart d'entre elles absorbent à ces longueurs d'onde. De ce fait, nous pourrions imaginer l'introduction de groupements permettant de décaler vers le rouge l'absorbance de la bande de la diazirine. Par exemple, l'introduction de groupements silylés a été rapportée pour réaliser ce décalage bathochrome par effet électrodonneur qui déstabiliserait la HOMO et diminuerait donc l'écart entre ce niveau d'énergie et la LUMO¹⁸². Nous pourrions donc imaginer la synthèse d'une diazirine aromatique portant un groupement silylé en lieu et place du groupement -CF₃ et étudier ses propriétés (Figure 80).

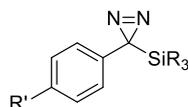


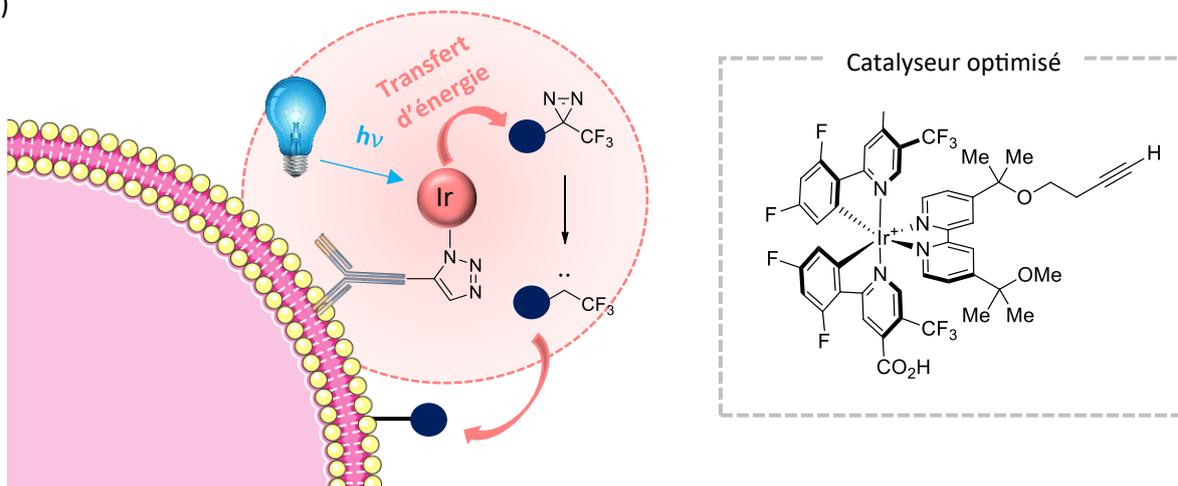
Figure 80 : Diazirine substituée par un groupement silylé

Des travaux effectués par McMillan et ses collaborateurs ont également pu démontrer que la diazirine pouvait être activée par transfert d'énergie d'un photocatalyseur à l'iridium excitable à 450 nm : le [Ir(dFCF₃ppy)₂(dtbpy)]PF₆¹⁸⁰. De ce fait, cette équipe a modifié ce catalyseur de façon à pouvoir l'attacher par réaction *click* à un anticorps (Schéma 110, A) et ainsi identifier sélectivement les interactions protéine-protéine sur membranes de cellules immunitaires. De la même manière, nous avons pensé à conjuguer ce catalyseur à la *bCA-II* par l'introduction d'un groupement N-

¹⁸² H. Maeda, T. Suzuki, M. Segi, *Photochem Photobiol Sci* **2018**, *17*, 781–792.

hydroxysuccinimide (NHS) capable de se conjuguer aux résidus lysines présents sur la biomolécule (Schéma 110, B)¹⁸³. Ainsi, une irradiation à 450 nm serait suffisante pour exciter la diazirine par transfert d'énergie liée à la protéine. Par ailleurs, cette approche pourrait limiter la formation du ligand dans le milieu puisque le transfert d'énergie entre l'iridium et la diazirine n'est possible qu'en deçà de 1 nm de distance.

A)



B)

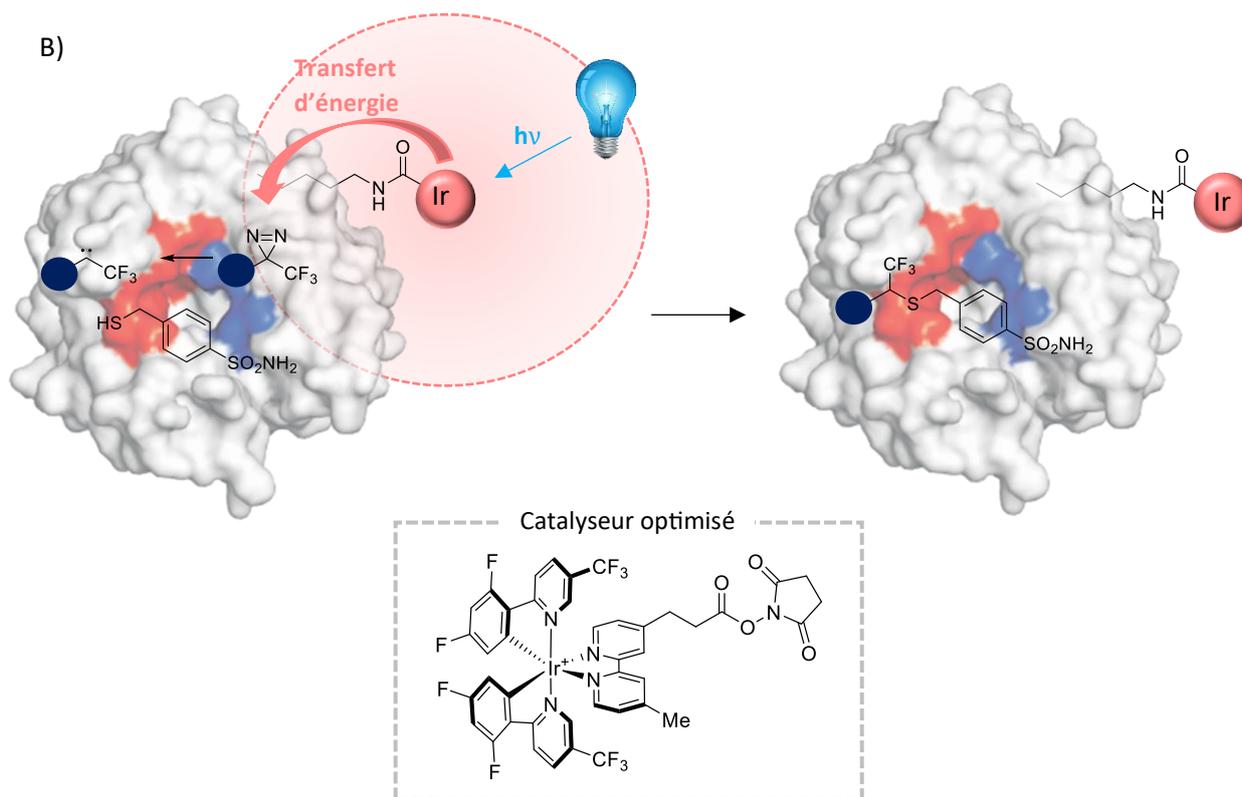


Schéma 110 : Activation de la diazirine par transfert d'énergie à partir d'un catalyseur à l'iridium greffé à la biomolécule d'intérêt, A) sur une cellule immunitaire¹⁸⁰, B) sur la bca-II

¹⁸³ P. T. Cesana, B. X. Li, S. G. Shepard, S. I. Ting, S. M. Hart, C. M. Olson, J. I. Martinez Alvarado, M. Son, T. J. Steiman, F. N. Castellano, A. G. Doyle, D. W. C. MacMillan, G. S. Schlau-Cohen, *Chem* **2022**, *8*, 174–185.

- 2) Le ligand est formé en l'absence d'enzyme à des quantités non négligeables. Afin de limiter cette réaction spontanée et rendre la KTGS plus sélective pour la cible utilisée, une expérience de FRET serait envisageable par irradiation à 280 nm des résidus tryptophane qui émettent à 350 nm et peuvent ainsi exciter la diazirine à son tour. En revanche, comme nous l'avons vu dans ces travaux de thèse, nous ne pourrions pas utiliser une diazirine aromatique car le cycle aromatique absorbe également à cette longueur d'onde et transfère son énergie à la diazirine en position *alpha*. Des expériences préliminaires ont effectivement montré que lorsque l'aromatique est éloigné de la diazirine, le transfert d'énergie n'est plus efficace à 280 nm en l'absence de résidus tryptophane (Figure 81). La KTGS en présence de ce type de diazirine serait donc à tester, tout en confirmant la nature du partenaire nucléophile.

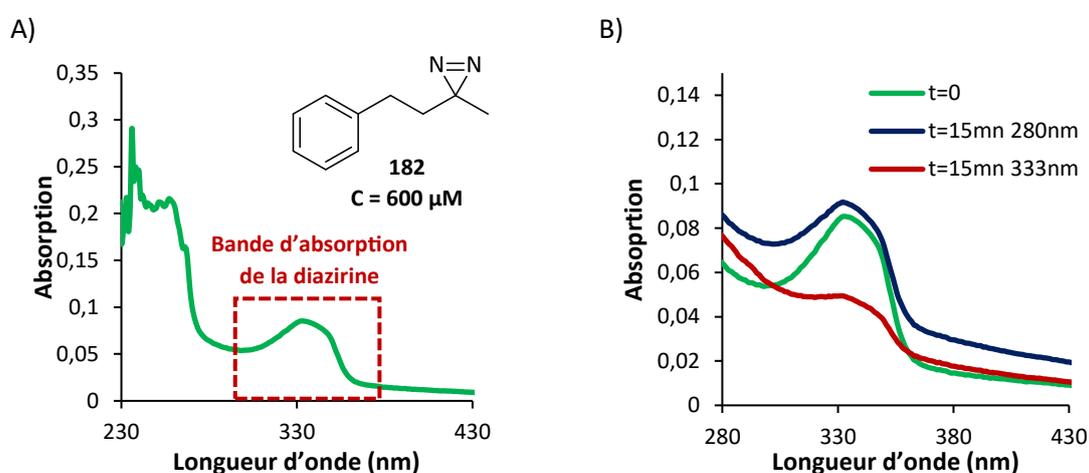


Figure 81 : A) Spectre d'absorption de la diazirine **182**, B) Variation de la bande d'absorption de la diazirine par irradiation pendant 15 minutes à 280 nm et à 333 nm au fluorimètre (largeur de fentes : 14 nm)

- 3) L'énantiosélectivité de la réaction de KTGS n'est pas confirmée, compte tenu du bruit de fond important et des faibles excès obtenus. Par ailleurs, les études de *docking* montrent que l'énantiomère minoritaire serait le plus affiné, ce qui serait en contradiction avec les résultats de KTGS obtenus. Afin de confirmer l'hypothèse que l'enzyme puisse catalyser la formation d'un énantiomère plus qu'un autre, il conviendrait de déterminer les valeurs des constantes de dissociation K_D de chacun des deux énantiomères du ligand **171**. Pour ce faire, la recristallisation des alcools **160** dont l'ee est 80% semble répondre à nos attentes puisqu'elle permet d'augmenter cette valeur à 96% ee dans un mélange DCM/heptane. La réduction sélective de Brown peut aussi être testée dans ce même but et la déracémisation enzymatique pourrait également être effectuée en plus grosses quantités. Une fois que l'approche permettant d'obtenir les ligands (R) et (S) avec des ee > 99% sera bien établie, cette stratégie pourrait être utilisée pour accéder à des ligands possédant d'autres hétéroatomes que le soufre, comme l'oxygène ou l'azote, conduisant à des affinités potentiellement différentes, tout en conservant le squelette du ligand thioéther de

référence. Cette diversification en fin de synthèse sera rapidement mise en œuvre pour ainsi établir une relation structure-affinité/activité biologique (Schéma 111).

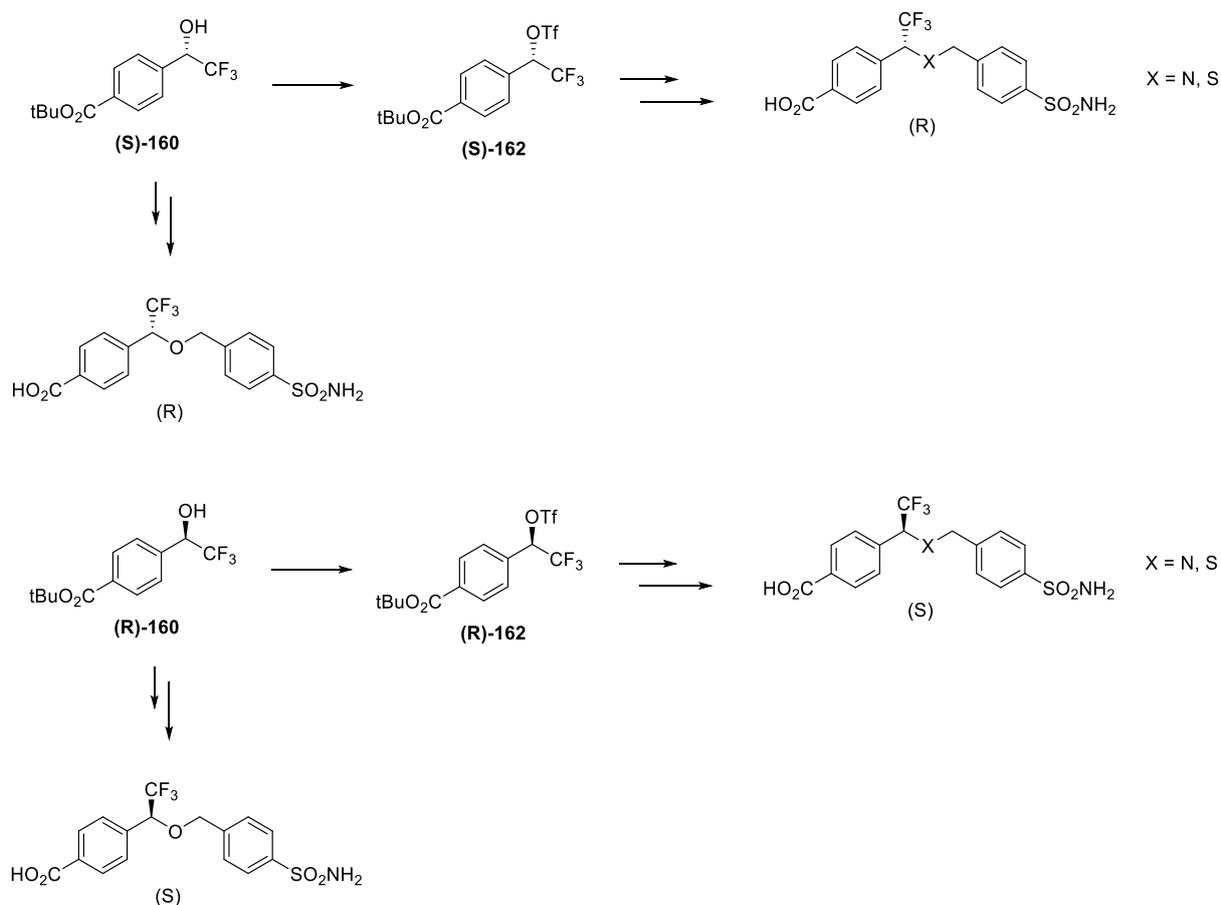


Schéma 111 : Diversification des énantiomères du ligand **171** à partir de différents nucléophiles

Partie expérimentale

1. General remarks

Unless otherwise stated, all chemicals were used as received from commercial sources without further purification and were purchased from suppliers such as Merck-Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, Acros Organics, Interchim, etc. *b*CA II was purchased from Merck-Sigma-Aldrich (reference C2624, lyophilized powder >95% SDS-PAGE, specific activity $\geq 3,500$ W-A units/mg protein; and reference C2522, lyophilized powder, $\geq 3,000$ W-A units/mg protein) and was stored at -20 °C. Triethylamine and diisopropylethylamine (DIPEA) were distilled over KOH and CaH_2 , respectively. Solvents, unless otherwise stated, were purchased in reagent grade or HPLC grade and used as received. Dry solvents were obtained following standard procedures: N,N-dimethylformamide (DMF) was purchased as dry solvent from Fisher Scientific and stored over 3 Å molecular sieves ; tetrahydrofuran (THF) was distilled over sodium/benzophenone ; dichloromethane (DCM), acetonitrile (ACN), toluene and diethylether were obtained from MB SPS-800 apparatus from MBRAUN ; isopropanol, methanol and acetone were stored for 24 hours (minimum) over molecular sieves (3 Å or 4 Å according to the solvent) prior to use. For non-aqueous reactions, flasks were dried by heating with a heat gun under vacuum. All reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) and/or RP-HPLC. TLC were carried out on Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminum sheets. Visualization of spots was performed under a UV lamp at $\lambda = 254$ or 365 nm, and/or staining with a KMnO_4 solution/ K_2CO_3 + 5% NaOH or with a ninhydrin solution/EtOH, both developed with heat. Flash column chromatography purifications were performed manually on silica gel (40–63 μM) under pressurized air flow. Aqueous buffers such as tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) (pH 7.6, 0.05 M), phosphate buffer saline (PBS) (pH 7.4, 0.1 M) or phosphate buffer (PB) (pH 7.4, 0.25 M) and aq. mobile phases for HPLC were prepared using water that was purified with a Milli-Q system (purified to 18.2 M Ω cm) and were stored at 4 °C. Formic acid (FA) for mobile phases was purchased in HPLC grade (Fisher Scientific or Acros Organics) and stored at 4 °C. For LC-MS analyses, ultrapure water (Alfa Aesar, LC-MS quality) was employed for the preparation of mobile phases.

2. Instruments and methods

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on 300 MHz Bruker FT-NMR machine operating at ambient probe temperature. The solvent resonance was used as the internal standard for ^1H -NMR (chloroform- d_1 at 7.26 ppm ; THF- d_8 at 1.72 and 3.58 ppm ; acetonitrile- d_3 at 1.94 ppm ; acetone- d_6 at 2.05 ppm ; methanol- d_4 at 3.31 ppm ; dimethylsulfoxide- d_6 at 2.50 ppm) and ^{13}C -NMR (CDCl_3 at 77.0 ppm ; THF- d_8 at 22.48 and 64.56 ppm ; acetonitrile- d_3 at 1.3 ppm ; acetone- d_6 at 29.8 ppm ; methanol- d_4 at 49.0 ppm ; DMSO- d_6 at 39.5). Chemical shifts (δ) were quoted in parts per million (ppm). Coupling constants (J) were quoted in Hertz (Hz). The following abbreviations were used to give the multiplicity of the NMR signals: s: singlet, bs: broad singlet, d: doublet, t: triplet, dd: doublet of doublet, dt: doublet of triplet...

High Resolution Mass spectrometry (HRMS) was performed with a Waters Micromass LCT Premier XE[®] equipped with an orthogonal acceleration time-of-flight (oa-TOF) and an electrospray source in positive or negative mode.

Infrared (IR) spectra were recorded with a universal ATR accessory on a Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR spectrum 100 spectrometer. Bond vibration frequencies are expressed in reciprocal centimeter (cm^{-1}).

Melting points were recorded on a LEICA VMHB Kofler system at atmospheric pressure and without correction.

UV-Vis spectroscopy was performed on an Agilent Cary 60 UV-Vis[®] at 20 or 25 °C. Fluorescence spectroscopic studies (emission/excitation spectra) were performed on a Horiba Scientific Fluorolog[®] spectrophotometer, equipped with a Hamamatsu photomultiplier tube R13456 and a xenon 450 W illuminator, using a quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, 10 × 4 mm, light path 10 mm, chamber volume 1.4 mL or Open Top, 10 × 10 mm, chamber volume 3.5 mL). Excitation/emission spectra were recorded at 25 °C. Fluorescence quantum yields (Φ_F) were measured at 25 °C by a relative method using quinine sulfate ($\Phi_F = 0.52$ in H_2SO_4 (0.05 M)¹⁸⁴) as standard (S). The following equation was used to determine the relative fluorescence quantum yield, where A is the absorbance (in the range of 0.01-0.1 A.U.), F is the area under the emission curve, n is the refractive index of solvents (1.337 for H_2SO_4

¹⁸⁴ A. M. Brouwer, *Pure Appl. Chem.*, **2011**, *83*, 2213–2228.

(0.005 M), 1.477 for DMSO at 25 °C) used in measurements, and the subscripts s and x represent standard and unknown, respectively.

$$\Phi_F(x) = (A_s/A_x)(F_x/F_s)(n_x/n_s)^2\Phi_F(s)$$

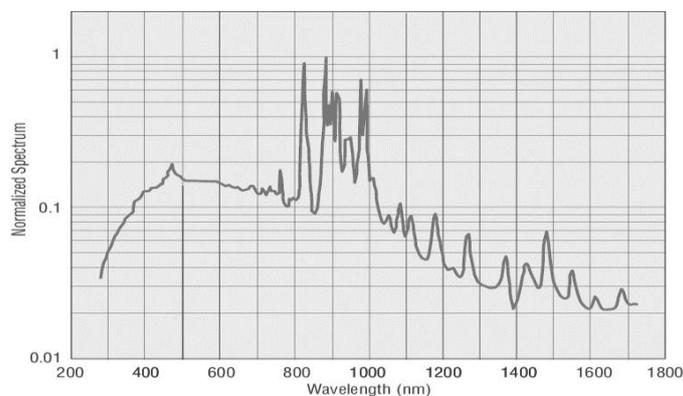
Centrifugations were performed with a VWR MicroStar 12® (11 000 rotations/min for 30 min).

For *b*CA II inhibition assay, the inhibitory activity (IC_{50}) was evaluated spectrophotometrically at 25 °C using a SPARK® Tecan apparatus and 96 well microplates (Eppendorf). *p*-Nitrophenyl acetate (PNPA) was recrystallized from EtOH prior to use and was stored at -25 °C.

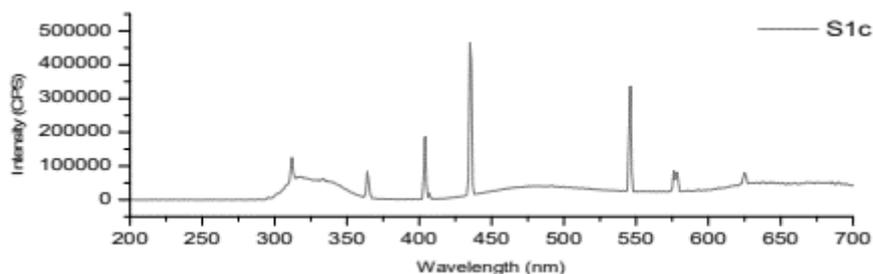
For thiol-yne and Sharpless KTGS experiments, incubations were conducted in a dedicated oven in which the temperature was maintained to 37 °C. For photoreactive KTGS experiments, irradiations were conducted in an EvoluChem PhotoRedOx Box in glass UPLC vials.

Photoreactions were performed with different light sources:

- 1) APEX2-XE Xenon Arc Lamp System (100 Watts) associated to the Cornerstone™ 260 1/4 m VIS-NIR Monochromator



- 2) A ReptiSun® 10.0 Compact Fluorescent UV-B lamp (ZooMed)



- 3) A visible blue LED spotlight (EvoluChem™ LED spotlights, 450PF (λ_{max} 450 nm), 18 Watts)
- 4) A near UV LED spotlight (EvoluChem™ LED spotlights, 405PF (λ_{max} 405 nm), 18 Watts)
- 5) A UV LED spotlight (EvoluChem™ LED spotlights, 380PF (λ_{max} 380 nm), 18 Watts)
- 6) A UV LED spotlight (EvoluChem™ LED spotlights, 365PF (λ_{max} 365 nm), 18 Watts).

All emission spectra of EvoluChem™ LED spotlights are accessible online <https://www.hepatochem.com/photoreactors-leds-accessories-old/led-evoluchem/>

Specific optical rotations were determined with a Jasco P-2000 polarimeter. The monochromatic light is the sodium D-line at 589.3 nm. The indicated values are followed by the concentration on a specific solvent:

$$[\alpha]_D^T = \frac{\alpha_{read}}{d * c} * 100$$

$[\alpha]_D^T$: Specific optical rotation (°)

T: temperature (°C)

α_{read} : rotation angle (°)

d: cuvette dimension (d=1 dm)

c: sample concentration (g/100 mL)

3. Analytical and purification HPLC systems

4. Analytical systems

System A: RP-HPLC analyses were performed with a Thermo Scientific Ultimate® 3000 RS instrument, equipped with a diode array detector (DAD-3000RS) and temperature of the column compartment was fixed at 25 °C. Injection volume was 1 or 2 µL. A Thermo Fisher Hypersil GOLD® column (1.9 µm, 2.1 × 50 mm) was used with a binary solvent system composed of MeCN and 0.1% aq. formic acid (aq. FA, pH 2) as eluents (linear gradient from 5 to 100% MeCN over 6 min; 100% MeCN for 1.5 min; linear gradient from 100 to 5% MeCN over 1.5 min ; 5% MeCN for 2 min) at a flow rate of 0.600 mL/min.

System B: RP-HPLC-MS analysis were performed on a Thermo Scientific Ultimate® 3000 RS and Bruker HCT ultra® instruments, equipped with a ACQUITY UPLC BEH C18 column (1.7 µm, 2.1 × 100 mm). Temperature was maintained to 40 °C. Injection volume was 1 µL. UV detector (set at 254 nm) was coupled with a low-resolution MS detector (ESI/ion trap). Solvent system was composed of MeCN and 0.1% aq. formic acid (aq. FA, pH 2) as eluents (linear gradient from 5 to 100% MeCN over 10 min; 100% MeCN for 2,5 min, linear gradient from 100 to 5% MeCN over 0,5 min; 5% MeCN for 2,5 min) at a flow rate of 0.400 mL/min.

System C: RP-HPLC analyses were performed with a Thermo Scientific Ultimate® 3000 RS instrument, equipped with a diode array detector (DAD-3000RS) and temperature of the column compartment was fixed at 30 °C. Injection volume was 1 µL. A DAICEL Column CHIRALCEL OJ-3R (3 µm, 4.6 × 150 mm) was used with a binary solvent system composed of MeCN and 0.1% aq. formic acid (aq. FA, pH 2) as eluents (50/50 MeCN/H₂O + 0.1% formic acid for 20 min, isocratic mode) at a flow rate of 0.700 mL/min.

System D: RP-HPLC analyses were performed with a Thermo Scientific Ultimate® 3000 RS instrument, equipped with a diode array detector (DAD-3000RS) and temperature of the column compartment was fixed at 30 °C. Injection volume was 1 µL. A DAICEL Column CHIRALCEL OJ-3R (3 µm, 4.6 × 150 mm) was used with a binary solvent system composed of MeCN and 0.1% aq. formic acid (aq. FA, pH 2) as eluents (35/65 MeCN/H₂O + 0.1% formic acid for 35 min, isocratic mode) at a flow rate of 0.700 mL/min.

System E: RP-HPLC-MS analysis were performed on a Thermo Scientific Ultimate® 3000 RS and Bruker HCT ultra® instruments, equipped with a DAICEL Column CHIRALCEL OD-RH (5 µm, 4.6 × 150 mm). Temperature was maintained to 30 °C. Injection volume was 20 µL. UV detector (set at 254 nm) was coupled with a low-resolution MS detector (ESI). Solvent system was composed of MeCN and 0.1% aq. formic acid (aq. FA, pH 2) as eluents (30% MeCN for 45 min, isocratic mode) at a flow rate of 0.700 mL/min splitted in 2 for mass detection.

System F: RP-HPLC-MS analysis were performed on a Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS and Waters Xevo TQD Triple Quadrupole mass Spectrometer, equipped with a DAICEL Column CHIRALCEL OD-RH (5 µm, 4.6 × 150 mm). Temperature was maintained to 30 °C. Injection volume was 20 µL. UV detector (set at 254 nm) was coupled with a low-resolution MS detector (ESI). Solvent system was composed of MeCN and 0.1% aq. formic acid (aq. FA, pH 2) as eluents (30% MeCN for 45 min, isocratic mode) at a flow rate of 0.700 mL/min splitted in 2 for mass detection.

System G: RP-HPLC-MS analysis were performed on a Thermo Scientific Vanquish® and Orbitrap Exploris 120 Mass Spectrometer, equipped with a DAICEL Column CHIRALCEL OD-RH (5 µm, 4.6 × 150 mm). Temperature was maintained to 30 °C. Injection volume was 10 µL. UV detector (set at 254 nm) was coupled with a high-resolution MS detector (ESI). Solvent system was composed of MeCN and 0.1% aq. formic acid (aq. FA, pH 2) as eluents (30% MeCN for 45 min, isocratic mode) at a flow rate of 0.700 mL/min splitted in 2 for mass detection.

5. Purification system

System H: Semi-preparative RP-HPLC were performed with a Interchim PuriFlash® 4250 instrument equipped with a UV-visible detector, and a Thermo Scientific Polar Advantage II column (5 µm, 250 × 20.1 mm) with MeCN and 0.1% aq. FA as eluents (from 40% to 70% MeCN over 30 min) at a flow rate of 16 mL/min.

System I: Semi-preparative RP-HPLC was performed with an Interchim PuriFlash® 4250 instrument equipped with a UV-visible detector, and an Interchim Puriflash C18-HP 15 µM F0040 flash column with MeCN and 0.1% aq. FA as eluents (from 10% to 35% MeCN over 35 min, followed by 35 to 40% MeCN over 5 min, 40 to 100% over 3 min and 100% MeCN over 10 min) at a flow rate of 30 mL/min.

System J: Semi-preparative RP-HPLC were performed with a Interchim PuriFlash® 4250 instrument equipped with a UV-visible detector, and a Hypersil Gold® column (5 µm, 250 × 30 mm) with MeCN and 0.1% aq. FA as eluents (from 50% to 70% MeCN over 30 min) at a flow rate of 18 mL/min.

4. Procedures and molecular description for Chapter II¹⁸⁵

4-(Bromomethyl)benzenesulfonamide – 73



To a solution of 4-(bromomethyl)benzenesulfonyl chloride (2.7 g, 10 mmol, 1 equiv.) in dry THF (40 mL) at 0 °C was slowly added a solution of ammonia (7 N in MeOH, 5.7 mL, 40 mmol, 4 equiv.). Then, the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 4 h. Then, solvents were removed by vacuum.

The crude residue was dissolved in EtOAc and a small portion of Celite® was added to prepare a solid deposit for purification and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, v/v) to provide the desired compound (2.08 g, 8.32 mmol, 83% yield) as a white powder.

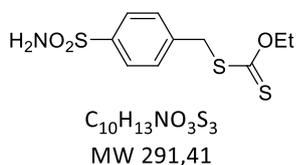
NMR analysis is in accordance with literature data.¹⁸⁶

¹⁸⁵ A. Lossouarn, C. Puteaux, L. Bailly, V. Tognetti, L. Joubert, P.-Y. Renard, C. Sabot, *Chem. Eur. J.* **2022**, *28*, e202202180.

¹⁸⁶ X. Hu, J. Sun, H.-G. Wang, R. Manetsch, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13820–13821.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, acetone- d_6) δ_{H} 7.92 – 7.83 (m, 2H), 7.70 – 7.61 (m, 2H), 6.60 (bs, 2H), 4.71 ppm (s, 2H).

O-Ethyl S-4-sulfamoylbenzyl carbonodithioate – 74



To a solution of 4-(bromomethyl)benzenesulfonamide **73** (100 mg, 0.40 mmol, 1 equiv.) in dry acetone (2 mL) under argon atmosphere was added in one portion potassium ethyl xanthate (128 mg, 0.80 mmol, 2 equiv.). The reaction was stirred at room temperature for 24 h. After that time, the reaction was filtered on sinter filter and a small portion of Celite® was added to the filtrate so as to prepare the solid deposit for the purification. Solvent was removed by vacuum and the crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1, 8:2 and 7:3, v/v) to provide the desired compound (110 mg, 0.28 mmol, 94% yield) as a white powder.

m.p. = 125 – 126 °C.

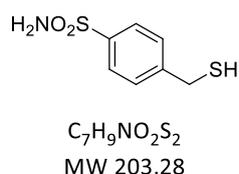
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, acetone- d_6) δ_{H} 7.91 – 7.82 (m, 2H), 7.68 – 7.58 (m, 2H), 6.56 (bs, 2H), 4.67 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.51 (s, 2H), 1.41 ppm (t, J = 7.1 Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, acetone- d_6) δ_{C} 214.2, 144.2, 141.9, 130.4, 127.2, 71.3, 39.7, 13.9 ppm.

IR (neat) ν_{max} (cm^{-1}) 3356, 3255, 2921, 2448, 1567, 1402, 1324, 1310, 1212, 1144, 1092, 1044, 917, 863, 840, 826.

HRMS (ESI-) Calculated for $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{NO}_3\text{S}_3$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 289.9979 ; found : 289.9976.

4-(Mercaptomethyl)benzenesulfonamide – 33



To a solution of *O*-ethyl *S*-4-sulfamoylbenzyl carbonodithioate **74** (200 mg, 0.686 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (5 mL) under argon atmosphere was added *n*-butylamine (81 μL , 0.823 mmol, 1.2 equiv). The reaction was stirred for 4 h at room temperature. After completion, the reaction was poured onto a solution of brine and the pH value was adjusted to 3 using a solution of aqueous HCl (6 N). The aqueous layer was then extracted with EtOAc (\times 1). The organic layer was washed with brine (\times 3), dried over MgSO_4 and a small portion of Celite® was added to the filtrate so as to prepare the solid deposit for the purification. The solvent was removed by vacuum and the crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, DCM/EtOAc as a gradient from 10:0 to 9:1 and 8:2, v/v) to provide the desired compound (94 mg, 0.46 mmol, 67% yield) as a white powder.

m.p. = 137 – 138 °C.

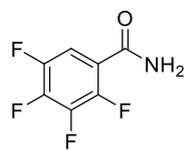
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, MeOH- d_4) δ_{H} 7.88 – 7.77 (m, 2H), 7.54 – 7.46 (m, 2H), 3.79 ppm (s, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, MeOH- d_4) δ_{C} 147.8, 143.4, 129.7, 127.5, 28.6 ppm.

IR (neat) ν_{\max} (cm⁻¹) 3358, 3256, 1566, 1410, 1324, 1309, 1168, 1145, 1092, 916, 845.

HRMS (ESI-) Calculated for C₇H₈NO₃S₂ [M-H]⁻ : 201.9996 ; found : 201.9992.

2,3,4,5-tetrafluorobenzamide – 94



C₇H₃F₄NO

MW 193,10

To a solution of 2,3,4,5- tetrafluorobenzoic acid (2.0 g, 10.0 mmol, 1.0 equiv.) in dry CH₂Cl₂ (10 mL) under argon was added oxalyl chloride (1.0 mL, 12.0 mmol, 1.2 equiv.) and DMF (ca. 2 drops), and the reaction mixture was stirred at rt for 16 h while venting to the atmosphere to allow escape of evolved gases. The solvent was removed under reduced pressure, and the vessel was placed on high vacuum to afford the acid chloride as a yellow oil mixed with a yellow solid. This compound was dissolved in chloroform (8 mL) and cooled to 4 °C. Aqueous ammonia (30%, 11 mL) was added dropwise and the reaction was stirred at 4 °C for 30 min. The mixture was extracted with chloroform, and the organic layer was dried, filtered, and concentrated under reduced pressure to afford **94** (1.9 g, 96%) as a white solid.

NMR analysis is in accordance with literature data¹⁸⁷.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} 7.84-7.75 (m, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.93 (s, 1H) ppm.

2,3,4,5-tetrafluorobenzonitrile – 95



C₇HF₄N

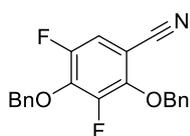
MW 175,09

To 2,3,4,5-tetrafluorobenzamide **94** (460 mg, 2.4 mmol, 1.0 equiv.) under argon was added phosphoryl chloride (1.5 mL, 15.6 mmol, 6.5 equiv.), and the mixture was stirred at 75°C for 3 h. This mixture was treated with diethyl ether (15 mL) and ice water (10 mL), followed by sat. aqueous NaHCO₃ (15 mL) for 30 min. This mixture was extracted with diethyl ether and the organic layer was washed with sat. aqueous NaHCO₃ until the mixture stops bubbling. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure to afford **95** (365.5 mg, 80%) as a colorless oil.

NMR analysis is in accordance with literature data¹⁸⁷.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} 7.36-7.28 (m, 1H) ppm.

¹⁸⁷ M. M. Lee, B. R. Peterson, *ACS Omega* **2016**, *1*, 1266–1276.

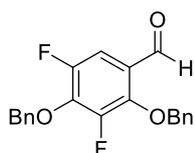
2,4-bis(benzyloxy)-3,5-difluorobenzonitrile – 96

$C_{21}H_{15}F_2NO_2$
MW 351,35

To a solution of 2,3,4,5-tetrafluorobenzonitrile **95** (705 mg, 4 mmol, 1.0 equiv.) in dry DMF (451 μ L) under argon was added benzyl alcohol (2.1 mL, 20 mmol, 5.0 equiv.) and potassium carbonate (3.32 g, 24 mmol, 6.0 equiv.). The vessel was heated to 105 °C for 16 h then cooled at rt. To this mixture was added sat. aqueous NH_4Cl and the organic layer was extracted with ethyl acetate. Then it was dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 95:5, v/v) to afford **96** (701 mg, 49%) as a viscous pale-yellow oil.

NMR analysis is in accordance with literature data¹⁸⁷.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.43-7.35 (m, 11H), 7.04 (dd, $J = 10.0, 2.3$ Hz, 1H), 5.28 (s, 2H), 5.22 (s, 2H) ppm.

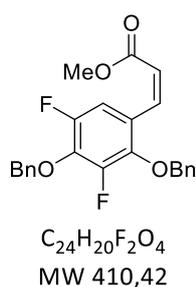
2,4-bis(benzyloxy)-3,5-difluorobenzaldehyde – 97

$C_{21}H_{16}F_2O_3$
MW 354,35

To a solution of 2,4-bis(benzyloxy)-3,5-difluorobenzonitrile **96** (350 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv.) in dry CH_2Cl_2 (6.5 mL) at -78 °C under argon was added diisobutylaluminum hydride (1.2 M in toluene, 1 mL, 1.2 equiv.). The reaction mixture was stirred at -78 °C for 1.75 h and was then quenched with aqueous HCl (1 M, 13 mL) by stirring for 5 min. The mixture was extracted with ethyl acetate and the organic layer was washed with sat. aqueous NaCl. Then it was dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 9:1, v/v) to afford **97** (306 mg, 87%) as a pale-yellow solid.

NMR analysis is in accordance with literature data¹⁸⁷.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 10.00 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 7.44-7.27 (m, 11 H), 5.33 (s, 2H), 5.16 (s, 2H) ppm.

(Z)-methyl 3-(2,4-bis(benzyloxy)-3,5-difluorophenyl)acrylate – 99

To a solution of K_2CO_3 (1 mmol, 139.3 mg, 2.4 equiv.) in anhydrous THF (6.6 mL) under argon was added 18-crown-6 (0.84 mmol, 221.8 mg, 2.0 equiv.). The reaction mixture was stirred at rt for 16 h then cooled at $-40^\circ C$. Then methyl 2-(bis(2,2,2-trifluoroethoxy)phosphoryl)acetate (162.2 mg, 0.51 mmol, 1.2 equiv.) and 2,4-bis(benzyloxy)-3,5-difluorobenzaldehyde **97** (150 mg, 0.42 mmol, 1.0 equiv.) were added. The resulting mixture was stirred at $-40^\circ C$ for 5h and was then quenched with sat. aqueous NH_4Cl (20 mL) by stirring for 30 min. The mixture was extracted with ethyl acetate and the organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 9:1, v/v) to afford the desired Z product **99** (145 mg, 84%) as a colorless oil.

m.p. = liquid product.

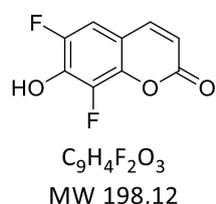
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.47-7.29 (m, 11H), 6.92 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 5.92 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 5.22 (s, 2H), 4.98 (s, 2H), 3.68 (s, 2H) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 166.12 (s), 151.10 (dd, $J = 243.5, 4.9$ Hz), 149.40 (dd, $J = 247.7, 6.7$ Hz), 142.01 (dd, $J = 10.5, 3.3$ Hz), 136.77 (s), 136.75 (s), 136.74 (s), 136.71 (s), 136.68 (d, $J = 28.3$ Hz), 136.33 (d, $J = 5.1$ Hz), 128.62 (s), 128.57 (s), 128.55 (s), 128.35 (s), 123.89 (dd, $J = 9.1, 2.6$ Hz), 120.84 (s), 112.23 (dd, $J = 22.0, 3.3$ Hz), 76.55 (d, $J = 5.0$ Hz), 76.09 (t, $J = 3.4$ Hz), 51.49 (s).

^{19}F NMR (282 MHz, $CDCl_3$) δ_F -132.8, -143.1.

IR (neat) ν_{max} (cm^{-1}) 3033, 2951, 1723, 1633, 1497, 1450, 1374, 1170, 1031, 1002, 968, 910, 822, 733, 695, 591, 384.

HRMS (ESI+): Calculated for $C_{24}H_{20}O_4F_2$ $[M+H]^+$: 411.1408; found: 411,1398.

6,8-difluoro-7-hydroxy-2H-chromen-2-one – 100

To a solution of (Z)-methyl 3-(2,4-bis(benzyloxy)-3,5-difluorophenyl)acrylate **99** (164 mg, 0.4 mmol, 1.0 equiv.) in dry CH_2Cl_2 (3.2 mL) at $-78^\circ C$ under argon was added dropwise boron tribromide (1 M in CH_2Cl_2 , 2.4 mL, 6.0 equiv.). The mixture was stirred at $-78^\circ C$ for 2.2 h. The reaction was quenched with water (20 mL) and the solution was stirred for further 10 min. The mixture was extracted with ethyl acetate and the organic layer was washed with sat. aqueous $NaCl$. Then it was dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, DCM/MeOH 99:1, v/v) to afford **100** (66 mg, 83%) as a white powder.

m.p.: 210,5 °C - 211,4 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ_H 11.53 (s, 1H), 7.95 (dd, *J* = 9.6, 1.1 Hz, 1H), 7.47 (dd, *J* = 10.6, 2.1 Hz, 1H), 6.40 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H) ppm.

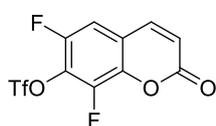
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ_C 159.31 (s), 148.87 (dd, *J* = 239.5, 4.9 Hz), 144.22 (t, *J* = 2.8 Hz), 140.29 (dd, *J* = 9.3, 1.9 Hz), 139.61 (dd, *J* = 238.2, 6.1 Hz), 138.22 (d, *J* = 13.3 Hz), 114.47 (s), 110.44 (d, *J* = 9.7 Hz), 109.34 (dd, *J* = 21.1, 3.3 Hz).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -136.3, -154.1.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 1714, 1577, 1517, 1309, 1160, 975, 874, 713.

HRMS (ESI+): Calculated for C₉H₅O₃F₂ [M+H]⁺: 199.0207; found: 199.0209.

6,8-difluoro-2-oxo-2H-chromen-7-yl trifluoromethanesulfonate – 101



C₁₀H₃F₅O₅S
MW 330,18

To a solution of 6,8-difluoro-7-hydroxy-2H-chromen-2-one **100** (71 mg, 0.36 mmol, 1 equiv.) in dry pyridine (1.56 mL) under argon atmosphere was added dropwise Tf₂O (145 μL, 0.86 mmol, 2.4 equiv.) at 0 °C. The reaction was stirred for 5 min at 0 °C and at room temperature for 1 h. After completion, the reaction was poured onto a solution of aqueous HCl (1 M) and was extracted with EtOAc (× 2). The

combined organic layers were successively washed with water (× 2), brine (× 1), then dried over MgSO₄ and the solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by a filtration through a pad of silica gel to provide the desired compound **101** (74 mg, 0.22 mmol, 62% yield) as a white solid.

m.p. = 88.8 °C.

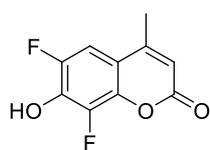
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 7.69 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 7.24 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 6.59 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 157.38 (s), 150.50 (d, *J* = 253.7 Hz), 142.81 (dd, *J* = 262.4, 2.8 Hz), 141.36 (t, *J* = 2.7 Hz), 139.66 (dd, *J* = 10.1, 3.1 Hz), 128.07 (dd, *J* = 18.1, 13.2 Hz), 119.83 (s), 119.03 (dd, *J* = 9.0, 2.0 Hz), 118.55 (q, *J* = 321.3 Hz), 109.34 (dd, *J* = 20.8, 4.3 Hz).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -72.76, -128.30, -140.16.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 1714, 1577, 1517, 1309, 1160, 975, 874, 713.

HRMS (ESI+): Calculated for C₁₂H₇NO₅SF₅ [M+H+ACN]⁺: 371.9959; found: 371.9965.

6,8-difluoro-7-hydroxy-4-methyl-2H-chromen-2-one – 103

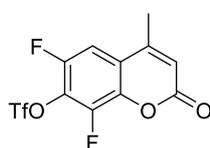
$C_{10}H_6F_2O_3$
MW 212,15

In a dry round-bottom flask under argon atmosphere were introduced 2,4-difluororesorcinol (200 mg, 1.37 mmol, 1 equiv.) and ethyl acetoacetate (173 μ L, 1.37 mmol, 1 equiv.). $MeSO_3H$ (2.23 mL, 34.3 mmol, 25 equiv.) was added dropwise at 0 °C. The reaction was stirred for 5 min at 0 °C and at room temperature overnight. After completion, the mixture was cooled to 0 °C and was quenched with water (4 mL). The precipitate formed was washed with cold water (\times 3). The crude product was dissolved with sodium hydroxide (1 M) (6 mL) and the resulting solution was filtered. The coumarin was reprecipitated from the filtrate by addition of H_2SO_4 (1 M) until approximately pH 1.0. After filtration, the solid was washed with cold water (\times 3) and dissolved with acetone. The solvents were removed by vacuum leading to 6,8-difluoro-7-hydroxy-4-methyl-2H-chromen-2-one **103** (265 mg, 1.25 mmol, 91% yield) as a pale pink solid.

NMR analyses are in accordance with literature data¹⁸⁸.

1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ_H 7.72 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.23 (dd, J = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 6.49 (d, J = 9.6 Hz, 1H).

^{19}F NMR (282 MHz, $DMSO-d_6$) δ_F -136.21, -153.84.

6,8-difluoro-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl trifluoromethanesulfonate – 104

$C_{11}H_5F_5O_5S$
MW 344,21

To a solution of 6,8-difluoro-7-hydroxy-4-methyl-2H-chromen-2-one **103** (222 mg, 1.05 mmol, 1 equiv.) in dry pyridine (4.55 mL) under argon atmosphere was added dropwise Tf_2O (424 μ L, 2.52 mmol, 2.4 equiv.) at 0 °C. The reaction was stirred for 5 min at 0 °C and at room temperature for 1 h. After completion, the reaction was poured onto a solution of aqueous HCl (1 M) and was extracted with EtOAc (\times 2). The combined organic layers were successively washed with water (\times 2), brine (\times 1), then dried over $MgSO_4$ and the solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by a filtration through a pad of silica gel to provide the desired compound (320 mg, 0.93 mmol, 89% yield) as a yellow solid.

m.p. = 111.1 – 112.0 °C.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.30 (dd, J = 9.5, 2.4 Hz, 1H), 6.46 (s, 2H), 2.44 (s, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 157.5, 150.4 (t, J = 2.6 Hz), 150.3 (dd, J = 252.4, 1.1 Hz), 142.9 (dd, J = 261.8, 3.0 Hz), 139.3 (dd, J = 9.8, 3.1 Hz), 127.8 (dd, J = 18.1, 13.4 Hz), 120.5 (dd, J = 8.3, 1.6 Hz), 118.5 (q, J = 321.1 Hz), 117.7, 106.52 (dd, J = 21.2, 4.2 Hz), 18.77.

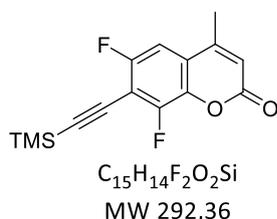
¹⁸⁸ C. Hedberg, F. J. Dekker, M. Rusch, S. Renner, S. Wetzels, N. Vartak, C. Gerding-Reimers, R. S. Bon, P. I. H. Bastiaens, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9832–9837.

^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3) δ_{F} -72.8, -127.5, -140.0.

IR (neat) ν_{max} (cm^{-1}) 3082, 1738, 1592, 1505.

HRMS (ESI+) Calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_6\text{O}_5\text{F}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 344.9841; found: 344.9856.

6,8-difluoro-4-methyl-7-((trimethylsilyl)ethynyl)-2H-chromen-2-one – 105



In a dry round-bottom flask under argon atmosphere was introduced 6,8-difluoro-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl trifluoromethanesulfonate **104** (208 mg, 0.6 mmol, 1 equiv.) which was dissolved in dry DMF (1.8 mL). NEt_3 was then added (1.05 mL, 7.8 mmol, 13 equiv.) and the solution was degassed by argon bubbling for 5 min. Then, CuI (11.4 mg, 0.06 mmol, 0.1 equiv.) and $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (42.1 mg, 0.06 mmol, 0.1 equiv.) were added and the solution was degassed by argon bubbling for further 5 min. Then, ethynyltrimethylsilane (0.98 mL, 6.0 mmol, 10 equiv.) was added and the reaction was stirred at room temperature for 15 h. After completion, water was added to the mixture and it was extracted with Et_2O ($\times 2$). The organic layer was washed with brine ($\times 2$), dried over MgSO_4 and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/ EtOAc 8:2, v/v) to provide the desired compound **105** (135 mg, 0.46 mmol, 77% yield) as a brown solid.

m.p. = 155.4 – 156.3 °C.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} 7.07 (dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz, 1H), 6.36 (s, 1H), 2.40 (d, $J = 1.2$ Hz, 3H), 0.30 (s, 9H).

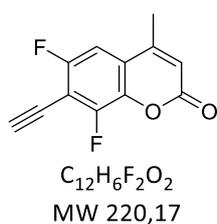
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} 158.9, 158.4 (dd, $J = 250.8, 3.9$ Hz), 151.2 (t, $J = 2.9$ Hz), 150.8 (dd, $J = 259.7, 5.9$ Hz), 138.9 (dd, $J = 11.5, 3.1$ Hz), 121.3 (dd, $J = 9.5, 2.1$ Hz), 114.1 (d, $J = 526.2$ Hz), 110.5 (t, $J = 3.5$ Hz), 105.7 (dd, $J = 22.2, 16.6$ Hz), 105.6 (dd, $J = 24.0, 4.3$ Hz), 90.05, 19.11, 0.0.

^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3) δ_{F} -112.26, -125.11.

IR (neat) ν_{max} (cm^{-1}) 3083, 2957, 2167, 1742, 1727, 1626, 1551.

HRMS (ESI+) Calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{F}_2\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 293.0809; found: 293.0809.

7-Ethynyl-6,8-difluoro-4-methyl-2H-chromen-2-one – 106



To a solution of 6,8-difluoro-4-methyl-7-((trimethylsilyl)ethynyl)-2H-chromen-2-one **105** (135 mg, 0.46 mmol, 1 equiv.), in MeOH (2.4 mL) was added K_2CO_3 (8.9 mg, 0.064 mmol, 0.14 equiv.). The solution was stirred at room temperature for 3.5 h under argon. After completion, water was added to quench the reaction and the resulting mixture was extracted with EtOAc ($\times 2$). The organic layer was dried

over MgSO₄ and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by a filtration through a pad of silica gel to provide the desired compound **106** (94 mg, 0.92 mmol, 92% yield) as an orange solid.

m.p.= 164.5 – 165.4 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 7.11 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H), 6.40 (s, 1H), 3.70 (s, 1H), 2.41 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 158.3 (dd, *J* = 251.5, 3.9 Hz), 158.3, 150.8 (dd, *J* = 260.6, 5.9 Hz), 150.7 (t, *J* = 2.9 Hz), 138.5 (dd, *J* = 11.2, 3.3 Hz), 121.6 (dd, *J* = 9.5, 2.3 Hz), 117.5, 105.39 (dd, *J* = 23.8, 4.4 Hz), 104.2 (dd, *J* = 22.0, 16.2 Hz), 90.6 (dd, *J* = 4.0, 3.1 Hz), 69.8, 18.76.

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -112.5, -124.9.

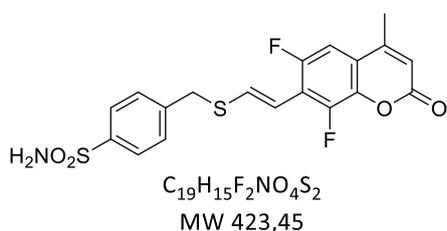
IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 3223, 2923, 2852, 2116, 1743, 1723, 1624, 1551.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₂H₇O₂F₂ [M+H]⁺: 221.0410; found: 221.0414.

Z-4-(((2-(6,8-difluoro-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)vinyl)thio)methyl)benzenesulfonamide and E-4-(((2-(6,8-difluoro-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)vinyl)thio)methyl)benzenesulfonamide – 107

To a solution of 4-(mercaptomethyl)benzenesulfonamide **33** (44 mg, 0.22 mmol, 1 equiv.) in dry MeCN (2.2 mL) under argon atmosphere was added 7-ethynyl-6,8-difluoro-4-methyl-2H-chromen-2-one **106** (52,4 mg, 0.24 mmol, 1.1 equiv.). The flask was protected from light and DBU (9.9 μL, 0.066 mmol, 0.3 equiv.) was added. The reaction was stirred at room temperature for 2 h. Then, reaction was quenched with H₂O and extracted with EtOAc (x 2). The combined organic layers were washed with brine (x 1), dried over MgSO₄ and solvents were removed by vacuum. The crude product was purified firstly by flash-column chromatography (silica gel, DCM/EtOAc 90:10, v/v) to provide the desired isomers Z and E (53 mg, 0.13 mmol, 57% yield) as a mixture (Z/E, 63:37). Then, both isomers were separated by RP-HPLC (System H) and fractions were collected and lyophilized to provide the desired compounds.

(CAUTION! Every step described above were performed under light protection)



m.p.= amorphous solid.

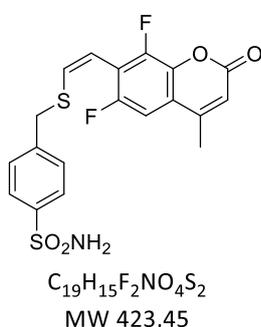
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ_H 7.80 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.61 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 7.34 (s, 2H), 6.48 (s, 1H), 6.44 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 4.31 (s, 2H), 2.39 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ_C 158.8, 154.8 (dd, *J* = 245.3, 6.8 Hz), 152.9 (t, *J* = 2.6 Hz), 145.9 (dd, *J* = 251.9, 8.5 Hz), 143.5 (s), 142.1 (s), 138.8 (dd, *J* = 11.9, 2.8 Hz), 136.9 (t, *J* = 8.3 Hz), 129.8, 126.4, 119.2 (dd, *J* = 10.5, 1.7 Hz), 116.7 (dd, *J* = 18.0, 12.3 Hz), 115.8 (s), 111.4 (s), 107.2 (dd, *J* = 25.9, 3.6 Hz), 35.3, 18.56 (s).

¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-d₆) δ_F -119.49, -135.98.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 3358, 3251, 1745, 1733, 1581, 1548, 1442, 1393, 1340, 1147.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₉H₁₆NO₄F₂S₂ [M+H]⁺: 424.0489; found: 424.0496.



m.p.= amorphous solid.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ_H 7.78 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.50 (dd, *J* = 10.0, 1.8 Hz, 1H), 7.34 (s, 2H), 6.96 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.42 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 4.17 (s, 2H), 2.40 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ_C 158.7, 154.6 (dd, *J* = 242.9, 5.7 Hz), 152.9 (t, *J* = 2.9 Hz), 145.7 (dd, *J* = 251.3, 8.6 Hz), 143.3, 143.0, 138.5 (dd, *J* = 12.0, 2.9 Hz), 136.3, 129.7, 126.4, 120.9 (d, *J* = 10.5 Hz), 116.7 (dd, *J* = 22.8, 17.0 Hz), 116.3

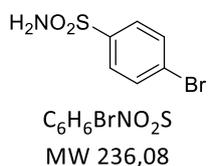
(s), 112.6 (s), 107.0 (dd, *J* = 25.4, 3.8 Hz), 36.7 (s), 18.6 (s).

¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-d₆) δ_F -115.1, -129,9.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 3373, 3260, 1716, 1626, 1596, 1396, 1333, 1215, 1159.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₉H₁₆NO₄F₂S₂ [M+H]⁺: 424.0489; found: 424.0497.

4-Bromobenzenesulfonamide – 110



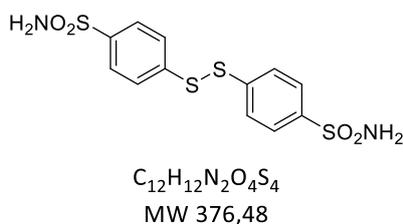
To a solution of 4-bromobenzenesulfonyl chloride (500 mg, 1.96 mmol, 1 equiv.) in dry THF (6.5 mL) at 0 °C was slowly added a solution of ammonia (7 N in MeOH, 1.06 mL, 7.45 mmol, 3.8 equiv.). Then, reaction was warmed to room temperature and was stirred for 4 h. After that time, solvents were removed by vacuum. The

crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 9:1 to 7:3, v/v) to provide the desired compound **110** (393 mg, 1.66 mmol, 85% yield) as a white solid.

NMR analysis is in accordance with literature data¹⁸⁹.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ_H 7.86 – 7.79 (m, 2H), 7.78 – 7.71 (m, 2H), 4.48 (bs, 2H).

4,4'-disulfanediyldibenzenesulfonamide – 111



In a round bottom flask were added 4-bromobenzenesulfonamide **110** (200 mg, 0.85 mmol, 1 equiv.), Na₂S₂O₃·5H₂O (529 mg, 2.13 mmol, 2.5 equiv.), Cs₂CO₃ (554 mg, 1.7 mmol, 2 equiv.) and PdG₂Xphos (31.5 mg, 0.04 mmol, 0.05 equiv.). The tube was flushed with argon (3 x) then DMF (1.7 mL) and water (50 μL) were

added. The mixture was stirred until homodisperse at rt then it was heated to 80 °C for 24 h. The

¹⁸⁹ J.-B. Feng, X.-F. Wu, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 6951–6954.

mixture was cooled, then solvents were removed by vacuum. Zn dust (850 mg) and HCl (10%, 8.5 mL) were added to the solid substance with cooling by ice-water. After stirred for 1 h, the mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with H₂O and brine and dried over MgSO₄. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 9:1 to 100% EtOAc, v/v) to provide the desired compound **111** (101 mg, 0.27 mmol, 32% yield) as a white solid.

m.p.= 178.7 °C.

¹H NMR (300 MHz, MeOH-d₄) δ_H 7.89 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H).

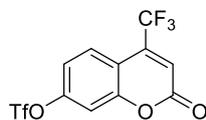
¹³C NMR (75 MHz, MeOH-d₄) δ_C 142.81 (s), 139.65 (s), 130.79 (s), 126.91 (s).

IR (neat) γ_{max} (cm⁻¹) 3594, 3305, 3202, 3083, 1577, 1475, 1391, 1319, 1154, 1100, 1076, 1013, 915, 829, 754, 624, 556.

HRMS (ESI-) Calculated for C₁₂H₁₁N₂O₄S₄ [M-H]⁻: 374.9602; found: 374.9584.

5. Procedures and molecular description for Chapter III

2-oxo-4-(trifluoromethyl)-2H-chromen-7-yl trifluoromethanesulfonate – 114



C₁₁H₄F₆O₅S
MW 362,20

To a solution of 7-hydroxy-4-(trifluoromethyl)-2H-chromen-2-one **112** (233 mg, 1.01 mmol, 1 equiv.) in dry pyridine (4.4 mL) under argon atmosphere was added dropwise Tf₂O (410 μL, 2.4 mmol, 2.4 equiv.) at 0 °C. The reaction was stirred for 5 min at 0 °C and at room temperature for 1 h. After completion, the reaction was quenched with water, then poured onto a solution of aqueous HCl (1 M) and was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, then dried over MgSO₄ and the solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by a filtration through a pad of silica gel to provide the desired compound (290 mg, 0.80 mmol, 79% yield) as a yellowish powder.

m.p.= 91.1 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 7.77 (dd, *J* = 8.9, 1.5 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.24 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H).

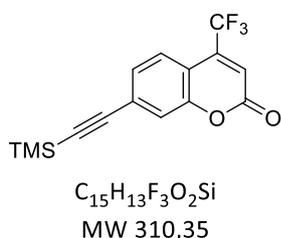
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 157.50 (s), 154.98 (s), 151.54 (s), 140.54 (q, *J* = 33.5 Hz), 127.32 (d, *J* = 2.5 Hz), 121.18 (q, *J* = 275.5 Hz), 118.66 (q, *J* = 320.9 Hz), 118.37 (s), 117.09 (q, *J* = 5.7 Hz), 113.61 (s), 111.21 (s).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -65.00, -72.69.

IR (neat) ν_{\max} (cm⁻¹) 3103, 1766, 1592, 1429, 1279, 1224, 1183, 1134, 1004, 893, 856, 815, 747, 688, 604, 503.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₃H₈NO₅F₆S [M+H+ACN]⁺: 404.0020; found : 404.0027.

4-(trifluoromethyl)-7-((trimethylsilyl)ethynyl)-2H-chromen-2-one – 116



In a dry sealed flask under argon atmosphere was introduced 2-oxo-4-(trifluoromethyl)-2H-chromen-7-yl trifluoromethanesulfonate **114** (144 mg, 0.4 mmol, 1 equiv.) which was dissolved in dry Et₃N (9.5 mL). The solution was degassed by argon bubbling for 5 min. Then, CuI (7.6 mg, 0.04 mmol, 0.1 equiv.) and PdCl₂(PPh₃)₂ (28.1 mg, 0.04 mmol, 0.1 equiv.) were added and the solution was degassed by argon bubbling for further 5 min. Then, ethynyltrimethylsilane (130 μ L, 0.8 mmol, 2 equiv.) was added and the flask was sealed. The reaction was heated to 90 °C for 5 h. Reaction was cooled to room temperature, then diluted with EtOAc and filtered through a pad of silica (elution with EtOAc). The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 95:5 to 85:15, v/v) to provide the desired compound (84 mg, 0.27 mmol, 68% yield) as a brown powder.

m.p. = 99.1 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} 7.64 (dd, *J* = 8.4, 1.9 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.40 (dd, *J* = 8.4, 1.6 Hz, 1H), 6.78 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 0.28 (s, 9H).

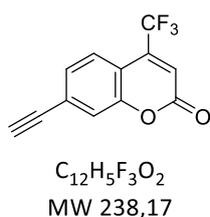
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_{C} 158.82 (s), 154.26 (s), 141.38 (q, *J* = 33.1 Hz), 128.76 (s), 125.38 (d, *J* = 2.4 Hz), 121.65 (q, *J* = 275.6 Hz), 120.82 (s), 116.41 (q, *J* = 5.7 Hz), 113.70 (s), 102.80 (s), 100.53 (s), 27.21 (s), -0.00 (s).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_{F} -64.67.

IR (neat) ν_{\max} (cm⁻¹) 3097, 3061, 2908, 1439, 1137, 1063, 994, 815, 693.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₅H₁₄O₂F₃Si [M+H]⁺: 311.0720; found : 311.0715.

7-ethynyl-4-(trifluoromethyl)-2H-chromen-2-one – 118



To a solution of 4-(trifluoromethyl)-7-((trimethylsilyl)ethynyl)-2H-chromen-2-one **116** (84 mg, 0.27 mmol, 1 equiv.) in dry THF (1.6 mL) under argon atmosphere was added dropwise tetra-*n*-butylammonium fluoride (TBAF) (1 M in THF, 540 μ L, 0.54 mmol, 2 equiv.) at 0 °C. The reaction was stirred at 0 °C for 5 min and then at room temperature for 2 h. After completion, the reaction was quenched with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and the solvents

were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 95:5 to 90:10, v/v) to provide the desired compound (43 mg, 0.18 mmol, 67% yield) as an orange powder.

m.p.= 127.2 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 7.60 (dd, *J* = 8.3, 1.7 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.37 (dd, *J* = 8.4, 1.4 Hz, 1H), 6.73 (s, 1H), 3.27 (s, 1H).

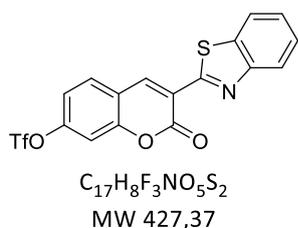
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 158.35 (s), 153.95 (s), 141.03 (q, *J* = 33.1 Hz), 128.60 (s), 127.19 (s), 125.30 (d, *J* = 2.4 Hz), 121.35 (q, *J* = 275.6 Hz), 120.91 (s), 116.49 (q, *J* = 5.8 Hz), 113.81 (s), 81.98 (s), 81.50 (s).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -64.70.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 2990, 2910, 1438, 1064, 815, 620.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₂H₆O₂F₃ [M+H]⁺: 239.0313; found : 239.0320.

3-(benzo[d]thiazol-2-yl)-2-oxo-2H-chromen-7-yl trifluoromethanesulfonate – 115



To a solution of 3-(benzo[d]thiazol-2-yl)-7-hydroxy-2H-chromen-2-one **113** (1 g, 3.39 mmol, 1 equiv.) in dry pyridine (14.7 mL) under argon atmosphere was added dropwise Tf₂O (1.4 mL, 8.14 mmol, 2.4 equiv.) at 0 °C. The reaction was stirred for 5 min at 0 °C and at room temperature for 1 h. After completion, the reaction was quenched with water, then poured onto a solution of aqueous HCl (1 M) and was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, then dried over MgSO₄ and the solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by a filtration through a pad of silica gel to provide the desired compound (1.28 g, 3.0 mmol, 88% yield) as a yellow powder.

m.p.= 134.9 °C.

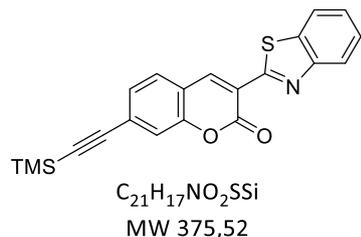
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 9.03 (s, 1H), 8.08 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.60 – 7.50 (m, 1H), 7.50 – 7.40 (m, 1H), 7.37 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.31 (dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz, 1H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 158.85 (s), 158.75 (s), 154.12 (s), 152.45 (s), 151.53 (s), 139.66 (s), 136.97 (s), 130.89 (s), 126.77 (s), 125.82 (s), 123.16 (s), 121.85 (s), 121.36 (s), 118.91 (s), 118.72 (q, *J* = 321.0 Hz), 118.63 (s), 110.47 (s).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -72.43.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 3058, 1729, 1612, 1484, 1426, 1217, 1136, 985, 883, 762, 599, 506.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₇H₉NO₅F₃S₂ [M+H]⁺: 427.9882; found : 427.9874.

3-(benzo[d]thiazol-2-yl)-7-((trimethylsilyl)ethynyl)-2H-chromen-2-one – 117

In a dry sealed flask under argon atmosphere was added 3-(benzo[d]thiazol-2-yl)-2-oxo-2H-chromen-7-yl trifluoromethane sulfonate **115** (1.28 g, 3.0 mmol, 1 equiv.) which was dissolved in dry DMF (9,1 mL) and dry Et_3N (26.3 mL). The solution was degassed by argon bubbling for 5 min. Then, CuI (57.1 mg, 0.3 mmol, 0.1 equiv.) and $PdCl_2(PPh_3)_2$ (210.6 mg, 0.3 mmol, 0.1 equiv.) were added and the solution was degassed by argon bubbling for further 5 min. Then, ethynyltrimethylsilane (898 μL , 6 mmol, 2 equiv.) was added and the flask was sealed. The reaction was heated to 90 °C for 5 h. Reaction was cooled to room temperature, then diluted with EtOAc and filtered through a pad of silica (elution with EtOAc). The organic layer was washed with brine, dried over $MgSO_4$ and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 95:5 to 85:15, v/v) to provide the desired compound (642 mg, 1.71 mmol, 57% yield) as an orange powder.

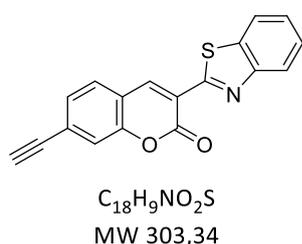
m.p. = 90.9 °C.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 8.93 (s, 1H), 8.03 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.52 – 7.45 (m, 1H), 7.43 (d, $J = 0.5$ Hz, 1H), 7.42 – 7.34 (m, 2H), 0.29 (s, 9H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 159.71 (d, $J = 1.5$ Hz), 153.54 (s), 152.62 (s), 140.63 (s), 137.07 (s), 129.23 (s), 128.87 (s), 128.23 (s), 126.73 (s), 125.67 (s), 123.17 (s), 121.93 (s), 120.51 (s), 119.86 (s), 119.08 (s), 103.48 (s), 100.39 (s), 29.92 (s), -0.00 (s).

IR (neat) ν_{max} (cm^{-1}) 2958, 2154, 1727, 1603, 1248, 1191, 987, 843, 756, 637.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{21}H_{18}NO_2SiS$ $[M+H]^+$: 376.0834; found : 376.0828.

3-(benzo[d]thiazol-2-yl)-7-ethynyl-2H-chromen-2-one – 119

To a solution of 3-(benzo[d]thiazol-2-yl)-7-((trimethylsilyl)ethynyl)-2H-chromen-2-one **117** (72 mg, 0.19 mmol, 1 equiv.) in dry THF (1.1 mL) under argon atmosphere was added dropwise tetra-*n*-butylammonium fluoride (TBAF) (1 M in THF, 380 μL , 0.38 mmol, 2 equiv.) at 0 °C. The reaction was stirred at 0 °C for 5 min and then at room temperature for 2 h. After completion, the reaction was quenched with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over $MgSO_4$ and the solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as a gradient from 95:5 to 9:1, v/v) to provide the desired compound (21 mg, 0.07 mmol, 36% yield) as a yellow powder.

m.p. = 120.3 °C.

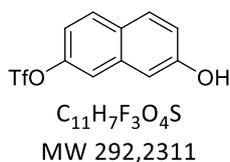
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 9.03 (s, 1H), 8.15 – 8.04 (m, 1H), 7.98 (ddd, *J* = 7.9, 1.2, 0.6 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.54 (ddd, *J* = 8.3, 5.7, 1.3 Hz, 2H), 7.49 – 7.38 (m, 2H), 3.36 (s, 1H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 159.51 (s), 153.38 (s), 152.50 (s), 140.47 (s), 136.96 (s), 129.20 (s), 128.84 (s), 127.00 (s), 126.64 (s), 125.61 (s), 123.05 (s), 121.83 (s), 120.78 (s), 120.13 (s), 119.29 (s), 82.16 (s), 81.91 (s), 29.74 (s).

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 3231, 3061, 2750, 1437, 1168, 1064, 1020, 984, 631.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₈H₁₀NO₂S [M+H]⁺: 304.0442; found : 304.0432.

7-Hydroxynaphthalen-2-yl trifluoromethanesulfonate – 123

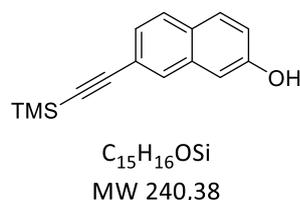


To a solution of naphthalene-2,7-diol (2 g, 0.012 mol, 1 equiv.) in DCM (24 mL) were added dry pyridine (6.8 mL, 0.084 mol, 7 equiv.) and Tf₂O dropwise (2.03 mL, 0.012 mol, 1 equiv.) under argon atmosphere at 0 °C. The reaction was stirred for 2h at 0 °C. After completion, the reaction was poured onto a solution of aqueous HCl (1 M) and was extracted with DCM. The organic layer was washed with brine, then dried over MgSO₄ and the solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 97:3, v/v) to provide the desired compound (1.29 g, 4.41 mmol, 37% yield) as a pale orange powder.

NMR analyses are in accordance with literature data¹⁹⁰.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 7.84 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.25 – 7.13 (m, 3H).

7-((Trimethylsilyl)ethynyl)naphthalen-2-ol – 124



In a dry sealed flask under argon atmosphere was introduced 7-hydroxynaphthalen-2-yl trifluoromethanesulfonate **123** (1.29 g, 4.4 mmol, 1 equiv.) which was dissolved in dry Et₃N (38.5 mL). The solution was degassed by argon bubbling for 5 min. Then, CuI (83.8 mg, 0.44 mmol, 0.1 equiv.) and PdCl₂(PPh₃)₂ (309 mg, 0.44 mmol, 0.1 equiv.) were added and the solution was degassed by argon bubbling for further 5 min. Then, ethynyltrimethylsilane (1.43 mL, 8.8 mmol, 2 equiv.) was added and the flask was sealed. The reaction was heated to 90 °C for 5 h. Reaction was cooled to room temperature, then water was added and the organic layer was extracted with Et₂O. Then it was dried over MgSO₄ and solvent was removed by vacuum. The crude product was

¹⁹⁰ M. Frigoli, C. Moustrou, A. Samat, R. Guglielmetti, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2799-2812.

purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 95:5 to 80:20, v/v) to provide the desired compound (803 mg, 3.34 mmol, 76% yield) as a brown solid.

m.p.= 79.5 °C.

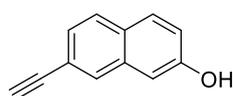
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 7.69 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 7.59 – 7.50 (m, 2H), 7.25 (dd, *J* = 8.4, 1.6 Hz, 1H), 7.04 – 6.96 (m, 2H), 0.20 (s, 9H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 154.04 (s), 134.06 (s), 130.43 (s), 129.59 (s), 128.27 (s), 127.70 (s), 126.24 (s), 120.81 (s), 118.79 (s), 109.46 (s), 105.75 (s), 94.61 (s), -0.00 (s).

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 3282, 2958, 2150, 1626, 1507, 1357, 1249, 1208, 832, 758, 637, 470.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₅H₁₇O_{Si} [M+H]⁺: 241.09704; found : 240.09739.

7-ethynynaphthalen-2-ol – 125



C₁₂H₈O
MW 168,20

To a solution of 7-((trimethylsilyl)ethynyl)naphthalen-2-ol **124** (99 mg, 0.41 mmol, 1 equiv.) in dry THF (2.4 mL) under argon atmosphere was added dropwise tetra-*n*-butylammonium fluoride (TBAF) (1 M in THF, 820 μL, 0.82 mmol, 2 equiv.) at 0 °C. The reaction was stirred at 0 °C for 5 min and then at room temperature for 2 h. After completion, the reaction was quenched with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and the solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by a filtration through a pad of silica gel to provide the desired compound (67 mg, 0.40 mmol, 97% yield) as a brown powder.

m.p.= 134.9 °C.

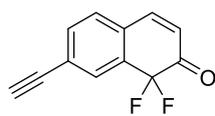
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 7.85 (s, 1H), 7.71 (dd, *J* = 8.4, 4.7 Hz, 2H), 7.38 (dd, *J* = 8.4, 1.6 Hz, 1H), 7.19 – 7.07 (m, 2H), 3.15 (s, 1H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 154.02 (s), 134.08 (s), 130.76 (s), 129.77 (s), 128.55 (s), 127.92 (s), 126.43 (s), 120.06 (s), 118.83 (s), 109.39 (s), 84.15 (s), 26.96 (s).

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 3459, 3265, 1626, 1597, 1516, 1432, 1388, 1366, 1194, 890, 843, 697, 532.

HRMS (ESI-) Calculated for C₁₂H₇O [M-H]⁻: 167.0490; found : 167.0497.

7-ethynyl-1,1-difluoronaphthalen-2(1H)-one – 126



C₁₂H₆F₂O
MW 204,18

To a solution of 7-ethynynaphthalen-2-ol **125** (302 mg, 1.8 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (18 mL) under argon atmosphere was added Selectfluor™ (1.28 g, 3.6 mmol, 2 equiv.). The reaction was stirred at room temperature for 24 h. After completion, the reaction was quenched with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and the solvents were removed by

vacuum. The crude product was purified by a filtration through a pad of silica gel to provide the desired compound (305 mg, 1.49 mmol, 83% yield) as a red powder.

m.p.= 93.7 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 7.92 – 7.83 (m, 1H), 7.59 (ddd, *J* = 7.9, 2.7, 1.3 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.21 (dt, *J* = 10.1, 2.7 Hz, 1H), 3.30 (s, 1H).

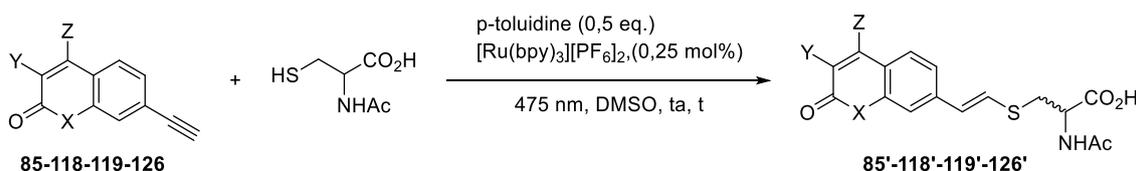
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 186.98 (t, *J* = 24.6 Hz), 144.85 (t, *J* = 1.4 Hz), 135.56 (t, *J* = 2.0 Hz), 133.33 (t, *J* = 23.6 Hz), 131.17 (t, *J* = 3.5 Hz), 130.25 (t, *J* = 5.6 Hz), 129.94 (s), 125.18 (t, *J* = 1.9 Hz), 123.90 (t, *J* = 2.4 Hz), 105.12 (t, *J* = 245.6 Hz), 81.88 (s), 81.39 (s).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -101.12.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 3249, 1693, 1299, 1252, 1171, 1044, 857, 712.

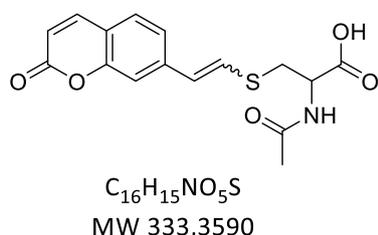
HRMS (ESI+) Calculated for C₁₂H₇OF₂ [M+H]⁺: 205.0470; found : 205.0465.

General procedure (GP) for visible-light induced thiolene reactions between cysteine and coumarin derivatives, in the presence of Ru(bpy)₃(PF₆)₂ as photocatalyst.



Reactions were conducted in a test tube (10 ml). N-acetyl cysteine (2.5 equiv.), photocatalyst (0.0025 equiv.), p-toluidine (0.5 equiv.) and coumarin (1 equiv.) were combined in DMSO. The mixture was stirred at room temperature and irradiated with a HepatoChem LED (475 nm, 18W) for a certain amount of time. Completion of the reaction was monitored with analytical HPLC. The purification of desired conjugated compounds was conducted by reverse phase HPLC (RP-HPLC) system and workup process.

2-acetamido-3-((2-(2-oxo-2H-chromen-7-yl)vinyl)thio)propanoic acid – 85'



According to GP, N-acetyl cysteine (96 mg, 588 μmol, 2.5 equiv.), Ru(bpz)₃(PF₆)₂ (508 μg, 0.588 μmol, 0.0025 equiv.) or Ru(bpy)₃(PF₆)₂ (505 μg, 0.588 μmol, 0.0025 equiv.), p-toluidine (12.6 mg, 118 μmol, 0.5 equiv.) and coumarin **85** (40 mg, 235 μmol, 1 equiv.) were combined in 0.8 ml DMSO. The mixture was stirred at room temperature and irradiated with a LED (475 nm, 18W) for 5 minutes. The crude product was purified by RP-HPLC (System I) to provide the desired compound (50 mg, 0.15 mmol, 64%).

m.p.= 139.8 °C.

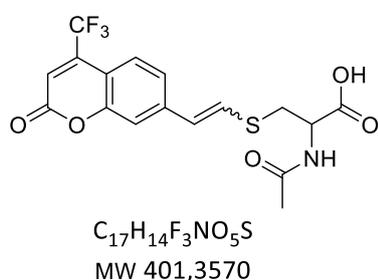
¹H NMR (300 MHz, acetonitrile-d₃) from a mixture Z/E (41:59) δ_H 7.83-7.78 (m, 1.7H), 7.57 (d, *J* = 8 Hz, 0.7H), 7.51 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.41-7.36 (m, 1.4H), 7.28-7.25 (m, 1.9H), 7.10 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 6.91 (br, 1.5H), 6.60-6.48 (m, 2.3H), 6.36-6.29 (m, 1.6H), 4.69-4.62 (m, 1.7H), 3.38 (d, *J* = 4.9 Hz, 0.7H), 3.34 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 3.28-3.18 (m, 1.9H), 1.92 (s, 1.6H), 1.9 (s, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, acetonitrile-d₃ and MeOH-d₄) δ_C 172.8, 172.7, 162.6, 162.5, 155.9, 155.4, 145.1, 145, 142.2, 142, 132.8, 131, 129.8, 129.4, 126.2, 125.1, 123.1, 119.1, 116.9, 116.7, 116.4, 113.9, 54, 53.6, 38.4, 35.2, 22.9.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 3291, 1725, 1613, 1584, 1535, 1421, 1289, 1230, 1132, 938, 846, 824, 617, 456.

HRMS (ESI-) Calculated for C₁₆H₁₄NO₅S [M-H]⁻: 332.0593; found : 332.0580.

2-acetamido-3-((2-(2-oxo-4-(trifluoromethyl)-2H-chromen-7-yl)vinyl)thio)propanoic acid – 118'



According to GP, N-acetyl cysteine (96 mg, 588 μmol, 2.5 equiv.), Ru(bpy)₃(PF₆)₂ (505 μg, 0.588 μmol, 0.0025 equiv.), p-toluidine (12.6 mg, 118 μmol, 0.5 equiv.) and coumarin **118** (56 mg, 235 μmol, 1 equiv.) were combined in 0.8 ml DMSO. The mixture was stirred at room temperature and irradiated with a LED (475 nm, 18W) for 15 minutes. The crude product was purified by RP-HPLC (System I) to

provide the desired compound (37 mg, 0.092 mmol, 39%).

m.p.= 165.4 °C.

¹H NMR (300 MHz, acetonitrile-d₃) from a mixture Z/E (28:72) δ_H 7.74-7.71 (m, 0.4H), 7.68-7.65 (m, 1H), 7.53-7.47 (m, 1H), 7.37-7.35 (m, 2H), 7.20 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.88 (br, 1.4H), 6.81 (br, 0.5H), 6.77 (br, 1H), 6.68-6.50 (m, 2H), 4.71-4.63 (m, 1.4H), 3.41 (d, *J* = 4.9 Hz, 0.4H), 3.36 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 3.30-3.19 (m, 1.5H), 1.90 (s, 3H).

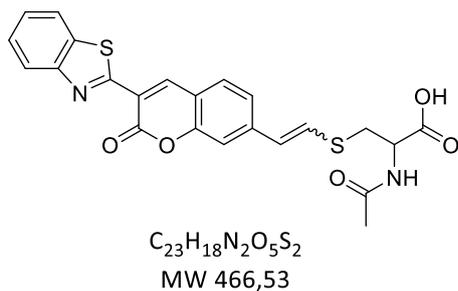
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ_C 171.7, 171.6, 169.4, 158.6, 158.4, 154.4, 141.7, 141.4, 139.3, 138.9, 133.7, 132.2, 125.2, 124.8, 123, 122.6, 122.4, 119.8, 115.7, 113, 111.2, 52.5, 51.9, 33.4, 22.3.

¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-d₆) -63.55.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 3302, 1736, 1613, 1579, 1536, 1405, 1290, 1193, 1160, 1135, 936, 874, 820, 652.

HRMS (ESI-) Calculated for C₁₇H₁₃NO₅F₃S [M-H]⁻: 400.0467; found : 400.0466.

2-acetamido-3-((2-(3-(benzo[d]thiazol-2-yl)-2-oxo-2H-chromen-7-yl)vinyl)thio)propanoic acid – 119'



This reaction was made under diluted conditions compared to GP, due to solubility issues of the starting material. N-acetyl cysteine (48 mg, 294 μ mol, 2.5 equiv.), $Ru(bpy)_3(PF_6)_2$ (253 μ g, 0.294 μ mol, 0.0025 equiv.), p-toluidine (6.3 mg, 58.8 μ mol, 0.5 equiv.) and coumarin **119** (35.6 mg, 118 μ mol, 1 equiv.) were combined in 0.8 ml DMSO. The mixture was stirred at room temperature and irradiated with a LED (475 nm, 18W) for 1 h. The crude product was purified by RP-HPLC (System I) to provide the desired compound (15 mg, 0.032 mmol, 27%).

m.p.= 212.5 °C.

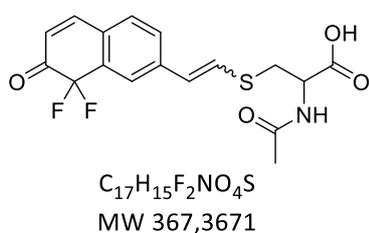
1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) only E isomer observed δ_H 9.14 (s, 1H), 8.4 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.16 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.05 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 8.19 Hz, 1H), 7.58-7.42 (m, 5H), 6.61 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 4.55-4.48 (m, 1H), 1.86 (s, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ_C 171.8, 169.4, 163.1, 159.9, 159.6, 154.1, 151.9, 142.4, 141.6, 135.8, 132.3, 130.4, 126.6, 125.3, 123.6, 122.4, 122.4, 122.2, 117.8, 117.2, 111.9, 51.9, 33.5, 22.4.

IR (neat) ν_{max} (cm^{-1}) 1721, 1649, 1573, 1536, 1477, 1373, 1192, 1134, 952, 769, 758, 729.

HRMS (ESI-) Calculated for $C_{23}H_{17}N_2O_5S_2$ [M-H] $^-$: 466.0579; found : 466.0579.

2-acetamido-3-((2-(8,8-difluoro-7-oxo-7,8-dihydronaphthalen-2-yl)vinyl)thio)propanoic acid – 126'



According to GP, N-acetyl cysteine (42 mg, 258 μ mol, 2.5 equiv.), $R(bpy)_3(PF_6)_2$ (221 μ g, 0.258 μ mol, 0.0025 equiv.), p-toluidine (5.5 mg, 51.5 μ mol, 0.5 equiv.) and coumarin **126** (21 mg, 103 μ mol, 1 equiv.) were combined in 0.35 ml DMSO. The mixture was stirred at room temperature and irradiated with a LED (475 nm, 18W) for 5 minutes.

The crude product was purified by RP-HPLC (System I) to provide the desired compound (2 mg, 0.0054 mmol, 5%).

m.p.= 72.9 °C.

1H NMR (300 MHz, acetonitrile- d_3) δ_H 7.81 (br, 1H), 7.6 (d, J = 10 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 6.96 (br, 1H), 6.59 (d, J = 15.7 Hz, 1H), 6.17 (dt, J = 10.1, 2.8 Hz, 1H), 4.7-4.63 (m, 1H), 3.37 (dd, J = 14, 4.9 Hz, 1H), 3.21 (dd, J = 14, 7 Hz, 1H), 1.89 (s, 3H).

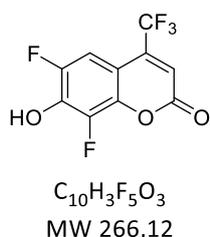
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ_C 188.2, 171.8, 171.7, 171.3, 147.1, 147, 140.8, 140.7, 134.4, 132.8, 132.7, 132, 131.6, 131.1, 129.8, 129.5, 128.1, 125.4, 125.1, 124.5, 123.6, 123.1, 106.8, 103.6, 53.6, 53.2, 38, 34.7, 22.7.

¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-d₆) -99.40, -99.67.

IR (neat) ν_{\max} (cm⁻¹) 3297, 1691, 1608, 1419, 1301, 1253, 1039, 940, 850, 551, 500.

HRMS (ESI-) Calculated for C₁₇H₁₄NO₄SF₂ [M-H]⁻: 366.0612; found : 366.0617.

6,8-Difluoro-7-hydroxy-4-(trifluoromethyl)-2H-chromen-2-one – 127



In a dry round-bottom flask under argon atmosphere were introduced 2,4-difluoro-7-hydroxy-4-(trifluoromethyl)-2H-chromen-2-one (400 mg, 2.7 mmol, 1 equiv.) and ethyl 4,4,4-trifluoroacetate (398 μ L, 2.7 mmol, 1 equiv.). MeSO₃H (4.4 mL, 67.5 mmol, 25 equiv.) was added dropwise at 0 °C. The reaction was stirred for 5 min at 0 °C and at room temperature overnight. After completion, the mixture was quenched with cold water and the precipitation was performed by letting the flask in a cold bath for 4 h. Then the precipitate was filtered and dissolved with acetone. The solvents were removed by vacuum leading to the expected product (157 mg, 0.59 mmol, 22% yield) as a yellowish solid.

m.p.= 198.3 °C.

¹H NMR (300 MHz, acetonitrile-d₃) δ_{H} 7.38 – 7.25 (m, 1H), 6.80 (s, 1H).

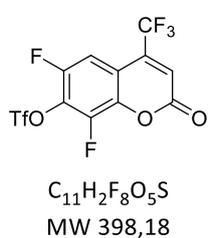
¹³C NMR (75 MHz, acetonitrile-d₃) δ_{C} 158.25 (s), 149.39 (dd, *J* = 241.0, 4.8 Hz), 141.60 (dd, *J* = 10.2, 2.5 Hz), 140.58 (dt, *J* = 33.3, 3.0 Hz), 140.46 (dd, *J* = 246.1, 5.8 Hz), 138.90 (dd, *J* = 18.0, 12.8 Hz), 122.09 (q, *J* = 274.6 Hz), 115.62 (dd, *J* = 11.6, 5.7 Hz), 106.85 – 106.28 (m), 105.80 (d, *J* = 10.6 Hz).

¹⁹F NMR (282 MHz, acetonitrile-d₃) δ_{F} -65.75, -136.63, -153.86.

IR (neat) ν_{\max} (cm⁻¹) 3259, 2923, 1722, 1637, 1586, 1529, 1439, 1313, 1292, 1156, 1135, 1046, 992, 877, 856, 730, 688, 599.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₂H₇NO₃F₅ [M+H+ACN]⁺: 308.0346; found : 308.0337.

6,8-Difluoro-2-oxo-4-(trifluoromethyl)-2H-chromen-7-yl trifluoromethanesulfonate – 128



To a solution of 6,8-difluoro-7-hydroxy-4-(trifluoromethyl)-2H-chromen-2-one **127** (36 mg, 0.14 mmol, 1 equiv.) in dry pyridine (610 μ L) under argon atmosphere was added dropwise Tf₂O (56.8 μ L, 0.34 mmol, 2.4 equiv.) at 0 °C. The reaction was stirred for 5 min at 0 °C and at room temperature for 1 h. After completion, the reaction was poured onto a solution of aqueous HCl (1 M) and was extracted with

EtOAc (\times 2). The combined organic layers were successively washed with water (\times 2), brine (\times 1), then dried over MgSO₄ and the solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by a filtration through a pad of silica gel to provide the desired compound (55 mg, 0.14 mmol, 99% yield) as a yellow solid.

m.p.= liquid product.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 7.39 (ddd, *J* = 9.5, 2.3, 1.4 Hz, 1H), 6.91 (s, 1H).

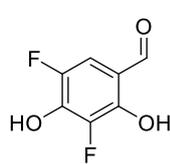
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 155.64 (s), 150.77 (d, *J* = 254.1 Hz), 143.39 (dd, *J* = 263.4, 3.1 Hz), 140.37 (dd, *J* = 10.6, 3.3 Hz), 140.31 – 139.71 (m), 128.95 (dd, *J* = 18.0, 13.1 Hz), 126.19 (s), 122.71 (q, *J* = 160.6 Hz), 117.65 (q, *J* = 186.6 Hz), 113.84 (dd, *J* = 7.7, 1.6 Hz), 107.88 – 107.34 (m).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -65.05, -72.58, -125.92, -137.89.

IR (neat) γ_{max} (cm⁻¹) 3103, 1766, 1592, 1513, 1463, 1429, 1329, 1306, 1279, 1224, 1168, 1183, 1152, 1134, 1113, 893, 856, 815.

HRMS (ESI-) Calculated for C₁₀H₂O₃F₅ [M-SO₂CF₃-H]⁻ : 264.9924; found : 264.9915.

3,5-Difluoro-2,4-dihydroxybenzaldehyde - 133



C₇H₄F₂O₃

MW 174,1017

In a sealed flask under argon atmosphere was introduced TFA (3.26 mL, 42.5 mmol, 25 equiv.). Then it was cooled to 0°C and HMTA (476.6 mg, 3.4 mmol, 2 equiv.) then 2,4-difluororesorcinol (250 mg, 1.7 mmol, 1 equiv.) were added. The reaction was refluxed and stirred overnight. After completion, TFA was removed by vacuum. Chloroform was added and the mixture was basified with NaHCO₃. The aqueous phase was collected then acidified with a solution of aqueous HCl (6 M). The organic phase was extracted with DCM (x 5) then dried over MgSO₄ and the solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by a filtration through a pad of silica gel to provide the desired compound (158 mg, 0.91 mmol, 53% yield) as a yellowish solid.

m.p.= 94.6 °C.

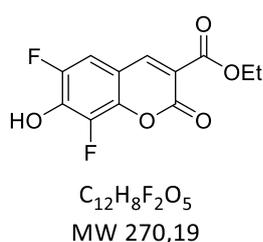
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 9.82 (dd, *J* = 1.2, 0.8 Hz, 1H), 7.22 (dd, *J* = 10.3, 2.1 Hz, 1H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ_C 189.5, 146.8 (d, *J* = 11.8 Hz), 145.6 (dd, *J* = 236.6, 4.5 Hz), 141.5 (dd, *J* = 18.0, 13.5 Hz), 141.2 (dd, *J* = 238.9, 5.7 Hz), 113.9 (d, *J* = 5.8 Hz), 109.4 (dd, *J* = 19.4, 2.9 Hz).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -147.18, -158.56.

IR (neat) γ_{max} (cm⁻¹) 3603, 3519, 2918, 2588, 1644, 1620, 1510, 1467, 1397, 1351, 1294, 1269, 1205, 1147, 1042, 947, 933, 877, 852, 774, 695.

HRMS (ESI-) Calculated for C₇H₃O₃F₂ [M-H]⁻ : 173.0050; found : 173.0049.

Ethyl 6,8-difluoro-7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate - 134

In a dry round-bottom flask under argon atmosphere were introduced 3,5-difluoro-2,4-dihydroxybenzaldehyde **133** (119 mg, 0.68 mmol, 1 equiv.) and diethyl malonate (477 μ L, 3.1 mmol, 4.6 equiv.). $MeSO_3H$ (2.2 mL, 34 mmol, 50 equiv.) was added and the reaction was stirred at room temperature overnight.

After completion, the mixture was quenched with cold water and the organic layer was extracted with EtOAc. Then it was washed with brine and the solvents were removed by vacuum leading to the expected product (49 mg, 0.18 mmol, 27% yield) as a yellowish solid.

m.p. = 210.5 °C.

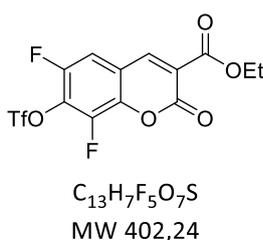
1H NMR (300 MHz, acetonitrile- d_3) δ_H 8.50 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 10.1, 2.1 Hz, 1H), 4.31 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.34 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, acetonitrile- d_3) δ_C 163.21 (s), 155.93 (s), 149.36 (dd, J = 240.9, 4.4 Hz), 148.66 (t, J = 3.0 Hz), 142.20 (dd, J = 9.4, 1.8 Hz), 140.37 (dd, J = 18.3, 12.8 Hz), 139.58 (dd, J = 245.6, 6.0 Hz), 116.61 (s), 110.61 (dd, J = 20.9, 3.4 Hz), 110.23 (dd, J = 9.9, 1.4 Hz), 62.06 (s), 14.05 (s).

^{19}F NMR (282 MHz, acetonitrile- d_3) δ_F -137.76, -155.57.

IR (neat) ν_{max} (cm^{-1}) 1726, 1680, 1615, 1582, 1526, 1467, 1372, 1282, 1243, 1170, 1073, 1004, 795, 732, 638.

HRMS (ESI-) Calculated for $C_{12}H_7O_5F_2$ $[M-H]^-$: 269.0262; found : 269.0258.

Ethyl 6,8-difluoro-2-oxo-7-(((trifluoromethyl)sulfonyl)oxy)-2H-chromene-3-carboxylate - 135

To a solution of ethyl 6,8-difluoro-7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate **134** (94 mg, 0.35 mmol, 1 equiv.) in dry pyridine (1.5 mL) under argon atmosphere was added dropwise Tf_2O (141.9 μ L, 0.84 mmol, 2.4 equiv.) at 0 °C. The reaction was stirred for 5 min at 0 °C and at room temperature for 1 h. After completion, the reaction was poured onto a solution of aqueous HCl

(1 M) and was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, then dried over $MgSO_4$ and the solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by a filtration through a pad of silica gel to provide the desired compound (126 mg, 0.31 mmol, 89% yield) as a pale yellow liquid.

m.p. = 134.9 °C.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 8.44 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.37 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 4.41 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.40 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_c 161.87 (s), 153.65 (s), 150.64 (d, *J* = 254.1 Hz), 145.88 (t, *J* = 2.7 Hz), 142.64 (dd, *J* = 263.8, 2.8 Hz), 140.66 (dd, *J* = 10.0, 3.1 Hz), 129.56 (dd, *J* = 18.2, 13.2 Hz), 121.40 (s), 118.53 (q, *J* = 321.3 Hz), 117.91 (dd, *J* = 9.1, 2.1 Hz), 110.66 (dd, *J* = 20.8, 4.4 Hz), 62.73 (s), 14.11 (s).

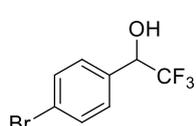
¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -72.65, -127.30, -139.01.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 3055, 1760, 1586, 1498, 1471, 1430, 1400, 1349, 1240, 1216, 1128, 1084, 1027, 1000, 862, 612.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₃H₈O₇F₅S [M+H]⁺: 402.9911; found : 402.9910.

6. Procedures and molecular description for Chapter IV

1-(4-Bromophenyl)-2,2,2-trifluoroethanol – 146



C₈H₆BrF₃O
MW 255,03

To a solution of 4-bromobenzaldehyde (1.74 g, 9.41 mmol, 1 equiv.) in DMF (17.4 mL) under argon atmosphere were added K₂CO₃ (15.6 mg, 0.11 mmol, 1mol%) and TMSCF₃ (1.67 mL, 11.3 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was stirred for 3h at room temperature. Then, aqueous HCl (3M) (8 mL) was added and the mixture was stirred for another 1h30 at room temperature. Water (20 mL) was added to the solution and the organic layer was extracted with EtOAc. Then it was washed with brine then dried over MgSO₄ and concentrated. The crude residue was filtrated over a pad of Celite® with EtOAc to provide the desired compound (2.40 g, 9.41 mmol, quantitative yield) as a transparent oil.

m.p.= liquid product.

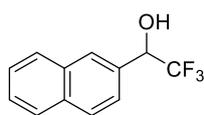
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 7.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 5.12 – 4.84 (m, 1H), 2.97 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_c 132.88 (d, *J* = 1.1 Hz), 131.85 (s), 129.12 (d, *J* = 0.8 Hz), 123.99 (q, *J* = 282.1 Hz), 123.80 (s), 72.23 (q, *J* = 32.2 Hz).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -78.45.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 3390, 1704, 1491, 1406, 1264, 1167, 1124, 1074, 1012, 846, 804, 726, 667, 585, 515.

HRMS (ESI+) Calculated for C₈H₆⁷⁹BrF₃O [M+H]⁺: 253.95541; found : 253.95450.

2,2,2-Trifluoro-1-(naphthalen-2-yl)ethanol – 147

$C_{12}H_9F_3O$
MW 226,20

To a solution of 2-naphthaldehyde (2.0 g, 12,8 mmol, 1 equiv.) in DMF (21.3 mL) under argon atmosphere were added K_2CO_3 (18.0 mg, 0.13 mmol, 1mol%) and $TMSCF_3$ (2.3 mL, 15.4 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was stirred for 3h at room temperature. Then, aqueous HCl (3M) (10 mL) was added and the mixture was stirred for another 1.5 hat room temperature. Water (20 mL) was added to the solution and the aqueous layer was extracted with EtOAc. Then the combined organic extracts were washed with brine then dried over $MgSO_4$ and concentrated. The crude residue was filtrated over a pad of Celite® with EtOAc to provide the desired compound (2.03 g, 8.97 mmol, 70% yield) as a white powder.

m.p.= 64.9 °C.

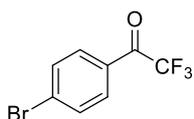
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.95 (s, 1H), 7.88 (dd, J = 9.0, 4.3 Hz, 3H), 7.62 – 7.51 (m, 3H), 5.17 (q, J = 6.7 Hz, 1H), 2.83 (bs, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 133.81 (s), 132.95 (s), 131.36 (s), 128.58 (s), 128.30 (s), 127.81 (s), 127.41 (s), 126.93 (s), 126.63 (s), 124.42 (q, J = 282.2 Hz), 124.38 (d, J = 0.9 Hz), 73.04 (q, J = 32.0 Hz).

^{19}F NMR (282 MHz, $CDCl_3$) δ_F -77.92.

IR (neat) ν_{max} (cm^{-1}) 3251, 1356, 1307, 1261, 1180, 1114, 1067, 818, 740, 701, 478, 452, 415.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{12}H_{10}F_3O$ $[M+H]^+$: 227.06055; found : 227.06136.

1-(4-Bromophenyl)-2,2,2-trifluoroethanone – 148

$C_8H_4BrF_3O$
MW 253,02

To a solution of 1-(4-bromophenyl)-2,2,2-trifluoroethanol **146** (500 mg, 1.96 mmol, 1 equiv.) in DCM (9.8 mL) under argon atmosphere were added DMP (2.91 g, 6.86 mmol, 3.5 equiv.) and Na_2CO_3 (831 mg, 7.84 mmol, 4 equiv.). The mixture was stirred for 3h at room temperature. Then, a solution of aqueous $Na_2S_2O_3$ saturated then a solution of aqueous $NaHCO_3$ saturated were added and the organic layer was extracted with EtOAc. Then it was washed with brine then dried over $MgSO_4$ and concentrated. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, pentane/DCM 90:10 v/v) to provide the desired compound (372 mg, 1.47 mmol, 75% yield) as a transparent oil.

m.p.= liquid product.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.92 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.70 (d, J = 8.7 Hz, 2H).

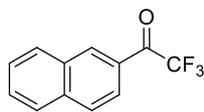
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 179.71 (q, J = 35.1 Hz), 132.61 (s), 131.43 (s), 131.40 (s), 128.66 (s), 116.53 (q, J = 291.1 Hz).

^{19}F NMR (282 MHz, $CDCl_3$) δ_F -71.54.

IR (neat) ν_{\max} (cm⁻¹) 1721, 1586, 1404, 1335, 1204, 1191, 1176, 1144, 1074, 941, 843, 756, 699, 603, 529.

HRMS (ESI+) Calculated for C₈H₅⁷⁹BrF₃O [M+H]⁺ : 252.94825; found : 252.94759.

2,2,2-Trifluoro-1-(naphthalen-2-yl)ethenone – 149



C₁₂H₇F₃O
MW 224,18

To a solution of 2,2,2-trifluoro-1-(naphthalen-2-yl)ethanol **147** (2.03 g, 9.0 mmol, 1 equiv.) in DCM (45 mL) under argon atmosphere were added DMP (13.4 g, 31.5 mmol, 3.5 equiv.) and Na₂CO₃ (3.8 g, 36 mmol, 4 equiv.). The mixture was stirred for 3h at room temperature. Then, a solution of aqueous Na₂S₂O₃ saturated then a solution of aqueous NaHCO₃ saturated were added and the organic layer was extracted with EtOAc. Then it was washed with brine then dried over MgSO₄ and concentrated. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 95:5 v/v) to provide the desired compound (1.68 g, 7.49 mmol, 83% yield) as a white solid.

m.p. = 56.1 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} 8.59 (s, 1H), 8.09 – 7.82 (m, 4H), 7.62 (dddd, *J* = 24.0, 8.1, 6.9, 1.3 Hz, 2H).

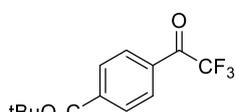
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_{C} 180.49 (q, *J* = 34.9 Hz), 136.50 (s), 133.22 (q, *J* = 2.7 Hz), 132.20 (s), 130.22 (s), 130.10 (s), 129.13 (s), 127.93 (s), 127.46 (s), 127.20 (s), 124.20 (d, *J* = 1.4 Hz), 116.93 (q, *J* = 291.4 Hz).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_{F} -70.68.

IR (neat) ν_{\max} (cm⁻¹) 1709, 1627, 1596, 1465, 1250, 1192, 1168, 1140, 1121, 969, 922, 901, 870, 851, 777, 767, 733, 635, 471.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₂H₈F₃O [M+H]⁺ : 225.04490; found : 225.04509.

Tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoroacetyl)benzoate – 151



C₁₃H₁₃F₃O₃
MW 274,24

To a solution of 4-(trifluoroacetyl)benzoic acid **150** (200 mg, 0.92 mmol, 1 equiv.) in DCM (2.5 mL) under argon atmosphere were added tert-butyl alcohol (188 μ L, 2.73 mmol, 3 equiv.), DCC (206 mg, 1.00 mmol, 1.1 equiv.), and DMAP (89.6 mg, 0.73 mmol, 0.8 equiv.). Then, the reaction mixture was heated under reflux for 15h. After cooling down to room temperature, the crude reaction mixture was filtered and the filtrate was washed with a solution of aqueous HCl (1 M), a solution of aqueous NaHCO₃ saturated, and brine. The organic layer was dried by MgSO₄ and concentrated. The crude residue was dissolved in ACN, a small portion of Celite® was added to prepare a solid deposit for purification and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography

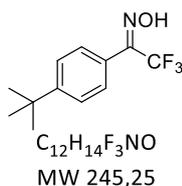
(silica gel, cyclohexane/EtOAc 95:5, v/v) to provide the desired compound (101 mg, 0.37 mmol, 40% yield) as a white powder.

NMR analysis is in accordance with literature data¹⁹¹.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 8.31 – 7.96 (m, 4H), 1.62 (s, 9H).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -71.63.

1-(4-(Tert-butyl)phenyl)-2,2,2-trifluoroethanone oxime – 152a



To a solution of 1-(4-(tert-butyl)phenyl)-2,2,2-trifluoroethanone (1 g, 4.3 mmol, 1 equiv.) in EtOH/H₂O 9:1 (15.4 mL) under argon atmosphere were added NaOAc (812 mg, 9.9 mmol, 2.3 equiv.) and NH₂OH.HCl (598 mg, 8.6 mmol, 2 equiv.). Then, the reaction mixture was heated under reflux for 15h. After cooling down to room temperature, the crude reaction mixture was washed with a solution of aqueous HCl

(1 M). The organic layer was extracted with EtOAc and washed with brine. Then the organic layer was dried by MgSO₄ and concentrated. The crude residue was filtrated over a pad of Celite® with EtOAc to provide the desired compound (829 mg, 3.38 mmol, 79% yield) as a white powder.

m.p.= 126.3 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 9.00 (bs, 1H), 7.51 (s, 4H), 1.35 (s, 9H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_c 154.06 (s), 147.70 (q, *J* = 31.6 Hz), 128.49 (s), 125.59 (s), 122.88 (s), 120.71 (q, *J* = 275.0 Hz), 34.96 (s), 31.14 (s).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -66.45.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 2970, 1609, 1450, 1333, 1204, 1181, 1146, 1008, 963, 835, 721, 558.

HRMS (ESI-) Calculated for C₁₂H₁₅F₃NO [M+H]⁺ : 246.10275; found : 246.10288.

1-(4-Chlorophenyl)-2,2,2-trifluoroethanone oxime – 152b



To a solution of 1-(4-chlorophenyl)-2,2,2-trifluoroethanone (1 g, 4.79 mmol, 1 equiv.) in EtOH/H₂O 9:1 (17.1 mL) under argon atmosphere were added NaOAc (906 mg, 11.0 mmol, 2.3 equiv.) and NH₂OH.HCl (667 mg, 9.6 mmol, 2 equiv.). Then, the reaction mixture was heated under reflux for 15h. After cooling down to room temperature,

the crude reaction mixture was washed with a solution of aqueous HCl (1 M). The organic layer was extracted with EtOAc and washed with brine. Then the organic layer was dried by MgSO₄ and

¹⁹¹ Sakurai, K.; Yasui, T.; Mizuno, S. *Asian J. Org. Chem.* **2015**, *4*, 724–728.

concentrated. The crude residue was filtrated over a pad of Celite® with EtOAc to provide the desired compound (1.07 g, 4.79 mmol, quantitative yield) as a white powder.

m.p.= 70.9 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 8.85 (s, 1H), 7.54 – 7.43 (m, 4H).

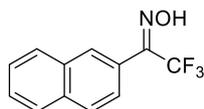
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 146.87 (q, *J* = 32.5 Hz), 137.03 (s), 130.18 (s), 129.01 (s), 124.16 (s), 120.45 (q, *J* = 274.9 Hz).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -66.56.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 3293, 1695, 1593, 1494, 1436, 1397, 1331, 1185, 1169, 1132, 1097, 1030, 1010, 960, 833, 729, 640, 492.

HRMS (ESI+) Calculated for C₈H₆³⁵ClF₃NO [M+H]⁺ : 224.00118; found : 224.00129.

2,2,2-Trifluoro-1-(naphthalen-2-yl)ethanone oxime – 152c



C₁₂H₈F₃NO
MW 239,20

To a solution of 2,2,2-trifluoro-1-(naphthalen-2-yl)ethenone **149** (1.68 g, 7.5 mmol, 1 equiv.) in EtOH/H₂O 9:1 (25.0 mL) under argon atmosphere were added NaOAc (1.42 g, 17.3 mmol, 2.3 equiv.) and NH₂OH.HCl (1.04 g, 15.0 mmol, 2 equiv.). Then, the reaction mixture was heated under reflux for 15h. After cooling down to room temperature, the crude reaction mixture was washed with a solution of aqueous

HCl (1 M). The organic layer was extracted with EtOAc and washed with brine. Then the organic layer was dried by MgSO₄ and concentrated. The crude residue was filtrated over a pad of Celite® with EtOAc to provide the desired compound (1.54 g, 6.43 mmol, 86% yield) as a white powder.

m.p.= 153.6 °C.

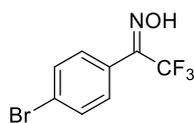
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 8.96 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.02 – 7.80 (m, 3H), 7.67 – 7.50 (m, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 147.97 (q, *J* = 32.6 Hz), 133.97 (s), 132.66 (s), 129.10 (s), 128.76 (s), 128.34 (s), 127.84 (s), 127.81 (s), 126.85 (s), 125.14 (s), 123.34 (s), 120.75 (q, *J* = 274.9 Hz).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -66.36.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 3253, 1328, 1198, 1174, 1134, 1027, 971, 942, 824, 755, 733, 483, 474.

HRMS (ESI-) Calculated for C₁₂H₇NOF₃ [M-H]⁻ : 238.0480; found : 238.0481.

1-(4-Bromophenyl)-2,2,2-trifluoroethanone oxime – 152d

$C_8H_5BrF_3NO$
MW 268,03

To a solution of 1-(4-bromophenyl)-2,2,2-trifluoroethanone **148** (372 mg, 1.5 mmol, 1 equiv.) in EtOH/H₂O 9:1 (5.3 mL) under argon atmosphere were added NaOAc (277 mg, 3.4 mmol, 2.3 equiv.) and NH₂OH.HCl (204 mg, 2.9 mmol, 2 equiv.). Then, the reaction mixture was heated under reflux for 15h. After cooling down to room temperature, the crude reaction mixture was washed with a solution of aqueous HCl (1 M). The organic layer was extracted with EtOAc and washed with brine. Then the organic layer was dried by MgSO₄ and concentrated. The crude residue was filtrated over a pad of Celite® with EtOAc to provide the desired compound (261 mg, 0.97 mmol, 66% yield) as a white powder.

m.p. = 58.0 °C.

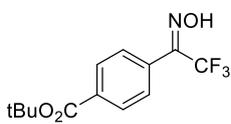
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 8.79 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, major isomer), 7.57 (d, *J* = 8.7 Hz, 0.85H, minor isomer), 7.41 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, major isomer), 7.37 (dd, *J* = 8.8, 0.9 Hz, 0.85H, minor isomer).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 147.22 (q, *J* = 30.7 Hz, minor isomer), 147.02 (q, *J* = 32.9 Hz, major isomer), 131.96 (s, major isomer), 131.88 (s, minor isomer), 130.31 (s, major isomer), 129.91 (d, *J* = 1.0 Hz, minor isomer), 125.35 (s, major isomer), 124.71 (s, major isomer), 120.40 (q, *J* = 274.8 Hz, major isomer).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -62.34 (minor isomer), -66.56 (major isomer).

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 3293, 2922, 1590, 1491, 1440, 1396, 1335, 1181, 1140, 1074, 1005, 947, 827, 734, 628, 495.

HRMS (ESI+) Calculated for C₈H₅⁷⁹BrF₃NO [M+H]⁺ : 266.95066; found : 266.94943.

Tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoro-1-(hydroxyimino)ethyl)benzoate – 152e

$C_{13}H_{14}F_3NO_3$
MW 289,25

To a solution of tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoroacetyl)benzoate **151** (200 mg, 0.73 mmol, 1 equiv.) in EtOH/H₂O 9:1 (2.68 mL) under argon atmosphere were added NaOAc (138 mg, 1.68 mmol, 2.3 equiv.) and NH₂OH.HCl (101 mg, 1.46 mmol, 2 equiv.). Then, the reaction mixture was heated under reflux for 15h. After cooling down to room temperature, the crude reaction mixture was washed with a

solution of aqueous HCl (1 M). The organic layer was extracted with EtOAc and washed with brine. Then the organic layer was dried by MgSO₄ and concentrated. The crude residue was dissolved in DCM, a small portion of Celite® was added to prepare a solid deposit for purification and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 95:5, v/v) to provide the desired compound (111 mg, 0.38 mmol, 53% yield) as a white powder.

m.p.= 88.2 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 9.39 (s, 1H), 8.10 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.57 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 1.61 (s, 9H).

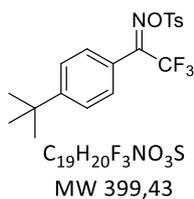
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 165.25 (s), 147.10 (q, *J* = 32.8 Hz), 133.71 (s), 130.05 (s), 129.59 (s), 128.68 (s), 120.50 (q, *J* = 274.6 Hz), 82.02 (s), 28.14 (s).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -66.55.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 3384, 1703, 1403, 1304, 1185, 1127, 1012, 961, 847, 775, 710, 512.

HRMS (ESI-) Calculated for C₁₃H₁₃NO₃F₃ [M-H]⁻ : 288.0848 ; found : 288.0847.

1-(4-(Tert-butyl)phenyl)-2,2,2-trifluoroethanone O-tosyl oxime – 153a



To a solution of 1-(4-(tert-butyl)phenyl)-2,2,2-trifluoroethanone oxime **152a** (829 mg, 3.38 mmol, 1 equiv.) in acetone (30.7 mL) at 0 °C was added triethylamine (1.4 mL, 10.1 mmol, 3 equiv.) then TsCl (709 mg, 3.72 mmol, 1.1 equiv.). Then, the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 2 h. Then, solvents were removed by vacuum. The crude residue was filtrated over a pad of Celite® with EtOAc to provide the desired compound (1.35 g, 3.38 mmol, quantitative yield) as a white powder.

m.p.= 102.2 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 7.90 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.48 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.42 – 7.33 (m, 4H), 2.47 (s, 3H), 1.33 (s, 9H).

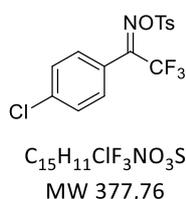
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 155.28 (s), 153.95 (dd, *J* = 66.1, 33.0 Hz), 146.12 (s), 131.30 (s), 129.90 (s), 129.33 (s), 128.68 (q, *J* = 240.1 Hz), 128.43 (s), 125.83 (s), 121.61 (s), 35.07 (s), 31.06 (s), 21.82 (s).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -66,40.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 2967, 1596, 1387, 1339, 1194, 1149, 1092, 1001, 893, 811, 757, 711, 664, 548, 403.

HRMS (ESI-) Calculated for C₁₉H₂₁F₃NO₃S [M+H]⁺ : 400.11160; found : 400.11377.

1-(4-Chlorophenyl)-2,2,2-trifluoroethanone O-tosyl oxime – 153b



To a solution of 1-(4-(tert-butyl)phenyl)-2,2,2-trifluoroethanone oxime **153a** (970 mg, 4.34 mmol, 1 equiv.) in acetone (39.5 mL) at 0 °C was added triethylamine (1.8 mL, 13.0 mmol, 3 equiv.) then TsCl (910 mg, 4.77 mmol, 1.1 equiv.). Then, the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 2 h. Then, solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/DCM 95:5 to 85:15, v/v) to provide the desired compound (1.64 g, 4.34 mmol, quantitative yield) as a white powder.

m.p.= 125.9 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.46 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.37 (dd, *J* = 10.0, 8.4 Hz, 4H), 2.48 (s, 3H).

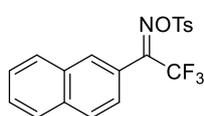
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 152.98 (q, *J* = 33.7 Hz), 146.37 (s), 138.23 (s), 131.03 (s), 129.99 (s), 129.94 (s), 129.94 (s), 129.34 (s), 122.88 (s), 119.51 (q, *J* = 277.6 Hz), 21.84 (s).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -66.65.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 2602, 2496, 1595, 1475, 1390, 1195, 1178, 1141, 1092, 1034, 1006, 897, 817, 759, 662, 548.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₅H₁₂NO₃F₃S³⁵Cl [M+H]⁺ : 378.0179; found : 378.0161.

2,2,2-Trifluoro-1-(naphthalen-2-yl)ethanone O-tosyl oxime – 153c



C₁₉H₁₄F₃NO₃S
MW 393,38

To a solution of 2,2,2-trifluoro-1-(naphthalen-2-yl)ethanone oxime **152b** (1.54 g, 6.45 mmol, 1 equiv.) in acetone (59 mL) at 0 °C was added triethylamine (2.68 mL, 19.35 mmol, 3 equiv.) then TsCl (1.35 g, 7.10 mmol, 1.1 equiv.). Then, the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 2 h. Then, solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/DCM 95:5 to 60:40, v/v) to provide the desired compound (2.54 g, 6.45 mmol, quantitative yield) as a white powder.

m.p.= 139.8 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 7.90 (ddd, *J* = 9.5, 6.1, 2.3 Hz, 6H), 7.65 – 7.52 (m, 2H), 7.44 (dd, *J* = 8.8, 1.4 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 2.48 (s, 3H).

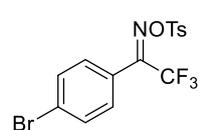
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 154.23 (q, *J* = 33.4 Hz), 146.22 (s), 134.30 (s), 132.40 (s), 131.26 (s), 129.95 (s), 129.34 (s), 129.24 (s), 128.90 (s), 128.77 (s), 128.43 (s), 127.89 (s), 127.22 (s), 124.41 (s), 121.97 (s), 119.81 (q, *J* = 277.7 Hz), 21.83 (s).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -66.42.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 1379, 1329, 1194, 1177, 1146, 1125, 1095, 883, 728, 781, 659, 549, 482.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₉H₁₅NO₃F₃S [M+H]⁺ : 394.0725; found : 394.0731.

1-(4-Bromophenyl)-2,2,2-trifluoroethanone O-tosyl oxime – 153d



C₁₅H₁₁BrF₃NO₃S
MW 422,22

To a solution of 1-(4-bromophenyl)-2,2,2-trifluoroethanone oxime **152d** (240 mg, 0.90 mmol, 1 equiv.) in acetone (8.2 mL) at 0 °C was added triethylamine (374 μL, 2.7 mmol, 3 equiv.) then TsCl (188.7 mg, 0.99 mmol, 1.1 equiv.). Then, the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 2 h. Then, solvents were

removed by vacuum. The crude product was purified by RP-HPLC (System J) to provide the desired compound (224 mg, 0.53 mmol, 59% yield) as a white powder.

m.p.= 126.3 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 7.89 (d, *J* = 8.5 Hz, 0.8H, minor isomer), 7.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, major isomer), 7.61 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, major isomer), 7.55 (d, *J* = 8.6 Hz, 0.8H, minor isomer), 7.39 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, major isomer), 7.37 (d, *J* = 8.0 Hz, 0.8H, minor isomer), 7.31 (d, *J* = 8.8 Hz, 0.8H, minor isomer), 7.28 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, major isomer), 2.46 (s, 3H, major isomer), 2.45 (s, 2.4H, minor isomer).

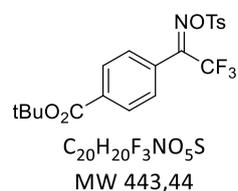
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 153.08 (q, *J* = 33.7 Hz, major isomer), 152.67 (q, *J* = 32.4 Hz, minor isomer), 146.45 (s, major isomer), 146.31 (s, minor isomer), 132.29 (s, major isomer), 132.15 (s, minor isomer), 131.27 (s, minor isomer), 131.00 (s, major isomer), 130.32 (d, *J* = 1.2 Hz, minor isomer), 130.02 (s, major isomer), 129.31 (s, major isomer), 129.16 (s, minor isomer), 126.91 (s, minor isomer), 126.63 (s, major isomer), 123.36 (s, major isomer), 119.46 (q, *J* = 277.5 Hz, major isomer), 117.20 (q, *J* = 283.9 Hz, minor isomer), 21.80 (s, major isomer).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -61.48 (minor isomer), -66.67 (major isomer).

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 1590, 1390, 1195, 1179, 1142, 1074, 900, 818, 751, 684, 549.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₅H₁₁⁷⁹BrF₃NO₃S [M+H]⁺ : 420.95951; found : 420.95872.

Tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoro-1-((tosyloxy)imino)ethyl)benzoate – 153e



To a solution of tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoro-1-(hydroxyimino)ethyl) benzoate **152e** (185 mg, 0.64 mmol, 1 equiv.) in acetone (5.78 mL) at 0 °C was added triethylamine (267 μL, 1.92 mmol, 3 equiv.) then TsCl (134 mg, 0.70 mmol, 1.1 equiv.). Then, the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred

for 1 h. Then, solvents were removed by vacuum. The crude residue was dissolved in DCM and a small portion of Celite® was added to prepare a solid deposit for purification and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 97:3, v/v) to provide the desired compound (268 mg, 0.60 mmol, 94% yield) as a white powder.

m.p.= 113.1 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 8.07 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, major isomer), 8.01 (d, *J* = 8.5 Hz, 0.75H, minor isomer), 7.88 (d, *J* = 5.5 Hz, 0.75H, minor isomer), 7.86 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, major isomer), 7.47 (d, *J* = 8.0 Hz, 0.75H, minor isomer), 7.42 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, major isomer), 7.36 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, major isomer), 7.36 (d, *J* = 8.1 Hz, 0.75H, minor isomer), 2.44 (s, 3H, major isomer), 2.42 (s, 1.12H, minor isomer), 1.58 (s, 9H, major isomer), 1.58 (s, 3.38H, minor isomer).

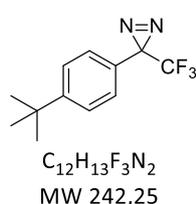
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_c 164.44 (s, minor isomer), 164.34 (s, major isomer), 153.70 (q, *J* = 33.9 Hz, minor isomer), 153.62 (q, *J* = 33.9 Hz, major isomer), 146.40 (s, major isomer), 146.30 (s, minor isomer), 134.98 (s, minor isomer), 134.88 (s, major isomer), 131.26 (s, minor isomer), 131.07 (s, major isomer), 130.00 (s, minor isomer), 130.00 (s, major isomer), 129.79 (s, major isomer), 129.66 (s, minor isomer), 129.25 (s, major isomer), 129.16 (s, minor isomer), 128.73 (s, minor isomer), 128.72 (s, major isomer), 128.32 (s, major isomer), 128.19 (s, minor isomer), 119.48 (q, *J* = 277.5 Hz, major isomer), 117.36 (q, *J* = 277.5 Hz, minor isomer), 81.91 (s), 28.06 (s), 21.73 (s)

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -61.49, -66.84.

IR (neat) γ_{max} (cm⁻¹) 2988, 1713, 1389, 1370, 1299, 1188, 1153, 1116, 1002, 911, 814, 776, 742, 695, 548, 510.

HRMS (ESI-) Calculated for C₂₀H₂₀NO₅F₃S³⁵Cl [M-Cl]⁻ : 478.0703 ; found : 478.0707.

3-(4-(Tert-butyl)phenyl)-3-(trifluoromethyl)-3H-diazirine – 154a



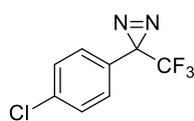
To tert-butyl 1-(4-(tert-butyl)phenyl)-2,2,2-trifluoroethane O-tosyl oxime **153a** (1.35 g, 3.38 mmol, 1 equiv.) was slowly added a solution of ammonia (7 N in MeOH, 8.5 mL, 59.2 mmol, 17.5 equiv.) under argon atmosphere. Then, the reaction mixture was stirred for 2.5 h. Then, water was added to the mixture and the organic layer was extracted with Et₂O. Then the organic layer was dried by MgSO₄ and concentrated. The resulting product was dissolved in DCM (33.8 mL) and it was cooled to 0°C. Then, triethylamine (1.4 mL, 10.1 mmol, 3 equiv.) and iodine (943.7 mg, 3.72 mmol, 1.1 equiv.) were incorporated and it was stirred for 1h at 0°C. The mixture was diluted with DCM and washed with sat. aq. sodium thiosulfate. The aqueous layer was re-extracted with DCM. Then the combined organic layers were washed with brine and dried by MgSO₄ and concentrated. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, 100% pentane) to provide the desired compound (442 mg, 1.81 mmol, 54% yield) as a pale-yellow oil.

NMR analysis is in accordance with literature data¹⁹².

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 7.43 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 1.32 (s, 9H).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -65.27.

¹⁹² Musolino, S. F.; Pei, Z.; Bi, L.; DiLabio, G. A.; Wulff, J. E. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 12138-12148.

3-(4-Chlorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-3H-diazirine – 154b

$C_8H_4ClF_3N_2$
MW 220,58

To 1-(4-chlorophenyl)-2,2,2-trifluoroethanone O-tosyl oxime **153b** (602 mg, 1.59 mmol, 1 equiv.) was slowly added a solution of ammonia (7 N in MeOH, 4.0 mL, 27.8 mmol, 17.5 equiv.) under argon atmosphere. Then, the reaction mixture was stirred for 2.5 h. Then, water was added to the mixture and the organic layer was extracted with Et₂O. Then the organic layer was dried by MgSO₄ and concentrated. The resulting product was dissolved in DCM (15.9 mL) and it was cooled to 0°C. Then, triethylamine (661 μL, 4.77 mmol, 3 equiv.) and iodine (443.9 mg, 1.75 mmol, 1.1 equiv.) were incorporated and it was stirred for 1h at 0°C. The mixture was diluted with DCM and washed with sat. aq. sodium thiosulfate. The aqueous layer was re-extracted with DCM. Then the combined organic layers were washed with brine and dried by MgSO₄ and concentrated. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, 100% pentane) to provide the desired compound (196 mg, 0.89 mmol, 56% yield) as a pale-yellow oil.

m.p.= liquid product.

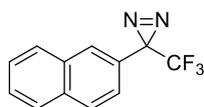
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 7.38 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 136.12 (s), 129.21 (s), 127.92 (d, *J* = 1.2 Hz), 127.59 (s), 121.97 (q, *J* = 274.7 Hz), 28.17 (q, *J* = 40.8 Hz).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -65.30.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 2925, 2855, 1498, 1343, 11189, 1158, 1098, 938, 819.

HRMS (ESI+) Calculated for C₈H₅³⁵ClF₃ [M+H]⁺ : 193.00319; found : 193.00389.

3-(Naphthalen-2-yl)-3-(trifluoromethyl)-3H-diazirine – 154c

$C_{12}H_7F_3N_2$
MW 236,20

To 2,2,2-trifluoro-1-(naphthalen-2-yl)ethanone O-tosyl oxime **153c** (2.4 g, 6.10 mmol, 1 equiv.) in THF (14 mL) was slowly added a solution of ammonia (7 N in MeOH, 15.3 mL, 0.11 mol, 17.5 equiv.) under argon atmosphere. Then, the reaction mixture was stirred for 4 h. Then, water was added to the mixture and the organic layer was extracted with DCM. Then the organic layer was dried by MgSO₄ and concentrated. The resulting product was dissolved in DCM (61.0 mL) and it was cooled to 0°C. Then, triethylamine (2.54 mL, 18.3 mmol, 3 equiv.) and iodine (1.70 g, 6.71 mmol, 1.1 equiv.) were incorporated and it was stirred for 1h at 0°C. The mixture was diluted with DCM and washed with sat. aq. sodium thiosulfate. The aqueous layer was re-extracted with DCM. Then the combined organic layers were washed with brine and dried by MgSO₄ and concentrated. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/DCM 97:3, v/v) to provide the desired compound (713 mg, 3.02 mmol, 50% yield) as an orange solid.

m.p.= 52.2 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 7.90 (dd, *J* = 13.7, 7.0 Hz, 3H), 7.65 (d, *J* = 17.9 Hz, 2H), 7.62 – 7.56 (m, 2H), 7.40 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H).

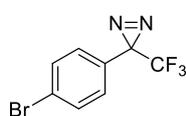
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 133.38 (s), 132.66 (s), 128.91 (s), 128.21 (s), 127.76 (s), 127.45 (s), 127.12 (s), 126.87 (s), 126.54 (s), 122.87 (d, *J* = 1.3 Hz), 122.32 (q, *J* = 274.7 Hz), 28.74 (q, *J* = 40.5 Hz).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -64.97.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 1602, 1511, 1324, 1259, 1149, 991, 929, 815, 747, 722, 558.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₄H₁₁NF₃ [M+H+ACN-N₂]⁺ : 250.0844; found : 250.0851.

3-(4-Bromophenyl)-3-(trifluoromethyl)-3H-diazirine – 154d



C₈H₄BrF₃N₂
MW 265,03

To 1-(4-bromophenyl)-2,2,2-trifluoroethanone O-tosyl oxime **153d** (224 mg, 0.53 mmol, 1 equiv.) was slowly added a solution of ammonia (7 N in MeOH, 1.32 mL, 9.28 mmol, 17.5 equiv.) under argon atmosphere. Then, the reaction mixture was stirred for 2.5 h. Then, water was added to the mixture and the organic layer was extracted with Et₂O. Then the organic layer was dried by MgSO₄ and concentrated. The resulting product was dissolved in DCM (5.3 mL) and it was cooled to 0°C. Then, triethylamine (220 μL, 1.59 mmol, 3 equiv.) and iodine (148.0 mg, 0.58 mmol, 1.1 equiv.) were incorporated and it was stirred for 1h at 0°C. The mixture was diluted with DCM and washed with sat. aq. sodium thiosulfate. The aqueous layer was re-extracted with DCM. Then the combined organic layers were washed with brine and dried by MgSO₄ and concentrated. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, 100% pentane) to provide the desired compound (43 mg, 0.16 mmol, 31% yield) as a pale-yellow oil.

m.p.= liquid product.

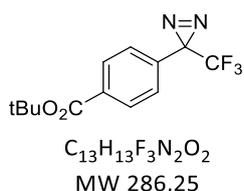
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 7.54 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.07 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 132.16 (s), 128.12 (s), 124.30 (s), 121.94 (q, *J* = 274.7 Hz), 28.25 (q, *J* = 40.9 Hz).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -65.27.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 2926, 1615, 1497, 1341, 1233, 1187, 1155, 1077, 1049, 1012, 937, 814, 747, 686, 578, 532, 475.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₆H₈Br₂F₆ [M+H]⁺ : 471.88970; found : 471.89018.

Tert-butyl 4-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzoate – 154e

To tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoro-1-((tosyloxy)imino)ethyl)benzoate **153e** (268 mg, 0.60 mmol, 1 equiv.) was slowly added a solution of ammonia (7 N in MeOH, 1.51 mL, 10.6 mmol, 17.5 equiv.) under argon atmosphere. Then, the reaction mixture was stirred for 2.5 h. Then, water was added to the mixture and the organic layer was extracted with Et₂O. Then the organic layer was dried by MgSO₄ and concentrated. The resulting product was dissolved in MeOH (610 μL) and it was cooled to 0°C. Then, PIDA (584 mg, 1.81 mmol, 3 equiv.) was incorporated and it was stirred for 1h at 0°C. Then it was concentrated. The crude residue was dissolved in DCM and a small portion of Celite® was added to prepare a solid deposit for purification and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 97:3, v/v) to provide the desired compound (93.0 mg, 0.32 mmol, 55% yield) as an orange oil.

m.p.= liquid product.

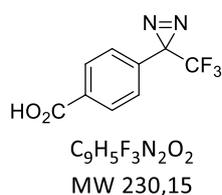
¹H NMR (300 MHz, MeOH-d₄) δ_H 8.01 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 1.58 (s, 9H).

¹³C NMR (75 MHz, MeOH-d₄) δ_C 164.52 (s), 133.17 (s), 132.80 (s), 129.50 (s), 126.05 (s), 121.98 (q, *J* = 274.4 Hz), 81.47 (s), 28.07 (q, *J* = 40.5 Hz), 26.95 (s).

¹⁹F NMR (282 MHz, MeOH-d₄) δ_F -66.67.

IR (neat) γ_{max} (cm⁻¹) 2981, 1716, 1369, 1343, 1291, 1228, 1184, 1153, 1114, 1049, 939, 848, 768, 699, 683.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₃H₁₇N₃O₂F₃ [M+NH₄]⁺ : 304.1273 ; found : 304.1262.

4-(3-(Trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzoic acid – 154f

To a solution of tert-butyl 4-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzoate **154e** (93.0 mg, 0.33 mmol, 1 equiv.) in DCM (4.64 mL) at 0 °C under argon atmosphere was added TFA (336 μL, 4.39 mmol, 13.5 equiv.). Then, the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 6.5h. Then, solvents were removed by vacuum. The desired compound (72.0 mg, 0.31 mmol, 96% yield) was then obtained as a pale pink powder.

m.p.= 123.8 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 9.53 (bs, 1H), 8.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H).

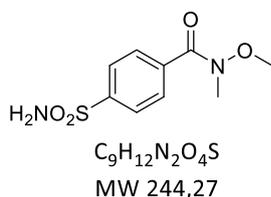
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 171.06 (s), 134.83 (s), 130.56 (s), 130.33 (s), 126.51 (d, *J* = 1.2 Hz), 121.86 (q, *J* = 274.8 Hz), 28.47 (q, *J* = 40.8 Hz).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -64.85.

IR (neat) ν_{\max} (cm⁻¹) 2565, 1687, 1609, 1429, 1346, 1292, 1202, 1181, 1155, 1051, 940, 844, 769, 741, 696, 547, 535, 422.

HRMS (ESI-) Calculated for C₉H₄N₂O₂F₃ [M-H]⁻ : 229.0228 ; found : 229.0225.

N-methoxy-N-methyl-4-sulfamoylbenzamide - 156



To a solution of 4-sulfamoylbenzoic acid (2 g, 9.94 mmol, 1 equiv.) in DCM (50 mL) were added N-methylmorpholine (1.1 mL, 9.94 mmol, 1 equiv.) and EDC.HCl (2.29 g, 11.9 mmol, 1.2 equiv.). Then, N,O-dimethylhydroxylamine hydrochloride was added (1.07 g, 10.93 mmol, 1.2 equiv.) and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Then, solvents were removed by vacuum. Water was added and the organic layer was extracted with EtOAc. Then it was dried by MgSO₄ and concentrated. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 1:1 to 1:3, v/v) to provide the desired compound (1.64 g, 6.71 mmol, 67% yield) as a white powder.

m.p.= 141.1 °C.

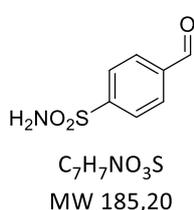
¹H NMR (300 MHz, MeOH-d₄) δ_{H} 7.99 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.39 (s, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, MeOH-d₄) δ_{C} 168.94 (s), 145.52 (s), 137.53 (s), 128.16 (s), 125.62 (s), 60.40 (s), 32.45 (s).

IR (neat) ν_{\max} (cm⁻¹) 3286, 1603, 1562, 1504, 1459, 1389, 1346, 1284, 1221, 1162, 1093, 979, 886, 860, 845, 773, 528.

HRMS (ESI-) Calculated for C₉H₁₁N₂O₄S [M-H]⁻ : 243.0440 ; found : 243.0435.

4-formylbenzenesulfonamide - 157



To a solution of N-methoxy-N-methyl-4-sulfamoylbenzamide **156** (116 mg, 0.47 mmol, 1 equiv.) in THF (2.35 mL) at -78°C was added DIBAL H (1.2 M in toluene, 433 μ L, 0.52 mmol, 1.1 equiv.). Then the reaction mixture was stirred at -78°C for 30 min. Then, it was quenched with a solution of aqueous HCl (1 M) then warmed to room temperature. The organic layer was extracted with EtOAc then washed with brine, dried by MgSO₄ and concentrated. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 8:2 to 1:1, v/v) to provide the desired compound (57 mg, 0.31 mmol, 66% yield) as a white powder.

m.p.= 120.2 °C.

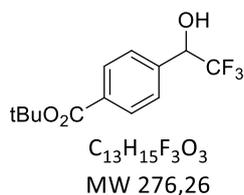
¹H NMR (300 MHz, THF-d₈) δ_{H} 10.05 (s, 1H), 8.08 – 7.97 (m, 4H), 6.82 (s, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, THF-d₈) δ_c 190.83 (s), 149.45 (s), 138.66 (s), 129.60 (s), 126.57 (s).

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 3339, 1693, 1550, 1326, 1298, 1153, 1091, 901, 823, 706, 541.

HRMS (ESI⁻) Calculated for C₇H₆NO₃S [M-H]⁻ : 184.0068 ; found : 184.0065.

Tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoro-1-hydroxyethyl)benzoate – 160



To a solution of tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoroacetyl)benzoate **151** (100 mg, 0.36 mmol, 1 equiv.) in THF (900 μL) under argon atmosphere was added NaBH₄ (15.0 mg, 0.40 mmol, 1.1 equiv.). Then, the reaction mixture was stirred for 1.5h. After completion, the reaction was quenched with H₂O. The organic layer was extracted with EtOAc and washed with brine. Then it was dried by MgSO₄ and concentrated. The crude residue was dissolved in DCM and a small portion of Celite[®] was added to prepare a solid deposit for purification and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 90:10, v/v) to provide the desired compound (67.0 mg, 0.24 mmol, 67% yield) as a transparent oil.

m.p. = 73.7 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 7.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 5.01 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H), 3.09 (bs, 1H), 1.52 (s, 9H).

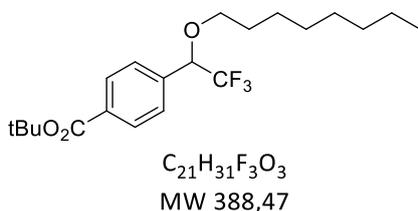
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_c 165.45 (s), 138.29 (s), 133.02 (s), 129.61 (s), 127.35 (s), 124.08 (q, *J* = 282.3 Hz), 81.61 (s), 72.44 (q, *J* = 32.0 Hz), 28.17 (s).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -78.19.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 3463, 1686, 1373, 1322, 1247, 1160, 1119, 1087, 848, 769, 715, 667, 500.

HRMS (ESI⁺) Calculated for C₁₃H₁₆F₃O₃ [M+H]⁺ : 277.10432 ; found : 277.10515.

Tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoro-1-(octyloxy)ethyl)benzoate – 161



To a solution of tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoro-1-hydroxyethyl)benzoate **160** (200 mg, 0.72 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (3 mL) under argon atmosphere was added 1-bromooctane (289 μL, 1.66 mmol, 2.3 equiv.). The reaction was cooled to 0°C and Cs₂CO₃ (306 mg, 0.94 mmol, 1.3 equiv.) was added. The mixture was stirred for 12h at room temperature. Upon completion of the reaction, it was filtered, extracted into DCM and washed with water. The organic layer was dried over MgSO₄ and the solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, using cyclohexane and a gradient of Cyclohexane/EtOAc: 95:5 to 90:10) to provide the desired compound (189 mg, 0.49 mmol, 67%).

m.p.= liquid product.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 8 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.49 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.6 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.56-3.43 (m, 2H), 1.66-1.56 (m, 11H), 1.38-1.25 (m, 10H), 0.87 (t, *J* = 7 Hz, 3H).

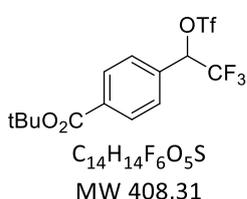
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 165.3, 137.7, 133.2, 129.6, 128.1, 123.6 (q, *J* = 282.7 Hz), 81.4, 79.7 (q, *J* = 31.4 Hz), 71.2, 31.9, 29.6, 29.3, 29.3, 28.2, 25.9, 22.7, 14.1.

¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ_F -75.38.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 2929, 2858, 1716, 1614, 1581, 1369, 1293, 1267, 1167, 1116, 1020, 872, 835, 716, 672.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₇H₂₄F₃O₃ [M+H-C₄H₈]⁺ : 333.16775 ; found : 333.16677.

Tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoro-1-(((trifluoromethyl)sulfonyl)oxy)ethyl)benzoate – 162



To a solution of tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoro-1-hydroxyethyl)benzoate **160** (275 mg, 1.00 mmol, 1 equiv.) in DCM (1 mL) under argon atmosphere was added 2,6-lutidine (184 μL, 1.6 mmol, 1.6 equiv.). The reaction mixture was cooled to -15°C and Tf₂O (252 μL, 1.5 mmol, 1.5 equiv.) was added dropwise. Then it was stirred for 1h. After completion, the reaction was quenched with H₂O. The

organic layer was extracted with DCM and washed with water. Then it was dried by MgSO₄ and concentrated. The crude residue was dissolved in DCM and a small portion of Celite® was added to prepare a solid deposit for purification and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 97:3, v/v) to provide the desired compound (335 mg, 0.82 mmol, 82% yield) as a transparent oil.

m.p.= liquid product.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 8.16 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.95 (q, *J* = 5.7 Hz, 1H), 1.66 (s, 9H).

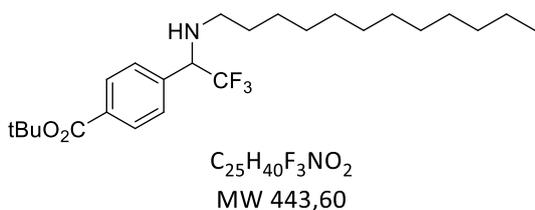
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 164.45 (s), 135.03 (s), 131.84 (s), 130.23 (s), 127.82 (s), 121.30 (q, *J* = 281.0 Hz), 118.22 (q, *J* = 319.7 Hz), 81.96 (s), 81.87 (q, *J* = 35.7 Hz), 28.09 (s).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -74.50, -76.16.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 2986, 1707, 1433, 1371, 1303, 1273, 1246, 1214, 1189, 1140, 1123, 985, 872, 847, 717, 607, 513.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₆H₁₈NO₅F₆S [M+ACN+H]⁺ : 450.0809 ; found : 450.0810.

Tert-butyl 4-(1-(dodecylamino)-2,2,2-trifluoroethyl)benzoate – 163



Tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoro-1-(((trifluoromethyl)sulfonyl)oxy)ethyl)benzoate **162** (120 mg, 0.29 mmol, 1 equiv.), K_2CO_3 (65 mg, 0.47 mmol, 1.6 equiv.) and dodecylamine (81.7 mg, 0.44 mmol, 1.5 equiv.) were solubilized under argon atmosphere in dry THF (300 μ L).

The mixture was heated at 55°C for 6h. Upon completion of the reaction, it was extracted into DCM and washed with water. The organic layer was dried over $MgSO_4$ and the solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 95:5 to 90:10, v/v) to provide the desired compound (95 mg, 0.21 mmol, 73%).

m.p.= liquid product.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 8 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.46 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 4.17 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 2.58-2.43 (m, 2H), 1.59 (s, 9H), 1.45-1.44 (m, 2H), 1.23 (br, 18H), 0.87 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H).

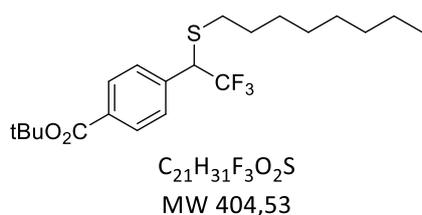
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 165.3, 139.1, 132.8, 129.8, 128.5, 125.2 (q, $J = 279.2$ Hz), 81.3, 64.7 (q, $J = 28.7$ Hz), 47.8, 32, 30, 29.7, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 28.3, 27.1, 22.8, 14.2.

^{19}F NMR (282 MHz, $CDCl_3$) δ_F -72.26.

IR (neat) ν_{max} (cm^{-1}) 2925, 2855, 1716, 1614, 1369, 1293, 1258, 1166, 1117, 1020, 847, 715.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{25}H_{41}NO_2F_3$ [$M + H$] $^+$: 443.30111 ; found : 443.30210.

Tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoro-1-(octylthio)ethyl)benzoate – 164



Tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoro-1-(((trifluoromethyl)sulfonyl)oxy)ethyl)benzoate **162** (100 mg, 0.24 mmol, 1 equiv.), K_2CO_3 (54 mg, 0.39 mmol, 1.6 equiv.) and 1-octanethiol (107 mg, 0.73 mmol, 3 equiv.) were solubilized under argon atmosphere in dry THF (250 μ L). The mixture was heated at 75°C for 12h. Upon completion of

the reaction, it was extracted into DCM and washed with water. The organic layer was dried over $MgSO_4$ and the solvents were removed by vacuum. The crude product was purified by RP-HPLC (System I) to provide the desired compound (30 mg, 0.074 mmol, 30%).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.98 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.45 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 4.2 (q, $J = 8.4$ Hz, 1H), 2.65-2.51 (m, 2H), 1.61-1.5 (m, 11H), 1.37-1.23 (m, 10H), 0.86 (t, $J = 7$ Hz, 3H).

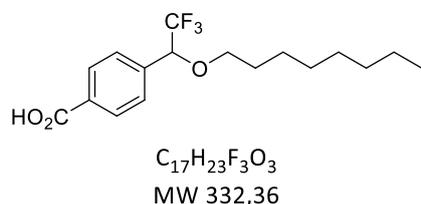
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 165.2, 138.2, 132.5, 129.9, 128.9, 125.8 (q, $J = 278.5$ Hz), 81.4, 52.2 (q, $J = 29.7$ Hz), 32.9, 31.8, 29.1, 29.1, 29, 28.7, 28.2, 22.7, 14.2.

^{19}F NMR (282 MHz, $CDCl_3$) δ_F -66.86.

IR (neat) ν_{max} (cm^{-1}) 2928, 2857, 1714, 1369, 1288, 1251, 1161, 1105, 1021, 846, 769, 711, 660.

HRMS (ESI-) Calculated for $C_{21}H_{30}SO_2F_3$ $[M-H]^-$: 403.1919 ; found : 403.1920.

4-(2,2,2-trifluoro-1-(octyloxy)ethyl)benzoic acid – 165a



To a solution of tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoro-1-(octyloxy)ethyl)benzoate **161** (50 mg, 0.129 mmol, 1 equiv.) in DCM (1,29 mL) at 0 °C under argon atmosphere was added TFA (133 μ L, 1.74 mmol, 13.5 equiv.). Then, the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 36h. Then, solvents

were removed by vacuum to provide the desired compound (36 mg, 0.11 mmol, 92% yield) as a brown oil.

m.p.= liquid product.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 10.92 (s, 1H), 8.22 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.63 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.72 (q, J = 6.5 Hz, 1H), 3.90 – 3.38 (m, 2H), 1.67 (dd, J = 13.9, 7.1 Hz, 2H), 1.55 – 1.12 (m, 10H), 0.93 (t, J = 6.7 Hz, 3H).

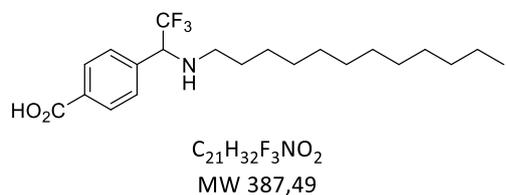
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 171.73 (s), 139.26 (s), 130.40 (s), 130.35 (s), 128.34 (s), 123.63 (q, J = 282.0 Hz), 79.56 (q, J = 31.2 Hz), 71.46 (s), 31.81 (s), 29.53 (s), 29.28 (s), 29.21 (s), 25.87 (s), 22.66 (s), 14.10 (s).

^{19}F NMR (282 MHz, $CDCl_3$) δ_F -76.38.

IR (neat) ν_{max} (cm^{-1}) 2928, 2858, 1695, 1615, 1581, 1425, 1355, 1314, 1267, 1203, 1173, 1135, 1106, 1020, 866, 796, 714, 666, 546.

HRMS (ESI-) Calculated for $C_{17}H_{22}O_3F_3$ $[M-H]^-$: 331.1521 ; found : 331.1522.

4-(1-(dodecylamino)-2,2,2-trifluoroethyl)benzoic acid – 165b



To a solution of tert-butyl 4-(1-(dodecylamino)-2,2,2-trifluoroethyl)benzoate **163** (50 mg, 0.113 mmol, 1 equiv.) in DCM (1,13 mL) at 0 °C under argon atmosphere was added TFA (117 μ L, 1.53 mmol, 13.5 equiv.). Then, the

reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 36h. Then, solvents were removed by vacuum to provide the desired compound (39 mg, 0.099 mmol, 88% yield) as a pale orange solid.

m.p.= 141,1 °C.

1H NMR (300 MHz, acetone- d_6) δ_H 8.14 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.82 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 4.95 (q, J = 7.6 Hz, 1H), 3.05 – 2.59 (m, 2H), 1.64 (dd, J = 14.6, 7.1 Hz, 2H), 1.27 (s, 19H), 0.88 (t, J = 6.7 Hz, 3H).

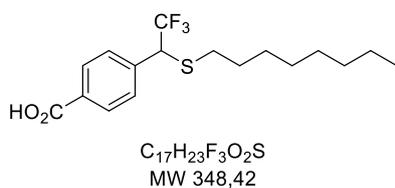
¹³C NMR (75 MHz, acetone-d₆) δ_c 166.10 (s), 136.79 (s), 131.75 (s), 129.99 (s), 129.35 (s), 124.68 (q, *J* = 280.8 Hz), 62.84 (q, *J* = 29.4 Hz), 47.23 (s), 31.72 (s), 29.69 (s), 29.42 (s), 29.36 (s), 29.26 (s), 29.15 (s), 29.05 (s), 27.90 (s), 26.57 (s), 22.41 (s), 13.44 (s).

¹⁹F NMR (282 MHz, acetone-d₆) δ_F -72.89.

IR (neat) γ_{max} (cm⁻¹) 2928, 2851, 1695, 1658, 1583, 1471, 1431, 1325, 1282, 1261, 1185, 1139, 1024, 865, 800, 721, 711, 602, 543.

HRMS (ESI-) Calculated for C₂₁H₃₁NO₂F₃ [M-H]⁻ : 386.2307 ; found : 386.2303.

4-(2,2,2-trifluoro-1-(octylthio)ethyl)benzoic acid – 165c



To a solution of tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoro-1-(octylthio)ethyl)benzoate **164** (54 mg, 0.134 mmol, 1 equiv.) in DCM (1,34 mL) at 0 °C under argon atmosphere was added TFA (139 μL, 1.81 mmol, 13.5 equiv.). Then, the reaction mixture was

warmed to room temperature and stirred for 36h. Then, solvents were removed by vacuum to provide the desired compound (35 mg, 0.10 mmol, 75% yield) as an orange oil.

m.p.= liquid product.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 10.31 (s, 1H), 8.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 4.37 (q, *J* = 8.3 Hz, 1H), 2.77 – 2.47 (m, 2H), 1.79 – 1.47 (m, 2H), 1.47 – 1.17 (m, 10H), 0.92 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H).

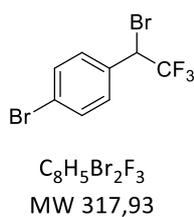
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_c 171.55 (s), 139.81 (s), 130.65 (s), 129.70 (s), 129.15 (s), 125.64 (q, *J* = 279.8 Hz), 52.16 (q, *J* = 30.0 Hz), 32.95 (s), 31.77 (s), 29.10 (s), 29.06 (s), 28.96 (s), 28.64 (s), 22.64 (s), 14.09 (s).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -67.66.

IR (neat) γ_{max} (cm⁻¹) 2927, 2856, 1695, 1614, 1578, 1424, 1316, 1287, 1252, 1157, 1109, 1045, 1020, 841, 769, 709, 545, 421.

HRMS (ESI-) Calculated for C₁₇H₂₂O₂F₃S [M-H]⁻ : 347.1293 ; found : 347.1277.

1-Bromo-4-(1-bromo-2,2,2-trifluoroethyl)benzene – 168



NBS (348.8 mg, 1.96 mmol, 2 equiv.) was dissolved in DCM (2.45 mL) and the mixture was cooled to -10°C. Then, P(OPh)₃ (511 μL, 1.96 mmol, 2 equiv.) was added. A solution of 1-(4-bromophenyl)-2,2,2-trifluoroethanol **146** (250 mg, 0.98 mmol, 1 equiv.) in DCM (1.23 mL) was added to the resulting mixture and it was stirred for 2h at -10°C, then 2h at rt. Then, Celite® was put in the mixture in order to make a solid

deposit and the crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, pentane/DCM 95:5 v/v) to provide the desired compound (187 mg, 0.59 mmol, 60% yield) as a transparent oil.

m.p.= liquid product.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 7.54 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.38 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.08 (q, *J* = 7.3 Hz, 1H).

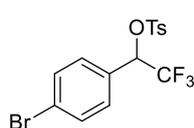
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 132.19 (s), 131.83 (s), 130.74 (d, *J* = 0.9 Hz), 124.44 (s), 123.18 (q, *J* = 278.1 Hz), 46.24 (q, *J* = 34.3 Hz).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -70.51.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 1592, 1491, 1409, 1340, 1305, 1255, 1179, 1161, 1111, 1014, 851, 810, 721, 654.

HRMS (ESI+) Calculated for C₈H₆⁷⁹Br₂F₃ [M+H]⁺ : 316.87884; found : 316.87972.

1-(4-Bromophenyl)-2,2,2-trifluoroethyl 4-methylbenzenesulfonate – 169



C₁₅H₁₂BrF₃O₃S
MW 409,22

To a solution of 1-(4-bromophenyl)-2,2,2-trifluoroethanol **146** (200 mg, 0.78 mmol, 1 equiv.) in DCM (1.1 mL) at 0 °C was added triethylamine (526 μL, 3.9 mmol, 5 equiv.) then TsCl (178.5 mg, 0.94 mmol, 1.2 equiv.). Then, the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred overnight. Then, solvents were removed by vacuum. The organic layer was extracted with Et₂O, then washed with water. The

organic layer was dried by MgSO₄ and concentrated. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/DCM 98:2 to 95:5, v/v) to provide the desired compound (229 mg, 0.56 mmol, 72% yield) as a white powder.

m.p.= 95.2 °C.

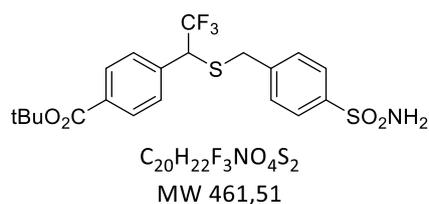
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 7.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.37 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.17 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.55 (q, *J* = 6.2 Hz, 1H), 2.35 (s, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 145.73 (s), 132.88 (s), 131.97 (s), 129.86 (s), 129.70 (s), 128.80 (s), 127.97 (s), 121.98 (q, *J* = 281.3 Hz), 77.35 (q, *J* = 34.6 Hz), 21.70 (s).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -76.10.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 1493, 1362, 1281, 1267, 1185, 1142, 1018, 1003, 890, 845, 812, 697, 669, 552, 533.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₅H₁₃⁷⁹BrF₃O₃S [M+H]⁺ : 408.96426; found : 408.96449.

Tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoro-1-((4-sulfamoylbenzyl)thio)ethyl)benzoate – 173

To a solution of 4-(mercaptomethyl) benzenesulfonamide **33** (710.5 mg, 3.50 mmol, 1.5 equiv.) in THF (1 mL) under argon atmosphere was added diisopropylethylamine (1.25 mL, 7.00 mmol, 1.6 equiv.). Then, tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoro-1-(((trifluoromethyl)sulfonyl)oxy)ethyl)benzoate **162** (949 mg, 2.33 mmol, 1 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The organic layer was extracted with EtOAc and washed with HCl (1M) then with brine. Then it was dried by $MgSO_4$ and concentrated. The crude residue was dissolved in EtOAc and a small portion of Celite® was added to prepare a solid deposit for purification and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 95:5 to 85:15, v/v) to provide the desired compound (385 mg, 0.83 mmol, 36% yield) as a transparent oil.

m.p.= liquid product.

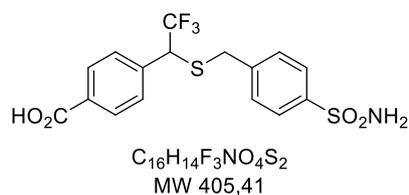
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.90 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 5.01 (s, 1H), 4.14 (q, $J = 8.2$ Hz, 1H), 3.90 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H), 3.75 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H), 1.59 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 165.25 (s), 141.78 (s), 141.23 (s), 137.09 (s), 132.65 (s), 129.70 (s), 128.98 (s), 126.86 (s), 125.40 (q, $J = 279.7$ Hz), 81.74 (s), 51.31 (q, $J = 30.2$ Hz), 36.12 (s), 28.18 (s).

^{19}F NMR (282 MHz, $CDCl_3$) δ_F -67.28.

IR (neat) ν_{max} (cm^{-1}) 3257, 2976, 1670, 1292, 1254, 1161, 1107, 843, 711, 658, 574, 543, 386.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{20}H_{26}N_2O_4F_3S_2$ $[M+NH_4]^+$: 479.1281 ; found : 479.1286.

4-(2,2,2-Trifluoro-1-((4-sulfamoylbenzyl)thio)ethyl)benzoic acid – 171

To a solution of tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoro-1-((4-sulfamoylbenzyl)thio)ethyl)benzoate **173** (180 mg, 0.39 mmol, 1 equiv.) in DCM (3.9 mL) at 0 °C under argon atmosphere was added TFA (403 μ L, 5.27 mmol, 13.5 equiv.). Then, the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 48h. Then, solvents were removed by vacuum. The crude residue was dissolved in EtOAc and a small portion of Celite® was added to prepare a solid deposit for purification and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 95:5 to 85:15, v/v) to provide the desired compound (68 mg, 0.17 mmol, 43% yield) as a beige oil.

m.p.= liquid product.

¹H NMR (300 MHz, MeOH-d₄) δ_H 8.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.56 (q, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.01 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 3.89 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H).

¹³C NMR (75 MHz, MeOH-d₄) δ_C 168.78 (s), 142.60 (s), 141.52 (s), 138.03 (s), 138.00 (s), 129.67 (s), 129.35 (s), 128.84 (s), 126.09 (s), 125.82 (q, *J* = 278.8 Hz), 50.87 (q, *J* = 29.9 Hz), 35.73 (s).

¹⁹F NMR (282 MHz, MeOH-d₄) δ_F -68.95.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 3259, 2460, 1698, 1612, 1578, 1419, 1332, 1292, 1243, 1152, 1103, 1043, 1019, 841, 772, 707, 660, 575, 539.

HRMS (ESI-) Calculated for C₁₆H₁₃NO₄S₂F₃ [M-H]⁻: 404.0238; found: 404.0247.

4-(((4-sulfamoylbenzyl)thio)methyl)phenyl formate – 174



To a solution of 4-(bromomethyl)phenyl formate (50 mg, 0.23 mmol, 1 equiv.) in EtOH (383 μL) under argon atmosphere were added 4-(mercaptomethyl) benzenesulfonamide **33** (44.7 mg, 0.22 mmol, 0.96 equiv.) and NaOH (17.5 mg, 0.44 mmol, 1.9 equiv.), the latter previously dissolved in EtOH (733 μL). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. After completion, HCl was added until pH= 3, then it was concentrated. The crude residue was dissolved in EtOAc and a small portion of Celite® was added to prepare a solid deposit for purification and solvent was removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 95:5 to 0:100, v/v) to provide the desired compound (15 mg, 0.04 mmol, 20% yield) as a white solid.

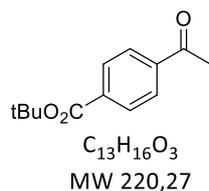
m.p.= 208.5 °C.

¹H NMR (300 MHz, THF-d₈) δ_H 7.96 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.41 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.38 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.45 (bs, 2H), 3.69 (s, 2H), 3.68 (s, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, THF-d₈) δ_C 167.20 (s), 144.24 (t, *J* = 2.5 Hz), 144.12 (s), 143.13 (s), 130.46 (s), 130.41 (s), 129.83 (s), 129.53 (s), 126.90 (s), 35.86 (s), 35.57 (s).

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 3275, 2938, 1686, 1609, 1575, 1431, 1335, 1292, 1179, 1148, 1093, 944, 898, 861, 741, 718, 664, 622, 586, 530.

HRMS (ESI-) Calculated for C₁₅H₁₄NO₄S₂ [M-H]⁻: 336.0364; found: 336.0354.

Tert-butyl 4-acetylbenzoate – 175

To a solution of 4-acetylbenzoic acid (1 g, 6.09 mmol, 1 equiv.) in DCM (16.5 mL) under argon atmosphere were added tert-butyl alcohol (1.7 mL, 18.3 mmol, 3 equiv.), DCC (1.38 g, 6.7 mmol, 1.1 equiv.), and DMAP (595 mg, 4.9 mmol, 0.8 equiv.). Then, the reaction mixture was heated under reflux for 15h. After cooling down to room temperature, the crude reaction mixture was filtered and the filtrate was washed with a solution of aqueous HCl (1 M), a solution of aqueous NaHCO₃ saturated, and brine. The organic layer was dried by MgSO₄ and concentrated. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 97:3, v/v) to provide the desired compound (893 mg, 3.26 mmol, 67% yield) as a white powder.

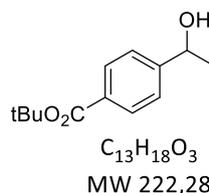
m.p. = 58.6 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 8.07 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.98 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 2.64 (s, 3H), 1.61 (s, 9H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 197.71 (s), 164.88 (s), 139.87 (s), 135.88 (s), 129.68 (s), 128.10 (s), 81.83 (s), 28.18 (s), 26.93 (s).

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 2984, 2929, 1708, 1683, 1296, 1175, 1122, 852, 769, 695, 592.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₅H₂₀NO₃ [M+H+ACN]⁺ : 262.1443 ; found : 262.1441.

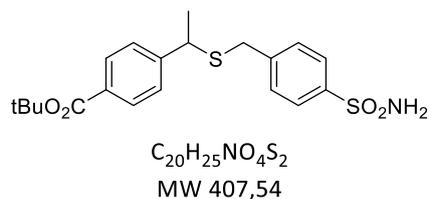
Tert-butyl 4-(1-hydroxyethyl)benzoate – 176

To a solution of tert-butyl 4-acetylbenzoate **175** (250 mg, 1.14 mmol, 1 equiv.) in MeOH (2.85 mL) under argon atmosphere was added NaBH₄ (86.3 mg, 2.28 mmol, 2 equiv.). Then, the reaction mixture was stirred for 2h. After completion, the reaction was quenched with H₂O. The organic layer was extracted with EtOAc and washed with brine. Then it was dried by MgSO₄ and concentrated. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 70:30, v/v) to provide the desired compound (167 mg, 0.75 mmol, 66% yield) as a white solid.

NMR analysis is in accordance with literature data¹⁹³.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 7.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.41 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.95 (qd, *J* = 6.4, 3.7 Hz, 1H), 1.89 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 1.59 (s, 9H), 1.49 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H).

¹⁹³ Li, D. *et al. J. Med. Chem.* **2023**, *66*, 7016–7037.

Tert-butyl 4-(1-((4-sulfamoylbenzyl)thio)ethyl)benzoate – 178

To a solution of NBS (202.9 mg, 1.14 mmol, 2 equiv.) in DCM (1.43 mL) at $-10^{\circ}C$ was added triphenylphosphite (299 μ L, 1.14 mmol, 2 equiv.). Tert-butyl 4-(1-hydroxyethyl)benzoate **176** (127 mg, 0.57 mmol, 1 equiv.) was diluted in DCM (713 μ L), then it was added to the mixture. It was stirred for 2h at $-10^{\circ}C$ then at rt.

After completion, the crude product was filtrated under silica with EtOAc, then it was concentrated. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/DCM 90:10, v/v) to provide tert-butyl 4-(1-bromoethyl)benzoate. 4-(mercaptomethyl) benzenesulfonamide **33** (36.6 mg, 0.18 mmol, 1 equiv.), KOH (40.4 mg, 0.72 mmol, 4 equiv.) and PEG₄₀₀ (360 μ L) were put in MeOH (900 μ L) under argon atmosphere. The mixture was heated to $70^{\circ}C$ and let stirred for 15 min. Then, tert-butyl 4-(1-bromoethyl)benzoate previously solubilized in MeOH (900 μ L) was added and the reaction mixture was heated to $110^{\circ}C$. The reaction was stirred overnight. Then, water was added and the organic layer was extracted with EtOAc and washed with brine. Then it was dried by $MgSO_4$ and concentrated. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 95:5 to 80:20, v/v) to provide the desired compound (29 mg, 0.07 mmol, 40% yield) as a transparent oil.

m.p.= liquid product.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.88 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.78 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.36 (dd, $J = 10.2, 8.5$ Hz, 4H), 3.89 (q, $J = 7.0$ Hz, 1H), 3.58 (q, $J = 13.7$ Hz, 2H), 1.60 (s, 9H), 1.51 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_c 165.80 (s), 148.87 (s), 143.19 (s), 142.02 (s), 130.56 (s), 129.25 (s), 129.06 (s), 127.18 (s), 125.86 (s), 80.96 (s), 43.41 (s), 34.76 (s), 27.06 (s), 21.26 (s).

IR (neat) ν_{max} (cm^{-1}) 3260, 2975, 2928, 1707, 1608, 1415, 1336, 1310, 1292, 1160, 1112, 1060, 1016, 843, 777, 709, 658, 576, 535.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{20}H_{25}NO_4NaS_2$ $[M+Na]^+$: 430.1123 ; found : 430.1107.

4-(1-((4-Sulfamoylbenzyl)thio)ethyl)benzoic acid – 179

To a solution of tert-butyl 4-(1-((4-sulfamoylbenzyl)thio)ethyl)benzoate **178** (20 mg, 0.049 mmol, 1 equiv.) in DCM (490 μ L) at $0^{\circ}C$ under argon atmosphere was added TFA (50.7 μ L, 0.43 mmol, 13.5 equiv.). Then, the reaction mixture was warmed to room

temperature and stirred for 18h. Then, solvents were removed by vacuum to provide the desired compound (11 mg, 0.031 mmol, 64% yield) as a beige solid.

m.p.= 110,0 °C.

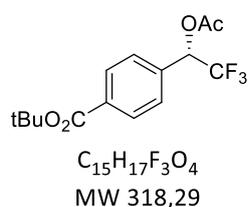
¹H NMR (300 MHz, MeOH-d₄) δ_H 7.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.42 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.37 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 3.93 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.62 (q, *J* = 13.7 Hz, 2H), 1.54 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, MeOH-d₄) δ_C 149.16 (s), 143.22 (s), 142.02 (s), 129.67 (s), 129.06 (s), 127.24 (s), 126.61 (s), 125.85 (s), 43.43 (s), 34.75 (s), 21.25 (s).

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 1680, 1290, 1147, 857, 707, 657, 576, 532, 404.

HRMS (ESI-) Calculated for C₁₆H₁₆NO₄S₂ [M-H]⁻: 350.0521; found : 350.0521.

(S)-tert-butyl 4-(1-acetoxy-2,2,2-trifluoroethyl)benzoate – (S)-181



Vinyl acetate (0.5 mL, 5.2 mmol, 17 equiv.), lipase acrylic resin (160 mg, ≥5,000 U/g) and tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoro-1-hydroxyethyl)benzoate **160** (82.9 mg, 0.3 mmol, 1 equiv.) were added to toluene (10 mL) in 50 mL Erlenmeyer flasks. The reaction mixture was shaken in a rotary orbital shaker at 32°C and 130 rpm. After 5 days, the immobilized lipase was filtered off and washed with

EtOAc. The resulting mixture was then concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 97:3 to 85:15, v/v) to provide the desired compound (89 mg, 0.28 mmol, 94% yield) as a transparent oil.

m.p.= liquid product.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H 8.03 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.16 (q, *J* = 6.8 Hz, 1H), 2.21 (s, 3H), 1.59 (s, 9H).

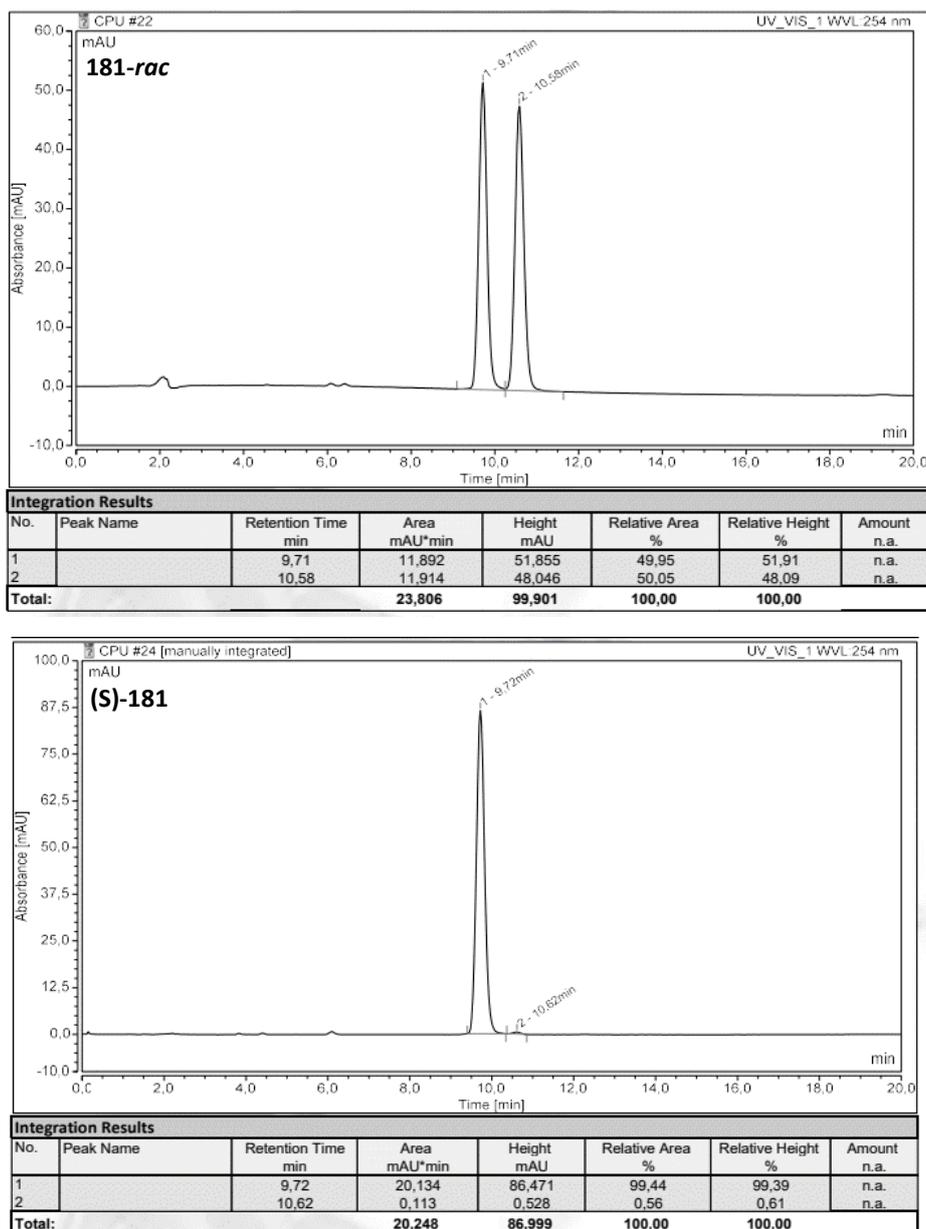
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C 168.59 (s), 164.97 (s), 135.30 (s), 133.55 (s), 129.77 (s), 127.89 (s), 122.95 (q, *J* = 280.6 Hz), 81.51 (s), 71.58 (q, *J* = 33.3 Hz), 28.17 (s), 26.94 (s), 20.58 (s).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ_F -75.82.

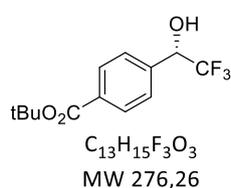
IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹) 2980, 1767, 1715, 1370, 1269, 1297, 1211, 1176, 1134, 1119, 1110, 1056, 1020, 928, 847, 770, 715, 677, 575.

HRMS (ESI+) Calculated for C₁₅H₁₈F₃O₄ [M+H]⁺ : 319.10789; found : 318.10623.

[α]_D²³ +46.7° (1 g/100 mL, CHCl₃)



LC method: System C.

(S)-tert-butyl 4-(2,2,2-trifluoro-1-hydroxyethyl)benzoate – (S)-160

To a solution of (R)-tert-butyl 4-(1-acetoxy-2,2,2-trifluoroethyl)benzoate **(S)-181** (134 mg, 0.42 mmol, 1 equiv.) in MeOH (4.2 mL) under argon atmosphere was added K_2CO_3 (116.1 mg, 0.84 mmol, 2 equiv.). Then, the reaction mixture was stirred for 10 min at rt. After completion, the organic layer was extracted with DCM and washed with with a solution of aqueous HCl (1M). Then it was dried by MgSO_4 and concentrated. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 95:5, v/v) to provide the desired compound (97.0 mg, 0.35 mmol, 84% yield) as a white solid.

m.p.= 73.7 °C.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} 7.92 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.45 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 5.01 (q, J = 6.5 Hz, 1H), 3.09 (bs, 1H), 1.52 (s, 9H).

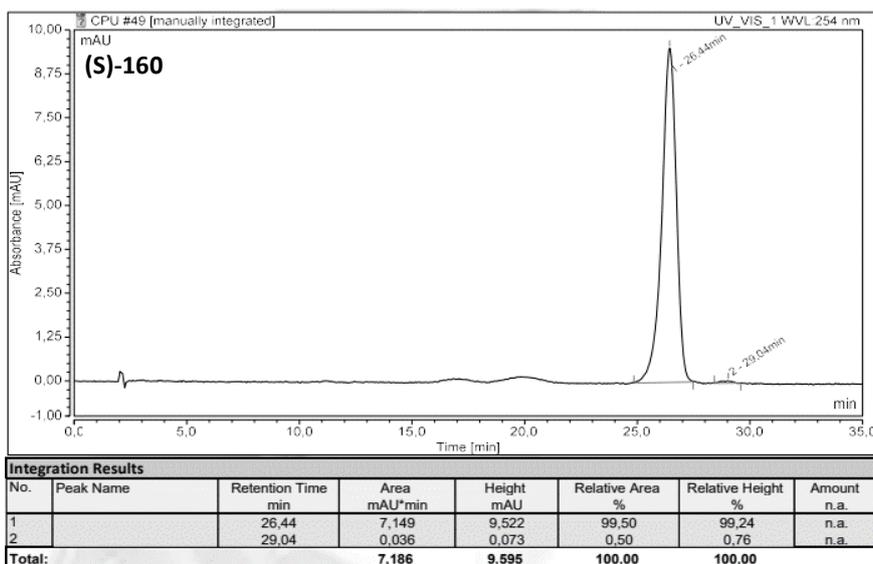
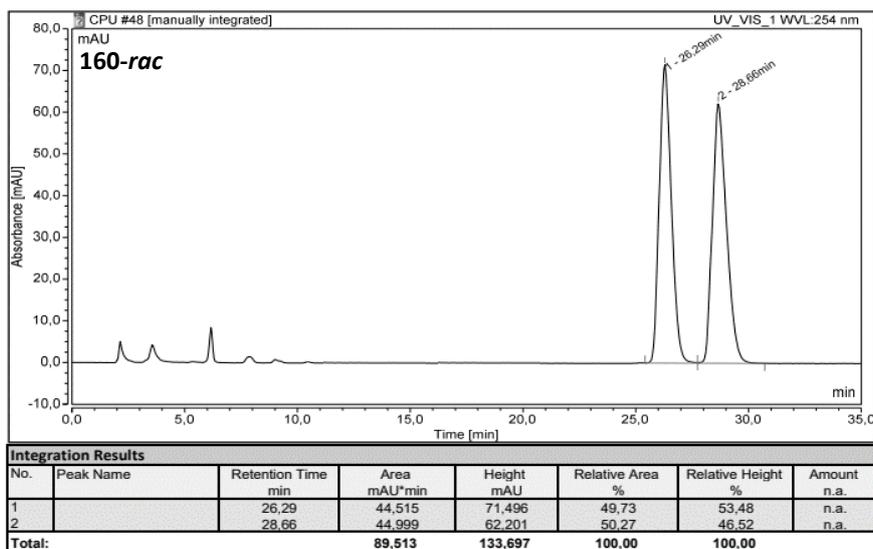
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} 165.45 (s), 138.29 (s), 133.02 (s), 129.61 (s), 127.35 (s), 124.08 (q, J = 282.3 Hz), 81.61 (s), 72.44 (q, J = 32.0 Hz), 28.17 (s).

^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3) δ_{F} -78.19.

IR (neat) ν_{max} (cm^{-1}) 3463, 1686, 1373, 1322, 1247, 1160, 1119, 1087, 848, 769, 715, 667, 500.

HRMS (ESI+) Calculated for $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 277.10432 ; found : 277.10515.

$[\alpha]_{\text{D}}^{23} +19^\circ$ (0.5 g/100 mL, CHCl_3)



LC method: System D.

6. KTGS preliminary tests

Nucleophile candidate – Diazirine ester

- External calibration procedure for HPLC monitoring

A range of titrated solutions containing product references presumably obtained from the reaction between the nucleophile and the diazirine and commercial 6-nitroquinoline (external HPLC reference) was prepared in pure MeCN as follows:

- 0.75 mmol reference / 0.25 mmol 6-nitroquinoline
- 0.5 mmol reference / 0.5 mmol 6-nitroquinoline
- 0.25 mmol reference / 0.75 mmol 6-nitroquinoline

All titrated mixtures were analyzed by UPLC ($\lambda = 240$ nm, System A) and the ratios of UPLC areas ($A_{\text{reference}}/A_{\text{6-nitroquinoline}}$) were plotted against the corresponding concentration ratios ($[\text{reference}]/[\text{6-nitroquinoline}]$).

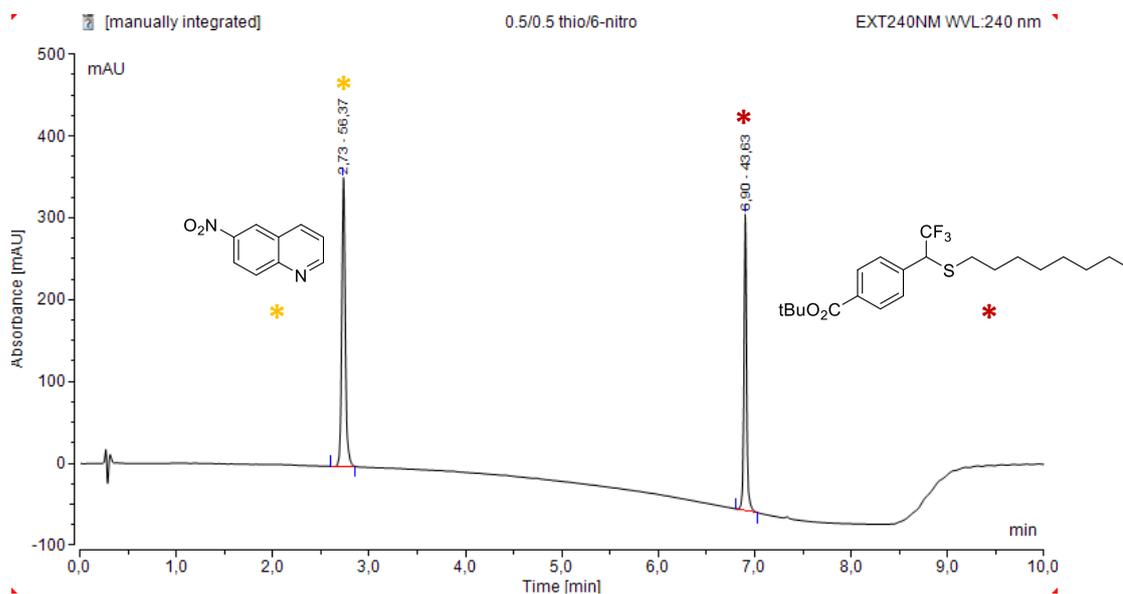


Figure 1: Chromatogram ($\lambda = 240$ nm, System A) of equimolar mixture of 6-nitroquinoline + product obtained from diazirine CO₂tBu and octanethiol reaction

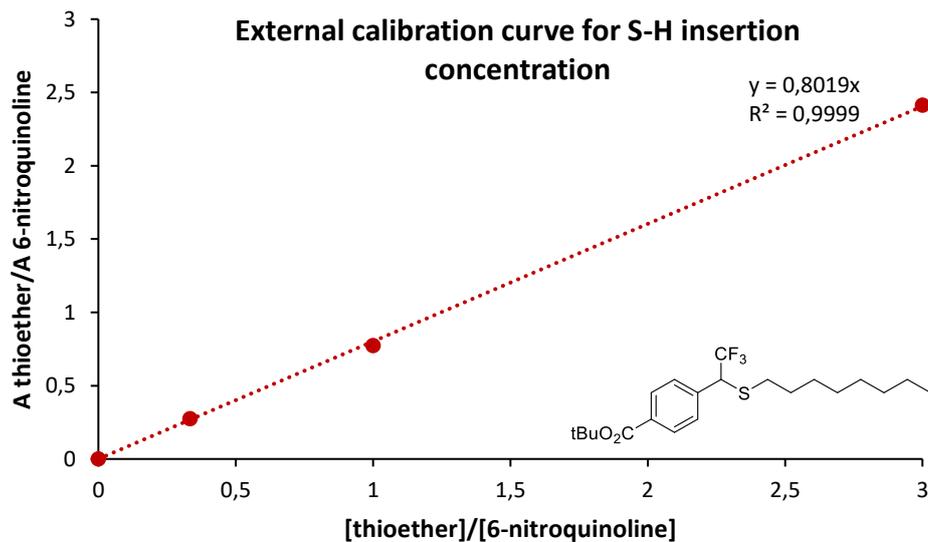


Figure 2: External calibration curve for S-H insertion concentration determination with diazirine CO₂tBu

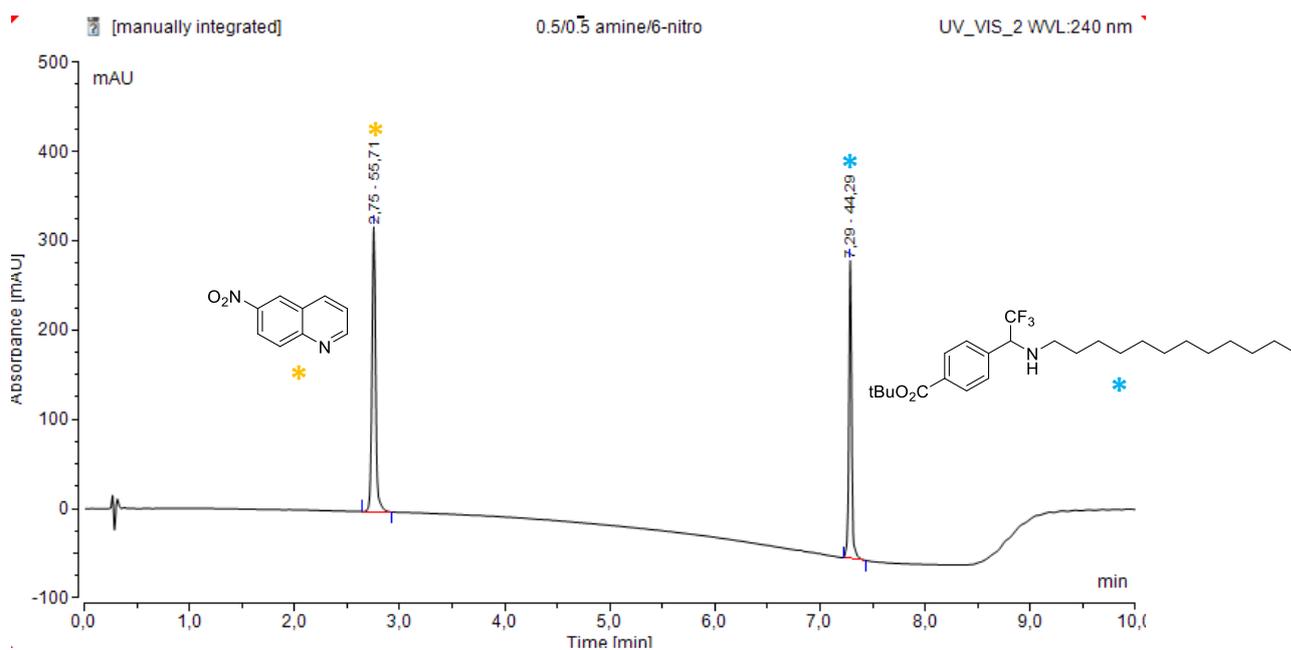


Figure 3: Chromatogram ($\lambda = 240$ nm, System A) of equimolar mixture of 6-nitroquinoline + product obtained from diazirine CO₂tBu and dodecylamine reaction

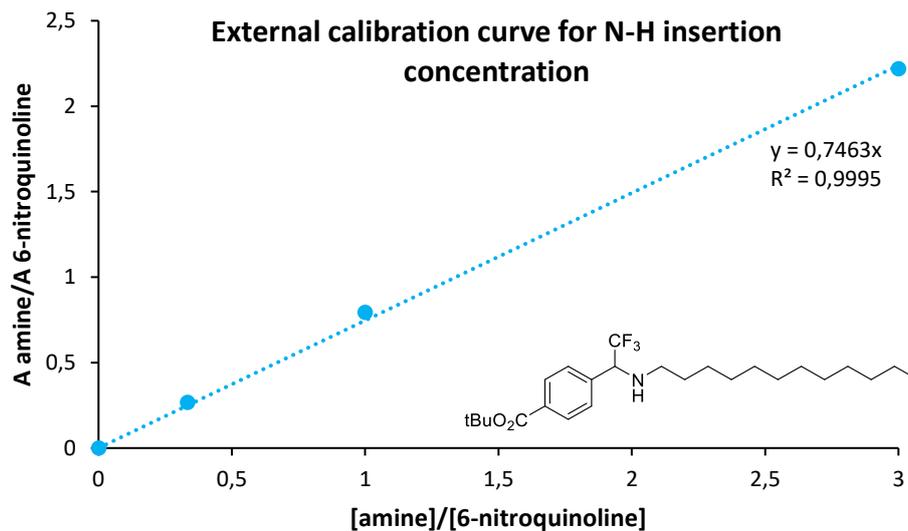


Figure 4: External calibration curve for N-H insertion concentration determination with diazirine CO₂tBu

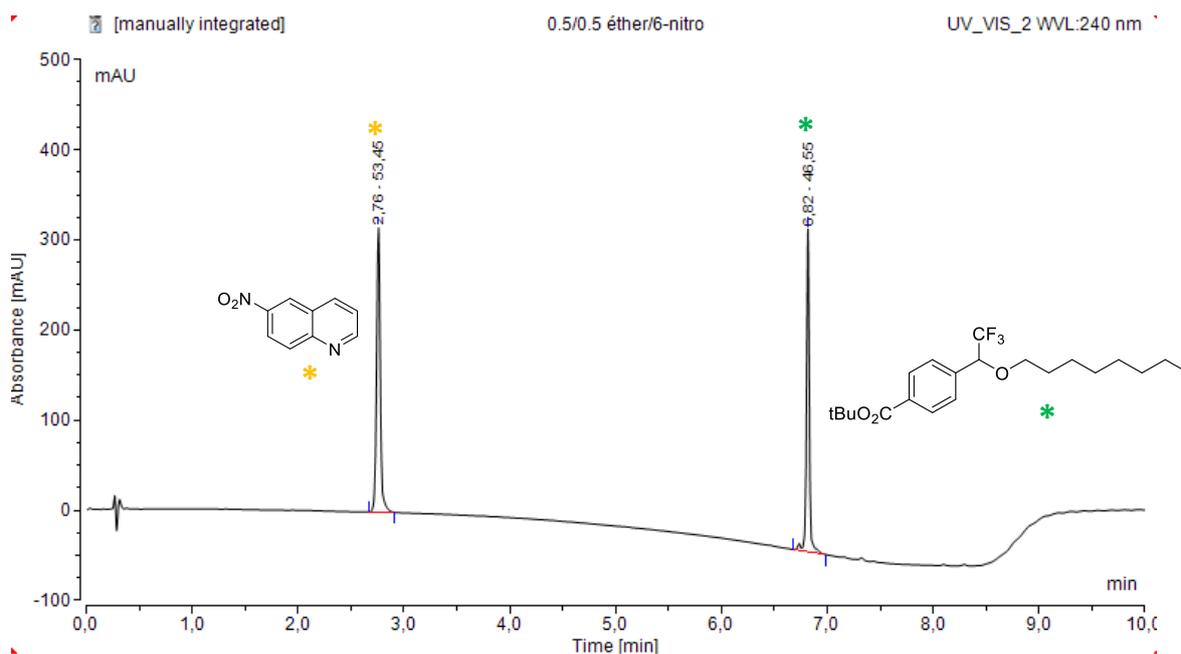


Figure 5: Chromatogram ($\lambda = 240$ nm, System A) of equimolar mixture of 6-nitroquinoline + product obtained from diazirine CO₂tBu and octanol reaction

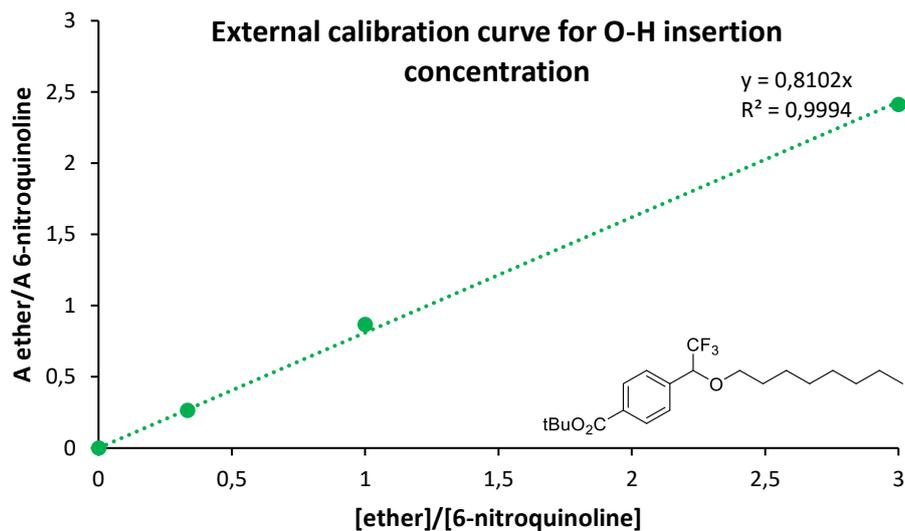


Figure 6: External calibration curve for O-H insertion concentration determination with diazirine CO₂tBu

- Nucleophile selection

Preparation of stock solutions: Stock solutions of the nucleophile (3.2M in MeCN), diazirine CO₂tBu (0.322 M in MeCN) were first prepared, followed by a solution of 6-nitroquinoline (0.04 M in MeCN).

Experiment: 25 μL of nucleophile and diazirine CO₂tBu stock solutions were introduced in a HPLC vial (1.5 mL), followed by 150 μL of MeCN. Then it was irradiated for 5 min with a 365 nm HepatoChem LED in PhotoRedox Box with stirring. After irradiation, 200 μL of 6-nitroquinoline stock solution was introduced in each vial. Then it was vortexed, and 50 μL were put in a HPLC vial with 950 μL of MeCN for UPLC analysis then vortexed again. Every mixture was analyzed by UPLC (λ = 240 nm, System A).

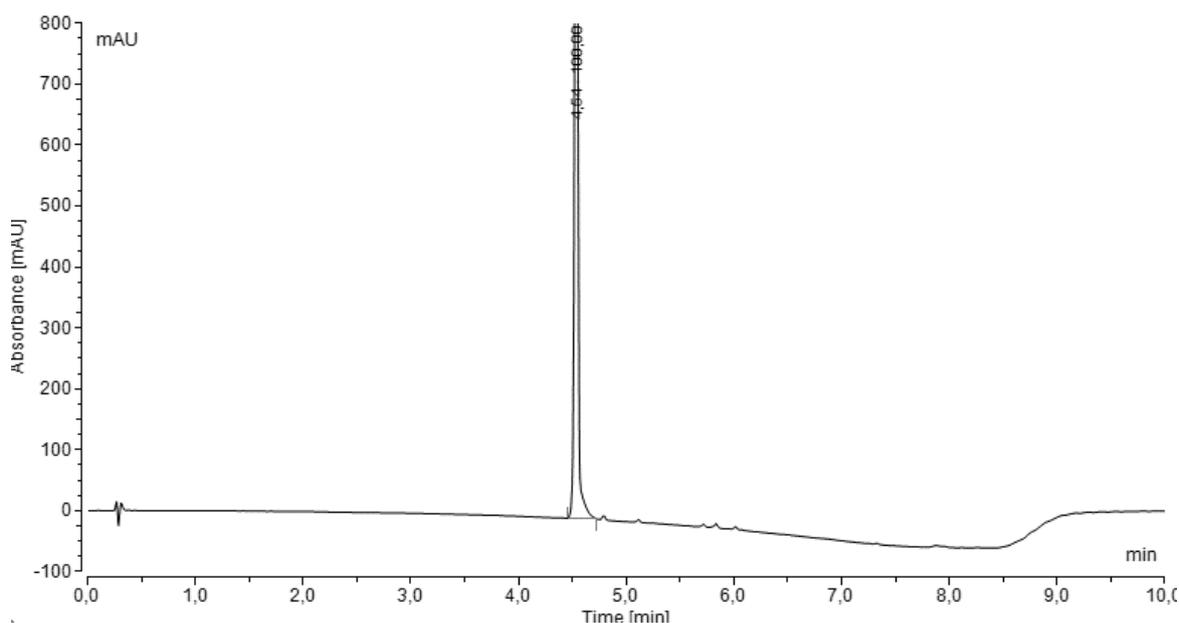


Figure 7: Chromatogram (λ = 240 nm, System A) from alcohol CO₂tBu

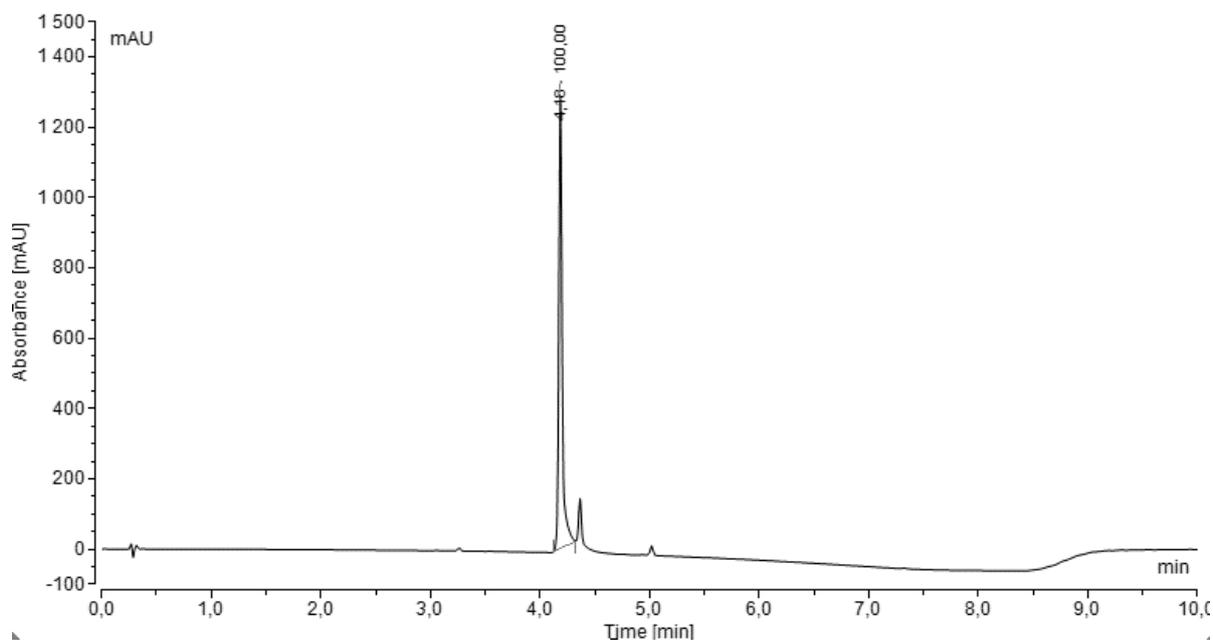


Figure 8: Chromatogram ($\lambda = 240$ nm, System A) from ketone CO₂tBu

- **Competition between nucleophiles**

Preparation of stock solutions: Stock solutions of nucleophiles (3.2 M in MeCN), diazirine CO₂tBu (0.322 M in MeCN) were first prepared, followed by a solution of 6-nitroquinoline (0.04 M in MeCN).

Experiment: 25 μ L of each nucleophile stock solutions, 25 μ L of diazirine CO₂tBu stock solution and 100 μ L of MeCN were introduced in a HPLC vial (1.5 mL). Then it was irradiated for 5 min with a 365 nm HepatoChem LED in PhotoRedox Box with stirring. After irradiation, 200 μ L of 6-nitroquinoline stock solution was introduced in each vial. Then it was vortexed, and 50 μ L were put in a HPLC vial with 950 μ L of MeCN for UPLC analysis then vortexed again. Every mixture was analyzed by UPLC ($\lambda = 240$ nm, System A).

Nucleophile candidate – Diazirine acid

- **External calibration procedure for HPLC monitoring**

A range of titrated solutions containing product references presumably obtained from the reaction between the nucleophile and the diazirine and commercial 6-nitroquinoline (external HPLC reference) was prepared in pure MeOH as follows:

- 0.75 mmol reference / 0.25 mmol 6-nitroquinoline

- 0.5 mmol reference /0.5 mmol 6-nitroquinoline
- 0.25 mmol reference /0.75 mmol 6-nitroquinoline

All titrated mixtures were analyzed by UPLC ($\lambda = 230$ nm, System A) and the ratios of UPLC areas ($A_{\text{reference}}/A_{\text{6-nitroquinoline}}$) were plotted against the corresponding concentration ratios ($[\text{reference}]/[\text{6-nitroquinoline}]$).

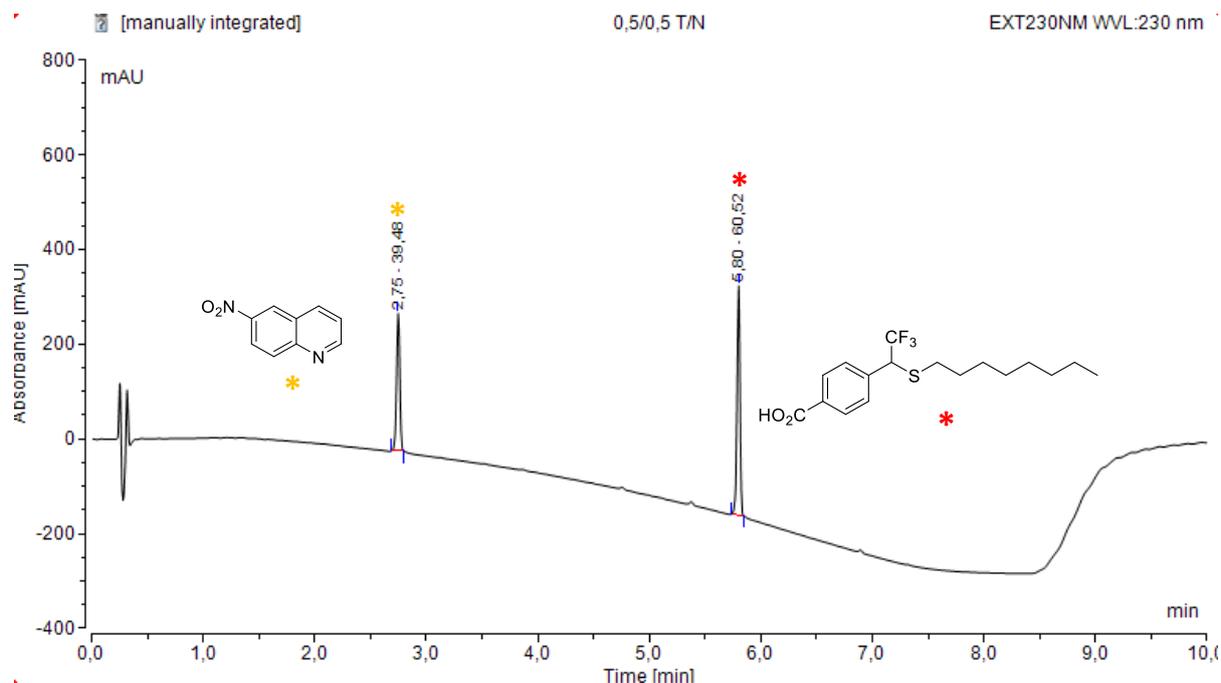


Figure 9: Chromatogram ($\lambda = 230$ nm, System A) of equimolar mixture of 6-nitroquinoline + product obtained from diazine CO_2H and octanethiol reaction

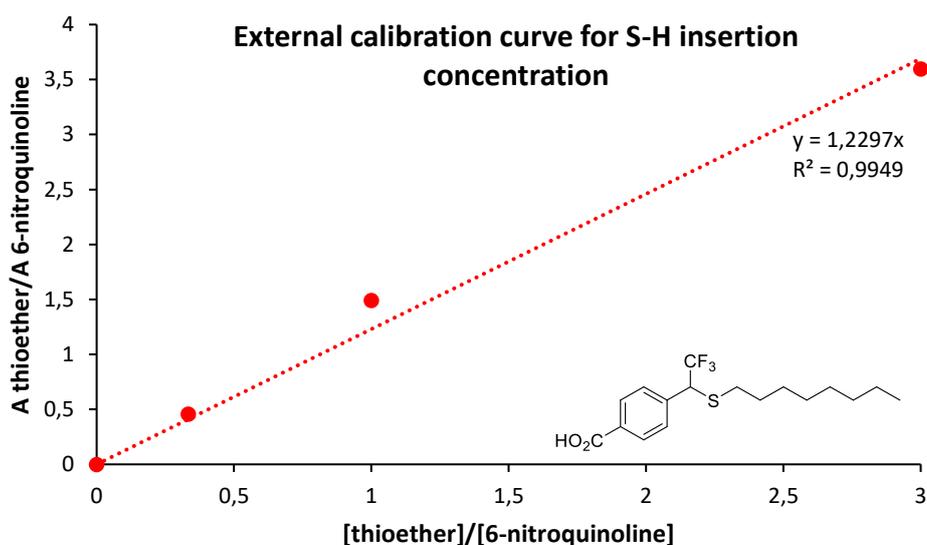


Figure 10: External calibration curve for S-H insertion concentration determination with diazine CO_2H

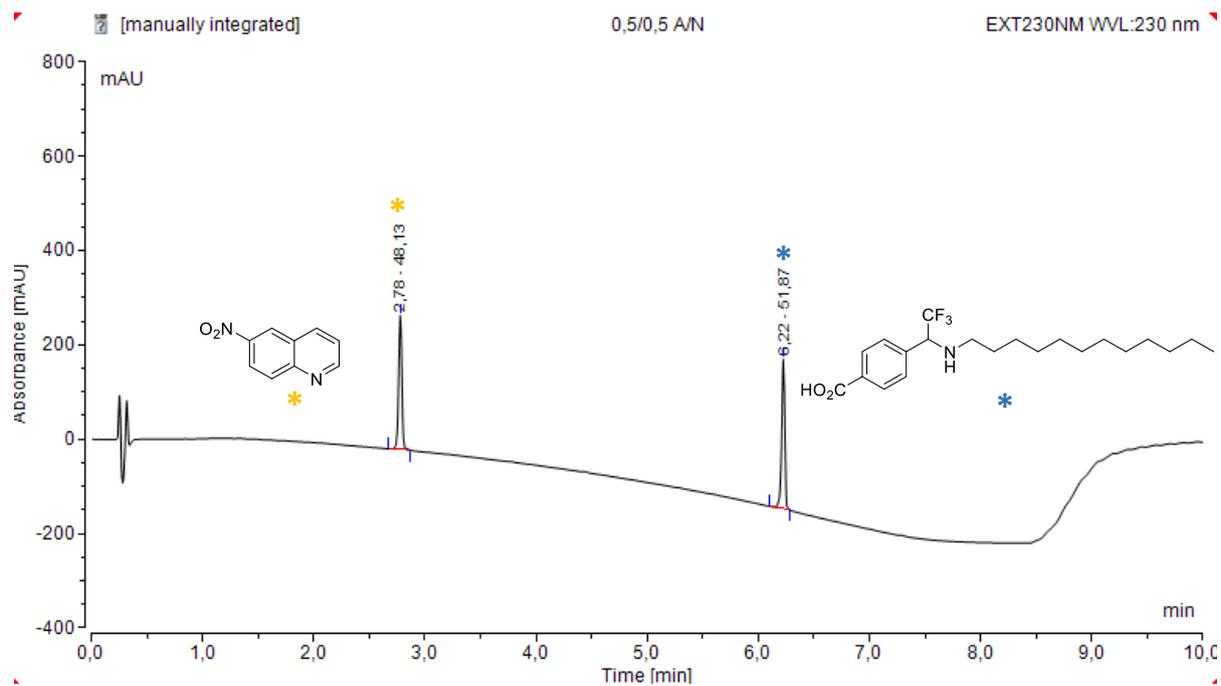


Figure 11: Chromatogram (λ = 230 nm, System A) of equimolar mixture of 6-nitroquinoline + product obtained from diazirine CO₂H and dodecylamine reaction

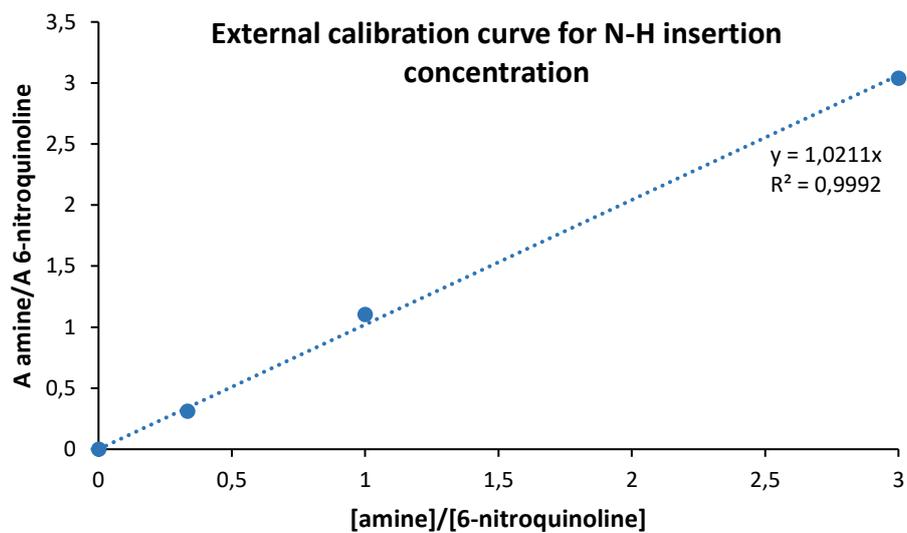


Figure 12: External calibration curve for N-H insertion concentration determination with diazirine CO₂H

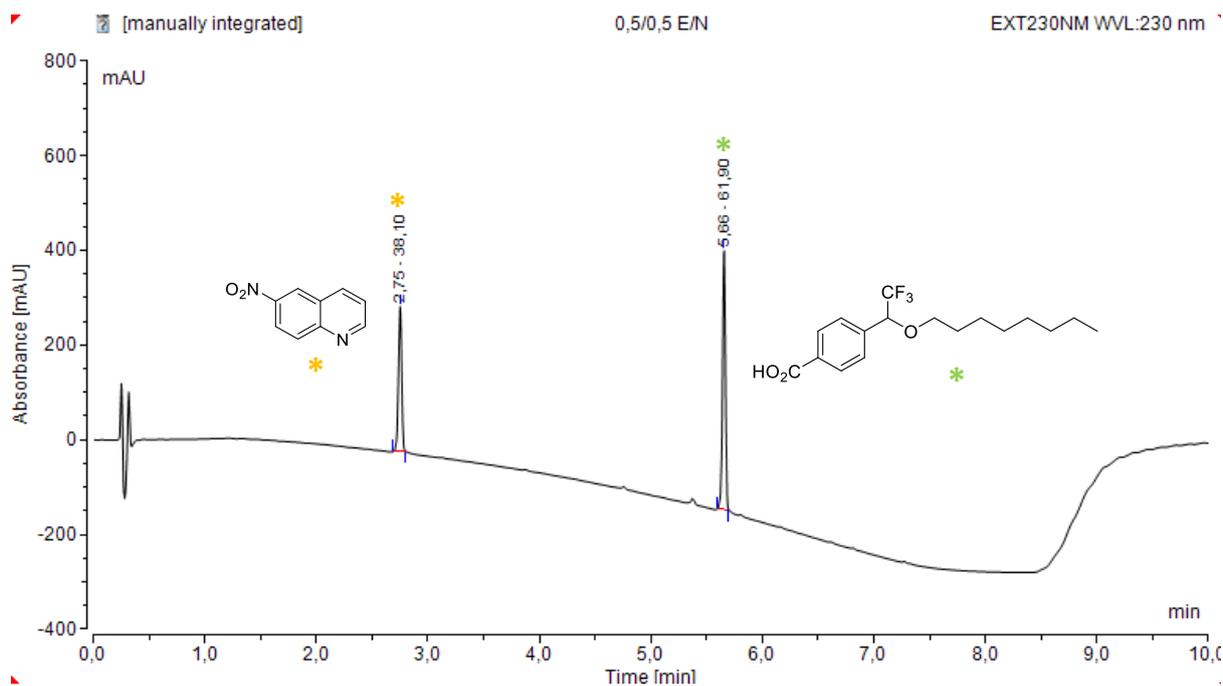


Figure 13: Chromatogram (λ = 230 nm, System A) of equimolar mixture of 6-nitroquinoline + product obtained from diazidine CO₂H and octanol reaction

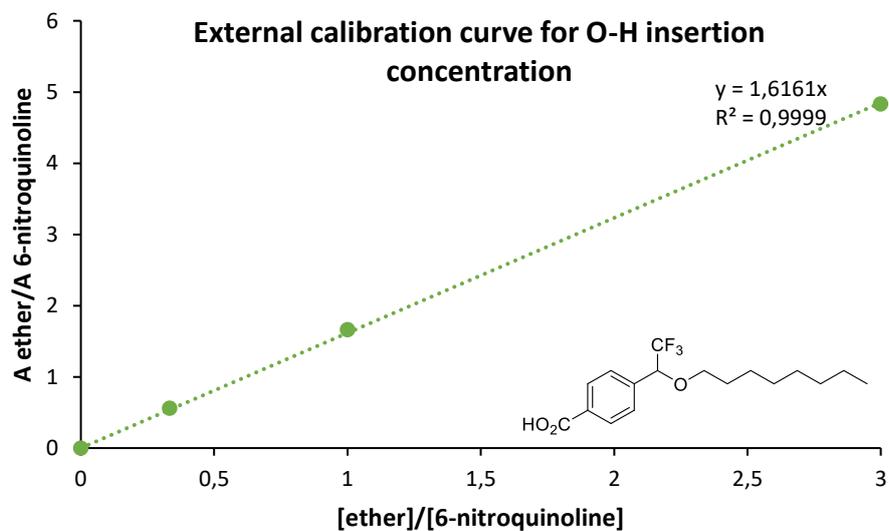


Figure 14: External calibration curve for O-H insertion concentration determination with diazidine CO₂H

- Nucleophile selection

Preparation of stock solutions: Stock solutions of the nucleophile (3.2M in MeCN), diazidine CO₂H (0.322 M in MeCN) were first prepared, followed by a solution of 6-nitroquinoline (0.04 M in MeOH).

Experiment: 25 μL of nucleophile and diazine CO_2H stock solutions were introduced in a HPLC vial (1.5 mL), followed by 150 μL of MeCN. Then it was irradiated for 5 min with a 365 nm HepatoChem LED in PhotoRedox Box with stirring. After irradiation, 200 μL of 6-nitroquinoline stock solution was introduced in each vial. Then it was vortexed, and 50 μL were put in a HPLC vial with 950 μL of MeOH for UPLC analysis then vortexed again. Every mixture was analyzed by LC-MS ($\lambda = 230 \text{ nm}$, System B).

- **Competition between nucleophiles**

Preparation of stock solutions: Stock solutions of nucleophiles (3.2 M in MeCN), diazine CO_2H (0.322 M in MeCN) were first prepared, followed by a solution of 6-nitroquinoline (0.04 M in MeOH).

Experiment: 25 μL of each nucleophile stock solutions, 25 μL of diazine CO_2H stock solution and 100 μL of MeCN were introduced in a HPLC vial (1.5 mL). Then it was irradiated for 5 min with a 365 nm HepatoChem LED in PhotoRedox Box with stirring. After irradiation, 200 μL of 6-nitroquinoline stock solution was introduced in each vial. Then it was vortexed, and 50 μL were put in a HPLC vial with 950 μL of MeOH for UPLC analysis then vortexed again. Every mixture was analyzed by UPLC ($\lambda = 230 \text{ nm}$, System B).

- **Water impact – Dual system**

Preparation of stock solutions: Stock solutions of methylmercaptopropionate (3.2M in MeCN), diazine CO_2H (0.322 M in MeCN) were first prepared, followed by a solution of 6-nitroquinoline (0.04 M in MeOH).

Experiment: 25 μL of methylmercaptopropionate and diazine CO_2H stock solutions were introduced in a HPLC vial (1.5 mL), followed by MeCN then water. Then it was irradiated for 5 min with a 365 nm HepatoChem LED in PhotoRedox Box with stirring. After irradiation, 200 μL of 6-nitroquinoline stock solution was introduced in each vial. Then it was vortexed, and 50 μL were put in a HPLC vial with 950 μL of MeOH for UPLC analysis then vortexed again. Every mixture was analyzed by LC-MS ($\lambda = 230 \text{ nm}$, System B).

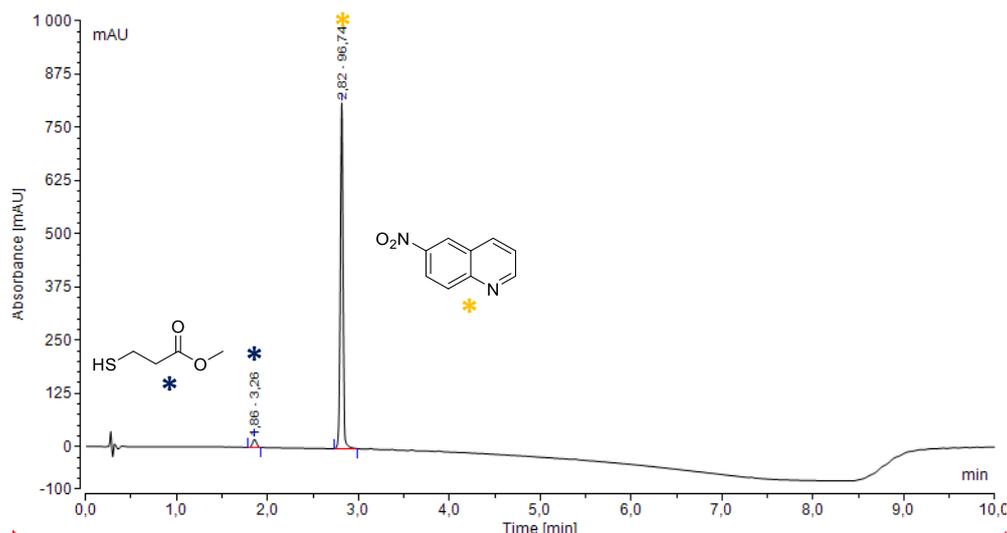


Figure 15: Chromatogram ($\lambda = 230$ nm, System A) of 10 eq of methylmercaptopropionate with 1 eq of 6-nitroquinoline

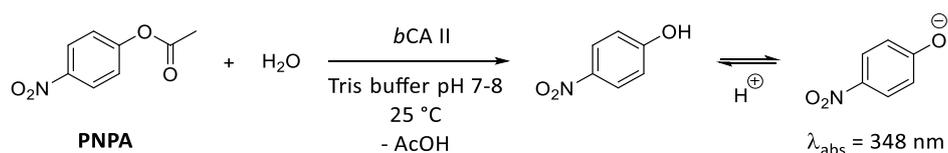
Diazirine irradiation kinetics

Preparation of stock solutions: Stock solutions of octanethiol (3.2 M in MeCN), diazirine CO₂tBu (0.322 M in MeCN) were first prepared, followed by a solution of 6-nitroquinoline (0.04 M in MeCN).

Experiment: 175 μ L of octanethiol and diazirine CO₂tBu stock solutions and 1050 μ L of MeCN were introduced in a HPLC vial (1.5 mL). Then it was irradiated with a 365 nm HepatoChem LED in PhotoRedox Box with stirring. After 1, 2, 3, 4, 5 and 7 min, 200 μ L of 6-nitroquinoline stock solution was introduced in each vial. Then it was vortexed, and 50 μ L were put in a HPLC vial with 950 μ L of MeCN for UPLC analysis then vortexed again. Every mixture was analyzed by UPLC ($\lambda = 240$ nm, System A).

General procedure for bCA-II stability assay

This procedure relies on the use of PNPA substrate.



Preparation of stock solutions:

- *b*CA II: 60 μ M (1.74 mg/mL) in Tris buffer (pH 7.5, 50 mM)
- PNPA: 120 mM (21.8 mg/mL) in DMSO

Preparation of the reaction mixture:

The order of introduction in HPLC vials (1.5 mL) of buffer and stock solutions in HPLC vials (1.5 mL) were as follows: 1) *b*CA II ; 2) Tris buffer pH 7.5 50 mM ; 3) DMSO. The reaction was run in triplicate.

Tris buffer pH 7.5 (μ L)	<i>b</i> CA II (μ L)	DMSO (μ L)
150	141	9.5

After the preparation of each solution, the vials were closed and solutions were gently homogenized before their incubation at room temperature for 30 min. After incubation, solutions were irradiated with a 365 nm HepatoChem LED in PhotoRedox Box whereas same solutions were not.

Preparation of second stock solutions:

- Dilution of each solution in Tris buffer (pH 7.5, 50 mM) so as to reach a final concentration of 6.4 mM
- Dilution of PNPA in Tris buffer (pH 7.5, 50 mM) so as to reach a final concentration of 6 mM on last minute to avoid hydrolysis.

Preparation of the 96-well plate:

The 96-well plate was prepared as follows: 1) Tris buffer pH 7.5; 2) Solution of *b*CA-II

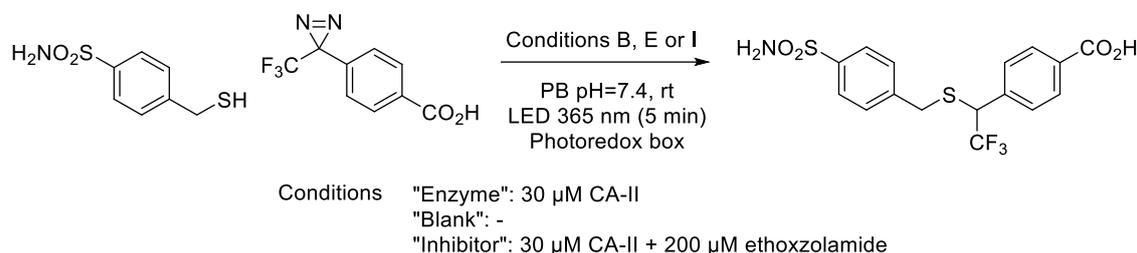
	Tris buffer pH 7.5	Solution of <i>b</i> CA II	PNPA
Volume (μ L)	70	10	20

Incubation, injection and activity measurement:

The solutions in the 96-well plate were incubated at 25 °C for 10 min. Then, PNPA solution was added into the solutions with an automatic injector (20 μ L). Absorbance was then automatically measured for every solution with 1 point/minute for 20 min at $\lambda_{\text{abs}} = 348$ nm.

7. KTGS experiments

General procedure



Preparation of stock solutions: Stock solutions of the thiol (1 mg/mL in DMSO, 5 mM), diazirine (10 mg/mL in DMSO, 43 mM) and ethoxzolamide (5 mg/mL in DMSO, 19.4 mM) were first prepared, followed by a solution of *b*CA-II (1.74 mg/mL = 60 μM in PB pH 7.4 250 mM).

Preparation of the reaction mixture: The order of introduction of buffer and stock solutions in HPLC vials (1.5 mL) were as follows: 1) *b*CA II for « Inhibitor » and « Enzyme » experiments ; 2) PB pH 7.4 250 mM ; 3) DMSO for « Blank » and « Enzyme » experiments ; 4) Ethoxzolamide for the « Inhibitor » experiment (incubation at room temperature for 2 min) ; 5) Thiol (incubation at room temperature for 2 min) ; 6) Diazirine. The reaction was run in triplicate.

Volumes of buffer and stock solutions which were taken for each experiment as follows (final volume = 1000 μL ; 3.2% v/v of DMSO maximum):

Experiment	PB pH 7.4 (μL)	<i>b</i> CA-II (μL)	DMSO (μL)	Ethoxzolamide (μL)	Thiol (μL)	Diazirine (μL)
« Blank »	968	/	10.3	/	12	9.3
« Inhibitor »	468	500	/	10.3	12	9.3
« Enzyme »	468	500	10.3	/	12	9.3

Final concentrations were as follows:

Experiment	<i>b</i> CA-II (μM)	Ethoxzolamide (μM)	Thiol (μM)	Diazirine (μM)
« Blank »	0	0	60	400
« Inhibitor »	30	200	60	400
« Enzyme »	30	0	60	400

After the preparation of each solution, the vials were closed, and solutions were gently homogenized before their incubation at room temperature for 30 min. After incubation, solutions were irradiated for 5 min with a 365 nm HepatoChem LED in PhotoRedox Box.

After incubation, 500 μL of each solution were prelevé and diluted in a solution of DMSO/MeOH (500 μL , 1:1, v/v, HPLC grade) and were vortexed (5 seconds) so as to denaturate the protein and to precipitate inorganic salts. The resulting solutions were decanted for 1 h. Then, solutions were centrifuged for 5 min at 13500 RPM. Then the supernatant was prelevé with a 1 mL disposable syringe and filtered through a PTFE filter (porosity = 0.45 μm). Finally, resulting solutions were analyzed by LC-MS/SIM (System B).

For enantiomeric excess determination, resulting solutions were analyzed by LC-MS/MRM (System E, F or G).

Kinetics – Calibration curves

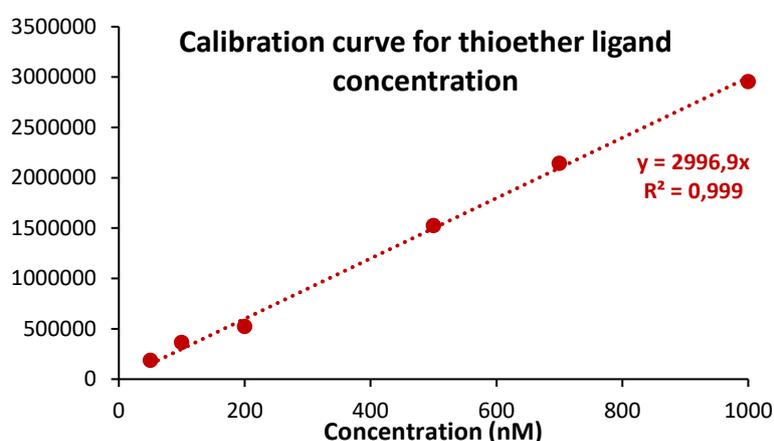


Figure 16: Calibration curve for thioether ligand concentration in KTGS experiment

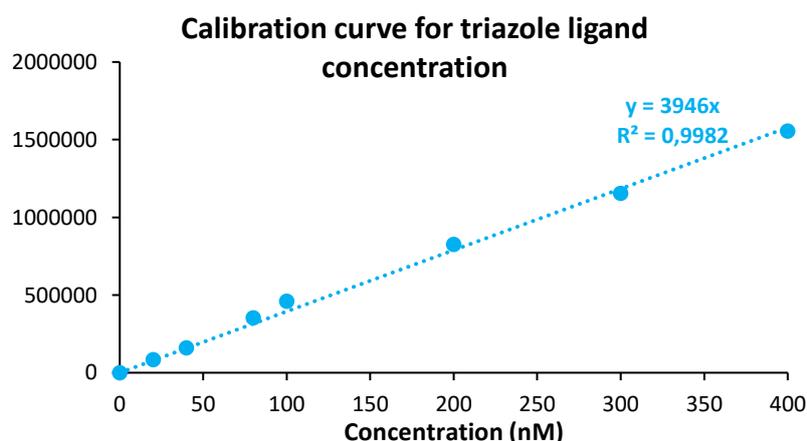
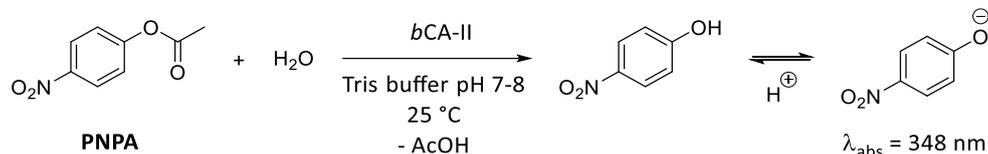


Figure 17: Calibration curve for triazole ligand concentration in Sharpless experiment

8. General procedure for bCA II inhibition assay

This procedure which relies on the use of PNPA substrate, was done in triplicate for every tested compound.



Preparation of first stock solutions:

- S1(*bCA-II*): 60 μM (2 mg/mL) in Tris buffer (pH 7.6, 50 mM)
- S1(PNPA): 120 mM (21.8 mg/mL) in DMSO
- S1(Ligand): 1 mM in DMSO

Preparation of second stock solutions:

- S2(*bCA-II*): dilution of S1(*bCA-II*) in Tris buffer (pH 7.6, 50 mM) so as to reach a final concentration of 6 μM
- S2(PNPA): dilution of S1(PNPA) in Tris buffer (pH 7.6, 50 mM) so as to reach a final concentration of 6 mM
- S2(Ligand): stocks solutions with specific concentration range (highest concentration = × 100 lowest concentration) were prepared by diluting S1(Ligand) in Tris buffer (pH 7.6, 50 mM)

Preparation of the 96-well plate:

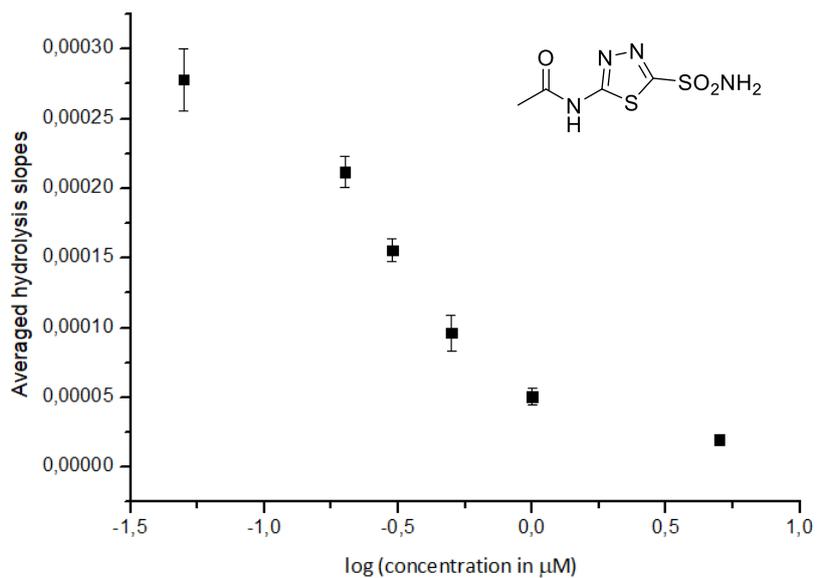
The 96-well plate was prepared as follows: 1) Tris buffer pH 7.6 ; 2) S2(Ligand) ; 3) S2(*bCA-II*)

	Tris buffer pH 7.6	S2(ligand)	S2(<i>bCA-II</i>)	S2(PNPA)
Volume (μL)	60	10	10	20

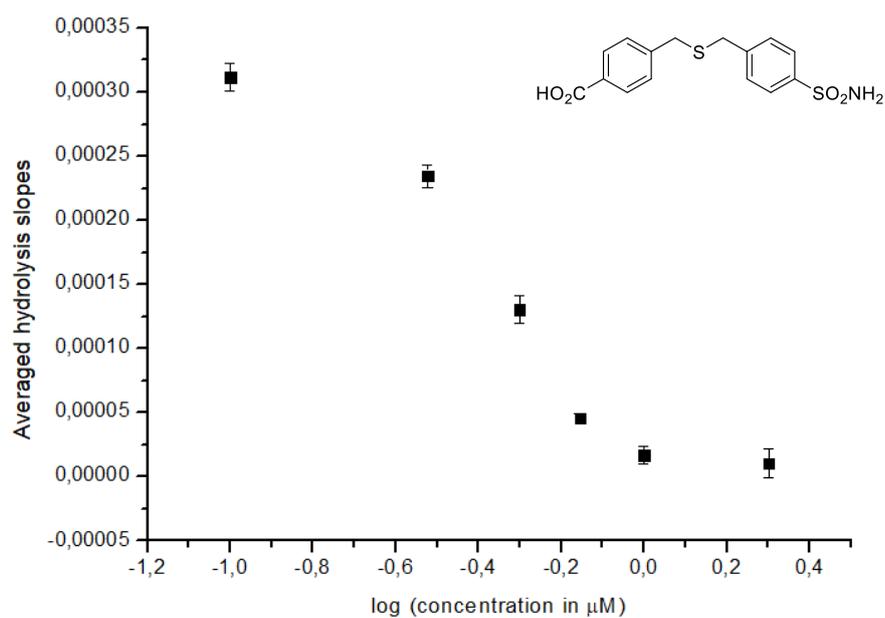
Incubation, injection and activity measurement:

The solutions in the 96-well plate were incubated at 25 °C for 10 min. Then, S2(PNPA) was added into the solutions with an automatic injector (20 μL). Absorbance was then automatically measured for every solution with 1 point/minute for 20 min at $\lambda_{\text{abs}} = 348 \text{ nm}$.

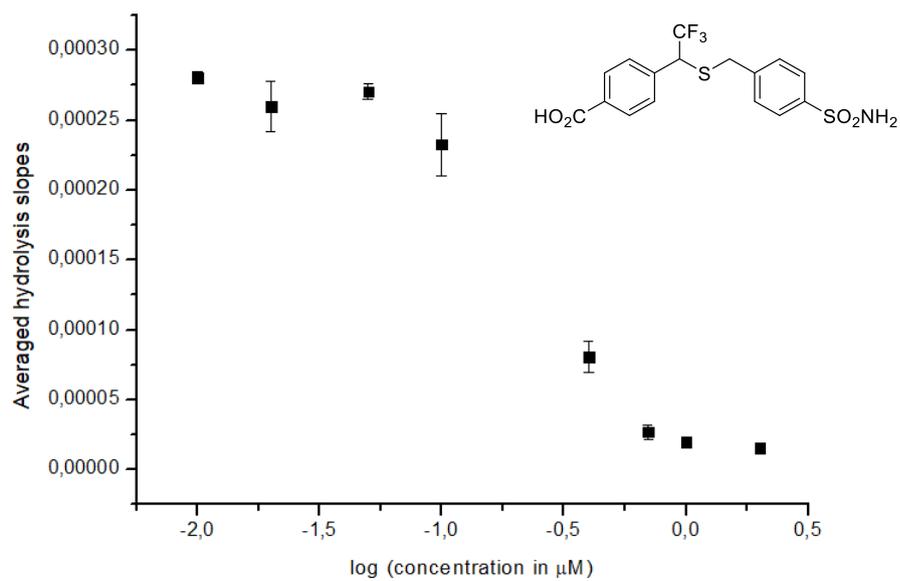
IC₅₀ were determined with *Origin8*® software using sigmoidal « Dose-Response » fitting. Averaged curves of three independent assays are shown below (error bars represent the standard deviation of the mean slopes values from the three assays).



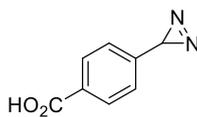
$\text{IC}_{50} = 305 \pm 18 \text{ nM}$



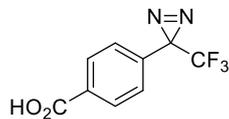
$\text{IC}_{50} = 439 \pm 28 \text{ nM}$



$\text{IC}_{50} = 244 \pm 25 \text{ nM}$



No inhibition of *b*CA II for concentration < 2 mM



**No inhibition of *b*CA II for concentration < 800 μM
(low solubility for higher concentrations than 800 μM)**

Résumé

La synthèse contrôlée par la cible sous contrôle cinétique (*Kinetic Target-Guided Synthesis*, *KTGS*) est une approche de « *drug discovery* » dans laquelle la protéine d'intérêt est capable de former son propre ligand à partir de fragments possédant des fonctions réactives complémentaires. Assez peu de réactions permettent la formation de ligands par la mise en jeu de liaisons covalentes et irréversibles en présence de la cible biologique, la click *in situ* développée par l'équipe de Sharpless étant la réaction la plus utilisée. Bien qu'en plein essor ces dernières années, la *KTGS* possède des limites liées aux critères exigeants de biocompatibilité et de cinétiques réactionnelles bien définies. Dans ce manuscrit de thèse, nous avons souhaité répondre à plusieurs problématiques, à savoir 1) l'amélioration des propriétés photophysiques (absorption, photoisomérisation, fluorescence) d'un inhibiteur de l'anhydrase carbonique II obtenu par *KTGS* par la réaction de thiol-yne ; et 2) la mise en place d'une réaction de *KTGS* photoactivable de façon à contrôler spatiotemporellement la ligation par irradiation lumineuse en vue de diminuer significativement les temps d'incubation des approches actuelles.

Mots-clés : *KTGS*, thiol-yne, photoisomérisation, click *in situ*, anhydrase carbonique, réaction photochimique, diazirine.

Abstract

The Kinetic Target-Guided Synthesis (*KTGS*) is a drug discovery approach, in which the protein of interest is able to form its own ligand from fragments bearing complementary reactive functions. Few reactions enable the formation of ligands through the elaboration of covalent and irreversible bonds in the presence of the biological target, with the *in situ* click developed by the Sharpless team being the most commonly used reaction. Despite its recent growth, *KTGS* has limitations related to demanding criteria of biocompatibility and well-defined reaction kinetics. In this manuscript, we aimed to address several issues, namely 1) improving the photophysical properties (absorption, photoisomerization, fluorescence) of an inhibitor of carbonic anhydrase II obtained with *KTGS* through thiol-yne reaction; and 2) establishing a photoactivable *KTGS* reaction to spatiotemporally control ligation through light irradiation, with the goal of significantly reducing the incubation times of current approaches.

Key words: *KTGS*, thiol-yne, photoisomerization, *in situ* click, carbonic anhydrase, photochemical reaction, diazirine.