



**HAL**  
open science

# Développement et applications de réactions d'hétérocycloaddition pour la diversification structurale et le marquage de molécules à visée thérapeutique

Timothé Maujean

► **To cite this version:**

Timothé Maujean. Développement et applications de réactions d'hétérocycloaddition pour la diversification structurale et le marquage de molécules à visée thérapeutique. Chimie thérapeutique. Université de Strasbourg, 2022. Français. NNT : 2022STRAF055 . tel-04920847

**HAL Id: tel-04920847**

**<https://theses.hal.science/tel-04920847v1>**

Submitted on 30 Jan 2025

**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.

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES**

**[UMR 7200 - Laboratoire d'Innovation Thérapeutique]**

**THÈSE** présentée par :

**Timothé MAUJEAN**

soutenue le : **27 octobre 2022**

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

Discipline/ Spécialité : Chimie biologique et thérapeutique

**Développement et applications de réactions  
d'hétérocycloaddition pour la diversification  
structurale et le marquage de molécules à  
visée thérapeutique**

**THÈSE dirigée par :**

**Dr. BONNET Dominique**  
**Dr. GULEA Mihaela**

Directeur de recherche, Université de Strasbourg  
Directrice de recherche, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Dr. TARAN Frédéric**  
**Dr. WONG Yung-Sing**

Directeur de recherche, CEA Saclay  
Directeur de recherche, Université Grenoble-Alpes

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Pr. BELMONT Philippe**  
**Dr. GIRARD Nicolas**

Professeur, Université Paris-Descartes  
Maître de conférences, Université de Strasbourg



# Sommaire

<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>- 3 -</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>- 7 -</b>
<b>ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>- 11 -</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	<b>- 15 -</b>
<b>PARTIE I. DIVERSIFICATION STRUCTURALE DES AZA-DCPS</b> .....	<b>- 25 -</b>
<b>CHAPITRE 1. BIBLIOGRAPHIE DES AZA-DCPS : SYNTHÈSE, VARIATIONS STRUCTURALES ET PROPRIÉTÉS</b> .....	<b>- 27 -</b>
<b>1. INTRODUCTION GENERALE SUR LES AZA-DCPS</b> .....	<b>- 27 -</b>
<b>2. STRATEGIES DE SYNTHÈSE DES AZA-DCPS</b> .....	<b>- 30 -</b>
2.1. VIA LA CYCLISATION INTRAMOLECULAIRE D'UNE 2-AMINOHYDRAZIDE.....	- 30 -
2.2. VIA LA CYCLISATION INTRAMOLECULAIRE D'UN SEMICARBAZIDE .....	- 37 -
2.2.1. A partir d'une hydrazine et d'un composé aminé dicarboxylé .....	- 38 -
2.2.2. A partir de carbazates activés et d'acides aminés .....	- 39 -
2.2.3. A partir d'hydrazines, d'acides aminés et d'un substitut du phosgène .....	- 40 -
<b>3. VARIATION DE LA STRUCTURE MOLECULAIRE D'UNE AZA-DCP</b> .....	<b>- 44 -</b>
3.1. VARIATIONS AU COURS DE LA SYNTHÈSE.....	- 44 -
3.1.1. Variation des substituants en positions 4 et/ou 5 .....	- 45 -
3.1.2. Variation des substituants en positions 1 et/ou 2 .....	- 47 -
3.2. VARIATIONS POST-SYNTHESE.....	- 50 -
3.2.1. Variation des substituants en position 1 et/ou 2 .....	- 51 -
3.2.2. Modification des substituants en position 5 .....	- 54 -
3.2.3. Introduction de substituants en position 4 .....	- 57 -
<b>4. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET ACTIVITES BIOLOGIQUES DES AZA-DCPS</b> ....	<b>- 58 -</b>
<b>5. BILAN BIBLIOGRAPHIQUE ET PERSPECTIVES ENVISAGEES</b> .....	<b>- 62 -</b>
<b>CHAPITRE 2. DIVERSIFICATION DES AZA-DCPS PAR LA RÉACTION DE POVAROV</b> .....	<b>- 65 -</b>
<b>1. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>- 65 -</b>
1.1. GENERALITES SUR LA REACTION DE POVAROV .....	- 65 -
1.1.1. Considérations mécanistiques.....	- 68 -
1.1.2. Les différents diénophiles de la réaction de Povarov .....	- 72 -
<b>2. RESULTATS ET DISCUSSIONS</b> .....	<b>- 76 -</b>

2.1.	SYNTHESE DU PRECURSEUR AZA-DCP BICYCLIQUE <b>4</b> .....	- 76 -
2.2.	OPTIMISATION DES CONDITIONS RÉACTIONNELLES .....	- 78 -
2.3.	MESURE DU RATIO ENDO/EXO.....	- 80 -
2.4.	ETUDE DE L'ETENDUE ET DES LIMITES DE LA REACTION .....	- 81 -
2.5.	ETUDE DE LA REACTION DE POVAROV EN VERSION ASYMETRIQUE .....	- 86 -
2.6.	ETUDE THEORIQUE DE LA REACTION DE POVAROV SUR LES AZA-DCPS .....	- 87 -
<b>CHAPITRE 3. SYNTHÈSE ET ÉVALUATIONS D'AZA-ANALOGUES DE DCPS BIOACTIVES .</b>		<b>- 95 -</b>
<b>1.</b>	<b>NOMENCLATURE .....</b>	<b>- 95 -</b>
<b>2.</b>	<b>TADALAFIL.....</b>	<b>- 96 -</b>
2.1.	HISTORIQUE DU TADALAFIL.....	- 96 -
2.2.	STRATEGIE DE SYNTHESE DE L'AZA-W-TADALAFIL <b>17</b> .....	- 99 -
2.2.1.	Stratégie « Pictet-Spengler ».....	- 99 -
2.2.2.	Stratégie « Bischler-Napieralski ».....	- 104 -
<b>3.</b>	<b>BRÉVIANAMIDE F .....</b>	<b>- 107 -</b>
3.1.	HISTORIQUE ET ACTIVITES BIOLOGIQUES DECRITES .....	- 107 -
3.2.	SYNTHESE DE LA BREVIANAMIDE F ET D'UN AZA-BREVIANAMIDE F .....	- 108 -
3.3.	RESULTATS BIOLOGIQUES SUR BACTERIES ET CHAMPIGNONS.....	- 110 -
<b>4.</b>	<b>PLINABULINE.....</b>	<b>- 113 -</b>
4.1.	ORIGINE, ACTIVITÉ BIOLOGIQUE ET RSA .....	- 113 -
4.2.	SYNTHÈSE DE L'AZA-F-PLINABULINE .....	- 118 -
4.3.	EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-CANCEREUSE DE L'AZA-F-PLINABULINE.....	- 126 -
<b>CONCLUSIONS &amp; PERSPECTIVES DE LA PARTIE I .....</b>		<b>- 133 -</b>
<b>PARTIE II. FONCTIONNALISATION DE PEPTIDES PAR RÉACTION « CLICK » DE THIA-DIELS-</b>		
<b>ALDER POUR DES APPLICATIONS EN IMAGERIE.....</b>		<b>- 135 -</b>
<b>CHAPITRE 4. BIBLIOGRAPHIES : IMAGERIE, RÉACTION « CLICK » ET DITHIOESTERS.....</b>		<b>- 137 -</b>
<b>1.</b>	<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES : FONCTIONNALISATION DE PEPTIDES PAR DES</b>	
<b>REACTIONS DE CYCLOADDITION ET UTILISATION EN IMAGERIE .....</b>		<b>- 137 -</b>
1.1.	METHODES D'IMAGERIE MOLECULAIRE EN CHEMOBIOLOGIE.....	- 137 -
1.1.1.	Imagerie par scanner TEP .....	- 138 -
1.1.2.	Imagerie optique (fluorescence, phosphorescence).....	- 141 -
1.2.	CHIMIE CLICK, BIOCONJUGAISON, REACTIONS BIO-ORTHOGONALES .....	- 143 -
1.3.	LES REACTIONS DE CYCLOADDITION .....	- 147 -
1.4.	CYCLOADDITIONS (3+2).....	- 149 -
1.4.1.	Réactions CuAAC .....	- 149 -
1.4.2.	Réactions SPAAC.....	- 156 -
1.4.3.	Réactions impliquant des composés mésoioniques.....	- 171 -

1.5.	CYCLOADDITIONS (4+2).....	- 176 -
1.5.1.	Diels-Alder à demande inverse.....	- 176 -
1.5.2.	Diels-Alder à demande normale .....	- 193 -
1.6.	BILAN BIBLIOGRAPHIQUE ET PERSPECTIVES ASSOCIES.....	- 202 -
<b>2.</b>	<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES DITHIOESTERS.....</b>	<b>- 204 -</b>
2.1.	PROPRIETES ET SYNTHÈSE .....	- 204 -
2.2.	LES PHOSPHONODITHIOESTERS.....	- 208 -
2.2.1.	Synthèse des phosphonodithioesters.....	- 208 -
2.2.2.	Les phosphonodithioesters en tant que diénophile .....	- 210 -
2.2.3.	Réactivité des phosphonodithioesters vis-à-vis des nucléophiles.....	- 218 -
	<b>CHAPITRE 5. MARQUAGE DE PEPTIDES À L'AIDE D'OUTILS D'IMAGERIE.....</b>	<b>- 221 -</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUCTION DU MOTIF PHOSPHONODITHIOESTER SUR PEPTIDE.....</b>	<b>- 221 -</b>
<b>2.</b>	<b>OPTIMISATION DU PARTENAIRE DIENIQUE PAR SUIVI CINETIQUE.....</b>	<b>- 224 -</b>
<b>3.</b>	<b>APPLICATION AU RADIOMARQUAGE DE PEPTIDES PAR LE <sup>18</sup>F.....</b>	<b>- 237 -</b>
3.1.	OPTIMISATION DU MARQUAGE D'UN TRIPEPTIDE MODELE.....	- 237 -
3.2.	LE RÉCEPTEUR PSMA.....	- 245 -
3.3.	MARQUAGE D'UN LIGAND PSEUDO-PEPTIDIQUE DU PSMA.....	- 249 -
<b>4.</b>	<b>APPLICATION AU MARQUAGE DE PEPTIDES PAR DES FLUOROPHORES.....</b>	<b>- 256 -</b>
4.1.	SYNTHÈSES DES PRÉCURSEURS DIÉNIQUES.....	- 256 -
4.2.	MARQUAGE D'UN TRIPEPTIDE MODELE EN CONDITIONS DOUCES .....	- 261 -
4.1.	LES PEPTIDES APELINES ET LEUR RECEPTEUR APJ .....	- 264 -
4.2.	MARQUAGE DE L'APELINE-13 ET MICROSCOPIE .....	- 266 -
	<b>CHAPITRE 6. STRATÉGIES « DOUBLE-CLICK » À L'AIDE DE LA RÉACTION DE THIA-DIELS-ALDER.....</b>	<b>- 273 -</b>
<b>1.</b>	<b>CHIMIE "MULTI-CLICK" : QUELQUES EXEMPLES DE LA LITTÉRATURE .....</b>	<b>- 273 -</b>
<b>2.</b>	<b>ETUDE D'UNE STRATEGIE DOUBLE CLICK : CUAAC/THIA-DA .....</b>	<b>- 286 -</b>
2.1.	SYNTHÈSE DES REACTIFS BI-FONCTIONNELS ET PARTENAIRES REACTIONNELS.....	- 286 -
2.2.	ETUDE DE LA SEQUENCE « DOUBLE-CLICK » .....	- 290 -
2.3.	APPLICATIONS A LA DOUBLE MODIFICATION DE PEPTIDES .....	- 296 -
<b>3.</b>	<b>ETUDE D'UNE STRATEGIE DOUBLE CLICK BIS-THIA-DIELS-ALDER PAR DISCRIMINATION CINETIQUE.....</b>	<b>- 300 -</b>
3.1.	CONCEPT.....	- 300 -
3.2.	SYNTHÈSE ET APPLICATIONS DE LA PLATEFORME BIFONCTIONNELLE .....	- 302 -
3.3.	SYNTHÈSE ET APPLICATION D'UNE PLATEFORME TRIFONCTIONNELLE .....	- 307 -
	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES DE LA SECONDE PARTIE.....</b>	<b>- 315 -</b>

<b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>- 321 -</b>
<b>PARTIE EXPÉRIMENTALE.....</b>	<b>- 329 -</b>
<b>1. GENERAL METHODS .....</b>	<b>- 331 -</b>
1.1. COMMERCIAL REAGENTS AND CONSUMABLES.....	- 331 -
1.1.1. For classical chemistry .....	- 331 -
1.1.2. For radiochemistry .....	- 331 -
1.1. REVERSE PHASE HPLC PURIFICATION .....	- 332 -
1.2. CHARACTERISATIONS OF PURE COMPOUNDS.....	- 332 -
1.1.3. Reverse Phase HPLC analyses .....	- 332 -
1.1.4. NMR analyses.....	- 333 -
1.1.5. MS analyses .....	- 334 -
<b>2. EXPERIMENTAL PROCEDURES .....</b>	<b>- 335 -</b>
2.1. PARTIE I : DIVERSIFICATION STRUCTURALE DES AZA-DCPs.....	- 335 -
2.1.1. Diversification des aza-DCPs par la réaction de Povarov .....	- 335 -
2.1.1.1 Chemical syntheses .....	- 335 -
2.1.1.2 Theoretical calculations.....	- 363 -
2.1.2. Synthèses et évaluations d'aza-analogues de DCps bioactives.....	- 431 -
2.1.2.1 Chemical syntheses .....	- 431 -
2.1.2.2 Biological evaluations.....	- 450 -
2.1.2.3 Theoretical calculations, total energy and cartesian coordinates .....	- 453 -
2.2. PARTIE II : FONCTIONNALISATION DE PEPTIDES PAR REACTION « CLICK » DE THIA-DIELS-ALDER POUR DES APPLICATIONS EN IMAGERIE.....	- 457 -
2.2.1. General procedure for solid phase peptide synthesis .....	- 457 -
2.2.2. Application au radiomarquage de peptide a l'aide du <sup>18</sup> F.....	- 459 -
2.2.2.1 Chemical syntheses .....	- 459 -
2.2.2.2 Radiochemical syntheses .....	- 486 -
2.2.2.3 Biological evaluation of radioligand [ <sup>18</sup> F]- <b>67</b> .....	- 492 -
2.2.3. Application au marquage de peptides à l'aide de fluorophores.....	- 501 -
2.2.3.1 Chemical syntheses .....	- 501 -
2.2.3.2 Photophysical characterisation .....	- 514 -
2.2.3.3 Confocal microscopy imaging .....	- 515 -
2.2.3.4 Saturation and competition curves.....	- 515 -
2.2.4. Stratégies « double click » à l'aide de la réaction de thia-Diels-Alder.....	- 517 -
2.2.4.1 Etude d'une stratégie « double click » : CuAAC/thia-DA .....	- 517 -
2.2.4.2 Etude d'une stratégie « double click » par discrimination cinétique .....	- 538 -
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>- 555 -</b>

# Remerciements

Ces travaux de thèse ont été effectués au sein du Laboratoire d'Innovation Thérapeutique (LIT, UMR 7200) au sein de l'équipe de Synthèse Organique Métallo-induite et Hétérochimie (SOMHet) dirigée par la Dr Mihaela Gulea et de l'équipe de Chimie-Biologie Intégrative et Pharmacognosie (CBIP) dirigée par le Dr Dominique Bonnet. Cette thèse a été financée par le biais d'un Contrat Doctoral Spécifique Normalien (CDSN) de 3 ans accordé par l'Ecole Normale Supérieure Paris-Saclay.

Je souhaite tout d'abord remercier mes directeurs de thèse, la Dr Mihaela Gulea et le Dr Dominique Bonnet pour leur accompagnement, leur temps et leurs précieux conseils. Merci également pour la confiance, l'autonomie que vous m'avez accordée au cours des différents projets pluridisciplinaires abordés ces 3 dernières années. J'ai énormément appris à vos côtés durant cette thèse et je ne vous en remercierai jamais assez. Je tiens également à remercier le Dr Nicolas Girard pour son encadrement, ses conseils avisés, sa disponibilité et sa bonne humeur dont il a fait preuve au cours de cette thèse.

Je voudrais également remercier les membres du jury, le Directeur de recherche Yung-Sing Wong (Université Grenoble Alpes), le Directeur de Recherche Frédéric Taran (CEA Saclay) et le Professeur Philippe Belmont (Université Paris Descartes) qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie évidemment l'ensemble des membres et anciens membres des équipes CBIP et SOMHet pour les bons moments passés au cours de ces trois dernières années. Je voudrais remercier tout particulièrement Stéphanie Riché, Claire Marsol, Sridévi Ramanoudjame, Damla TORUN et Océane Flores pour leurs conseils, leur aide et leur bonne humeur quotidienne qui ont vraiment ensoleillé chaque jour de cette thèse. Je tiens à remercier aussi Julie Karpenko (LIT, UMR 7200) et Nicolas Humbert (LBP, UMR 7021) pour leur expertise et leurs conseils en spectroscopie. Merci en particulier à toi Julie pour le temps que tu as consacré aux expériences d'imagerie de cette thèse. Je souhaite également remercier et surtout souhaiter bon courage aux futurs docteurs du laboratoire : Lucille, Yann, Arthur, Ervan, Roméric. Merci également

aux deux meilleurs pharmacognostes, Elora Aubert et Maël Gainche (ou Gaël Mainche selon d'autres sources) pour leur bonne humeur et les discussions à l'aquarium. Un grand merci également à Mickaël « Momo » Choury pour le soutien, les fous rires, sa motivation sans faille et ses précieuses mises en garde vis-à-vis de la rédaction d'un manuscrit de thèse. Je tiens enfin à remercier les différentes étudiantes de Master que j'ai eu la chance d'encadrer au cours des différents projets de cette thèse : Laurane Michel, Blanca Rodriguez-Noguer et Valentine Le Berruyer. Un grand merci pour votre excellent travail et je vous souhaite le meilleur pour la suite de vos carrières !

Je voudrais également remercier la plateforme PSO pour leur travail, leur bonne humeur et leur rigueur : Patrick Wagner, Camille Van Wesemael et Jacques Bricard. Merci beaucoup pour le travail impressionnant que vous réalisez (en général) au début des projets pour leur permettre de voir le jour. Je remercie également Clothilde Le Guen, « locataire » de cette plateforme, pour son travail sur des projets proches de cette thèse.

Impossible d'oublier dans ces remerciements toute l'équipe de la plateforme Cyrce pour leur accueil, leur bonne humeur, leur temps et pour nous avoir approvisionnés en fluor-18 : Nathalie Dick, Jacky Schuler, Michel Pellicoli. Merci également au service de radioprotection et plus particulièrement à Thierry Foehrenbacher pour son temps et pour avoir accepté de me former aux notions de radioprotection. Je remercie aussi Estelle Santiago, Bruno Jessel et Lionel Thomas pour l'ensemble de leur travail en culture cellulaire et imagerie animale.

Enfin, je souhaite remercier tout particulièrement Patrice Marchand pour ses précieux conseils, sa disponibilité, ses encouragements et bien évidemment, sa bonne humeur sans faille. J'ai pu découvrir les joies de la radiochimie à tes côtés et malgré l'horaire (trop) matinal (pour moi) de ces journées, j'ai passé d'excellents moments à tes côtés au cours desquels j'ai pu apprendre énormément grâce à toi.

Je souhaite également remercier les différents collaborateurs biologistes qui ont accepté de participer aux différents projets de cette thèse en évaluant nos composés sur diverses cibles biologiques : Marcela Sabou (IPPTS, CHU Strasbourg), Elora

Aubert (LIT, UMR 7200), Monique Dontenwill (LBP, UMR 7021), Sophie Martin (LBP, UMR 7021), Chloé Bernhard (UMR 7021).

Merci également à toute l'équipe d'enseignement des TP intégrés (Line, Maria, Marcella, Ludivine, Sonia, Damien, Benoit, Bruno, Maxime, Chantal) pour m'avoir offert l'opportunité d'enseigner et pour votre bonne humeur pendant les (longues) séances.

Je voudrais également remercier tous mes amis pour leur soutien depuis de nombreuses années maintenant. Merci à toute la clique des narvalos de la cuvette : Sacha, Anthony, Victor, Nathalie, Violaine B., Lucille et Margot pour les bons moments passés ensemble depuis une quinzaine d'années et la joie inchangée de se retrouver à chaque fois. Un immense merci également à Aurélien, Nicolas P., Xavier et Violaine V. pour les parties de coinche en prépa et pour les nombreuses discussions et sessions de révision communes qui me permettent d'être là aujourd'hui. Merci aussi à Nico (PPSM for ever), Nathy, Céline, Emile et (encore) Aurélien pour tous les excellents moments passés ensemble à l'ENS, dans le RER B, à Orsay et même en dehors de tout ça ! Merci enfin au GKS, Charly, Fu, Darox, Jerem pour les moments de rire et de détente à distance chaque soir !

Un grand merci également à toute ma famille, notamment mes parents, frères et sœurs pour leur soutien et leurs conseils au cours de ces (longues) années d'études. Merci également pour l'accueil merveilleux à chaque retour dans les Alpes et pour le cat-sitting à chacune de nos vacances pour nous permettre de souffler un peu. J'en profite pour remercier également toute ma belle-famille pour leur bonne humeur et leur accueil tout aussi chaleureux. Tous nos passages à Grenoble ont vraiment été d'excellents moments grâce à vous tous.

Merci enfin à toi Arielle pour tout. Merci d'avoir accepté de me supporter au quotidien depuis de nombreuses années maintenant, merci pour ta bonne humeur, merci pour nos rires et merci pour ton soutien malgré un travail tout aussi épuisant et prenant. A ton tour maintenant !

*Ce manuscrit et ce travail est dédié à Guillaume.*

# Abréviations

$\Phi_F$	Rendement quantique de fluorescence
2CR	Réaction dicomposante
2CPR	Réaction de Povarov dicomposante
3CR	Réaction tricomposante
3CPR	Réaction de Povarov tricomposante
4Å MS ou 3Å MS	Tamis moléculaire de 3Å ou 4Å
[ <sup>18</sup> F]-FDG	[ <sup>18</sup> F]-fluorodésoxyglucose
[ <sup>18</sup> F]-FET	[ <sup>18</sup> F]-fluoroéthyl-L-tyrosine
2-PMPA	2-(Phosphonométhyl)pentanedioic acid
Ac	Acétyle
acac	Acétylacétone
ACN	Acétonitrile
Aib	Acide 2-aminoisobutyrique
AL	Acide de Lewis
A <sub>m</sub>	Activité molaire
APTS	Acide Para-Toluène Sulfonique
aq	Aqueous ou Aqueux
Ar	Aryle
Aza-DCP	Aza-dicétopipérazine
BAIB	Bis(acetoxy)iodobenzène
BEMP	2-tert-Butylimino-2-diéthylamino-1,3-diméthylperhydro-1,3,2-diazaphosphorine
BiPhePhos	6,6'-[(3,3'-Di- <i>tert</i> -butyl-5,5'-diméthoxy-1,1'-biphényl-2,2'-diyl)bis(oxy)]bis(dibenzo[d,f][1,3,2]dioxaphosphépine)
Bn	Benzyle
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyle
BSA	Bovine Serum Albumine
BTC	Bis(trichlorométhyl)carbonate
<i>n</i> -Bu	<i>n</i> -butyle
BV	Orbitale la plus basse vacante
C18	Colonne de chromatographie greffée par des chaînes octadécyles
Cat.	Catalyseur
Cbz	Carboxybenzyle
CCM	Chromatographie sur couche mince
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
Cp	Cyclopentadiényle
CSA	Acide camphosulfonique
CuAAC	Copper-catalysed azide/alkyne cycloaddition
DA	Diels-Alder
DA/p	Dose ajoutée par puit
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
dc	Corrigé de la décroissance radioactive
DCM	Dichlorométhane
DCP	Dicétopipérazine
DFT	Théorie de la fonctionnelle de la densité

DI/g	Dose injectée par gramme
DIAD	Diisopropyl azodicarboxylate
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropyl-éthylamine
DiO	3,3'-Diocetadecyloxacarboxyanine perchlorate
DMAP	Diméthylaminopyridine
DME	Diméthoxyéthane
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMSO- <i>d</i> 6	Diméthylsulfoxyde deutéré
dr	Ratio diastéréomérique
EDCI	1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]carbodiimide
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
ee	Excès énantiomérique
EOS	End of synthesis
equiv. ou eq.	Equivalent
ESI	Electrospray ionisation
Et	Ethyle
ET	Etat de transition
FDA	Food and Drug Administration
Fmoc	9-fluorénylméthoxycarbone
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
F <sub>sp3</sub>	Fraction sp <sup>3</sup>
H <sub>2</sub> O MQ	Eau ultrapure
HATU	Hexafluorophosphate de-N, N-diméthylméthaniminium
HBSS	Solution saline équilibrée de Hank
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthanel sulfonique
HO	Orbitale la plus haute occupée
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
HWE	Horner-Wadsworth-Emmons
IC <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice médiane
IEDDA	Inverse electron demand Diels-Alder
<i>i</i> Pr	Isopropyle
IRM	Imagerie à Résonance Magnétique Nucléaire
<i>i.v.</i>	Intraveineuse
j	jour
<i>J</i>	Constante de couplage (Hz)
K <sub>d</sub>	Constante de dissociation
K <sub>i</sub>	Constante d'inhibition
Kryptofix 2.2.2	4,7,13,16,21,24-Hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosane
LC	Liquid Chromatography
LDA	Diisopropylamidure de lithium
LNCaP	Lymph Node Carcinoma of the Prostate
Lys	Lysine
Majo	Majoritaire
Me	Méthyle
MeOH- <i>d</i> 4	Méthanol deutéré

mino	Minoritaire
Ms	Mésyle
MS	Mass Spectrometry
MW	Poids moléculaire
NaAsc	Ascorbate de sodium
NMM	<i>N</i> -méthylmorpholine
<i>nd</i>	Non déterminé
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
Np	<i>p</i> -nitrophényle
PBS	Phosphate Buffer Saline
Pd/C	Palladium sur charbon
PDE	Phosphodiesterase
Ph	Phényle
Phe	Phénylalanine
PMB	<i>p</i> -méthoxybenzyle
ppm	Partie Par Million
PPTS	Pyridinium <i>p</i> -toluenesulfonate
Pro	Proline
PSMA	Prostate Membrane Specific Antigen
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
Pyr	Pyridine
RBF	Round Bottom Flask
RCC	Conversion radiochimique
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
RCY	Rendement radiochimique
R <sub>f</sub>	Rapport frontal
RMN ou NMR	Résonance Magnétique Nucléaire ou Nuclear Magnetic Resonance
ROG	Rayon de giration
RSA	Relation Structure Activité
RX	Cristallographie aux rayons X
SBP	Bathophenanthrolinedisulfonic acid disodium salt hydrate
SOS	Start Of Synthesis
SPAAC	Strain-promoted azide/alkyne cycloaddition
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
SPSAC	Strain-promoted sydnone/alkyne cycloaddition
Su	Succinimide
t	Temps
t.a.	Température ambiante
TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
TBAI	Iodure de tétrabutylammonium
TBS	<i>tert</i> -butyldiméthylsilyle
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -butyle
TCF	Trichlorométhyl chloroformate
TDM	Tomodensitométrie
TEMP	Tomographie par émission monophotonique
TEMPO	(2,2,6,6-Tétramethylpipéridin-1-yl)oxyl
TEP	Tomographie à Emission de Positons
Tf	Triflyle
TFA	Acide trifluoroacétique

THF	Tétrahydrofurane
THQ	Tétrahydroquinoline
TIS	Triisopropylsilane
TLC	Thin Layer Chromatography
TM	Tamis moléculaire
t <sub>R</sub>	Temps de rétention
Trp	Tryptophane
Ts	Tosyle
Ts	Tétrazine
UV-vis	Ultraviolet-visible
v/v	Ratio volumique
w/w	Ratio massique

---

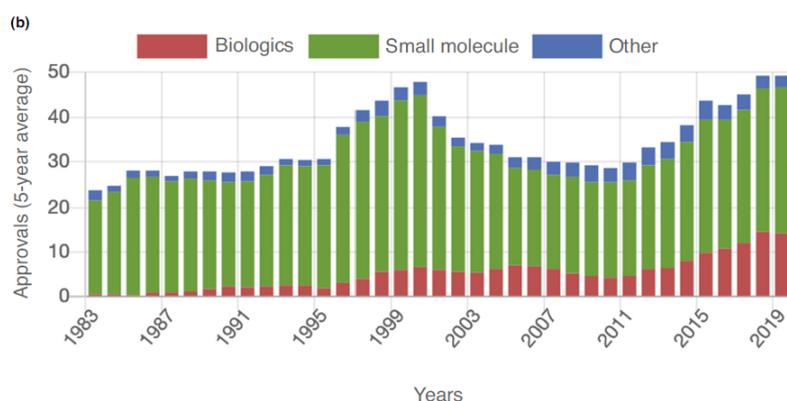
## **Introduction générale**

---

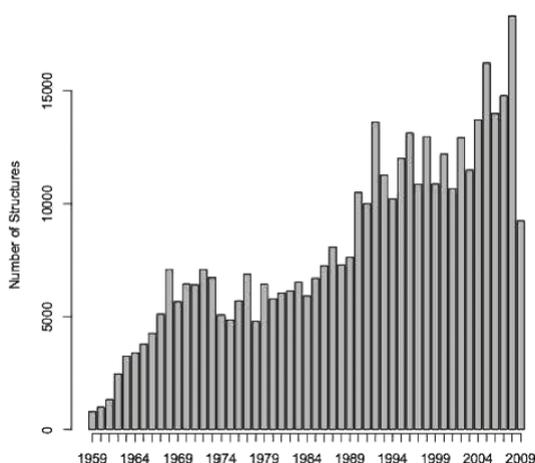


## Nouveaux médicaments et diversité moléculaire

Depuis les années 80, le nombre de nouvelles petites molécules acceptées annuellement par la FDA n'a subi que de légères variations<sup>1</sup> (Figure 1) malgré une forte augmentation du nombre de structures décrites chaque année<sup>2</sup> (Figure 2). Plusieurs hypothèses ont été soulevées pour expliquer ce phénomène, comme le durcissement des critères pour la mise sur le marché des petites molécules ou encore l'intérêt décroissant des grands groupes pharmaceutiques vis-à-vis de l'innovation.



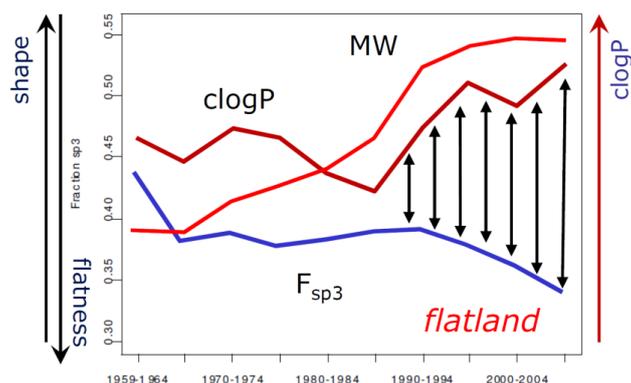
**Figure 1.** Evolution du nombre de nouvelles petites molécules acceptées par la FDA (moyenne glissante sur 5 ans)



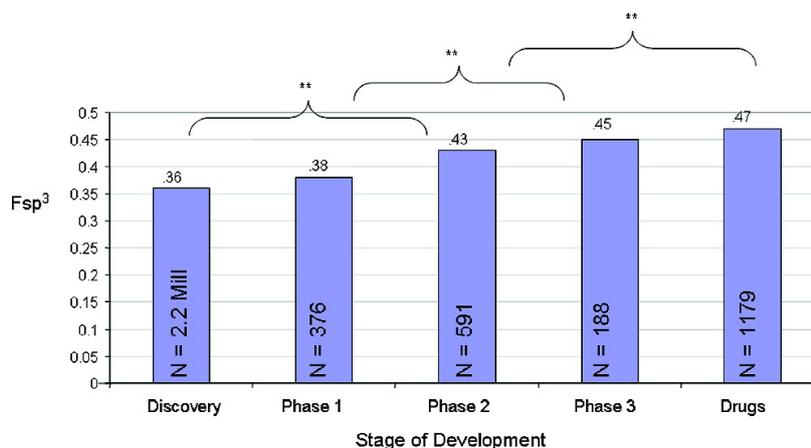
**Figure 2.** Evolution du nombre de structures décrites dans le « Journal of Medicinal Chemistry » entre 1959 et mi-2009

Cette tendance pourrait également s'expliquer par le caractère non « drug-like » des différentes molécules décrites en chimie médicinale ces dernières décennies.<sup>2</sup> En effet à partir des années 90, une hausse significative du poids moléculaire (MW) et de

l'hydrophobie (cLogP) des molécules décrites a pu être observée (Figure 3). Ces deux critères ont également été accompagnés d'une diminution de la fraction de carbones hybridés  $sp^3$  ( $F_{sp^3}$ ) au sein de ces molécules, menant ainsi à des structures plus planes et hydrophobes. A cause de ces propriétés, il a été montré que de telles molécules possédaient de plus faibles chances de passer les différentes phases des essais cliniques (Figure 4).<sup>3</sup>



**Figure 3.** Evolutions de certaines propriétés moléculaires depuis 1959



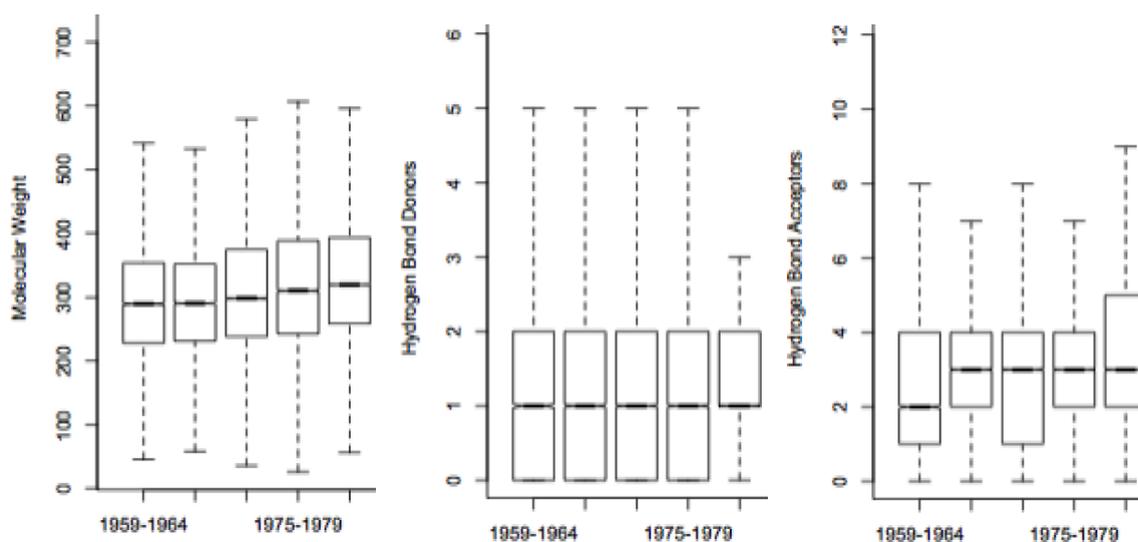
**Figure 4.** Valeurs moyennes de  $F_{sp^3}$  au cours des différentes phases cliniques

L'évolution de ces trois propriétés (MW, cLogP,  $F_{sp^3}$ ) peut être en partie expliquée par l'essor des réactions de couplages métallo-catalysés (Kumada-Corriu-Tamao, Suzuki-Miyaura...) qui ont grandement facilité l'introduction de squelettes aromatiques plans au sein de molécules complexes. Cette corrélation entre la découverte de nouvelles réactions et l'évolution globale des propriétés des molécules décrites en chimie médicinale illustre parfaitement l'impact que peut avoir le développement de nouvelles méthodologies de synthèse sur les propriétés des candidat-médicaments de demain.

Cependant il est pertinent de s'interroger sur ce qui définit le caractère « druglike » d'une molécule. Une première définition fut donnée par Lipinski *et al.*<sup>4</sup> en 1997 en sélectionnant différents critères régissant les propriétés et structures des candidats médicaments à administration orale :

- Poids moléculaire inférieur à 500 g.mol<sup>-1</sup>
- LogP inférieur à 5
- Moins de 5 atomes donneurs de liaison hydrogène
- Moins de 10 atomes accepteurs de liaison hydrogène

Bien qu'une corrélation entre ces différentes règles et la probabilité pour une molécule bioactive d'atteindre le marché puisse réellement exister, il est possible qu'un ou plusieurs facteurs de confusion aient pu biaiser les conclusions de l'époque. Un d'entre eux semble pouvoir fournir une explication plausible : la nature des chimiothèques. Les règles ont en effet été définies à l'époque par Lipinski *et al.* à l'aide de données empiriques extraites des différentes molécules nommées par la « United States Adopted Names » (USAN). Ces molécules représentent ainsi un sous-ensemble des molécules décrites en chimie médicinale lors des décennies précédentes. Or si l'on s'intéresse à certaines propriétés des structures décrites dans le *Journal of Medicinal Chemistry* entre 1959 et 1985, il apparaît clairement que l'immense majorité de ces molécules rentraient déjà dans le cadre des règles de Lipinski (Figure 5).



**Figure 5.** Propriétés moléculaires au sein de chimiothèques entre 1959 et 1985

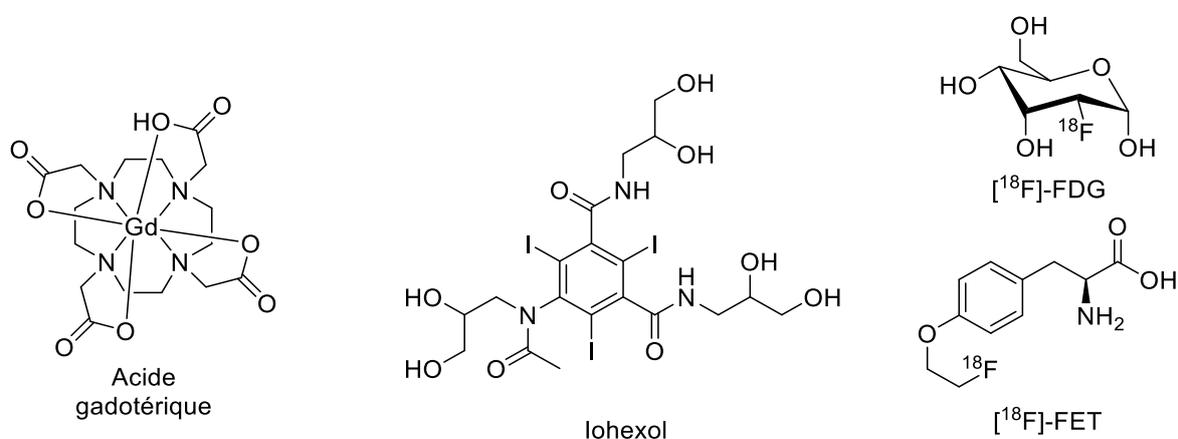
Ainsi, de nombreuses études effectuées à l'aide de base de données plus diversifiées ont montré la possibilité de dépasser ses règles tout en conservant une solubilité aqueuse et une perméabilité suffisante.<sup>5</sup> Ces règles sont ainsi davantage remises en question aujourd'hui et nombreux sont ceux à les considérer trop simplistes.<sup>6</sup> L'obtention de chimiothèques hautement diversifiées est donc primordiale pour permettre une meilleure compréhension du concept de « druglikeness ». Plusieurs solutions peuvent permettre d'atteindre cet objectif. D'une part, l'emploi de réactions multicomposantes permet l'accès rapide à un très grand nombre de composés divers à partir de réactifs simples. Ces réactions représentent donc une méthode de choix pour augmenter la diversité moléculaire au sein de l'espace chimique.<sup>7</sup> D'autre part, l'utilisation de la chémoinformatique permet d'obtenir une représentation visuelle de la diversité au sein de nos chimiothèques actuelles. Cette technique conduit donc à la mise en lumière des zones les moins exemplifiées de l'espace chimique pouvant être atteintes ensuite par synthèse ciblée.

Le développement de méthodes de synthèse permettant l'accès rapide à différentes familles de molécules hautement diversifiées, non planaires et facilement modulables représente ainsi un axe primordial de la recherche en chimie médicinale. Les molécules ainsi synthétisées pourront donc devenir de futurs candidat-médicaments et/ou aider à définir les principales propriétés requises pour obtenir une molécule « drug-like ».

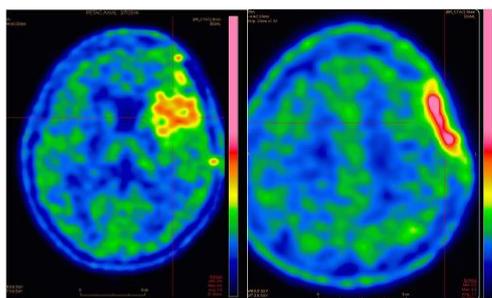
### *Outils diagnostiques d'imagerie*

Le développement de nouveaux outils d'imagerie a également participé à différents niveaux au développement et au perfectionnement de nouvelles options thérapeutiques. D'un point de vue clinique, l'imagerie représente tout d'abord une méthode de choix dans le diagnostic de pathologies complexes. Depuis la découverte des rayons X par Wilhelm Röntgen en 1895, l'imagerie médicale n'a cessé de se diversifier pour offrir aujourd'hui un panel large et complémentaire de méthodes d'imagerie aux cliniciens : imagerie par résonance magnétique (IRM), radiographie, tomographies... Plusieurs agents de contraste comme les complexes de gadolinium(III) pour l'IRM ou les agents iodés pour la tomodensitométrie (TDM) ont été développées au cours des dernières décennies afin de perfectionner ces différentes

techniques d'imagerie en augmentant notamment leur sensibilité (Figure 6). L'intérêt des chimistes pour de telles applications a également accompagné l'émergence de nouvelles méthodes d'imagerie comme la tomographie à émission de positons (TEP) via le développement de traceurs radioactifs comme le [ $^{18}\text{F}$ ]-fluorodésoxyglucose ([ $^{18}\text{F}$ ]-FDG) et le [ $^{18}\text{F}$ ]-fluoroéthyl-L-tyrosine ([ $^{18}\text{F}$ ]-FET), utilisées en oncologie notamment. Cependant, de par leur sélectivité pour les cellules hypermétaboliques, ces radiotraceurs ne permettent pas de distinguer efficacement entre des zones d'inflammation et du tissu tumoral par exemple. Ce phénomène limite notamment le diagnostic de récurrences tumorales après ablation chirurgicale de la tumeur d'origine (Figure 7).<sup>8</sup>



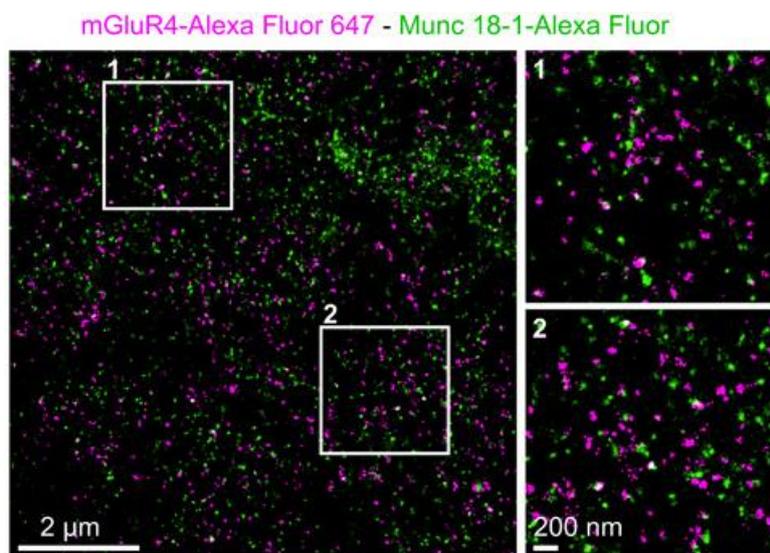
**Figure 6.** Structures de l'acide gadotérique (IRM), de l'iohexol (TDM) et du radiotracteur [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG et [ $^{18}\text{F}$ ]-FET (TEP)



**Figure 7.** Scanners TEP du lobe frontal gauche (gauche) et du lambeau chirurgical (droite) d'un patient récemment opéré pour un gliome (3 semaines)

En amont de l'application clinique, le développement d'outils d'imagerie a tout d'abord permis une exploration fondamentale du vivant. L'utilisation de la fluorescence et de la microscopie haute résolution<sup>9</sup> ont notamment permis de s'affranchir de la limite de résolution de la microscopie classique ( $\sim 0.2 \mu\text{m}$ ) et ont ainsi pu conduire à l'étude

d'objets biologiques de tailles nanométriques. Ces techniques ont par exemple permis à l'équipe de Sauer et Calebiro en 2020 d'obtenir une meilleure compréhension de l'organisation à l'échelle nanométrique de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) dans la zone présynaptique (Figure 8).<sup>10</sup>



**Figure 8.** Image obtenue par microscopie haute résolution des récepteurs mGluR4 et Munc 18-1 au sein de synapses de souris

Le développement de ligands sélectifs et de méthodes de marquage efficaces représentent ainsi des pistes activement étudiées pour perfectionner les techniques d'imageries employées cliniquement. D'autre part, ces recherches peuvent également conduire à une meilleure compréhension fondamentale du vivant pour mener par la suite à de nouvelles stratégies thérapeutiques ou de diagnostics.

### Présentation et objectifs de la thèse

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe de Synthèse Organique Métallo-induite et Hétérochimie (SOMHet) dirigée par Mihaela Gulea et l'équipe Chimie-Biologie Intégrative et Pharmacognosie (CBIP) dirigée par Dominique Bonnet. L'équipe SOMHet s'intéresse pour sa part au développement de méthodologies innovantes pour la synthèse de composés originaux, en particulier des hétérocycles azotés, oxygénés et soufrés, permettant d'enrichir la diversité moléculaire au sein des chimiothèques. L'équipe CBIP se préoccupe également de la synthèse et de la diversification structurale d'hétérocycles non privilégiés dans le but

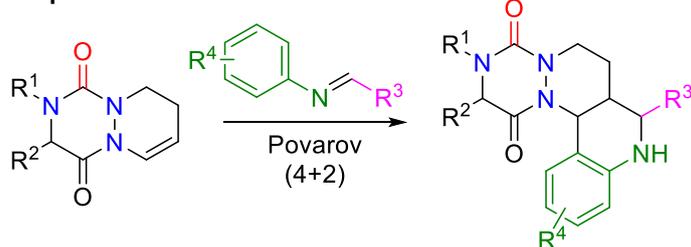
d'élargir l'espace chimique connu. Cette équipe s'attèle aussi au développement de nouveaux outils chémobiologiques permettant d'accéder à une meilleure compréhension du vivant.

Les travaux de cette thèse ont ainsi concerné le développement et l'application de nouvelles méthodologies de synthèse pour la diversité moléculaire et la chémobiologie. Le manuscrit est divisé en deux parties distinctes (Figure 9) :

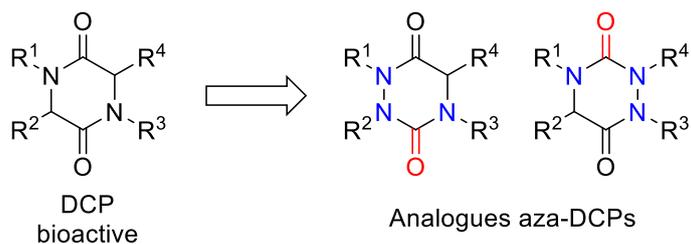
- La **PARTIE I** a été consacrée à la diversification structurale des aza-dicétopipérazines (aza-DCPs), une famille d'hétérocycles étudiée au laboratoire. Plusieurs synthèses et modifications de ce squelette hétérocyclique ont été décrites dans la littérature et seront présentées dans le **Chapitre 1** bibliographique. Dans le **Chapitre 2** seront décrits les résultats que nous avons obtenus dans la diversification structurale des aza-DCPs en utilisant une réaction d'hétéro-cycloaddition, la réaction de Povarov, et qui nous ont permis de synthétiser des nouveaux dérivés tétracycliques. En parallèle de ces travaux, les voies d'accès à des aza-DCPs analogues de trois dicétopipérazines (DCPs) bioactives sélectionnées ont également été étudiées et seront détaillées dans le **Chapitre 3**.
- La **PARTIE II** de ce manuscrit s'est concentrée sur le développement d'une réaction de thia-Diels-Alder non catalysée comme nouvelle réaction de « click » pour la fonctionnalisation de peptides bioactifs par différents outils d'imagerie. Une étude bibliographique (**Chapitre 4**) dresse d'abord l'état de l'art sur les principaux types de cycloaddition sans utilisation de catalyseurs métalliques employés en particulier pour le marquage de peptides par le fluor-18 ou par des fluorophores, puis sur la réaction de thia-Diels-Alder et ses utilisations récentes en chimie click. Ensuite, nos travaux de développement de cette réaction pour le marquage peptidique et les exemples d'application en imagerie seront discutés dans le **Chapitre 5**. Enfin, l'utilisation de cette même réaction de thia-Diels-Alder au sein d'une stratégie « double-click » a également été étudiée (**Chapitre 6**) et a montré des résultats prometteurs.

## Partie I : Diversification structurale des aza-DCPs

### Chapitre 2

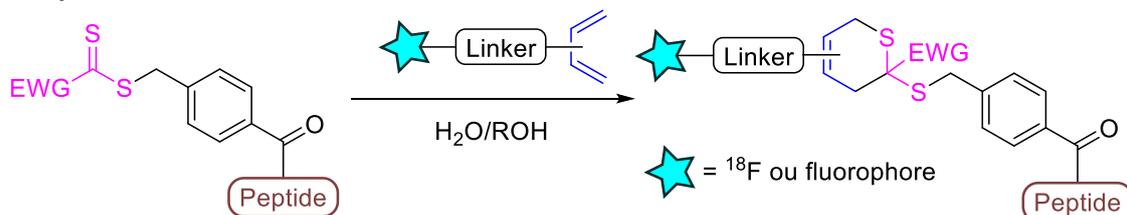


### Chapitre 3



## Partie II : Marquage de peptides d'intérêt thérapeutique

### Chapitre 5



### Chapitre 6

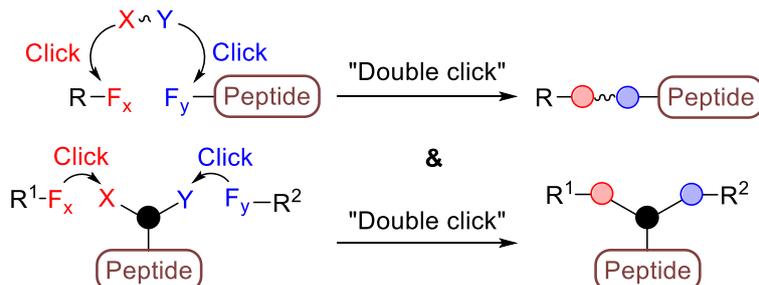


Figure 9. Présentation de l'organisation du mémoire de thèse

---

**PARTIE I.**  
**DIVERSIFICATION STRUCTURALE DES AZA-DCPs**

---

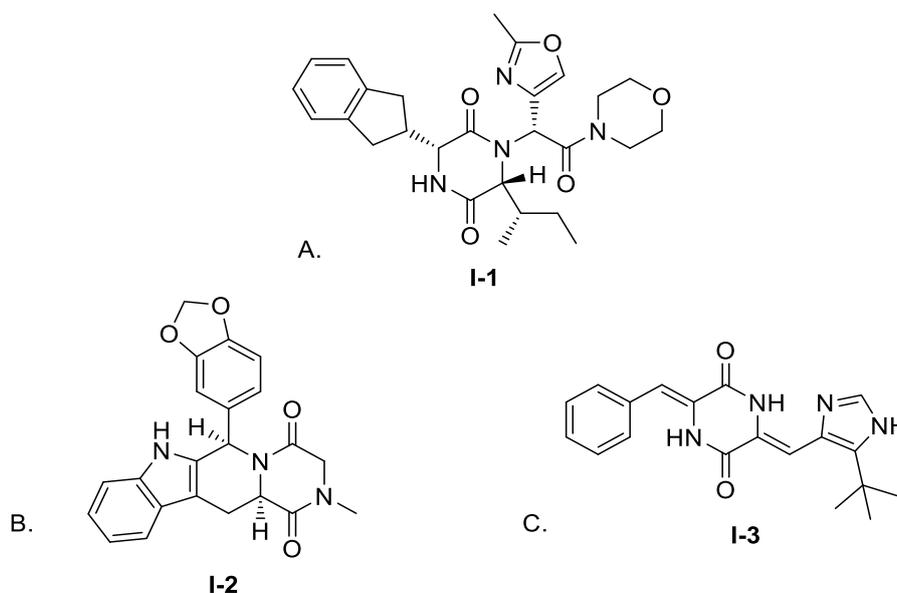


# CHAPITRE 1.

## BIBLIOGRAPHIE DES AZA-DCPs : SYNTHÈSE, VARIATIONS STRUCTURALES ET PROPRIÉTÉS

### 1. Introduction générale sur les aza-DCPs

Une majorité de molécules autorisées par la *Food and Drug Administration* (FDA), contient un hétérocycle au sein de leur structure.<sup>11-13</sup> Parmi les différents types d'hétérocycles, les 2,5-dicétopipérazines (DCPs) représentent des cibles privilégiées en chimie médicinale,<sup>14-18</sup> mais aussi en synthèse organique.<sup>16-19</sup> Provenant de la condensation de deux acides aminés, les DCPs constituent les plus petits représentants de la famille des peptides cycliques avec des propriétés distinctes des peptides linéaires classiques.<sup>20</sup> Les DCPs sont ainsi largement représentées au sein des molécules bioactives naturelles extraites de plantes, champignons, bactéries ou mammifères.<sup>21,22</sup> De nombreuses activités ont été associées à des DCPs sur diverses cibles comme les récepteurs GABAergiques,<sup>23</sup> sérotoninergiques 5HT<sub>1A</sub>,<sup>24</sup> ou de l'ocytocine avec le retosiban **I-1** (Figure 10A),<sup>25-27</sup> ou encore sur des enzymes comme PDE5 avec le Tadalafil **I-2**, seule DCP approuvée par la FDA (Figure 10B). Enfin, la plinabuline **I-3** a présenté de nombreuses propriétés intéressantes en tant que molécule anti-cancéreuse (Figure 10C).

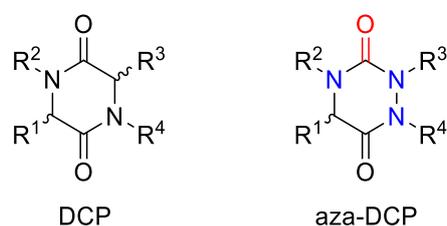


**Figure 10.** Exemples de composés bioactifs contenant un motif DCP.

A. Rétosiban **I-1**, antagoniste du récepteur de l'ocytocine ; B. Tadalafil<sup>®</sup> **I-2**, inhibiteur de PDE-5 ; C. Plinabulin **I-3**, inhibiteur de la polymérisation de la tubuline

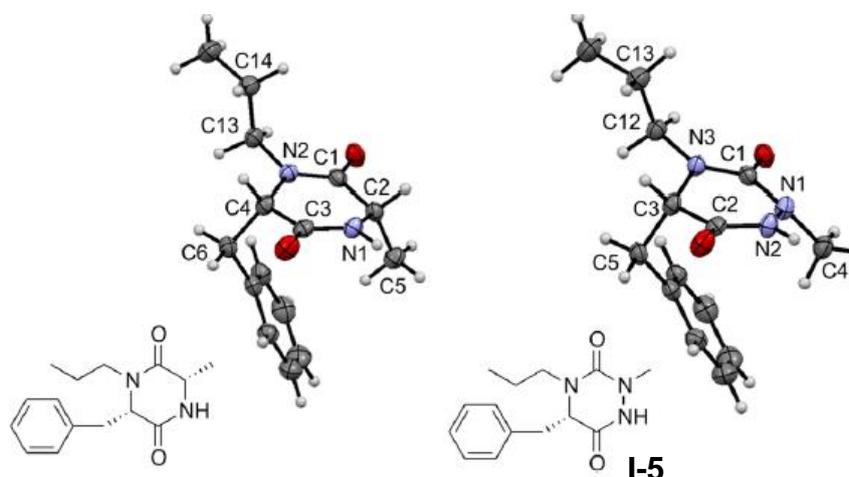
Ce châssis offre également 4 points de diversification notamment par l'utilisation d'acides aminés naturels, avec des substituants pouvant être orientés dans différentes directions de l'espace. Les DCPs représentent ainsi un exemple parfait de plateforme privilégiée avec des propriétés attractives, ainsi que des activités biologiques intéressantes sur de nombreuses cibles thérapeutiques.<sup>28,29</sup> Cependant, le concept de plateforme privilégiée possède certaines limites intrinsèques à l'utilisation de châssis surreprésentés, liées à la brevetabilité ou à leur potentiel de diversification moléculaire. Les chimistes de synthèse se sont alors orientés vers des structures non privilégiées peu ou pas représentées dans la littérature, compatibles avec la découverte de nouveaux candidats médicaments et permettant de pallier les inconvénients mentionnés plus haut. En effet, de nombreux hétérocycles sont encore à synthétiser comme l'a démontré l'équipe de Pitt à Celltech<sup>30</sup> : sur les 25 000 structures hétérocycliques synthétiquement accessibles, seules 1 700 ont été synthétisées avec seulement 5 à 10 systèmes originaux publiés chaque année. En se basant sur ces considérations, avec comme hypothèse de travail de pouvoir conserver ou améliorer les propriétés attractives des DCPs en travaillant sur des analogues peu décrits de ces dernières, notre laboratoire, en collaboration avec A. Ganesan (University of East Anglia), s'est intéressé aux 1,2,4-triazine-3,6-diones ou aza-dicétopipérazines (aza-

DCPs). Ces composés ont été obtenus par « scaffold hopping » via le remplacement d'un carbone  $sp^3$  de l'hétérocycle par un azote  $sp^2/sp^3$  (Figure 11).



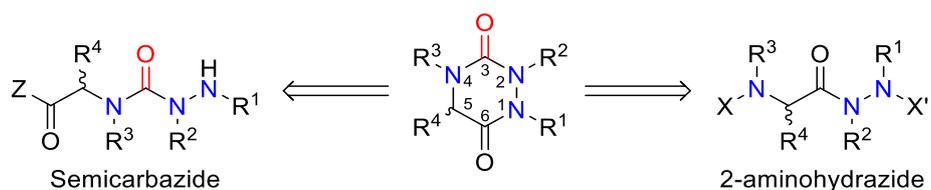
**Figure 11.** Structures générales des DCPs et aza-DCPs.

Une telle modification a déjà été effectuée auparavant au sein de polypeptides et a mis en évidence un aplatissement des substituants portés par l'azote.<sup>31,32</sup> Cette différence d'organisation structurale a également été observée au laboratoire sur l'exemple de la DCP **I-4** et de son équivalent aza-DCP **I-5** par cristallographie aux rayons X avec le même aplatissement de la structure autour du nouvel atome d'azote (Figure 12).<sup>33</sup> De plus, des expériences RMN réalisées dans le  $CDCl_3$  et le  $DMSO-d_6$  et à différentes températures ont montré une faible influence de ces paramètres sur les déplacements chimiques des protons attestant de la rigidité de ce nouveau châssis en solution. Ce nouvel hétérocycle possède donc des propriétés « drug-like » similaires aux DCPs (faible poids moléculaire, 4 points de diversité, respect des règles de Lipinski<sup>34</sup>...) tout en offrant une orientation légèrement différente de ces substituants dans l'espace.



**Figure 12.** Cristallographie aux rayons X d'une 2,5-DCP et de son équivalent aza-DCP

L'examen de la littérature nous a montré qu'en 2019, seulement 450 molécules comprenant un squelette aza-DCP étaient répertoriées dans la base de données de SciFinder® contre 100 000 DCPs, ce qui fait toujours des aza-DCPs un châssis non privilégié. Aucune revue concernant cette famille de composés n'a été publiée, ainsi, dans le cadre de cette thèse, nous avons réuni et analysé l'ensemble des publications portant sur la synthèse et les propriétés des aza-DCPs. Nous avons d'abord classifié les différentes stratégies de synthèse selon les deux types de précurseurs impliqués dans la cyclisation intramoléculaire conduisant à la triazine : le semicarbazide ou la 2-aminohydrazone (Schéma 1). Nous avons ensuite classé les différentes méthodes en fonction du mode d'introduction des différents substituants sur les quatre positions de l'hétérocycle ou de la post-fonctionnalisation. Enfin, une dernière partie a été dédiée aux propriétés physico-chimiques et biologiques des aza-DCPs.

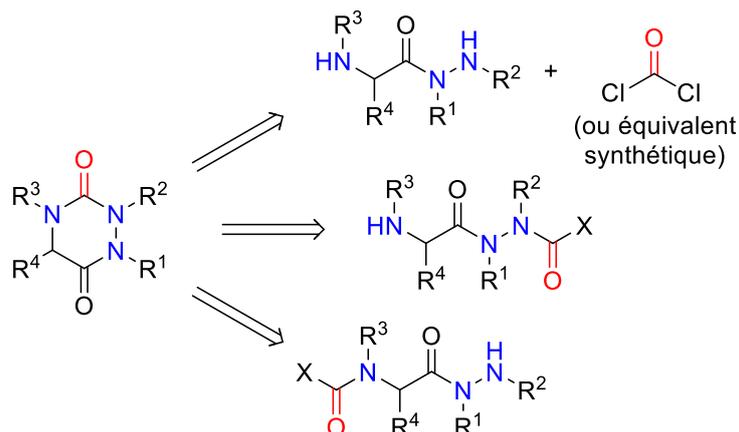


**Schéma 1.** Stratégies de synthèse d'aza-DCPs

## 2. Stratégies de synthèse des aza-DCPs

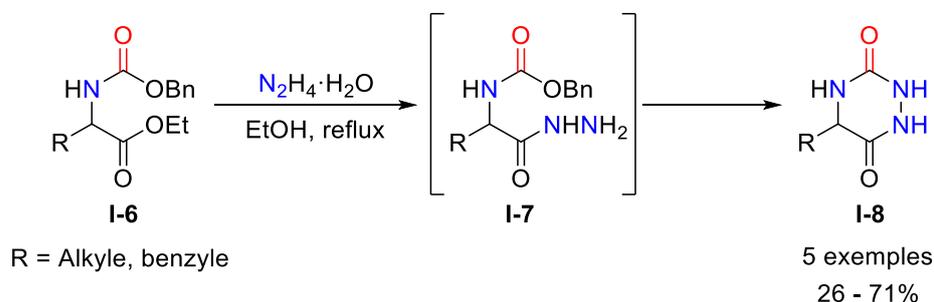
### 2.1. Via la cyclisation intramoléculaire d'une 2-aminohydrazone

Une première stratégie consiste en l'utilisation comme substrat d'un dérivé de 2-aminohydrazone et l'introduction ou la génération d'une fonction appropriée (carbamate, carbazate, ou isocyanate) permettant via une cyclisation intramoléculaire de former le motif urée présent dans la structure d'une aza-DCP (Schéma 2).



**Schéma 2.** Formation d'aza-DCPs par cyclisation d'une 2-aminoacétohydrazine

La première stratégie de synthèse d'aza-dicétopipérazines (aza-DCPs) a été publiée par Schlögl et Korger en 1951.<sup>35</sup> Cette synthèse a été effectuée en deux étapes à partir d'un précurseur dicarboxylé dérivé d'acide aminé **I-6** (racémique ou énantiopur). Ce dernier a été traité par de l'hydrazine monohydratée pour obtenir le dérivé du 2-aminoacétohydrazide intermédiaire non-isolé **I-7**, qui a cyclisé sur le carbamate de benzyle par addition/élimination, pour donner le motif triazine désiré **I-8**, avec des rendements de 26 à 71% (Schéma 3). Les auteurs ont cependant observé sur deux dérivés d'acides aminés énantiopurs (*L*-leucine et *L*-tyrosine), une perte totale d'activité optique sur l'aza-dicétopipérazine finale **I-8** obtenue. Il a été supposé que cette racémisation complète était due à l'action de l'hydrazine à chaud pendant plusieurs heures.



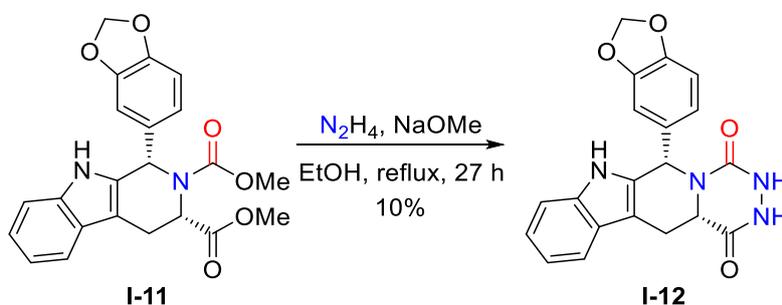
**Schéma 3.** Première synthèse d'aza-DCPs

Une approche similaire a été employée par Winterfield et Nair sur une pipéridine 1,2-dicarboxylée racémique **I-9** traitée avec de l'hydrazine anhydre et de l'éthanolate de sodium pour obtenir le premier exemple d'aza-DCP bicyclique **I-10** avec un rendement de 65% (Schéma 4).<sup>36</sup>



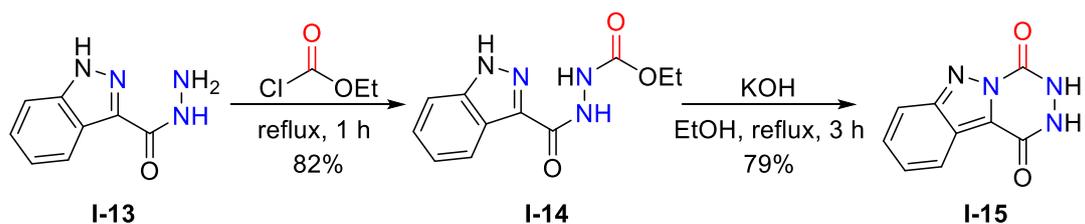
**Schéma 4.** Premier exemple d'aza-DCP bicyclique

Cette même méthode a également été utilisée dans un brevet publié en 2002 concernant la synthèse de dérivés du Tadalafil comme inhibiteurs de phosphodiesterase 5 (PDE5).<sup>37</sup> Ainsi, à partir du précurseur dicarboxylé énantiopur **I-11** et d'hydrazine, l'aza-DCP **I-12** a été synthétisée en tant qu'analogue du Tadalafil avec un rendement faible de 10% (Schéma 5).



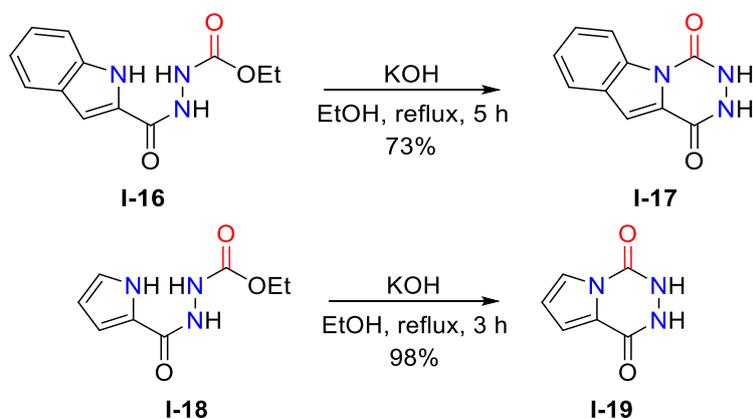
**Schéma 5.** Synthèse d'une aza-DCP analogue du Tadalafil

Cette stratégie a également été décrite par l'équipe de Robba<sup>38-40</sup> afin d'accéder à des aza-DCPs fusionnées à divers hétérocycles azotés. Le dérivé de triazino-1,2,4-[4,5-b]indazole **I-15** a été d'abord synthétisé à partir de l'hydrazide de carboxy-3-indazole **I-13** qui a conduit par réaction avec le chloroformate au précurseur acyclique **I-14** (Schéma 6).<sup>38</sup> Cet dernier a pu ensuite cycliser en présence de KOH pour obtenir l'aza-DCP correspondante avec un rendement de 79%. Dans le composé final, le motif hétérocyclique 1*H*-indazole est remplacé par le motif 2*H*-indazole, *a priori* moins stable de quelques kcal.mol<sup>-1</sup>.<sup>41</sup>



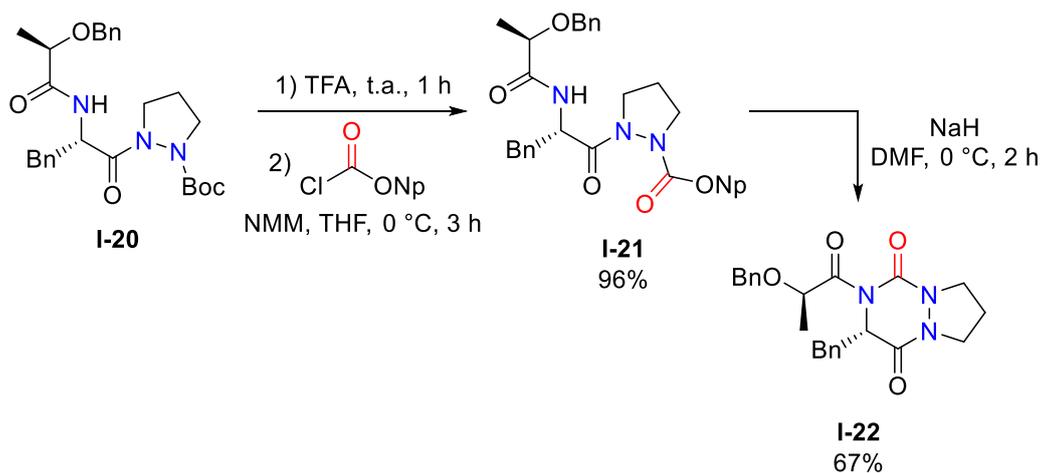
**Schéma 6.** Synthèse de triazino-1,2,4-[4,5-b]indazole à partir d'une 2-aminoacétohydrazine

Les mêmes auteurs ont ensuite étendu cette stratégie à la synthèse d'autres aza-DCPs fusionnées cette fois-ci à des indoles<sup>39</sup> I-17 ou des pyrroles<sup>40</sup> I-19 (Schéma 7).



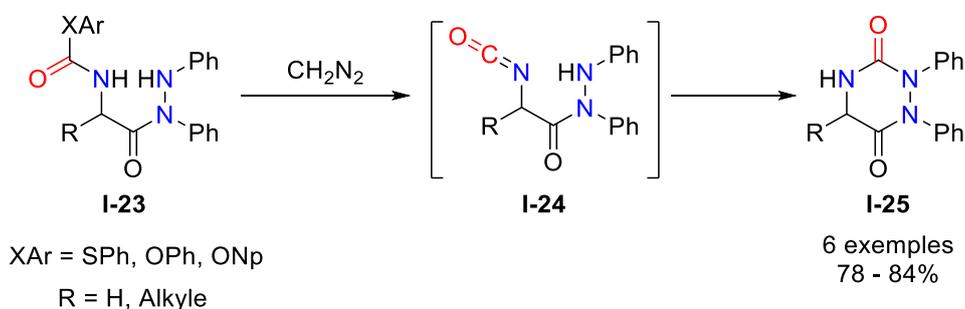
**Schéma 7.** Exemples de synthèses de d'aza-DCPs fusionnées à divers N-hétérocycles

Pinnen *et al.*<sup>42</sup> ont utilisé le précurseur monocyclique I-20 dont le groupement protecteur Boc a été remplacé par un *p*-nitrophénoxy-carbonyl, par traitement au TFA suivi de la réaction avec le chloroformiate d'aryle correspondant. La fonction amide du composé I-21 obtenu ainsi a été ensuite déprotonée par NaH pour conduire après cyclisation sur le carbazate activé, à l'aza-DCP bicyclique I-22 dérivée d'acide lactique (Schéma 8).



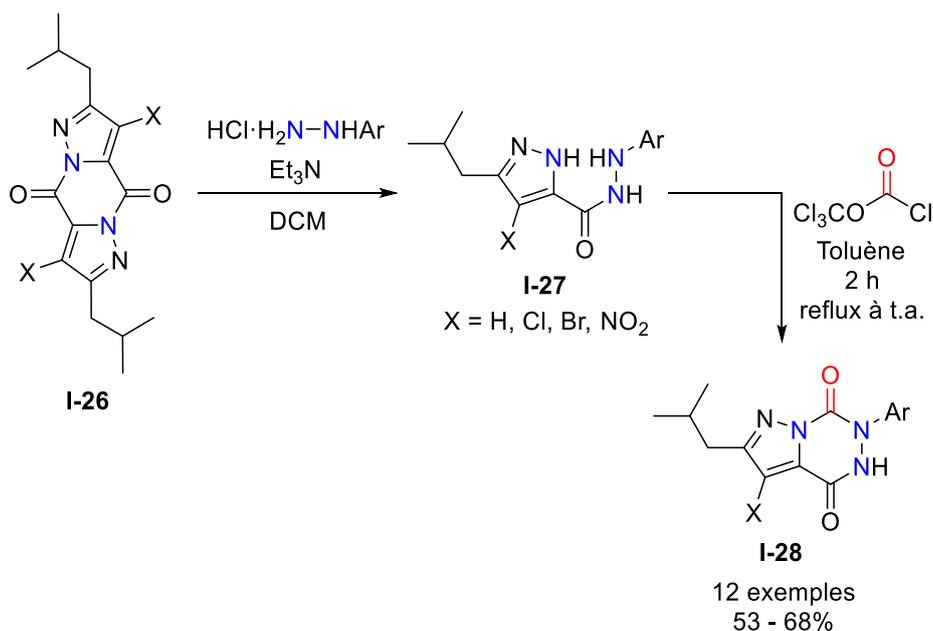
**Schéma 8.** Synthèse d'une aza-DCP acylée par cyclisation d'un amide sur un carbamate activé

A partir du dérivé carbamate **I-23** d'un 2-aminoacétohydrazine, Baudet *et al.* ont généré l'isocyanate **I-24** *in situ* par action du diazométhane sur un carbamate activé, dérivé du phénol, du 4-nitrophénol, ou du thiophénol (Schéma 9).<sup>43</sup> Une fois l'intermédiaire isocyanate formé, la cyclisation intramoléculaire a pu avoir lieu par attaque de l'azote nucléophile de l'hydrazine sur le carbonyle, pour obtenir les aza-DCPs **I-25** avec des rendements compris entre 78 et 84%.



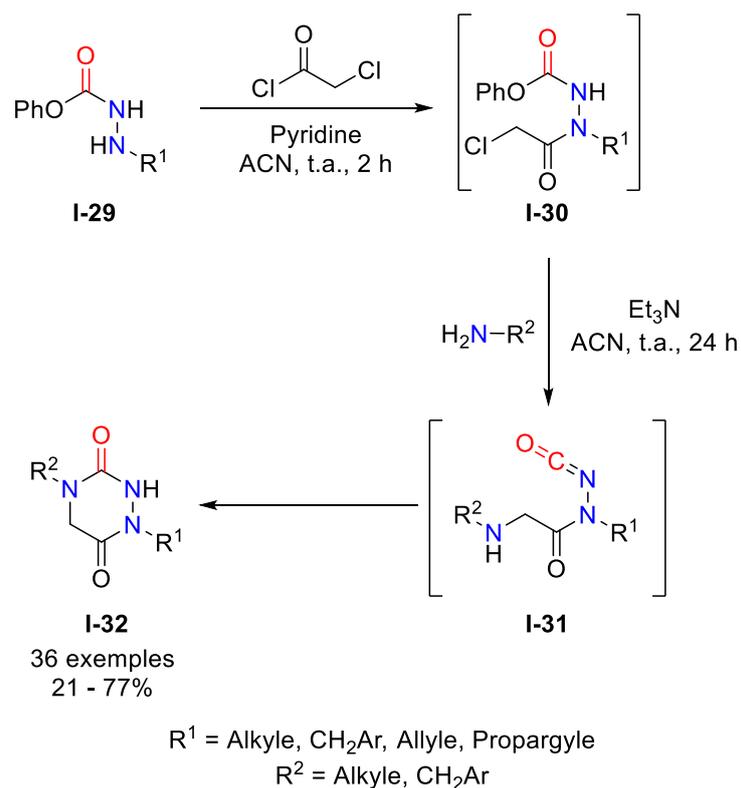
**Schéma 9.** Cyclisation via un isocyanate masqué pour la synthèse d'aza-DCP

Cette stratégie a été également réalisée en une seule étape à partir d'une 2-aminoacétohydrazine, par action du phosgène ou de ses équivalents synthétiques. Baraldi *et al.* ont été les premiers à utiliser le diphosgène pour la synthèse d'aza-DCPs. Ceci a permis une cyclisation rapide à partir du précurseur **I-27** via une double attaque des azotes nucléophiles pour obtenir une série de pyrazolo[1,5-d]-1,2,4-triazines **I-28** avec des bons rendements de 53 à 68% (Schéma 10).<sup>44</sup>



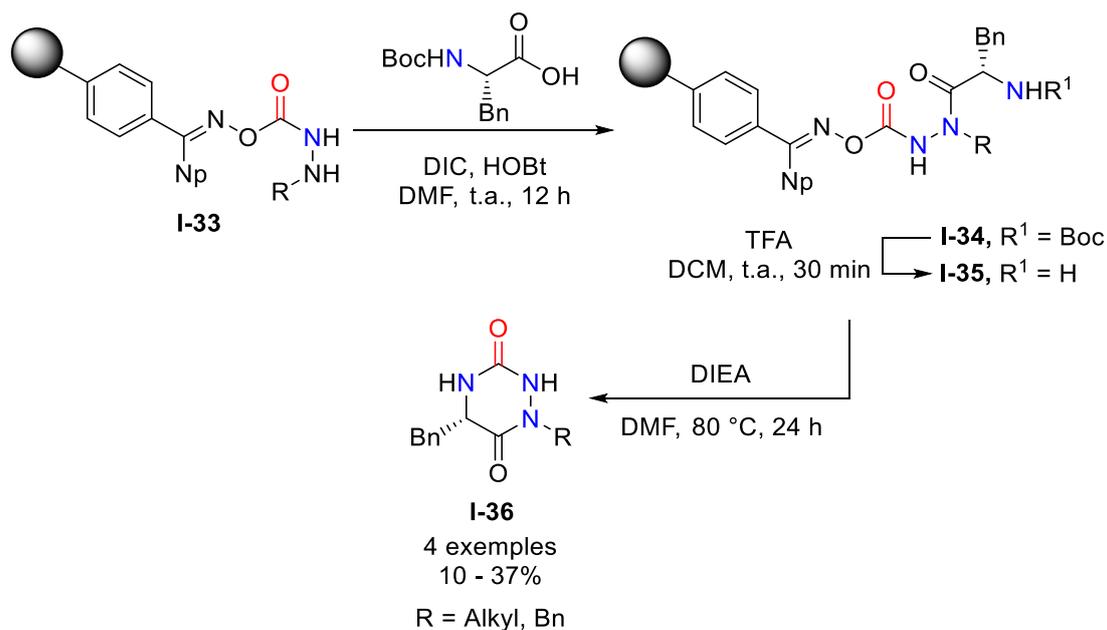
**Schéma 10.** Synthèse d'aza-DCPs à partir du disphosgène

Enfin, la méthode publiée par Beauchemin *et al.* en 2015 a montré la possibilité de synthétiser toute une série d'aza-DCPs di-substituées via une transformation one-pot dans laquelle le précurseur **I-30** n'est pas isolé (Schéma 11).<sup>45</sup> Le carbazate dérivé du phénol **I-29** a été d'abord acylé par le chlorure de chloroacétyle en présence de pyridine qui ne peut pas provoquer la formation d'isocyanate. Puis, ont été ajoutées au milieu réactionnel l'amine primaire appropriée et la triéthylamine, cette dernière permettant cette fois la formation de l'isocyanate **I-31** et la cyclisation intramoléculaire par l'attaque de l'amine, pour conduire aux aza-DCPs **I-32** avec des rendements globaux allant de 21 à 77%. Il peut être noté que cette méthode a également été appliquée sur des dérivés possédant des fonctions nucléophiles portées par l'hydrazine ou l'amine (alcool, phénol, aniline, pyridine, thiophène, indole...) avec des rendements compris entre 33 et 73%.



**Schéma 11.** Synthèse d'aza-DCP en une étape formelle par Beauchemin et al.

Cette stratégie a également été transférée en phase solide par le groupe de Scialdone en 1999.<sup>46</sup> Après avoir attaché l'hydrazine désirée sur une résine Phoxime<sup>®</sup>, un couplage peptidique a été réalisé en présence de DIC et d'HOBt afin de rajouter la phénylalanine et obtenir la 2-aminoacétohydrazine précurseur **I-34**. Après déprotection de l'amine primaire en présence de TFA, un traitement par la DIEA a permis le décrochage des aza-DCPs **I-36** d'intérêt avec de faibles rendements entre 10 et 37% (Schéma 12).



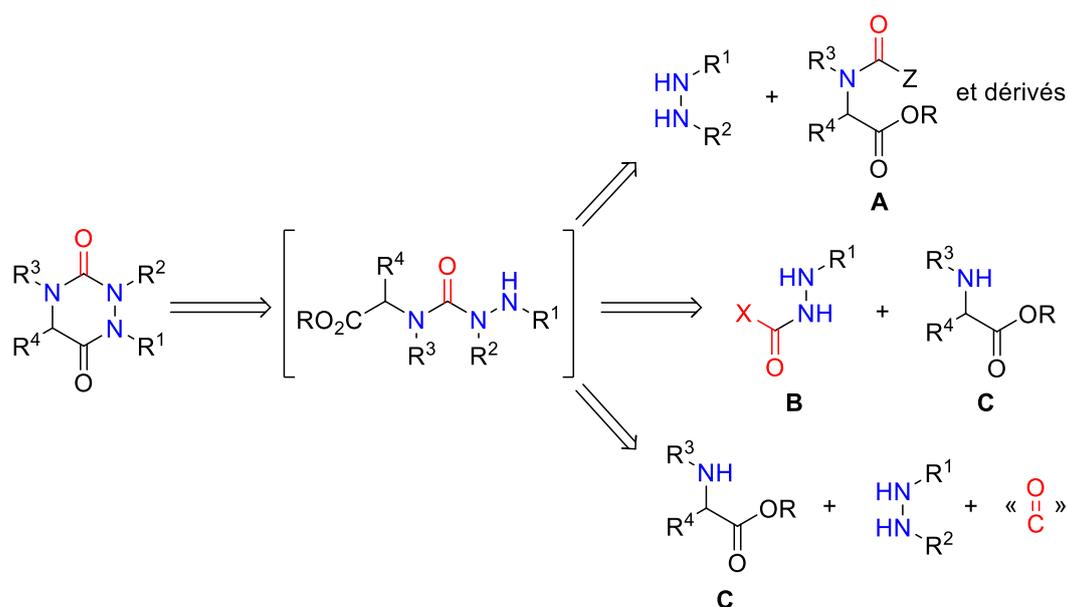
**Schéma 12.** Premiers exemples de synthèse d'aza-DCPs sur résine Phoxime®

## 2.2. Via la cyclisation intramoléculaire d'un semicarbazide

Cette première stratégie s'appuie sur l'emploi d'un précurseur semicarbazide (isolé ou non) qui peut être formé par une des trois voies suivantes décrites dans la littérature (Schéma 13) :

- réaction d'une hydrazine avec un dérivé d'acide aminé *N*-carboxylé **A** (ou un équivalent synthétique de type isocyanate ou  $\alpha$ -lactame)
- réaction d'un carbazate activé **B** avec un dérivé d'acide aminé **C**
- réaction d'un dérivé d'acide aminé **C** avec une hydrazine et un donneur de carbonyle

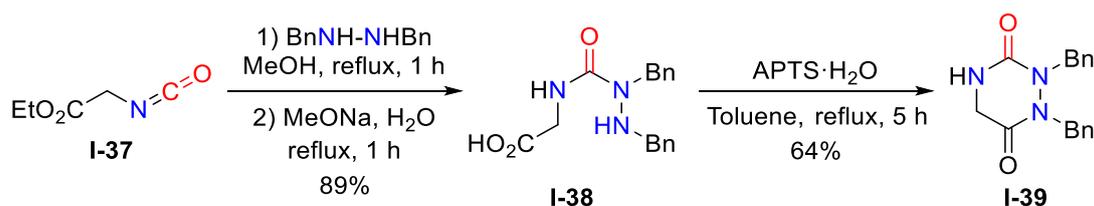
La cyclisation du semicarbazide par formation intramoléculaire de la liaison amide conduit à l'aza-DCP correspondante.



**Schéma 13.** Synthèse d'aza-DCP par cyclisation intramoléculaire d'un semicarbazide

### 2.2.1. A partir d'une hydrazine et d'un composé aminé dicarboxylé

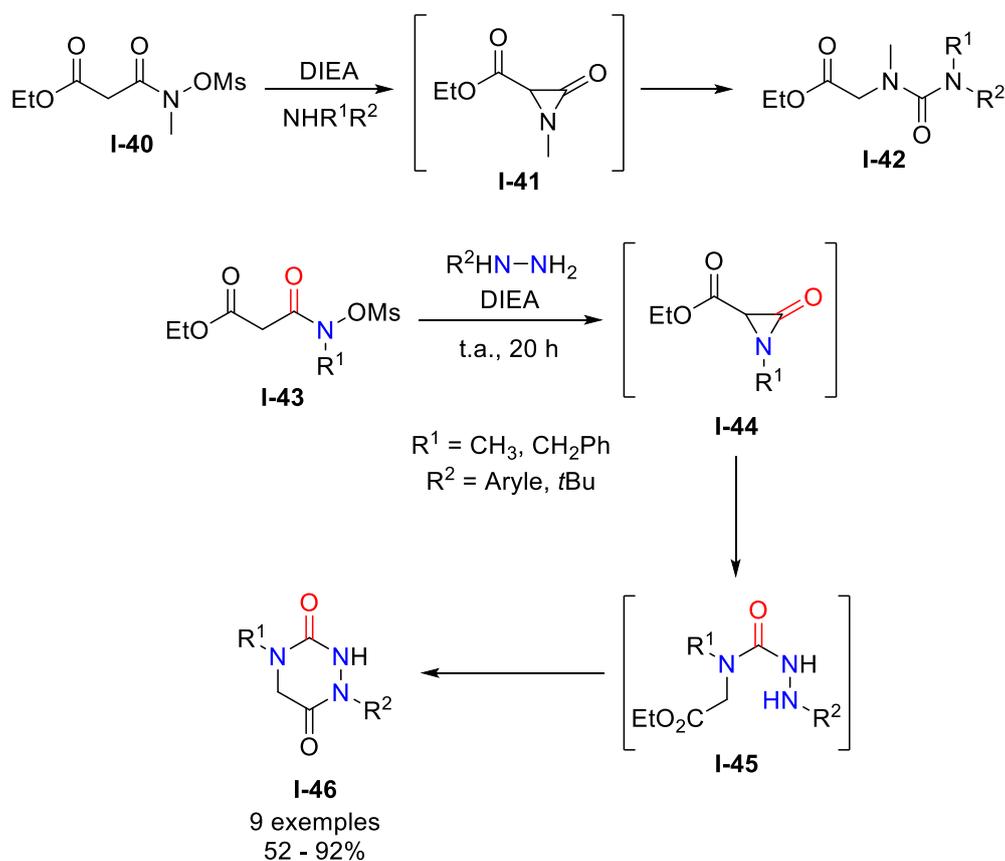
L'isocynoacetate d'éthyle **I-37** a été utilisé alternativement comme dérivé azoté et dicarboxylé dans une synthèse décrite par Schwan en 1983 (Schéma 14).<sup>47</sup> En faisant réagir cet isocyanate avec une hydrazine disubstituée symétrique il a obtenu le semicarbazide **I-38** qui a ensuite pu cycliser sous catalyse acide pour conduire à l'aza-DCP **I-39** désirée.



**Schéma 14.** Synthèse d'aza-DCP à partir d'un isocyanate

Enfin, Hoffman *et al.* ont utilisé des  $\alpha$ -lactames comme partenaires dans la réaction avec les hydrazines (Schéma 15).<sup>48</sup> L' $\alpha$ -lactame **I-41** généré à partir d'un précurseur *N*-(mesyloxy)malonamide **I-40** par traitement avec une base (DIEA), peut réagir facilement par ouverture du cycle avec diverses amines même peu nucléophiles comme la dicyclohexylamine ou des hydrazines, conduisant à des urées ou des semicarbazides **I-42**.<sup>49</sup> Ainsi, différents *N*-(mesyloxy)malonamides **I-43** et hydrazines

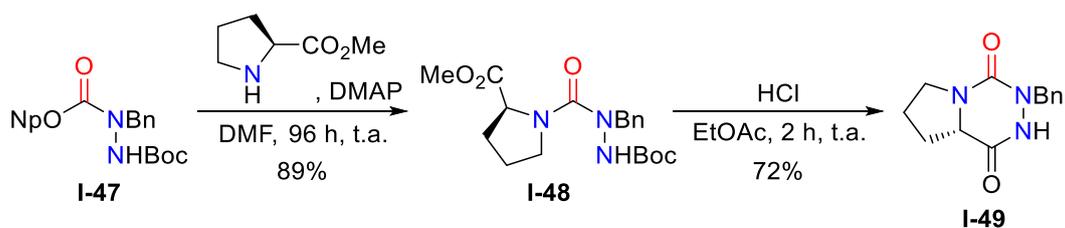
diversement substitués ont été utilisés pour accéder à une famille d'aza-DCPs **I-46** avec des rendements compris entre 52 et 92%.



**Schéma 15.** Réaction d'amines avec un  $\alpha$ -lactame ; application à la synthèse d'aza-DCPs

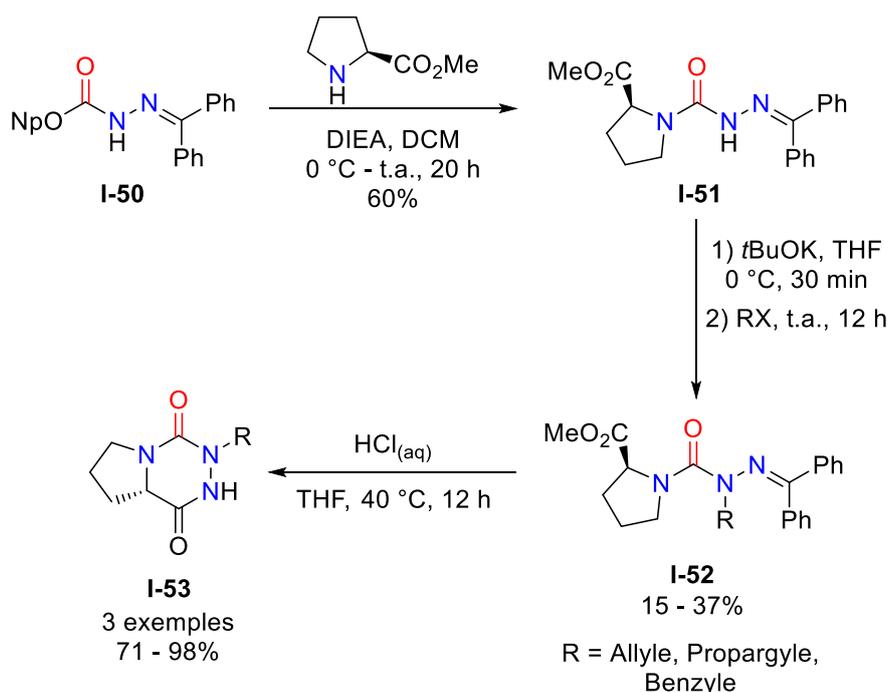
### 2.2.2. A partir de carbazates activés et d'acides aminés

Une méthode alternative à la précédente a été développée et consiste en l'utilisation de carbazates activés comme isocyanates masqués pour la formation de semicarbazides. Pinnen *et al.*<sup>50</sup> ont utilisé la DMAP en tant que catalyseur nucléophile pour activer le carbazate de 4-nitrophénol **I-47** et générer ainsi l'isocyanate à température ambiante (Schéma 16). Ce dernier, en présence de l'ester méthylique de la proline, a conduit au semicarbazide **I-48** attendu avec un rendement de 89% après 96 heures. La dernière étape de cyclisation sous catalyse acide (HCl) a permis d'obtenir la triazine finale **I-49** avec un rendement de 72%.



**Schéma 16.** Synthèse de l'aza-DCP **I-49** à partir d'un carbazate activé

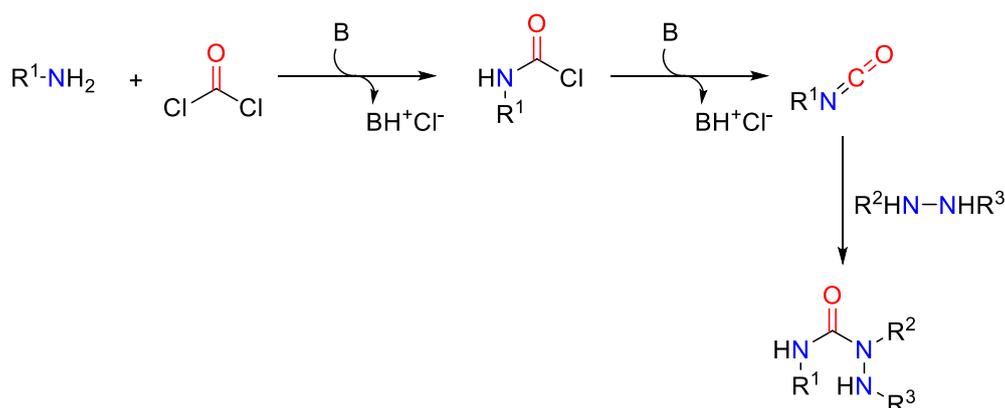
En partant du carbazate dérivé de 4-nitrophénol **I-50** mais en utilisant la DIEA en tant que base, l'équipe de Lubell a pu réduire le temps de réaction, le semicarbazide **I-51** correspondant étant obtenu après 20 heures, avec un rendement de 60% (Schéma 17).<sup>51</sup> Ce dérivé a par la suite été *N*-alkylé dans des conditions classiques avec des rendements modestes pour donner après déprotection de l'hydrazone et cyclisation par traitement acide avec une solution d'HCl les aza-DCPs **I-53** désirées.



**Schéma 17.** Synthèse des aza-DCPs **I-53** à partir d'un carbazate activé

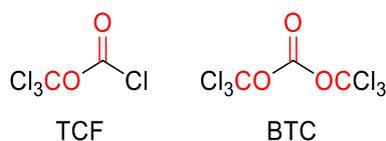
### 2.2.3. A partir d'hydrazines, d'acides aminés et d'un substitut du phosgène

La réaction du phosgène avec une amine primaire constitue une méthode efficace pour former un isocyanate *in situ* via une assistance basique. Cette méthode permet de préparer une grande diversité d'isocyanates pour un accès plus direct à des composés d'intérêt tel que les semicarbazides (Schéma 18).



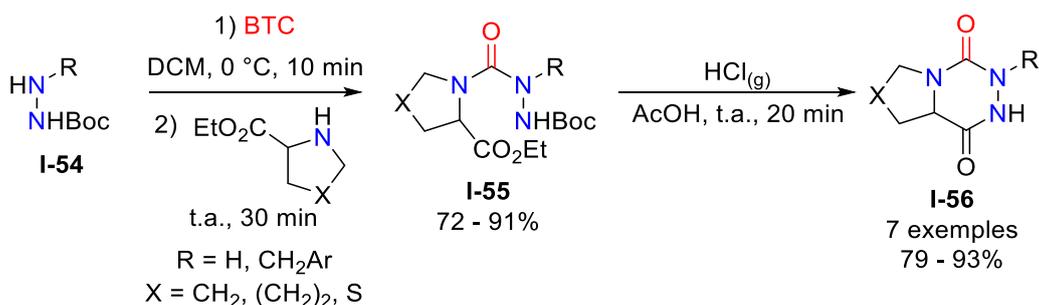
**Schéma 18.** Obtention d'un semicarbazide à partir du phosgène

Cependant, le phosgène étant un réactif gazeux et toxique, des équivalents synthétiques moins dangereux ont été développés pour le remplacer, comme le diphosgène liquide (TCF : trichlorométhyl chloroformate), ou le triphosgène (BTC : bis(trichlorométhyl) carbonate), solide (Figure 13).



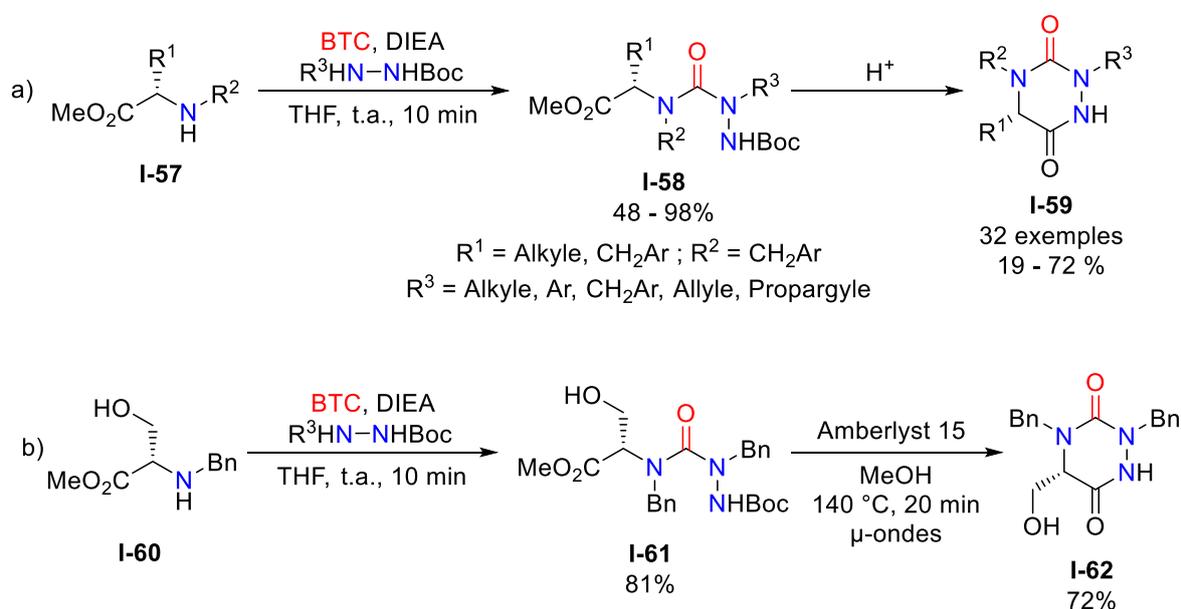
**Figure 13.** Structures du diphosgène et du triphosgène

Lors de la synthèse d'aza-DCPs à partir de dérivés d'hydrazine et d'acides aminés cycliques, Obreza et Urleb ont utilisé ce type de réactifs pour introduire le groupement carbonyle (C=O) entre les deux atomes d'azote des partenaires impliqués (Schéma 19).<sup>52</sup> Le triphosgène (BTC) a été utilisé dans ce cas et les semicarbazides **I-55** ont été d'abord obtenues et isolées avec d'excellents rendements. Après déprotection de la fonction *N*-Boc par traitement acide, les intermédiaires obtenus ont conduit par amidation cyclisante aux aza-DCPs bicycliques **I-56** désirées.



**Schéma 19.** Exemple d'utilisation de triphosgène pour la synthèse d'aza-DCPs bicycliques

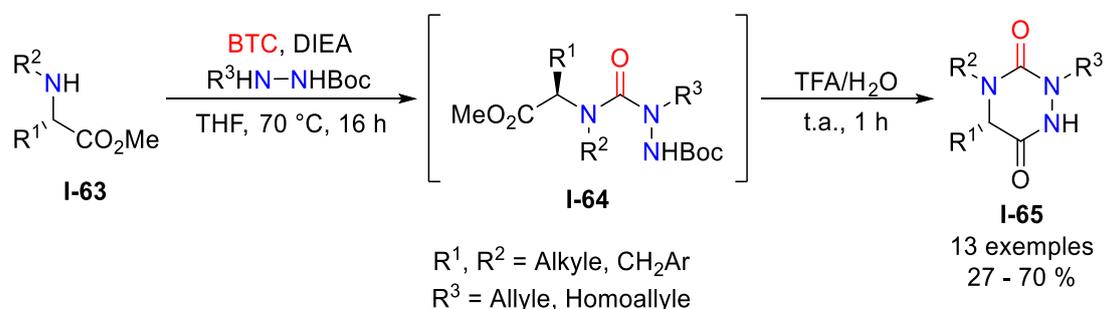
En utilisant la même stratégie, plusieurs aza-DKPs dérivées d'acides aminés énantiopurs ont pu être synthétisées par le groupe de Ganesan en collaboration avec notre laboratoire.<sup>53,54</sup> Dans un premier temps, la synthèse a été réalisée en deux étapes, en isolant le semicarbazide intermédiaire **I-58** avec de très bons rendements (Schéma 20). Ce dernier a été ensuite cyclisé par action du PPTS ou d'une résine Amberlyst 15, suivant l'acide aminé employé. Ces conditions ont permis d'utiliser comme précurseur l'ester méthylique de la *L*-sérine sans protéger la fonction hydroxy et l'aza-DCP **I-62** correspondante a été obtenue avec d'excellents rendements sur les deux étapes successives (81% et 72%), sans formation de produits secondaires.



**Schéma 20.** a) Synthèse d'aza-DCPs à partir d'acides aminés énantiopurs b) Exemple de synthèse d'aza-DCP à partir de la *L*-sérine

Par la suite, une version *one-pot* de cette même stratégie a été développée au laboratoire (sans isolement du semicarbazide **I-64** intermédiaire) sur une série

d'acides aminés **I-63** (Schéma 21). Le mélange brut obtenu après réaction avec le triphosgène a été traité directement par une solution d'acide trifluoroacétique et d'eau pour donner par cyclisation les aza-DCPs **I-65** désirées avec des rendements allant de 27 à 70%.



**Schéma 21.** Synthèse *one-pot* d'aza-DCPs

Comparées aux conditions réactionnelles racémisantes de la méthode de Schlögl<sup>35</sup> celles décrites pour les exemples précédents ont permis d'obtenir des semicarbazides et les triazines correspondantes non-racémiques. Cette stratégie représente ainsi une avancée dans la synthèse d'aza-DCPs chiraux.

De plus, les mêmes auteurs ont transféré cette stratégie de synthèse en phase solide (Schéma 22).<sup>53</sup> Cette méthode a permis une synthèse rapide et diversifiée d'une famille de dérivés, sans purification intermédiaire. Des résines de type Wang ou HMBA ont été choisies afin de débiter la synthèse sur l'acide aminé supporté désiré **I-66**. Après déprotection du *N*-Fmoc et amination réductrice, l'acide aminé a été acylé en présence de triphosgène pour générer le chlorure de carbamoyle **I-69**. Ce dernier a été mis en réaction avec différents dérivés de *tert*-butyl carbazate afin d'obtenir les semicarbazides souhaités. En présence du TFA dans l'eau, les semicarbazides **I-70** ont été décrochés de la résine par une stratégie de « cyclization-release » conduisant aux aza-DCPs **I-71** correspondantes, avec des rendements allant de 3 à 78% pour la résine Wang et de 53 à 93% pour la résine HMBA et une pureté >95%.

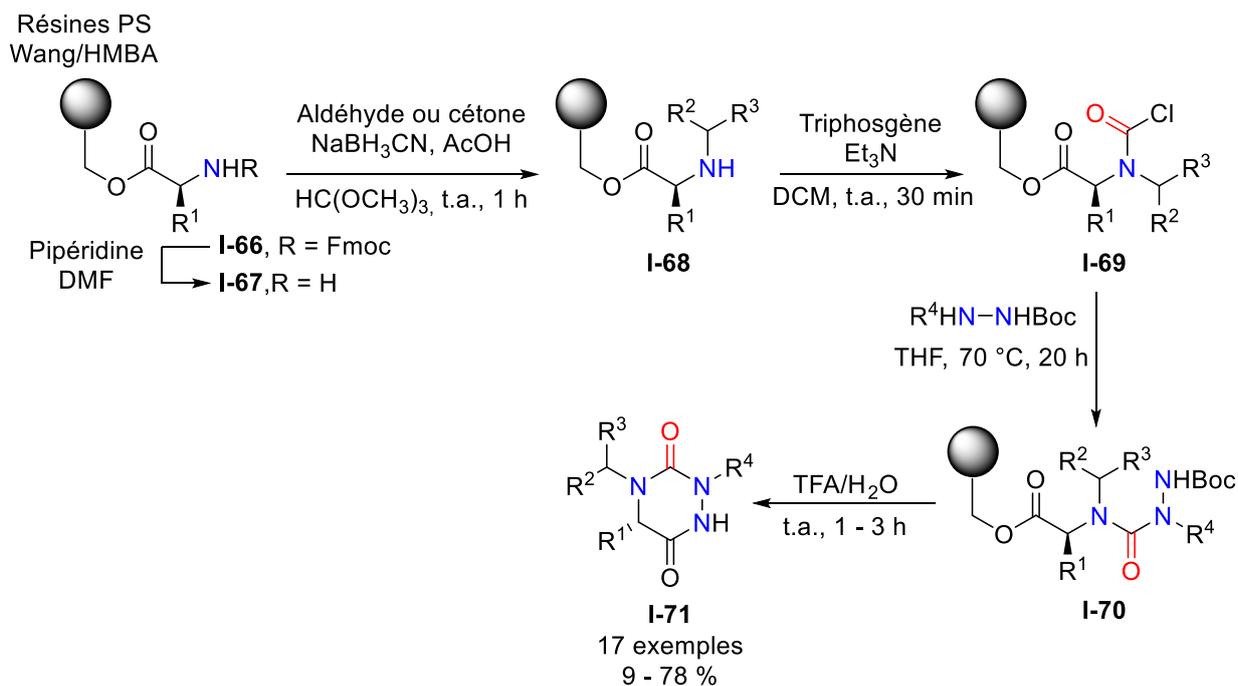


Schéma 22. Synthèse d'aza-DCPs sur résine Wang ou HMBA

### 3. Variation de la structure moléculaire d'une aza-DCP

La variation des substituants présents sur les quatre positions dans la structure d'une aza-DCP (Figure 14) peut s'effectuer soit lors de leur synthèse via les différentes stratégies présentées précédemment, soit par des transformations fonctionnelles sur la triazine déjà formée.

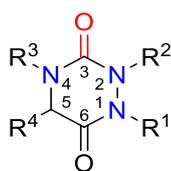


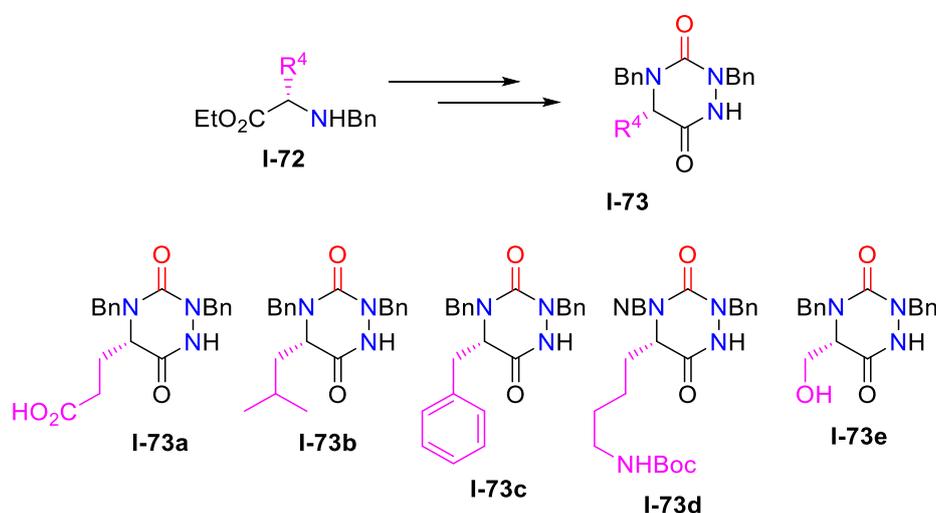
Figure 14. Représentation générale d'une aza-DCP tétrasubstituée

#### 3.1. Variations au cours de la synthèse

Cette voie consiste à introduire directement les substituants désirés lors de la synthèse de l'aza-DCP, en choisissant les partenaires réactionnels adaptés, en fonction de la stratégie utilisée (cf. §1, Schéma 1, page 30).

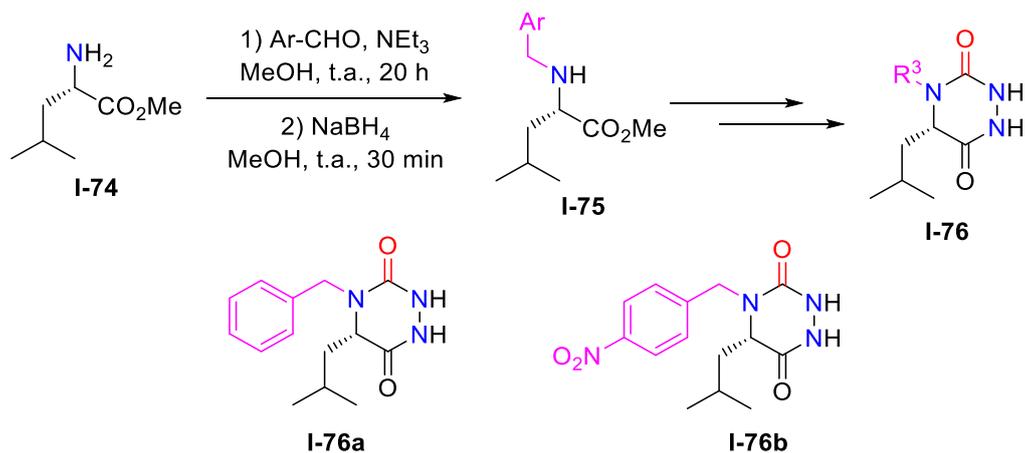
### 3.1.1. Variation des substituants en positions 4 et/ou 5

Une première catégorie de variations peut être effectuée en positions 4 et 5 de l'hétérocycle. La position 5 représente un élément important dans la diversification structurale lors des différentes synthèses des aza-DCPs. Le substituant placé dans cette position peut provenir d'acides aminés naturels énantiopurs **I-72** utilisés comme précurseurs dans certaines stratégies (cf. §2.2.3., Schémas 20 et 21, pages 42 et 43).<sup>53,54</sup> Plusieurs groupements alkyles, benzyles, ou chaînes fonctionnalisées ont été ainsi introduits en position 5 d'aza-DCPs **I-73** (Schéma 23). De plus, certaines méthodes ont permis de préserver la stéréochimie d'origine.



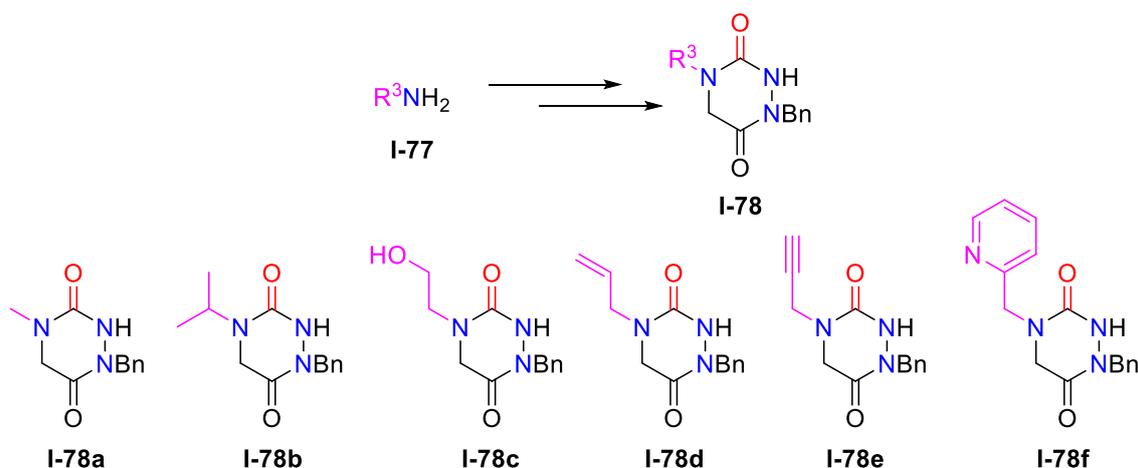
**Schéma 23.** Variation du substituant en position 5 à partir d'un dérivé d'acide aminé

Le substituant en position 4, porté par l'azote, a également été varié lors des synthèses des aza-DCPs **I-76**. Par exemple, des groupements benzyls ont été introduits sur cette position (cf. §2.2.3., Schéma 20, page 40),<sup>53</sup> à partir d'acides aminés *N*-benzylés **I-75** obtenus préalablement via une amination réductrice (Schéma 24).<sup>53</sup>



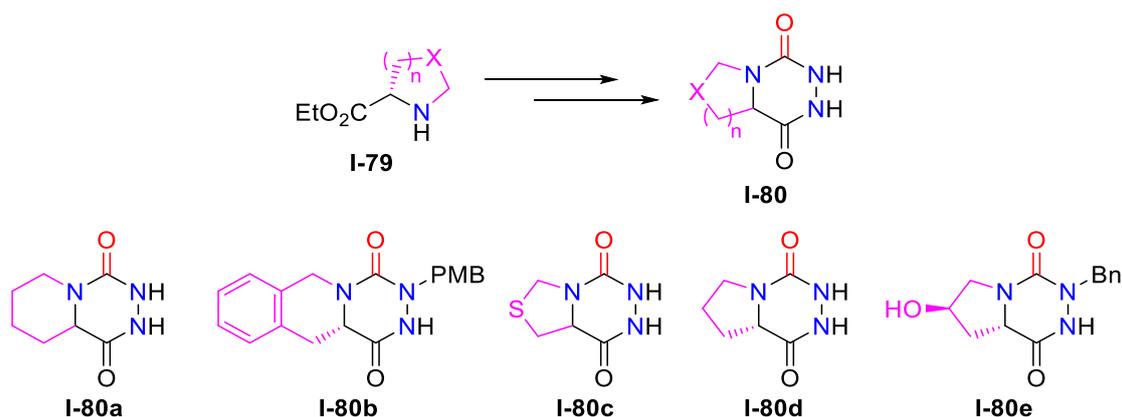
**Schéma 24.** Variation du substituant en position 4 à partir d'un dérivé d'acide aminé

Le substituant en position 4 a pu davantage être diversifié grâce à une autre stratégie utilisant l'introduction d'une amine primaire **I-77** avant l'étape de cyclisation en triazine **I-78** (cf. §2.1., Schéma 11, page 36).<sup>45</sup> En effet, un grand nombre d'aza-DCPs ont été synthétisées à partir d'amines commerciales (Schéma 25).



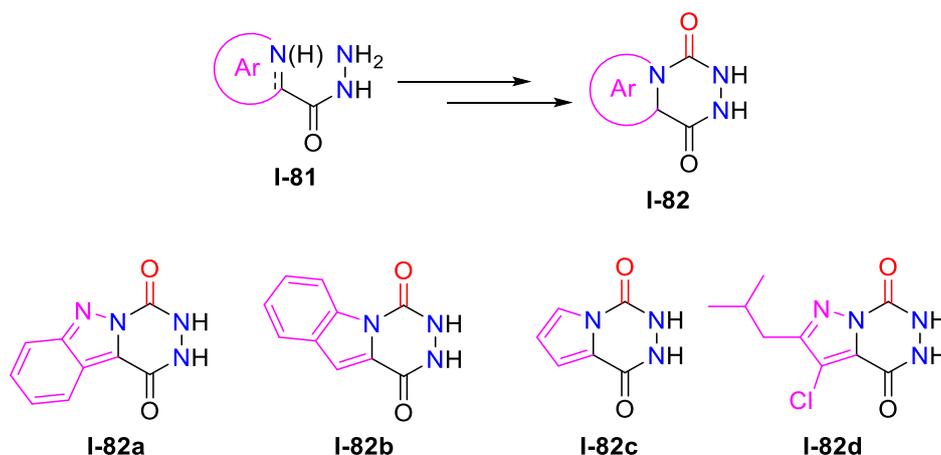
**Schéma 25.** Variation du substituant en position 4 à partir d'une amine primaire

Dans la catégorie d'aza-DCPs bicycliques, les deux positions 4 et 5 peuvent être connectées. Ces structures **I-80** peuvent être obtenues en partant de précurseurs adaptés comme les aminoacides cycliques d'origine naturelle ou synthétique **I-79**, comme par exemple la *L*-proline, l'acide pipécolinique, ou la thiaproline (Schéma 26). Les différentes méthodes de synthèses utilisées ont été détaillées auparavant (cf. §2.1 Schéma 4, page 32; §2.2.2 Schéma 16 - Schéma 17, page 40; §2.2.3 Schéma 19 - Schéma 22, pages 42 à 44).<sup>36,50-52</sup>



**Schéma 26.** Aza-DCPs bicycliques : variation des substituants en positions 4 et 5

Enfin, des aza-DCPs bicycliques **I-82**, fusionnées cette fois à des hétérocycles azotés divers, ont également obtenues (Schéma 27). Les précurseurs utilisés **I-81** comportent dans leur structure l'hétérocycle correspondant, tel que l'indazole, l'indole, le pyrrole ou le pyrazole (cf §2.2, Schéma 16, Schéma 17, Schéma 19, pages 40 et 42).<sup>38-40,44</sup>

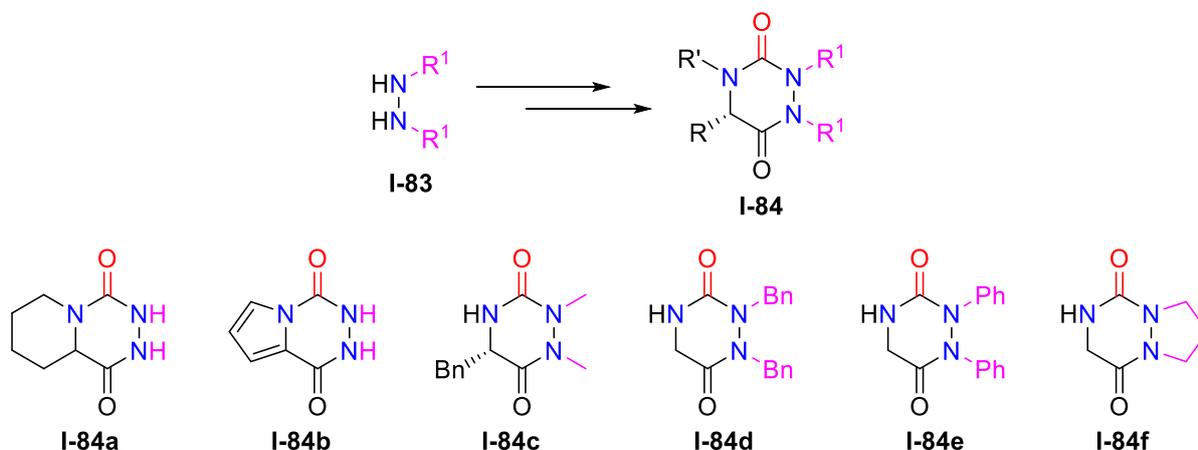


**Schéma 27.** Aza-DCPs fusionnées à des *N*-hétérocycles divers

### 3.1.2. Variation des substituants en positions 1 et/ou 2

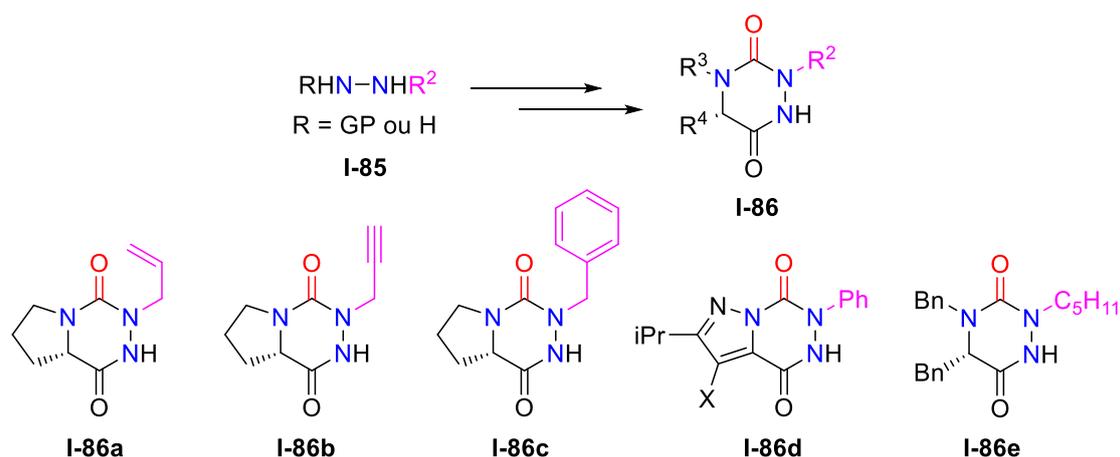
Les positions 1 et 2 concernent les substituants sur les atomes d'azote du motif hydrazine. Parmi les méthodes de synthèse précédemment décrites, plusieurs reposaient sur la réaction entre l'hydrazine et un dérivé carboxylé. Afin d'éviter des problèmes de régiosélectivité, des hydrazines symétriques **I-83** ont été tout d'abord employées (cf. §2.1, Schéma 3-Schéma 9, pages 31 à 34; §2.2.1, Schéma 14, page

38).<sup>35-40,42,43,47</sup> Ainsi de nombreuses aza-DCPs synthétisées **I-84** possèdent des substituants identiques sur les azotes N<sup>1</sup> et N<sup>2</sup> (Schéma 28).



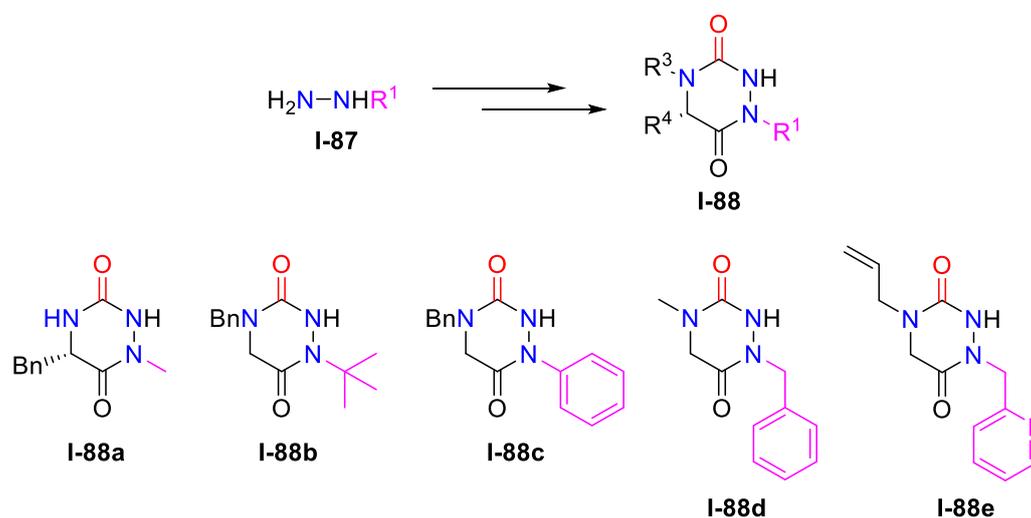
**Schéma 28.** Substituants identiques en positions 1 et 2 ; utilisation d'hydrazines disubstituées symétriques

La variation du substituant présent en position 2 a pu être réalisée par le biais d'autres stratégies, en utilisant des hydrazines **I-85** soit monosubstituées, soit 1,2-disubstituées comportant un azote désactivé par un groupement protecteur. Par exemple, le groupement phényle a été introduit par utilisation de la phénylhydrazine, la régiosélectivité étant contrôlée grâce à la désactivation de l'azote *N*-arylique par mésomérie (cf. §2.1., Schéma 10, page 35).<sup>44</sup> En utilisant une hydrazine dont un azote porte les substituants souhaités et l'autre est désactivé par un groupement Boc, la régiosélectivité a été totale lors de la formation du semicarbazide précurseur de la triazine désirée (cf. §2.2.3., Schéma 20 et Schéma 21, pages 42 et 43).<sup>53,54</sup> Enfin, une autre méthode a impliqué la protection d'un azote sous forme d'hydrazone, ce qui a permis d'introduire un substituant sur l'azote adjacent par déprotonation et *N*-alkylation (cf. §2.2.2., Schéma 17, page 40).<sup>51</sup> Ainsi, des substituants alkyle, allyle, propargyle, benzyle, et phényle ont pu être introduits sur la position 2 lors des synthèses des aza-DCPs correspondantes (Schéma 29).



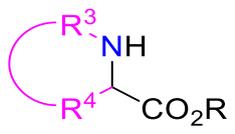
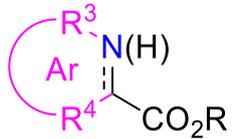
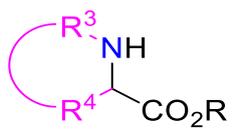
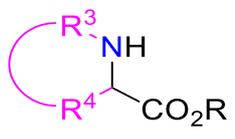
**Schéma 29.** Variation des substituents en position 2

Enfin, le substituant en position 1 peut être également varié en utilisant des hydrazines monosubstituées **I-87** (Schéma 30). De manière similaire à celle décrite précédemment pour la variation en position 2, la régiosélectivité de la réaction impliquant l'hydrazine peut être contrôlée via la diminution de la nucléophilie de l'azote portant le substituant souhaité, par effet électronique ou stérique (cf. §2.1., Schéma 11 et Schéma 12, pages 36 et 37 ; cf. §2.2.1, Schéma 15, page 39).<sup>45,46,48</sup> Ainsi divers groupements (alkyle, benzyle, aryle) ont pu être introduits au cours de la synthèse des aza-DCPs **I-88** désirées sur l'azote N<sup>1</sup>.



**Schéma 30.** Variation des substituents en position 1

Le tableau ci-après résume les variations sur les quatre positions d'une aza-DCP, en fonction du précurseur impliqué et de la stratégie utilisée, en indiquant les références correspondantes sélectionnées de la littérature.

Position sur l'aza-DCP	Strategie (§)	Precurseur	Schéma	[ref]
1	2.1	$R^1NH-NH_2$	11 12	[44] [45]
1	2.2.1	$R^1NH-NH_2$	15	[48]
2	2.1	$R^2NH-NH_2$	10	[43]
2	2.2.2	$R^2X$	17	[50]
2	2.2.3	$R^2NH-NHZ$	20, 21	[52-53]
1 & 2 ( $R^1 = R^2 = R$ )	2.1	$NH_2-NH_2$	3 4 5 6, 7	[34] [35] [36] [37-39]
1 & 2 ( $R^1 = R^2 = R$ )	2.1 2.2.1	$RNH-NHR$	8 9 14	[41] [42] [46]
4	2.1	$R^3NH_2$	11	[44]
4	2.2.3	$R^3NHCH(R^4)CO_2R$	20, 21	[52-53]
5	2.2.3	$R^3NHCH(R^4)CO_2R$	20, 21	[52-53]
4 & 5	2.1		4	[35]
4 & 5	2.1		6, 7	[37-39]
4 & 5	2.2.2		16 17	[49] [50]
4 & 5	2.2.3		19 20, 22 21	[51] [52] [53]

**Tableau 1.** Résumé des variations autour de la squelette aza-DCP réalisées au cours de la synthèse

### 3.2. Variations post-synthétique

Cette seconde stratégie consiste en l'introduction ou la modification de substituants après formation de l'aza-DCP. La majorité des travaux dans ce domaine ont été effectués par notre équipe.

### 3.2.1. Variation des substituants en position 1 et/ou 2

Les aza-DCPs **I-89** portant respectivement un groupe allyle et homoallyle en position 2 ont été préparées au laboratoire (cf. §2.2.3, Schéma 21, page 43). La double liaison présente sur ces structures a pu être modifiée par hydroformylation catalysée au rhodium, ce qui a permis d'introduire régiosélectivement le groupement formyle sur le carbone terminal. L'aldéhyde intermédiaire **I-90** obtenu a été ensuite engagé dans une cyclisation par condensation intramoléculaire sur l'azote en position 1 pour donner les aza-DCPs bicycliques **I-91** correspondantes avec des rendements compris entre 57 et 81% (Schéma 31).<sup>54</sup> Cette stratégie de cyclohydrocarbonylation a permis la synthèse d'une famille originale d'aza-DCPs fusionnées à des cycles à 6 et 7 chaînons sur le motif hydrazine. De plus, cette transformation a eu comme résultat la formation d'un énamide cyclique, dont la double liaison offre de nouvelles possibilités de post-fonctionnalisation.

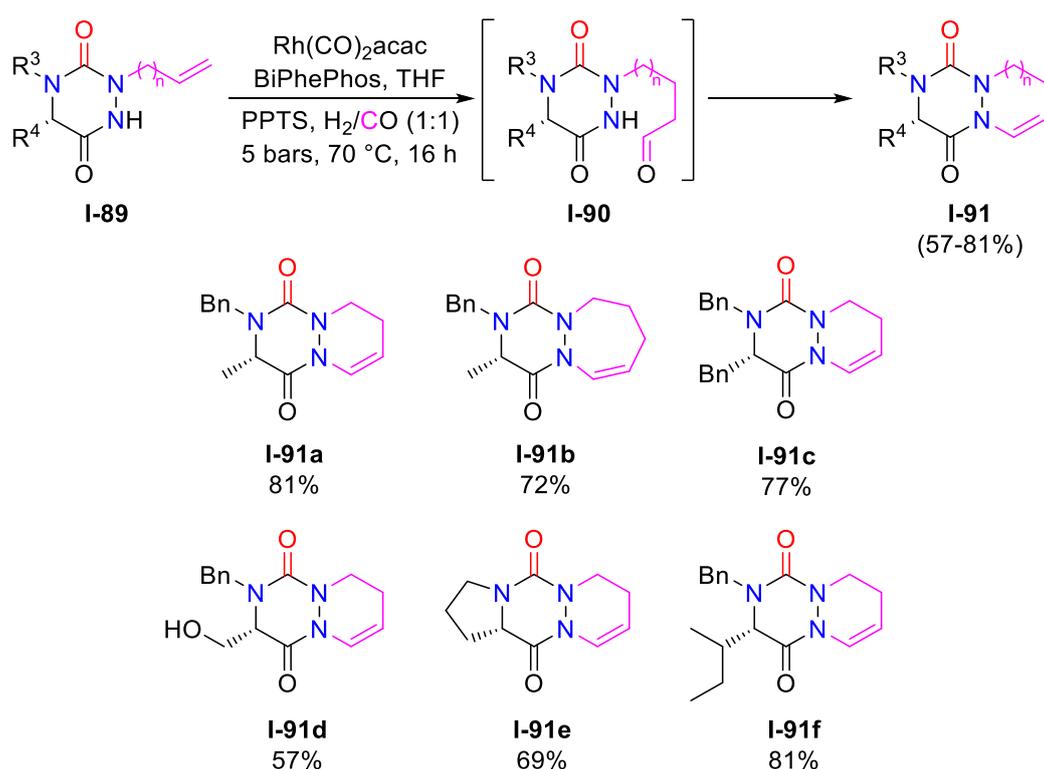
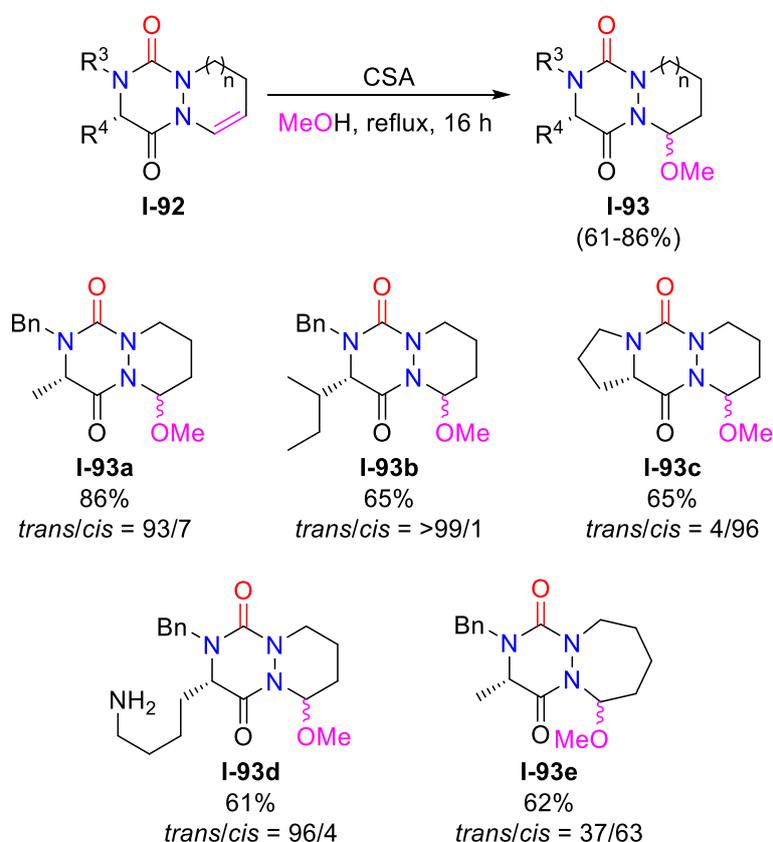


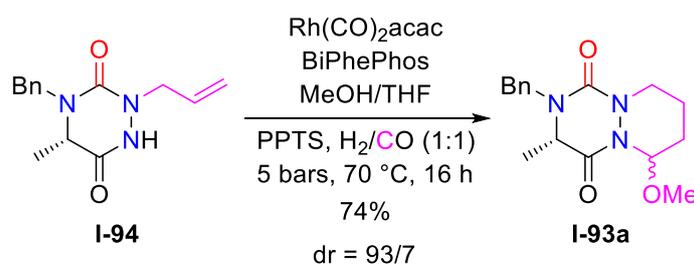
Schéma 31. Formation d'aza-DCP bicycliques par cyclohydrocarbonylation

La réactivité de l'énamide a été principalement exploitée pour introduire des fonctions en  $\alpha$  de l'azote. Par exemple, mises en réaction avec un nucléophile comme le méthanol, en présence d'un acide (CSA), les aza-DCPs **I-92** ont conduit aux éthers

d'hémiaminals chiraux correspondants **I-93** avec des rendements compris entre 61 et 86%. Les ratios diastéréomériques ont été supérieurs à 93/7 pour **I-93a** à **I-93d** et de 37/63 pour l'aza-DCP **I-93e** fusionnée avec un cycle à 7 chaînons (Schéma 32).<sup>54</sup> L'aza-DCP **I-93a** a également été obtenue par une procédure one-pot, à partir de l'aza-DCP allylée monocyclique **I-94**, dans des conditions de cyclohydrocarbonylation en présence de méthanol. Le rendement ainsi que le ratio diastéréomérique obtenus (74%, 93/7) ont été similaires à ceux obtenus en utilisant la séquence en deux étapes (Schéma 33).<sup>54</sup>

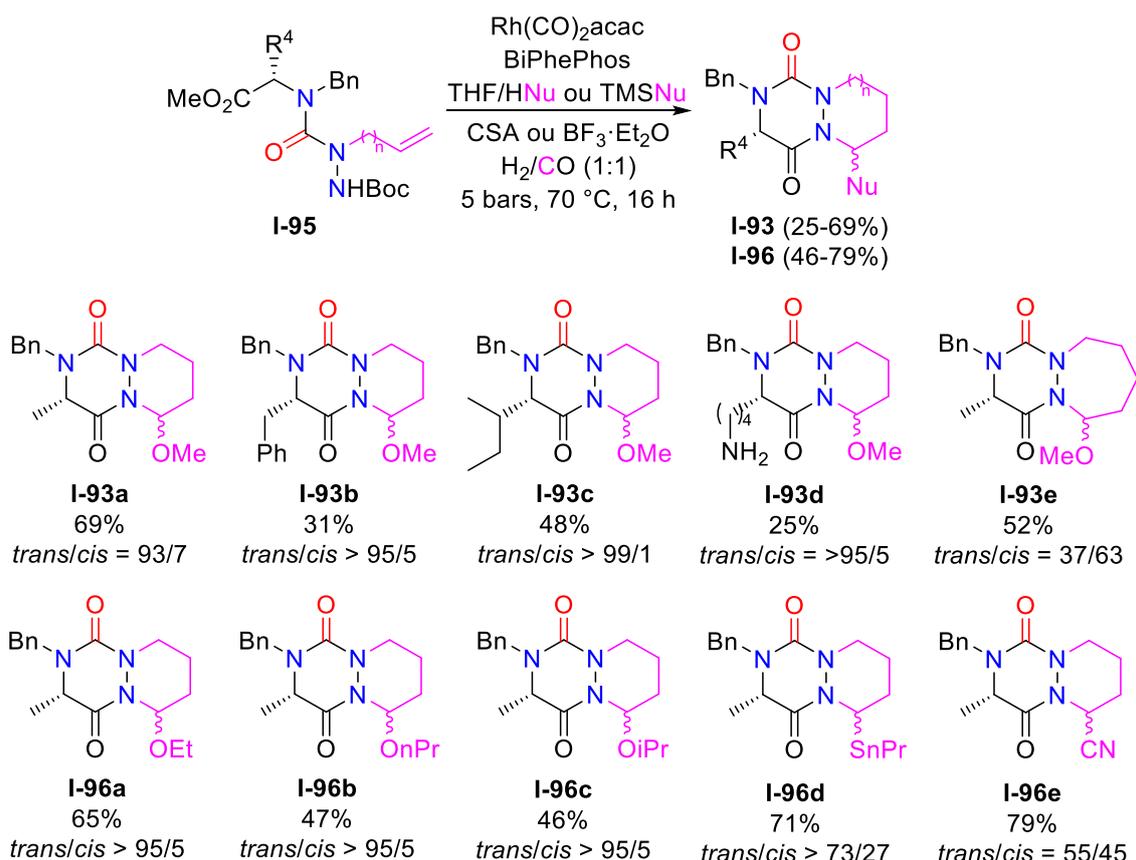


**Schéma 32.** Introduction d'un groupement méthoxy sur une aza-DCP bicyclique



**Schéma 33.** Réaction domino de cyclohydrocarbonylation suivie de l'introduction d'un groupement méthoxy pour la synthèse d'aza-DCP bicyclique

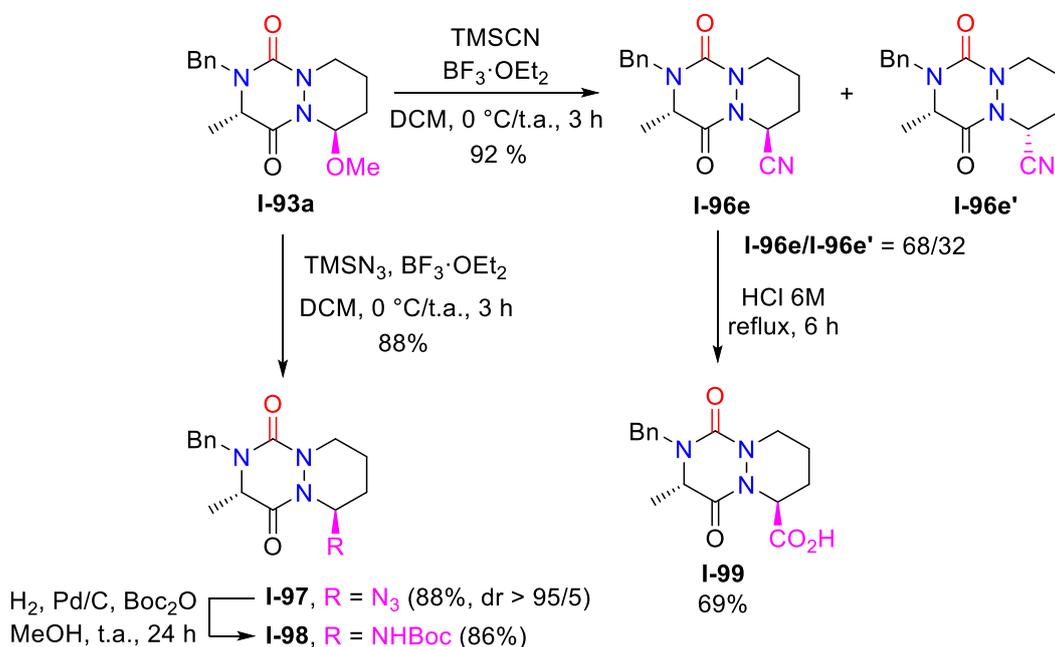
Une version de cette méthode incluant également la formation de la triazine a été ensuite développée comme une réaction multicomposants. Soumis aux conditions de cyclohydrocarbonylation en présence d'un nucléophile (ROH, TMSCN, *n*PrSH) et d'un acide de Brønsted (CSA) ou de Lewis (BF<sub>3</sub>), les semicarbazides **I-95** ont conduit directement aux aza-DCPs **I-93** et **I-96** correspondantes avec des rendements compris entre 25 et 69% (Schéma 34).<sup>55</sup>



**Schéma 34.** Synthèse "one-pot" d'aza-DCPs bicycliques fonctionnalisées

Le traitement de l'éther d'héminaminal **I-93a** avec d'autres nucléophiles catalysé par BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O a également permis l'introduction de diverses fonctions en α de l'azote (Schéma 35).<sup>54</sup> L'emploi de cyanure de triméthylsilyle (TMSCN) a par exemple permis d'introduire un nitrile sur cette position avec un rendement de 92% et un ratio diastéréomérique modeste de 68/32. L'hydrolyse acide du diastéréoisomère majoritaire a ensuite conduit à l'acide carboxylique correspondant avec 69% de rendement. Dans les mêmes conditions, TMSN<sub>3</sub> a permis d'obtenir l'azoture sur cette même position avec un rendement de 88% et un excellent ratio diastéréomérique

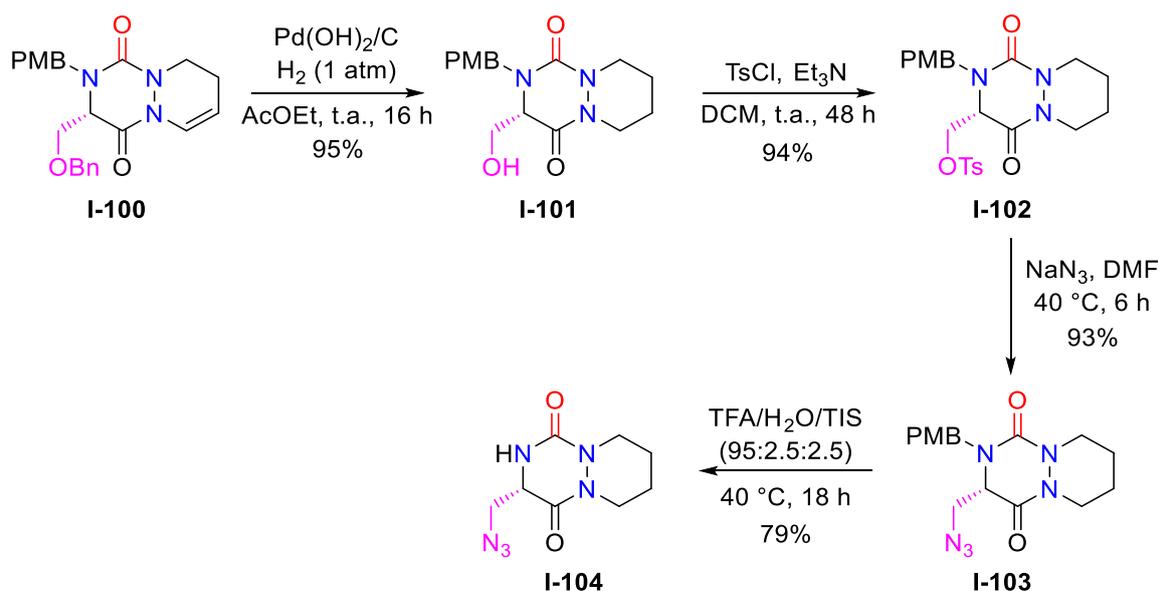
(>95:5). L'hydrogénation catalytique de l'azoture en présence de Boc<sub>2</sub>O a conduit au carbamate correspondant avec un rendement de 86%.



**Schéma 35.** Fonctionnalisation d'une aza-DCP bicyclique avec d'autres nucléophiles

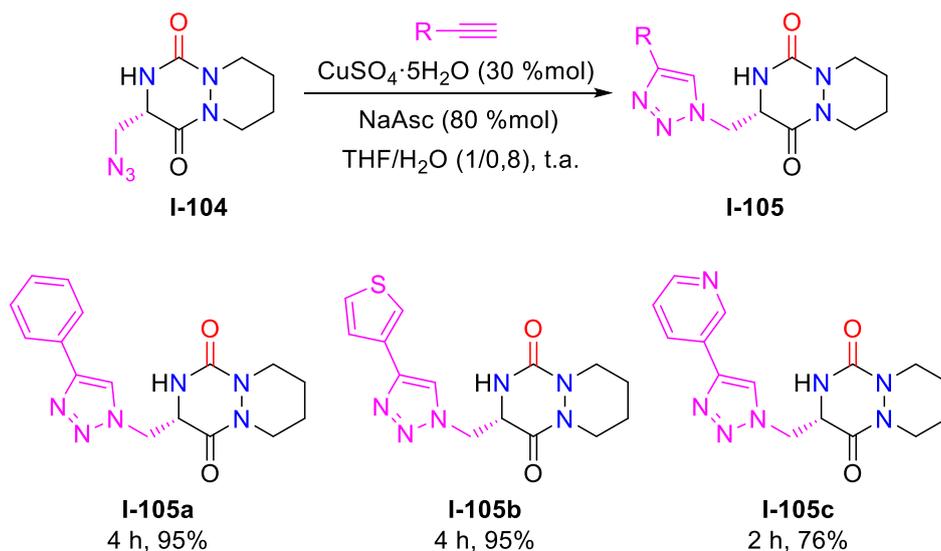
### 3.2.2. Modification des substituants en position 5

La modification structurale du substituant en position 5 n'a été jusqu'à présent étudiée que par notre équipe (Schéma 36). A partir de l'aza-DCP **I-100** dérivée de la sérine, l'hydrogénation et l'hydrogénolyse pallado-catalysées ont permis par exemple d'accéder à l'aza-DCP **I-101**. Après activation sous forme de tosylate, l'hydroxyle a été substitué par un azoture, pour conduire après déprotection en milieu acide à l'aza-DCP **I-104** avec un bon rendement.<sup>56</sup>

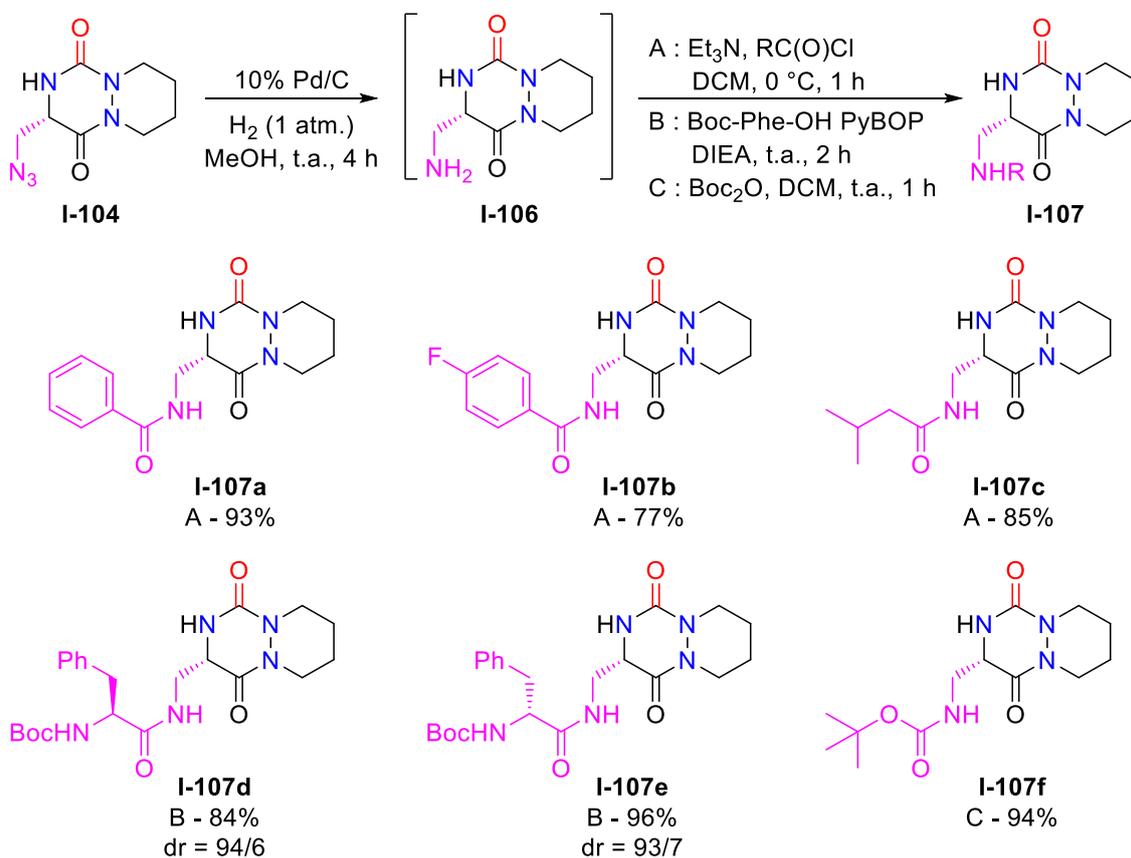


**Schéma 36.** Substitution d'un hydroxyle par un azoture sur une aza-DCP en position 5

Ensuite, la fonction azoture présente sur l'aza-DCP **I-104** a été transformée par cycloaddition avec divers alcynes vrais, sous catalyse au cuivre(I), en triazoles **I-105** correspondants variés, avec de très bons rendements (Schéma 37). A partir de la même aza-DCP **I-104**, l'azoture a également été réduit en amine correspondante par hydrogénation pallado-catalysée. L'aza-DCP obtenue **I-106** a par la suite été *N*-acylée en utilisant différentes méthodes (Schéma 38). L'utilisation de chlorure d'acyle a permis d'obtenir les amides correspondants **I-107a** à **I-107c** avec des rendements allant de 77 à 93% (Schéma 38, Méthode A). Des conditions de couplage peptidique ont permis d'accéder aux aza-DCPs **I-107d** et **I-107e** couplées à la *L*- et *D*-phénylalanine avec des rendements et des ratios diastéréomériques respectifs de 84% (dr = 94/6) et 96% (dr = 93/7) (Schéma 38, Méthode B). La présence d'un deuxième diastéréomère montre qu'une légère racémisation a pu avoir lieu lors de la synthèse de l'azoture **I-104**. Enfin, le traitement de l'amine **I-106** avec  $\text{Boc}_2\text{O}$  a permis d'obtenir le carbamate **I-107f** avec un rendement de 94% (Schéma 38, Méthode C).<sup>56</sup>



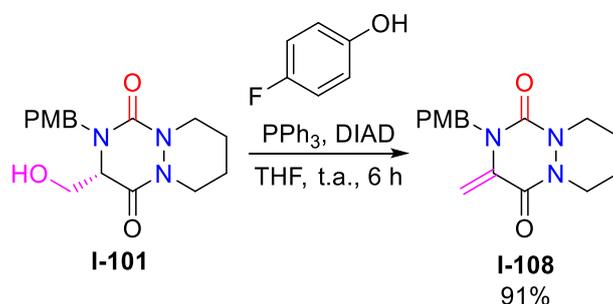
**Schéma 37.** Formation de triazoles en position 5 par cycloaddition (3+2)



**Schéma 38.** Réduction de l'azoture **I-104** et fonctionnalisation de l'amine intermédiaire **I-106**

Enfin, dans des conditions de Mitsunobu, l'aza-DCP **I-101** obtenue précédemment a été déshydratée pour donner le dérivé **I-108** avec une double liaison exocyclique avec un rendement de 91% (Schéma 39).<sup>56</sup> Malgré l'obtention d'un produit secondaire non

désiré au départ, ce dernier pourrait permettre l'introduction de divers groupements nucléophiles par réaction de Michael sur l'alpha-énone nouvellement formée.

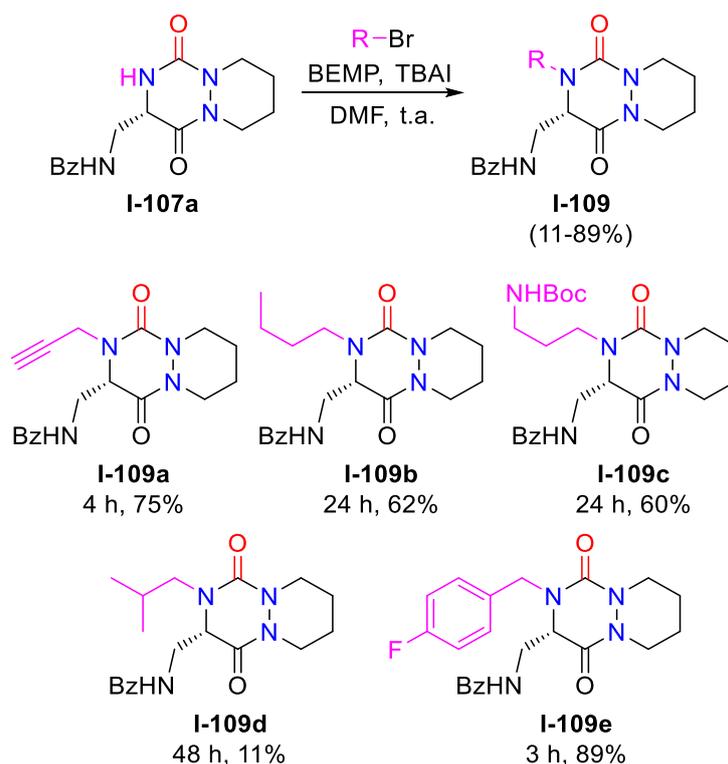


**Schéma 39.** Déshydratation d'une aza-DCP en position 5

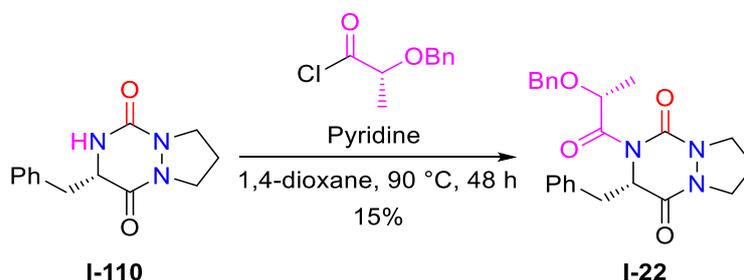
### 3.2.3. Introduction de substituants en position 4

Des travaux de notre laboratoire ont porté sur la post-fonctionnalisation de la position 4 du cycle. L'alkylation de l'aza-DCP **I-107a** par des dérivés bromés a été effectuée en présence d'une base forte et peu nucléophile de type phosphazène (BEMP), a permis d'introduire divers substituants alkyles, propargyles et benzyliques en position 4 de l'aza-DCP énantiopure **I-109** avec des rendements compris entre 11 et 89% et sans racémisation (Schéma 40).<sup>56</sup>

Pour la *N*-acylation en position 4 d'une autre aza-DCP bicyclique **I-110**, Pinnen *et al.* ont utilisé le chlorure d'acide de l'acide lactique *O*-benzylé, en présence de pyridine (Schéma 41).<sup>29</sup> Cette méthode a conduit à l'aza-DCP **I-22** avec un rendement de seulement 15%, beaucoup plus faible que celui que les auteurs avaient obtenu pour le même composé en introduisant l'acyle avant l'étape de cyclisation en triazine (voir Schéma 8, page 34).



**Schéma 40.** Alkylation de l'azote en position 4



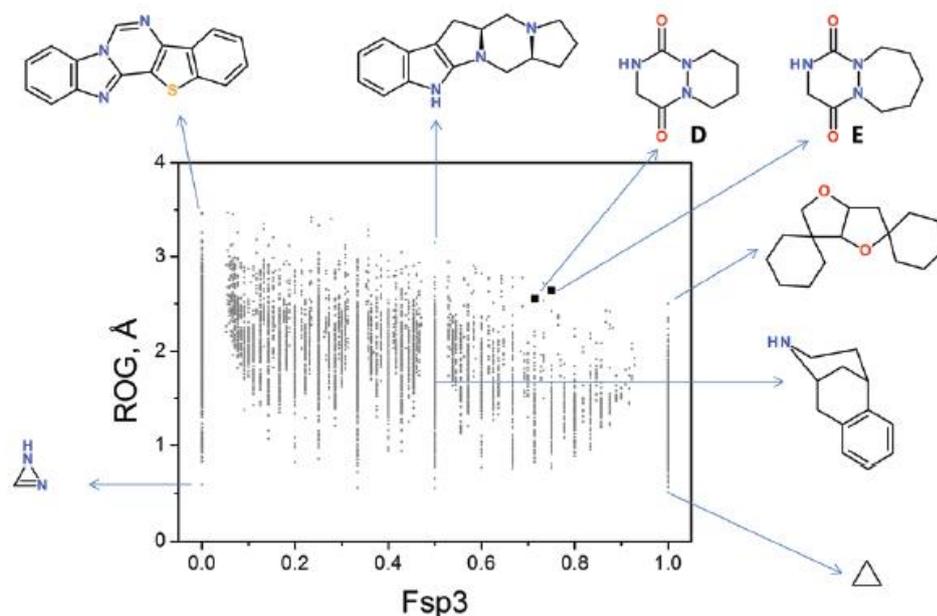
**Schéma 41.** Acylation de l'azote en position 4 par un chlorure d'acyle

#### 4. Propriétés physico-chimiques et activités biologiques des aza-DCPs

Quelques études se sont intéressées aux propriétés physico-chimiques et biologiques des aza-DCPs et ont montré des résultats encourageants pour cette nouvelle famille d'hétérocycles.

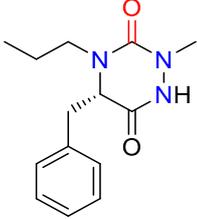
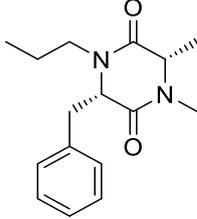
Notre équipe, en collaboration avec le groupe du Dr. D. Rognan, a notamment corrélé les rayons de giration (ROG) avec les fractions en carbones hybridés  $sp^3$  ( $F_{sp^3}$ ) des squelettes d'aza-DCPs **D** et **E** et de plus de 9000 structures uniques décrites dans la littérature (Figure 15).<sup>55</sup> Cette analyse a montré que les deux structures **D** et **E** se trouvaient dans des zones « sous-peuplées » du graphique démontrant qu'un nouvel

espace chimique pouvait être exploré via ces structures. De plus, les deux squelettes aza-DCPs **D** et **E** présentent des fractions  $F_{sp^3}$  élevées ( $\sim 0,75$ ) ce qui augmente leur probabilité de passer les différentes étapes des essais cliniques.<sup>57</sup>



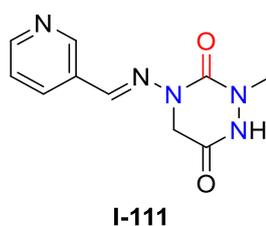
**Figure 15.** Représentation de l'espace chimique actuel occupé par les plateformes dites « drug-like »

Notre groupe a également comparé les propriétés physico-chimiques de l'aza-DCP **I-5** et de son équivalent DCP **I-4** (Tableau 2).<sup>33</sup> L'aza-DCP **I-5** utilisée ici présente tout d'abord une solubilité aqueuse dans le PBS supérieure d'un facteur 16 en comparaison avec la DCP **I-4** correspondante. **I-5** possède également un  $\text{LogD}_{7.4}$  inférieur à celui de **I-4** offrant ainsi plus de flexibilité quant à l'introduction de substituants apolaires lors d'études d'optimisations. Enfin, bien que les deux structures aient présenté d'excellentes stabilités dans le PBS ou le plasma de souris, une meilleure stabilité métabolique a été observée pour l'aza-DCP **I-5** dans les microsomes de foie de souris (83% vs 51%). Ces observations, si elles sont extrapolées, démontrent des propriétés « drug-like » supplémentaires très intéressantes pour ce nouvel hétérocycle en comparaison avec les DCPs, une famille de molécules déjà connue en chimie médicinale.<sup>16</sup>

		
	<b>Aza-DCP I-5</b>	<b>DCP I-4</b>
<b>Solubilité (mM)</b>	16.5 ± 0,6	1,0 ± 0,1
<b>LogD<sub>7,4</sub></b>	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,1
<b>Stabilité (%)</b>	<b>PBS (25 °C, 24 h)</b>	> 98
	<b>Plasma (37 °C, 6 h)</b>	> 98
	<b>Microsomes (37 °C, 30 min)</b>	83 ± 3
	51 ± 1	51 ± 1

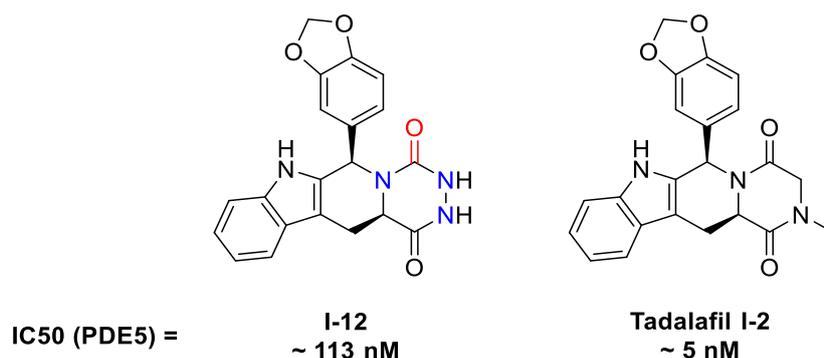
**Tableau 2.** Comparaison des propriétés physico-chimiques d'une aza-DCP et de son équivalent DCP

Concernant les activités biologiques, seules trois études ont publié des résultats impliquant une ou plusieurs aza-DCPs. Une équipe de Ciba-Geigy (Novartis) a décrit l'aza-DCP **I-111** dans un brevet en 1995, concernant l'utilisation de dérivés de pyridine comme produit phytosanitaire, sans en préciser l'activité (Figure 16).<sup>58</sup>



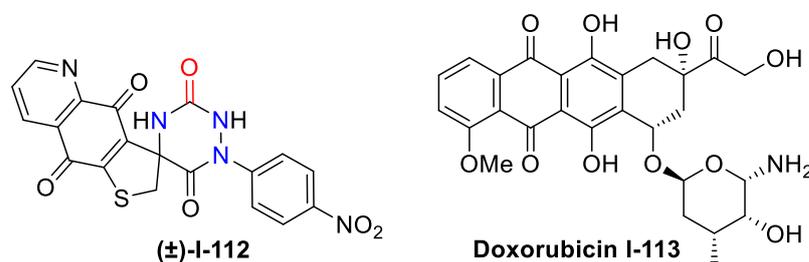
**Figure 16.** Structure d'une aza-DCP avec de potentielles activités phytosanitaires

Un second brevet publié par une équipe de Lilly en 2002, s'intéressant à des analogues du Tadalafil, a également décrit l'aza-DCP **I-12** (Figure 17).<sup>25</sup> Cette dernière présente une activité inhibitrice de la phosphodiésterase 5 (PDE5) 20 fois plus faible que le Tadalafil<sup>59</sup> (113 nM vs 5 nM) ne permettant pas de continuer le développement de cette structure.



**Figure 17.** Structures et activités du Tadalafil et d'un analogue aza-DCP

Enfin les groupes de Bolognese et Lavecchia se sont intéressés à une série d'aza-DCPs comme anti-cancéreux potentiel (Tableau 3).<sup>60</sup> **I-112** est ressorti de cette série comme l'exemple le plus intéressant de par son activité sur de nombreuses lignées cancéreuses (CCRF-CEM, CCRF-SB, MT-4) notamment en comparaison avec la Doxorubicin **I-113**. Cependant, de meilleurs résultats ayant été obtenus avec une seconde famille de molécules sur les autres lignées cancéreuses, l'étude de **I-112** n'a pas été poursuivie.



	IC <sub>50</sub> (μM)	
	(±)-I-112	Doxorubicin
<b>CCRF-CEM</b>	0,002	0,02
<b>CCRF-SB</b>	0,002	0,03
<b>MT-4</b>	0,005	0,01
<b>HT-29</b>	1,01	0,01
<b>MCF-7</b>	0,55	0,05
<b>HeLa</b>	0,61	0,07
<b>ACHN</b>	0,65	0,04
<b>SF-268</b>	3,55	0,2
<b>XF-498</b>	4,80	0,16

**Tableau 3.** Structures et cytotoxicité d'un candidat aza-DCP et de la Doxorubicin sur différentes lignées

## 5. Bilan bibliographique et perspectives envisagées

Cette étude bibliographique montre que l'intérêt pour les aza-DCPs est grandissant, car de nombreuses synthèses d'aza-DCP ont été mises au point depuis le premier exemple par Schlögl et Korger en 1951.<sup>35</sup> Les substituants portés par l'hétérocycle ont également été variés au cours et après la synthèse des hétérocycles permettant d'obtenir les aza-DCPs mono-, di-, tri- ou tétra-substitués correspondantes. Cependant, malgré leurs bonnes propriétés physico-chimiques comparées aux DCPs, seules de faibles activités biologiques ont été décrites dans la littérature concernant les aza-DCPs.

Il serait donc intéressant dans un premier temps de pouvoir élargir la diversité structurale autour de la famille des aza-DCPs. La variation des substituants sur les quatre positions de l'hétérocycle ayant été déjà largement étudiée, nous nous sommes donc intéressés à la structure bicyclique de type énamide **4**, dont la double liaison devrait permettre d'introduire des fonctionnalités supplémentaires (Schéma 42). Si la mono-fonctionnalisation a été déjà explorée au laboratoire, la double fonctionnalisation n'a jamais été réalisée jusqu'à présent. La réactivité spécifique des énamides nous offre la possibilité d'utiliser à ce but des réactions de cycloadditions employant habituellement des diénophiles enrichis. Nous avons ainsi sélectionné, pour cette première étude de difonctionnalisation, la réaction de Povarov. Cette réaction nous permettrait d'une part de fusionner le châssis aza-DCP avec un squelette tétrahydroquinoléine (THQ), connu pour de nombreuses applications en synthèse organique<sup>61</sup> et en chimie médicinale.<sup>62</sup> D'autre part, cette réaction pouvant être effectuée en tri-composante entre l'énamide **4**, une *N*-aryl amine et un aldéhyde, de nombreuses variations pourront facilement être effectuées sur les différentes positions de la THQ.

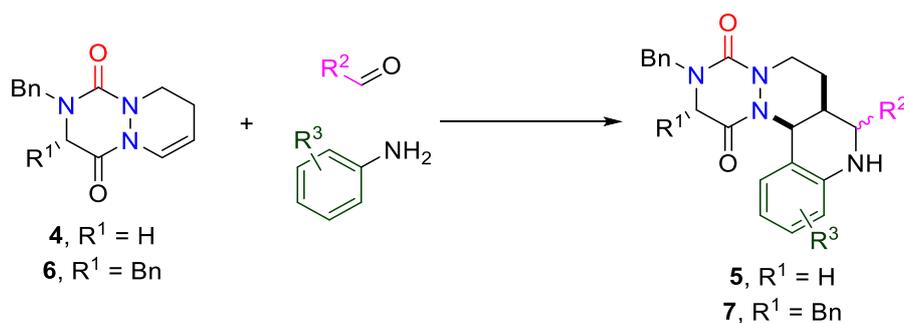
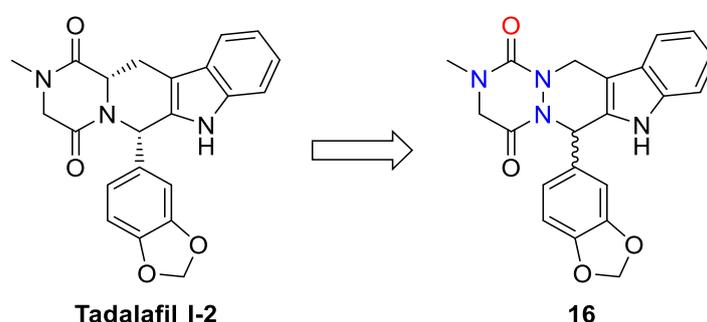


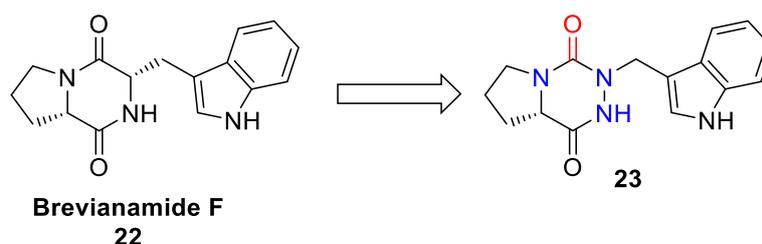
Schéma 42. Réaction de Povarov en tri-composante sur l'aza-DCP **4** ou **6**

Nous nous sommes intéressés par la suite à la synthèse d'analogues aza-DCP de DCPs bioactives afin d'augmenter les chances d'obtenir une activité biologique sur une aza-DCP, mais aussi de comparer leurs propriétés pour mieux comprendre l'impact de cette modification structurale. Nous avons ainsi sélectionné le Tadalafil I-2, un inhibiteur de PDE-5 approuvé par la FDA, comme première cible avec l'aza-DCP **16** comme analogue (Figure 18). L'introduction de l'azote supplémentaire à cette position permet en effet de supprimer un centre asymétrique au sein de la molécule et de potentiellement davantage modifier l'orientation des substituants que dans l'exemple décrit par Lilly en 2002.<sup>37</sup>



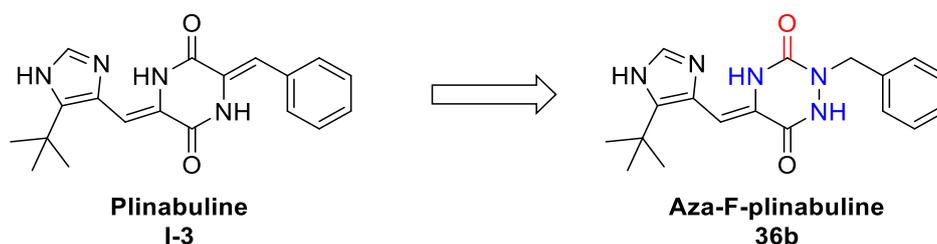
**Figure 18.** Structure du Tadalafil I-2 et de l'aza-DCP analogue **16**

La seconde DCP ciblée durant cette étude est la Brévianamide F **22** (Figure 19). Cette cible est une molécule naturelle synthétisée par les champignons *A.fumigates* et *Aspergillus sp.* qui présente des activités anti-bactériennes<sup>63,64</sup> et anti-fongiques<sup>64</sup> du même ordre de grandeur que la Ciprofloxacine et l'Amphotéricine B respectivement. Cependant, une hépatotoxicité ayant été associée à la Brévianamide F son développement s'est arrêté prématurément.<sup>65,66</sup> Nous avons décidé de synthétiser l'analogue aza-DCP **23** de la Brévianamide F et de le tester sur différentes souches bactériennes et fongiques. Dans un second temps, son hépatotoxicité sera évaluée et comparée à celle de la Brévianamide F.



**Figure 19.** Structures de la Brévianamide F **22** et son analogue aza-DCPs **23**

Nous avons enfin sélectionné la plinabuline **I-3** comme dernière DCP modèle pour cette étude (Figure 20). Cette DCP possède de nombreuses activités biologiques particulièrement intéressantes dans le cadre du traitement du cancer : augmentation de la réponse immunitaire, diminution de l'apport sanguin à la tumeur et réduction de la neutropénie induite par chimiothérapie. Ces différentes propriétés lui ont permis d'entrer en phase 3 de développement clinique en association avec le Docetaxel dans le traitement du cancer du poumon non à petites cellules.



**Figure 20.** Structures de la plinabuline **I-3** et d'un de ces analogues aza-DCPs **36b**

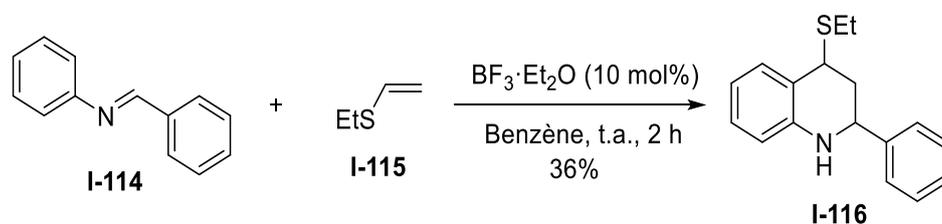
# CHAPITRE 2.

## DIVERSIFICATION DES AZA-DCPS PAR LA REACTION DE POVAROV

### 1. Rappels bibliographiques

#### 1.1. Généralités sur la réaction de Povarov

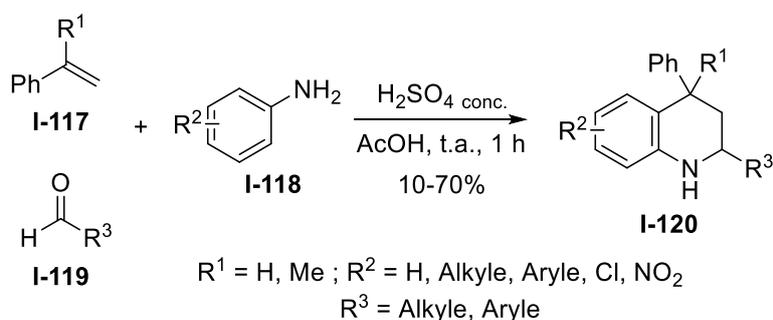
Découverte au début des années 1960,<sup>67,68</sup> la réaction de Povarov fait aujourd'hui partie des principales méthodes pour la synthèse de tétrahydroquinolines avec des applications en synthèse organique<sup>69, 70, 71</sup> ou en chimie médicinale.<sup>72,73</sup> Cette réaction permet l'obtention de squelettes tétrahydroquinoléines à partir d'un iminodiène et d'un diénophile enrichi, en présence d'un catalyseur acide de Lewis ou de Brønsted. Un des premiers exemples publiés par Povarov en 1962, décrit la réaction entre la *N*-benzylidèneaniline **I-114** et le thioéther d'énol **I-115** catalysée par  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  dans le benzène qui conduit après 2 h à température ambiante à la tétrahydroquinoléine **I-116** correspondante avec 36% de rendement (Schéma 43).<sup>68</sup>



**Schéma 43.** Une des premières réactions de Povarov sur un thioéther d'énol

La réaction de Povarov, décrite originellement comme une réaction impliquant deux partenaires (2CPR), peut également être effectuée en version à trois composants (3CPR) via la formation *in situ* de l'iminodiène par réaction entre l'aniline et l'aldéhyde correspondants. Avec cette version 3CPR, la réaction de Povarov peut être considérée faisant partie des réactions multicomposants (MCRs) qui offrent de nombreux avantages synthétiques comme l'économie d'étapes et d'atomes, une diversification facile des produits (par synthèse parallèle notamment) et une simplicité de mise en œuvre de la réaction.

Ainsi, le premier exemple de réaction de Povarov en 3CPR est décrit par Hesse en 1970.<sup>74</sup> La réaction est ici réalisée sur des dérivés de styrènes **I-117**, d'anilines **I-118** et d'aldéhydes **I-119** aliphatiques ou aromatiques catalysés par l'acide sulfurique concentré dans l'acide acétique (Schéma 44). Les tétrahydroquinoléines **I-120** correspondantes sont isolés avec des rendements compris entre 10 et 70%.



**Schéma 44.** Premiers exemples de réaction de Povarov en 3CPR

Différents travaux ont suivi par la suite pour améliorer ces résultats et faire de la réaction de Povarov, une MCR reconnue en chimie organique. En 1988, Bahsas et Grieco, en travaillant sur une réaction d'aza-Diels-Alder entre des iminiums et le cyclopentadiène,<sup>75</sup> ont mis en évidence une réaction de Povarov multicomposante.<sup>76</sup> Ainsi, en réalisant cette réaction entre le sel de l'aniline avec l'acide trifluoroacétique **I-121**, le formaldéhyde et le cyclopentadiène **I-122**, dans l'acétonitrile à la surprise des auteurs, le cycloadduit **I-123** issu de la réaction d'aza-Diels-Alder entre l'iminium diénophile et le cyclopentadiène n'a pas été détecté (Schéma 45). Par contre, deux produits diastéréomères **I-124** et **I-124'**, issus de la double réaction de Povarov ont été isolés avec un rendement de 98% et dans un ratio 3,7/1.

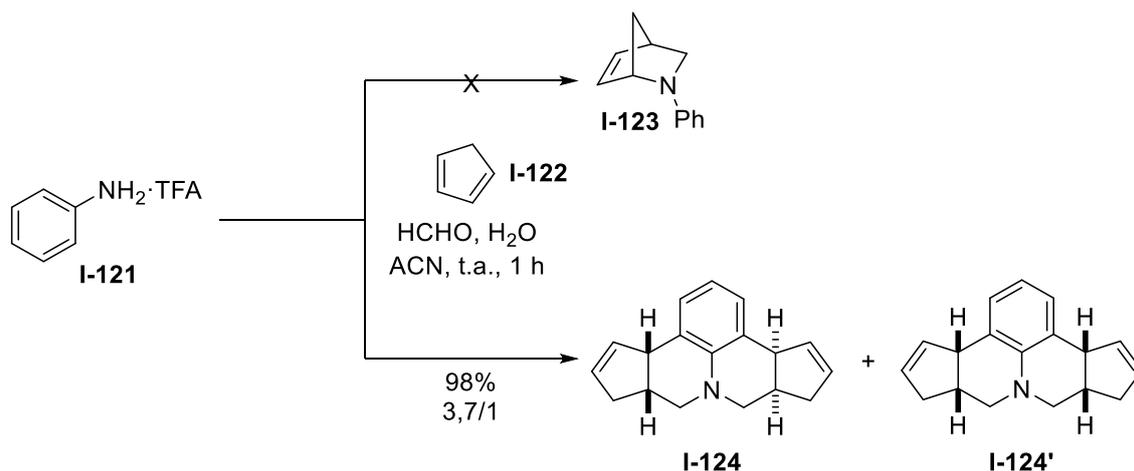


Schéma 45. Réaction de Povarov en 3CPR

Kobayashi *et al.*<sup>77</sup> ont ensuite décrit un des premiers exemples employant une quantité catalytique d'acide de Lewis, ici 5 à 20 mol% de triflate d'ytterbium, dans l'acétonitrile à température ambiante, à partir du cyclopentadiène **I-122**, d'une aniline **I-125** et d'un aldéhyde **I-126** pour obtenir les tétrahydroquinolines **I-127** correspondantes avec des rendements compris entre 56 et 100% (Schéma 46).

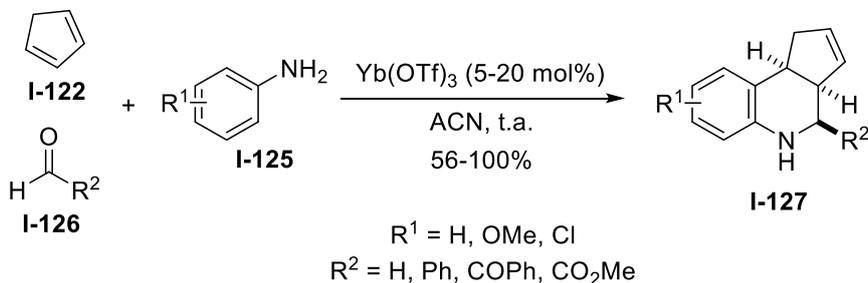
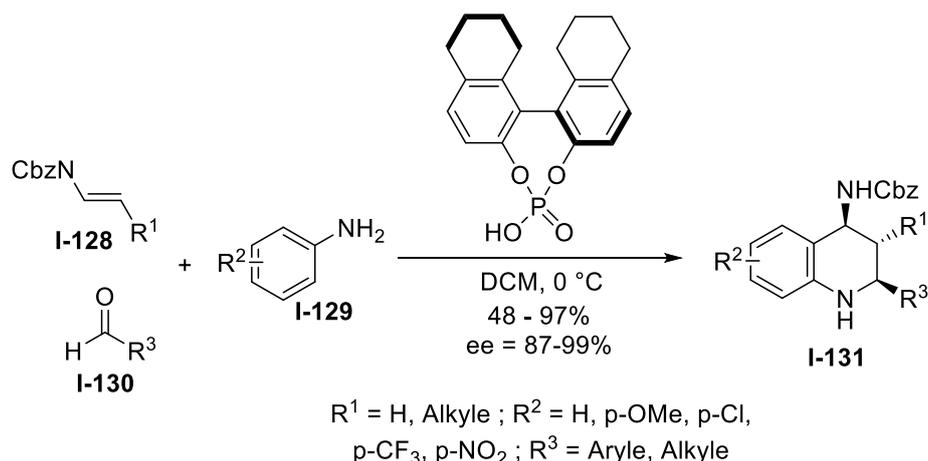


Schéma 46. Premier exemple de réaction de Povarov acido-catalysée en 3CPR

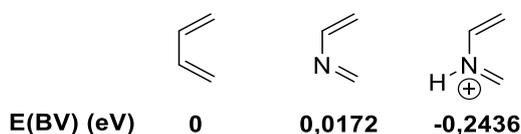
Enfin, le groupe de Masson et Zhu<sup>78,79</sup> ont décrit de nombreux exemples de réactions de Povarov énantiosélectives en 3CPR, catalysées par un acide phosphorique chiral (Schéma 47). Les différents partenaires réactionnels impliqués ont permis d'obtenir les tétrahydroquinoléines **I-131** correspondantes avec d'excellents excès énantiomériques et de très bons rendements.



**Schéma 47.** Exemples de réactions de Povarov énantiosélectives en 3CPR

### 1.1.1. Considérations mécanistiques

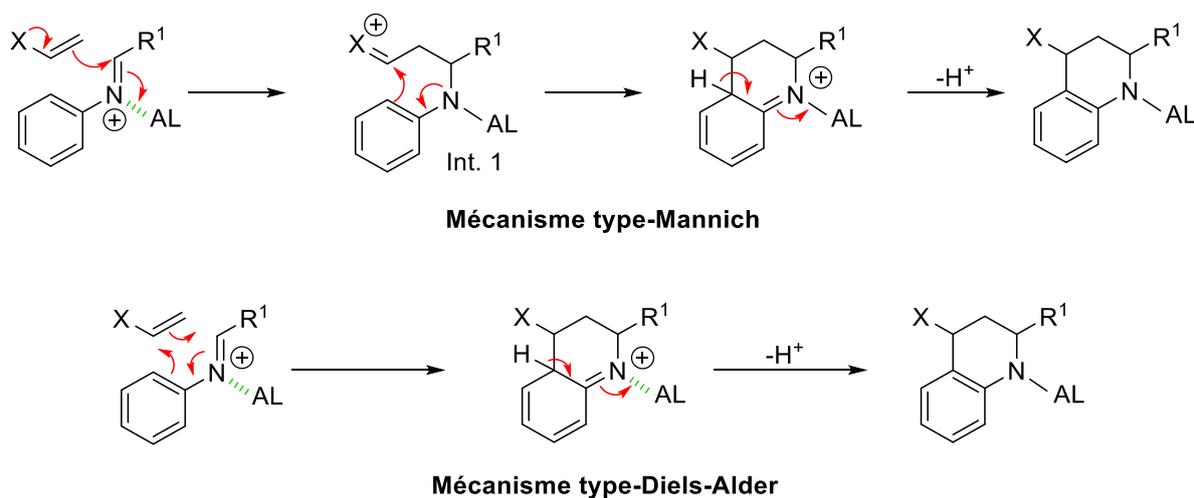
La réaction de Povarov peut être considérée comme une réaction d'aza-Diels-Alder à demande inverse, où l'aza-diène utilisé doit être activé par un acide de Brønsted ou de Lewis. En effet, étant légèrement plus riche en électrons que son équivalent carboné, l'aza-diène ne peut pas réagir sans assistance électrophile. Ceci a été mis en évidence lors de calculs *ab initio*, via la méthode Hartree-Fock, réalisés par G. Dagousset lors de sa thèse.<sup>80</sup> Il a été montré que l'énergie de l'orbitale la plus basse vacante (BV) du 2-aza-butadiène se place 0,0172 eV au-dessus de la BV de référence du butadiène bloquant la réaction cinétiquement. Cependant l'ajout d'une assistance électrophile, modélisé ici par un proton venant former l'iminium correspondant, abaisse la BV de ce système à -0,2436 eV (Figure 21), en lui permettant ainsi d'agir comme un diène très appauvri et rendre la réaction possible.



**Figure 21.** Energie de la BV de différents diènes

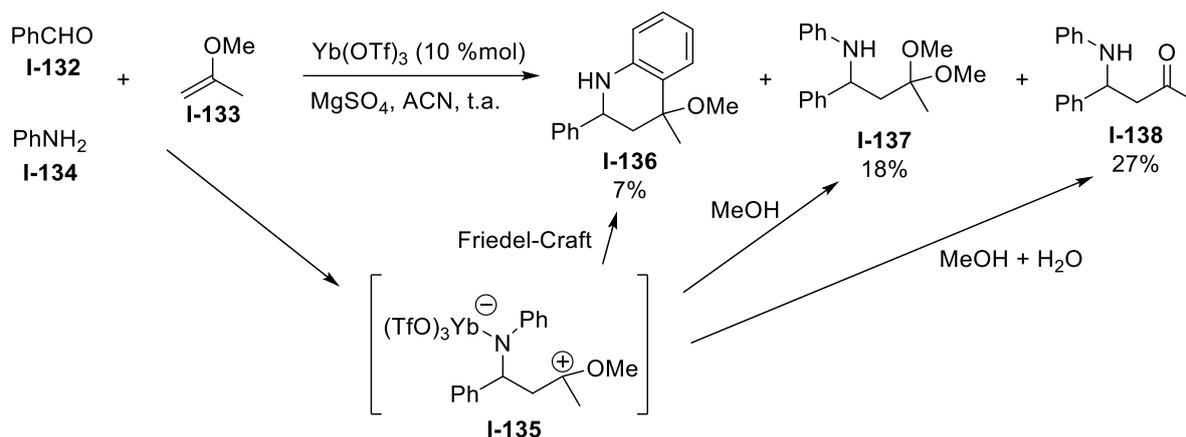
Pour catalyser cette réaction, de nombreux acides de Lewis comme  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ <sup>68</sup>,  $\text{AlCl}_3$  ou  $\text{AlBr}_3$ <sup>81</sup>,  $\text{BiCl}_3$ <sup>82</sup> ou les triflates de lanthanides<sup>77</sup> peuvent être utilisés. Divers exemples utilisent également des acides de Brønsted comme l'acide acétique<sup>83</sup> ou des dérivés d'acides phosphoriques chiraux donnant lieu à d'excellentes énantiosélectivités et diastéréosélectivités.

Enfin, bien que la nature de son mécanisme soit toujours débattu, deux chemins réactionnels principaux sont aujourd'hui employés pour rationaliser les résultats observés. Cette réaction peut donc suivre un mécanisme en deux étapes proche de celui de la réaction de Mannich ou un mécanisme concerté de type Diels-Alder (Schéma 48).



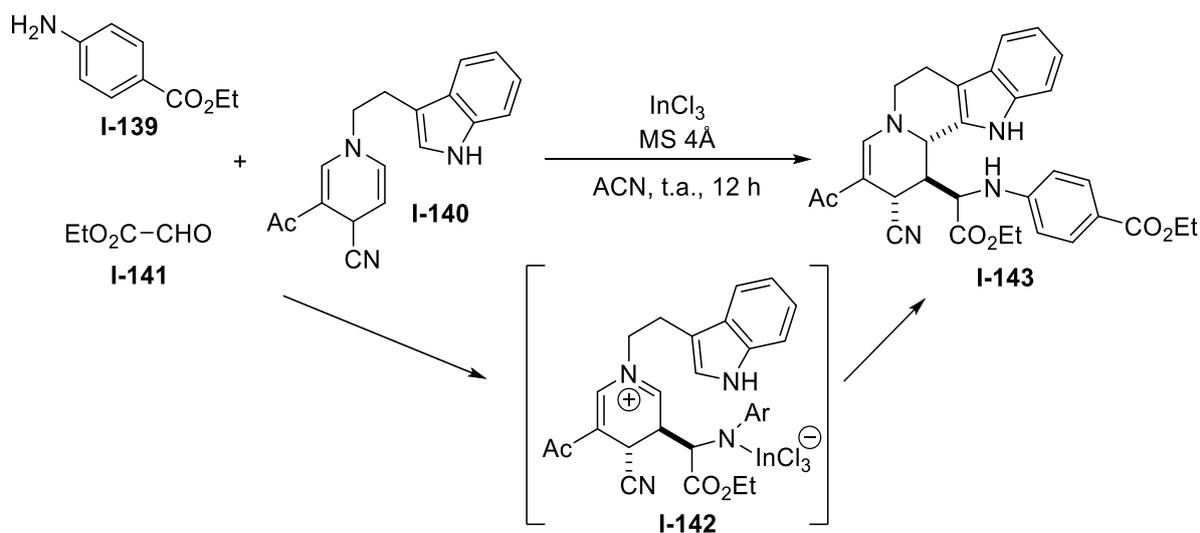
**Schéma 48.** Différents mécanismes possibles pour la réaction de Povarov

Il semblerait, au vu des différents résultats publiés dans la littérature, que le mécanisme suivi par la réaction dépend principalement du diénophile employé et de sa réactivité. Par exemple, lors des travaux sur la réaction de Povarov des deux groupes de Kobayashi<sup>77</sup> et de Lavilla<sup>84</sup>, la présence de certains produits obtenus n'a pu s'expliquer que par un mécanisme en plusieurs étapes (Schéma 49). En effet, Kobayashi *et al.* ont pu isoler une cétone **I-137** et son cétal **I-138** comme produits majoritaires de leur réaction de Povarov en version tricomposante, ces deux produits ne pouvant provenir que du piégeage de l'intermédiaire **I-135** par du méthanol et de son hydrolyse.



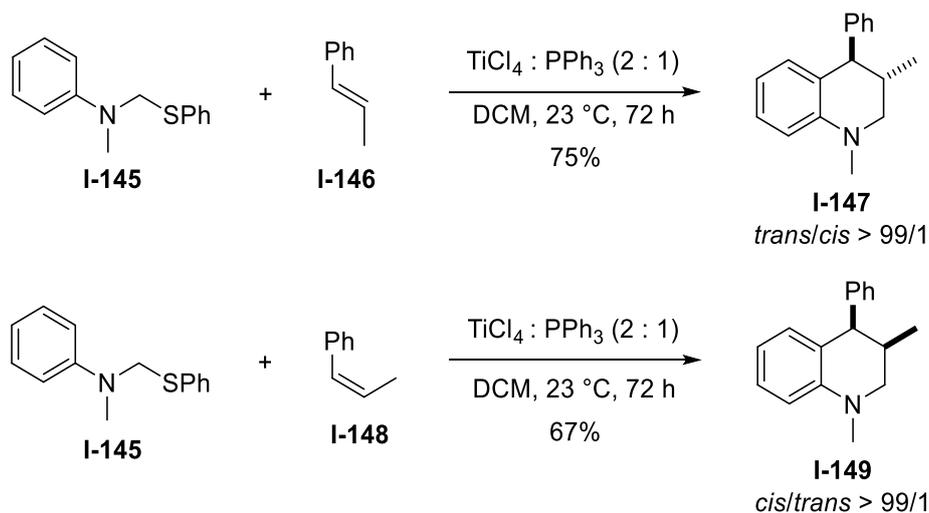
**Schéma 49.** Piégeage intermoléculaire d'un intermédiaire réactionnel d'une réaction de Povarov par le méthanol

Lavilla *et al.* ont effectué une expérience similaire avec le piégeage du même type d'intermédiaire par un indole présent au sein de l'intermédiaire **I-142** via une cyclisation intramoléculaire de type Pictet-Spengler (Schéma 50).



**Schéma 50.** Piégeage intramoléculaire d'un intermédiaire réactionnel d'une réaction de Povarov par une réaction de Pictet-Spengler

D'autre part, V. Ondrus *et al.* ont quant à eux pu observer la stéréosélectivité de la réaction en utilisant un dérivé styrénique comme diénophile peu enrichi.<sup>85</sup> Dans cet exemple, lorsque le (*E*)-méthylstyrène **I-146** est employé (*resp.* le (*Z*)-méthylstyrène **I-149**) seul l'adduit *trans* **I-147** (*resp.* l'adduit *cis* **I-149**) est observé avec une sélectivité totale (Schéma 51).



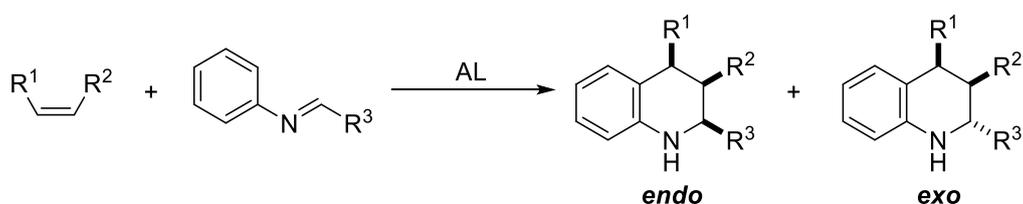
**Schéma 51.** Mise en évidence de la stéréospécificité de la réaction de Povarov sur des dérivés styréniques

D'autres expériences conduites par V. Ondrus *et al.* ont également montré que :

- aucune isomérisation du dérivé styrénique de départ n'était possible dans les conditions réactionnelles.
- l'adduit *cis* est moins stable que l'adduit *trans* (calculs semi-empiriques).

Enfin, comme aucun intermédiaire correspondant au mécanisme de type Mannich n'a été observé ici, un mécanisme de type Diels-Alder semble plus adapté pour rationaliser ces résultats.

Bien que les deux mécanismes soient envisageables, d'après les données de la littérature, ces deux chemins réactionnels conduisent aux deux mêmes diastéréoisomères qui peuvent s'apparenter aux produits obtenus par les approches *endo* et *exo* que l'on retrouve classiquement dans la réaction de Diels-Alder (Schéma 52).

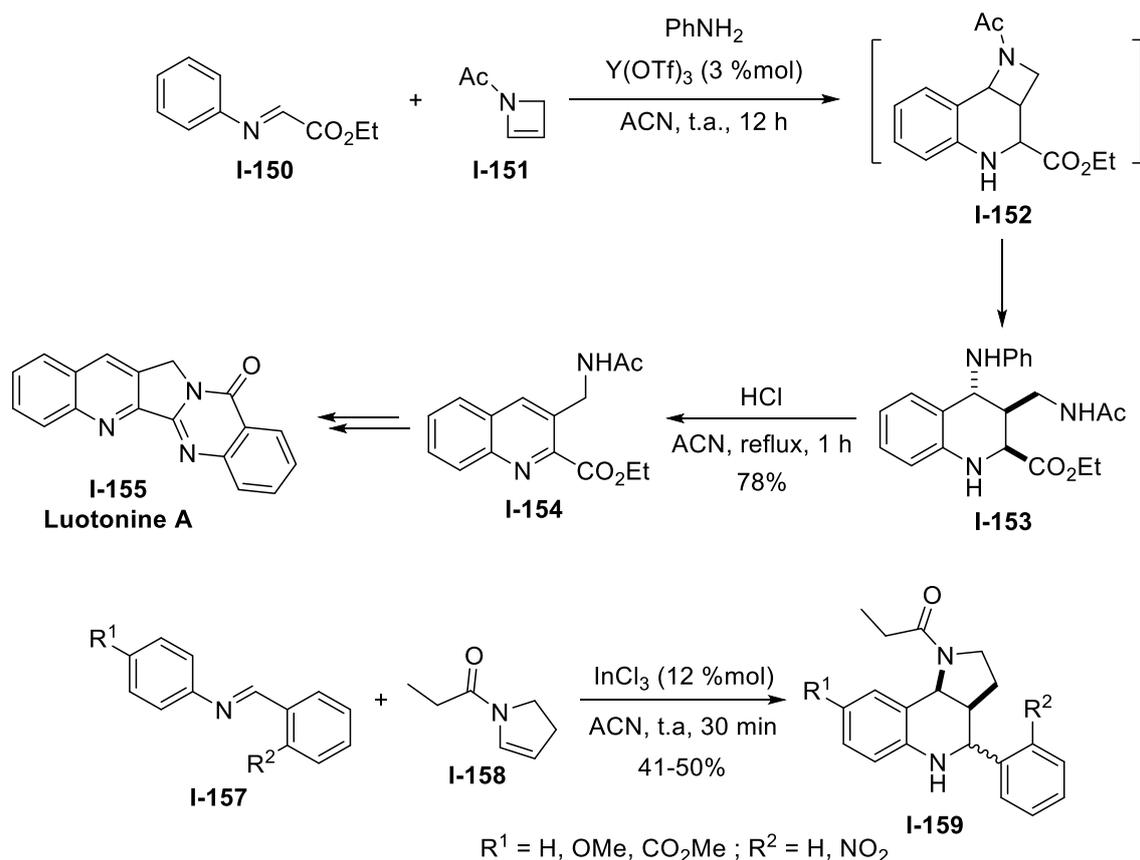


**Schéma 52.** Structure des deux diastéréoisomères formés lors de la réaction de Povarov

### 1.1.2. Les différents diénophiles de la réaction de Povarov

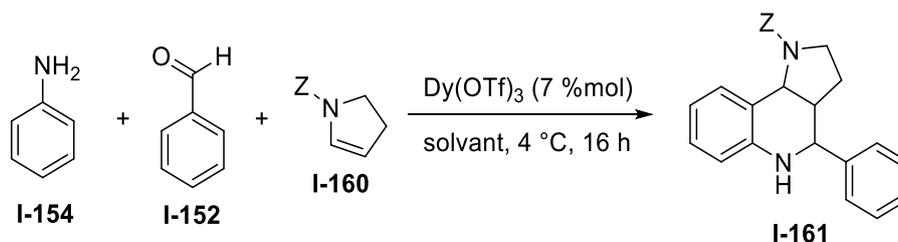
Depuis les premiers résultats de Povarov dans les années 1960, cette réaction a pu être généralisée à diverses diénophiles enrichis comme les thioéthers d'énol<sup>68</sup>, les éthers d'énol<sup>68</sup>, les énamines<sup>86</sup>. Cette réaction a également été réalisée sur des diénophiles peu enrichis ou non-activés comme les dérivés de norbornène<sup>87</sup>, de cyclopentadiène<sup>88</sup>, de styrène<sup>84</sup> ou même d'alcynes<sup>89</sup>.

Parmi les diénophiles enrichis, les énamides et les ène-carbamates ont également été beaucoup décrits dans la littérature comme partenaire dans la réaction de Povarov.<sup>61, 78,90</sup> Cependant, les dérivés énamides ou ène-carbamates endocycliques n'ont été que très peu décrits dans la littérature bien qu'ils représentent des substrats d'intérêt pour la synthèse de structures *N*-polyhétérocycliques avec de potentielles applications en chimie médicinale. Stevenson *et al.* ont notamment décrit deux exemples de réactions de Povarov sur des énamides endocycliques à 4<sup>91</sup> et 5<sup>92</sup> chaînons (Schéma 53). Dans le premier exemple, les auteurs ont astucieusement utilisé le *N*-Acetyl-1,2-dihydroazete **I-151** comme diénophile pour former un adduit **I-152** qui, par attaque de l'aniline et rupture de la tension de cycle de l'azétidine, donne le dérivé **I-153**. Ce dernier conduit, par élimination de l'aniline en conditions acides puis oxydation, à la quinoléine **I-154** correspondante qui après plusieurs étapes a permis aux auteurs d'obtenir la Luotonine A **I-155**. Dans un second exemple, Stevenson *et al.* ont également décrit une réaction de Povarov sur un énamide endocyclique à 5 chaînons **I-158** catalysée par 12 %mol de InCl<sub>3</sub> qui après 30 minutes de réaction conduit aux adduits **I-159** avec des rendements proche de 50% et des ratios diastéréomériques compris entre 1/1 et 3/2 en faveur du produit *endo*.



**Schéma 53.** Exemples de réaction de Povarov sur des enamides endocycliques à 4 et 5 chaînons

Batey *et al.*<sup>93</sup> ont montré sur un exemple d'ène-carbamate endocyclique à 5 chaînons **I-160** l'importance du solvant dans la réaction de Povarov (Tableau 4). Dans leurs travaux, les auteurs ont tout d'abord observé de faibles diastéréosélectivités dans l'acétonitrile et le DMF anhydres (Entrées 1-2). En revanche, l'utilisation de ces mêmes solvants avec de l'eau comme co-solvant leur a permis d'obtenir une meilleure diastéréosélectivité en faveur du produit *endo*, mais au détriment des rendements (Entrée 3-4).

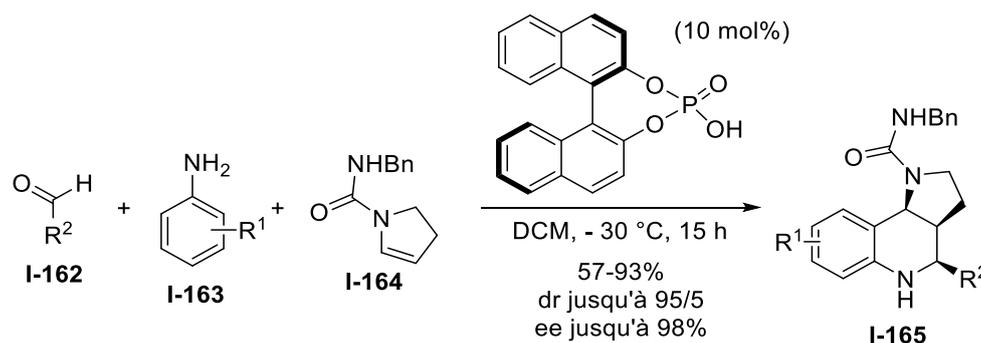


Entrée	Solvant	dr ( <i>endo/exo</i> ) <sup>[a]</sup>	Yield <sup>[b]</sup>
1	ACN	51/49	91%
2	DMF	70/30	35%
3	MeCN/H <sub>2</sub> O (9/1)	65/35	55%
4	DMF/H <sub>2</sub> O (4/1)	97/3	26%

[a] Mesuré par RMN sur le brut réactionnel ; [b] Rendements isolés

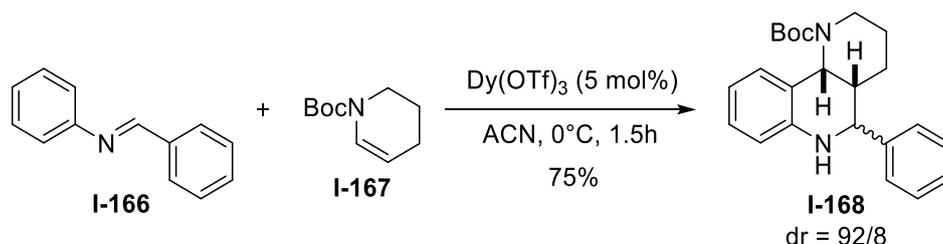
**Tableau 4.** Influence de la nature du solvant sur le rendement et la diastéréosélectivité dans la réaction de Povarov par Dagousset *et al.*

Enfin, une ènethiourée endocyclique à 5 chaînons **I-164** a été utilisée comme partenaire dans une réaction de Povarov énantioselective catalysée par des acides phosphoriques chiraux (Schéma 54).<sup>94</sup> En variant les aldéhydes **I-162** et les anilines **I-163**, une série de hexahydropyrroloquinoléines **I-165** énantiorenrichies ont été obtenues sous la forme du stéréoisomère *endo* majoritaire, avec d'excellents rendements et excès énantiomériques.



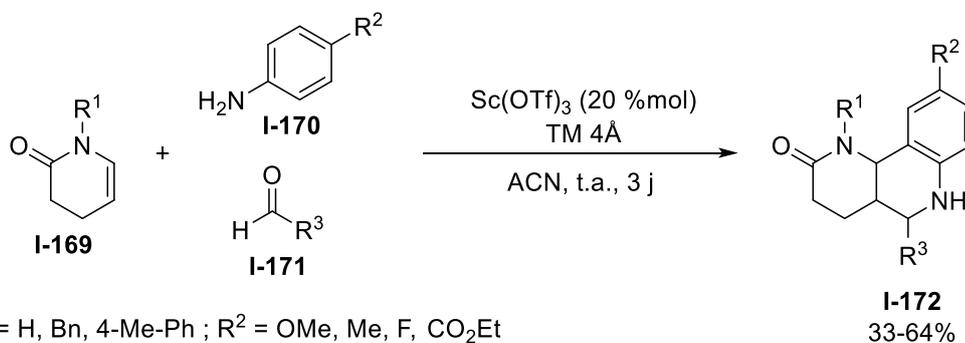
**Schéma 54.** Catalyse énantiosélective d'une réaction de Povarov sur une ènethiourée endocyclique à 5 chaînons

Kajino *et al.* ont quant à eux réalisé une réaction de Povarov sur un dérivé ène-carbamate de pipéridine **I-167** pour obtenir les adduits **I-168** correspondants avec une excellente diastéréosélectivité en faveur du produit *endo* (Schéma 55).<sup>95</sup>



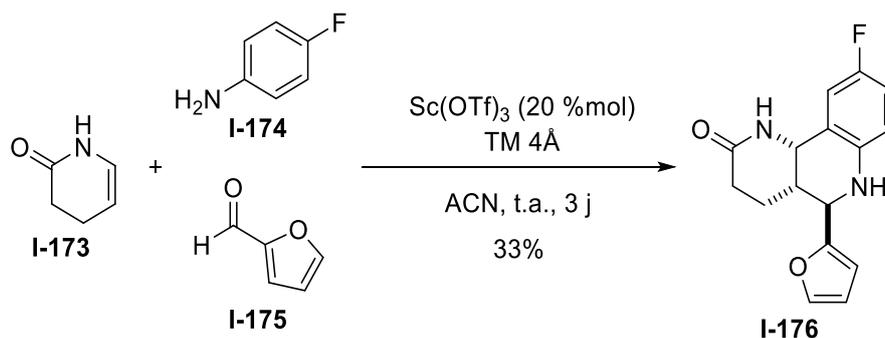
**Schéma 55.** Réaction de Povarov sur un éne-carbamate endocyclique à 6 chaînons par Kajino *et al.*

Enfin le seul exemple d'énamide endocyclique à 6 chaînons décrit dans la littérature a été publié par Vicente-Garcia *et al.* qui ont pu obtenir les adduits **I-172** de Povarov d'un dérivé de  $\delta$ -lactame insaturé **I-169** via une catalyse au  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  après trois jours de réaction avec des rendements modérés (Schéma 56).<sup>96</sup>

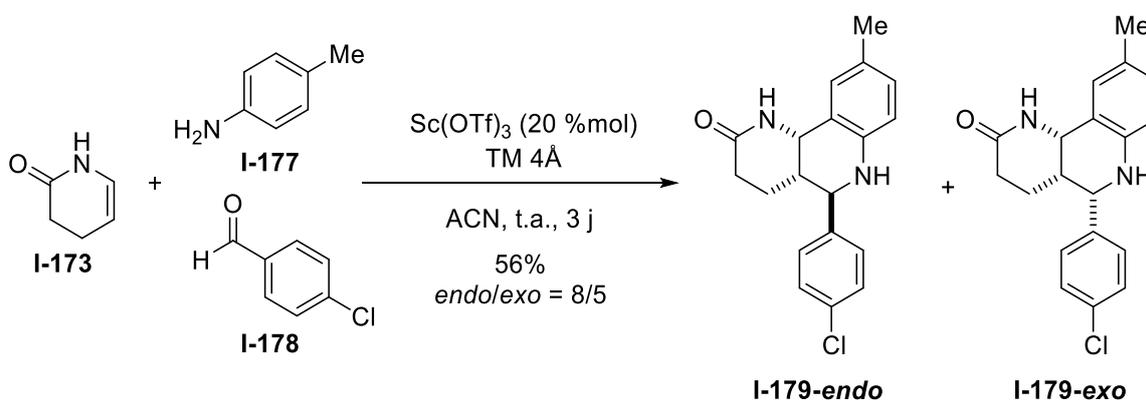


**Schéma 56.** Réaction de Povarov sur une  $\delta$ -lactame insaturée par Vicente-Garcia *et al.*

Les ratios diastéréomériques observés ici étaient majoritairement faibles, entre 1/1 et 8/5, en faveur de l'isomère *exo* mais certains exemples ont montré des résultats différents. Lors de l'utilisation du furfural **I-175**, seul l'isomère **I-176** *exo* a été observé et isolé à hauteur de 33% de rendement par le groupe de Vicente-Garcia (Schéma 57) tandis que le 4-chlorobenzaldéhyde **I-178** a conduit à la formation majoritaire de l'isomère *endo* **I-179-endo** dans un ratio *endo/exo* de 8/5 (Schéma 58).



**Schéma 57.** Réaction de Povarov tricomposante sur une énamide à 6 chaînons conduisant exclusivement au dérivé *exo*



**Schéma 58.** Réaction de Povarov tricomposante sur une énamide à 6 chaînons conduisant majoritairement au composé *endo*

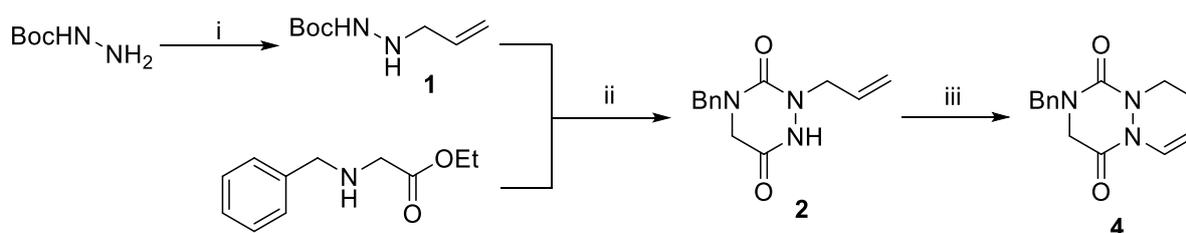
L'aza-DCP bicyclique **3** (Schéma 42, page 62) appartient d'un point de vue structural à la famille des énamides endocycliques à 6 chaînons, qui appartiennent donc à une catégorie de diénophiles peu étudiés dans la réaction de Povarov. L'étude de cette réaction sur cette plateforme originale représente donc une excellente opportunité tant du point de vue de la diversification structurale des aza-DCPs que d'un point de vue méthodologique vis-à-vis de la réaction de Povarov en elle-même.

## 2. Résultats et discussions

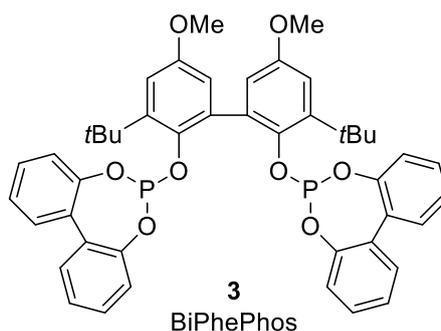
### 2.1. Synthèse du précurseur aza-DCP bicyclique **4**

Nous avons dans un premier temps synthétisé le précurseur aza-DCP bicyclique **4** comme dérivé achiral d'énamide endocyclique afin de réduire le nombre de diastéréoisomères pouvant être obtenus. Selon une séquence décrite par le laboratoire (Tableau 2)<sup>54</sup>, le *tert*-butyl carbazate a tout d'abord été *N*-allylé pour donner

le carbazate **1** avec un rendement de 62%. L'estér éthylique de *N*-benzyl glycine est ensuite mis en présence de l'allyle de *tert*-butyl carbazate **1** et de triphosgène pour conduire à l'allyle d'aza-DCP **2** avec 58% de rendement. Ce dernier est ensuite traité selon des conditions de cyclohydrocarbonylation catalysées au rhodium pour donner l'aza-DCP bicyclique **4** attendue. Lorsque la réaction a été effectuée dans les conditions décrites par la procédure précédente<sup>54</sup> sur une échelle de 300 mg de l'allyle d'aza-DCP **2**, avec 2 %mol de Rh(acac)(CO)<sub>2</sub> et 6 %mol de BiPhePhos **3**, le rendement obtenu a été de 74% (Tableau 5, entrée 1). Les coûts de la source de rhodium Rh(acac)(CO)<sub>2</sub> étant élevés, nous avons essayé de diminuer progressivement leur quantité tout en augmentant l'échelle de la réaction (Tableau 5, Entrées 2 et 3). Finalement, la réaction a pu être réalisée avec une conversion totale sur 1,4 g de substrat avec seulement 0,25 %mol de Rh(acac)(CO)<sub>2</sub> et 0,75 %mol de BiPhePhos, tout en conservant un très bon rendement de 71% (Tableau 5, Entrée 4).



- (i) Bromure d'allyle, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, THF, DMF, 80 °C, 16 h, 62%  
(ii) Triphosgène, DIEA, THF, DCM, 40 °C, 16 h, 58%  
(iii) Rh(acac)(CO)<sub>2</sub>, BiPhePhos **3**, CO/H<sub>2</sub> (5 bars, 1/1), PPTS, THF, 70 °C, 16 h



Entrée	Echelle (mg)	[Rh] (%mol)	BiPhePhos <b>3</b> (%mol)	Rendement (%)
1	300	2	6	74
2	500	1	3	73
3	900	0,5	1,5	72
4	1400	0,25	0,75	71

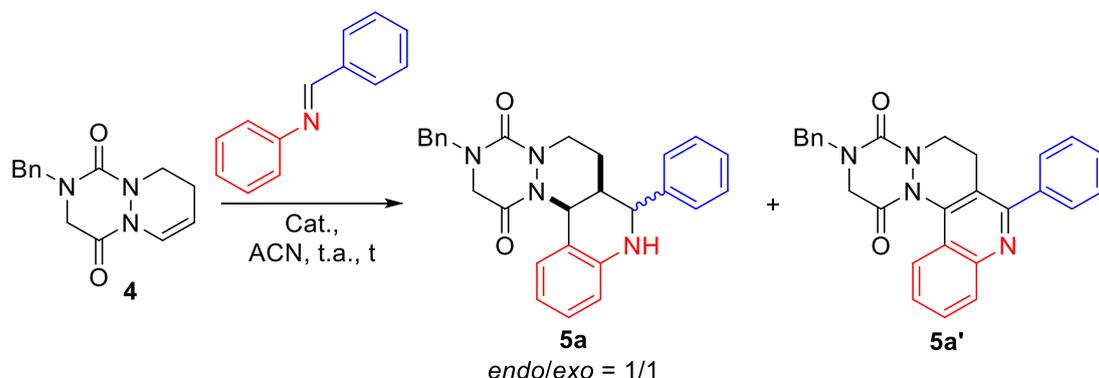
**Tableau 5.** Optimisation de la réaction de cyclohydrocarbonylation pour obtenir **4**

## 2.2. Optimisation des conditions réactionnelles

Dans un premier temps, la réaction dicomposante (2CPR) entre l'énamide **4** et la *N*-benzylideneaniline a été réalisée dans les conditions classiques d'une réaction de Povarov, avec un excès d'imine<sup>97</sup> (1,4 équiv.) et 1 équivalent de BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O comme acide de Lewis, dans l'acétonitrile, à température ambiante (Tableau 6, Entrée 1). Une conversion complète est observée après 18 h et un mélange équimolaire (mesuré par HPLC du brut réactionnel) des deux diastéréoisomères *endo/exo* du produit attendu **5a** est obtenu, avec comme sous-produit minoritaire **5a'**, issu de l'aromatisation déshydrogénante de **5a'**. La formation de **5a'** est vraisemblablement due à l'excès d'imine qui, jouant le rôle d'oxydant, serait réduite en *N*-benzylaniline.<sup>98</sup> Le rendement global isolé de cette réaction est de 45% et les deux diastéréoisomères ont été séparés par chromatographie en phase inverse afin de confirmer leur structure par analyses RMN. Le choix de la méthode de purification a été ici déterminant pour obtenir une bonne séparation et un rendement optimal sur cette réaction, l'utilisation de la chromatographie en phase normale menant à des dégradations de **5a** tandis qu'une cristallisation ne permettait pas d'isoler **5a** des autres réactifs et produits de la réaction. Vis-à-vis du solvant de la réaction, le remplacement de l'acétonitrile par le dichlorométhane a conduit à une conversion incomplète après 18 h et davantage de sous-produit **5a'** formé (Tableau 6, Entrée 2). Lorsque la réaction a été réalisée à 50 °C dans l'acétonitrile, une formation plus importante du sous-produit **5a'** a encore été observée (Tableau 6, Entrée 3). Cependant, l'utilisation de seulement un équivalent d'imine dans les mêmes conditions que le premier essai a permis d'éviter totalement la formation de **5a'** et d'obtenir un meilleur rendement isolé de 69% pour **5a** (Tableau 6, Entrée 4). D'autre part lorsque la quantité de BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O a été réduite à 30 %mol, 48 h ont été nécessaires pour atteindre la complétion avec un rendement chutant à 39% (Tableau 6, Entrée 5).

D'autres acides de Lewis comme Sc(OTf)<sub>3</sub>, Yb(OTf)<sub>3</sub>, et Dy(OTf)<sub>3</sub>, dont l'efficacité en tant que catalyseur est reconnue dans la réaction de Povarov, ont également été testés à 30 %mol. Cependant, bien que des rendements similaires à ceux observés avec BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O ont été obtenus, 3 à 4 jours de réaction étaient nécessaires pour obtenir une conversion totale (Tableau 6, Entrées 6 à 8). Enfin l'acide trifluoroacétique et le diphenyl phosphate ont été testés comme catalyseurs de type acide de Brønsted,

conduisant respectivement à seulement 41% de rendement pour **5a** ou à une conversion nulle après 2 jours de réaction (Tableau 6, Entrées 9 et 10).

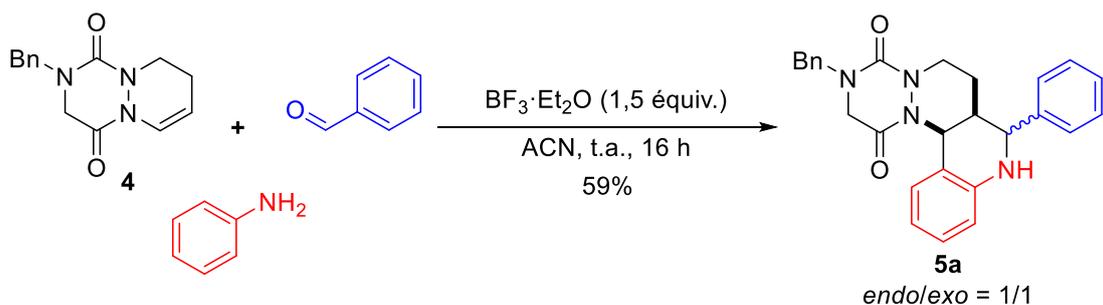


Entrée	Catalyseur	Ratio 4/imine/Cat.	<i>t</i>	Ratio <sup>[a]</sup> 4/5a/5a'	Rendement (%) <sup>[b]</sup>
1	BF <sub>3</sub> ·Et <sub>2</sub> O	1/1,4/1	16 h	0/9/1	45
2 <sup>[c]</sup>	BF <sub>3</sub> ·Et <sub>2</sub> O	1/1,4/1	16 h	1/1/1	nd <sup>[d]</sup>
3 <sup>[e]</sup>	BF <sub>3</sub> ·Et <sub>2</sub> O	1/1,4/1	16 h	0/3/2	nd <sup>[d]</sup>
4	BF <sub>3</sub> ·Et <sub>2</sub> O	1/1/1	16 h	0/1/0	69
5	BF <sub>3</sub> ·Et <sub>2</sub> O	1/1/0,3	2 j	0/1/0	39
6	Sc(OTf) <sub>3</sub>	1/1/0,3	4 j	0/1/0	60
7	Yb(OTf) <sub>3</sub>	1/1/0,3	3 j	0/1/0	64
8	Dy(OTf) <sub>3</sub>	1/1/0,3	3 j	0/1/0	65
9	TFA	1/1/1	3 j	0/1/0	41
10	(PhO) <sub>2</sub> PO <sub>2</sub> H	1/1/0,3	2 j	1/0/0	nd <sup>[d]</sup>

[a] Mesurés par HPLC sur le brut réactionnel. [b] Rendements isolés de **5a** (*endo* + *exo*). [c] DCM employé comme solvant. [d] Non déterminé. [e] Réaction réalisée à 50 °C.

**Tableau 6.** Optimisation de la réaction de Povarov sur l'énamide **4** avec la *N*-benzylidèneaniline

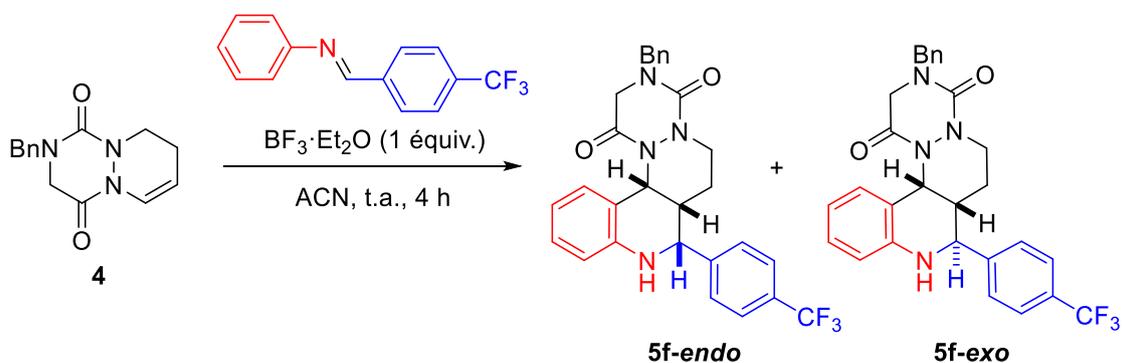
Les meilleures conditions en 2CPR pour obtenir **5a** ont ensuite été transposées à une version tricomposante (3CPR) entre l'énamide **4**, l'aniline et le benzaldéhyde (Schéma 59). En 3CPR, un léger excès de BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (1,5 équiv) était nécessaire pour obtenir une conversion totale et un rendement légèrement inférieur a été obtenu (59% vs 69%). Dans les deux cas le ratio *endo/exo* obtenu était similaire (≈ 1/1).



**Schéma 59.** Réaction de Povarov en 3CPR pour l'obtention de **5a**

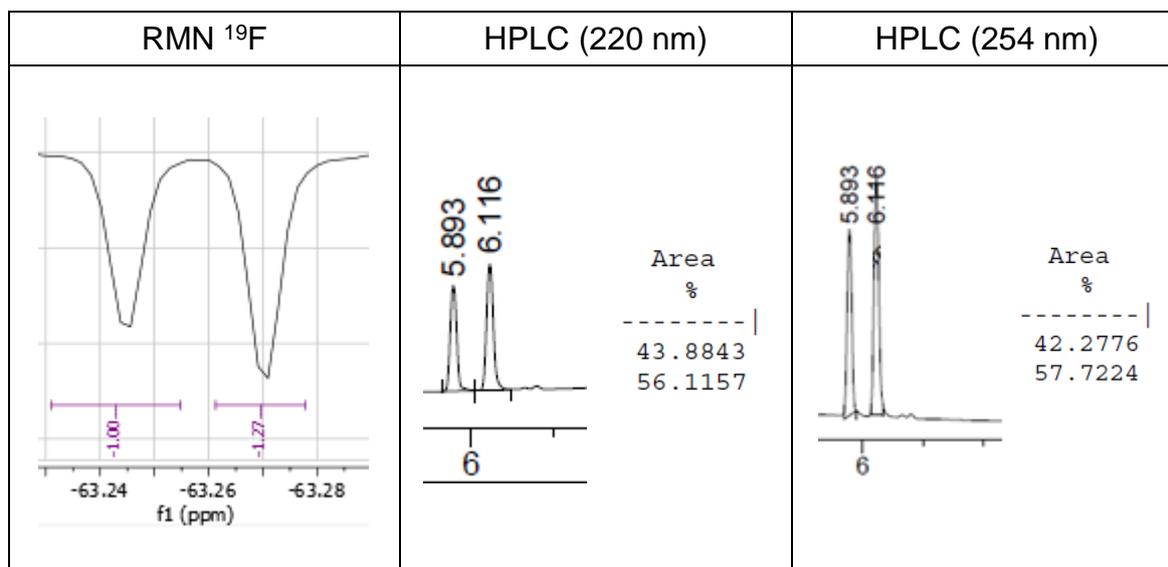
### 2.3. Mesure du ratio endo/exo

Avant d'étudier plus en détails l'étendue et les limites de cette réaction sur notre substrat, il était nécessaire d'avoir une méthode d'analyse fiable pour mesurer le ratio *endo/exo* de cette réaction. Classiquement, ce dernier est mesuré par RMN  $^1\text{H}$  du brut réactionnel par comparaison de deux signaux caractéristiques des deux produits. Cependant, la présence d'un équivalent de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  dans le milieu diminue grandement la résolution de la RMN  $^1\text{H}$  en élargissant l'ensemble des signaux ne permettant pas une analyse quantitative du brut réactionnel. Nous nous sommes donc tournés vers l'analyse du brut réactionnel par HPLC à détection par absorption UV. Deux molécules ne possédant pas nécessairement le même coefficient d'absorption molaire à une longueur d'onde donnée, une courbe d'étalonnage devrait en théorie être mesurée pour chaque composé. Ce travail étant consommateur en produit nous avons décidé de vérifier la justesse de la comparaison des aires des deux produits en HPLC à l'aide de la RMN  $^{19}\text{F}$ . Nous avons donc réalisé la réaction entre notre aza-DCP modèle **4** et le 4-trifluorométhylbenzylidèneaniline dans les conditions optimisées pour obtenir les deux adduits de Povarov correspondants **5f-endo** et **5f-exo** (Schéma 60).



**Schéma 60.** Réaction de Povarov entre l'aza-DCP et le 4-trifluorométhylbenzaldéhyde

Le brut réactionnel a ensuite été analysé par RMN  $^{19}\text{F}$  (le signal à -63,24 ppm correspond au produit **5f-exo**, celui à -63,27 ppm correspond à **5f-endo**) ce qui a conduit à un ratio RMN de 56/44, similaire à ceux obtenus par HPLC ( $t_{\text{R}}(\text{endo}) = 6.116$  min,  $t_{\text{R}}(\text{exo}) = 5.893$  min) aux longueurs d'onde de 220 nm (56/44) et 254 nm (58/42) (Figure 22).



**Figure 22.** Comparaison des ratios *endo/exo* obtenus par RMN  $^{19}\text{F}$  et HPLC à 254 et 220 nm

Les deux diastéréoisomères absorbent donc de manière équivalente à ces deux longueurs d'onde. Nous avons donc extrapolé ce résultat à l'ensemble des paires de diastéréoisomères obtenues lors de l'étude de l'étendue et des limites de la réaction où les ratios seront mesurés exclusivement par HPLC.

#### 2.4. Etude de l'étendue et des limites de la réaction

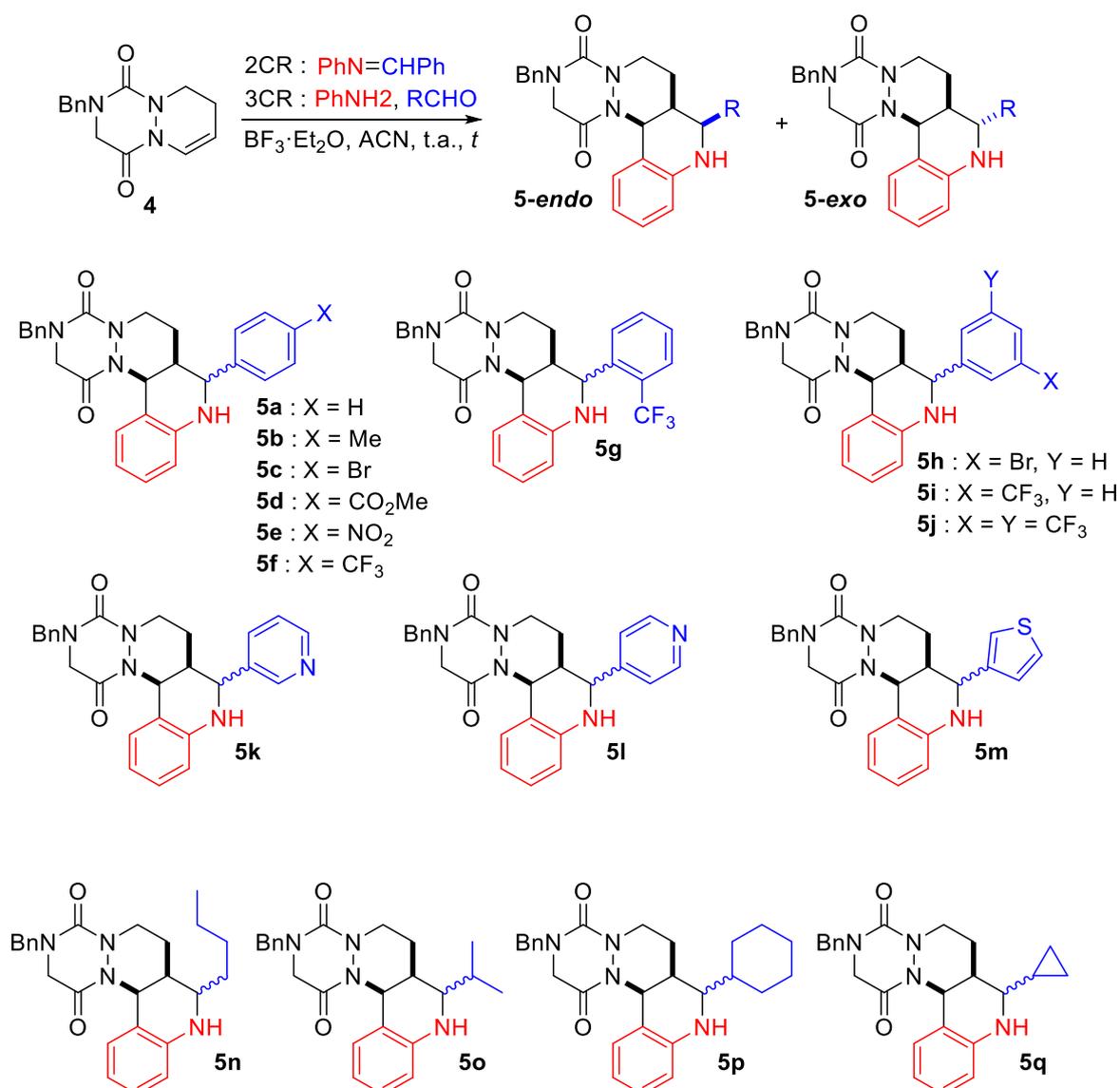
Après avoir optimisé les conditions réactionnelles des deux versions (2CPR et 3CPR), nous avons ensuite étudié l'étendue et les limites de la réaction de Povarov sur l'énamide **4** en variant tout d'abord l'aldéhyde (Tableau 5). Comme précédemment, pour certains exemples où la version 2CPR était la plus efficace les imines correspondantes ont été préparées à partir d'aniline et d'aldéhydes benzyliques.<sup>97</sup> L'influence sur la réaction des propriétés électroniques et de la position des substituants sur le cycle aromatique a tout d'abord été examinée. L'utilisation de groupements très faiblement donneurs (méthyle ou bromo) en position *para* sur le cycle ont engendré une forte diminution de la réactivité et de la sélectivité de la

réaction. Dû aux nombreux produits secondaires formés, la séparation a été difficile et les cycloadduits **5b** et **5c** n'ont pas pu être isolés (Tableau 7, Entrées 3 et 4). Cependant l'emploi du 3-bromobenzaldéhyde dans les conditions de 3CPR a permis, avec une conversion totale après 7 h de réaction, d'obtenir le produit attendu **5h** avec un rendement de 41% et un ratio *endo/exo* de 40/60 (Tableau 7, Entrée 10). Lorsqu'un groupement électroattracteur a été employé (CO<sub>2</sub>Me, NO<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>), quelle que soit sa position sur le cycle aromatique, la réaction a été fortement accélérée et a conduit à des rendements supérieurs à 60% avec des ratios diastéréoisomériques proches de 1/1 (Tableau 7, Entrées 5-9 et 11). La réaction la plus rapide a été observée avec l'imine dérivée du 4-nitrobenzaldéhyde ou du 3,5-bis(trifluorométhyl)benzaldéhyde où seulement 2 heures ont été nécessaires pour atteindre une conversion complète et obtenir les produits **5e** et **5j** avec 61% et 74% de rendement respectivement (Tableau 7, Entrée 6 & 12). Lorsque cette réaction a été réalisée en 3CPR, **5e** a été obtenu avec un rendement beaucoup plus faible de 38% (Tableau 7, Entrée 7).

Des aldéhydes hétéroaromatiques ont par la suite été étudiés dans la réaction de Povarov en version 3CPR. Les réactions impliquant les 3- et 4-pyridinylcarboxaldéhydes, bien que nécessitant l'emploi de 2,5 équivalents de BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (1 équivalent étant piégé par la pyridine), ont conduit aux produits correspondant avec respectivement 50% et 47% de rendement (Tableau 7, Entrées 13 et 14). Les ratios *endo/exo* ont été similaires dans les deux cas, avoisinant 70/30, et comme attendu au vu des propriétés électroniques, la réaction du 4-pyridinylcarboxaldéhyde a été beaucoup plus rapide que celle du 3-pyridinylcarboxaldéhydes (3 vs 48 h). Dans le cas du 3-thiophénecarboxaldéhyde, le produit désiré **5m** a été détecté par HPLC et son ratio diastéréoisomérique a été mesuré. Cependant comme pour les exemples légèrement enrichis précédents (méthyle et bromo) **5m** n'a pu être isolé en raison de nombreux sous-produits coluant avec le produit désiré (Tableau 7, entrée 15).

Il peut être important de remarquer que malgré une stéréosélectivité faible de la réaction dans les exemples aromatiques, nous avons pu séparer les deux diastéréoisomères dans la plupart des cas par chromatographie en phase inverse. De plus, l'ensemble des résultats déjà présentés ici semble en accord avec les caractéristiques de la réaction de Povarov en tant que réaction d'aza-Diels-Alder à demande inverse, l'énamide **4** montrant une meilleure réactivité vis-à-vis des iminodiènes appauvris.

Nous avons ensuite étendu la réaction aux aldéhydes aliphatiques. Les iminodiènes étant trop peu stables, nous avons à nouveau réalisé ces réactions en 3CPR. La réaction n'a pas fonctionné avec un aldéhyde primaire, le butyraldéhyde (Tableau 7, Entrée 16), par contre les aldéhydes secondaires linéaires, comme l'isobutyraldéhyde, ou cycliques comme les dérivés de cyclopropyle et cyclohexyle ont conduit aux produits correspondants **5o-q** (Tableau 7, Entrées 17-19). Ces réactions ont permis d'obtenir des diastéréosélectivités élevées (entre 72/28 et 99/1), le diastéréoisomère *endo* étant largement majoritaire et isolé avec d'excellents rendements.



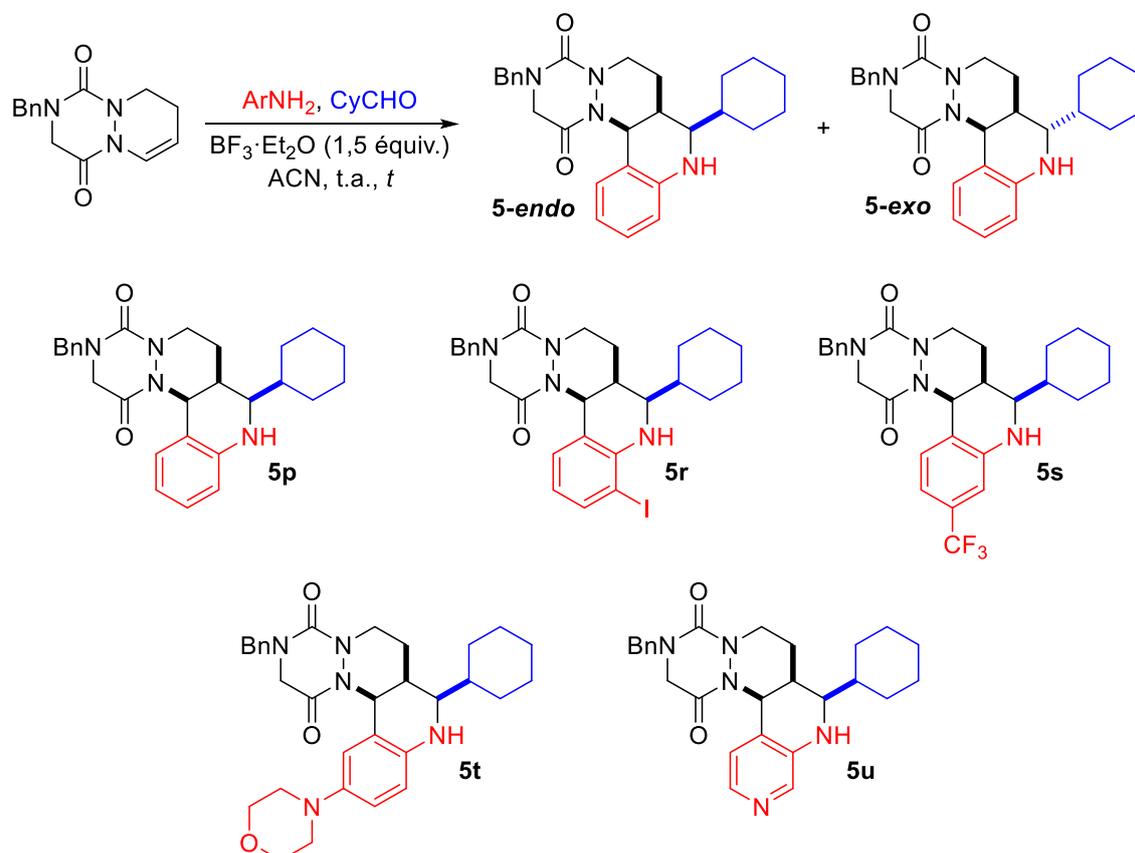
Entrée	R (aldéhyde)	Produit	Méthode <sup>[a]</sup>	t	Ratio <sup>[b]</sup> endo/exo	η (%) <sup>[c]</sup> (endo/exo)
1	Ph	5a	2CPR	18 h	48:52	69 (29/40)
2	Ph	5a	3CPR	18 h	44:56	59 (23/36)
3	4-Me-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	5b	2CPR	48 h	49:51	nd <sup>[e]</sup>
4	4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	5c	3CPR	24 h	-	nd <sup>[e]</sup>
5	4-MeCO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	5d	2CPR	6 h	50:50	63 (24/39)
6	4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	5e	2CPR	2 h	49:51	61 (26/35)
7	4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	5e	3CPR	3 h	53:47	38 (13/25)
8	4-CF <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	5f	2CPR	4 h	57:43	66 (35/31)
9	2-CF <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	5g	2CPR	4 h	50:50	75 <sup>[f]</sup>
10	3-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	5h	3CPR	7 h	40:60	41 (11/30)
11	3-CF <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	5i	2CPR	7 h	47:53	60 (24/36)
12	3,5-(CF <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> - C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	5j	2CPR	2 h	42:58	74 (32/42)
13 <sup>[d]</sup>	3-Pyridyl	5k	3CPR	48 h	75:25	51 (42/9)
14 <sup>[d]</sup>	4-Pyridyl	5l	3CPR	3 h	71:29	47 (37/10)
15	3-Thienyl	5m	3CPR	24 h	67:33	nd <sup>[e]</sup>
16	nPr	5n	3CPR	96 h	-	0
17	iPr	5o	3CPR	48 h	99:1	70 (70/0)
18	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>	5p	3CPR	28 h	90:10	90 (90/0)
19	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	5q	3CPR	96 h	72:28	47 (47/0)

[a] **2CPR**: ratio 1/imine/BF<sub>3</sub> 1/1/1; **3CPR**: ratio 4/aniline/aldéhyde/BF<sub>3</sub> 1/1/1/1.5. [b] Mesuré par HPLC sur le brut réactionnel. [c] Rendement global isolé. [d] 2.5 équiv of BF<sub>3</sub> employés. [e] Non déterminé. [f] Mélange inséparable de *endo* et *exo*.

**Tableau 7.** Etendue et limites de la réaction de Povarov sur l'énamide **4** : Partie aldéhyde

Ensuite, afin d'examiner l'étendue de la réaction vis-à-vis du dérivé d'aniline, nous avons sélectionné le cyclohexylcarboxaldéhyde comme partenaire réactionnel, ayant permis d'obtenir **5p** avec un excellent rendement et une bonne stéréosélectivité (Tableau 8, Entrée 18). Trois anilines commerciales ont tout d'abord été employées : la 4-(trifluorométhyl)aniline, la 2-iodoaniline, et la 4-morpholinoaniline. Les trois réactions ont conduit aux produits désirés **5r-t** avec une bonne diastéréosélectivité en faveur de l'isomère *endo* qui a été isolé à chaque fois avec de bons rendements

(Tableau 8, Entrées 2-4). Enfin, la 3-aminopyridine a été utilisée avec 2,5 équivalents de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  comme précédemment (Tableau 7, Entrées 13 et 14) et a permis d'obtenir le produit désiré **5u** avec un rendement faible de 18%, malgré une bonne diastéréosélectivité de 86/14 (Tableau 8, Entrée 5).



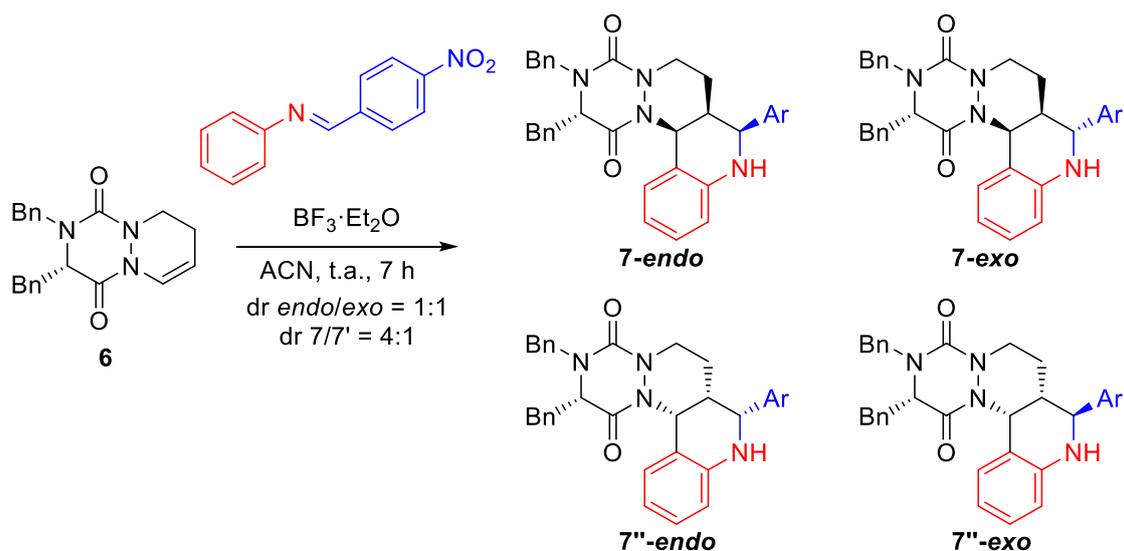
Entrée	Produit	Temps (h)	Ratio <sup>[a]</sup> <i>endo:exo</i>	Rendement (%) <sup>[b]</sup>
1	<b>5p</b>	28	90:10	90
2	<b>5r</b>	5	89:11	62
3	<b>5s</b>	7	85:15	56
4	<b>5t</b>	10	94:6	86
<b>5<sup>[c]</sup></b>	<b>5u</b>	24	86:14	18

[a] Mesuré par HPLC sur le brut réactionnel. [b] Rendement isolé pour l'isomère majoritaire **5-endo**; **5-exo** n'a pas été isolé. [c] 2,5 équiv. of  $\text{BF}_3$  employés.

**Tableau 8.** Etendue et limites de la réaction de Povarov sur l'énamide **4** : Partie aniline

## 2.5. Etude de la réaction de Povarov en version asymétrique

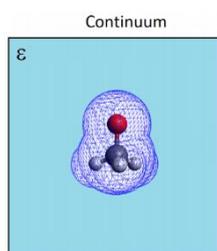
Enfin, pour clore cette partie expérimentale nous nous sommes penchés sur une version asymétrique de cette réaction. Nous avons tout d'abord préparé l'énamide endocyclique énantiopure **6** à partir de L-phénylalanine selon une stratégie connue (cf. §1.2.3, Schéma 20 et Schéma 21, pages 42 et 43). L'aniline et l'isobutyraldéhyde, ayant précédemment donné le meilleur ratio diastéréomérique, ont été choisis comme premiers partenaires pour cette réaction. Malheureusement aucun produit n'était visible en HPLC après 24 h de réaction et un résultat identique a été observé lorsque le cyclohexylcarboxaldéhyde (deuxième meilleur ratio diastéréomérique) a été utilisé. Nous nous sommes donc tournés vers l'un des aldéhydes ayant réagi le plus rapidement : le 4-(nitrophényl)benzaldéhyde en version 2CPR. Cette fois-ci, la réaction a donné une conversion totale après 7 h pour conduire aux cycloadduits attendus avec un rendement isolé total de 7% (Schéma 61). Le ratio *endo/exo* était de 1/1 comme dans le cas de **5e** précédemment décrit (cf. Tableau 7) et un ratio diastéréomérique de 4/1 pour chaque stéréoisomères *endo* et *exo* résultant de l'induction chirale. Parmi ces quatre cycloadduits, seul l'un des stéréoisomères majoritaires a pu être isolé. Par analyses RMN (<sup>1</sup>H & NOESY) ce dernier a été caractérisé comme un stéréoisomère *exo* mais il nous a été malheureusement impossible de distinguer s'il s'agissait du **7-exo** ou du **7''-exo** sans une structure cristallographique aux rayons X.



**Schéma 61.** Version asymétrique de la réaction de Povarov sur l'énamide énantiopure **6**

## 2.6. Etude théorique de la réaction de Povarov sur les aza-DCPs

Afin d'avoir une meilleure appréciation du mécanisme de ces réactions, nous avons choisi d'examiner le chemin réactionnel suivi par la réaction de Povarov à l'aide de méthodes de calculs DFT. Ces calculs ont ainsi été réalisés avec la fonctionnelle M062X et la base double zéta à valence séparée 6-31+G(d,p) formant un niveau de théorie reconnu pour des calculs fidèles d'énergie lors de réactions de cycloadditions.<sup>99-101</sup> La solvation par l'acétonitrile a été prise en compte *via* le modèle implicite de solvation SMD (solvation model based on density) où le solvant est remplacé par un milieu continu, homogène et polarisable caractérisé par sa constante diélectrique  $\epsilon$  et formant une cavité autour des réactifs (Figure 23).

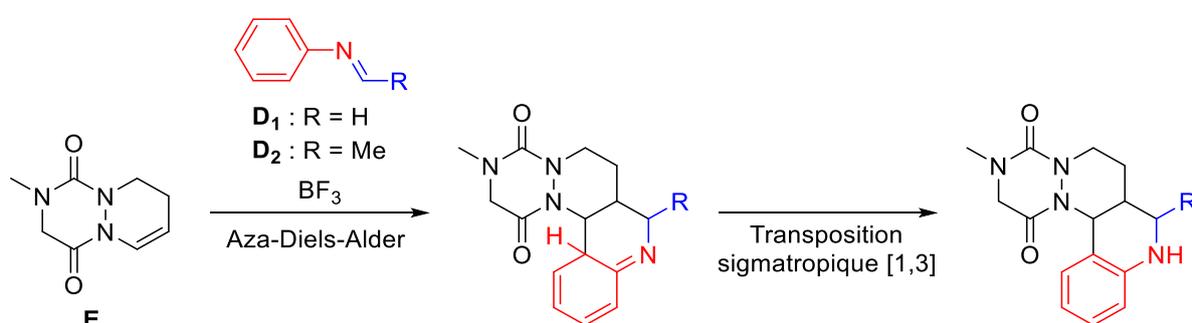


**Figure 23.** Modèle de solvation implicite sur l'exemple de l'anion méthoxide dans l'eau

Cette méthode plus simple qu'une description explicite des molécules de solvant permet de réduire considérablement les temps de calculs. Elle peut cependant présenter certains inconvénients comme la non-prise en compte de l'effet hydrophobique (primordial pour les réactions impliquant des substrats hydrophobes dans l'eau), de la viscosité du solvant ou des liaisons hydrogènes avec le solvant. Dans notre cas le solvant étant l'acétonitrile, ces trois paramètres peuvent être négligés.

La réaction de Povarov a déjà été étudiée par calculs théoriques à quelques occasions<sup>102-104</sup> avec différents nucléophiles, la plupart du temps simplifiée par l'utilisation de modèles monosubstitués. Cette réaction est considérée comme un processus domino où deux réactions s'enchainent : une réaction d'aza-Diels-Alder suivi d'une transposition sigmatropique [1,3] permettant de retrouver l'aromaticité du cycle benzénique (Schéma 62).<sup>102</sup> Il a été démontré que la première étape de la réaction procède préférentiellement selon un mécanisme en deux étapes avec formation en amont de l'iminium par réaction entre l'aza-diène et  $\text{BF}_3$  (ou tout autre

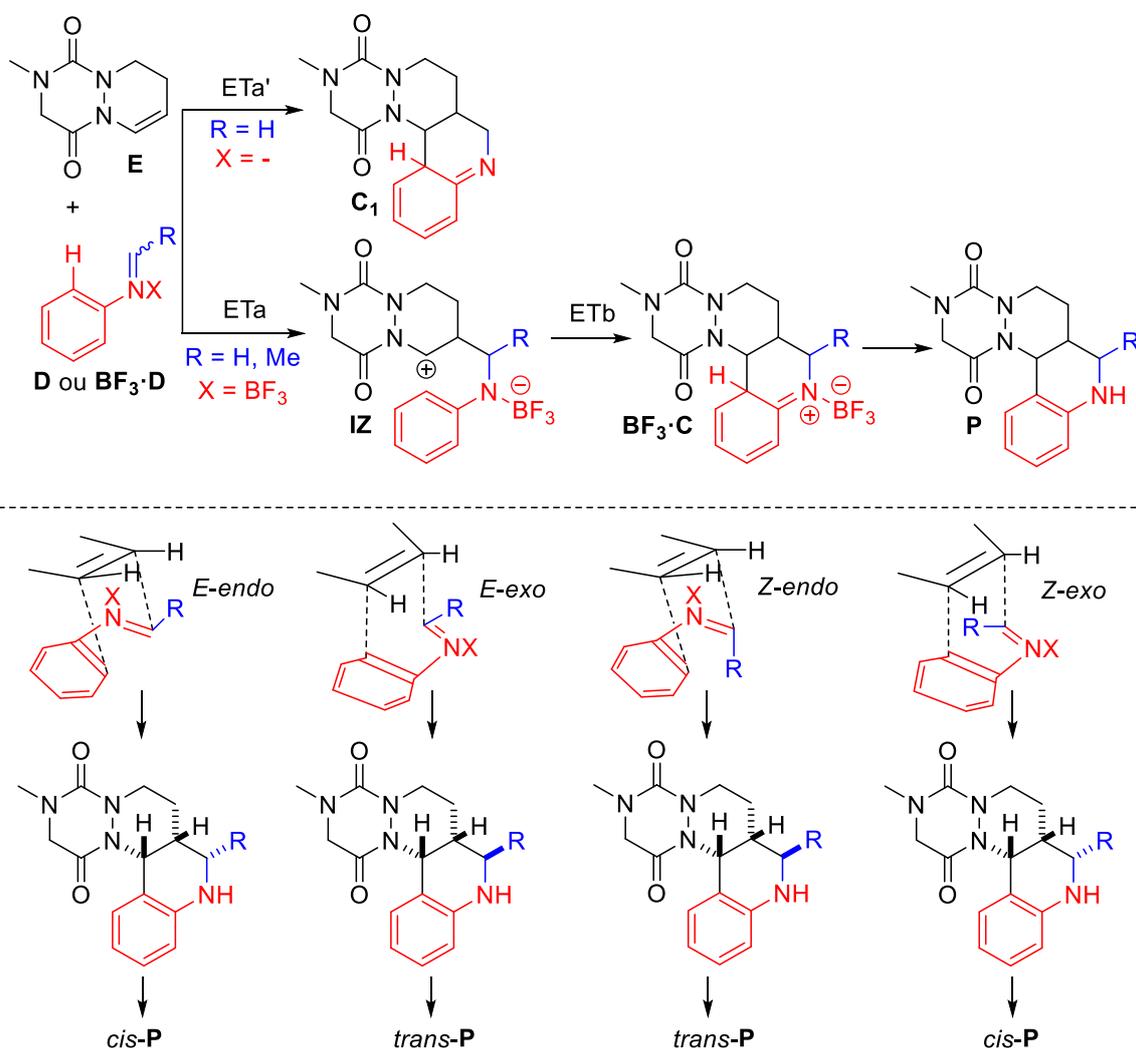
acide). Enfin, la transposition sigmatropique [1,3] finale grandement favorisée car permettant la réaromatisation du cycle de l'aryle amine est considérée comme une étape rapide et irréversible. Cependant, il est intéressant de noter que la substitution du cycle de l'aniline peut influencer sur la cinétique de cette étape. Nous avons ainsi conclu que la sélection des produits formés dépendait uniquement de considérations cinétiques et non thermodynamique. Les calculs ont été effectués par la suite sur le diénophile modèle simplifié **E** où le groupement benzyle présent sur nos substrats a été remplacé par un méthyle. Les composés **D<sub>1</sub>** et **D<sub>2</sub>** ont quant à eux été utilisés comme aza-diènes modèles.



**Schéma 62.** Détails du processus domino d'une réaction de Povarov sur une aza-DCP simplifiée

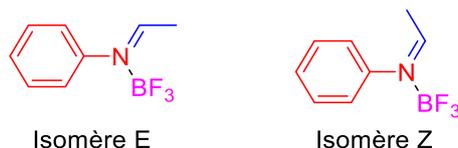
Nous avons comparé dans un premier temps les mécanismes impliquant l'aza-diène non activé **D<sub>1</sub>** ou complexé par le  $BF_3$ ,  $BF_3 \cdot D_1$ . Après avoir optimisé la géométrie de **D<sub>1</sub>** et  $BF_3 \cdot D_1$  nous avons pu noter la présence d'un angle dièdre C=N-C non nul et respectivement de  $44^\circ$  et  $41^\circ$  pour ces deux imines. La présence de ces angles indique un recouvrement orbitalaire plus faible entre les deux doubles liaisons réduisant le caractère « conjugué » de ce diène. Par la suite, l'évaluation des orbitales frontières a montré une interaction plus favorable entre la BV du diénophile **E** et la HO des aza-diènes **D<sub>1</sub>** ou  $BF_3 \cdot D_1$ , classant ainsi cette réaction comme une cycloaddition à demande inverse comme toute réaction de Povarov. De plus, comme attendu, la différence d'énergie entre les orbitales frontières impliquées dans la réaction (BV de **E** et HO des aza-diènes) était plus faible dans le cas de  $BF_3 \cdot D_1$  (6.2 eV contre 7 eV pour **D<sub>1</sub>**) suggérant un processus catalysé par l'acide de Lewis. Afin d'évaluer le chemin réactionnel préférentiel pour cette réaction, nous avons tout d'abord déterminé les états de transition (ET) impliqués dans la cycloaddition menant aux produits **P**. Deux

approches ont été considérées, correspondantes aux approches *endo* et *exo* classiquement rencontrées dans les réactions de Diels-Alder (Schéma 63).



**Schéma 63.** Différentes approches et mécanismes réactionnels pour la réaction de Povarov entre **E** et **D/BF<sub>3</sub>·D**

Dans le cas où l'aza-diène est substitué par un méthyle (**D<sub>2</sub>**) se pose la question de la géométrie *E/Z* du complexe **BF<sub>3</sub>·D<sub>2</sub>** ainsi formé, le méthyle pouvant être du côté du phényle (*Z*) ou du BF<sub>3</sub> (*E*) (Figure 24). Dans leur géométrie optimisée, ces deux isomères présentent des angles diédraux C=N–C=C encore plus important que pour **BF<sub>3</sub>·D<sub>1</sub>** avec 56° pour l'isomère *E* et même 81° pour l'isomère *Z*, soit un recouvrement  $\pi$  quasi-nul des orbitales p entre les liaisons C=N et C=C. L'isomère *Z* est ici légèrement plus stable que l'isomère *E* avec une différence énergétique faible entre ces deux formes ( $\Delta\Delta G = 0,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ).



**Figure 24.** Isomères E et Z du complexe  $\text{BF}_3\cdot\text{D}_2$

En amont des premiers calculs et afin de valider le niveau de théorie et le modèle de solvation choisis précédemment, nous avons calculé les énergies d'activation du premier état de transition  $\text{ET}_a$  de la réaction entre **E** et  $\text{BF}_3\cdot\text{D}_1$  en modifiant la base, la DFT ou encore le modèle de solvation employé (Tableau 9). Cette étude rapide a permis de montrer que les énergies d'activation restaient dans une gamme étroite quels que soit les paramètres choisis (à part pour B3LYP) validant ainsi l'utilisation de M062X/6-31+G(d,p) avec le modèle de solvation PCM.

Entrée	Niveau de théorie	$\Delta\text{G}^\ddagger$ <i>endo</i> <sup>[a]</sup>	$\Delta\text{G}^\ddagger$ <i>exo</i> <sup>[a]</sup>	$\Delta\Delta\text{G}^\ddagger$ ( <i>endo/exo</i> ) <sup>[a]</sup>
1	M062X/6-31+G(d,p)	24,1	24,2	- 0,1
2	M062X/6-311+G(d,p) <sup>[b]</sup>	20,3	19,7	0,6
3	wb97xd/6-31+G(d,p) <sup>[b]</sup>	20,5	20,2	0,3
4	B3LYP/6-31+G(d,p) <sup>[b]</sup>	30,0	28,0	2,0
5	B3LYP-D3/6-31+G(d,p) <sup>[b]</sup>	18,1	18,8	- 0,7
6	<b>M062X/6-31+G(d,p)<sup>[c]</sup></b>	<b>20,8</b>	<b>20,3</b>	<b>0,5</b>

[a] Différences d'énergies libres de Gibbs entre les différents substrats impliqués en  $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ . [b] Calculs effectués en appliquant le modèle de solvation PCM. [c] Calculs effectués en appliquant le modèle de solvation SMD.

**Tableau 9.** Validation du niveau de théorie et du modèle de solvation employés

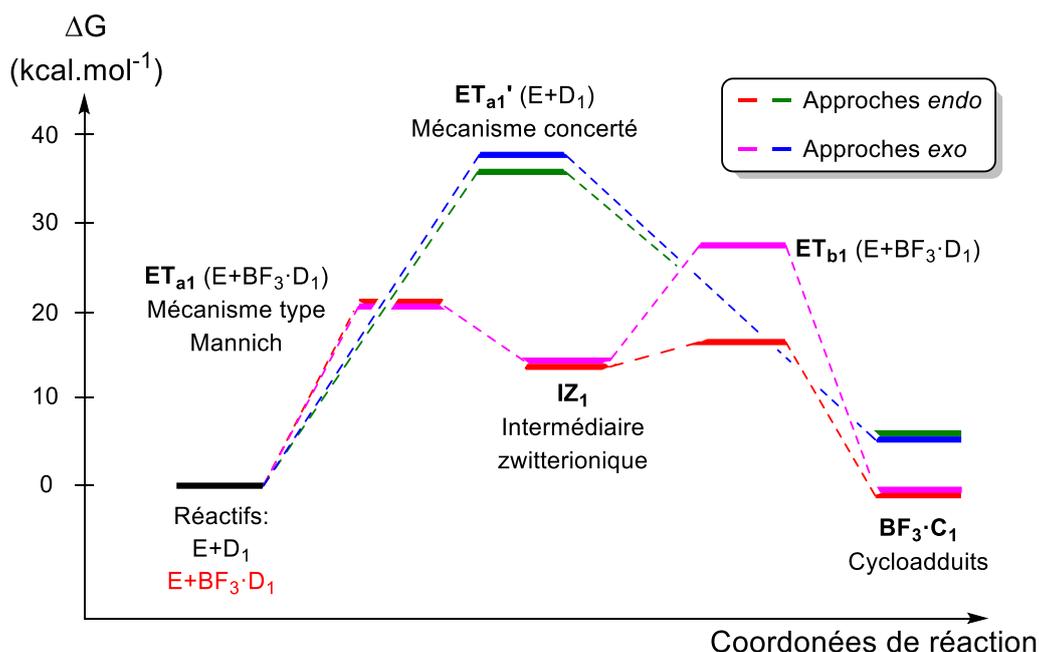
Suite à cela nous avons pu calculer les différences d'énergies pour chaque étape pour **D** et  $\text{BF}_3\cdot\text{D}$  selon des approches *endo* et *exo* (Tableau 10).

Entrée	R	X	Approche	$\Delta G^\ddagger$ ET <sub>a</sub> <sup>[a]</sup>	$\Delta G^\ddagger$ ET <sub>b</sub> <sup>[a]</sup>
1	H	-	<i>endo</i>	36,8	-
2	H	-	<i>exo</i>	38,1	-
3	H	BF <sub>3</sub>	<i>endo</i>	20,8	2.7
4	H	BF <sub>3</sub>	<i>exo</i>	20,3	13.5
5	Me	BF <sub>3</sub>	<i>E-endo</i>	29,7	2.6
6	Me	BF <sub>3</sub>	<i>E-exo</i>	31,6	11.5
7	Me	BF <sub>3</sub>	<i>Z-endo</i>	30,5	3.2
8	Me	BF <sub>3</sub>	<i>Z-exo</i>	32,6	8.5

[a] Différences d'énergies libres de Gibbs entre les différents substrats impliqués en kcal.mol<sup>-1</sup>.

**Tableau 10.** Calculs DFT pour les cycloadditions de l'aza-DCP **E** avec les imines **D** ou **BF<sub>3</sub>-D**

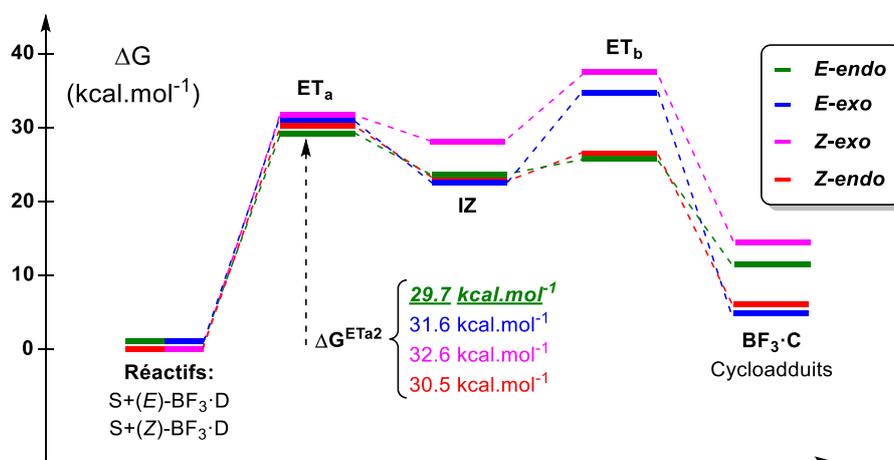
Ces premiers calculs ont tout d'abord montré une différence fondamentale entre les chemins réactionnels empruntés par **D**<sub>1</sub> et sa forme activée **BF<sub>3</sub>-D**<sub>1</sub> (Figure 25). En effet, l'aza-diène **D**<sub>1</sub> réagit selon un mécanisme concerté asynchrone où la liaison CH–CH<sub>2</sub> se forme avant la liaison CH–CHAr dans la l'état de transition **ET**<sub>a1</sub>' calculé (1,7 contre 2,7-2,8 Å respectivement). En revanche, l'aza-diène activé **BF<sub>3</sub>-D**<sub>1</sub> emprunte un mécanisme réactionnel en deux étapes comprenant une réaction de type Mannich permettant d'obtenir un intermédiaire réactionnel zwitterionique (**IZ**) suivi d'une cyclisation de type Friedel-Craft. Dans ce mécanisme l'étape cinétiquement déterminante correspond à l'étape type Mannich, son énergie d'activation ( $\Delta G^\ddagger = 20,3$  kcal.mol<sup>-1</sup>) étant plus grande que la différence d'énergie entre **IZ**<sub>1</sub> et **ET**<sub>b1</sub> ( $\Delta G^\ddagger = 2,8$  kcal.mol<sup>-1</sup> pour l'approche *endo* et 13,5 kcal.mol<sup>-1</sup> pour l'approche *exo*). Finalement, la comparaison des énergies d'activation des étapes cinétiquement déterminantes des processus activés ou non a montré qu'une énergie beaucoup plus importante était nécessaire dans le cas de l'aza-diène non activé **D**<sub>1</sub> ( $\Delta\Delta G^\ddagger = 16,5$  kcal.mol<sup>-1</sup>). La cycloaddition catalysée par l'acide de Lewis BF<sub>3</sub> semble donc être le processus privilégié.



**Figure 25.** Mécanismes réactionnels pour la cycloaddition catalysée ou non par  $\text{BF}_3$  entre  $\text{E}$  et  $\text{D}_1$

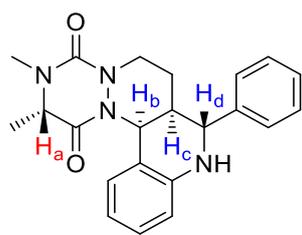
Après avoir écarté la possibilité d'une réaction de Povarov non catalysée par  $\text{BF}_3$ , nous nous sommes intéressés au cas de l'aza-diène  $\text{BF}_3\cdot\text{D}_2$  comme modèle pour les dérivés alkylés utilisés expérimentalement. Quatre chemins réactionnels ont ainsi été envisagés par la suite (approches *endo/exo* et géométries *E/Z*; Tableau 10, entrées 5-8) menant à deux produits : *trans*- $\text{P}_2$  et *cis*- $\text{P}_2$ . Comme précédemment un mécanisme en deux étapes a été calculé, avec d'abord une réaction de type Mannich pour obtenir les intermédiaires zwitterioniques  $\text{IZ}_2$  suivie d'une étape de type Friedel-Crafts permettant la cyclisation vers les cycloadduits  $\text{BF}_3\cdot\text{C}_2$  (Figure 26). Comme attendu, les énergies requises pour permettre ces réactions sont plus importantes ici que dans le cas non-substitué où  $\text{D}_1$  était employé ( $\Delta\text{G}^\ddagger \approx 30 \text{ kcal.mol}^{-1}$  ici contre  $\Delta\text{G}^\ddagger \approx 20 \text{ kcal.mol}^{-1}$  dans le cas précédent), probablement dû à un encombrement stérique plus important au niveau des états de transition. Le chemin réactionnel le plus favorable parmi ces quatre possibilités est donc l'approche *E-endo* menant au produit *cis*- $\text{P}_2$  comme observé expérimentalement pour les dérivés alkylés. Il est cependant important de rester prudent sur ces résultats, les différences énergétiques restant faibles entre les approches *E-endo* et *E-exo* (inférieures à  $1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ). Cependant, il est probable que les substituants *iPr* ou *Cy* utilisés expérimentalement induisent de plus grandes différences énergétiques dues à des contraintes stériques plus

importantes sur les états de transitions expliquant ainsi les excellentes diastéréosélectivités observées.

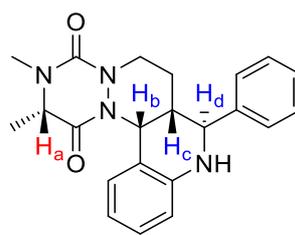


**Figure 26.** Mécanismes réactionnels pour la cycloaddition catalysée ou non par  $\text{BF}_3$  entre **E** et les isomères de  $\text{BF}_3 \cdot \text{D}_2$

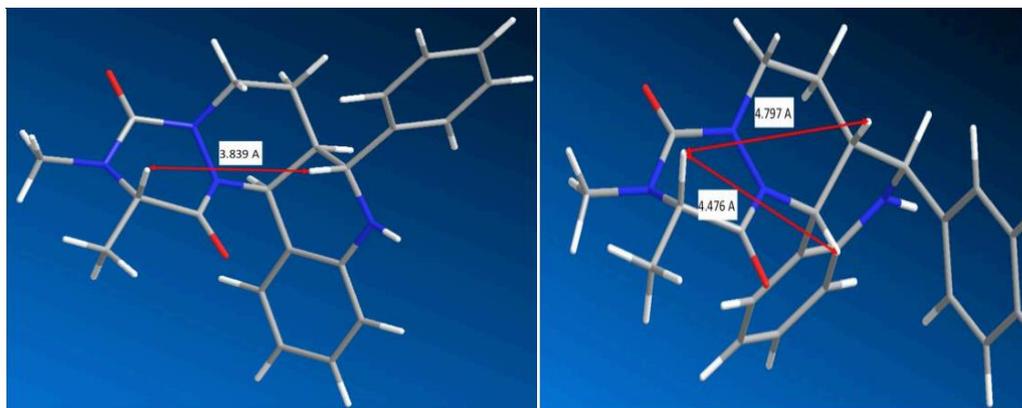
Enfin, nous avons essayé de rationaliser les résultats obtenus pour la version asymétrique de cette réaction. L'énamide énantiopure **6** a été remplacé par un modèle plus simple où les deux groupements benzyles sont substitués à nouveau par des méthyles (Figure 27). Nous avons choisi ici de simplement optimiser les géométries des produits de la réaction ayant une stéréochimie relative *trans* (comme le produit obtenu expérimentalement). L'étude des différentes énergies des états de transition sans les groupements benzyles, principaux responsables des gênes stériques au cours des chemins réactionnels, ne nous semblaient pas pertinente pour expliquer les diastéréosélectivités observées. En revanche, il est possible d'apporter des éléments de réponse quant à l'absence de couplage en NOESY et les difficultés rencontrées pour déterminer la configuration absolue sur le stéréoisomère isolé (Figure 27). En effet, pour le composé **Pc** la distance entre les protons  $\text{H}_a$  et  $\text{H}_d$  avoisine les 4 Å tandis que sur **P''c** les distances  $\text{H}_a\text{-H}_b$  et  $\text{H}_a\text{-H}_c$  se situent entre 4,5 et 5 Å. A ces distances, la corrélation NOESY attendue entre ces protons est faible ou nul expliquant ainsi l'absence de couplage dans les cas de **Pc** et **P''c**.<sup>105</sup>



*trans-Pc*



*trans-P''c*



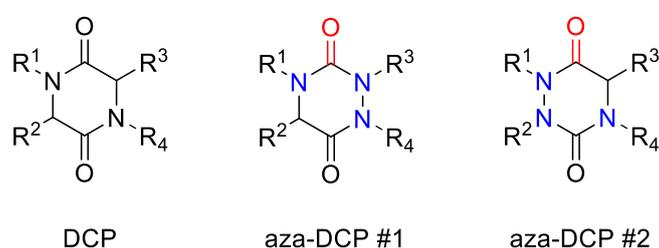
**Figure 27.** Structures optimisées pour les composés **Pc** et **P''c**

# CHAPITRE 3.

## SYNTHESE ET EVALUATIONS D'AZA-ANALOGUES DE DCPs BIOACTIVES

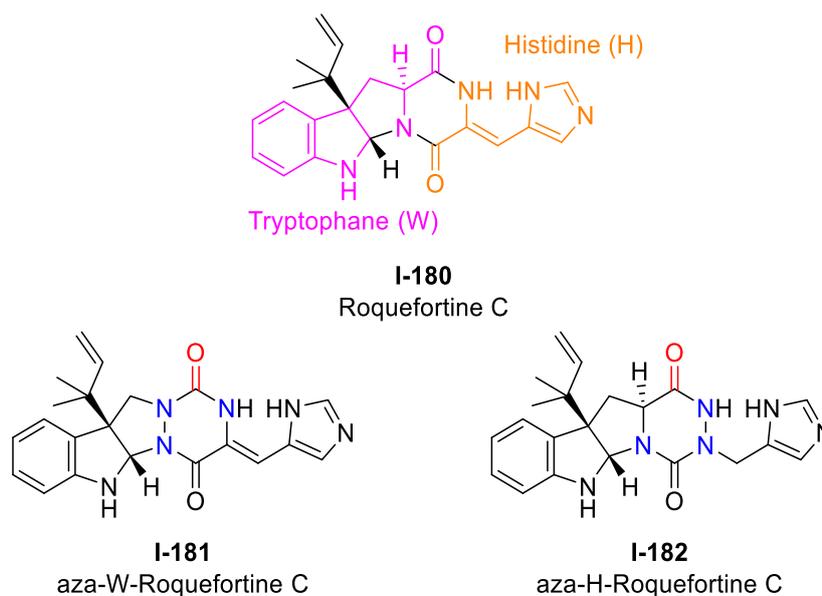
### 1. Nomenclature

Lors du passage d'une DCP à son analogue aza-DCP, deux possibilités d'introduction du nouvel atome d'azote sont possibles (Figure 28).



**Figure 28.** Possibilités d'aza-DCP à partir d'une DCP

Les DCPs étant généralement formées par deux dérivés d'acide aminé, l'introduction de cet azote supplémentaire aura donc lieu sur le carbone alpha de l'un de ces deux acides aminés. Ainsi, les aza-DCPs sur lesquelles nous avons travaillé par la suite seront nommées en commençant par « aza-» suivi de la lettre correspondant à l'acide aminé modifié et terminant par le nom de la DCP d'origine. Si l'on prend l'exemple de la Roquefortine C **I-180**, une DCP produite naturellement par le champignon *Penicillium roqueforti*, on retrouve dans sa structure deux dérivés d'acides aminés : le tryptophane et l'histidine (Figure 29). Deux aza-DCPs peuvent donc être obtenues et seront nommées : aza-W-Roquefortine C **I-181** et aza-H-Roquefortine C **I-182**.



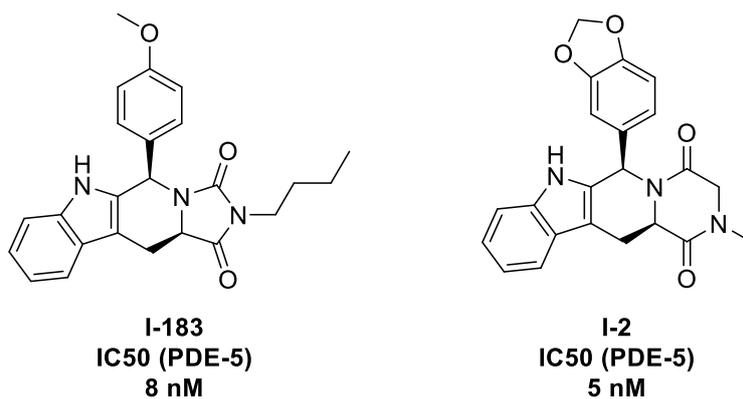
**Figure 29.** Structure de la Roquefortine C et de ses deux dérivés aza-DCPs

Comme précisé précédemment, nous avons sélectionné trois DCPs bioactives pour cette étude : le tadalafil **I-2**, la bréviaamide F **22** et la plinabuline **I-3**.

## 2. Tadalafil

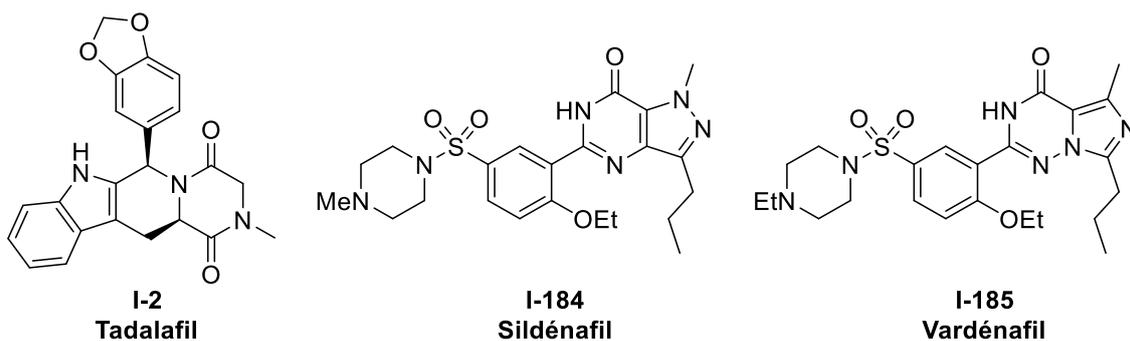
### 2.1. Historique du tadalafil

La phosphodiesterase 5 représente une cible thérapeutique de choix dans de nombreuses pathologies (dysfonctionnement érectile, hypertension pulmonaire artérielle, hyperplasie bénigne de la prostate). L'un des derniers inhibiteurs de phosphodiesterase 5 (PDE-5) décrit, le tadalafil **I-2**, a été développé lors d'études de relations structure-activité (RSA) réalisées par l'équipe de Daugan chez GlaxoSmithKline, au début des années 2000, à partir d'un dérivé d'hydantoïne **I-183** identifié comme lead (Schéma 64).<sup>106</sup>



**Schéma 64.** Structures et activités du "lead" hydantoïne et du Tadalafil

Comparé au sildénafil **I-184** et au vardénafil **I-185**, deux inhibiteurs de PDE-5, le tadalafil **I-2** possède une activité comparable vis-à-vis de PDE-5, mais avec des sélectivités bien différentes vis-à-vis des autres familles de PDE (Tableau 11). En effet, Daugan *et al.*<sup>106</sup> en 2003 et Bischoff *et al.*<sup>107</sup> en 2004, ont pu démontrer que de faibles sélectivités pouvaient être associées avec le sildénafil **I-184** et le vardénafil **I-185** entre PDE-5 et PDE-1 ou PDE-6, ce qui conduisait vraisemblablement à de nombreux effets secondaires comme des maux de têtes ou des altérations de la vision. Le tadalafil **I-2** présente dans ces cas de meilleures sélectivités, en revanche, sa sélectivité vis-à-vis de PDE-11 est moins bonne, ce qui pourrait également expliquer les effets secondaires lui étant associés (douleurs dans le dos et les membres, dyspepsie, myalgie ...) <sup>107,108</sup> bien qu'aucun lien de cause à effets n'ait été démontré entre PDE-11 et ces derniers.<sup>109</sup>

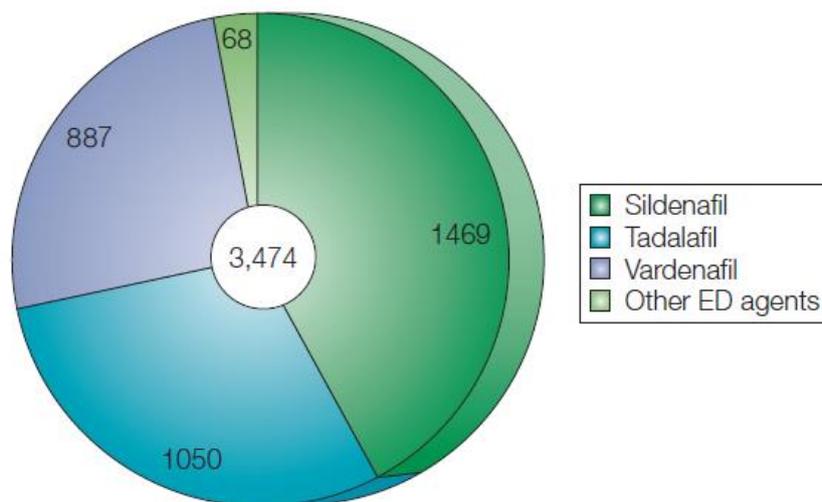


		PDE-5A	PDE-1	PDE-6 <sup>[a]</sup>	PDE-11A
<b>Sildénafil</b>	IC <sub>50</sub> (nM)	8.5	350	49	1725
	Ratio X/5	1	41	7,4	203
<b>Vardénafil</b>	IC <sub>50</sub> (nM)	0,89	121	11	308
	Ratio X/5	1	136	15	346
<b>Tadalafil</b>	IC <sub>50</sub> (nM)	9,4	> 10000	5100 <sup>[b]</sup>	67
	Ratio X/5	1	> 1000	> 1000 <sup>[b]</sup>	7,1

<sup>[a]</sup> Mesuré sur une PDE-6 bovine. <sup>[b]</sup> Mesuré par Daugan en 2003 avec IC<sub>50</sub> (PDE-5) du Tadalafil à 5 nM

**Tableau 11.** Structures, activités (IC<sub>50</sub>) et sélectivités (Ratio X/5) du sildénafil, vardénafil et tadalafil vis-à-vis des différentes familles de PDE

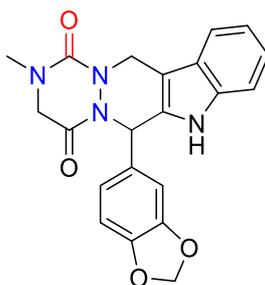
Approuvé en 2003 par la FDA, le tadalafil **I-2** est utilisé aujourd'hui pour le traitement en première intention du dysfonctionnement érectile, avec le sildénafil (approuvé en 1998) et le vardénafil (approuvé en 2003) (Figure 30).<sup>110</sup> Par la suite, l'utilisation du tadalafil a été approuvée par la FDA pour deux nouvelles pathologies : l'hypertension pulmonaire artérielle (PAH) en 2009<sup>111</sup> et l'hypertrophie bénigne de la prostate (BPH) en 2011,<sup>112</sup> alors que de futures applications pourraient émerger dans les années à venir.<sup>113</sup>



**Figure 30.** Marché du traitement du dysfonctionnement érectile en million de dollars en 2013.

## 2.2. Stratégie de synthèse de l'aza-W-tadalafil 17

Pour cette première étude, nous nous sommes intéressés à l'aza-W-tadalafil **17** (Figure 31), l'aza-G-tadalafil présentant moins d'intérêt, une structure proche ayant déjà été décrite avec une activité bien plus faible à celle du tadalafil d'origine (Figure 17, page 61).<sup>37</sup> Différentes stratégies de synthèse ont été imaginées pour l'obtention de ce dérivé et seront présentées, avec les problèmes rencontrés, dans les prochains paragraphes.

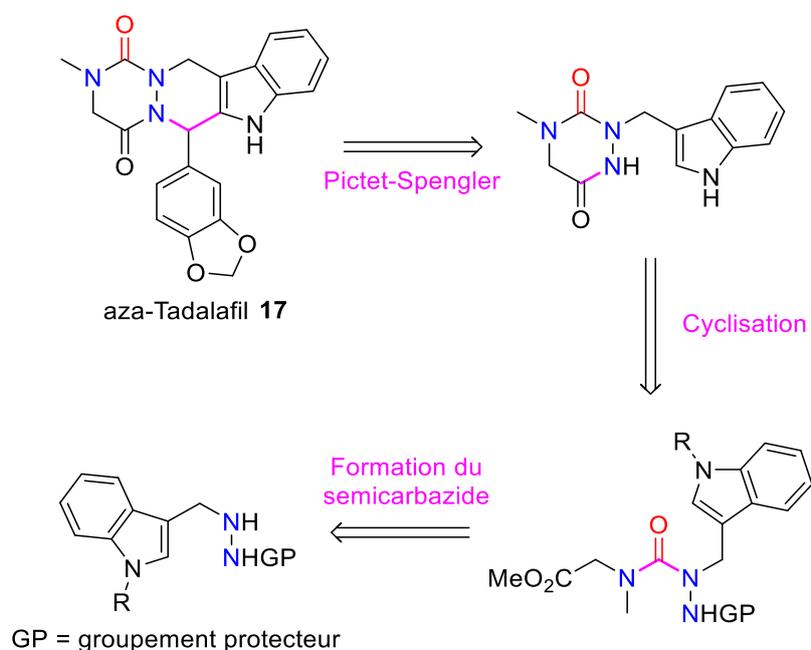


**Figure 31.** Structure de l'aza-W-tadalafil **17**

### 2.2.1. *Stratégie « Pictet-Spengler »*

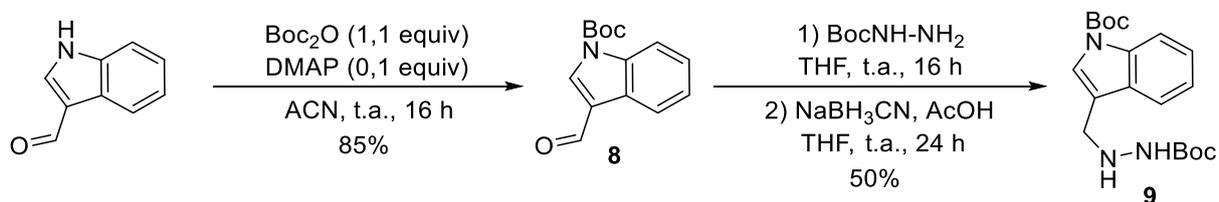
La première stratégie que nous avons envisagée pour l'obtention de l'aza-W-tadalafil **17** consistait en une séquence finissant par une réaction de Pictet-Spengler entre l'un des azotes du cycle aza-DCP, l'indole et le pipéronal (Schéma 65). Une telle réaction semblait envisageable au vue de la réactivité observée pour l'atome d'azote lors de

l'obtention d'aza-DCPs bicycliques décrite par notre groupe.<sup>54</sup> Le précurseur de cette réaction de Pictet-Spengler pourrait lui être obtenu par la même stratégie que celle décrite par notre groupe (cf. Schéma 21, page 43) via formation du semicarbazide correspondant et cyclisation après déprotection du motif hydrazine.



**Schéma 65.** Première stratégie de synthèse de l'aza-W-tadalafil **17**

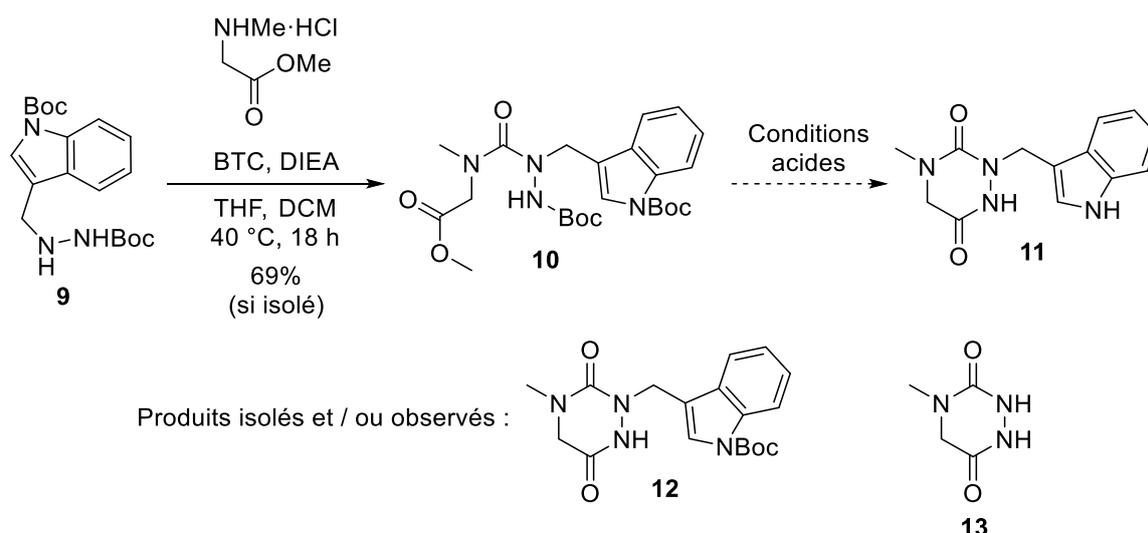
Pour obtenir **9**, l'indole-3-carboxaldehyde a tout d'abord été protégé avec un groupement Boc en présence de DMAP avec un rendement de 85% (Schéma 66). L'indole protégé **8** a ensuite été engagé dans une séquence d'amination réductrice avec le *tert*-butyl carbazate pour donner **9** avec un rendement de 50%.



**Schéma 66.** Synthèse de l'hydrazino-indole **8**

Les premiers essais d'obtention de **11** ont tout d'abord été réalisés à partir de **9** (Tableau 12). Une première tentative a été effectuée dans les conditions

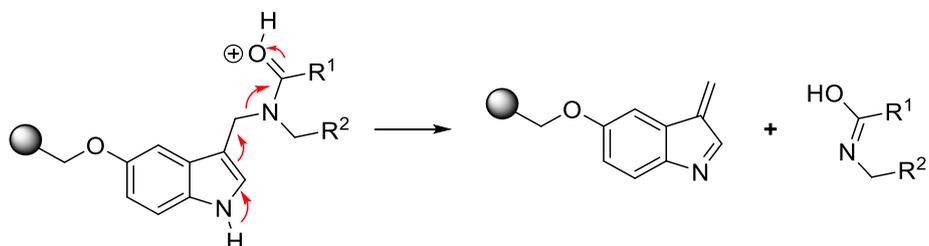
classiquement employées au laboratoire<sup>54</sup> avec un mélange TFA/H<sub>2</sub>O (95/5), mais seuls des produits de dégradation ont pu être observés. Afin de valider l'efficacité de la première étape, le semicarbazide **10** a tout d'abord été isolé intermédiairement avec un rendement de 69%. Cependant, seuls des produits de dégradation ont pu être obtenus en traitant **10** avec de l'APTS dans le toluène au reflux.<sup>53</sup> Pour éviter ce phénomène de dégradation, des conditions plus douces ont été utilisées, soit une solution de TFA à 10% dans le DCM, soit une solution à 4 M d'HCl dans le dioxane. Dans ces conditions, seul le produit cyclisé **12** toujours protégé par un groupement Boc sur l'indole a pu être obtenu avec des rendements respectifs de 21% et 53%. Dans un cas, nous avons également pu identifier un second produit comme étant le composé **13** ayant subi une élimination du groupement « CH<sub>2</sub>-Indole » porté par l'azote. Il semblerait que le produit **12** soit stable mais qu'après déprotection, il subisse immédiatement cette élimination pour conduire au composé **13**.



Entry	<b>10</b> isolé ?	Conditions acides	Temps	Température	Résultat
1	Non	TFA / H <sub>2</sub> O (95/5)	90 min	t.a.	Dégradation
2	Oui	APTS / Toluène	2 h	Reflux	Dégradation
3	Oui	TFA 10% dans le DCM	3 h	t.a.	<b>12</b> (21%)
4	Oui	HCl 4 M dans le dioxane	48 h	t.a.	<b>12</b> (53%)

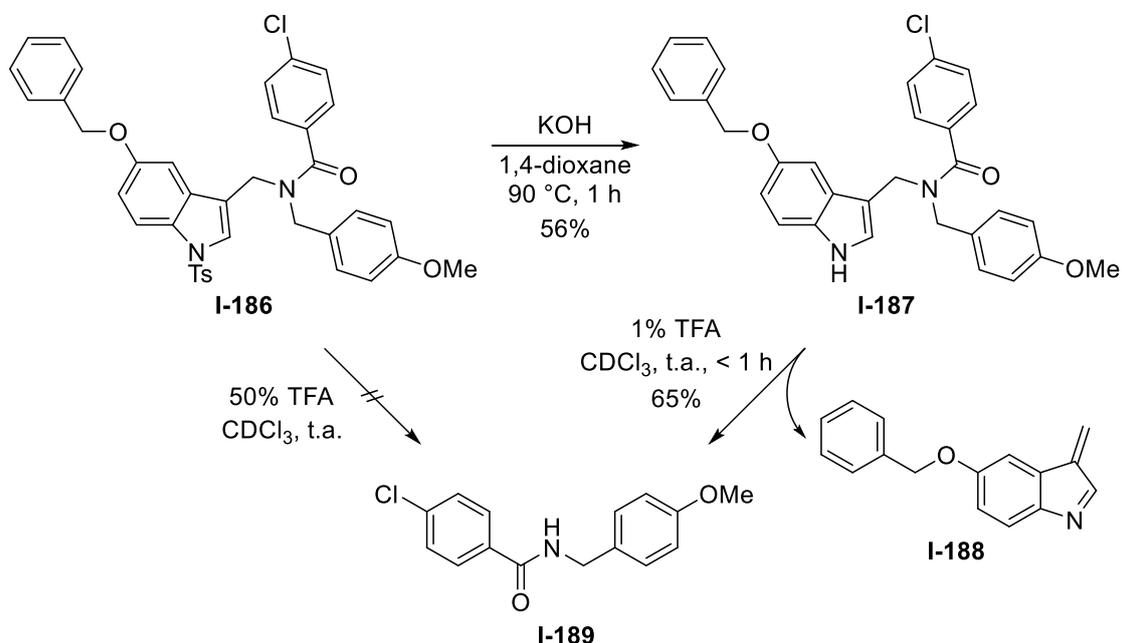
**Tableau 12.** Essais de cyclisation en conditions acides

Ce type de réaction a déjà été décrite dans la littérature sur des dérivés de 3-(aminométhyl)indole supportés sur résine.<sup>114</sup> Ces résines sont ainsi clivables en milieu acide (TFA notamment) via un mécanisme d'élimination avec assistance du doublet de l'azote (Schéma 67).



**Schéma 67.** Mécanisme d'élimination en milieu acide d'un squelette 3-(aminométhyl)indole

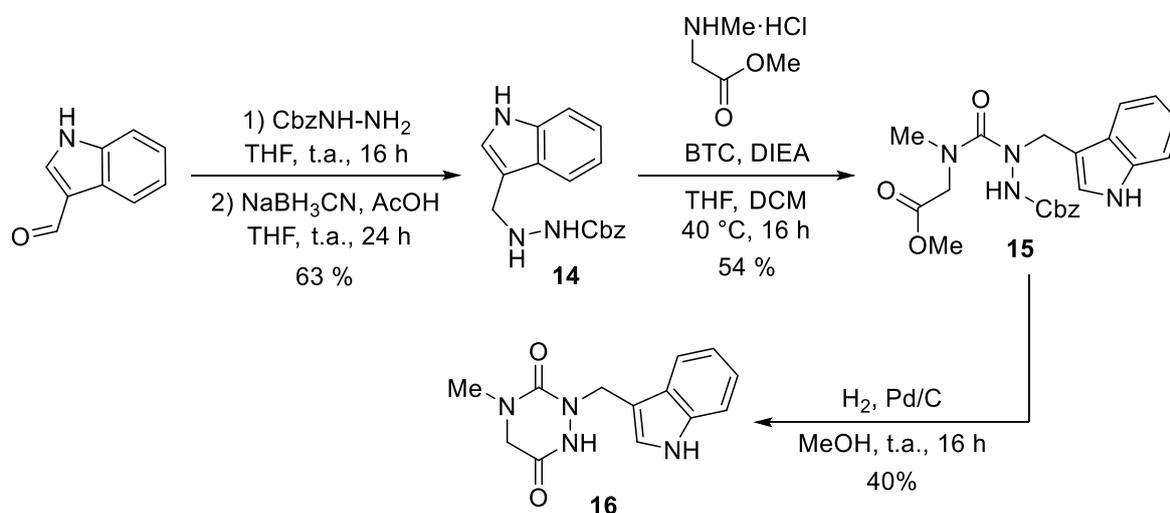
Dans un cas où l'indole est protégé par un groupement électroattracteur (tosyle), le composé **I-186** est stable même dans une solution à 50% TFA dans le  $\text{CDCl}_3$ .<sup>115</sup> Par contre, une fois la déprotection effectuée, l'élimination se fait facilement, même avec seulement 1% de TFA dans le  $\text{CDCl}_3$  (Schéma 68).



**Schéma 68.** Influence d'un groupement protecteur sur l'azote de l'indole sur sa dégradation en milieu acide

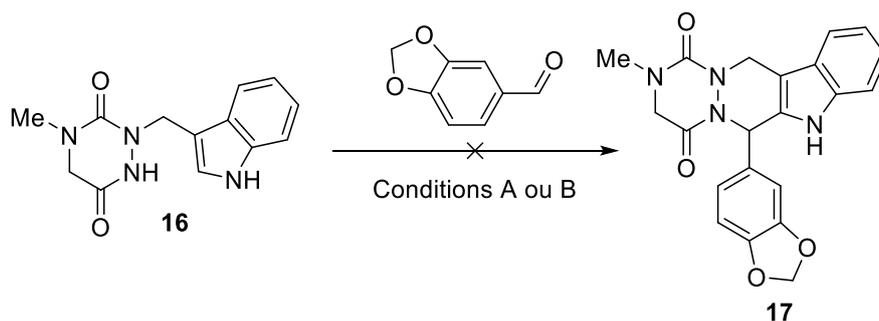
Nous nous sommes donc tournés par la suite vers l'utilisation d'un substrat avec un groupement Cbz sur le motif hydrazine (Schéma 69). L'hydrazino-indole **14** a été

obtenu par amination réductrice du carbazate de benzyle sur l'indole-3-carboxaldéhyde en présence de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  et d'acide acétique. Le produit **15** est isolé avec un rendement de 63% dans cette étape. Le semicarbazide **15** peut ensuite être obtenu à l'aide de BTC à partir de **14** et d'un dérivé de sarcosine avec 54% de rendement. La cyclisation a ensuite été effectuée après déprotection du groupement Cbz en condition d'hydrogénolyse permettant d'obtenir l'aza-DCP **16** avec un rendement acceptable de 40%. Nous avons également noté la dégradation de notre composé en **16** après purification par HPLC semi-préparative en cas d'utilisation de solvants contenant 0,1% de TFA.



**Schéma 69.** Synthèse du précurseur **16** en stratégie Cbz

Le dérivé **16** a ensuite été placé dans des conditions modifiées de Pictet-Spengler de façon à obtenir l'aza-W-tadalafil **17**. En effet, la sensibilité de ce squelette aux conditions acides classiquement employées dans cette réaction nous a obligé à nous tourner vers des conditions plus douces. Nous avons ainsi sélectionné deux conditions décrites dans la littérature employant des acides de Lewis : le catalyseur cationique d'or(I) de Gagosz<sup>116</sup> et le triflate d'Ytterbium<sup>117</sup> (Schéma 70). Malheureusement aucune de ces deux conditions ne nous ont permis d'obtenir le produit souhaité et seulement des mélanges complexes de produits de départ, produit de « déindolisation » et autres produits secondaires ont pu être observés.



Conditions A =  $\text{Ph}_3\text{PAuNTf}_2$  (6 %mol), TM 3Å, DCM, t.a., 16 h  
 Conditions B =  $\text{Yb}(\text{OTf})_3$  (10 %mol), DCM, 100 °C ( $\mu$ -ondes), 30 min

**Schéma 70.** Essai de réaction de Pictet-Spengler à l'aide d'acide de Lewis comme catalyseur

### 2.2.2. Stratégie « Bischler-Napieralski »

Notre deuxième stratégie s'est appuyée sur une autre réaction permettant de former des squelettes  $\beta$ -carbolines : la réaction de Bischler-Napieralski. Cette réaction est habituellement employée sur des  $\beta$ -aryléthylamides qui après réaction avec  $\text{POCl}_3$  conduisent aux squelettes hétérocycliques correspondants (Schéma 71). Une variante de cette réaction utilise comme substrats de départ les dérivés thioamides. Le thioamide peut être activé par alkylation du soufre avec l'iodure de méthyle déclenchant ainsi l'attaque de l'indole et permettant d'accéder au motif  $\beta$ -carboline. Cette variante présente également l'avantage de nécessiter des conditions plus douces, sans relargage d' $\text{HCl}$  provenant du  $\text{POCl}_3$ , pour obtenir ce type de squelette hétérocyclique.

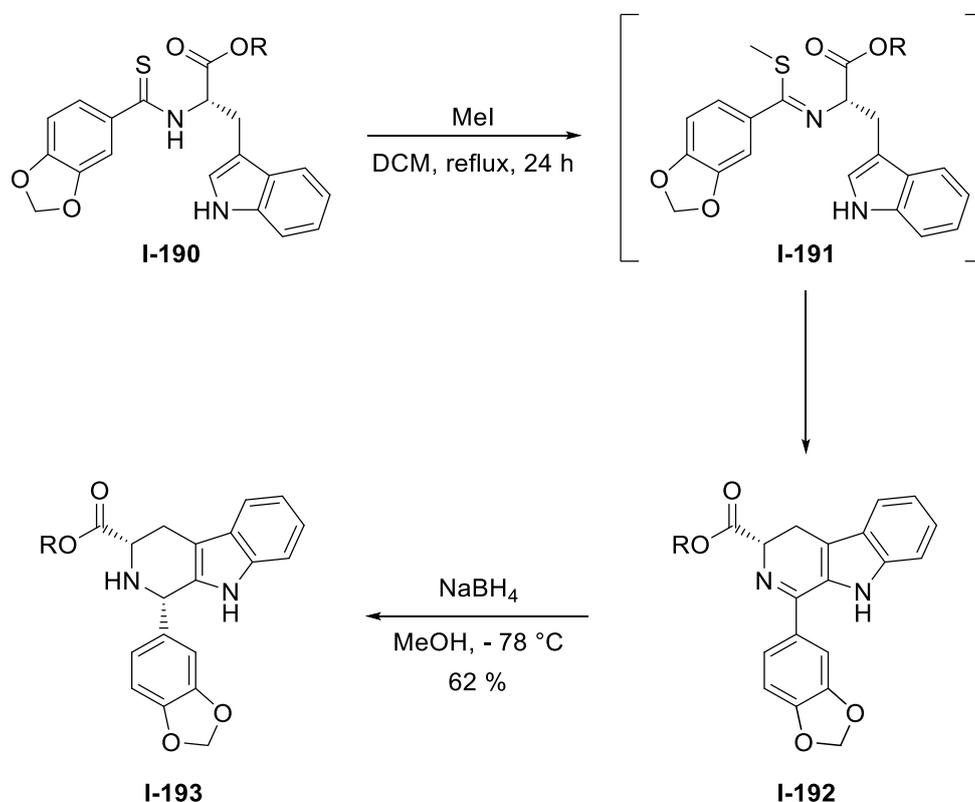


Conditions :  $\text{POCl}_3$  (X = O) ou MeI,  $\Delta$  (X = S)

**Schéma 71.** Réaction de Bischler-Napieralski

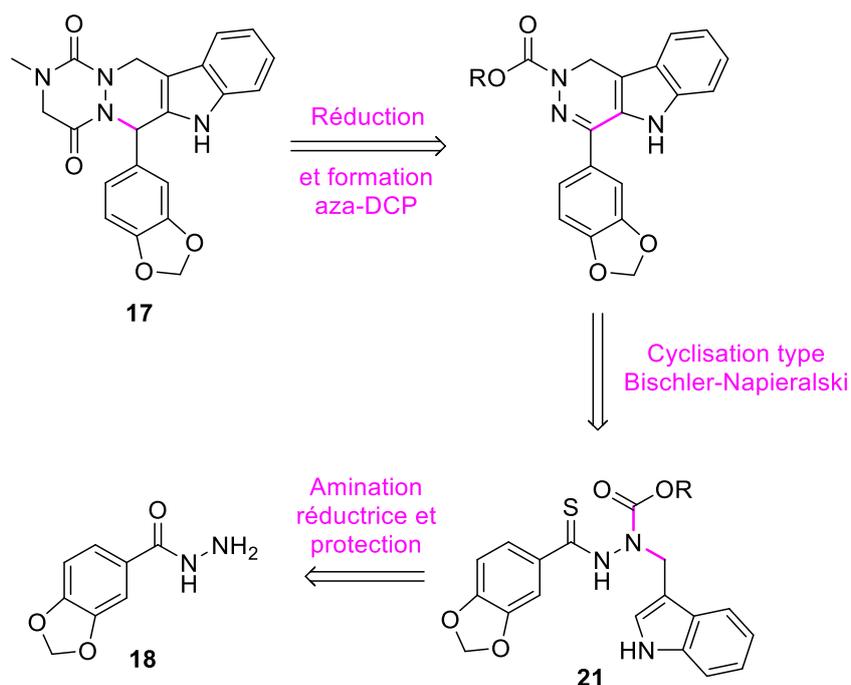
Cette réaction modifiée de Bischler-Napieralski a déjà été employée avec succès par Daugan *et al.*<sup>118</sup> pour synthétiser le tadalafil **I-2** (Schéma 72). Après cyclisation, la

fonction imine du  $\beta$ -carboline formée **I-192** a été réduite dans une seconde étape par  $\text{NaBH}_4$  pour donner avec un rendement de 62% le produit désiré **I-193**.



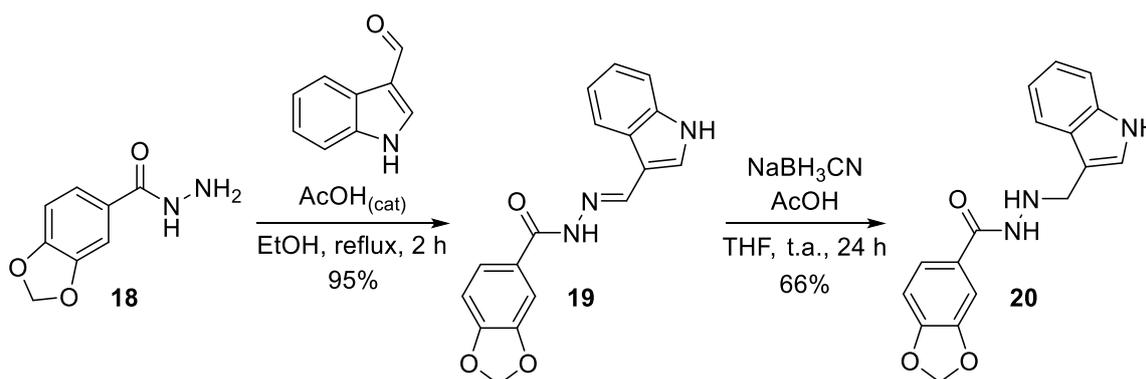
**Schéma 72.** Réaction du type Bischler-Napieralski pour la synthèse du tadalafil

Nous avons donc envisagé d'appliquer cette même stratégie pour notre synthèse de l'aza-W-tadalafil **17** (Schéma 73). Le squelette  $\gamma$ -aza- $\beta$ -carboline pourrait être obtenu par la même réaction de cyclisation suivie d'une étape de réduction de l'hydrazone formée et formation du cycle aza-DCP.



**Schéma 73.** Stratégie de synthèse de l'aza-W-tadalafil par réaction du type Bischler-Napieralski

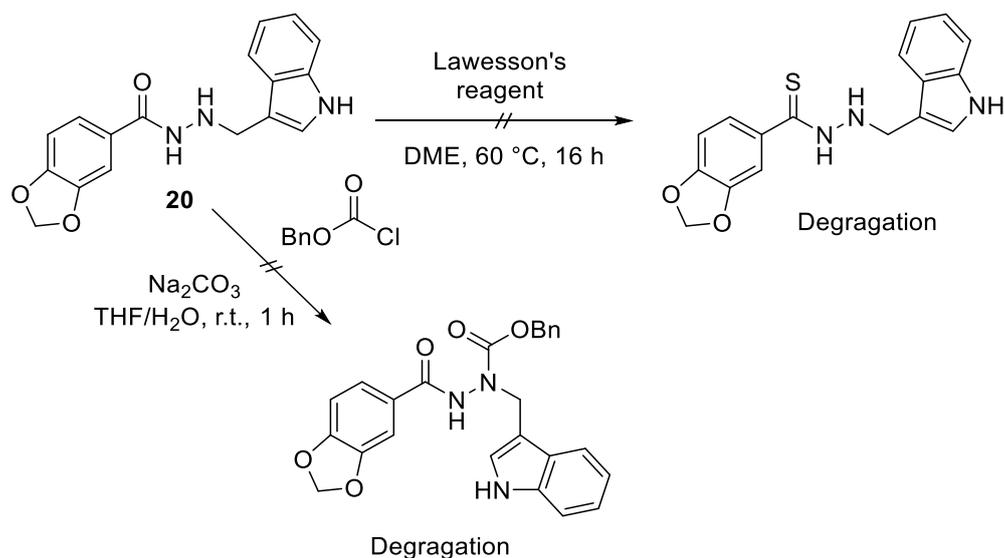
L'hydrazone **19** a été d'abord obtenue à partir de l'hydrazide **18** et de l'indole-3-carboxaldehyde au reflux et sous catalyse acide, avec un rendement de 95% (Schéma 74). Cette hydrazone **19** a ensuite été réduite par  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  en présence d'acide acétique pour donner l'hydrazide correspondante **20** avec un rendement de 66%.



**Schéma 74.** Synthèse de l'hydrazide **20**

Nous avons envisagé par la suite deux réactions pour accéder à **21** via transformation de la liaison  $\text{C}=\text{O}$  en  $\text{C}=\text{S}$  et protection de l'azote  $\beta$  de l'hydrazide sous forme de carbamate (ou inversement). Cependant malgré plusieurs essais, il nous a été impossible d'obtenir l'intermédiaire **21** et de pouvoir tenter la réaction de cyclisation

(Schéma 75). Nous nous sommes heurtés d'une part à l'impossibilité d'introduire notre atome de soufre par le réactif de Lawesson sur le motif hydrazide et d'autre part, à nouveau, à la sensibilité de notre composé en milieu acide lors de l'étape de protection (libérant du HCl) et ce même en présence de base dans des conditions de type Schotten-Baumann.



**Schéma 75.** Essai préliminaire d'obtention de l'intermédiaire **21**

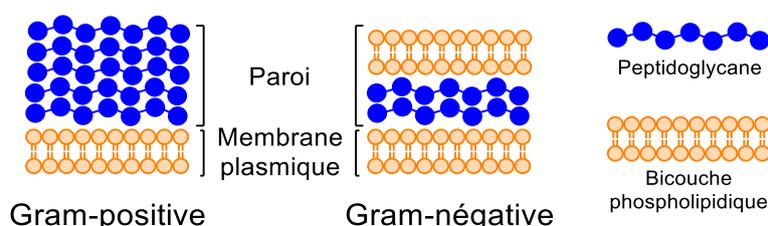
### 3. Brévianamide F

#### 3.1. Historique et activités biologiques décrites

La brévianamide F est une molécule naturelle synthétisée par la souche TN58 de la bactérie *Streptomyces sp.*<sup>119</sup> et par les champignons *Aspergillus sp.*<sup>120</sup> et *A. fumigates* notamment.<sup>121</sup> Cette molécule a initialement montré des propriétés biologiques intéressantes sur les différents canaux ioniques cardiaques pour le traitement de troubles cardiovasculaires.<sup>122</sup> Cependant dû à son importante hépatotoxicité *in vitro* et *in vivo* chez le rat, son développement en tant que candidat médicament s'est arrêté à un stade précoce.<sup>123,124</sup>

Cette DCP a également démontré des résultats préliminaires prometteurs en tant qu'antimicrobien. Des activités antibactériennes vis-à-vis de bactéries Gram-positives comme *S. epidermidis*,<sup>125</sup> *Mycobacterium bovis*,<sup>126</sup> *M. luteus*,<sup>119</sup> *B. subtilis*<sup>127</sup> ou *S. aureus*<sup>119,125,127</sup> ont effectivement été rapportées dans la littérature. Concernant les

bactéries Gram-négatives comme *E. coli*,<sup>119,125,127</sup> *P. aeruginosa*<sup>119,125,126</sup> ou *K. pneumoniae*<sup>125</sup> seules de très faibles activités ont été décrites. Cela peut s'expliquer par la nature des membranes bactériennes, les bactéries Gram-négatives possédant notamment une bicouche phospholipidique externe supplémentaire rendant cette paroi plus hermétique aux antibactériens (Figure 32).



**Figure 32.** Représentation simplifiée des parois bactériennes Gram-positive et Gram-négative

Des activités antifongiques, plus élevées que l'Amphotéricine B, ont également été rapportées vis-à-vis de deux champignons pathogènes pour l'homme *T. rubrum* et *C. Neoformans*.<sup>125</sup> Ce dernier étant notamment responsable de cryptococcoses, qui sous sa forme méningée est classée au 2<sup>ème</sup> rang des infections opportunistes fatales par l'Institut Pasteur.<sup>128</sup>

Plus récemment, des travaux récents réalisés par l'équipe de Liu ont également montré une activité antiallergique prometteuse pour la Brévianamide F via l'induction d'apoptose de mastocytes.<sup>129</sup>

### 3.2. Synthèse de la brévianamide F et d'un aza-brévianamide F

Nous avons tout d'abord commencé par synthétiser la brévianamide F **23** de référence. Nous avons pour cela suivi une synthèse décrite par Ashnagar *et al.*<sup>130</sup> dans laquelle, lors d'une première étape, un tryptophane protégé par un groupement Cbz est couplé en présence d'EDCI et d'HOBt à l'ester éthylique de la proline avec un rendement de 80% (Schéma 76). La déprotection du groupement Cbz de **22** en condition d'hydrogénolyse entraîne la cyclisation du dipeptide précédemment formé pour donner la brévianamide F **23** avec un rendement de 92%. Ce dérivé a pu être cristallisé et sa structure a ainsi été confirmée par diffraction aux rayons X (Figure 33), nous permettant de vérifier que la configuration des centres stéréogènes provenant des

acides aminés de départ était bien conservée au cours de cette synthèse. Nous avons également pu vérifier que notre spectre RMN  $^1\text{H}$  était identique à ceux décrits dans les différentes publications<sup>119,125,126</sup> présentant les effets antibiotiques de la brevianamide F.

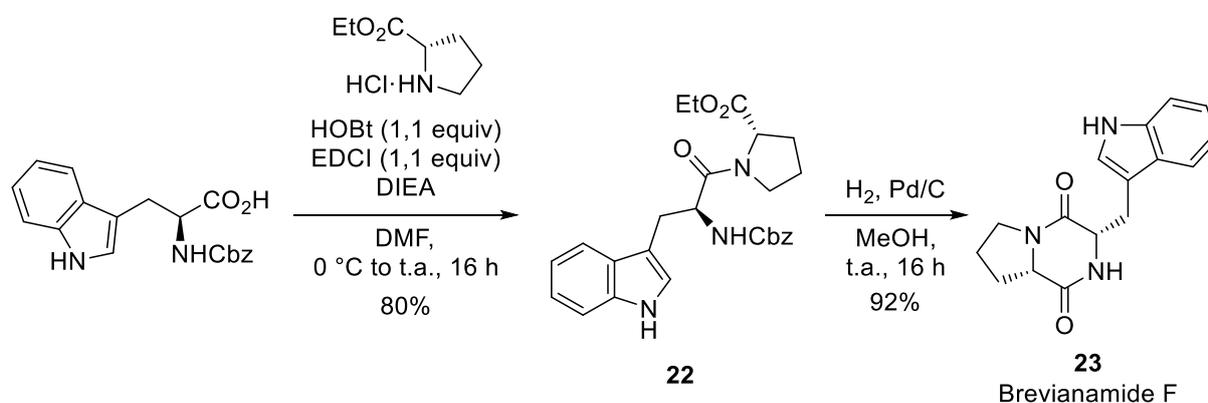


Schéma 76. Synthèse de la brevianamide F **23**

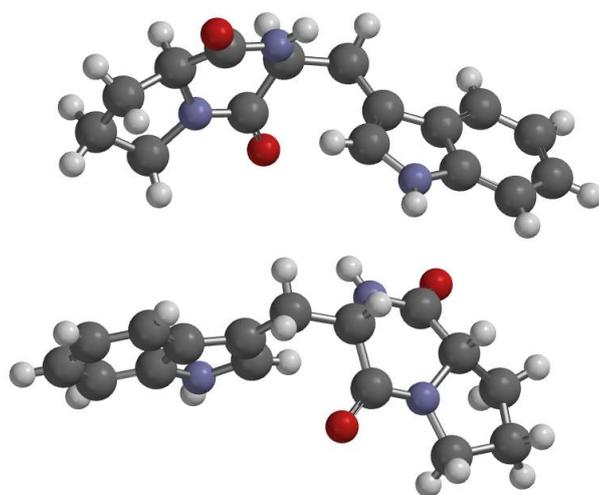
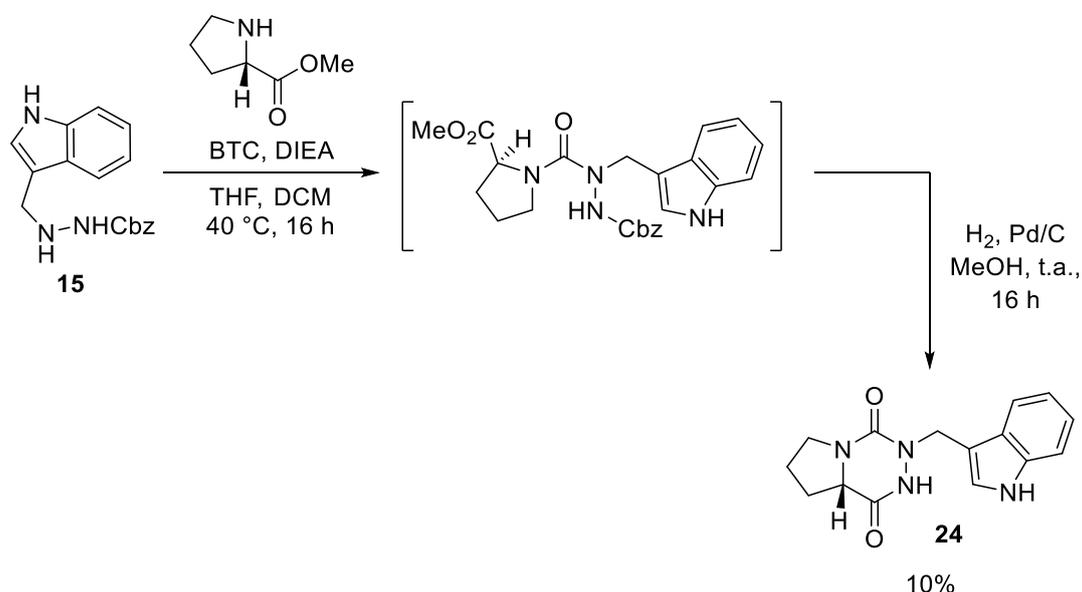


Figure 33. Structure RX de la brevianamide F **23** obtenue au laboratoire

Nous nous sommes ensuite intéressés à la synthèse de l'analogue aza-DCP de cette molécule (Schéma 77). Nous avons sélectionné l'aza-W-brevianamide F **24** comme première aza-DCP d'étude, certains intermédiaires étant communs avec la stratégie employée pour l'aza-W-tadalafil **17**. Le traitement de l'ester méthylique de la proline avec le BTC suivi de l'addition de **15** permet d'accéder au semicarbazide correspondant qui peut être directement mis en condition d'hydrogénolyse, sous  $\text{H}_2$  et en présence de Pd/C, pour donner après déprotection et cyclisation, l'aza-W-

brévianamide F **24** avec un rendement faible de 10%. La quantité obtenue en produit souhaité étant suffisante pour les premiers tests biologiques, nous n'avons pas optimisé cette synthèse.

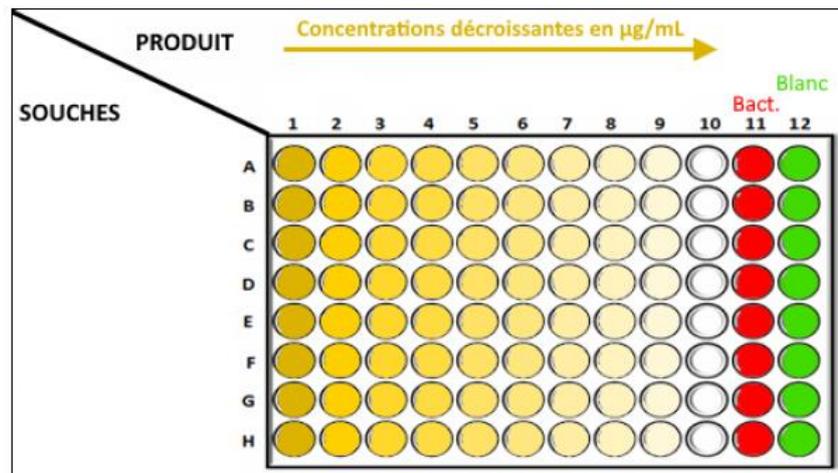


**Schéma 77.** Synthèse de l'aza-W-brévianamide F

### 3.3. Résultats biologiques sur bactéries et champignons

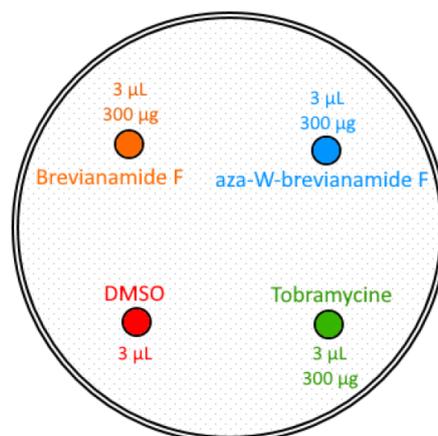
Afin d'évaluer les propriétés antimicrobiennes de notre composé et de les comparer à celles de la brévianamide F d'origine, un premier essai de détermination de concentration minimale inhibitrice (CMI) a été mis en place par Elora Aubert, doctorante en pharmacognosie dans notre équipe. Pour cela, une plaque 96 puits a été préparée comme indiqué en Figure 34, chaque ligne correspondant à une espèce bactérienne et chaque colonne à une concentration de notre composé. Les espèces sélectionnées comprenaient des bactéries Gram-positives (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. striatum*) et Gram-négatives (*E. coli*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* ATCC, *P. aeruginosa* B25 et *K. pneumoniae*). Les tests ont été effectués avec une gamme de concentration allant de 500 µg/mL pour la plus élevée jusqu'à 1 µg/mL pour la minimale. Cependant aucune activité antibactérienne n'a pu être détectée dans cette gamme de concentration pour l'aza-brévianamide F et la brévianamide F d'origine. Ce résultat est d'autant plus surprenant que deux espèces Gram-positives (*S. aureus* et *S. epidermidis*) testées ici avaient présenté des sensibilités intéressantes vis-à-vis de

la brévianamide F dans la littérature avec des CMI rapportées de 4 µg/mL pour *S. aureus* et 8 µg/mL pour *S. epidermidis*.<sup>125</sup>



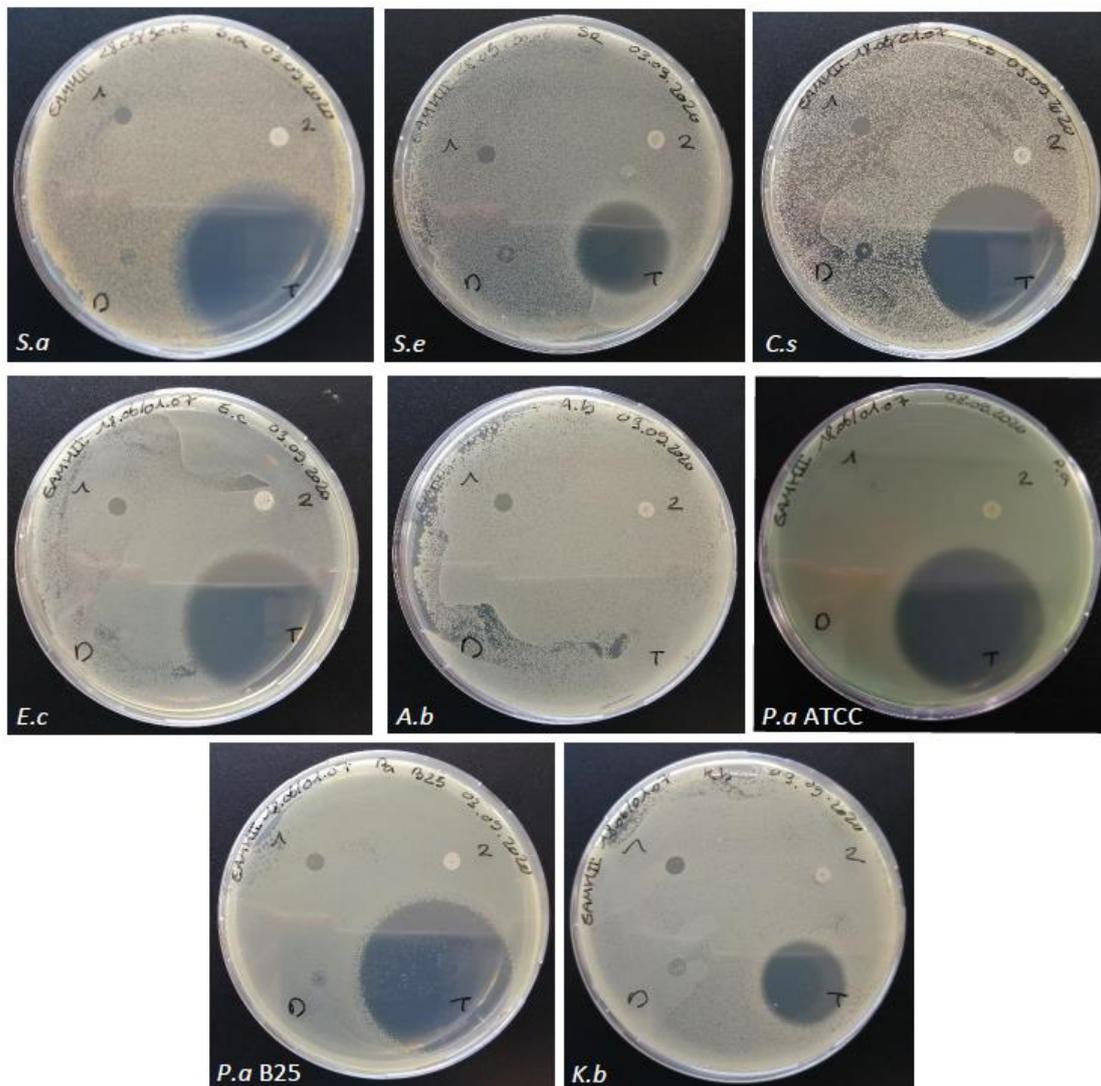
**Figure 34.** Montage d'une plaque 96 puits pour le test de l'activité d'un composé sur 8 espèces bactériennes

Pour compléter ces premiers résultats, des essais sur gel de culture ont également été réalisés. Dans ce test, les bactéries sont déposées sur la surface du gel de culture en boîte de Pétri suivi par le dépôt d'une même quantité, ici 300 µg, de brévianamide F, d'aza-brévianamide F, de DMSO (contrôle négatif) et de tobramycine (contrôle positif), un antibactérien de référence (Figure 35). La boîte est séchée et mise à l'étuve à 37 °C pour 24 heures, puis les zones d'inhibition peuvent être observées autour des dépôts préalablement effectués.



**Figure 35.** Disposition des différents dépôts sur un gel de culture

Les résultats de ce test peuvent être observés en Figure 36. Comme vu précédemment avec les tests effectués en plaque 96 puits, aucune zone d'inhibition et donc aucune activité antibactérienne ne peut être observée pour nos deux composés sur l'ensemble de ces espèces et dans ces conditions. Le résultat en gel de culture peut cependant s'expliquer par une diffusion faible ou une faible solubilité de nos composés au sein du gel. Cette hypothèse n'est pas à écarter au vu du dépôt blanc observable au point « 2 » (aza-W-brévianamide F).



**Figure 36.** Antibiogrammes (1 = Brévianamide F; 2 = Aza-W-brévianamide F; D = DMSO; T = Tobramycine) sur les espèces suivantes, de gauche à droite et de haut en bas : *S. aureus* ; *S. epidermidis* ; *C. striatum* ; *E. coli* ; *A. baumannii* ; *P. aeruginosa* ATCC ; *P. aeruginosa* B25 ; *K. pneumoniae*

Des essais supplémentaires ont également été réalisés par la Dr. Marcela Sabou de l'Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale (IPPTS) au CHU de Strasbourg. Ces tests ont été effectués sur différentes espèces de champignons (*C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. neoformans*) dont certaines décrites pour être sensibles à la brévianamide F. Ces premiers essais ont été réalisés dans des plaques 96 puits comme précédemment. Des concentrations allant jusqu'à 512 µg/mL ont été testées sans jamais réussir à mettre en évidence d'activité antifongique malgré des CMI mesurées à 2 µg/mL pour *C. neoformans* et à 8 µg/mL pour *C. albicans*.<sup>125</sup>

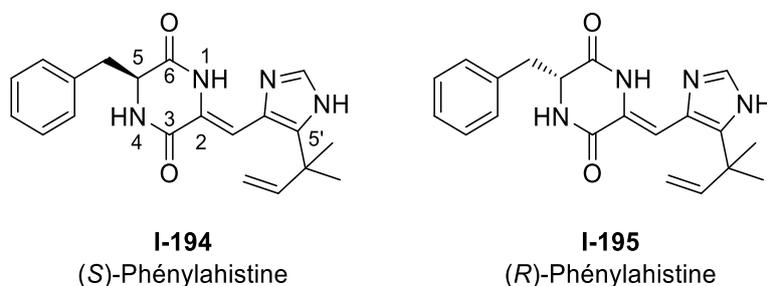
Différentes hypothèses peuvent expliquer ces résultats. D'une part, il est possible que nous ayons utilisé des souches bactériennes différentes de celles décrites dans la littérature pour une même espèce. Il est tout à fait envisageable que certaines souches de *S. aureus* soient sensibles à la brévianamide F et d'autres pas, par exemple. D'autre part, il est également possible que le milieu de culture utilisées dans nos expériences diffère de celui employé dans les différentes publications. Ceci impacterait directement la croissance des microorganismes étudiés et donc les activités observées. Enfin, comme la plupart des CMI pour la brévianamide F ont été rapportées dans une seule publication et pas reproduites par la suite, il est possible que les résultats soient questionnables.

## 4. Plinabuline

### 4.1. Origine, activité biologique et RSA

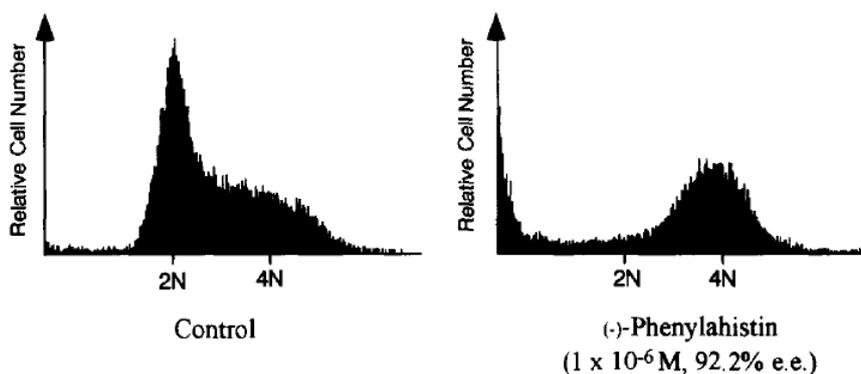
En 1996, le groupe de Fukumoto<sup>131</sup> a mis en évidence l'activité cytotoxique du composé NSCL-96F037 au sein d'un bouillon de culture d'*Aspergillus ustus* NSC-F038. La structure de ce composé a par la suite été élucidée et nommée phénylahistine **I-194** par Kanoh *et al.* en 1997.<sup>132</sup> Cette structure s'articule autour d'un squelette DCP formé par la condensation d'une phénylalanine et d'une histidine portant un substituant 2-méthylbut-3-ène-2-yle en position 5' de l'imidazole et déhydrogénée sur le carbone 2 de la DCP (Figure 37). Cette structure possédant un centre stéréogène, le carbone 5 de la DCP, deux énantiomères de cette molécule existent et peuvent être observés au sein de l'extrait de départ dans un ratio 3/1 en faveur de l'énantiomère *R* **I-194'**. Une analyse et une résolution par HPLC chirale a

permis d'isoler chaque énantiomère afin d'en mesurer l'activité cytotoxique. Sur cellules murines P388, l'énantiomère **S I-194** ( $3.5 \times 10^{-7}$  M) a montré un très bon  $IC_{50}$ , de deux ordres de grandeur inférieur à celui de l'énantiomère **R I-194'** ( $3.8 \times 10^{-5}$  M). Ainsi, seul l'énantiomère **S** a été considéré comme actif par la suite.



**Figure 37.** Structures de deux énantiomères de la phénylahistine

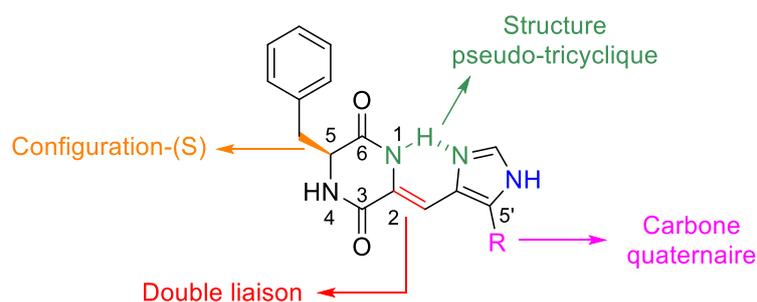
Pour élucider l'activité de ce composé, la même équipe a effectué des analyses en cytométrie de flux via le marquage de l'ADN de cellules P388 à l'iodure de propidium. Ces résultats peuvent être observés en Figure 38. Il apparaît clairement qu'après incubation du composé à une concentration de  $1 \mu\text{M}$ , seules les cellules contenant une quantité double d'ADN sont présentes dans le milieu. La réplication cellulaire est donc bloquée par la (S)-phénylahistine au stade G2/M juste avant la mitose et la division du matériel génétique.



**Figure 38.** Analyse de l'activité de la (S)-phénylahistine par cytométrie de flux et marquage à l'iodure de propidium de cellules P388

Suite à cette découverte, de nombreux dérivés ont été obtenus permettant d'effectuer une étude de relation structure-activité complète autour du squelette de la phénylahistine, avec cinq sites de modifications (Tableau 13).<sup>133</sup> Comme vu

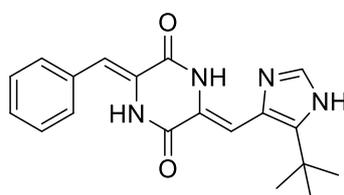
précédemment, la configuration du centre stéréogène semble primordial pour l'activité et ce dernier doit être en configuration *S* pour exhiber une activité anti-cancéreuse. A l'opposé, la double liaison issue du résidu histidine est également nécessaire pour le maintien de cette activité, le dérivé hydrogéné en cette position ne présentant plus aucune activité d'inhibition de la prolifération cellulaire. L'alkylation de l'azote 1 engendrant la perte de la liaison hydrogène intramoléculaire entraîne également une importante perte d'activité de 3 ordres de grandeur. Cette liaison hydrogène semble organiser cette molécule sous une structure pseudo-tricyclique nécessaire à l'activité. L'alkylation de l'azote de l'imidazole n'a en revanche que très peu d'effet sur l'activité avec une faible perte d'un facteur 3 sur l'IC<sub>50</sub>. Enfin, le substituant porté par l'imidazole en position 5' a également subi plusieurs variations. La réduction de l'encombrement stérique au niveau de cette position via la substitution du groupement 2-méthylbut-3-èn-2-yle par un hydrogène ou un substituant méthyle a drastiquement supprimé ou diminué l'activité des composés correspondant.



Entrée	Modification structurale					IC <sub>50</sub> (μM)
	Carbone α Phe	Double liaison	Liaison hydrogène	NH	Carbone quat.	P388 (Prolifération)
1	<i>S</i>	Oui	Oui	Oui	Oui	0,21-0,23
2	<i>R</i>	Oui	Oui	Oui	Oui	19
3	<i>S</i>	<i>Non</i>	Oui	Oui	Oui	> 200
4	<i>S</i>	Oui	<i>Non</i>	Oui	Oui	160
5	<i>S</i>	Oui	Oui	<i>Non</i>	Oui	0,95
6	<i>S</i>	Oui	Oui	Oui	<i>Non</i>	> 200 (R = H) 7,5 (R = Me)

**Tableau 13.** Relation structure-activité autour du squelette de la phénylhistine

Suite à cette étude et aux travaux de Kanzaki *et al.*,<sup>134</sup> le groupe de Hayashi a intégré une double liaison supplémentaire à la place du carbone stéréogénique et a remplacé également le substituant 2-méthylbut-3-ène-2-yle par un *tert*-butyle (Tableau 14).<sup>135</sup> Cette nouvelle structure a tout d'abord été évaluée sur la lignée P388 et a présenté une activité environ 10 fois supérieure à la phénylahistine et à la colchicine (molécule anti-cancéreuse de référence). Par la suite, des activités au nanomolaire ont également été mesurées sur une vaste gamme de lignées cancéreuses (Tableau 14). Le mode d'action de ce composé a également été démontré par la même méthode que celle décrite pour la phénylahistine et présente le même profil avec une inhibition de la prolifération cellulaire en phase G2/M par interaction au sein du site de la colchicine.<sup>136</sup>

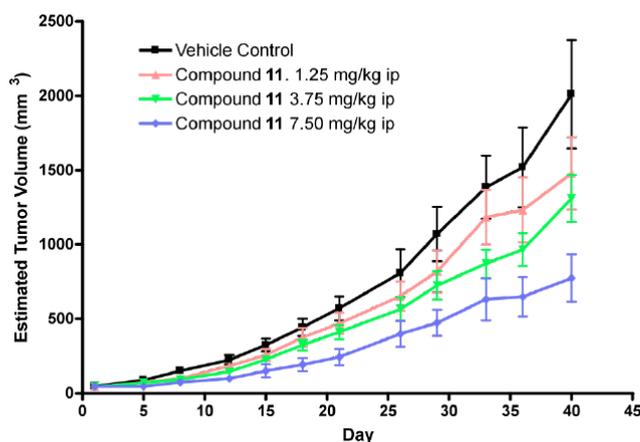


I-3  
Plinabulin

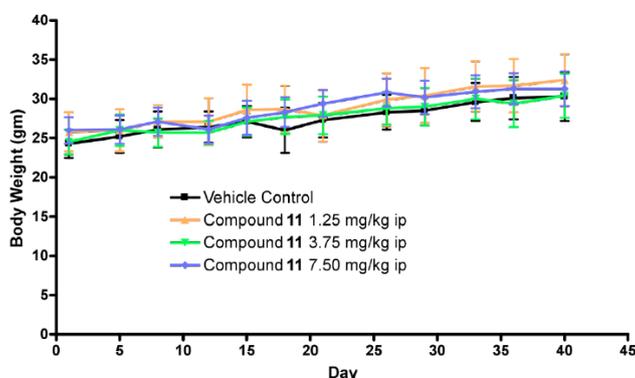
Cellules	NCI-H460	HCT116	HepG2	MCF-7	HT-29	HeLa
IC <sub>50</sub> (nM)	26	6	5	30	15	9

**Tableau 14.** Structure et activité anti-cancéreuse de la plinabuline

Cette molécule a également été évaluée dans un modèle tumoral *in vivo* chez des souris xénotreffées par des cellules humaines de carcinomes de la prostate (DU 145). Les souris ont été traitées selon différentes doses comprises entre 1,25 mg/kg et 7,50 mg/kg et ont été suivies sur plusieurs semaines. Une réduction du volume tumoral a pu être observée en corrélation avec la dose employée (Figure 39). Le poids des souris a également été suivi au cours de l'expérience de façon à montrer une excellente tolérance de ce composé dans ce modèle murin avec une hausse du poids moyen des souris quelle que soit la dose utilisée (Figure 40).



**Figure 39.** Evolution du volume tumoral sous différents dosages de plinabuline



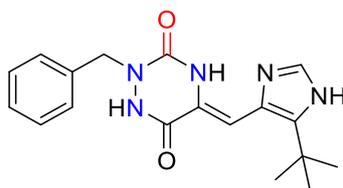
**Figure 40.** Evolution du poids des souris sous différents dosages de plinabuline

Ces excellentes activités ont permis à ce composé d'atteindre la phase III de développement clinique en association avec le docetaxel dans le traitement du cancer du poumon non à petites cellules [NCT02504489].<sup>137</sup> En plus de cette activité, la plinabuline est également évaluée en phase III pour la prévention de la neutropénie induite par chimiothérapie TAC (Docetaxel, doxorubicin & cyclophosphamide) en comparaison avec le Pegfilgrastim [NCT03294577].

La plinabuline **I-3** présente cependant une solubilité aqueuse particulièrement faible (< 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) et n'est utilisée à l'heure actuelle qu'en formulation avec un agent de solubilisation.<sup>138</sup> Ce composé représente donc un candidat parfait pour notre stratégie de « scaffold hopping » avec d'excellentes activités anti-cancéreuses sur plusieurs lignées et une solubilité aqueuse à améliorer, ce qui semble envisageable au vue de nos résultats précédents.<sup>33</sup>

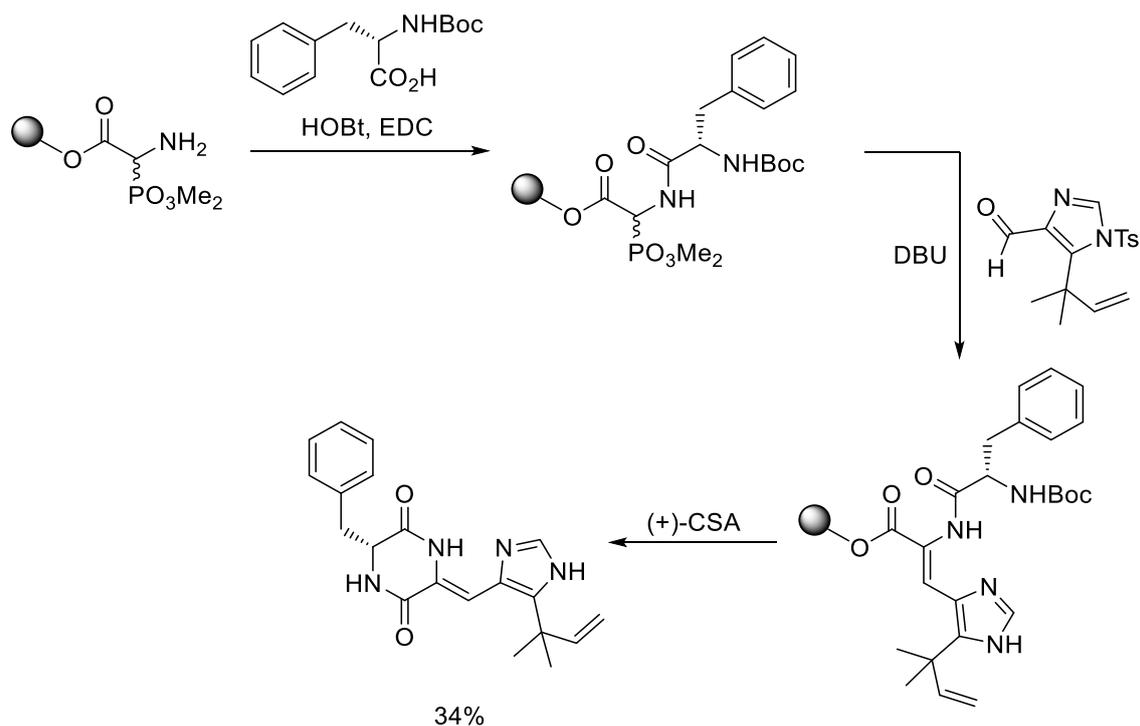
#### 4.2. Synthèse de l'aza-F-plinabuline

Dans cette étude, nous avons choisi d'introduire l'azote supplémentaire à la place du carbone 5 dans la structure de la plinabuline (Figure 41). Ce choix semble cohérent avec l'étude de RSA effectuée par Hayashi *et al.*<sup>133</sup> sur la phénylahistine et également avec la structure de la plinabuline. En effet, une fois introduit dans l'hétérocycle, cet azote devrait adopter une hybridation mixte  $sp^2/sp^3$ . Cette hybridation mixte lui permettra d'adopter une conformation 3D intermédiaire entre un carbone  $sp^2$  d'une oléfine et un carbone  $sp^3$  d'un acide aminé. Comme présenté en introduction, de tels atomes d'azote sont également capables de chiralité adaptative<sup>32</sup> entre deux formes (*R*) et (*S*) et devraient donc pouvoir adopter la bonne configuration active lors de l'interaction de la molécule avec sa cible biologique.



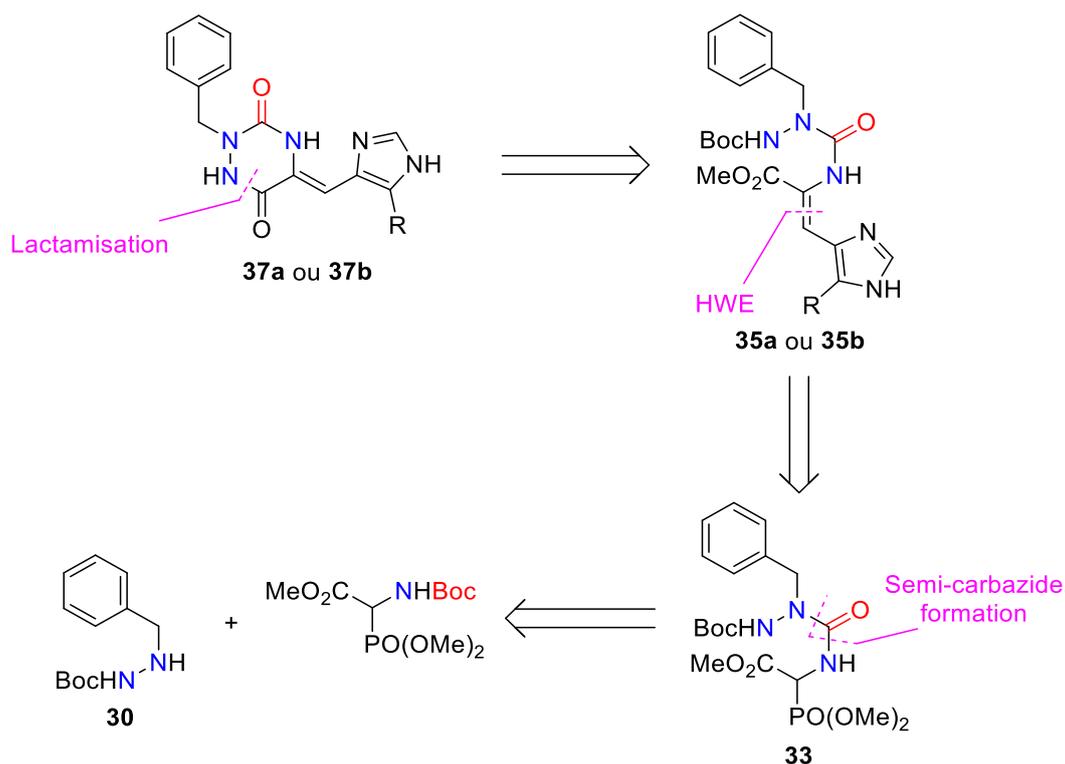
**Figure 41.** Structure de l'aza-F-plinabuline **37b**

Concernant la synthèse de ce composé, nous avons envisagé une stratégie proche de celle employée par Couladouros *et al.* pour la synthèse de la phénylahistine.<sup>139</sup> Les auteurs ont utilisé un dérivé de glycine  $\alpha$ -phosphorylé<sup>140</sup> supporté sur résine qui après un couplage peptidique, une réaction d'Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) et un clivage cyclisant en condition acide, a conduit à la (*S*)-phénylahistine avec un rendement de 34% sur l'ensemble de la séquence (Schéma 78).



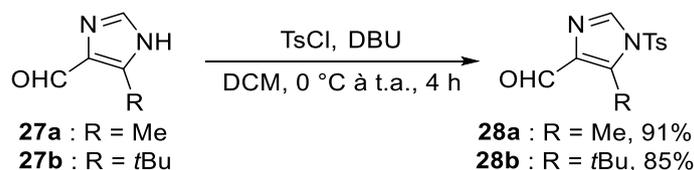
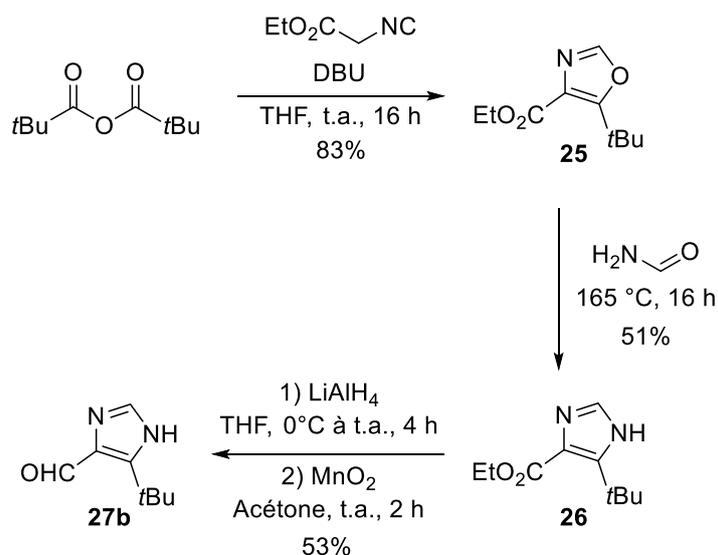
**Schéma 78.** Synthèse de la (S)-phénylahistidine par Couladouros *et al.*

En se basant sur cette stratégie et sur celles décrites auparavant (§2.2.3), nous avons proposé pour l'aza-F-plinabuline **37b** la rétrosynthèse présentée en Schéma 79. Le composé ciblé **37** pourrait être obtenu après cyclisation de l'intermédiaire **35** résultant de la réaction d'Horner-Wadsworth-Emmons entre l'imidazole-carbaldéhyde **27** et le semicarbazide phosphorylé **33**. Ce dernier peut à son tour être obtenu à partir de la glycine protégée  $\alpha$ -phosphorylée et le carbazate **30** correspondant. Pour cette étude, deux molécules ont été considérées : l'aza-F-plinabuline **37b** et le dérivé **37a** substitué par un groupement méthyle à la place du *tert*-butyle en position 5 de l'imidazole. Ce second dérivé a été sélectionné malgré une activité biologique plus faible afin d'optimiser plus aisément les différentes étapes de synthèse, l'imidazole méthylé **27a** correspondant étant commercial. Ces travaux ont été réalisés avec la collaboration du Dr Océane Florès et de Laurane Michel, étudiante en M2 que j'ai encadrée lors de son stage.

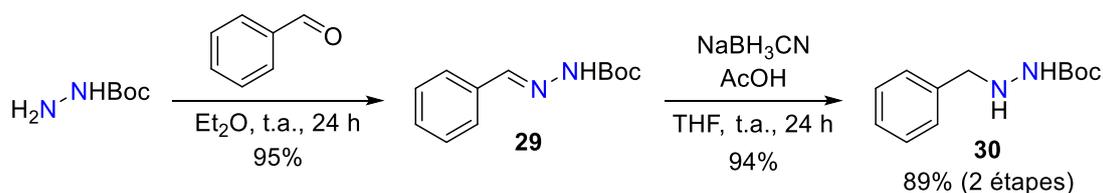


**Schéma 79.** Rétrosynthèse des aza-F-plinabulines

Selon une méthode déjà décrite dans la littérature,<sup>135</sup> nous avons synthétisé dans un premier temps le précurseur oxazole **25** à partir de l'anhydride pivalique et l'isocyanate d'éthyle, avec un rendement de 83% (Schéma 80). L'oxazole **25** a été ensuite mis à réagir dans le formamide à reflux menant ainsi à l'imidazole-carboxylate **26** avec des rendements variables compris entre 37 et 51%. Cet ester a été engagé sans purification préalable dans une réduction par  $\text{LiAlH}_4$ , suivie d'une oxydation par  $\text{MnO}_2$ , pour conduire à l'aldéhyde correspondant **27b** avec un rendement global de 53%. Les imidazoles **27a** et **27b** ont enfin été protégés par un groupement tosylo dans des conditions classiques avec des rendements respectifs de 91% et 85% (Schéma 81).

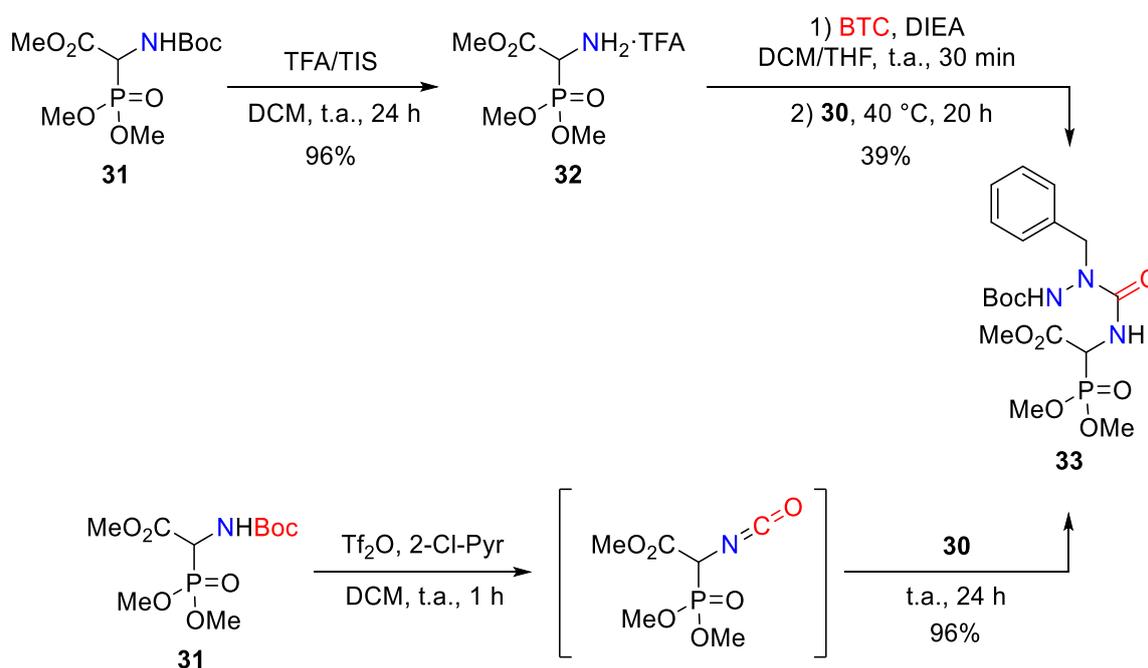


Nous avons ensuite synthétisé le carbazate substitué **30** à partir du *tert*-butyl carbazate par une séquence d'amination réductrice avec le benzaldéhyde (Schéma 82). Le carbazate désiré **30** a ainsi été obtenu avec un excellent rendement de 89% sur ces deux étapes.



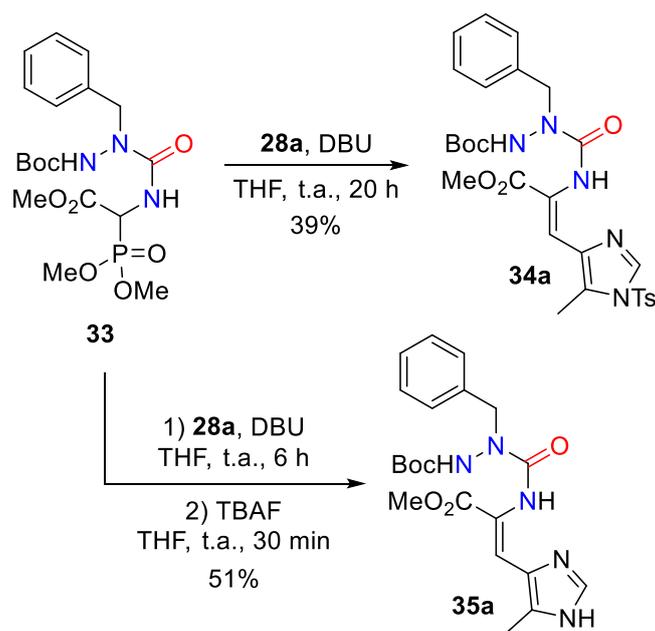
Une fois ces précurseurs en main il nous a été possible de débiter la séquence réactionnelle envisagée en Schéma 80. Afin d'obtenir le semicarbazide **31** nous avons d'abord utilisé des conditions réactionnelles classiquement utilisées au laboratoire (Schéma 83). L'ester aminé **31** a été déprotégé par réaction avec l'acide trifluoroacétique pour donner l'amine libre **32** avec un rendement de 96%. Le

semicarbazide **33** a tout d'abord été obtenu à l'aide de triphosgène avec un rendement modeste de 39%. Afin d'augmenter le rendement obtenu lors de cette première étape, nous nous sommes tournés vers une méthode décrite dans la littérature pour la synthèse d'urées à partir d'amine protégée par un groupement Boc.<sup>141</sup> La réaction a ainsi été directement effectuée sur l'acide aminé protégé **31** qui a été transformé en isocyanate correspondant par traitement avec l'anhydride triflique en présence de 2-chloropyridine. Après ajout du carbazate **30** sur l'isocyanate formé in situ, le semicarbazide **33** a été cette fois-ci obtenu avec un excellent rendement de 96%.



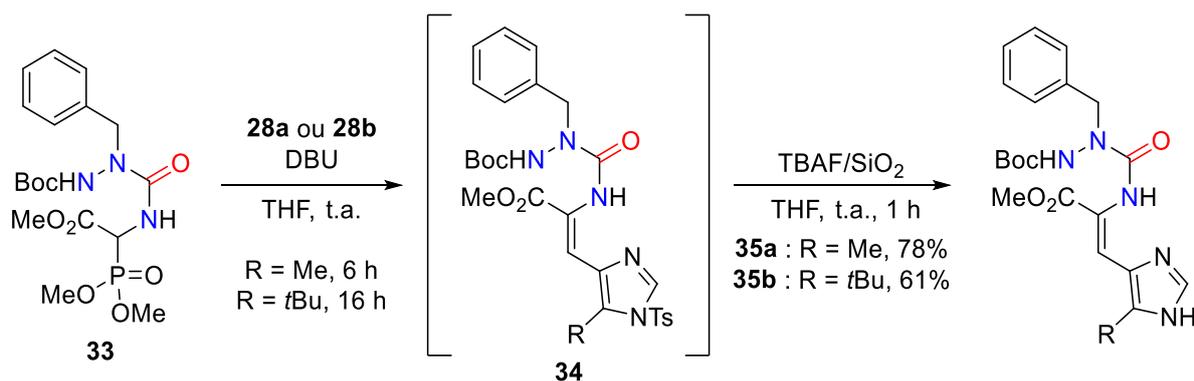
**Schéma 83.** Obtention du semicarbazide **33** selon deux stratégies

Ensuite, à partir du semicarbazide **33**, la réaction d'HWE a été réalisée dans un premier temps sur l'imidazole-aldéhyde méthylé **28a** dans les conditions décrites par Couladouros *et al.* pour la synthèse de la phénylhistine.<sup>139</sup> Dans ces conditions, nous avons pu obtenir l'alcène souhaité **34a** avec un rendement de 39% (Schéma 84). Cependant après analyse du brut réactionnel, nous nous sommes aperçus de la présence en quantité non-négligeable du produit **35a** issu de la déprotection du groupement tosylo. Nous avons ainsi décidé de réaliser l'étape de déprotection de ce tosylo en présence de TBAF directement sur le brut réactionnel de l'étape d'HWE. Cette stratégie nous a permis d'obtenir le composé souhaité **35a** avec un rendement global sur ces deux étapes de 51%.

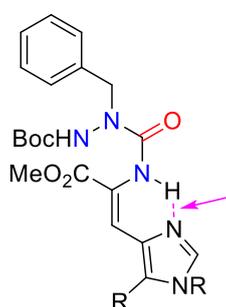


**Schéma 84.** Premières synthèses des composés **34a** et **35a**

Ce rendement modéré peut s'expliquer principalement par les difficultés rencontrées lors de la purification, dues à la présence d'un second composé inconnu portant un groupement tétrabutylammonium provenant du TBAF qui co-élue avec notre composé d'intérêt. Pour résoudre ce problème nous nous sommes tournés vers l'emploi de TBAF supporté sur silice, ce qui nous a permis d'augmenter le rendement de cette séquence à 78% pour **35a** (Schéma 85). Cette séquence a par la suite été optimisée pour le dérivé substitué par le groupement *tert*-butyle, plus encombré. Ainsi, en utilisant 2 équivalents d'aldéhyde et en prolongeant à 16 heures le temps de réaction pour la réaction d'HWE, **35b** a été obtenu avec un rendement de 61%. Il est à noter que ces deux composés **35a** et **35b** ont été obtenus ici uniquement sous la forme des stéréoisomères *Z*, ceci pouvant s'expliquer par l'existence d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre les azotes de l'imidazole et du semicarbazide comme représentée en Figure 42. Cette interaction stabilisante doit donc permettre de guider la réaction d'HWE vers l'isomère *Z*.

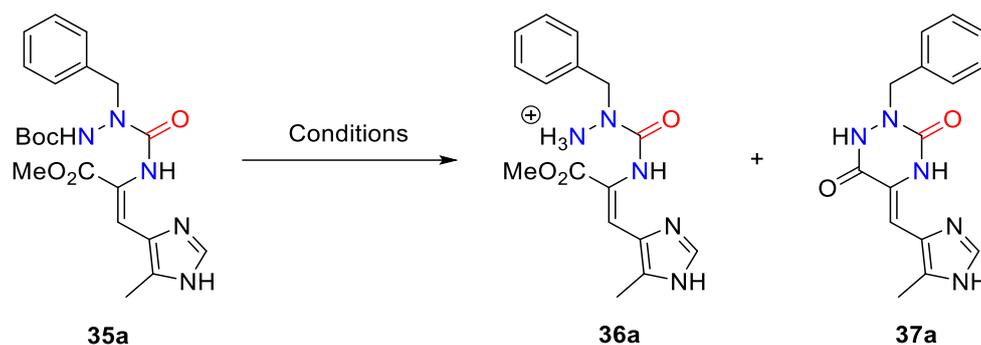


**Schéma 85.** Séquence optimisée pour la synthèse de **35a** et **35b**



**Figure 42.** Liaison hydrogène intramoléculaire stabilisante au sein de **35a** et **35b**

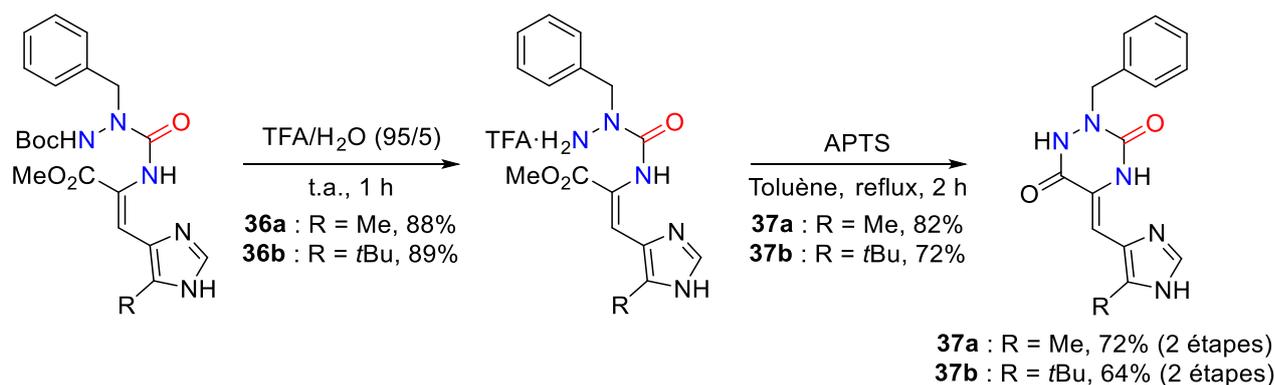
Enfin, nous nous sommes concentrés sur l'étape de cyclisation du semicarbazide **35a** obtenu précédemment. Plusieurs conditions acides ont été employées lors de cette étape afin d'obtenir l'aza-dicétopipérazine désirée. Pour cette réaction, l'emploi d'un mélange TFA/H<sub>2</sub>O a permis d'obtenir le dérivé déprotégé **36a** avec un excellent rendement isolé de 88%, mais sans formation du produit cyclisé **37a** (Tableau 15, Entrée 1). Le même résultat a été constaté avec la résine Amberlyst pour laquelle seul le produit déprotégé **36a** a été observé (Tableau 15, Entrée 2-4). En utilisant l'acide *p*-toluenesulfonique dans le méthanol uniquement de la dégradation a été observée (Tableau 15, Entrée 5-6). En revanche, lorsque le méthanol a été remplacé par le toluène, après 2 h de reflux, le produit de cyclisation **37a** a pu être obtenu et isolé avec un rendement de 66% (Tableau 15, Entrée 7). La prolongation du temps de reflux a mené à une baisse de rendement (57%) et à la formation de plusieurs sous-produits non-identifiés (Tableau 15, Entrée 8).



Entrée	Conditions	Résultats
1	TFA/H <sub>2</sub> O (95/5), t.a., 1 h	<b>36a</b> (88%)
2	Amberlyst, Toluène, reflux, 2 h	<b>36a</b> uniquement
3	Amberlyst, MeOH, reflux, 2 h	<b>36a</b> uniquement
4	Amberlyst, MeOH, 120 °C (μ-ondes), 20 min	<b>36a</b> uniquement
5	APTS, MeOH, reflux, 2 h	Dégradations
6	APTS, MeOH, 120 °C (μ-ondes), 20 min	Dégradations
7	APTS, Toluène, reflux, 2 h	<b>37a</b> (66%)
8	APTS, Toluène, reflux, 6 h	<b>37a</b> (57%)

**Tableau 15.** Optimisation de l'étape de cyclisation vers **37a**

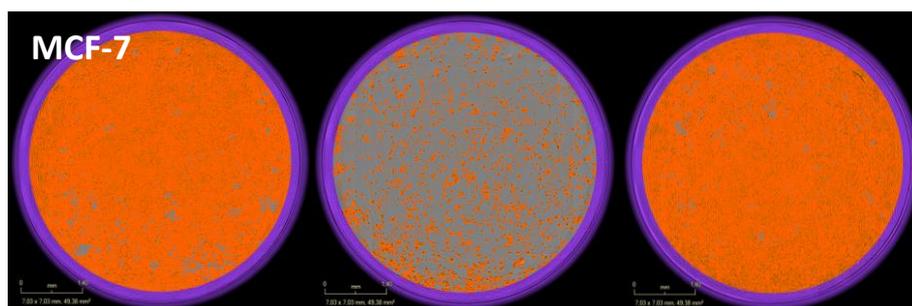
Compte tenu de ces résultats, nous avons envisagé d'effectuer la synthèse de **37a** en deux étapes : d'abord la déprotection du semicarbazide **35a** dans le mélange TFA/H<sub>2</sub>O (conditions du Tableau 15, Entrée 1) pour obtenir le composé **36a**, puis cyclisation de ce dernier en **37a** avec de l'APTS dans le toluène (conditions du Tableau 15, Entrée 7). Dans ces conditions l'aza-DCP **37a** peut être isolée avec un rendement de 72% sur les deux étapes (Schéma 86). Bien que ce rendement ne soit que légèrement supérieur à celui obtenu en une étape (72% vs 66%), les purifications se sont avérées plus simples et ces conditions ont été conservées. Ces conditions ont ensuite pu être appliquées au semicarbazide **35b** substitué par un groupement *tert*-butyle, conduisant à l'aza-DCP **37b** avec un rendement de 64% sur les deux étapes.



**Schéma 86.** Obtention des aza-DCPs **37a** et **37b**

#### 4.3. Evaluation de l'activité anti-cancéreuse de l'aza-F-plinabuline

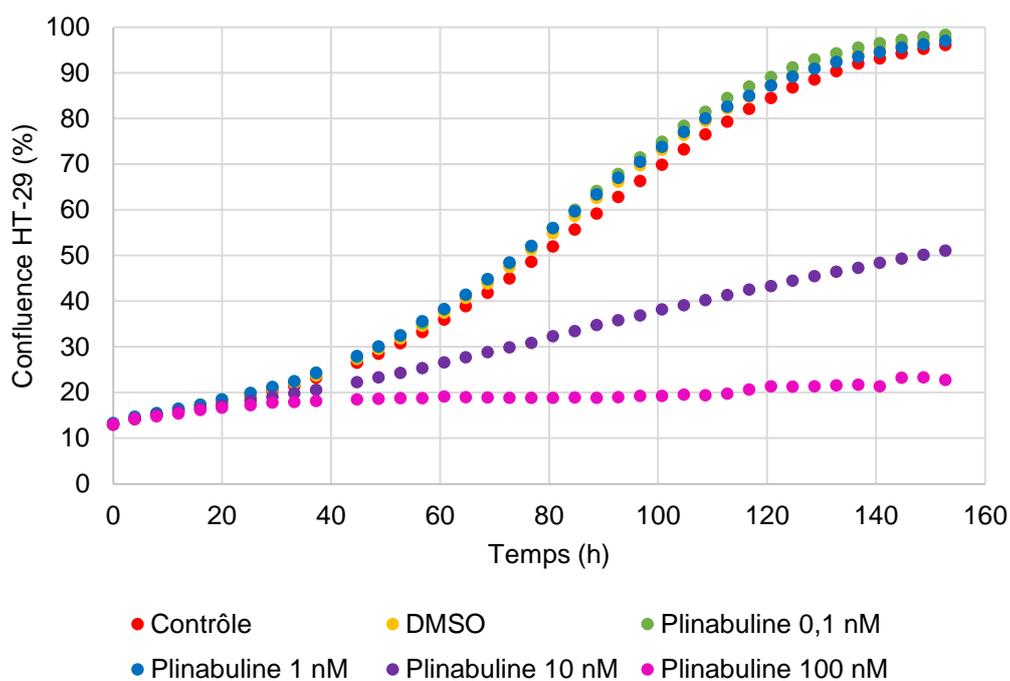
L'activité de l'aza-F-plinabuline **37b** a ensuite été testée sur trois lignées de cellules cancéreuses ayant démontré une sensibilité pour la plinabuline de départ. Les lignées HT-29 (cancer du côlon), MCF-7 (cancer du sein) et HCT-116 (cancer du côlon) ont ainsi été sélectionnées avec des IC<sub>50</sub> respectives pour la plinabuline de 15 nM, 30 nM et 6 nM. La prolifération cellulaire a été évaluée ici par mesure du pourcentage de la surface des puits de culture recouvert par les cellules adhérentes (confluence). Les trois lignées cancéreuses ont ainsi été cultivées en présence de concentrations croissantes de la molécule évaluée et la confluence a été mesurée régulièrement par un appareil Incucyte sur plusieurs jours (Figure 43).



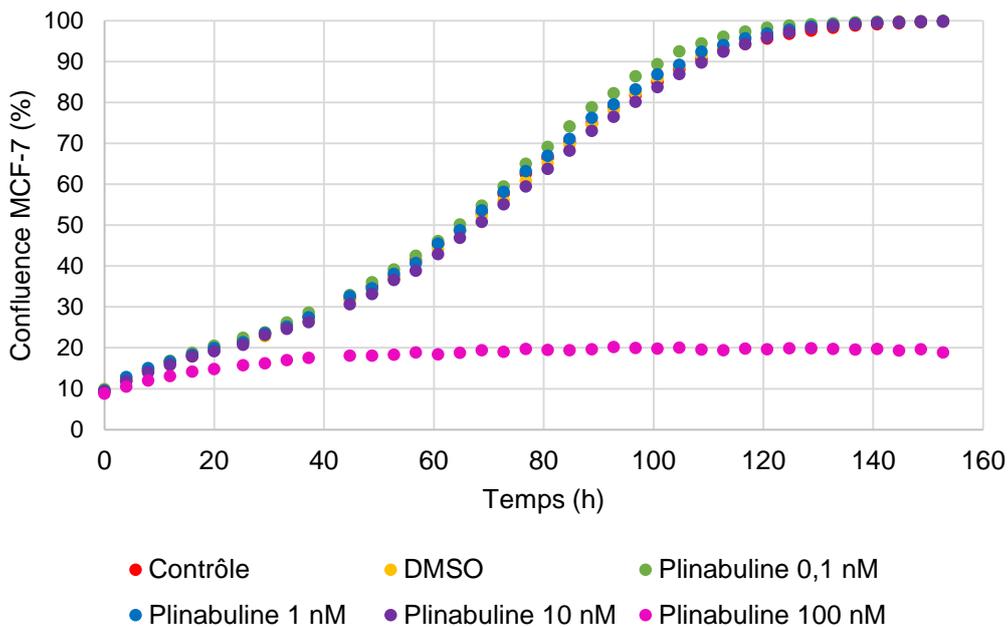
**Figure 43.** Images obtenues par l'Incucyte sur lignée MCF-7 du contrôle (gauche), plinabuline à 100 nM (centre), aza-F-plinabuline à 100 nM (droite)

L'activité anticancéreuse de la plinabuline a tout d'abord été validée sur ces trois lignées avec des inhibitions complètes de la croissance cellulaire à 100 nM (Figure 44- Figure 49). Une inhibition partielle a également pu être mesurée à 10 nM sur les lignées HT-29 et HCT-116, les deux lignées les plus sensibles à cette molécule. En revanche,

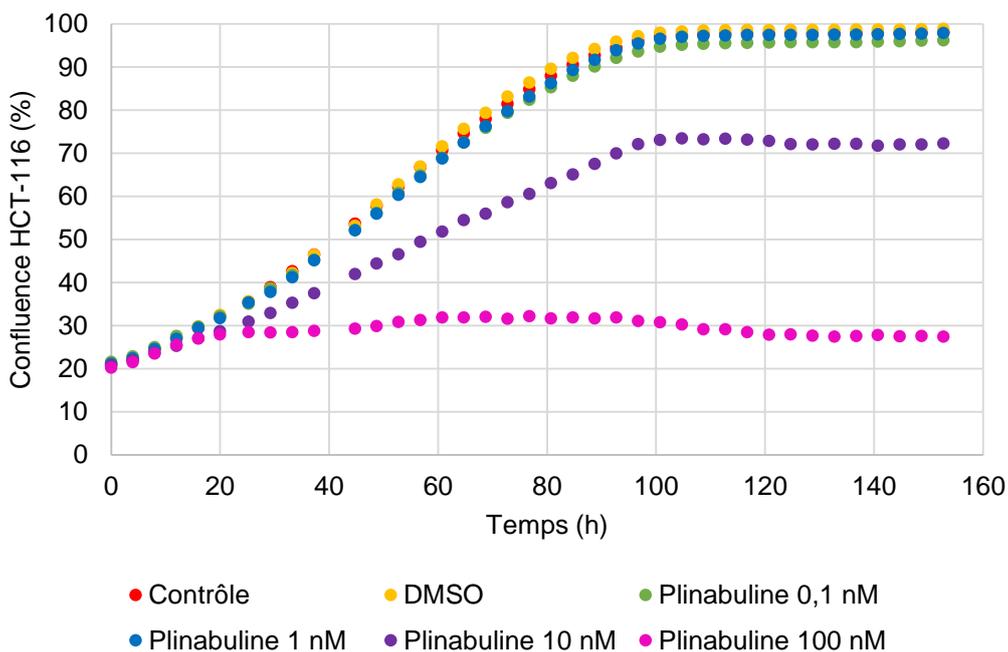
aucune activité anticancéreuse n'a pu être détectée jusqu'à 100 nM pour le dérivé aza-F-plinabuline **37b** sur ces trois lignées (). Des essais supplémentaires ont été réalisés sur d'autres lignées cancéreuses (CAL-27, CAL-33, SCC-9) et ont confirmé ces premiers résultats.



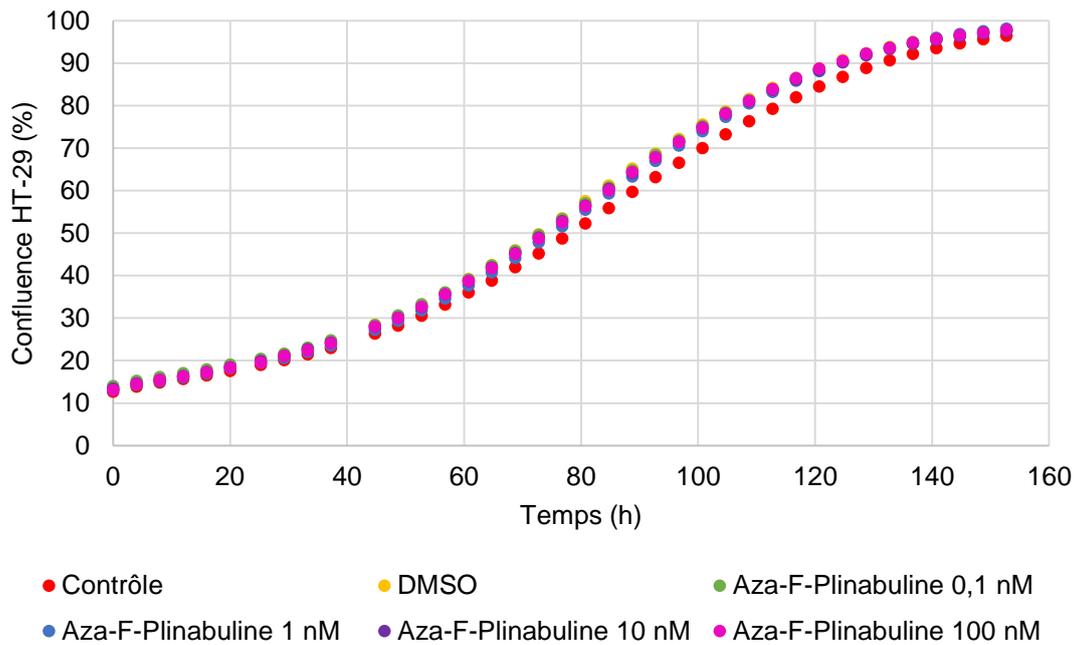
**Figure 44.** Mesure de l'inhibition de la croissance de cellules HT-29 en présence de plinabuline



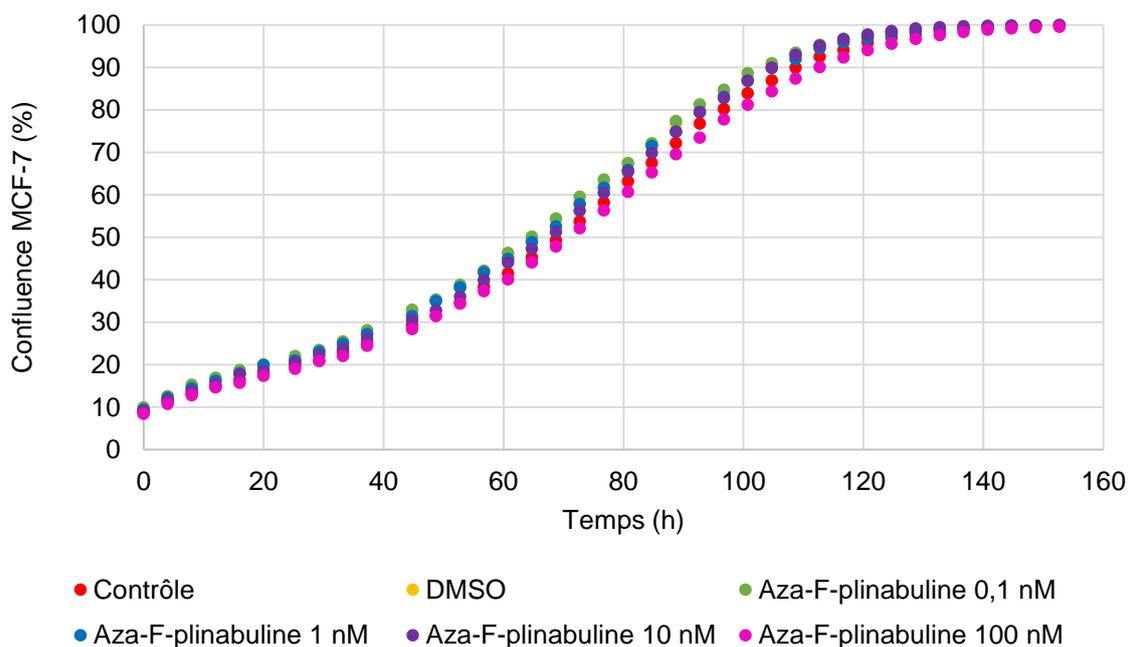
**Figure 45.** Mesure de l'inhibition de la croissance de cellules MCF-7 en présence de plinabuline



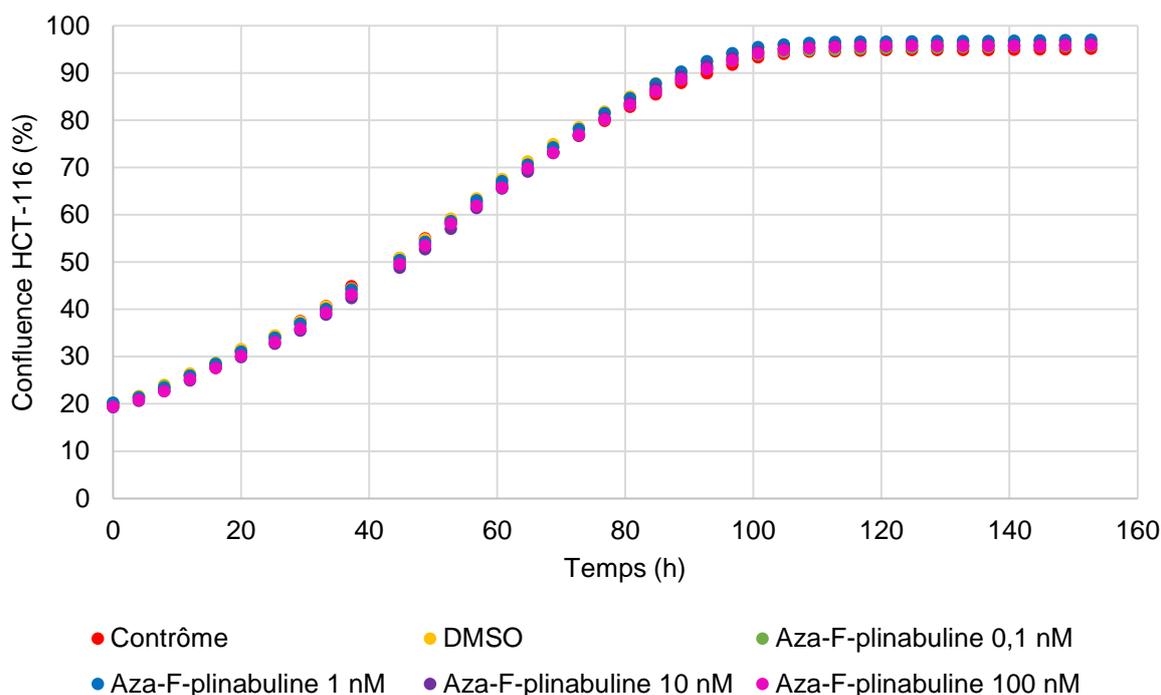
**Figure 46.** Mesure de l'inhibition de la croissance de cellules HCT-116 en présence de plinabuline



**Figure 47.** Mesure de l'inhibition de la croissance de cellules HT-29 en présence d'aza-F-plinabuline

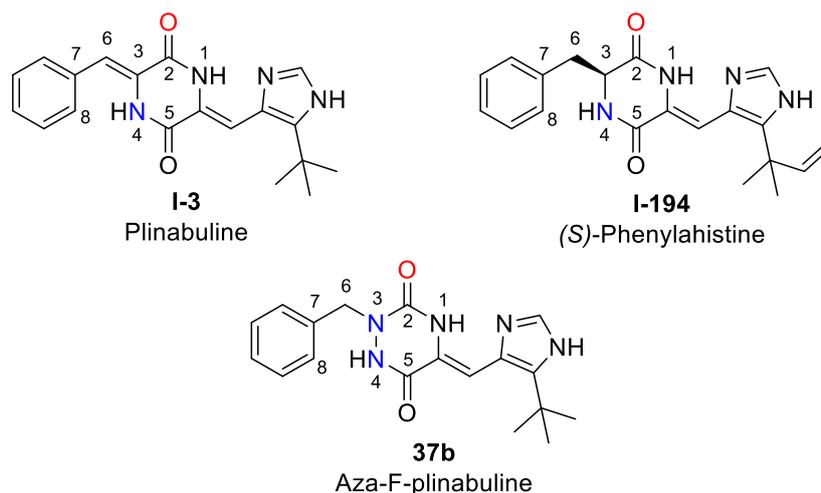


**Figure 48.** Mesure de l'inhibition de la croissance de cellules MCF-7 en présence d'aza-F-plinabuline



**Figure 49.** Mesure de l'inhibition de la croissance de cellules HCT-116 en présence d'aza-F-plinabuline

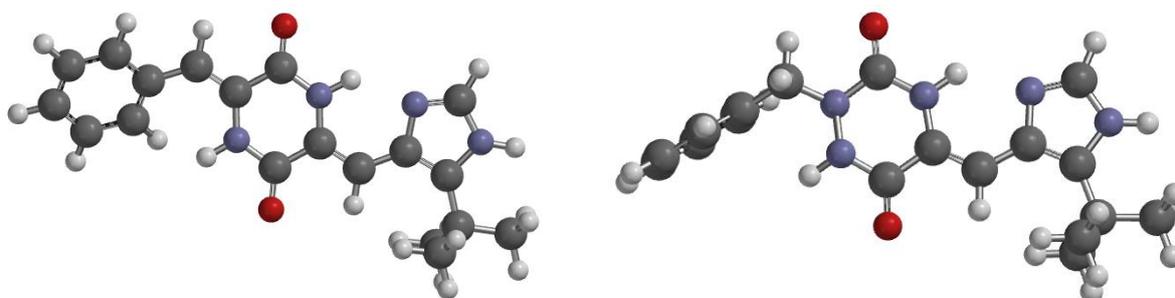
Pour mieux comprendre l'impact que les différentes modifications structurales pourraient avoir sur les interactions avec les cibles et ainsi sur les activités biologiques, les structures de la plinabuline, la phénylahistine ainsi que de l'aza-F-plinabuline ont été calculées et optimisées par DFT (B3LYP/6-31G<sup>\*</sup>). Dans ces structures, il est ainsi possible d'observer que l'introduction de l'atome d'azote à la place d'un carbone conduit à la déformation de l'hétérocycle DCP ou aza-DCP, la plinabuline et la phénylahistine étant plus planes que l'aza-F-plinabuline (Tableau 16, Entrée 1 et 2). L'hybridation mixte  $sp^2/sp^3$  de l'azote en position 3 de l'aza-F-plinabuline induit également une modification de la géométrie locale autour de cette position. Le carbone 6 est ici orienté légèrement en dehors du plan de l'hétérocycle (Tableau 16, Entrée 3 et 4), une géométrie intermédiaire entre celle de la plinabuline (plane) et de la phénylahistine (3D). Ces résultats obtenus ici par calcul théorique sont en bon accord avec ceux obtenus précédemment par notre groupe par diffraction aux rayons X.<sup>33</sup>

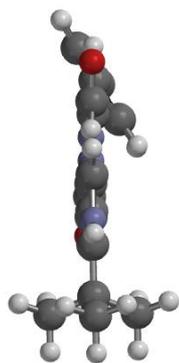


Entrée	Angle dièdre	Plinabuline	Phénylahistine	Aza-F-plinabuline
1	1-2-3-4	2,9°	4,0°	17°
2	2-3-4-5	2,6°	7,3°	29°
3	1-2-3-6	178°	122°	158°
4	5-4-3-6	179°	116°	171°

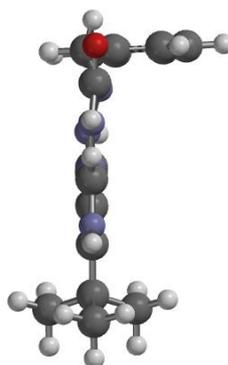
**Tableau 16.** Différences structurales de la plinabuline, la phénylahistine et l'aza-F-plinabuline

La substitution de la liaison double C=C de la plinabuline par une liaison simple C-N induit également une modification de l'orientation du cycle benzénique (Figure 50). Dans la structure de la plinabuline, ce dernier est orienté de façon quasi coplanaire avec le cycle DCP en partie à cause de la conjugaison avec la double liaison. Cette conjugaison n'existant plus pour l'aza-F-plinabuline, le cycle benzénique semble s'orienter préférentiellement de façon orthogonale au cycle aza-DCP. Ces molécules interagissant au sein de la tubuline avec le site de liaison de la colchicine **I-195**, une molécule relativement plane (Figure 51), de telles modifications structurales pourraient expliquer la perte d'activité observée.



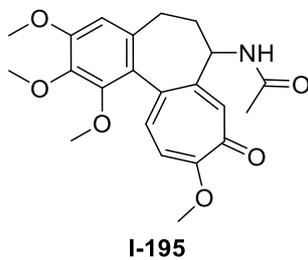


Plinabuline **I-2**



aza-F-plinabuline **37b**

**Figure 50.** Structures théoriques de la plinabuline et de l'aza-F-plinabuline



**Figure 51.** Structure de la colchicine **I-195**

# Conclusions & perspectives de la Partie I

Dans cette première partie, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à une réaction de Povarov faisant intervenir en tant que diénophile l'aza-DCP **4**, une énamide endocyclique à 6 chaînons qui est un type de diénophile très peu décrit pour cette réaction. Cette méthodologie a été développée en réaction dicomposante (2CPR) à partir des imines, ou tricomposante (3CPR) à partir d'aldéhydes et anilines avec formation *in situ* des imines sous catalyse de BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O. Une vingtaine d'exemples d'aza-DCP tétracycliques **5** ont ainsi été obtenues sous la forme de deux diastéréoisomères, séparables par purification HPLC semi-préparative en phase inverse. Enfin, une étude théorique a permis de mettre en évidence un mécanisme de type Mannich pour cette réaction.

Dans un second temps, afin d'identifier des activités biologiques potentielles des aza-DCPs, une recherche a été menée en appliquant la stratégie de « scaffold hopping » directement sur des dérivés DCP bioactifs. Trois DCPs ont été sélectionnées : le tadalafil (un inhibiteur de PDE5), la brévianamide F (molécule naturelle aux propriétés antimicrobiennes) et la plinabuline (une molécule anticancéreuse). Les différentes stratégies utilisées pour synthétiser l'analogue du tadalafil, l'aza-W-tadalafil, n'ont pas abouti à cause d'instabilité en milieu acide de certains intermédiaires de synthèse. Par la suite, l'aza-W-brévianamide F a été synthétisée avec un rendement faible de 10%, mais qui a permis l'obtention d'une quantité suffisante pour son évaluation biologique. Pour la brévianamide F, les résultats des tests biologiques décrits dans la littérature sur les espèces de bactéries et champignons, n'ont pas pu être reproduits. Sur ces mêmes souches, l'aza-W-brévianamide F **24** n'a pas conduit à de meilleurs résultats. Enfin, le dérivé aza-DCP de la plinabuline, l'aza-F-plinabuline **37b**, a pu être synthétisé avec un rendement de 34% sur 6 étapes. Les évaluations biologiques de la plinabuline et de l'aza-F-plinabuline ont été réalisées, mais les premières mesures effectuées sur les lignées cancéreuses HT-29, MCF-7 et HCT-116 n'ont pas permis de mettre en évidence une activité anticancéreuse pour l'aza-DCP **37b**. Ce résultat pourrait en partie s'expliquer par les modifications structurales induites par la substitution de la double liaison C=C au profit d'une liaison simple C-N.

En perspective de ce travail, il est envisagé d'inclure un maximum de structures aza-DCPs au sein de nos chimiothèques, celle de l'UMR 7200 et celle de l'Institut du

Médicament de Strasbourg (IMS) dont notre équipe est membre fondateur. Les criblages réguliers pourront nous mener à la découverte de structures d'aza-DCP prometteuses. A partir de ces dernières, des études de RSA pourront être conduites à l'aide du savoir-faire accumulé par le laboratoire vis-à-vis de la modification de ce scaffold.

---

**PARTIE II.**

**FONCTIONNALISATION DE PEPTIDES PAR REACTION**

**« CLICK » DE THIA-DIELS-ALDER POUR DES**

**APPLICATIONS EN IMAGERIE**

---



# CHAPITRE 4.

## BIBLIOGRAPHIES : IMAGERIE, REACTION « CLICK » ET DITHIOESTERS

### 1. Rappels bibliographiques : fonctionnalisation de peptides par des réactions de cycloaddition et utilisation en imagerie

#### 1.1. Méthodes d'imagerie moléculaire en chémobiologie

Afin d'étudier et sonder le vivant, différentes méthodes d'imagerie peuvent être employées et possèdent chacune leurs avantages et leurs inconvénients (Tableau 17).<sup>142</sup> L'imagerie optique possède une excellente sensibilité (10 pM) ainsi qu'une très bonne résolution pour des études *in vitro* grâce à l'utilisation de la microscopie confocale<sup>143</sup> ou à haute résolution. Ces deux caractéristiques font de l'imagerie par fluorescence une méthode de premier choix pour les études *in vitro* réalisées sur cellules notamment. Cette technique souffre cependant d'une faible pénétration (< 20 mm) tissulaire limitant grandement son utilisation pour des études *in vivo*. Pour y remédier, les chémobiologistes ont pu se tourner vers différentes techniques d'imagerie possédant de meilleures pénétrations au sein des tissus comme l'imagerie à résonance magnétique (IRM), la tomodensitométrie (TDM), la tomographie à émission de positons (TEP) ou la tomographie par émission monophotonique (TEMP). Parmi ces alternatives, l'IRM et la TDM possèdent toutes deux des sensibilités faibles à très faibles (resp. 10  $\mu$ M et 0.1 M) et nécessitent donc de plus grandes quantités d'agents d'imagerie augmentant donc le coût de l'examen et les risques pour le patient. Ces méthodes restent ainsi peu privilégiées malgré d'excellentes résolutions *in vivo*. La TEP et la TEMP présentent en revanche les plus hautes sensibilités pour de l'imagerie *in vivo* (1 - 10 pM) et résolutions spatiales (0,5 - 15 mm) leur permettant de figurer parmi les méthodes les plus employées pour l'étude de systèmes biologiques *in vivo*. En outre, contrairement à l'IRM (hormis l'IRM fonctionnelle peu répandue) et à la TDM X, ces deux méthodes (TEP et TEMP) constituent les piliers de l'imagerie fonctionnelle et permettent ainsi d'explorer des mécanismes cellulaires (enzymes, récepteurs, transporteurs...) *in vivo*. Le second avantage pour l'imagerie TEP, hormis sa sensibilité élevée, est lié au fait que la méthode soit intrinsèquement quantitative et

permet ainsi de quantifier de façon précise le radiotracteur au sein des tissus que ce soit par imagerie *in vivo* ou par comptage *ex vivo*.

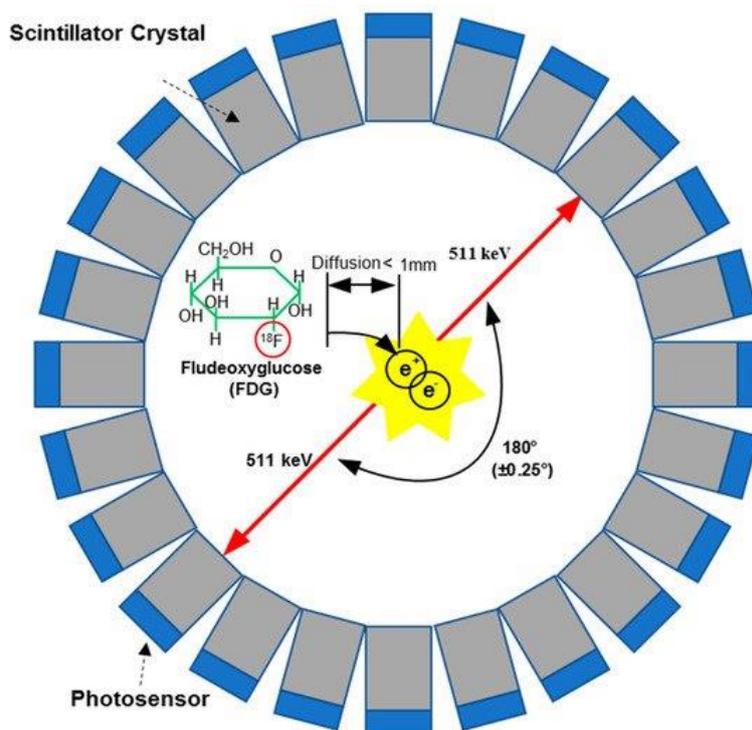
Technique	Principal agent d'imagerie	Résolution <i>in vivo</i>	Sensibilité	Pénétration des tissus
Optique	Fluorophores	2 - 3 mm ( $< 1 \mu\text{m}$ <i>in vitro</i> )	10 pM	$< 20$ mm
IRM	Molécules para-magnétiques	0,03 - 1 mm	10 $\mu\text{M}$	$> 300$ mm
TDM	Molécules iodées	0,03 - 1 mm	0,1 M	$> 300$ mm
TEP	Emetteurs $\beta$	1 – 10 mm	1 pM	$> 300$ mm
TEMP	Emetteurs $\gamma$	0,5 – 15 mm	10 pM	$> 300$ mm

**Tableau 17.** Propriétés des différentes techniques d'imagerie employées en chimobiologie

Nous avons détaillé dans les prochains paragraphes les méthodes d'imagerie par scanner TEP et par fluorescence. Ces deux techniques représentent les meilleures options pour des études *in vivo* et *in vitro* respectivement et ce sont celles que nous avons également choisi pour ces travaux de thèse.

#### 1.1.1. Imagerie par scanner TEP

Le scanner TEP est une technique d'imagerie non invasive utilisée pour le diagnostic et le suivi de différentes pathologies chez l'homme. Elle est réalisée après injection d'une quantité infime de traceur porteur d'un isotope radioactif émetteur de positon (ou émetteur  $\beta^+$ ). Après émission du positon avec une certaine vitesse, ce dernier va ensuite parcourir une courte distance avant de s'arrêter et rencontrer un électron (Figure 52). Cette rencontre particule/anti-particule va produire deux rayons  $\gamma$  à 511 keV émis à  $180^\circ$  qui seront finalement détectés. Ces rayonnements étant très peu absorbés par les tissus, cette méthode d'imagerie est une technique de choix pour des applications *in vivo* et permet une reconstruction 3D de la zone d'intérêt.



**Figure 52.** Illustration d'un scanner TEP avec le 18-fluorodésoxyglucose<sup>144</sup>

Les trois principaux isotopes utilisés pour cette technique d'imagerie sur peptides à des stades préliminaires ou cliniques, ainsi que leurs principales propriétés, sont indiqués dans le Tableau 18.<sup>145</sup> Ces isotopes possèdent tous des temps de demi-vie adéquats pour le suivi de peptides *in vivo* ainsi que de bonnes propriétés pour être utilisées en TEP. Parmi les trois, le fluor-18 semble cependant présenter le meilleur compromis entre temps de demi-vie et résolution (liée à l'énergie du positon), tout en permettant son introduction par simple substitution nucléophile à l'aide de l'anion fluorure. Cette méthode induit en général une modification minimale de la structure peptidique, permettant de mieux préserver les propriétés pharmacologiques du peptide de départ. A l'inverse, l'introduction du cuivre-64 ou du gallium-68 qui doit être effectuée par le biais d'un ligand encombrant de type DOTA, peut s'accompagner d'une modification de la pharmacologie du peptide.

Isotopes	Demi-vie	Décroissance $\beta^+$	Energie maximale (MeV)	Distance maximale (mm)
$^{18}\text{F}$	110 min	97%	0,63	2,4
$^{64}\text{Cu}$	12,8 h	18%	0,65	2,5
$^{68}\text{Ga}$	68 min	89%	1,90	9,2

**Tableau 18.** Principaux isotopes utilisés sur peptides pour des applications en TEP

Le radiomarquage d'un peptide par le fluor-18 peut être effectué de manière directe<sup>146</sup> ou indirecte (cf. §3.2 et §3.3) à l'aide de groupements prosthétiques. Cette seconde stratégie s'appuie sur le radiomarquage dans un premier temps d'une molécule de petite taille qui sera liée au peptide dans une deuxième étape. En règle générale c'est la stratégie préférée, car elle permet de réduire la quantité de peptide utilisé et de travailler en conditions plus douces. Par contre, l'étape de liaison au peptide doit être effectuée sur des temps relativement court, inférieurs à une heure, s'adaptant à la période radioactive du fluor-18 ( $t_{1/2} = 110$  min) tout en travaillant à des concentrations beaucoup plus faibles qu'en chimie « classique » (de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ). Enfin, les synthèses de radioligands étant effectuées sur quelques nanomoles de produit, d'autres caractérisations, conversions ou rendements ont dû être définies. A une telle échelle, seul un faible voire très faible signal UV peut être observée en HPLC, les suivis doivent donc être effectués à l'aide de détecteurs de radioactivité. Ces mesures sont uniquement et directement liées à la quantité de radioactivité et sont indépendantes de la nature de la molécule étudiée contrairement au signal UV. Elles peuvent être directement quantifiées et permettent ainsi d'accéder à des conversions radiochimiques (RCC) par intégration des aires des pics. De la même manière, les produits ne pouvant être pesés, les rendements radiochimiques (RCY) sont calculés comme le rapport entre la radioactivité du produit final pur et celle du réactif de départ. Ces mesures de RCC et RCY peuvent également être « corrigées de la décroissance » en ramenant toutes les activités considérées à un même temps. De cette façon, les valeurs obtenues ne prendront en compte que les processus chimiques, on les notera dans ce cas dcRCC et dcRCY. La pureté des composés obtenue peut également être mesurée sur le canal radioactif de l'HPLC, on parlera alors de pureté radiochimique. De plus, chaque isotope radioactif émet une certaine radioactivité par quantité de matière appelée « activité spécifique » ou  $A_s$ , donnée en  $\text{GBq}/\mu\text{mol}$ . Le fluor-18 possède par exemple une activité spécifique d'environ 63 000

GBq/ $\mu\text{mol}$ . Pour un composé, une activité molaire ou  $A_m$  pourra être calculée en mesurant, par le biais d'une courbe d'étalonnage, la quantité de matière émettant une certaine radioactivité. Cette donnée est particulièrement importante car elle permet d'obtenir une bonne estimation du ratio entre le produit marqué au fluor-18 et celui « marqué » au fluor-19, lié à l'inévitable contamination des milieux réactionnels et des réactifs par l'isotope stable. En effet, ces deux composés possédant les mêmes propriétés physico-chimiques, leur temps de rétention en HPLC sera donc parfaitement identique. Une proportion plus grande de produit marqué au fluor-19 augmentera donc le signal UV obtenu en HPLC sans modifier la radioactivité, diminuant donc l'activité molaire mesurée. Cette mesure est également le seul moyen à notre disposition pour évaluer la quantité de matière engagée et donc le nombre d'équivalents utilisé dans les réactions de radiomarquage. Enfin, l'identification des produits radioactifs formés ne peut être réalisée qu'à l'aide de références non-radioactives (ou marquées au fluor-19) par comparaison des temps de rétention ou par co-injection en HPLC.

#### 1.1.2. *Imagerie optique (fluorescence, phosphorescence)*<sup>147</sup>

L'utilisation d'imagerie optique (fluorescence ou phosphorescence) représente une méthode d'étude du vivant complémentaire à la TEP. Cette technique possède également une excellente sensibilité avec des concentrations d'étude pouvant descendre jusqu'au nanomolaire. De plus, l'imagerie par fluorescence permet d'accéder à de bien meilleures résolutions spatiales ( $< 1\mu\text{m}$ ) ouvrant ainsi la possibilité d'imageries cellulaires par exemple. Cette technique s'appuie sur les propriétés spectroscopiques des molécules fluorescentes ou phosphorescentes qui peuvent être illustrées au sein d'un diagramme de Perrin-Jablonski (Figure 53). Après absorption d'un photon, un fluorophore se trouvera généralement dans un état vibrationnel de haute énergie au sein des états électroniques excités  $S_2$  ou  $S_1$  avant de rapidement revenir à l'état de plus basse énergie de  $S_1$  par conversion interne et/ou relaxation vibrationnelle. Cette molécule pourra ensuite revenir à l'état fondamentale  $S_0$  soit par des phénomènes non radiatifs, soit par émission d'un photon de fluorescence en quelques nanosecondes. Certaines molécules à l'état  $S_1$  (état singulet) peuvent également changer de spin et passer à l'état  $T_1$  (état triplet) par conversion intersystème. L'émission de  $T_1$  vers  $S_0$  est alors appelée phosphorescence et étant interdite de spin, se caractérisera par des temps d'émission beaucoup plus longs (de

quelques millisecondes à quelques secondes). Ce second phénomène peut être favorisé par la présence d'atomes lourds au sein de la molécule considérée, ces derniers facilitant la conversion intersystème nécessaire au phénomène de phosphorescence.

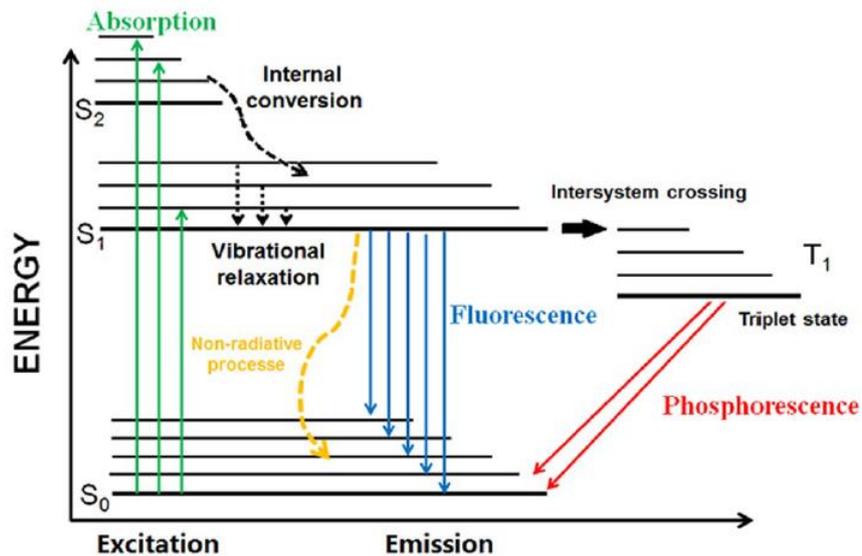
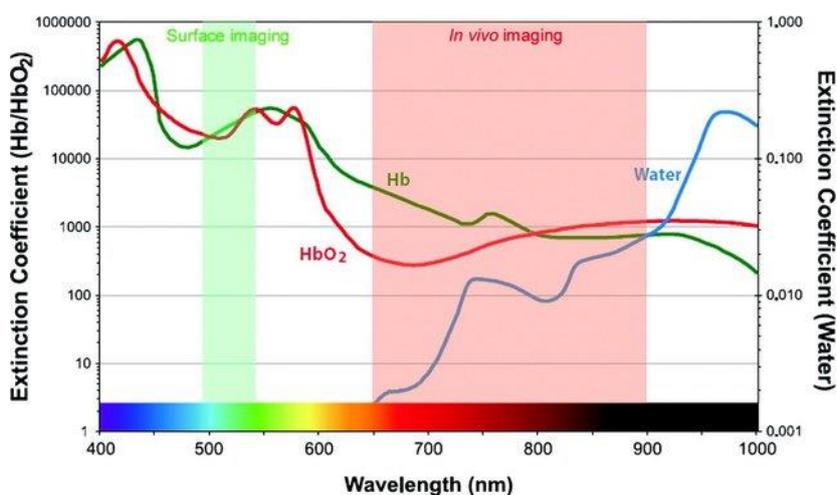


Figure 53. Diagramme de Perrin-Jablonski<sup>148</sup>

Un fluorophore pourra tout d'abord être caractérisé par les longueurs d'onde d'absorption  $\lambda_{\text{abs}}$  et d'émission  $\lambda_{\text{em}}$  maximales. Comme illustré par le diagramme de Perrin-Jablonski, une molécule fluorescente réémettra nécessairement des photons de plus basse énergie ou de plus haute longueur d'onde que ceux précédemment absorbés. La différence entre ces deux longueurs d'onde maximales est appelée déplacement de Stokes et peut grandement varier entre plusieurs fluorophores, de quelques nanomètres à une centaine de nanomètres. Comme toute molécule absorbant la lumière, un fluorophore sera également caractérisé par son coefficient d'extinction molaire  $\epsilon_{\lambda}$  quantifiant sa capacité à absorber à la longueur d'onde  $\lambda$ . Comme précisé ci-dessus, plusieurs chemins de relaxation existent pour une molécule dans un état excité après absorption d'un photon. Le rendement quantique de fluorescence  $\Phi_F$  a ainsi été défini comme la probabilité que possède un photon absorbé d'induire l'émission d'un photon de fluorescence chez un fluorophore. Cette caractéristique est directement liée aux capacités émissives d'une molécule, plus ce rendement est élevé, meilleur sera le fluorophore.

Enfin, à la différence des rayons gamma en TEP, l'émission de fluorescence dans le domaine du visible sera rapidement absorbée par les tissus, ce qui restreint en grande partie l'imagerie optique à des applications *in cellulo* ou à des études en surface. Pour obtenir des images *in vivo*, des fluorophores émettant dans la gamme rouge lointain - proche infrarouge (entre 650 et 900 nm) devront être employés. Malheureusement de tels fluorophores sont encore rares et coûteux de nos jours et peu d'applications *in vivo* ont ainsi été rapportées.

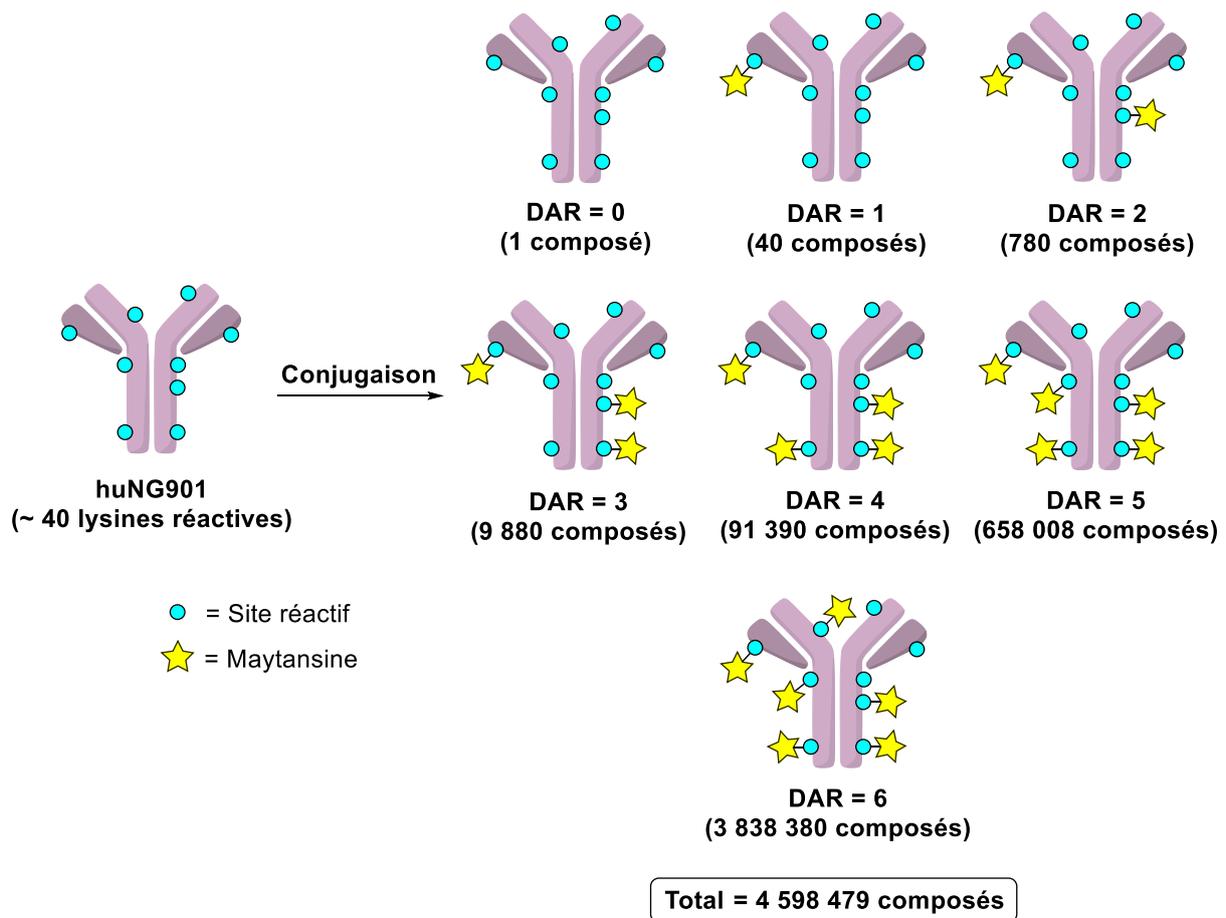


**Figure 54.** Évolution des coefficients d'extinction molaire de l'hémoglobine et de l'eau à différentes longueurs d'onde<sup>149</sup>

## 1.2. Chimie click, bioconjugaison, réactions bio-orthogonales

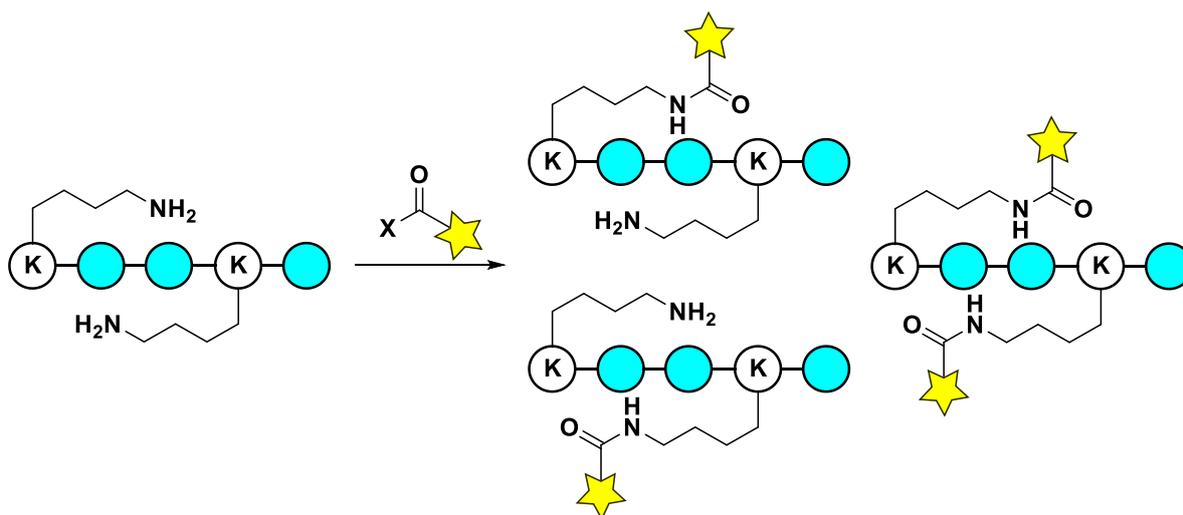
Introduit par Sharpless *et al.* en 2001,<sup>150</sup> le concept de « chimie click » définit les caractéristiques de réactions idéales permettant la jonction de deux sous-unités moléculaires par un lien hétéroatomique (C-X-C), de manière efficace et quelle que soit l'échelle employée. Pour atteindre un tel objectif, Sharpless *et al.* ont établi les différents critères permettant de définir cette nouvelle catégorie de réactions. Ces transformations doivent ainsi présenter une thermodynamique très favorable ( $> 20 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) afin de conduire aux produits avec de hauts rendements et sélectivités. Ces processus doivent également être modulables vis-à-vis des substrats envisagés de façon à obtenir la plus grande diversité de produits possible. Ces réactions devant être efficaces à toute échelle, des conditions réactionnelles simples (substrats facilement disponibles, pas de solvant ou un solvant bénin) ainsi qu'une purification non-nécessaire ou facile (cristallisation ou distillation) sont également à considérer.

Ces réactions constituent ainsi un excellent point de départ pour la mise au point de réactions dites de bioconjugaison, où deux partenaires, dont une biomolécule, sont liés de façon covalente pour donner un bioconjugué. Différentes biomolécules complexes (peptides,<sup>151</sup> protéines,<sup>151</sup> anticorps<sup>152</sup>) peuvent ainsi être fonctionnalisées pour diverses applications notamment en imagerie de fluorescence<sup>153</sup> ou TEP<sup>154</sup> ou en thérapie, par liaison à un médicament ou radioisotope thérapeutique. Pour cela, les liens nouvellement formés devront évidemment faire preuve de stabilité chimique et biologique dans des conditions physiologiques (pH, températures) et face aux différentes enzymes (CYP450, estérases, peptidases) pouvant être rencontrées en fonction de l'application visée. La mise au point de nouvelles stratégies de bioconjugaison reste depuis plusieurs décennies un point central de la recherche en chimobiologie. Ces molécules présentant un grand nombre de fonctions disponibles pour réagir (amine, alcool, thiol, acide carboxylique...), leur modification non sélective mènera inévitablement à des mélanges complexes de produits. Par exemple, la modification des lysines de l'anticorps huN901 par un ester succinique dérivé de la maytansine (agent cytotoxique) a montré la présence d'un mélange d'anticorps avec des « drug-antibody ratio » (DAR) compris entre 0 et 6.<sup>155</sup> En théorie, ces modifications peuvent avoir lieu sur n'importe laquelle des 86 lysines de huN901 mais les auteurs ont réussi à démontrer que « seules » 40 lysines pouvaient subir cette conjugaison. Avec ces données et par analyse combinatoire, il est possible de calculer qu'après une telle conjugaison, le bioconjugué est obtenu sous la forme d'un mélange d'un peu plus de 4,5 millions d'isomères dans des proportions variées. Une telle méthode ne peut donc pas être appliquée à la synthèse de conjugué anticorps-médicament. En effet, l'obtention de plusieurs isomères pour un même DAR associée à la formation de plusieurs DAR pose de nombreux problèmes pour des applications thérapeutiques. De plus, les auteurs ont également démontré que les modifications pouvaient avoir lieu sur les chaînes légères et lourdes mais également en position *N*-terminal de l'anticorps. Ces modifications pourraient donc altérer la liaison de l'anticorps à sa cible et ainsi diminuer sa sélectivité.



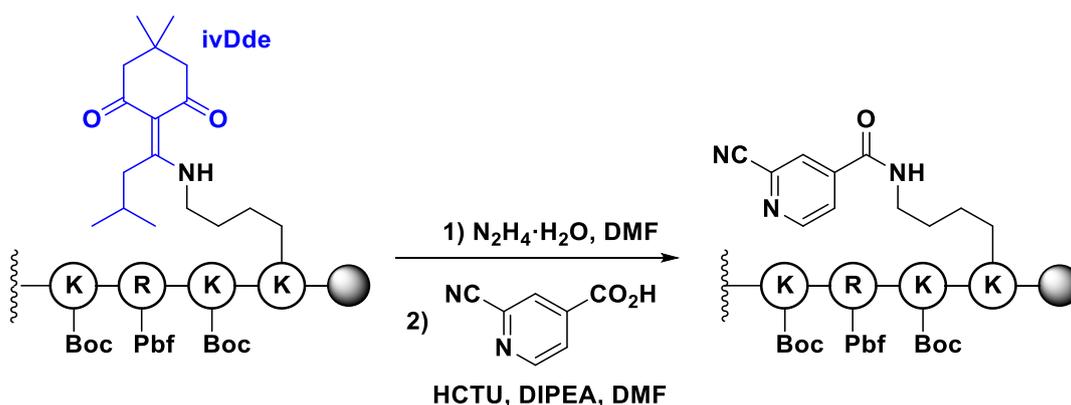
**Schéma 87.** Modification de l'anticorps huNG901 par la maytansine

Ce manque de chimiosélectivité de la réaction d'acylation peut également être observé à moindre échelle en travaillant sur des peptides. Un peptide pouvant présenter plusieurs lysines, l'utilisation de méthodes d'acylation comme dans l'exemple précédent mènera également à un mélange de produits (Schéma 88).



**Schéma 88.** Acylation d'un peptide présentant plusieurs lysines

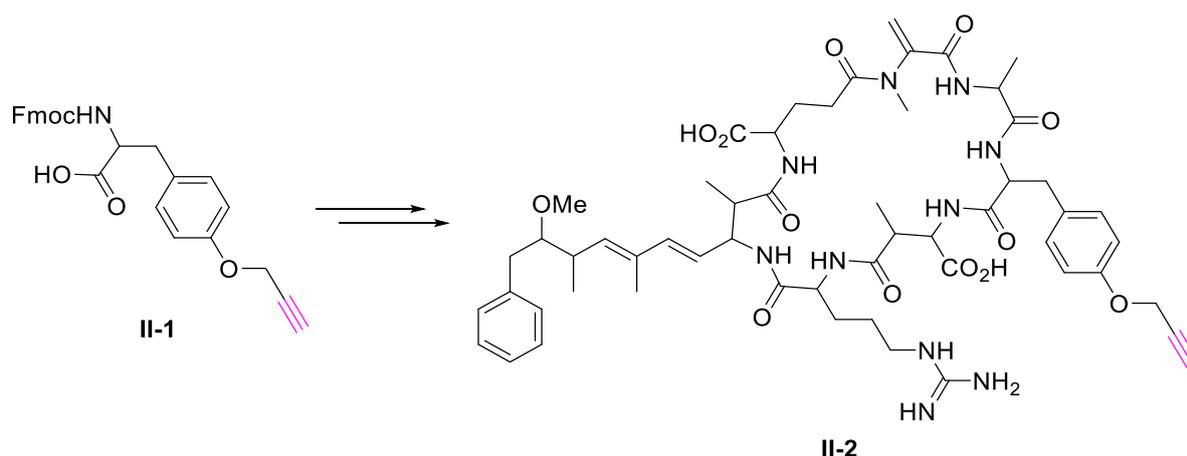
Plusieurs stratégies ont cependant permis de pallier ce problème. L'utilisation de groupements protecteurs alternatifs comme les groupements monométhoxytrityle (Mmt), 4-méthyltrityle (Mtt) ou encore 1-(4,4-Diméthyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidène)-3-méthylbutyle (ivDde) pour la chaîne latérale de lysine représente une première solution simple à ce problème. Cette stratégie a notamment permis au groupe de Nitsche d'introduire sélectivement un motif cyanopyridine sur une unique lysine et sur support solide, pour une cyclisation future du peptide (Schéma 89).<sup>156</sup>



**Schéma 89.** Modification d'une lysine après déprotection d'un groupement ivDde

Cette stratégie de fonctionnalisation directe est cependant très consommatrice en produit et peut être difficilement étendue à l'introduction de molécules acido-sensibles et coûteuses comme les fluorophores. Une stratégie alternative s'appuie sur la fonctionnalisation de ces peptides par le biais de groupements réagissant ensuite dans

des transformations bio-orthogonales. Ce concept de « bio-orthogonalité » développé par le groupe de Bertozzi en 2003<sup>157</sup> se réfère à l'ensemble des réactions de bioconjugaison n'interférant pas ou peu avec le milieu biologique. Les fonctions réactives utilisées dans ces cas ne doivent pas réagir (ou peu) avec les fonctions natives citées précédemment (amine, alcool, thiol, acide carboxylique) présentes sur les biomolécules. L'introduction de ces fonctions peut être effectuée par la modification préalable de certains acides aminés qui seront ensuite incorporés dans le peptide. Cette stratégie a par exemple été employée par le groupe de Deng en 2020 pour la synthèse d'un peptide cyclique **II-2** de la famille des microcystines, où la tyrosine a été incorporée sous la forme de son dérivé *O*-propargylé **II-1** (Schéma 90).<sup>158</sup> Ainsi, l'alcyne terminal non-réactif vis-à-vis des fonctions natives, pourra réagir sélectivement avec une fonction non-native, tel un azoture dans une réaction de cycloaddition (voir ci-après § 2.2).

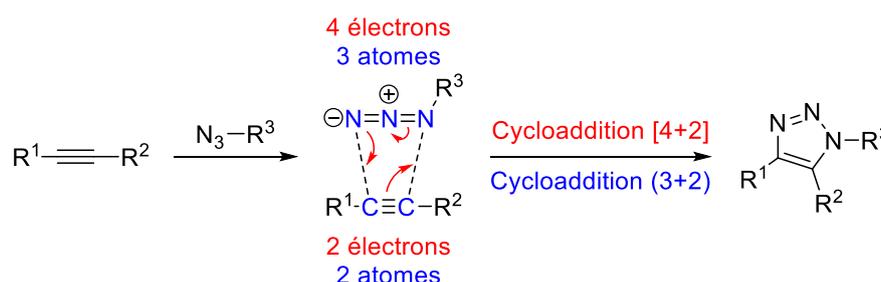


**Schéma 90.** Incorporation d'un acide aminé fonctionnalisé par un alcyne terminal dans la synthèse d'un peptide cyclique

### 1.3. Les réactions de cycloaddition

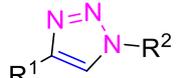
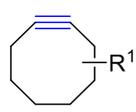
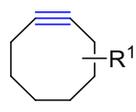
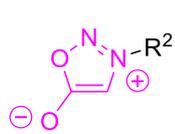
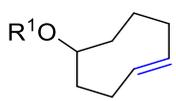
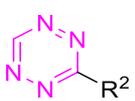
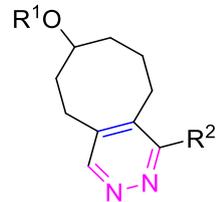
Les cycloadditions peuvent se définir comme la réaction entre deux partenaires réactionnels formant deux nouvelles liaisons  $\sigma$  aux extrémités de chacun, de façon concertée, pour obtenir un cycle. Ces réactions peuvent être effectuées entre partenaires comportant un ou plusieurs hétéroatomes, on parlera alors de réactions d'hétérocycloaddition. Afin de caractériser ces différentes réactions, deux nomenclatures, utilisant des parenthèses ou des crochets, ont été définies par l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée, (IUPAC). Une cycloaddition [x+y]

caractérisera une réaction entre deux partenaires apportant respectivement  $x$  et  $y$  électrons, tandis qu'une cycloaddition  $(n+m)$  décrira une réaction entre deux partenaires impliquant respectivement  $n$  et  $m$  atomes. Selon ces deux nomenclatures la réaction entre un alcyne et un azoture peut donc être qualifiée de cycloaddition  $(3+2)$  ou  $[4+2]$  (Schéma 91). Dans notre cas, l'ensemble des cycloadditions qui seront discutées dans les paragraphes suivants pouvant toutes être qualifiées de type  $[4+2]$ , la nomenclature entre parenthèses sera préférée pour plus de clarté.



**Schéma 91.** Cycloaddition entre un alcyne et un azoture

Les cycloadditions impliquent des fonctions naturellement absentes dans les biomolécules et ne réagissant *a priori* pas avec les fonctions natives (amines, alcool, acide carboxylique...). Elles se distinguent ainsi des réactions classiquement employées pour la modification de biomolécules (formation d'hydrazones, oximes ou thioethers)<sup>159</sup> et représentent donc de parfaits candidats aux réactions bio-orthogonales. De ce fait, plusieurs réactions de cycloadditions ont pu être appliquées au marquage de biomolécules et notamment de peptides (Tableau 19). On y retrouve des cycloadditions  $(3+2)$  comme la « Copper-Catalysed Azide Alkyne Cycloaddition » (CuAAC), son équivalent non catalysé « Strain-Promoted Azide Alkyne Cycloaddition » (SPAAC), ou la plus récente « Strain-Promoted Sydnone Alkyne Cycloaddition » (SPSAC) popularisée en grande partie par le groupe de Taran.<sup>160</sup> Les cycloadditions  $(4+2)$  de type Diels-Alder ont également fait leurs preuves dans ce domaine, avec celles à demande inverse (IEDDA) cependant largement plus utilisées que celles à demande normale (NEDDA).

Réaction	Réactif 1	Réactif 2	Produit
CuAAC		$N_3-R^2$	
SPAAC		$N_3-R^2$	
SPSAC			
IEDDA			
NEDDA			

**Tableau 19.** Exemples de réaction de cycloadditions bio-orthogonales

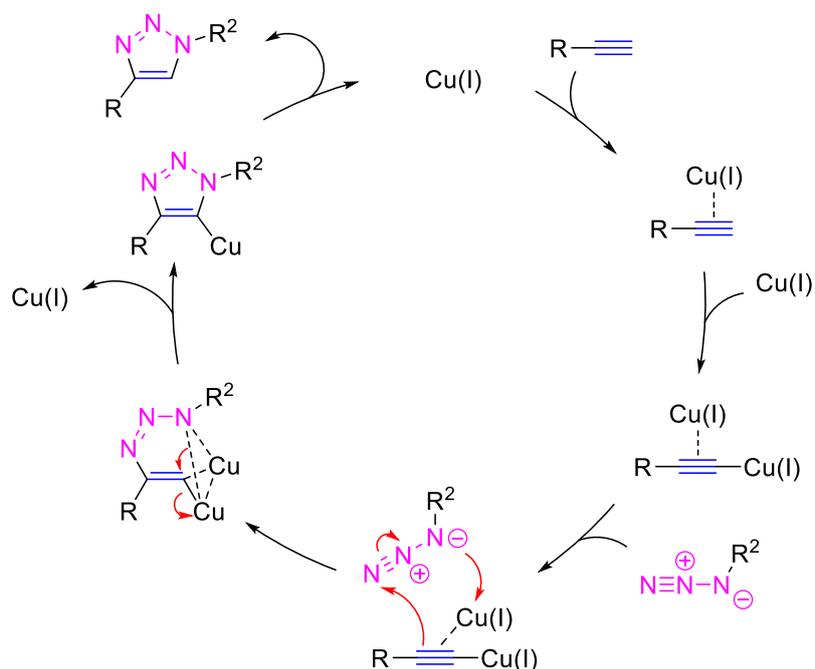
Dans la section suivante nous allons présenter l'état de l'art sur les applications des cycloadditions (3+2) et (4+2) citées précédemment pour la fonctionnalisation de peptides à l'aide d'outils d'imagerie en fluorescence et en fluor-18.

#### 1.4. Cycloadditions (3+2)

##### 1.4.1. Réactions CuAAC

La cycloaddition (3+2) entre un alcyne et un azoture a été étudiée pour la première fois dans les années 1960 par Huisgen.<sup>161</sup> Cette réaction était alors réalisée par activation thermique (> 100 °C) et permettait d'obtenir les deux triazoles régioisomères 1,4- et 1,5-disubstitués. L'utilisation d'un catalyseur de cuivre(I) proposée simultanément par Sharpless<sup>162</sup> et Meldal<sup>163</sup> en 2002 a permis de s'affranchir de l'emploi de hautes températures et de travailler en conditions douces. Cette réaction

procède selon un mécanisme impliquant deux atomes de cuivre<sup>164</sup> et permet d'obtenir sélectivement le triazole 1,4-disubstitué (Schéma 92).

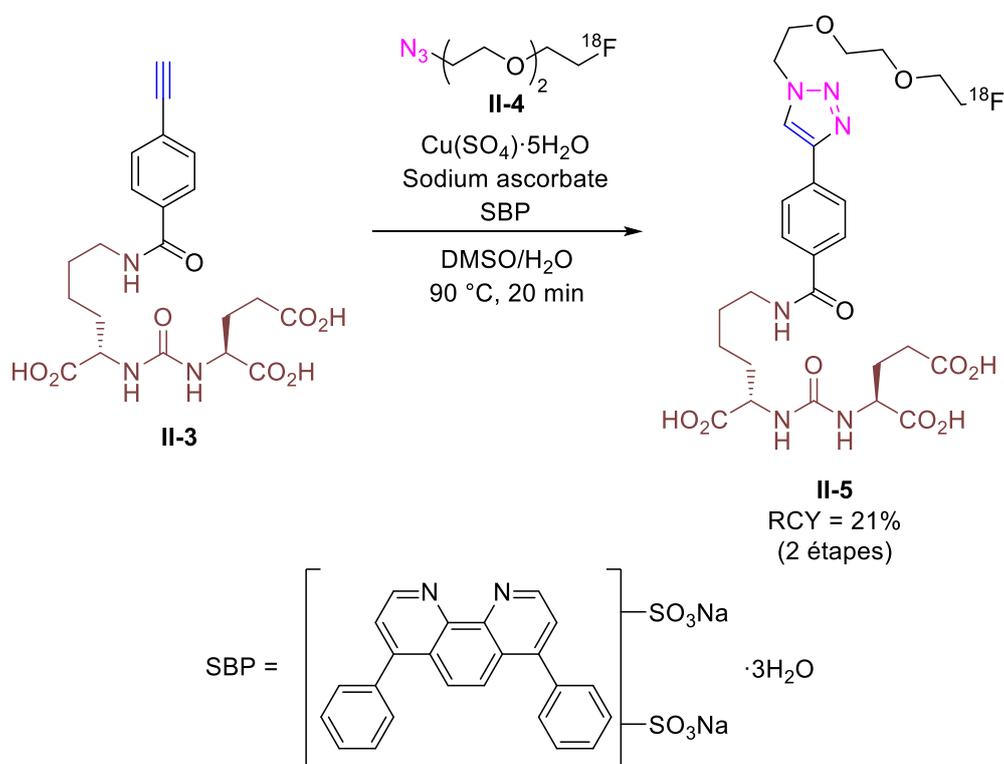


**Schéma 92.** Mécanisme à deux atomes de cuivre pour la réaction de CuAAC

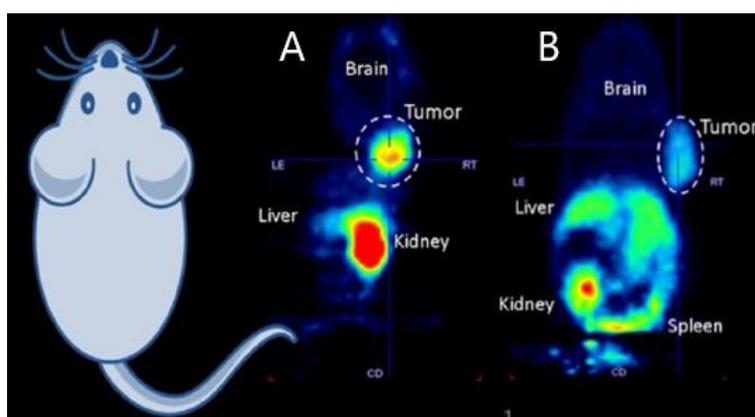
Cette réaction a pu être réalisée dans l'eau à des températures physiologiques, le cuivre(I) nécessaire pouvant être généré *in situ* à partir de cuivre(II), en présence d'agents réducteurs comme l'ascorbate de sodium. Ainsi la CuAAC s'est rapidement imposée comme la référence des réactions "click" de bioconjugaison,<sup>165</sup> et a été notamment appliquée aux peptides.<sup>166</sup> En effet, le lien triazole formé lors de cette réaction est un bioisostère parfait d'une liaison peptidique de « configuration *E* » permettant de limiter les modifications des propriétés pharmacologiques du peptide. Ainsi, le nombre d'exemples de cette réaction pour la modification de peptides à des fins d'imagerie optique ou TEP étant très important, nous avons choisi de ne citer ici que quelques exemples représentatifs décrits ces dernières années, ainsi que les principaux inconvénients liés à cette réaction.

Le groupe de Feringa et Elsinga a par exemple appliqué en 2020 cette réaction à la synthèse et la diversification de sondes TEP en oncologie.<sup>167</sup> Un pseudo-dipeptide ligand du récepteur « Prostate-Specific Membrane Antigen » (PSMA), surexprimé dans le cancer de la prostate, a été sélectionné. Il a été fonctionnalisé par un alcyne

terminal permettant sa radiofluoration par CuAAC avec **II-4**, pour donner **II-5** avec un RCY global de 21% (Schéma 93). Son utilisation pour la détection *in vivo* de tumeurs a ensuite été validée sur un modèle murin par le biais d'expériences de compétition avec un ligand froid (Figure 55).



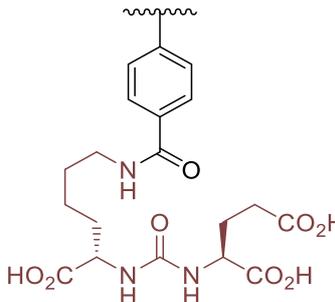
**Schéma 93.** Synthèse d'un radioligand **II-5** du récepteur PSMA

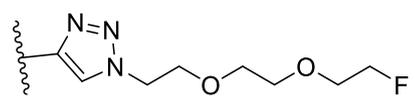
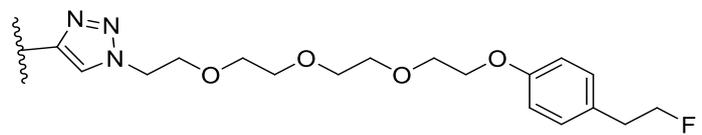
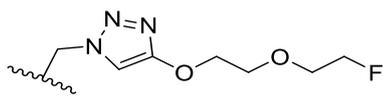
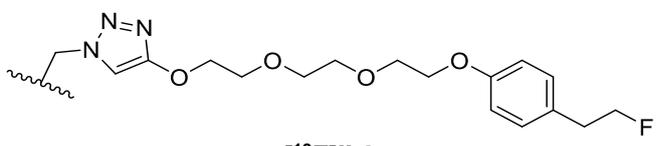


**Figure 55.** Images TEP *in vivo* dans un modèle murin de tumeurs LNCap en absence ou présence de compétition avec un ligand froid

Les auteurs ont par la suite mis à profit cette méthode pour la synthèse de trois nouveaux dérivés contenant un atome de fluor-19 (Tableau 20). Leurs IC<sub>50</sub> ont été

mesurées et ont permis de mettre en évidence que le composé [<sup>19</sup>F]II-7 présentait une IC<sub>50</sub> de 41 nM sur ce même récepteur contre 407 nM pour [<sup>19</sup>F]II-6 utilisé précédemment. Cette stratégie a permis ainsi l'accès rapide à une chimiothèque de ligands potentiels II-6 à II-9 du récepteur PSMA dont les données pharmacologiques seront parfaitement transposables en radiochimie et radioimagerie.

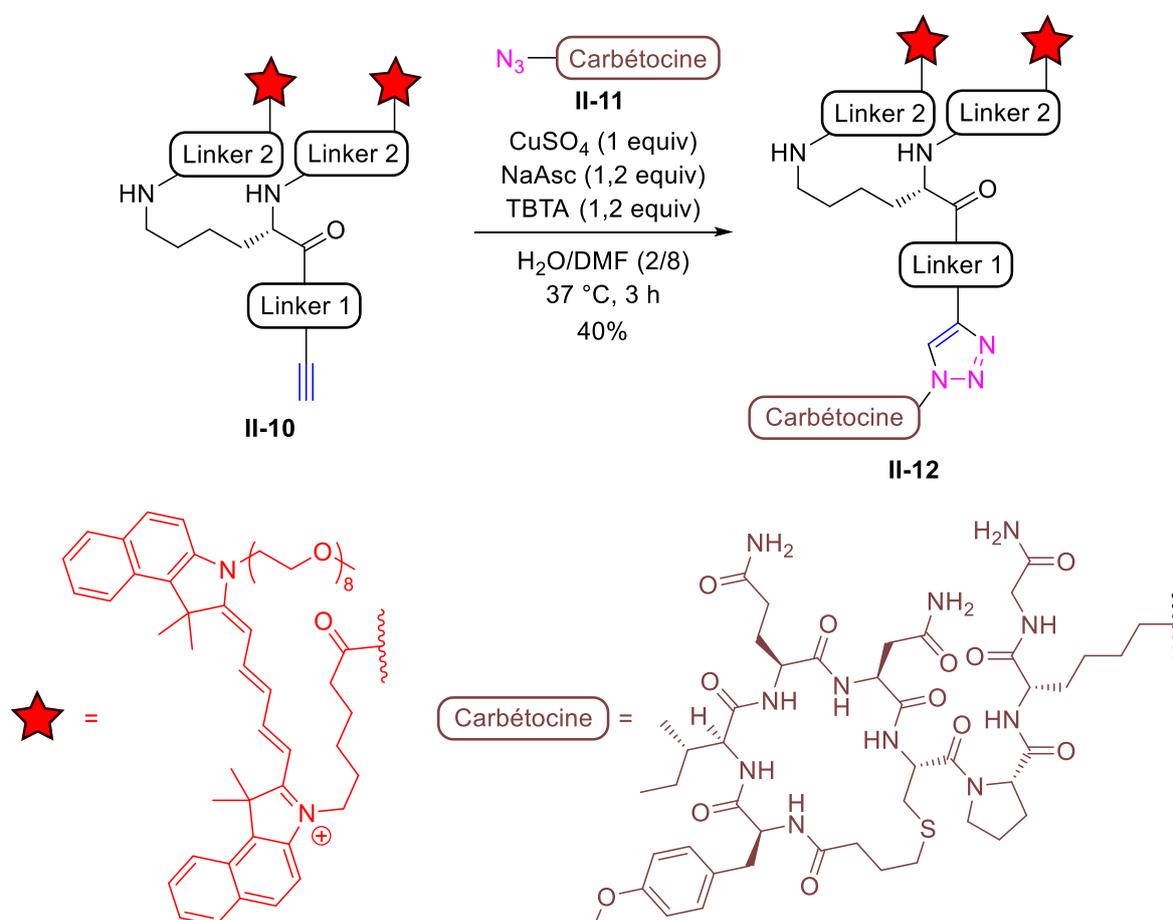


Structure	IC <sub>50</sub>
 <b>[<sup>19</sup>F]II-6</b>	407 nM
 <b>[<sup>19</sup>F]II-7</b>	41 nM
 <b>[<sup>19</sup>F]II-8</b>	275 nM
 <b>[<sup>19</sup>F]II-9</b>	263 nM

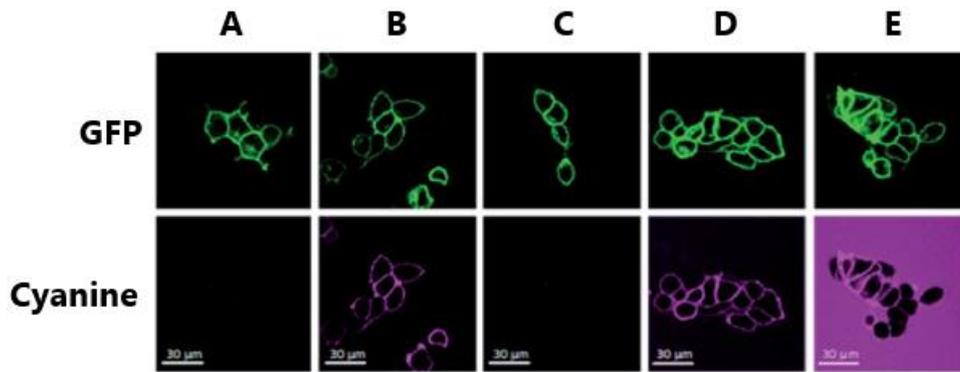
**Tableau 20.** IC<sub>50</sub> de trois nouveaux ligands [<sup>19</sup>F]II-7, [<sup>19</sup>F]II-8, [<sup>19</sup>F]II-9 obtenus par CuAAC

Enfin, au laboratoire, le groupe de Bonnet a décrit en 2020 l'utilisation de cette cycloaddition pour la synthèse de sondes peptidiques fluorogènes pour le récepteur de l'ocytocine (OTR).<sup>168</sup> Cette réaction a été effectuée dans des conditions douces à 37 °C pendant 3 heures et a permis d'obtenir le produit désiré issu de la ligation de deux blocs de masses molaires importantes (1000 Da ou plus) avec 40% de

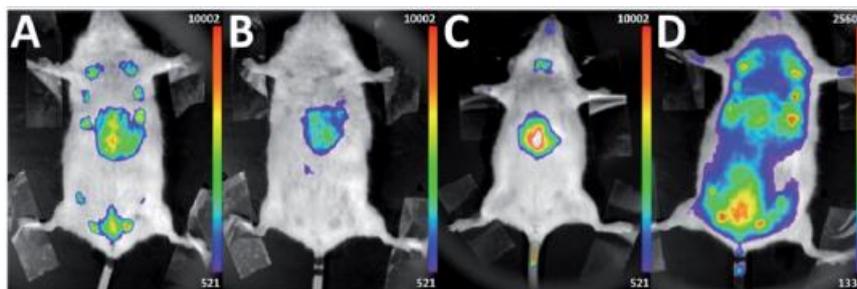
rendement (Schéma 94). L'affinité de la sonde obtenue pour le récepteur OTR a tout d'abord été validée sur des cellules exprimant ce récepteur par des expériences de compétition avec la carbétocine native (Figure 56). Le fluorophore employé ici émettant dans le rouge lointain, cette sonde a également pu être validée sur modèle *in vivo* de souris allaitantes (Figure 57). L'utilisation de deux fluorophores cyanines a permis ici d'obtenir des sondes fluorogènes ne s'éclairant qu'après interaction du peptide avec le récepteur. Dans l'eau, les deux fluorophores préféreront s'agréger inhibant leur fluorescence et réduisant donc le bruit de fond. Ceci est particulièrement visible en comparant les images obtenues pour la sonde **II-12** avec celles obtenues pour la sonde **II-13** ne portant qu'une cyanine.



**Schéma 94.** Synthèse de sondes peptidiques fluorogènes par réaction CuAAC



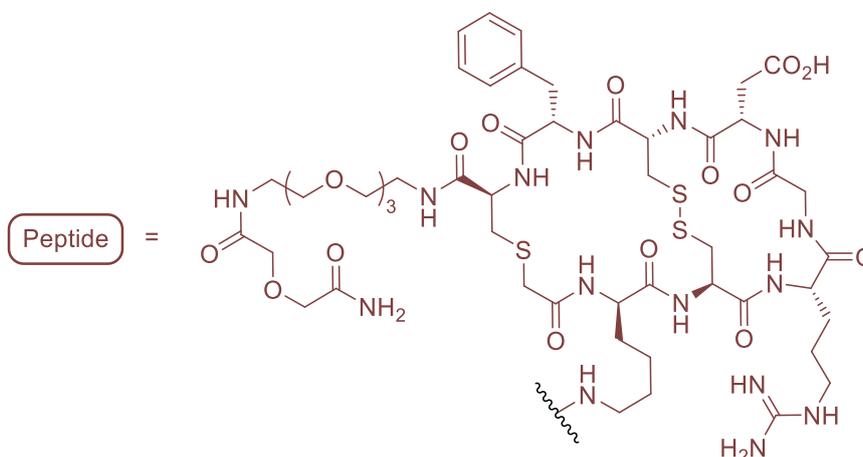
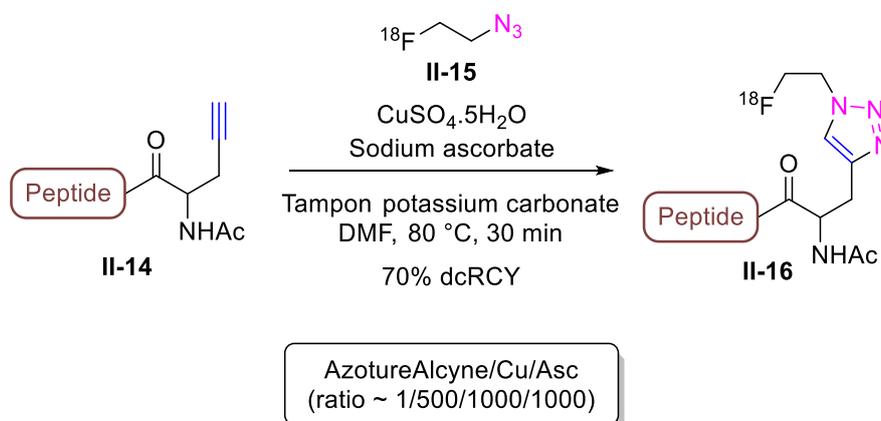
**Figure 56.** Images obtenues par microscopie confocale de cellules exprimant le récepteur OTR-GFP (A = Rien; B = **II-12**, 10 nM; C = **II-12**, 10 nM + CBT, 2 μM; D = **II-12**, 500 nM; E = **II-13**, 500 nM)



**Figure 57.** Images *in vivo* de souris allaitantes (A, B et C) ou non (D) injectée avec **II-12** (A, C), **II-12** + CBT (B) ou **II-13** (D)

Malgré une utilisation extrêmement répandue vis-à-vis du marquage de peptides, cette réaction présente cependant de nombreux inconvénients incitant à développer d'autres alternatives sans catalyseur.<sup>169</sup> La réaction de CuAAC utilisant le cuivre en quantité catalytique possède par exemple une cinétique insuffisante pour le marquage de biomolécule au fluor-18. Pour pallier ce problème, de larges excès de partenaire réactionnel, de cuivre et d'agent réducteur ont dû être utilisés dans certains cas. Ce problème fut notamment rencontré par le groupe de Årstad en 2008 dans le cadre du radiomarquage d'un peptide dérivé de RGD **II-14** (Schéma 95).<sup>170</sup> Dans cette étude, en estimant une activité spécifique pour l'azoture fluoré **II-15** de 100 GBq/μmol, un excès d'environ 500 équivalents du peptide alcyne **II-14**, 1000 équivalents de sulfate de cuivre et d'ascorbate ont été employés pour obtenir une réaction complète après 30 min à 80 °C. Au-delà d'une problématique de coût du peptide de départ, l'utilisation d'un si large excès pose également le problème de la purification du produit final. Dans ce cas, le peptide marqué **II-16** étant trop proche structurellement du peptide de départ **II-14**, les deux produits n'ont pu être séparés. L'utilisation de tels radioligands pour des

applications d'imagerie sur cellules ou *in vivo* semble ainsi inadaptée, le radioligand étant dès le départ en compétition avec un large excès de ligand non marqué.



**Schéma 95.** Radiomarquage d'un dérivé de RGD en large excès de partenaires réactionnels

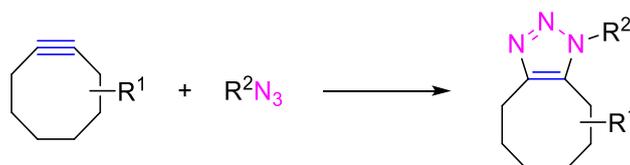
D'autre part, l'utilisation de cuivre peut également entraîner l'oxydation de résidus peptidiques lors de ces réactions de bioconjugaison. Plusieurs études ont notamment montré la sensibilité des acides aminés cystéine, méthionine et histidine vis-à-vis de ces oxydations.<sup>171</sup> Ces réactions secondaires peuvent être limitées dans une certaine mesure par l'utilisation de ligands du cuivre capable d'intercepter les « Reactive Oxygen Species » en partie responsables de ces oxydations. Ces ligands ont cependant un coût élevé et ne permettent pas d'éviter d'autres mécanismes d'oxydation initiés par exemple par chélation du Cu(I) ou Cu(II) à différents acides aminés (acide glutamique ou aspartique, histidine,...). Ces oxydations posent ainsi le problème de la dégradation du peptide d'intérêt au cours de la réaction mais posent également la question de la purification de ce dernier. En effet, comme dans l'exemple

précédent, même une réaction d'oxydation partielle sur un unique acide aminé pourrait empêcher la purification du peptide final, la différence structurale pouvant être trop faible avec l'espèce oxydée. L'unique solution pour éviter ces phénomènes revient donc à travailler directement en présence d'un catalyseur stable de cuivre(I) en condition anaérobie, des conditions qui s'éloignent des principes de la chimie click.

Enfin, les bioconjugués obtenus par ces réactions étant principalement destinés à être injectés sur cellules ou *in vivo*, la cytotoxicité du cuivre(I)<sup>172</sup> pose également des problèmes quant aux applications de cette réaction. En effet comme précisé ci-dessus, les peptides possèdent de nombreux ligands potentiels du cuivre et peuvent ainsi piéger ce dernier après l'étape de bioconjugaison, a fortiori lorsque le cuivre est utilisé en excès. Dans très peu d'études la teneur en cuivre du peptide final obtenu est vérifiée et l'étape de purification est considérée comme suffisante pour assurer son élimination. Ce problème est d'autant plus important pour les études effectuées *in cellulo* où la question de la survie des cellules en conditions de CuAAC doit être posée.

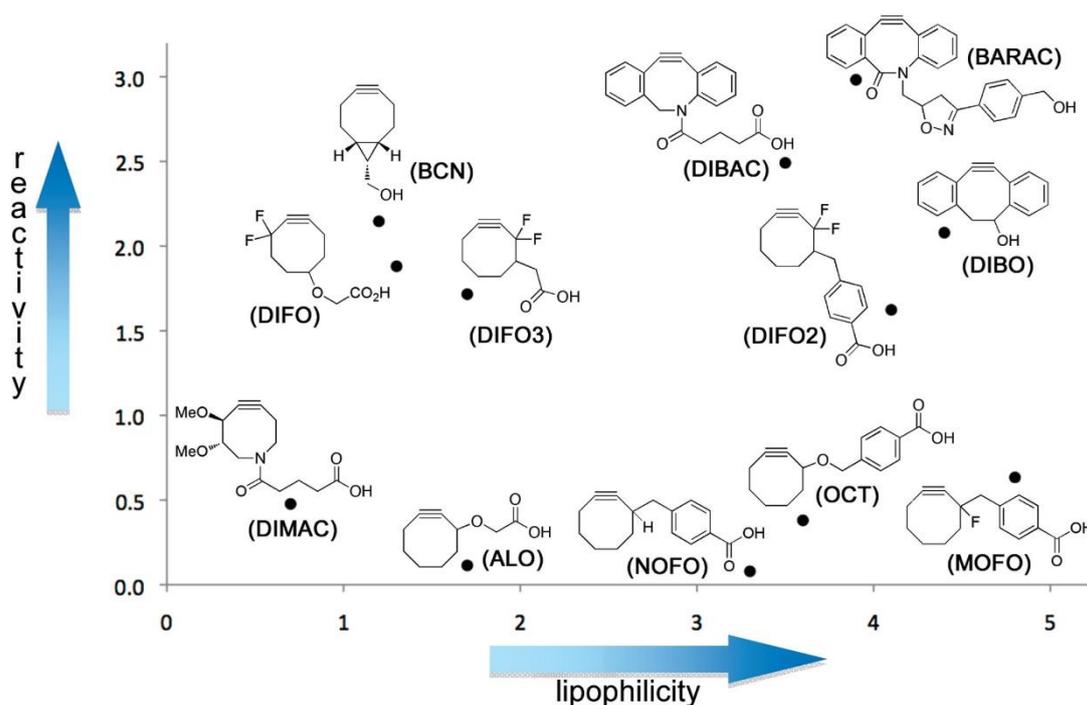
#### 1.4.2. Réactions SPAAC

Afin de s'affranchir de l'utilisation d'un catalyseur de cuivre au sein des réactions de bioconjugaison, l'équipe de Bertozzi<sup>173</sup> s'est tout d'abord intéressée en 2004 à la réactivité des alcynes contraints dans ce contexte. Cette réaction qui avait été découverte près d'un demi-siècle plus tôt par Krebs et Wittig<sup>174</sup> avait alors été décrite comme « une explosion ne donnant qu'un seul produit », un candidat idéal aux réactions de chimie click. Cette immense différence de réactivité est ici principalement due à la tension portée par l'alcyne, forcé d'adopter un angle de 163° et qui pourra être partiellement relâchée après cycloaddition.

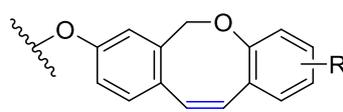


**Schéma 96.** Réaction de SPAAC entre un cyclooctyne et un azoture

De nombreux dérivés de cyclooctynes ont été développés pour cette réaction afin d'obtenir des structures suffisamment réactives pour se rapprocher des cinétiques observées en CuAAC (Figure 58). Parmi ces structures, les meilleures cinétiques ont été observées sur les dérivés de BCN ( $0,14 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ), DIBO ( $0,12 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ), DIBAC ( $0,31 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ) et BARAC ( $0,96 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ).<sup>175</sup> Ces cinétiques ayant été mesurées dans des conditions réactionnelles différentes (température, solvants organiques), leur comparaison directe n'est ni pertinente ni transposable en milieu aqueux pour la bioconjugaison. Pour illustrer cela, les cinétiques de réaction du cyclooctyne ODIBO avec plusieurs azotures ont été mesurées dans différents solvants (Figure 59).<sup>176</sup> Des augmentations de cinétique d'un facteur 30 ont pu être observées entre une réaction dans le méthanol et celle dans un mélange méthanol/eau/THF. Cette accélération est notamment due à l'effet hydrophobique de l'eau, forçant les molécules hydrophobes à davantage de proximité.



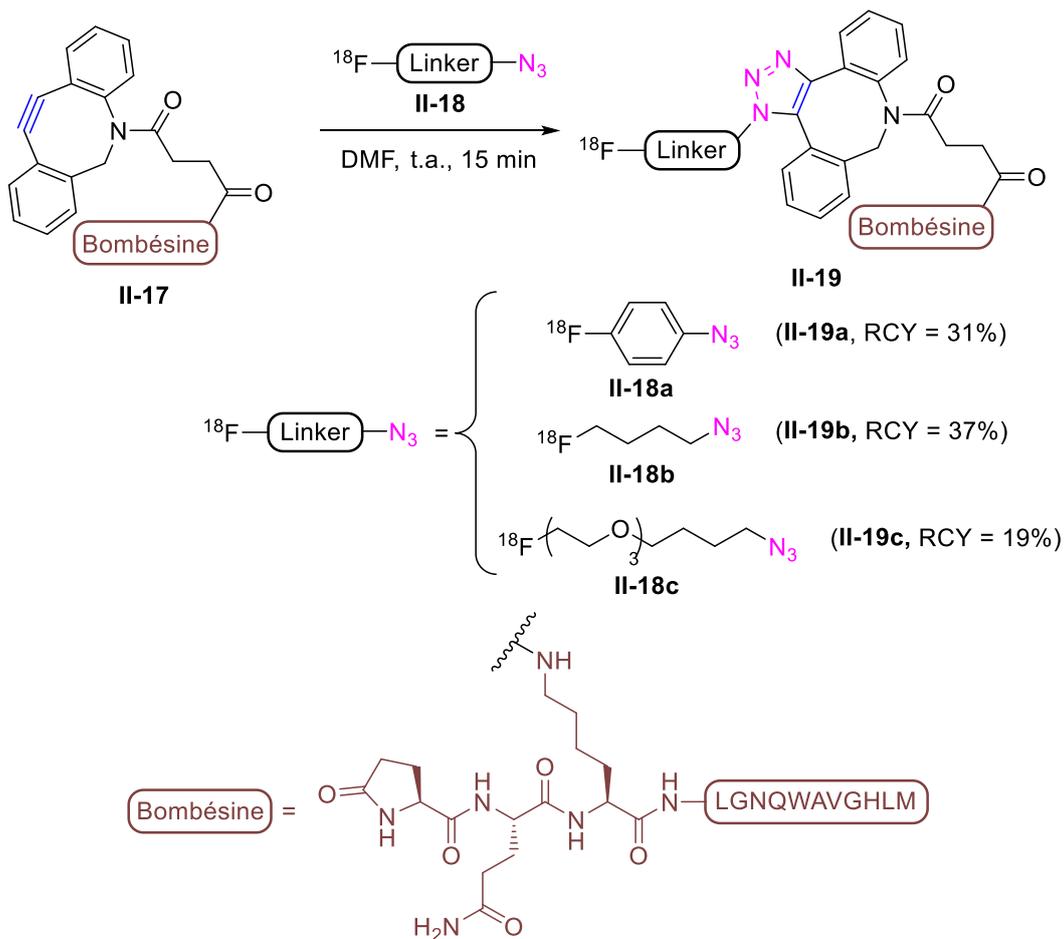
**Figure 58.** Comparaison des réactivités et lipophilies de différents cyclooctynes



**Figure 59.** Structure générale du cyclooctyne ODIBO

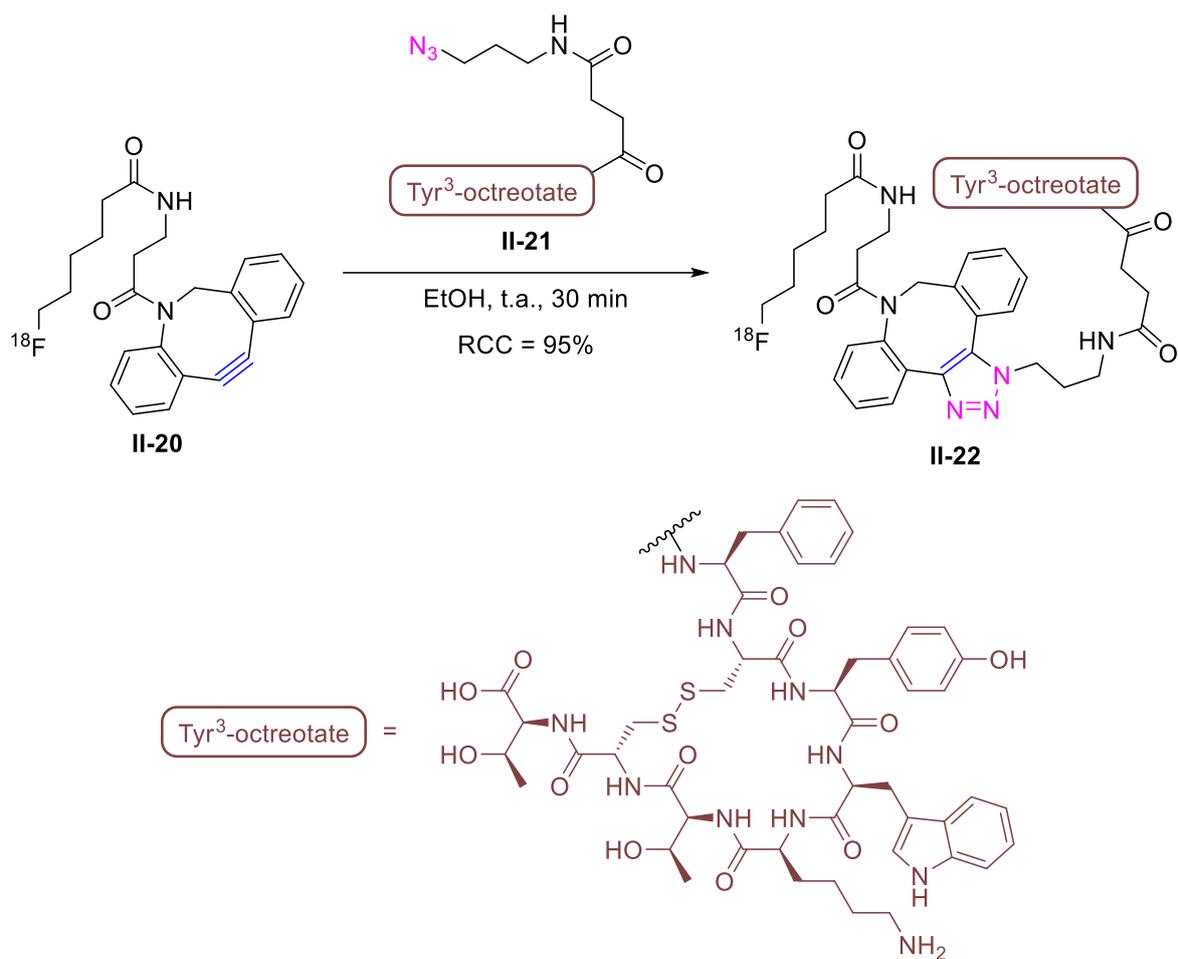
La cinétique de réaction n'est cependant pas le seul paramètre à considérer pour une réaction de bioconjugaison. En effet, la lipophilie des partenaires réactionnelles ainsi que leur taille sont deux facteurs qui pourront grandement influencer les données de pharmacocinétique des bioconjugués obtenus par ces réactions. Par exemple, parmi les cyclooctynes citées précédemment, trois possèdent un squelette dibenzocyclooctyne particulièrement encombrant et lipophile avec des LogP évalués à 4,4 (DIBO), 3,5 (DIBAC) et 3,9 (BARAC). Le BCN semble en revanche être un bon compromis entre réactivité, encombrement et lipophilie avec un LogP de 1,2.

Le premier exemple d'application de cette réaction SPAAC au radiomarquage de biomolécules par du fluor-18 a été effectuée par l'équipe de Feringa et Elsinga en 2011.<sup>177</sup> Le peptide sélectionné a été la bombésine, un ligand du récepteur « Gastrin-Releasing Peptide Receptor » (GRPR), lui-même surexprimé dans des nombreux cancers.<sup>178</sup> La bombésine **II-17** a ainsi pu être marquée à l'aide de trois groupements porteurs d'un atome de fluor-18 (**II-18a** à **II-18c**) avec des RCY de 19 à 37% (Schéma 97). Les conditions réactionnelles employées ici sont douces et simples, le nombre d'équivalents de cyclooctyne n'est par contre pas précisé. Les trois radioligands ainsi formés ont tous conservé une activité élevée sur le récepteur GRPR avec des IC<sub>50</sub> de 40 nM pour **II-19a**, 29 nM pour **II-19b** et 30 nM pour **II-19c** proches des valeurs rapportées pour la bombésine native (IC<sub>50</sub> = 1-2 nM).<sup>179</sup> La perte observée d'un ordre de grandeur sur ces IC<sub>50</sub> peut s'expliquer par l'encombrement stérique apporté par le cyclooctyne dans cette transformation.

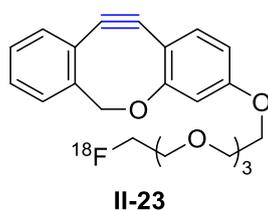


**Schéma 97.** Radiomarquage de la bombésine au fluor-18

Le groupe de Kostikov a utilisé la même stratégie peu de temps après pour le radiomarquage du Tyr<sup>3</sup>-octreotate, un peptide aux nombreuses applications en imagerie oncologique (Schéma 98).<sup>180</sup> Le peptide **II-20** a également été radiomarqué efficacement dans des conditions douces, dans l'éthanol à température ambiante pour obtenir une RCC de 95% après 30 min. La même équipe a développé quelques années plus tard un cyclooctyne dérivé d'ODIBO **II-23**, plus réactif, (Figure 60), qu'elle a appliqué au même peptide Tyr<sup>3</sup>-octreotate.<sup>181</sup>



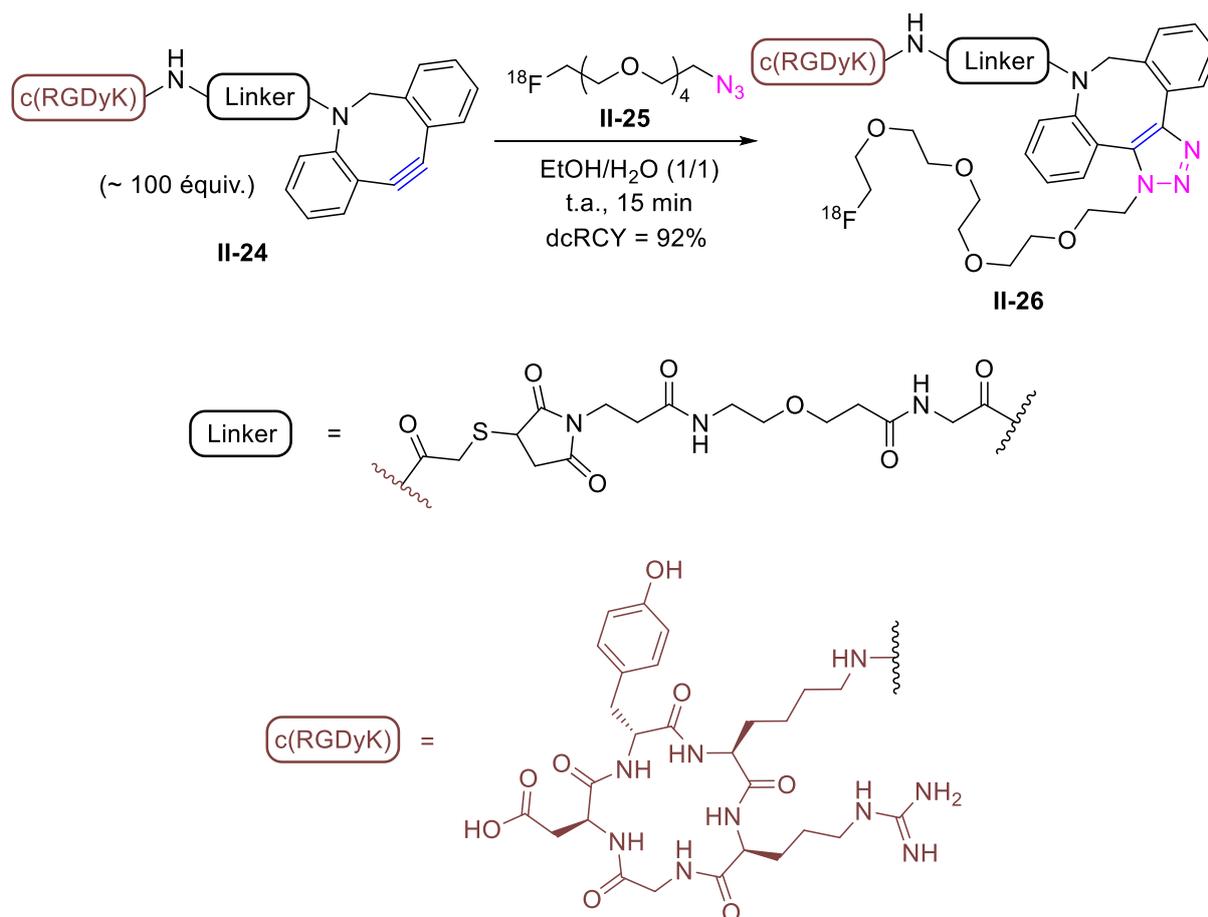
**Schéma 98.** Radiomarquage du Tyr<sup>3</sup>-octreotate par réaction de SPAAC



**Figure 60.** Structure du cyclooctyne ODIBO développé par Kim *et al.*

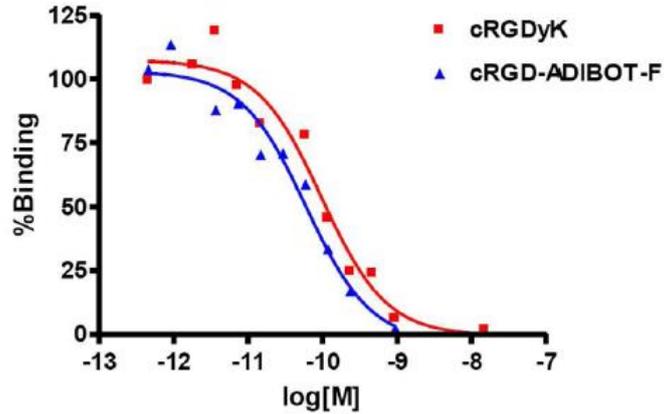
Les premières images en scanner TEP obtenues par le biais de cette stratégie ont été décrites en 2012 par le groupe de Kim.<sup>182</sup> Cette équipe a sélectionné le peptide c(RDGfK) comme peptide d'intérêt qu'ils ont tout d'abord fonctionnalisé par un motif cyclooctyne. Le radiomarquage a ensuite été effectué en 15 min dans des conditions douces à température ambiante dans un mélange H<sub>2</sub>O/EtOH (Schéma 99). Pour atteindre une telle cinétique, une centaine d'équivalents de peptide-cyclooctyne **II-24** ont été employés. Au-delà d'une consommation importante en peptide de départ qui

peut s'avérer précieux, l'utilisation d'un tel excès nécessite une purification pour éviter une saturation des récepteurs *in vivo* par cet excès de ligand non marqué. Pour cela les auteurs ont synthétisé une résine fonctionnalisée par un azoture **II-25** capable de capturer l'excès de cyclooctyne qui a pu être séparé du milieu réactionnel par simple filtration. Le peptide radiomarqué final **II-26** a pu être ainsi obtenu avec un dcRCY de 92% et une pureté radiochimique supérieure à 98% sans purification par HPLC.

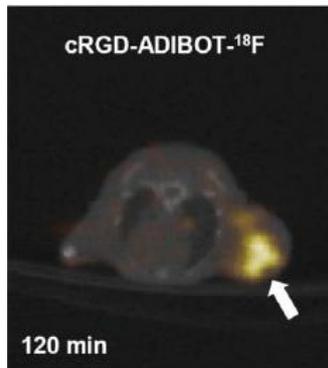


**Schéma 99.** Radiomarquage du c(RGDfK) par réaction de SPAAC

Par la suite, une affinité comparable au c(RDGfK) natif a tout d'abord été obtenue pour le radioligand **II-26** sur cellules cancéreuses de glioblastome (U87MG) surexprimant l'intégrine  $\alpha\beta_3$  (Figure 61). **II-26** a ensuite été injecté à des souris préalablement xénotransplantées à l'aide de cellules U87MG et a permis de mettre efficacement en évidence la tumeur sous-cutanée (Figure 62).

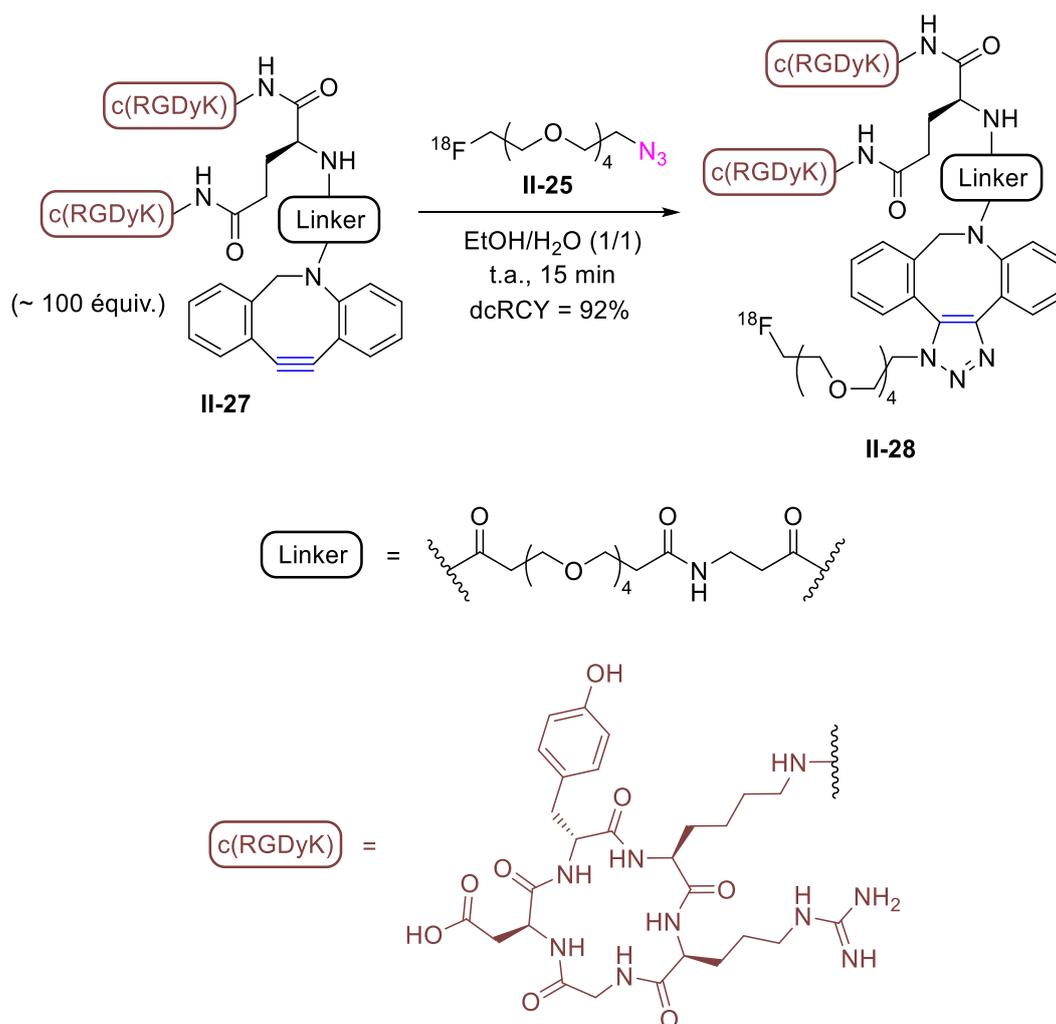


**Figure 61.** Mesure de l'affinité du radioligand **II-26** obtenu sur cellules U87MG et comparaison avec le c(RGDfK) natif

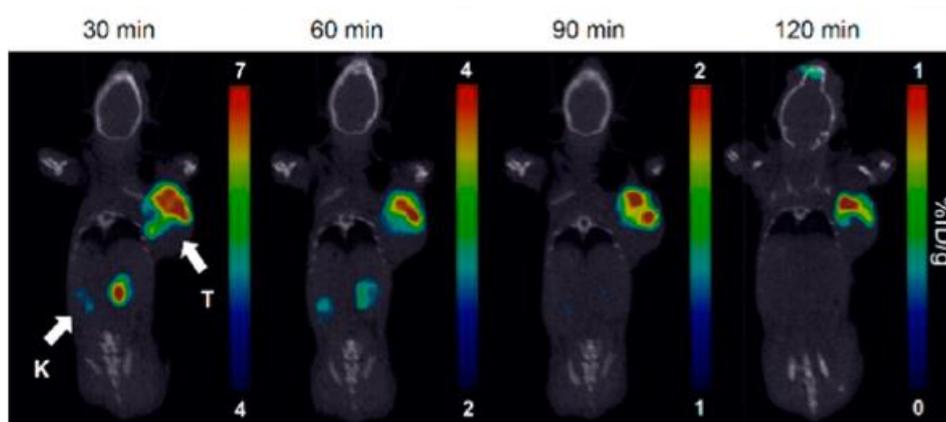


**Figure 62.** Scanner TEP d'un modèle murin de tumeur U87MG, après injection du radioligand **II-26**

Cette même équipe a étendu en 2015 cette stratégie à des ligands composés de deux entités de c(RGDfK).<sup>183</sup> L'utilisation d'un acide glutamique comme réactif trifonctionnel a permis d'obtenir le cyclooctyne-di[c(RGDfK)] **II-27** qui a par la suite été radiomarqué dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus avec un dcRCY de 92% (Schéma 100). L'affinité de ce radioligand **II-28** a également été validée sur cellules U87MG dans un premier temps puis dans un modèle *in vivo* pour la détection de tumeurs de glioblastome (Figure 63).



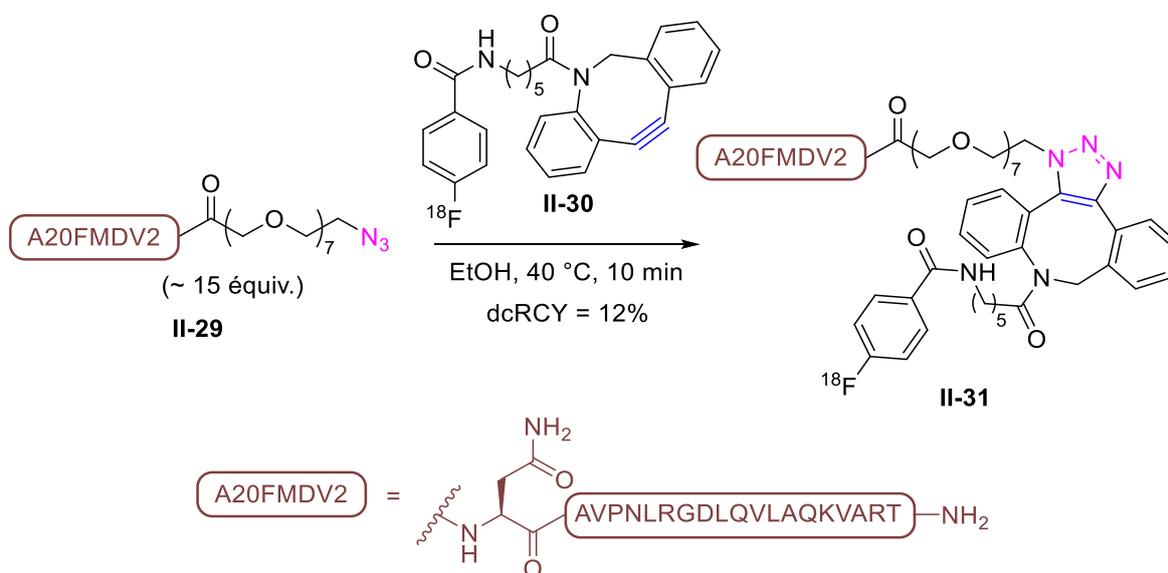
**Schéma 100.** Radiosynthèse du radioligand **II-28** possédant deux motifs c(RGDfK) par SPAAC



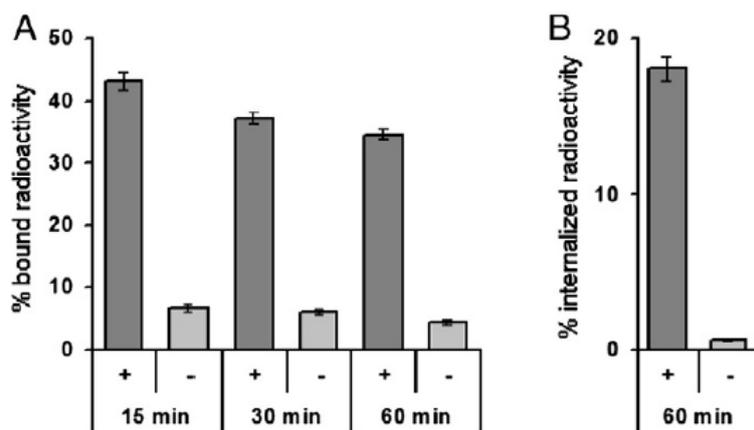
**Figure 63.** Scanners TEP obtenus sur un modèle murin de tumeurs U87MG injecté avec **II-28** (T = tumeur, K = rein)

Entre temps, l'équipe de Stuclyffe a étendu en 2012 cette méthode au radiomarquage du peptide A20FMDV2, ligand de l'intégrine  $\alpha_v\beta_6$ .<sup>184</sup> Le radiomarquage est ici effectué

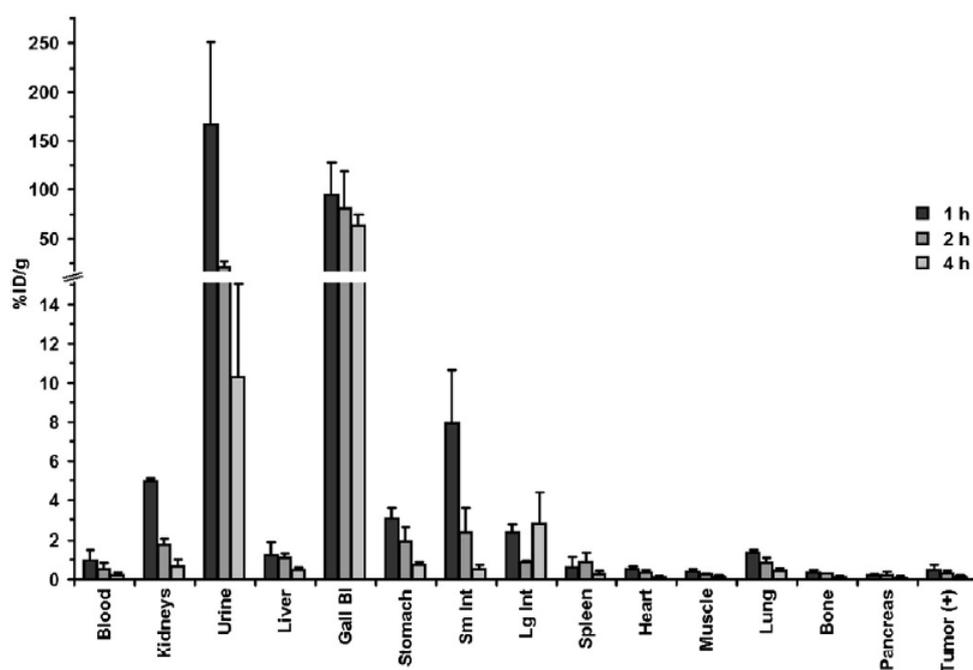
à 40 °C mais avec seulement une quinzaine d'équivalents de peptide **II-29** pour un dcRCY de 12%, bien en dessous des valeurs obtenues précédemment (Schéma 101). L'affinité et l'internalisation du radioligand **II-31** pour l'intégrine  $\alpha_v\beta_6$  ont ensuite été validées sur cellules DX3puro $\beta_6$  exprimant cette intégrine, avec les cellules DX3puro comme contrôle négatif (Figure 64). Malgré ces résultats, cette équipe n'a pas été en mesure de valider cette étude dans un modèle murin *in vivo* où de faibles accumulations dans les tumeurs ont pu être observées. Les auteurs justifient cette observation par une modification de la pharmacocinétique du radioligand causée par l'importante lipophilie du motif dibenzocyclooctyne utilisé lors du radiomarquage. Ce radioligand est en effet éliminé très majoritairement par la voie hépato-biliaire, un schéma classique pour les composés particulièrement lipophiles (Figure 65).



**Schéma 101.** Radiomarquage du peptide A20FMDV2 par réaction SPAAC



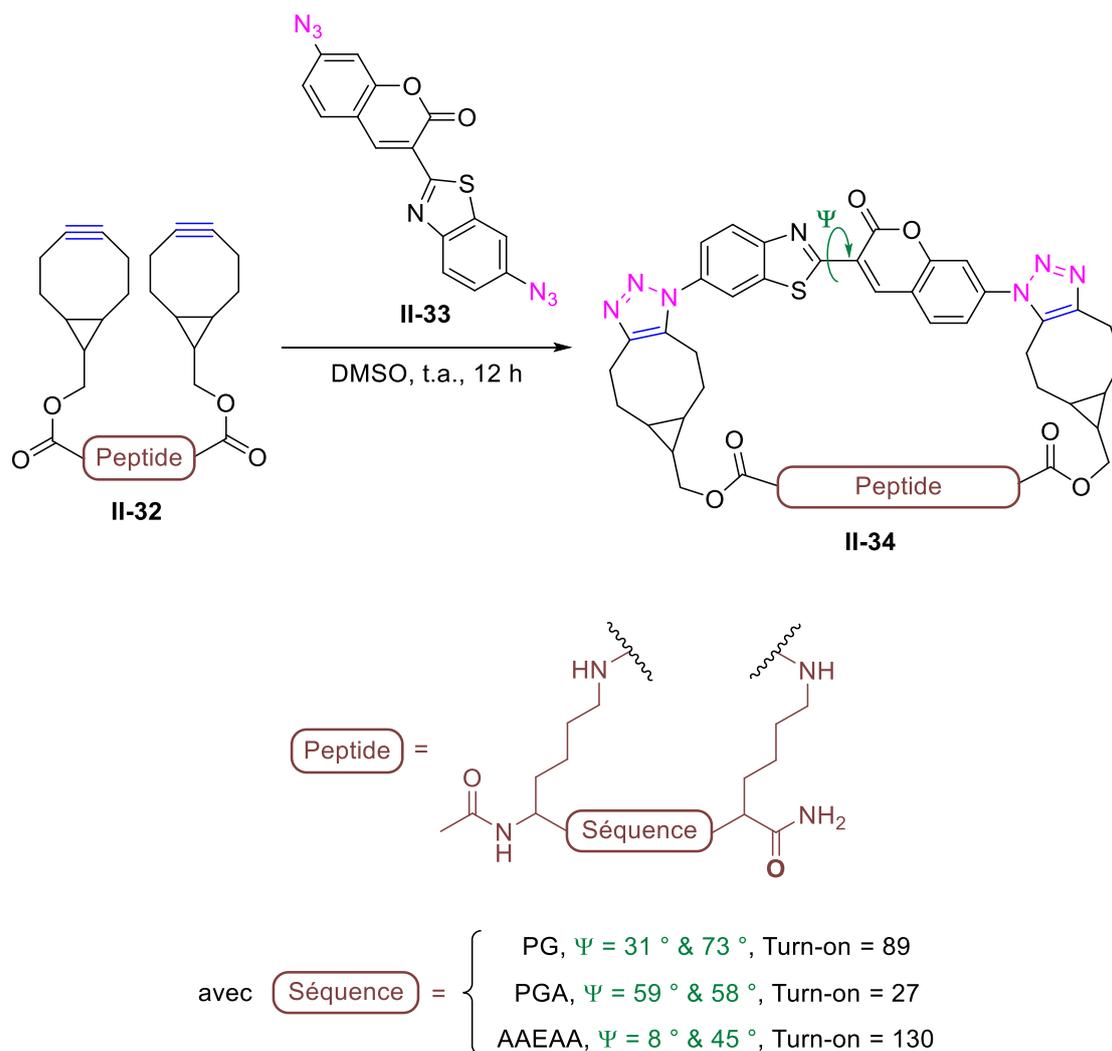
**Figure 64.** Evaluation de l'affinité et de l'internalisation du radioligand II-31 sur cellules DX3puroβ6 (+) et DX3puro (-)



**Figure 65.** Biodistribution du radioligand II-31 dans un modèle murin

Un dernier exemple a été publié en 2018 par l'équipe de Luyt décrivant l'utilisation d'un groupement prosthétique de plus petite taille pour le radiomarquage de peptides.<sup>185</sup> Cette étude s'est intéressée à deux peptides, un dérivé de ghréline et un dérivé de bombésine, ligands respectifs du récepteur « Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a » (GHSR-1a) et du récepteur GRPR. Les deux radioligands obtenus ont conservé d'excellentes affinités au nanomolaire pour leur récepteur mais n'ont été isolés qu'avec des activités molaires faibles de l'ordre de 1 GBq/μmol limitant leur application en tant que sonde TEP à l'heure actuelle.

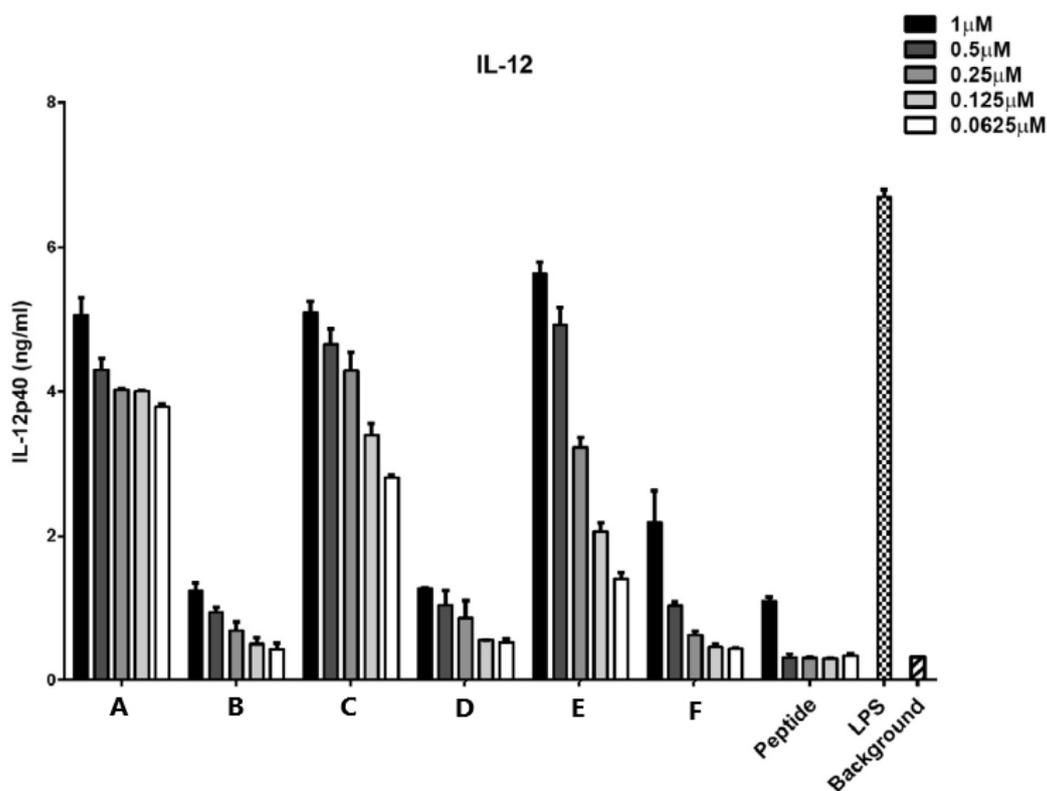
Vis-à-vis de l'utilisation de cette réaction pour la fonctionnalisation de peptides pour l'imagerie optique, une première équipe s'est intéressée à un marquage fluorogénique de peptides modèles. Kele *et al.* ont synthétisé en 2016 une plateforme fluorogénique capable de réagir avec deux alcynes contraints en réaction de SPAAC pour donner une exaltation de fluorescence (ou « turn-on ») d'un facteur 140 (Schéma 102).<sup>186</sup> Trois peptides **II-32** composés respectivement de 4, 5 et 6 acides aminés modèles ont ensuite été employés dans cette stratégie : (BCN)KPGK(BCN), (BCN)KPGAK(BCN) et (BCN)KAEEAAK(BCN). Parmi ces trois structures, seul le peptide le plus long a permis d'obtenir une exaltation de fluorescence comparable à celle observée précédemment. Ces résultats peuvent s'expliquer par la tension de cycle existante après cycloaddition, plus importante pour les tétra- et pentapeptides, et qui oblige la plateforme fluorogène à se déformer. Cette déformation induisant la torsion autour de la liaison C-C reliant les deux fluorophores, plus l'angle de torsion sera grand, plus la conjugaison réduite et la fluorescence diminuée. Ces angles diédraux ont été évalués par calculs DFT et semblent bien corrélés avec les observations faites en fluorescence pour les trois séquences peptidiques.



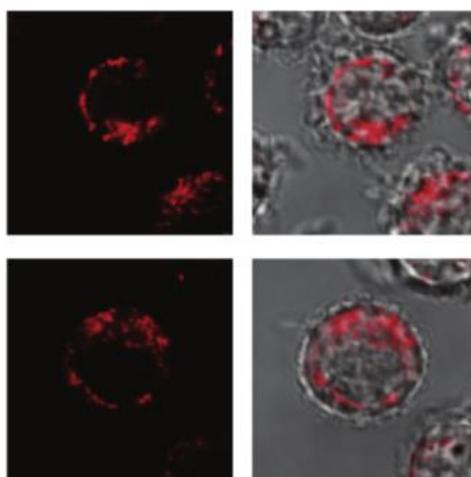
**Schéma 102.** Double réactions de SPAAC pour le marquage fluorogénique de peptides

D'autre part, l'équipe de Filippov s'est intéressée en 2016 au marquage par réaction de SPAAC d'un lipopeptide permettant l'activation des cellules dendritiques du système immunitaire.<sup>187</sup> Ces peptides **II-35** sont ici composés d'une séquence d'acides aminés fonctionnalisée par trois chaînes lipidiques portées par un motif glycérol (Schéma 103). Les formes *R* et *S* de ce motif glycérol peuvent exister et possèdent des propriétés distinctes sur les cellules dendritiques. Après avoir synthétisé les peptides sur support, les auteurs les ont ensuite fonctionnalisés par deux fluorophores (TAMRA et Cy5) à l'aide de réactions de SPAAC sur une azidolysine judicieusement introduite dans la séquence. Ces réactions ont été effectuées dans le DMSO, à température ambiante, pendant 16 heures, pour obtenir les conjugués correspondants **II-37** avec des rendements compris entre 37% et 52%. L'immunogénicité de ces conjugués et des peptides natifs **II-38** a ensuite été évaluée sur cellules dendritiques





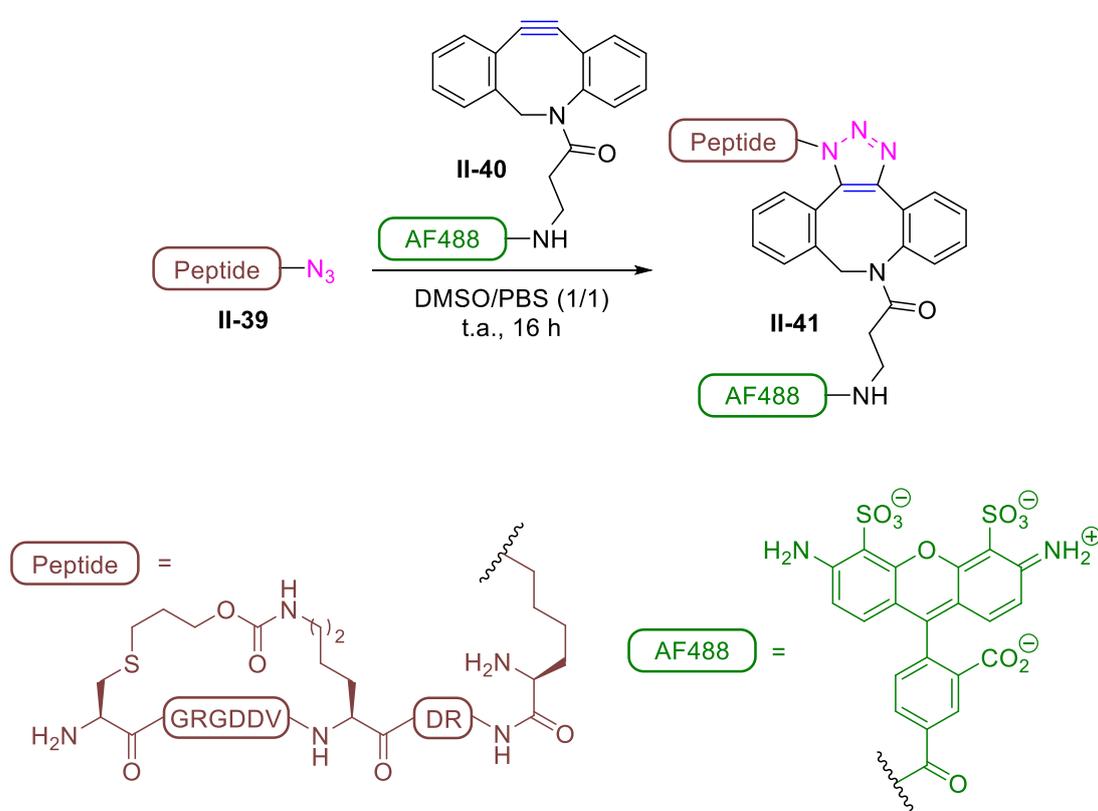
**Figure 66.** Production d'interleukine-12 après incubation de cellules dendritiques avec différents composés (A = (R)-II-38; B = (S)-II-38 ; C = (R)-II-37a; D = (S)-II-37a; E = (R)-II-37b; F = (S)-II-37b; Peptide = SK<sub>4</sub>DEVSGLEQLQLESINFEKL; LPS = Lipopolysaccharide)



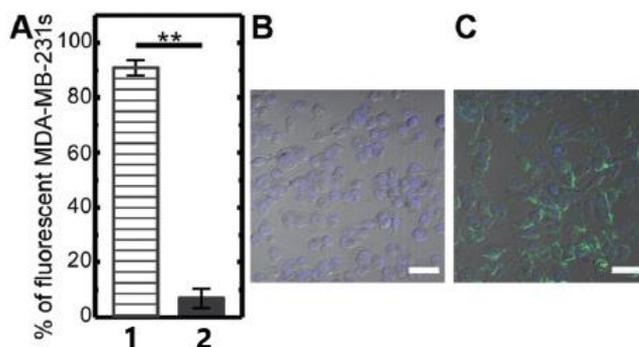
**Figure 67.** Accumulation des composés (R)-II-37b et (S)-II-37b au sein de cellules dendritiques

Enfin, l'équipe de Kloxin a appliqué en 2018 cette réaction au marquage de peptides à l'aide de fluorophores pour la détection de cellules cancéreuses.<sup>188</sup> Ce groupe a tout d'abord développé une stratégie permettant d'obtenir un dérivé de RGD cyclisé par

une réaction d'hydrothiolation. Ce peptide **II-39** a ensuite été fonctionnalisé par un dérivé d'AlexaFluor-488 **II-40** à l'aide d'une réaction de SPAAC dans un mélange PBS/DMSO à température ambiante sur la nuit (Schéma 104). Ce conjugué **II-41** a ensuite été incubé sur cellules MDA-MB-231s d'adénocarcinome du sein pour évaluer l'impact de la conjugaison sur l'affinité du peptide pour son récepteur. Avec ce protocole, 91% des cellules MDA-MB-231s ont exhibé un marquage de leur membrane par fluorescence, alors que les cellules incubées uniquement avec le DIBO-AF488 n'ont montré qu'un très faible marquage non spécifique, avec seulement 7% de cellules marquées (Figure 68).



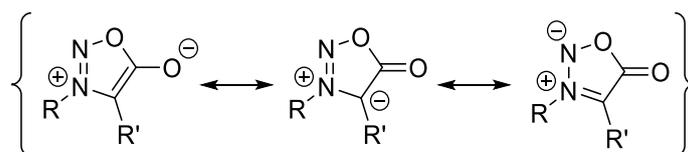
**Schéma 104.** Marquage d'un peptide cyclisé dérivé de RGD par SPAAC



**Figure 68.** Marquage de cellules MDA-MB-231s par un RGD fluorescent

### 1.4.3. Réactions impliquant des composés mésoioniques

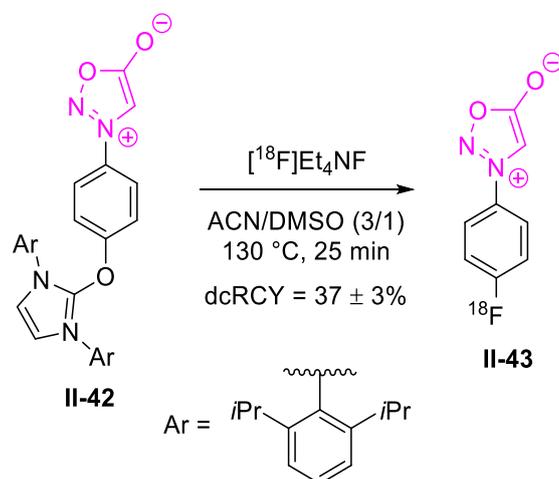
Parmi les composés dipolaires pouvant réagir en réaction d'hétéro-cycloaddition (3+2), les composés mésoioniques représentent une nouvelle opportunité récemment développée. Ces réactifs, dont la définition a longuement été réécrite dans l'histoire, sont constitués d'un cœur hétérocyclique portant deux charges opposées et délocalisées sur ce cycle comme pour les sydnones (Schéma 105). Les réactions découlant de ces structures ont été rapidement acceptées au sein de la chimie click et leurs applications comme réactions bio-orthogonales ont fait l'objet d'une revue décrite en 2020 par l'équipe de Taran.<sup>160</sup> Cependant, bien que cette réaction soit appliquée depuis une dizaine d'années sur diverses biomolécules, seuls deux exemples sur peptide ont été rapportés dans la littérature.



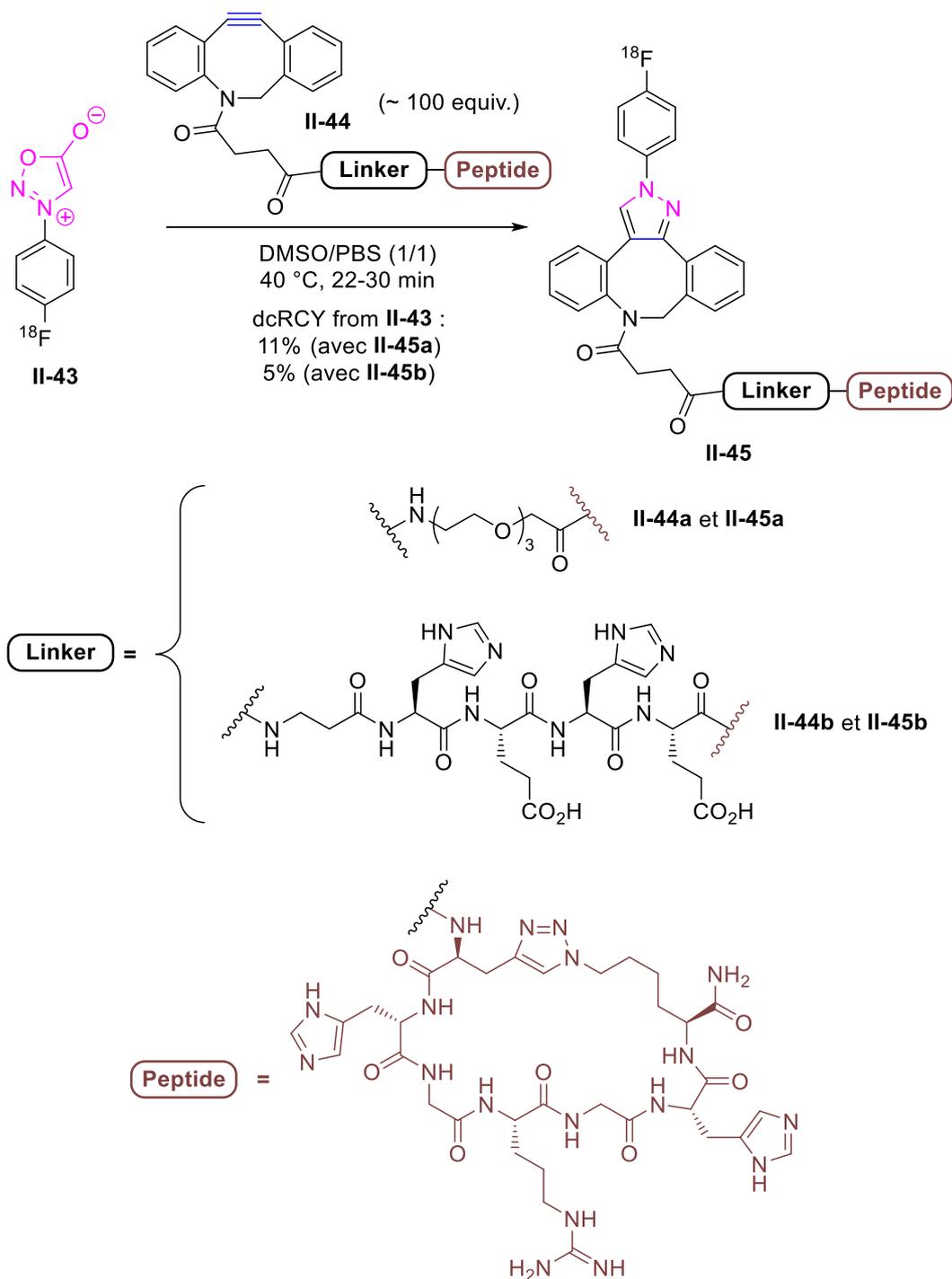
**Schéma 105.** Structures mésomériques générales d'une sydnone

Murphy *et al.* ont décrit en 2021 l'utilisation de cette réaction pour le radiomarquage de peptides au fluor-18.<sup>189</sup> Dans cette étude, le groupement prosthétique a été obtenu par substitution nucléophile aromatique de [<sup>18</sup>F]Et<sub>4</sub>NF sur l'uronium **II-42** avec un dcRCY de 37% (Schéma 106). Le peptide, ligand de la protéine humaine CD8α, a été lié à un motif cyclooctyne via un linker solubilisant, dérivé soit d'éthylène glycol soit d'acides aminés comme l'histidine et l'acide glutamique (Schéma 107). Ces derniers

(**II-44**) ont par la suite été engagés dans une réaction de SPSAC avec la sydnone **II-43** préalablement obtenue pour donner les radioligands correspondants **II-45** avec des dcRCY sur deux étapes de 11% pour **II-45a** et 5% pour **II-45b**, malgré de bons dcRCY pour l'étape de SPSAC seule (77% et 62%, respectivement). L'ensemble de cette radiosynthèse a pu être automatisée et réalisée sur des échelles de 2 à 11 GBq pour les deux composés. Il est également à noter qu'un très large excès du peptide-cyclooctyne a dû être employé dans cette réaction. En effet, **II-45b** étant obtenu avec une activité molaire moyenne de 47 GBq/μmol il est possible, en reportant cette valeur pour **II-43**, d'estimer qu'une centaine d'équivalents de peptide-cyclooctynes ont dû être employés.



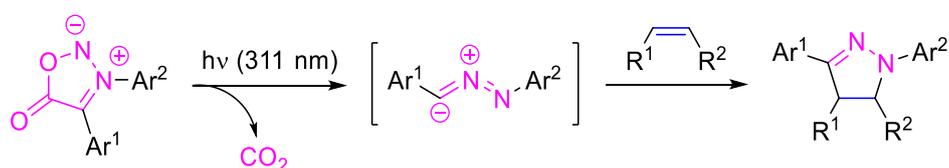
**Schéma 106.** Synthèse d'un groupement prosthétique contenant une sydnone



**Schéma 107.** Radiomarquage d'un peptide d'intérêt par réaction de SPSAC

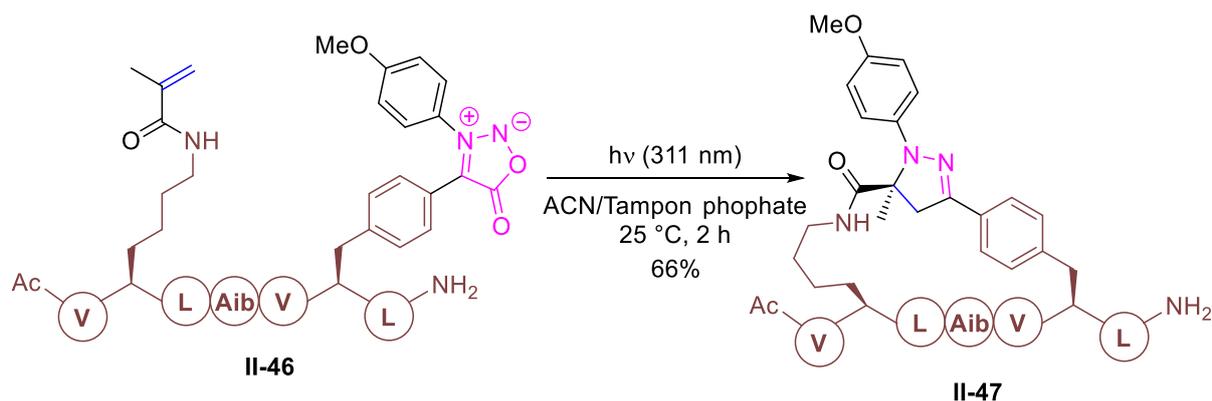
Le second exemple a été décrit par le groupe de Yu en 2019 pour le marquage de peptide en imagerie optique.<sup>190</sup> Dans cette étude, les auteurs ont exploité la photoréactivité d'une diarylsydnone. Sous irradiation UV à 311nm, la sydnone libère une molécule de CO<sub>2</sub> permettant de générer *in situ* le dipôle correspondant, qui réagit

avec un dipolarophile (dérivé d'acrylate ou de *trans*-cyclooctène) via une cycloaddition (3+2) pour donner le pyrazole correspondant (Schéma 108).

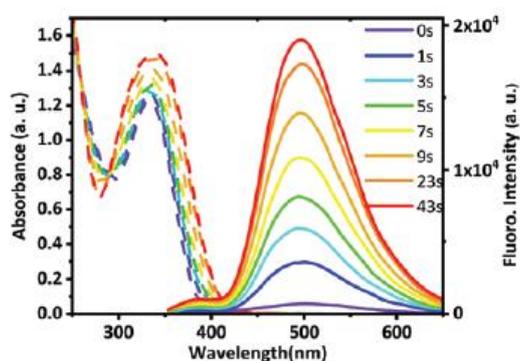


**Schéma 108.** Mécanisme de la réaction de photo-click avec une diarylsydnone

Cette cycloaddition a ensuite été utilisée en version intramoléculaire pour obtenir, à partir de l'heptapeptide **II-46** comportant un acrylamide et une diarylsydnone, le cyclopeptide fluorescent **II-47** correspondant avec un rendement de 66% (Schéma 109). La réaction de photo-click a pu être suivie par spectroscopie de fluorescence (Figure 69).

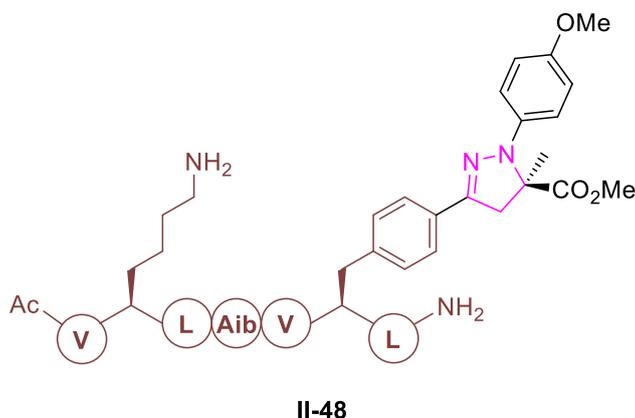


**Schéma 109.** Réactions de photo-click fluorogénique pour la cyclisation de peptides

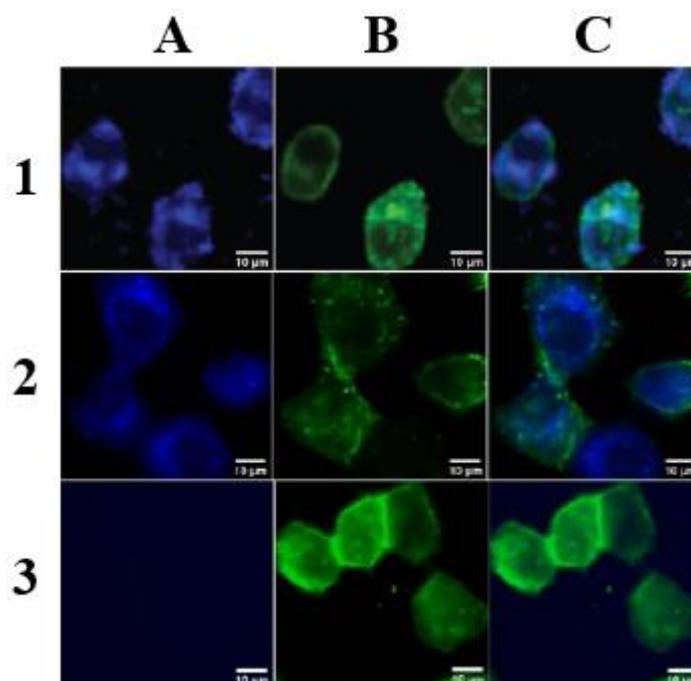


**Figure 69.** Modification des spectres d'absorption (ligne pointillée) et d'émission (ligne pleine) lors de la réaction de photo-click sur **II-46**

Cette réaction a ensuite été évaluée pour le suivi de peptides en milieu biologique. Des cellules A549 ont été cultivées en présence de **II-46** ont été irradiées à 371 nm pendant 1 minute et incubée ensuite pendant 3 heures (Figure 71, Ligne 1). D'autre part, deux diarylpyrazole-peptides **II-47**, produit de la photo-cycloaddition, et **II-48**, un peptide contrôle linéaire (Figure 70), ont également été incubés sur cellules A549 (Figure 71, Ligne 2 et 3). Le DiO a été employé ici pour marquer les membranes cellulaires et clarifier les images (Figure 71, Colonne B). Les images obtenues permettent de mettre en évidence la pénétration du peptide cyclisé **II-47** après photo-cyclisation *in cellulo* avec une fluorescence observée au sein de cette dernière à la longueur d'onde d'émission du pyrazole (Case A1). Ce résultat est confirmé par les deux expériences contrôles dans lesquelles une fluorescence est observée dans les cellules après incubation avec **II-47** (Case A2) mais pas pour le peptide linéaire **II-48** (Case A3). Cette méthode présente ainsi des résultats préliminaires encourageant sur peptides pour la modification de leurs propriétés pharmacologiques et leur suivi *in cellulo* par fluorescence.



**Figure 70.** Structure du peptide contrôle linéaire **II-48**

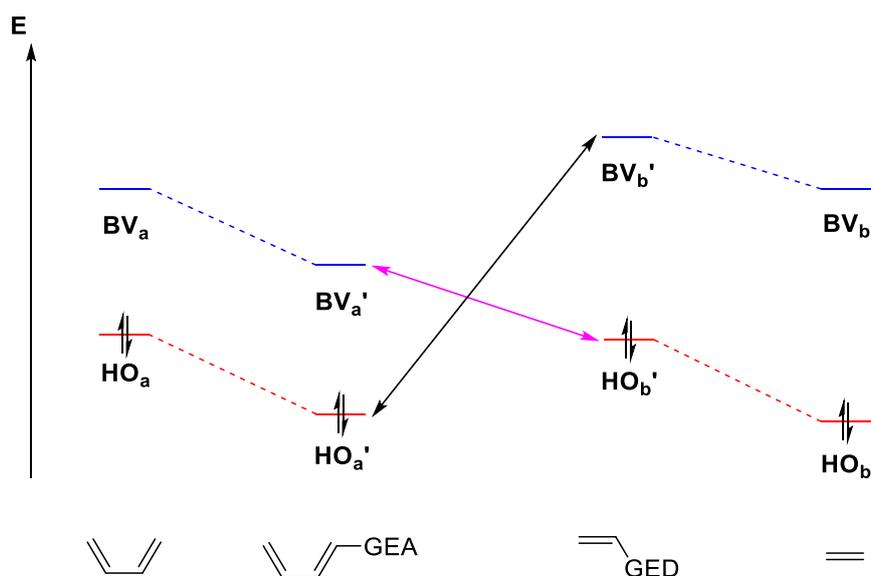


**Figure 71.** Images obtenues par microscopie confocale de cellules A549

## 1.5. Cycloadditions (4+2)

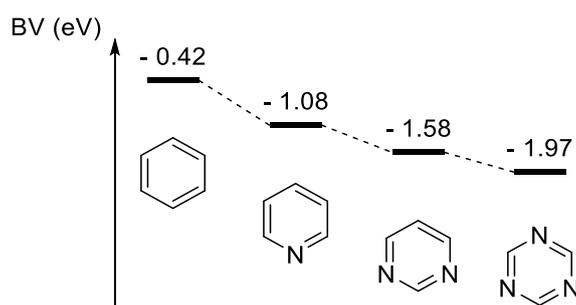
### 1.5.1. *Diels-Alder à demande inverse*

Les réactions de Diels-Alder à demande inverse représentent une sous classe des cycloadditions (4+2) et des réactions de Diels-Alder au sens large où le diénophile réagit par son orbitale HO et le diène par sa BV. Cette réactivité peut être obtenue d'une part par la fonctionnalisation du diénophile avec des groupements électrodonneurs (GED) permettant d'augmenter l'énergie de son orbitale HO. D'autre part, le diène peut être fonctionnalisé par des groupements électroattracteurs (GEA) afin de diminuer l'énergie de sa BV (Figure 72). Ainsi l'interaction entre l'orbitale  $BV_a'$  du diène et  $HO_b'$  du diénophile sera donc favorisée car représentant l'interaction avec la plus faible différence énergétique.



**Figure 72.** Influence des substituents sur les orbitales frontières et interaction privilégiée en demande inverse

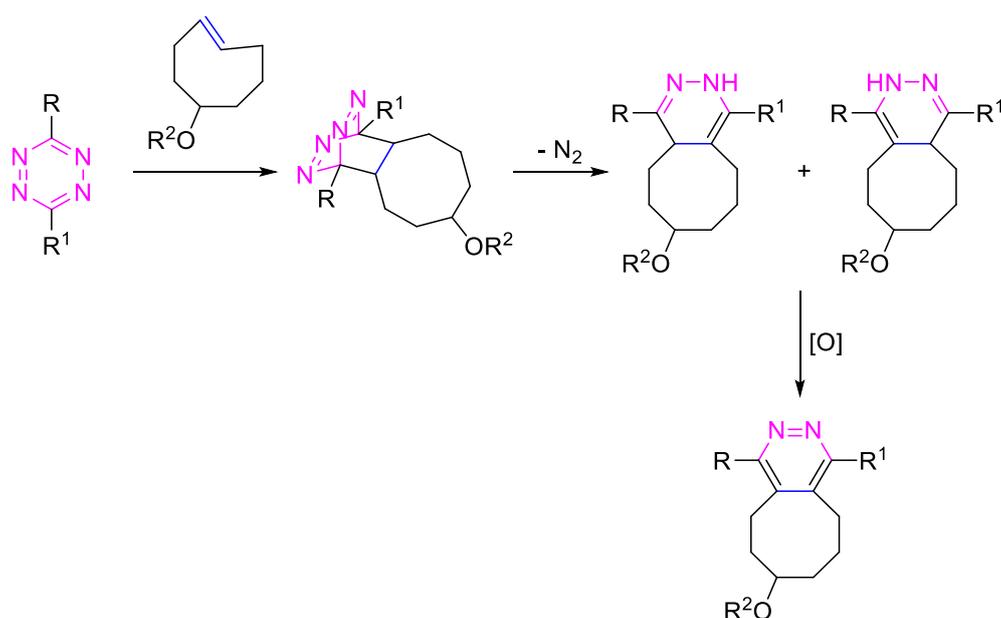
L'utilisation d'hétérocycles azotés à 6 chaînons représente un excellent point de départ pour l'obtention de systèmes diéniques appauvris. Ce phénomène a été mesuré par le groupe de Su en 2014 pour des applications dans la synthèse d'OLED.<sup>191</sup> Les énergies des orbitales BV ont été calculées pour quatre cycles (benzène/pyridine/1,3-diazine/1,3,5-triazine) par calcul théorique DFT (B3LYP/6-31G(d,p)). Au vu de ces résultats, il apparaît clairement que l'énergie de l'orbitale BV est directement corrélée au nombre d'atomes d'azote du cycle, plus ce nombre augmente, plus l'orbitale sera basse en énergie.



**Figure 73.** Comparaison des énergies des orbitales BV pour le benzène, la pyridine, la 1,3-diazine et la 1,3,5-triazine

Côté diénophile, plusieurs structures d'alcènes contraints ont été employées dans cette réaction et ont donné d'excellents résultats avec notamment les dérivés de *trans*-cyclooctène ou de cyclopropène.<sup>192</sup>

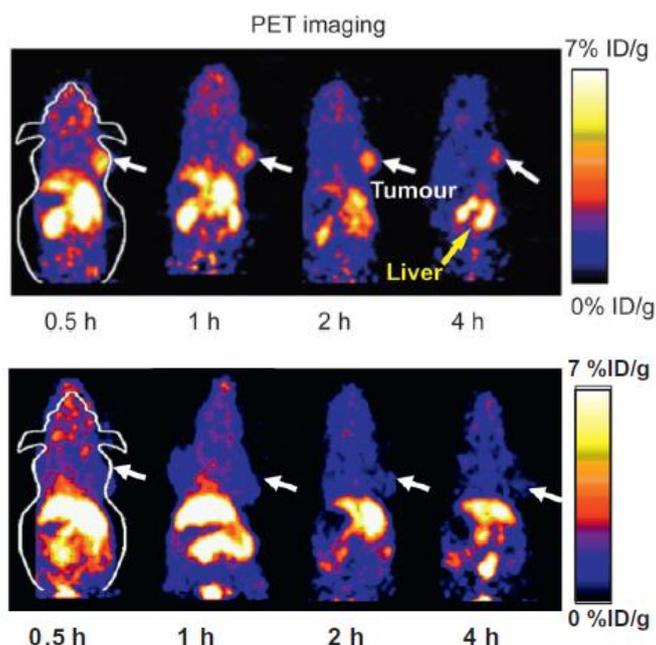
Ainsi, parmi les Diels-Alder à demande inverse, la réaction entre une tétrazine (Tz) et un alcène contraint représente la meilleure option en matière de bioconjugaison. Cette réaction pouvant être effectuée sans catalyseur en milieu biologique (eau, pH physiologique, ...) peut atteindre des cinétiques jusqu'à 10 000 fois plus rapide que la cycloaddition (3+2) catalysée au Cu(I). Cette réaction a ainsi fait l'objet de nombreuses revues en synthèse organique,<sup>193</sup> bioconjugaison<sup>193-195</sup> et notamment une revue focalisée sur ses applications sur peptides.<sup>196</sup> Le processus se déroule en deux étapes, d'abord une réaction de Diels-Alder donnant le cycloadduit intermédiaire ponté, puis une réaction de rétro-Diels-Alder avec libération de N<sub>2</sub> et isomérisation, conduisant à deux 1,4-dihydropyridazines régioisomères. Au contact de l'oxygène de l'air ces deux derniers composés sont rapidement oxydés en 1,2-diazine aromatique (Schéma 110). L'utilisation d'alcynes contraints dérivés de cyclooctyne peut également être envisagée et permet de s'affranchir de cette étape d'oxydation en donnant directement le produit aromatisé correspondant.



**Schéma 110.** Mécanisme pour la réaction de Diels-Alder à demande inverse avec une tétrazine et un *trans*-cyclooctène

Cette réaction pouvant atteindre des cinétiques particulièrement élevées, elle représente une méthode de choix pour le radiomarquage à l'aide de radioéléments à demi-vie courte comme le <sup>18</sup>F (110 min) ou le <sup>68</sup>Ga (68 min). En 2010, Fox *et al.* ont rapporté le premier exemple d'utilisation de la réaction d'IEDDA dans le contexte du





**Figure 74.** Images en coupe coronale de souris nude porteuses de tumeurs U87MG injectée avec II-51 en absence ou présence d'un ligand froid

Ce premier exemple s'appuie donc sur l'introduction du motif tétrazine par acylation de la lysine présente dans la structure du c(RGDyK). Ce motif étant assez courant et souvent répété au sein de peptides bioactifs, la modification de ce résidu pourrait demander à travailler sur peptides protégés de façon à éviter la polyfonctionnalisation du peptide d'intérêt. Une autre stratégie basée sur la fonctionnalisation de résidus cystéines a ainsi été décrite par Weissleder *et al.*<sup>199</sup> en 2012 et appliquée au radiomarquage du peptide Exendin-4 constitué de 40 acides aminés et ligand du « Glucagon-Like Peptide 1 Receptor » (GLP-1R). Une cystéine a alors été introduite en position 12 de l'Exendin-4 et sa fonctionnalisation par un motif tétrazine a été effectuée par addition de thia-Michael sur un motif maléimide. Le radiomarquage a ensuite été réalisé avec un dérivé de *trans*-cyclooctène II-52 pour donner le radioligand I-54 avec 47% de dcRCY, après 20 minutes de réaction, à température ambiante, dans un mélange PBS/DMSO (Schéma 112). Ce ligand a ensuite été évalué dans un modèle murin *in vivo*, pour la détection de nésioblastomes (ou insulinomes) surexprimant le récepteur GLP-1R. Par cette stratégie, la tumeur a pu être détectée après un examen TEP/CT corps entier de la souris (Figure 75).

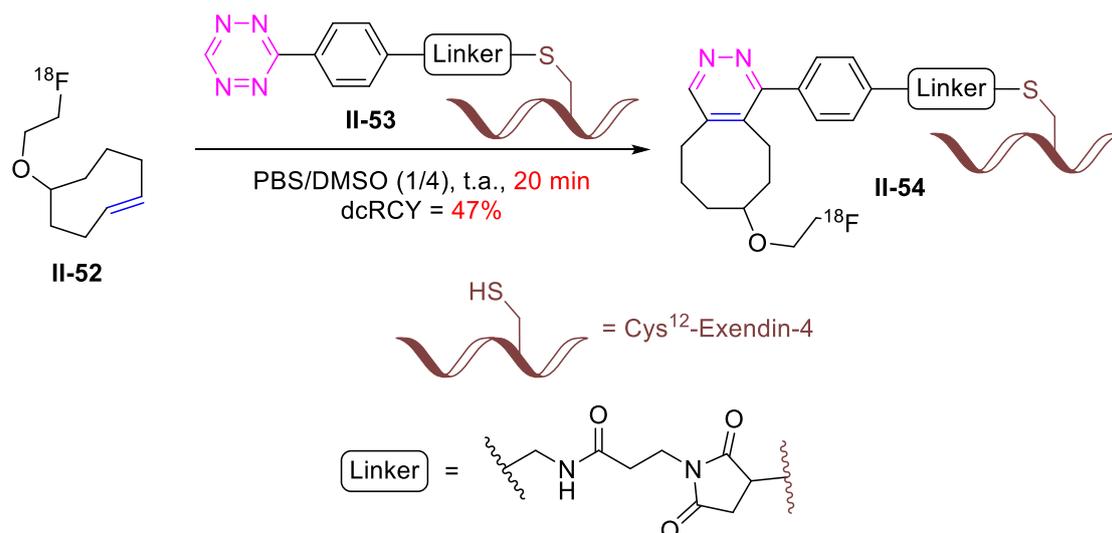


Schéma 112. Radiomarquage de l'exendin-4 par Weissleder *et al.*

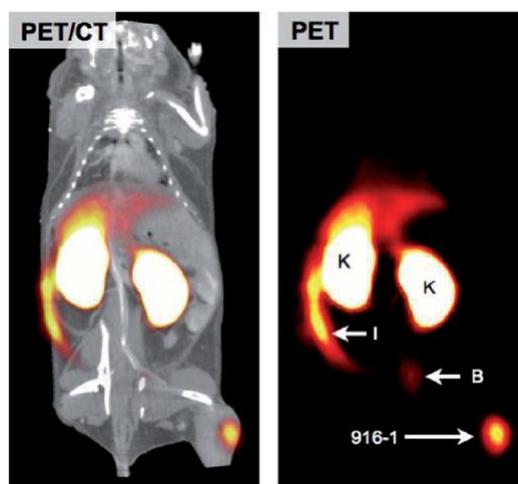


Figure 75. Scanners PET/CT ou PET d'une souris xéno greffé par une tumeur 916-1.  
 K = reins, I = intestins, B = Vessie, 916-1 = tumeur

Peu de temps après, le groupe de Kandeel<sup>200</sup> a publié une étude de radiomarquage de l'exendin-4 via une stratégie similaire basée à nouveau sur la fonctionnalisation de la cystéine. Les auteurs ont cependant préféré introduire la cystéine en position 40 plutôt qu'au milieu de la séquence peptidique comme dans l'exemple précédent. Le radiomarquage effectué avec le même *trans*-cyclooctène **II-52** donne ici de meilleurs résultats avec un dcRCY de 80% après 5 minutes de réaction à température ambiante. Ces différences de réactivité et de rendement pourraient s'expliquer selon deux facteurs principaux. D'une part, l'encombrement stérique doit être plus important au milieu de la séquence peptidique qu'en fin de séquence comme ici et cela doit impacter



dcRCY quasi-quantitatif après 5 min à 40 °C. L'affinité de ce radioligand **II-58** pour son récepteur a également été validée avec succès sur modèle murin xéno greffé par des cellules U87MG (Figure 77).

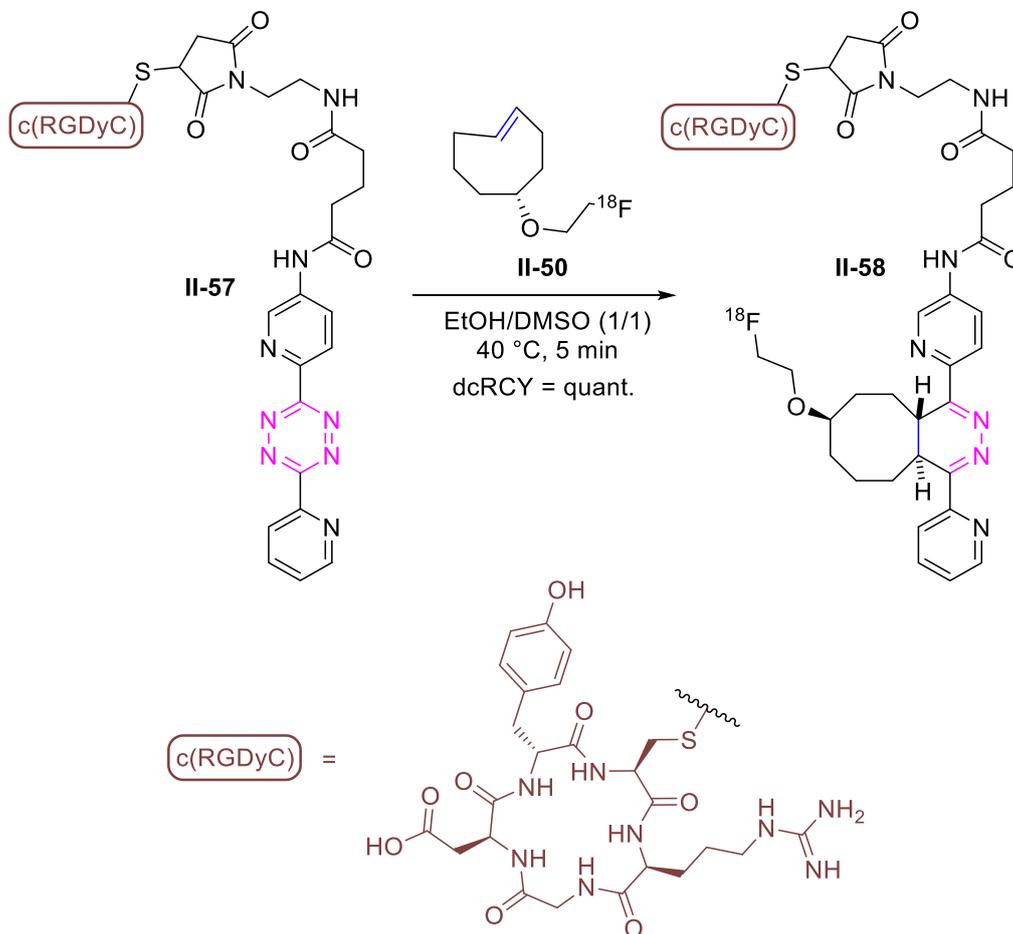


Schéma 114. Radiomarquage de c(RGDyC) par Conti et al.

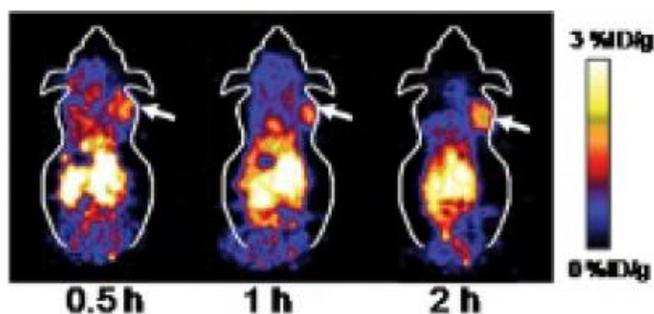
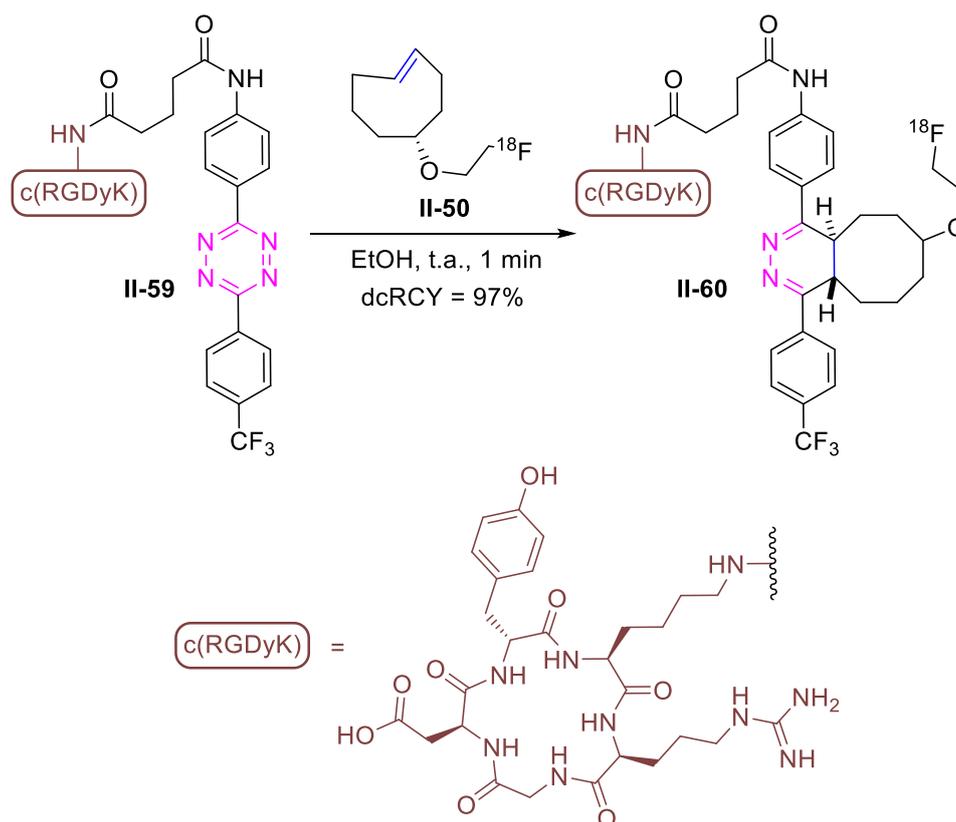


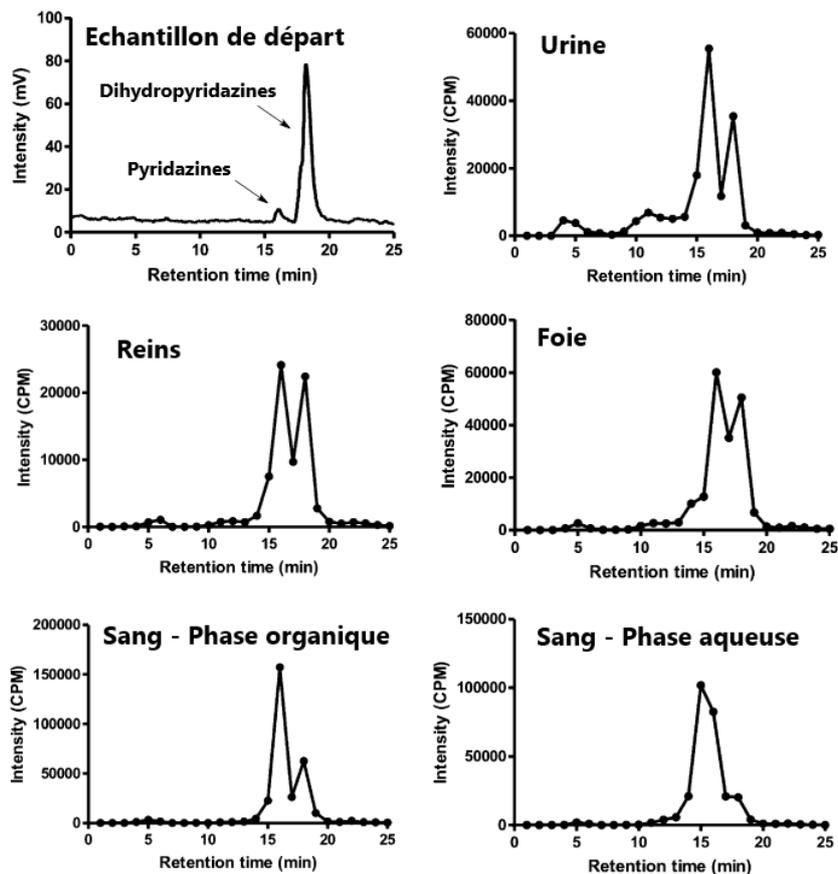
Figure 77. Scanner TEP de souris xéno greffée avec une tumeur U87MG après injection de **II-58**

Parmi ces exemples, de nombreux radioligands présentaient des stabilités métaboliques limitées malgré leur validation sur modèle tumoraux murin par scanner

TEP. La principale raison soulevée pour expliquer ces dégradations proviendrait de la nécessité d'utiliser des tétrazines particulièrement pauvres en électrons comme les dipyridyl-tétrazines pour le radiomarquage au  $^{18}\text{F}$ . Le cœur dihydropyridazine obtenu après cycloaddition serait à son tour particulièrement électrophile et sensible aux attaques nucléophiles pouvant être responsables de la métabolisation rapide des adduits *in vivo*. Pour pallier ce problème, le groupe de Fox et Li a développé dans un premier temps une diaryltétrazine moins réactive **II-59**, mais qui conduit à des adduits **II-60** plus stables après radiomarquage.<sup>203</sup> Cette nouvelle tétrazine permet d'effectuer un radiomarquage toujours efficace avec seulement quatre équivalents de diène et un dcRCY de 97%, après 1 minute à température ambiante. Les adduits obtenus **II-60** ont ensuite montré de très bonnes stabilités métaboliques 2 heures après injection chez la souris. Seuls les adduits sous leur forme dihydropyridazine et leur forme oxydée (pyridazine) ont pu être observées, garantissant la solidité du lien.

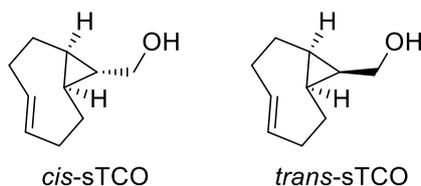


**Schéma 115.** Utilisation de tétrazine moins réactive pour le radiomarquage de peptide



**Figure 78.** Mesure de la stabilité métabolique des adduits II-60

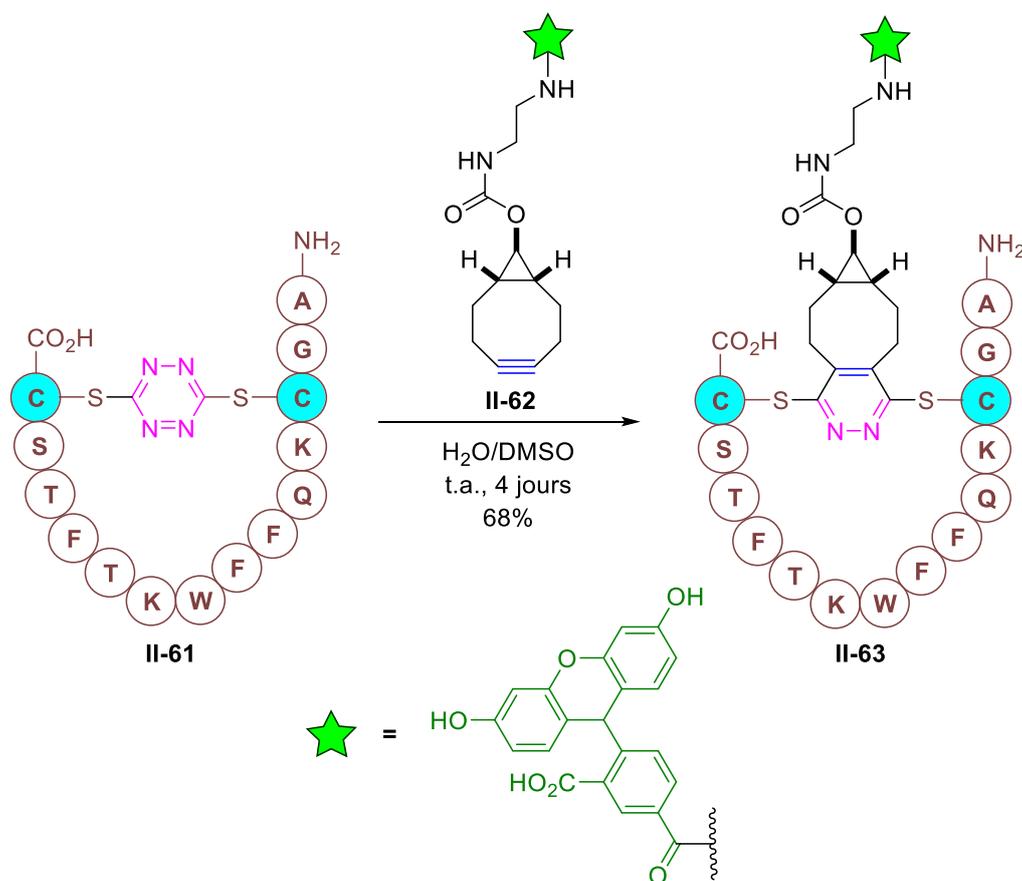
Enfin, l'utilisation de *trans*-cyclooctènes plus contraintes fusionnées à des cyclopropanes (Figure 79), comme les isomères *cis* et *trans* du (1*R*,8*S*,*E*)-bicyclo[6.1.0]non-4-èn-9-ylméthanol (sTCO), a permis d'atteindre les constantes de vitesses les plus élevées à ce jour en bioconjugaison, avec des valeurs atteignant plus de  $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .<sup>204</sup> Ces composés ont également donné de très bons résultats sur un dérivé de RGD marqué avec une dipyridyl-tétrazine.<sup>205</sup>



**Figure 79.** Structure des isomères du sTCO

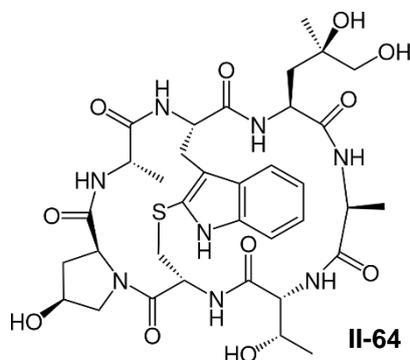
De façon sporadique, d'autres groupements prosthétiques ont été utilisés comme diénophiles dans la réaction IEDDA pour des applications en imagerie. Par exemple, un dérivé de norbornène a été employé pour le radiomarquage au fluor-18 de la bombésine, avec un rendement radio-HPLC de 46%, après 30 minutes, à température ambiante.<sup>206</sup>

Cette réaction a également été appliquée pour la conjugaison de peptides avec des fluorophores. Un exemple a été décrit en 2015 par Brown et Smith, après la mise au point d'une stratégie de « stapling » de peptides par le motif tétrazine.<sup>207</sup> Les auteurs ont ainsi développé une méthode d'introduction d'un motif tétrazine entre deux cystéines qui peuvent être séparées entre elles par 2 et jusqu'à 27 acides aminés, en faisant réagir les 2 fonctions thiol sur la 3,6-dichloro-1,2,4,5-tétrazine. Les peptides cycliques obtenus ont été marqués pour être suivis par fluorescence via une réaction d'IEDDA avec un dérivé d'alcyne contraint portant une fluorescéine, avec un rendement de 68%, après 4 jours de réaction, à température ambiante (Schéma 116).



**Schéma 116.** Fonctionnalisation par IEDDA d'un peptide cyclisé à l'aide d'un motif tétrazine

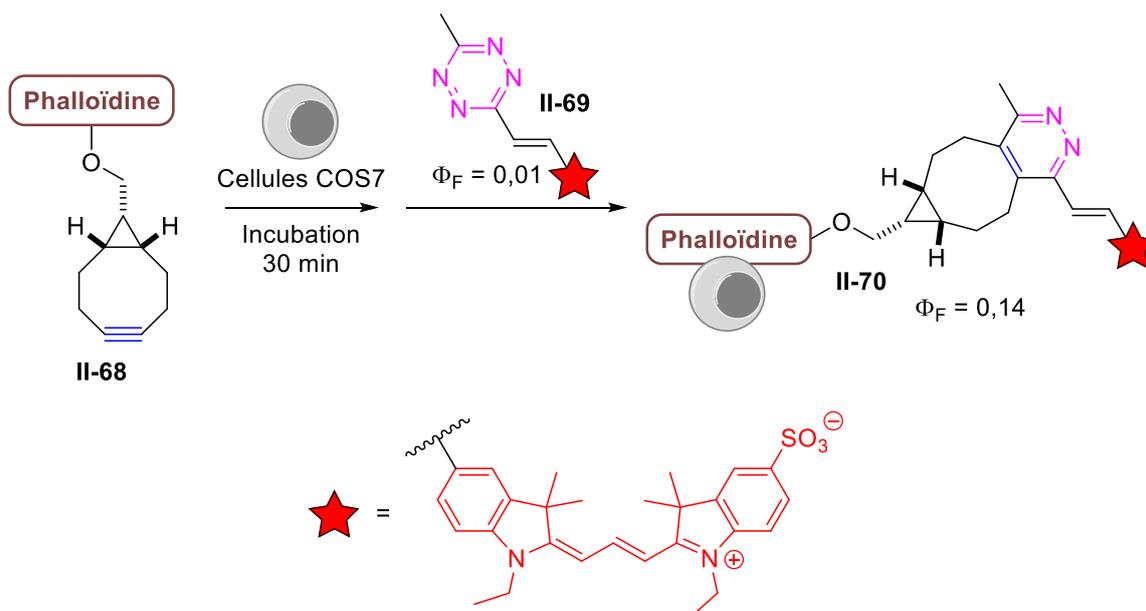
Le groupe de Wombacher a poursuivi ce travail en décrivant en 2017 l'utilisation de cette réaction pour le marquage de la phalloïdine **II-64** (Figure 80), ligand de l'actine, à l'aide de différents fluorophores de la famille des xanthènes émettant du vert au rouge lointain.<sup>208</sup>



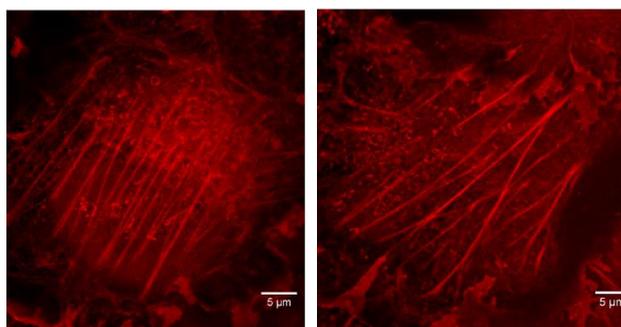
**Figure 80.** Structure de la phalloïdine

Dans cette étude, les fluorophores ont été cette fois couplés au motif tétrazine, connu pour inhiber la fluorescence de ces structures par transfert d'énergie de type « *Through-Bond-Energy-Transfer* » ou TBET. Après réaction d'IEDDA la fluorescence a pu être retrouvée avec une exaltation pouvant atteindre un facteur supérieur à 100. Les auteurs ont donc exploité cette propriété pour mettre au point une méthode d'imagerie cellulaire sans besoin de lavage du fluorophore (Schéma 117). Ainsi, après d'incubation de **II-65** au sein de cellules HeLa, le traitement par **II-66** ( $\lambda_{em} = 524 \text{ nm}$ ) de ces dernières a permis d'obtenir des images des filaments d'actine avec d'excellentes résolutions en microscopie confocale, sans lavage préalable du fluorophore (Figure 81).



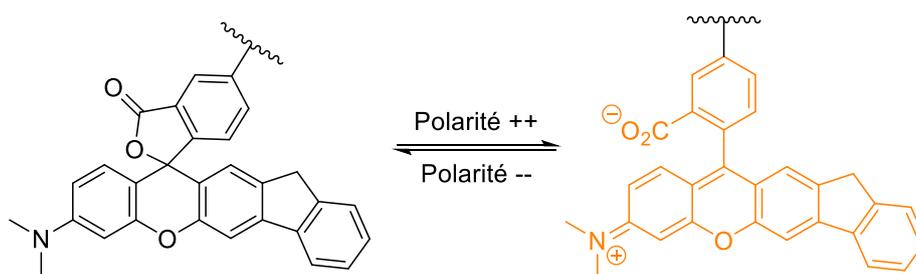


**Schéma 118.** Marquage de filaments d'actine par une réaction d'IEDDA fluorogénique

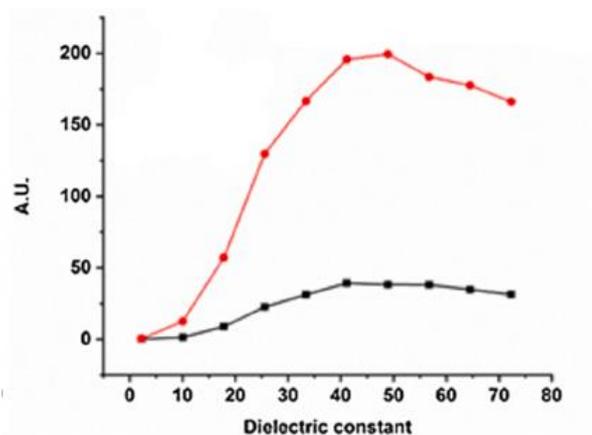


**Figure 82.** Images obtenues en microscopie super-résolutive après marquage fluorogénique et sans lavage

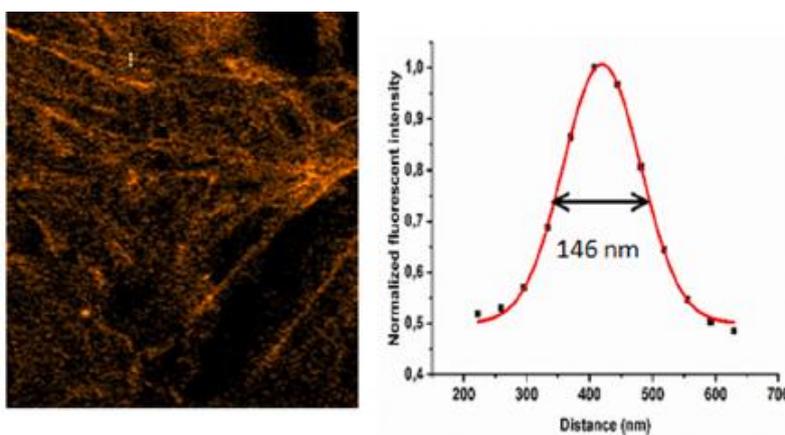
Le même groupe a par la suite étendu cette stratégie pour le marquage de la phalloïdine par un fluorophore dérivé de rhodamine dont la fluorescence est inhibée par deux mécanismes distincts.<sup>210</sup> Comme précédemment, d'une part ce fluorophore est fonctionnalisé par une tétrazine capable d'inhiber sa fluorescence par TBET, d'autre part, comme pour la majorité des fluorophores dérivés de xanthes, deux formes existent : une forme ouverte fluorescente et une forme fermée éteinte (Schéma 119). L'équilibre entre ces deux formes pouvant être modifié en fonction de la polarité du milieu, il est ainsi possible d'obtenir un deuxième mécanisme d'inhibition de fluorescence modulable (Figure 83). Par cette stratégie, des images de filaments d'actine avec une résolution dépassant la limite de diffraction ont pu être obtenues (Figure 84).



**Schéma 119.** Equilibre entre forme ouverte et fermée pour les rhodamines employées



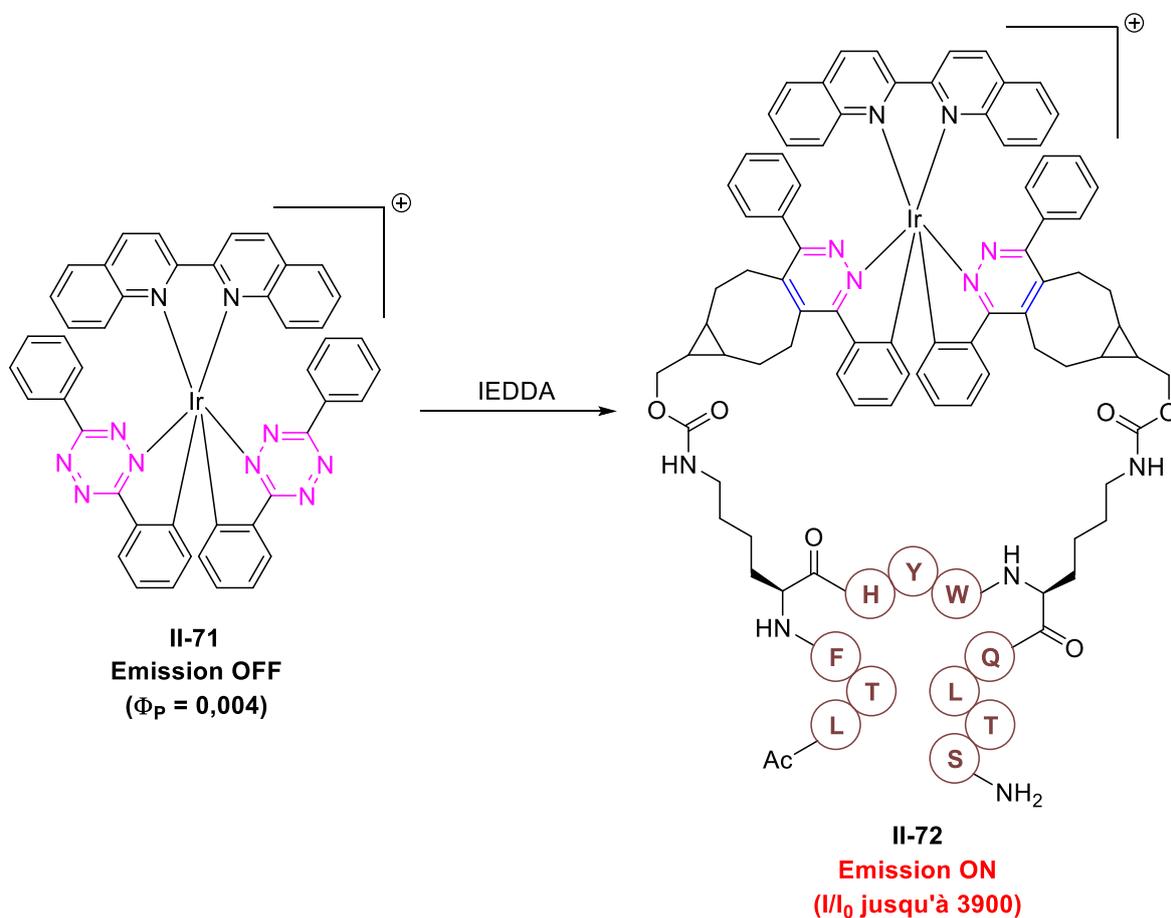
**Figure 83.** Influence de la polarité du milieu sur l'émission de fluorophores avant (courbe noire) ou après (courbe rouge) réaction d'IEDDA



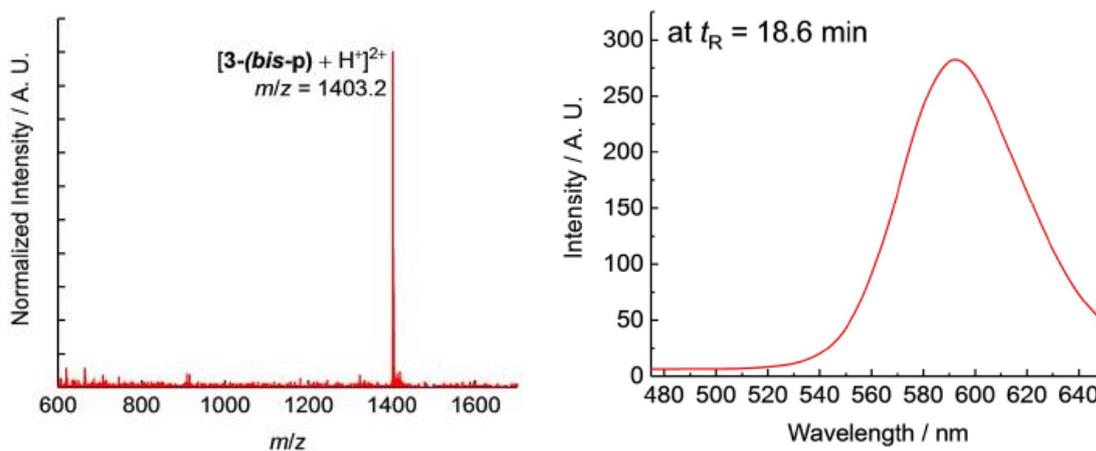
**Figure 84.** Images de filaments d'actine obtenues par microscopie super-résolutive et épaisseur mesurée des filaments observés

Les complexes métalliques fluorescents ou phosphorescents ont aussi été utilisés pour le marquage de peptides. La stratégie par IEDDA permet en effet leur emploi, car n'étant pas métallo-catalysée, il n'y a pas de risque d'interférence entre les espèces

métalliques. En 2022, le groupe de Lo a décrit le « stapling » phosphorogénique de peptides à l'aide de complexes d'iridium.<sup>211</sup> Ces complexes **II-71** comportent deux ligands tétrazines inhibant la phosphorescence de l'iridium à l'état initial et permettant d'atteindre une exaltation de phosphorescence proche d'un facteur 4000 après réaction sur réactifs modèles. D'autre part, deux cyclooctynes ont été introduites sur les chaînes latérales de deux lysines d'un peptide modèle pouvant agir comme inhibiteur de l'interaction p53-Mdm2/Mdmx dans les cancers surexprimant ces deux dernières protéines. La cycloaddition a été effectuée ici à 50  $\mu\text{M}$  et permet d'obtenir très majoritairement, après 24 heures, le peptide cyclisé désiré **II-72** et présentant une phosphorescence à 600 nm issu du complexe d'iridium (Figure 85).

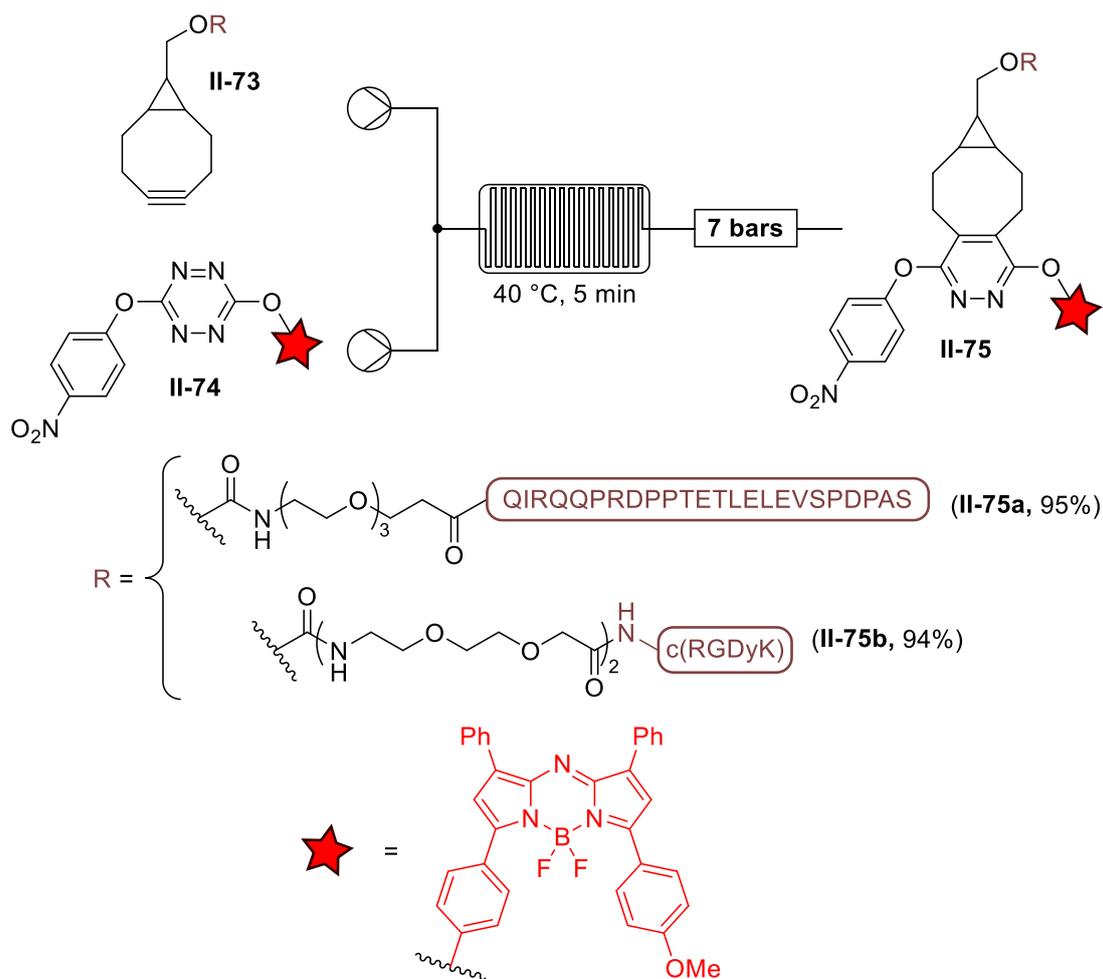


**Schéma 120.** Cyclisation phosphorogénique d'un peptide modèle par IEDDA



**Figure 85.** Confirmation en ESI-MS de l'obtention du peptide cyclisé (gauche) et signal de phosphorescence obtenu après réaction (droite)

Une étude récente du groupe de O'Shea a également porté sur l'utilisation de cette réaction et de son caractère fluorogénique pour le marquage de peptides par des fluorophores BF<sub>2</sub>-azadipyrométhènes, à l'aide de la chimie en flux.<sup>212</sup> Deux peptides ont ainsi été marqués par cette méthode en conditions stoechiométriques, à 40 °C, avec seulement 5 minutes de temps de résidence, pour des rendements de 95% pour **II-75a** et 94% pour **II-75b**, sans purification supplémentaire (Schéma 121).



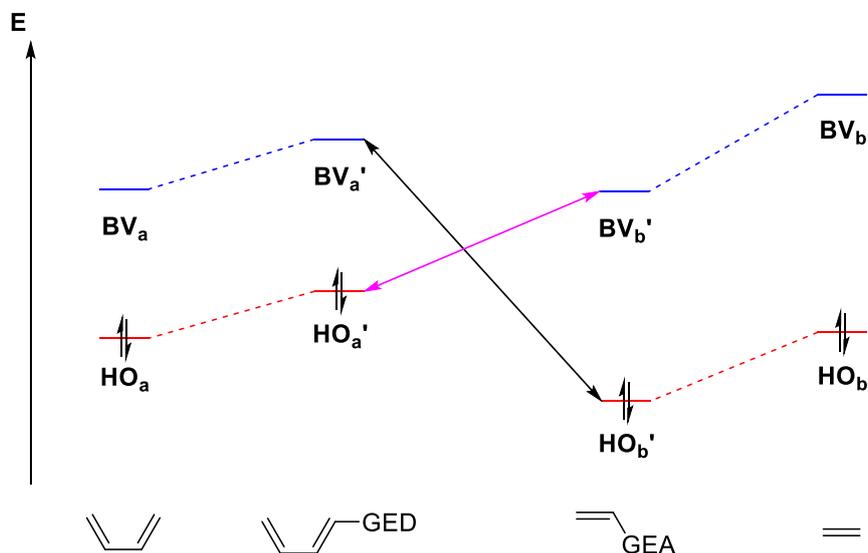
**Schéma 121.** Marquage de peptides par un aza-BODIPY par IEDDA en chimie en flux

Bien que cette réaction soit particulièrement efficace et rapide pour des applications sur peptides, peu d'exemples ont été décrits dans la littérature. En revanche, les exemples rapportés pour d'autres biomolécules, notamment des anticorps, sont bien plus nombreux. Ceci peut s'expliquer d'une part par l'encombrement stérique engendré par les réactifs impliqués dans cette réaction, encombrement qui pourrait avoir plus d'impact avec des petites structures comme des peptides sur leur rôle biologique. D'autre part, la faible accessibilité et/ou le coût élevé des réactifs de départ peut également impacter la fréquence d'utilisation de cette méthode.

### 1.5.2. Diels-Alder à demande normale

Les réactions de Diels-Alder à demande normale bien qu'historiquement plus anciennes, restent largement sous-représentées parmi les réactions de

bioconjugaison.<sup>213</sup> Ce type de réaction a lieu par interaction de l'orbitale  $HO_a'$  d'un diène fonctionnalisé par un GED avec l'orbitale  $BV_b'$  d'un diénophile appauvri par un GEA (Figure 86).

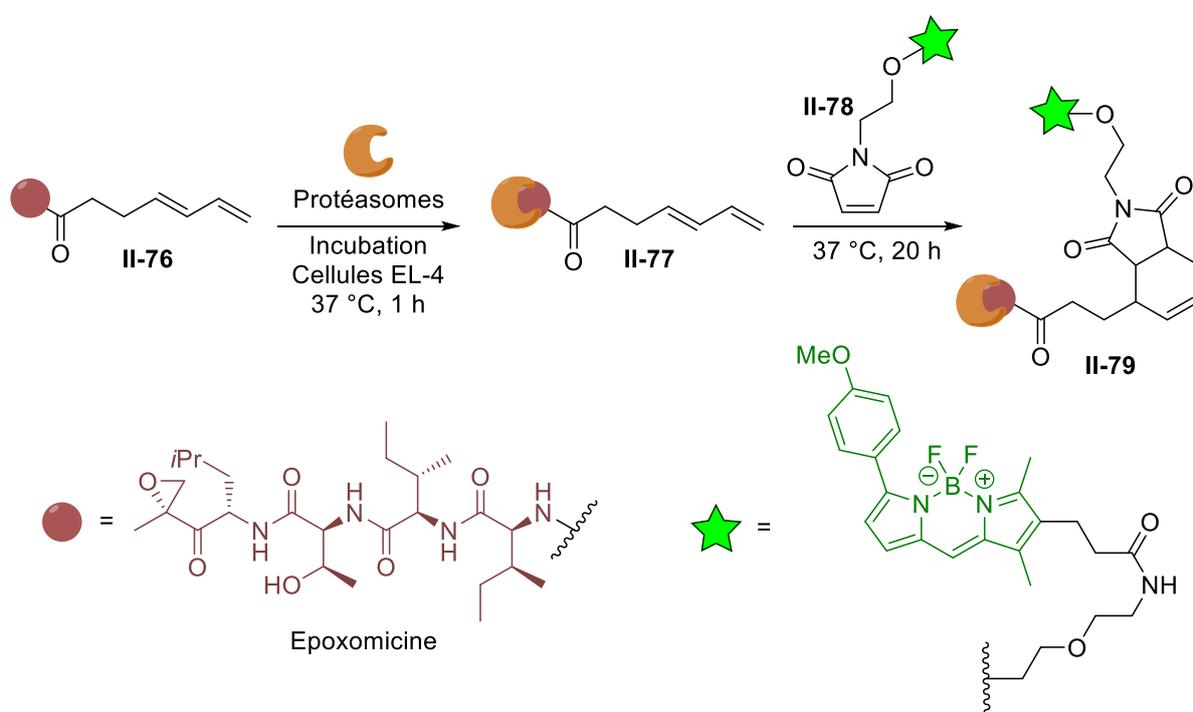


**Figure 86.** Influence des substituents sur les orbitales frontières et interaction privilégiée en demande normale

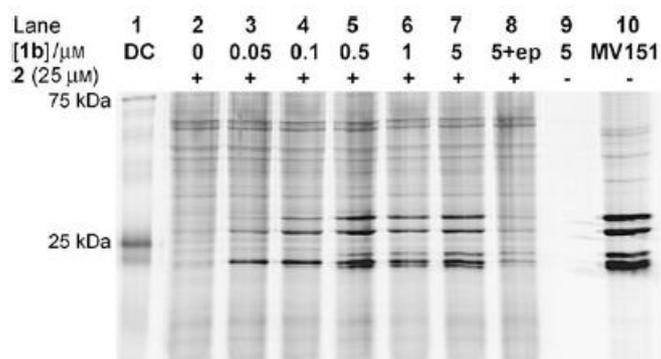
A notre connaissance, aucun article décrivant l'utilisation de la réaction de NEDDA dans le cadre du radiomarquage de biomolécules au  $^{18}F$  n'a été publié à ce jour. Cela peut s'expliquer par les cinétiques rapportées dans la littérature<sup>214</sup> qui sont, pour la plupart des diènes, très inférieures au seuil limite nécessaire au fluor-18. Seuls les dérivés de cyclopentadiènes permettent d'obtenir les cinétiques souhaitées, au prix d'une faible stabilité de ces derniers particulièrement sujet à l'homodimérisation. Concernant les diénophiles, ce sont presque exclusivement les dérivés de maléimide qui ont été décrits dans la littérature pour ces applications. Ces dérivés permettent en effet un bon équilibre entre stabilité et réactivité tout en permettant une accroche facile pour les biomolécules ou outils d'imagerie d'intérêt.

Quelques exemples de fonctionnalisation de peptide par un fluorophore ont cependant été rapportés dans la littérature. Ce type de réaction a notamment été employé par Overkleeft *et al.* en 2010, pour la détection de protéasomes *in cellulo* (Schéma 122).<sup>215</sup> Dans cet exemple, l'époxomicine, un tripeptide ligand de protéasomes, a tout d'abord été fonctionnalisé par un diène linéaire, puis **II-76** a été incubé sur cellules EL-

4 permettant sa ligation aux protéasomes intracellulaires. Ce milieu a été ensuite traité pendant 24 heures par un fluorophore BODIPY porteur d'un motif maléimide **II-78**. La réaction de cycloaddition entre les deux partenaires a permis de marquer le peptide avec le fluorophore et de lier **II-79** aux protéasomes. Ceci a été visualisé par SDS-PAGE, mettant en évidence l'efficacité de cette méthode pour la détection de protéasomes (Figure 87). Les électrophorèses obtenues (colonne 3 à 7) sont comparables à celle obtenue avec un ligand de protéasomes fluorescent connu (colonne 10). La sélectivité de cette méthode a également été vérifiée en incubant initialement les cellules avec un excès de tripeptide natif (ligne 8) et dans ce cas un signal beaucoup plus faible a été obtenu après électrophorèse.

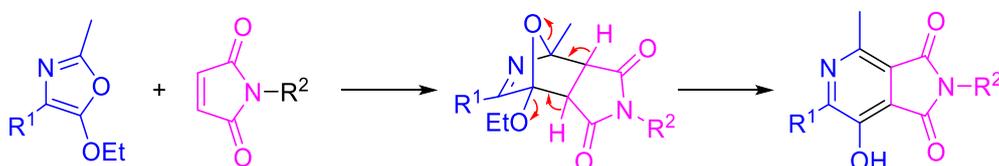


**Schéma 122.** Méthode de détection de protéasomes *in cellulo* par réaction de Diels-Alder



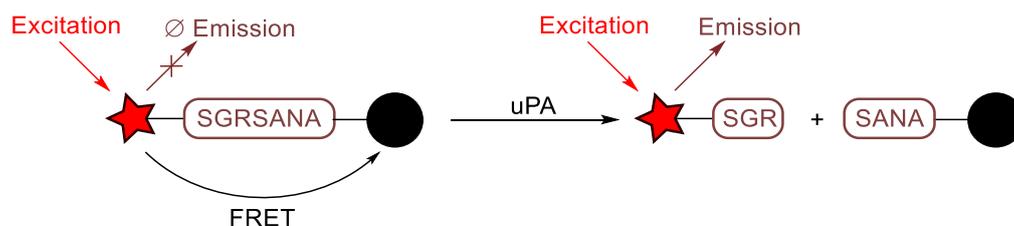
**Figure 87.** Visualisation du marquage de protéasomes par SDS-PAGE

Quelques années plus tard le groupe de Sabot et Renard,<sup>216</sup> après avoir fait le constat d'un cruel manque de méthodes de bioconjugaison sur peptide, ont proposé un exemple d'utilisation de la réaction de Kondrat'eva pour la modification de peptides. Cette réaction d'hétéro-Diels-Alder (HDA) à demande normale entre un dérivé de maléimide et un aza-diène cyclique, permet après cycloaddition, l'ouverture de l'intermédiaire ponté et l'élimination d'éthanol, pour conduire à un dérivé de pyridine, protonable en milieu biologique (Schéma 123).



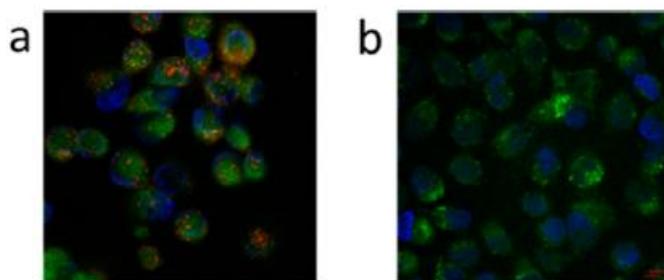
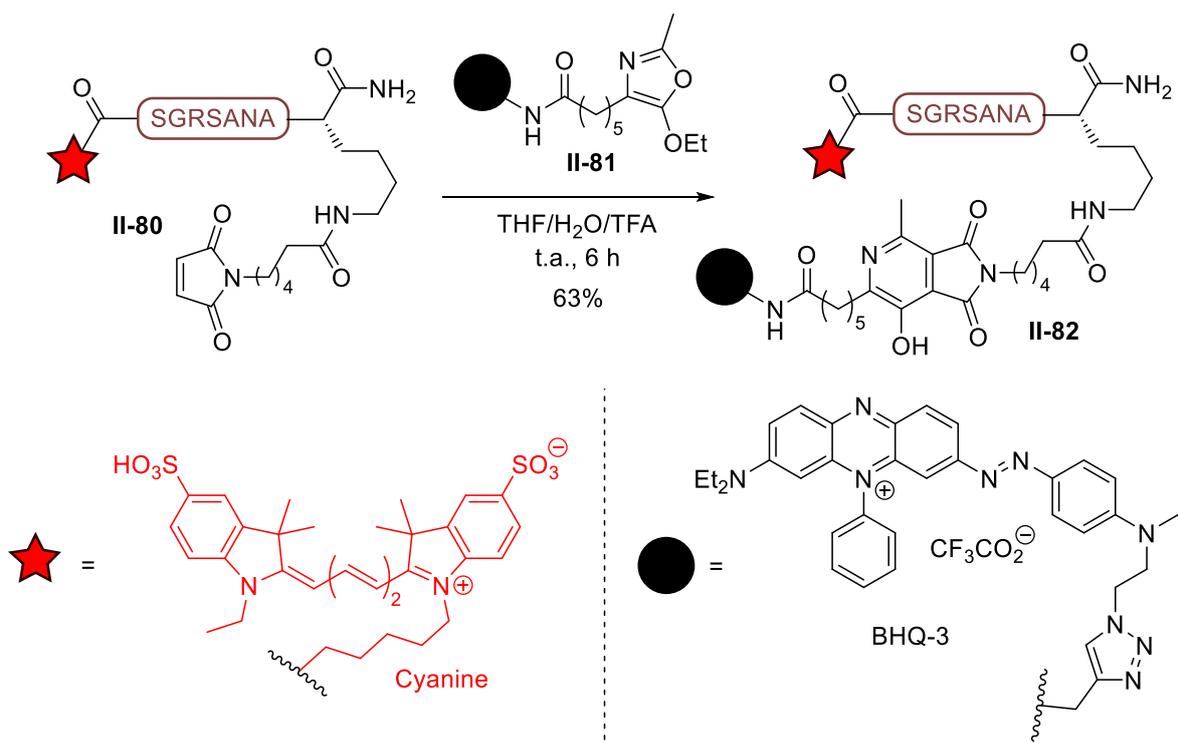
**Schéma 123.** Mécanisme de la réaction d'HDA de Kondrat'eva

Dans ces travaux, Renard *et al.* ont appliqué cette réaction à la synthèse de sondes dans lesquelles un fluorophore est initialement inhibé par un quencher via transfert d'énergie de type Förster ou FRET (Schéma 124). Dans ces sondes, ces deux partenaires sont liés par un heptapeptide ligand d'urokinase ou uPA, une enzyme surexprimée au sein de cellules cancéreuses et capable de scinder ce peptide en deux par hydrolyse. Le transfert FRET étant une interaction à courte distance, après coupure du peptide par l'uPA, les deux partenaires de FRET se trouvent suffisamment éloignés et la fluorescence du fluorophore peut être retrouvée.



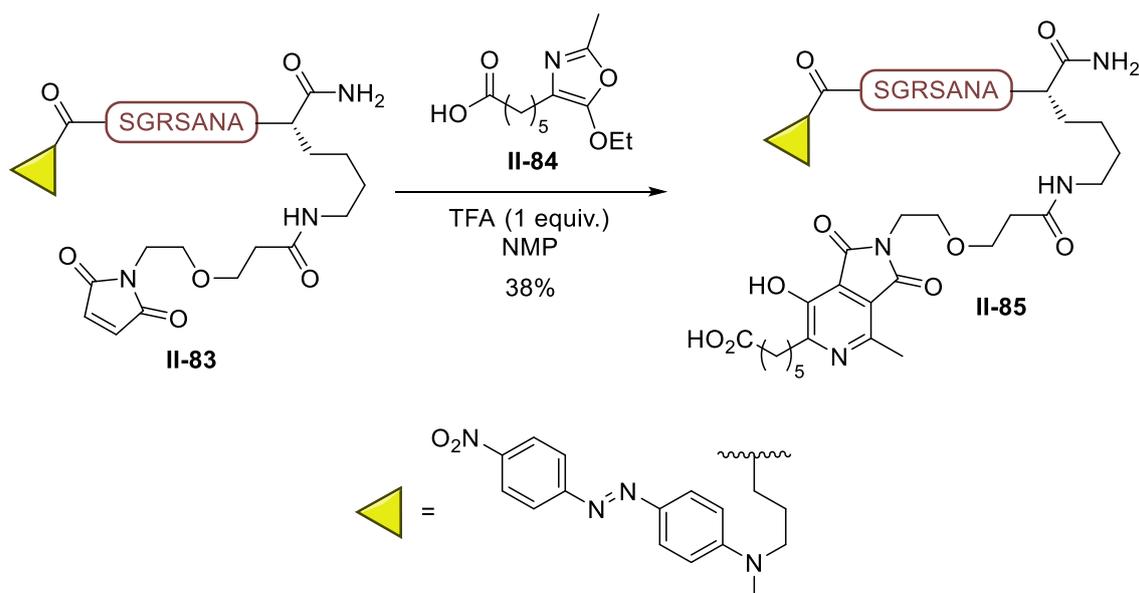
**Schéma 124.** Principe de sondes FRET sensibles à l'uPA

Cette stratégie a ainsi été mise au point par la suite en utilisant comme fluorophore un dérivé de cyanine émettant dans le rouge et l'accepteur de FRET « BHQ-3 ». La réaction de Kondrat'eva a permis d'obtenir la sonde FRET **II-82** avec un rendement de 63% dans un mélange THF/H<sub>2</sub>O/TFA, après 6 heures, à température ambiante (Schéma 125). Après action de l'uPA sur cette sonde, une exaltation de fluorescence d'un facteur 66 est observée après quelques dizaines de minutes. Cette sonde **II-82** a ensuite été incubée sur cellules de cancer de la prostate (PC3) surexprimant l'enzyme uPA (Figure 88). Après 2 heures, une fluorescence rouge peut être observée, signe du clivage du peptide par l'enzyme. Ce phénomène n'est en revanche pas observé lorsque les cellules sont incubées avec la sonde **D-II-82** constituée d'acide aminé D, démontrant ainsi la spécificité de cette méthode.

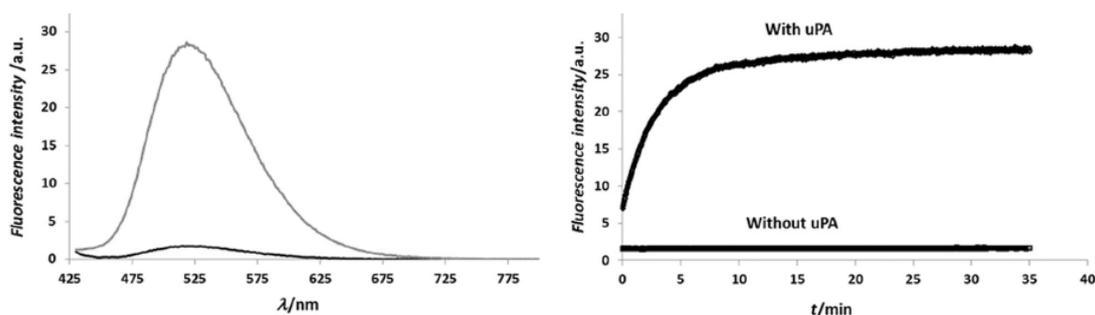


**Figure 88.** Imagerie confocale de cellules de cancer de la prostate PC3 traitée avec la sonde **II-82** (a) ou **D-II-82** (b)

Les mêmes auteurs ont par la suite étendu cette méthode en profitant du caractère fluorogénique de la réaction de Kondrat'eva.<sup>217</sup> Après optimisation des substituants portés par les deux partenaires, il est en effet possible d'obtenir des azaphthalimides avec des rendements quantiques de fluorescence de 15% à pH physiologique (Schéma 126). L'accepteur de FRET sélectionné ici est un dérivé d'azobenzène et la sonde finale **II-85** est obtenue dans la NMP avec 1 équivalent de TFA avec 38% de rendement. Comme précédemment, une bonne exaltation de fluorescence est observée après incubation avec l'urokinase, autour d'un facteur 10 (Figure 89).

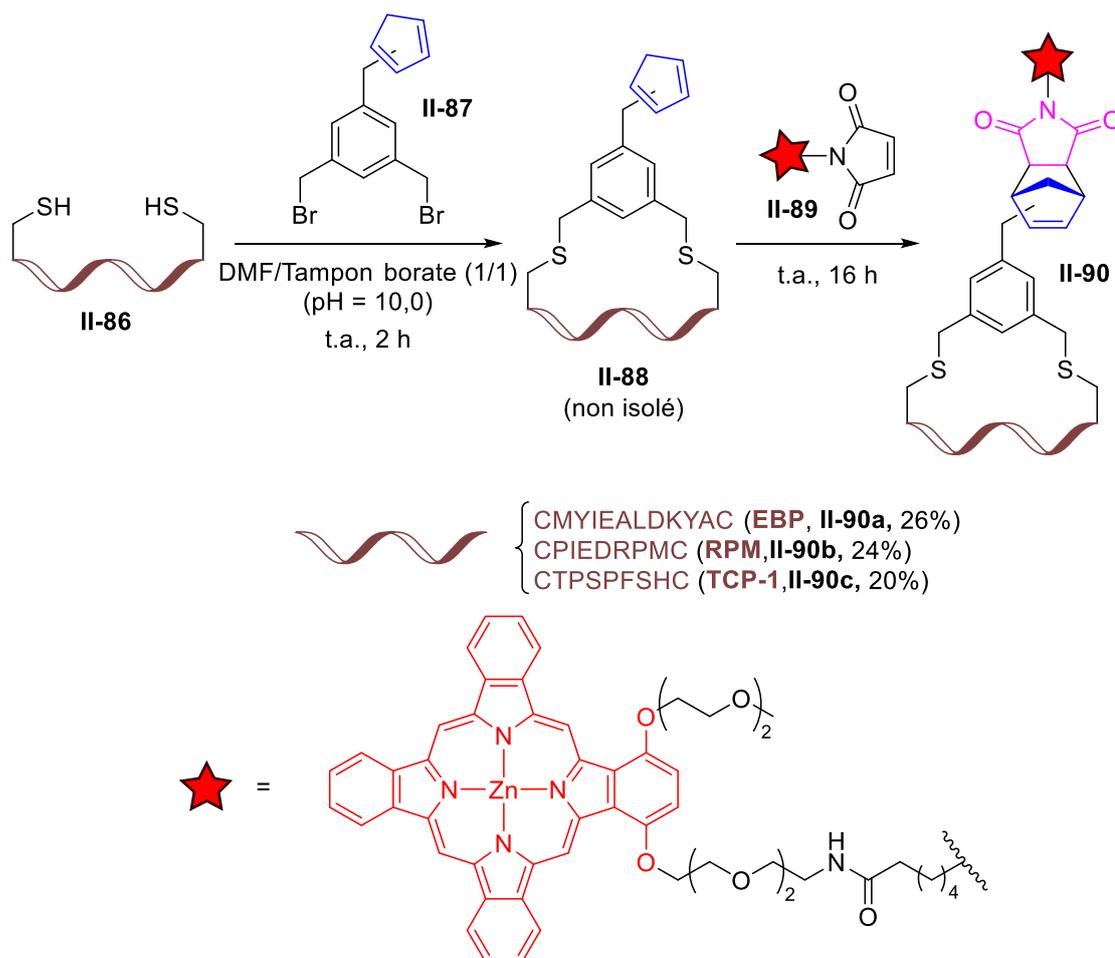


**Schéma 126.** Application de la réaction fluorogénique de Kondrat'eva à la synthèse de sonde FRET sensibles à l'uPA



**Figure 89.** Exaltation de la fluorescence de la sonde FRET **II-85** après incubation avec l'uPA

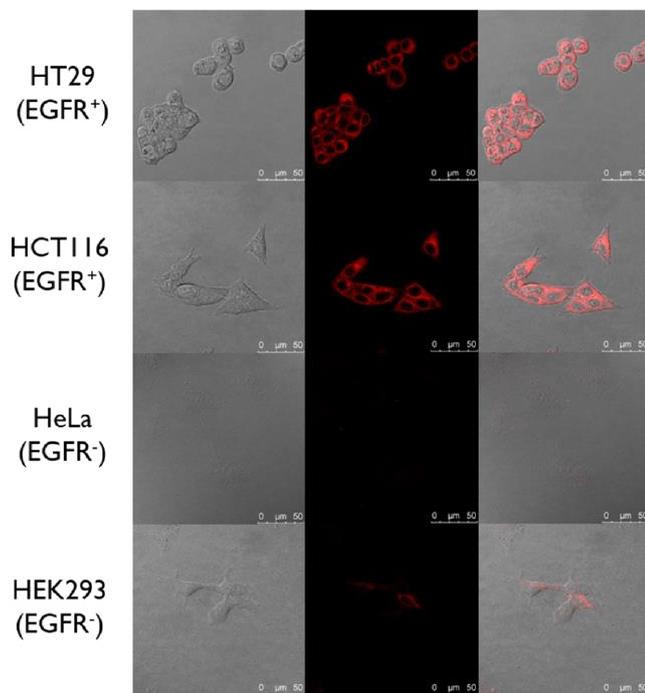
De la même façon que pour l'IEDDA, la réaction de NEDDA ne nécessite pas l'emploi de catalyseurs métalliques, il est donc possible d'étendre son champ d'application au marquage de peptides à l'aide de complexes métalliques. L'équipe de Ng a développé en 2021<sup>218</sup> une stratégie de cyclisation/fonctionnalisation de peptides consistant en l'alkylation de deux cystéines terminales **II-86** par le dialkylant portant un cyclopentadiène **II-87** pour la cyclisation, puis la fonctionnalisation par une phtalocyanine portant un maléimide **II-89**, via une réaction de Diels-Alder (Schéma 127). Cette séquence réactionnelle a été effectuée sur trois ligands peptidiques (EBP, RPM et TCP-1) pouvant présenter des applications potentielles dans le carcinome colorectal. Les trois peptides marqués **II-90** ont été obtenus avec des rendements modérés de 20 à 26% sur les deux étapes.



**Schéma 127.** Stratégie de fonctionnalisation de peptide par un dérivé de Zn-phtalocyanine

L'objectif initial de cette publication étant la conception de bioconjugués utilisables en photothérapie oncologique, la sélectivité des ligands formés par cette stratégie pour leur récepteur a tout d'abord été évaluée. Pour cela, **II-90a** a été sélectionné pour la suite de l'étude, le peptide EBP au sein de cette structure étant un ligand connu du « Epidermal Growth Factor Receptor » (EGFR), un récepteur surexprimé à la surface de nombreuses cellules cancéreuses. Les phtalocyanines, en plus de permettre la production photocatalysée d'oxygène singulet pour des applications en thérapie photodynamique, sont également des fluorophores de choix avec une émission dans le rouge lointain. Le rendement quantique de fluorescence reste ici inchangé entre le maléimide de départ **II-89** ( $\Phi_F = 0.21$ ) et le peptide cyclisé **II-90a** ( $\Phi_F = 0.19$ ), tout comme le maximum d'émission mesuré pour ces deux composés à 700 nm. **II-90a** a ensuite été incubé sur cellules HT-29 et HCT-116 exprimant le récepteur EGFR, et également sur cellules HeLa et HEK293, comme contrôle négatif. Comme observé en Figure 90, un signal de fluorescence d'intensité plus élevée peut être observé pour les

deux premières lignées par rapport aux contrôles négatifs tout en montrant une colocalisation parfaite avec les cellules visibles par simple transmission.



**Figure 90.** Images obtenues par microscopie en transmission, confocale en fluorescence et images combinées de **II-90a** sur cellules cancéreuses

## 1.6. Bilan bibliographique et perspectives associés

Cette étude bibliographique permet de mettre en évidence le manque de réactions non catalysées de marquage de peptide pour des applications en imagerie comme indiqué dans le Tableau 21. Les principales alternatives à la réaction de CuAAC restent les réactions de SPAAC et IEDDA, bien que ces deux cycloadditions nécessitent l'emploi de réactifs de départ difficile d'accès, coûteux, fortement encombrés et lipophiles (i.e. cyclooctynes, *trans*-cyclooctènes). L'emploi de composés mésoioniques comme les sydnones reste encore sous-développé pour les peptides, avec seulement deux exemples décrits. Cette réaction pourrait se heurter aux mêmes inconvénients que les deux cycloadditions citées précédemment, car elle nécessite les mêmes partenaires réactionnels. Enfin, bien que la plus rarement utilisée, la réaction de NEDDA représente un bon candidat de réaction click non métallo-catalysée pour la bioconjugaison. Sa cinétique peut être modulée par le choix des partenaires diène/diénophile, dont les réactivités sont fortement dépendantes de leurs structures. De plus, il est connu que cette réaction peut être accélérée en milieu aqueux par effet hydrophobique.<sup>219</sup> Le groupe de Read de Alaniz a notamment décrit ce phénomène sur un exemple de bioconjugaison par réaction de Diels-Alder entre un peptide cytotoxique lié au maléimide et un anticorps lié à différents diènes cycliques.<sup>220</sup> Une augmentation de deux à trois ordres de grandeur a été observée sur les constantes cinétiques entre les cycloadditions effectuées dans le chloroforme versus dans l'eau. En revanche, peu de partenaires réactionnels à la fois hautement réactifs et stables ont été décrits pour de telles applications. En effet, dans la quasi-totalité des applications de cette réaction en bioconjugaison, un dérivé de maléimide a été utilisé comme diénophile.

	Cycloadditions (3+2)		Cycloadditions (4+2)	
	SPAAC	Mesoionic	IEDDA	NEDDA
Partenaires	Azoture + Alcyne contraint	Sydnone + Alcyne contraint	Tétrazine + Alcène contraint (ou Alcyne contraint)	Maléimide + Diène
Catalyse	Non	Non	Non	Non
Etapes de synthèse précurseurs	BCN (4) DBCO (7)	BCN (4) DBCO (7)	BCN (4) TCO (3) s-TCO (3)	Maléimide (1) Diène (0-1)
Stabilité réactifs	Thiol sur alcyne	Thiol sur alcyne	Isomérisation TCO Thiol sur alcyne	Thiol sur maléimide
Défauts	Taille Coût Lipophilie	Taille Coût Lipophilie	Taille Coût Lipophilie Stabilité diazine	Cinétique Diversité faible
Nombre d'exemples	11	2	10	4
Plusieurs isomères ?	Oui (2)	Oui (2)	Oui (> 2)	Oui (4)
Cinétique maximale	$10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Excès partenaire en $^{18}\text{F}$	10 à 100 equiv.	~ 100 equiv.	2 à 20 equiv.	/
$A_m$ (GBq/ $\mu\text{mol}$ )	1 à 70	50	70 à 170	/

**Tableau 21.** Bilan bibliographique des réactions de cycloadditions comme réactions de bioconjugaison sur peptides

Ainsi, le développement de nouveaux diènes et diénophiles capables de réagir rapidement dans une cycloaddition NEDDA sans utilisation d'un catalyseur et en conditions de bioconjugaison, représente à l'heure actuelle un sujet de recherche d'intérêt, notamment en radiomarquage au fluor-18 pour lequel aucun exemple n'est référencé dans la littérature.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la réaction de thia-Diels-Alder entre un composé diénique et un dithioester en tant que diénophile. D'abord nous avons développé cette réaction pour le marquage de peptide à l'aide de fluor-18 pour une

application en TEP *in vivo*, ou à l'aide de fluorophores pour l'imagerie optique *in cellulo* (Schéma 128).

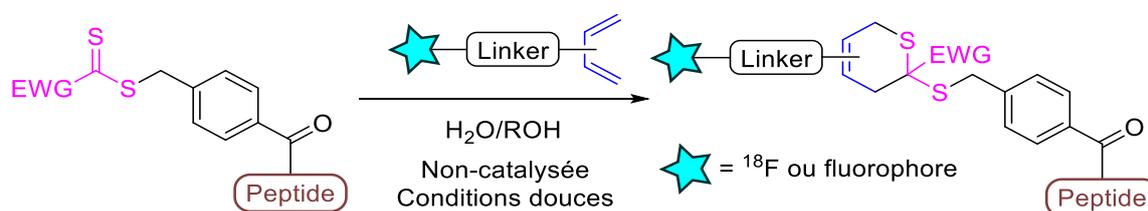


Schéma 128. Stratégie de marquage de peptides par une réaction de thia-Diels-Alder

## 2. Rappels bibliographiques sur les dithioesters

### 2.1. Propriétés et synthèse

La substitution de l'atome d'oxygène d'un carbonyle par un atome de soufre induit une modification importante des propriétés de la double liaison concernée (Figure 91). En effet, le faible recouvrement orbitalaire entre l'orbitale 3p diffuse du soufre et l'orbitale 2p du carbone conduit à une diminution de l'énergie de la BV ( $\pi^*$ ), ainsi qu'une augmentation de celle de la HO (n) et HO-1 ( $\pi$ ). Ces deux modifications entraînent une augmentation importante de la réactivité des dérivés thiocarbonylés par rapport à leurs équivalents oxygénés. De ce fait, les thioaldéhydes et thiocétone sont dans leur majorité trop instables pour être isolées et leur utilisation en synthèse reste limitée malgré leur riche réactivité, dont notamment en tant que diénophiles dans la réaction de Diels-Alder à demande normale (Schéma 129).<sup>221</sup>

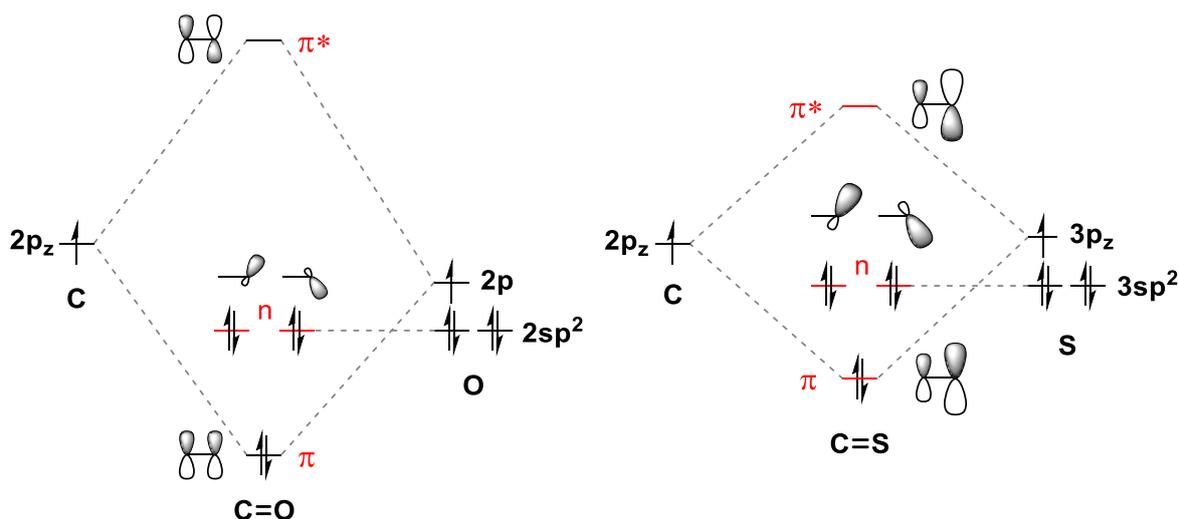


Figure 91. Diagrammes orbitaux des fonctions C=O et C=S

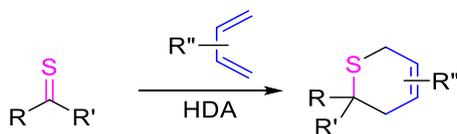
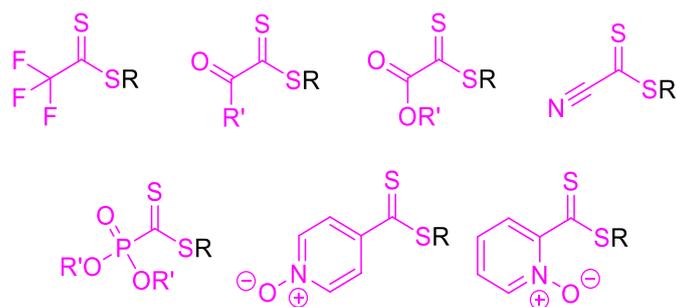
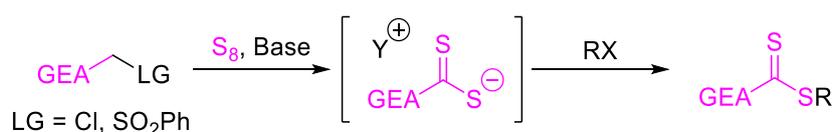


Schéma 129. Réaction de thia-Diels-Alder avec un diéophile thiocarbonyle

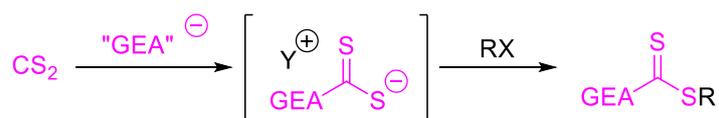
Parmi les composés contenant un motif thiocarbonyl, les dithioesters représentent une famille de dérivés moins réactifs mais plus stables que les thioaldéhydes et les thiocétones. Une partie de cette réactivité peut néanmoins être retrouvée si le motif dithioester porte un groupement électroattracteur permettant l'abaissement de l'orbitale BV. Différents groupements électroattracteurs (trifluorométhyle, cétone, ester, nitrile, phosphoryle, pyridyle *N*-oxyde) ont ainsi été utilisés de façon à moduler la stabilité et la réactivité des dithioesters associés (Figure 92). Ces différentes structures ont pu être obtenues principalement selon deux stratégies de synthèse. Une première méthode s'appuie sur l'oxydation du pont méthylène substitué par un groupement électroattracteur par action d'une base et de soufre élémentaire pour donner *in situ* le sel dithiocarboxylate correspondant qui mènera après S-alkylation au dithioester désiré (Schéma 130).<sup>222,223</sup> Ce sel peut également être obtenu par attaque nucléophile d'un anion sur le disulfure de carbone (Schéma 131).<sup>224-226</sup>



**Figure 92.** Structures de différents dithioesters appauvris

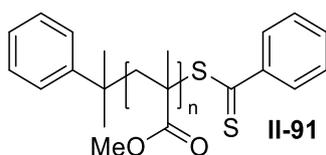


**Schéma 130.** Synthèse de dithioester par oxydation à l'aide de soufre élémentaire



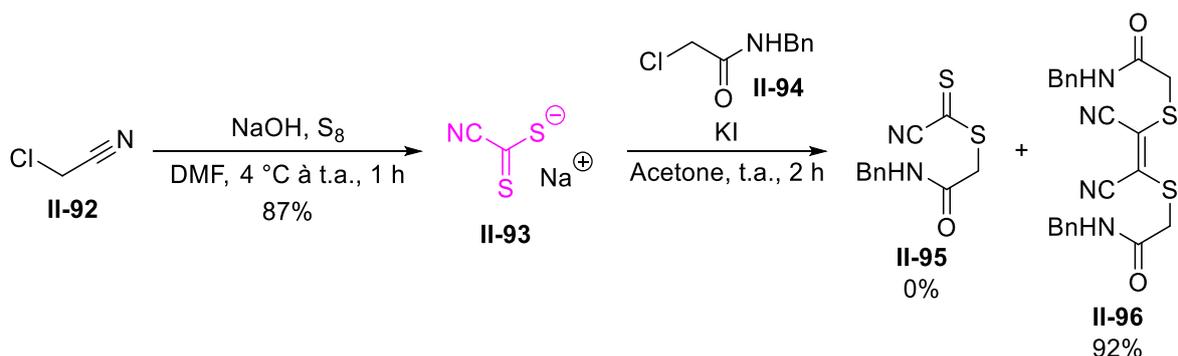
**Schéma 131.** Synthèse de dithioester par addition nucléophile sur  $CS_2$

Comme observé dans le diagramme orbitalaire de la liaison  $C=S$  (Figure 91), les dithioesters possèdent également deux bandes d'absorption caractéristiques autour de 330 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) et de 500 nm ( $n \rightarrow \pi^*$ ). Ces deux bandes offrent des possibilités idéales de suivis de réaction par spectrophotométrie, peu de composés absorbant autour de ces deux longueurs d'onde. De plus, la transition  $n \rightarrow \pi^*$  se trouvant dans le domaine du visible, les dithioesters possèdent également une couleur caractéristique (entre le rouge et le rose) qui permet un suivi visuel de l'avancée des différentes réactions qu'ils peuvent subir. Le groupe de Yang a notamment utilisé cette propriété pour l'évaluation de la stabilité thermique d'un polymère PMMA **II-91** modifié par un motif dithioester.<sup>227</sup> Dans cet exemple, la couleur rose/rouge du dithioester de départ disparaît entièrement après décomposition thermique à 120 °C pendant 30 heures (Figure 93).



**Figure 93.** Structure du polymère PMMA et aspect (en solution ou précipité) avant (a) ou après (b) chauffage à 120 °C pendant 30 heures

Parmi les dithioesters appauvris cités plus haut (Figure 92), ceux substitués par un nitrile<sup>228</sup>, un trifluorométhyle<sup>229</sup>, ou un ester carboxylique<sup>230,231</sup> ont été d'abord utilisés en tant que diénophiles dans des études méthodologiques, dont certaines visant des composés potentiellement bioactifs. C'est également le cas pour les pyridyl-dithioesters qui deviennent des diénophiles réactifs après activation sous forme pyridinium par un acide de Lewis ou de Brønsted, ou alors sous forme de dérivés *N*-oxyde.<sup>232</sup> Ensuite, certains de ces dithioesters ont été appliqués également en chimie des matériaux et polymères.<sup>233-235</sup> Ayant une grande réactivité en tant que diénophiles, ces dithioesters sont également très réactifs vis-à-vis de nucléophiles. Des travaux préliminaires menés au laboratoire<sup>236</sup> ont montré l'impossibilité d'utilisation des cyanodithioesters pour cette étude, ces derniers « dimérisant » à température ambiante pour donner des 2,3-bis(alkylthio)fumaronitriles comme **II-96** (Schéma 132).<sup>237</sup> Les trifluorométhyldithioesters avaient également été testés, mais ils présentent une trop grande électrophilie qui rend leur emploi incompatible dans l'eau notamment. C'est pourquoi par la suite seuls les phosphonodithioesters ont été sélectionnés pour notre étude.



**Schéma 132.** Travaux préliminaires sur les cyanodithioesters

## 2.2. Les phosphonodithioesters

Les phosphonodithioesters sont des dithioesters activés étudiés dans la littérature notamment dans des réactions de cycloaddition (en tant que diénophiles ou dipolarophiles), ou en tant qu'électrophiles, pour des diverses applications comme la synthèse d'analogues de molécules bioactives, la modification de biomolécules, ou la chimie des polymères et matériaux. Nous avons sélectionné ci-après les principales voies de synthèses des phosphonodithioesters et quelques exemples significatifs de leur réactivité pour la suite de notre étude.

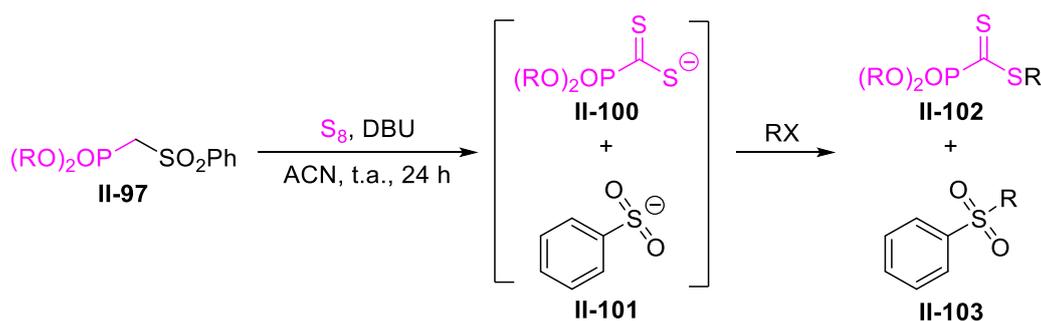
### 2.2.1. Synthèse des phosphonodithioesters

Dans la littérature, l'obtention des phosphonodithioesters est principalement effectuée selon deux méthodes distinctes. La première méthode pouvant être employée utilise le soufre élémentaire et un pont méthylène substitué par un groupement électroattracteur d'une part et un groupe partant d'autre part (halogène ou sulfone **II-97**). Cette stratégie a notamment été employée pour la synthèse d'un phosphonodithioester **II-99** avec un bon rendement de 67% par le groupe de Masson (Schéma 133).<sup>222</sup>



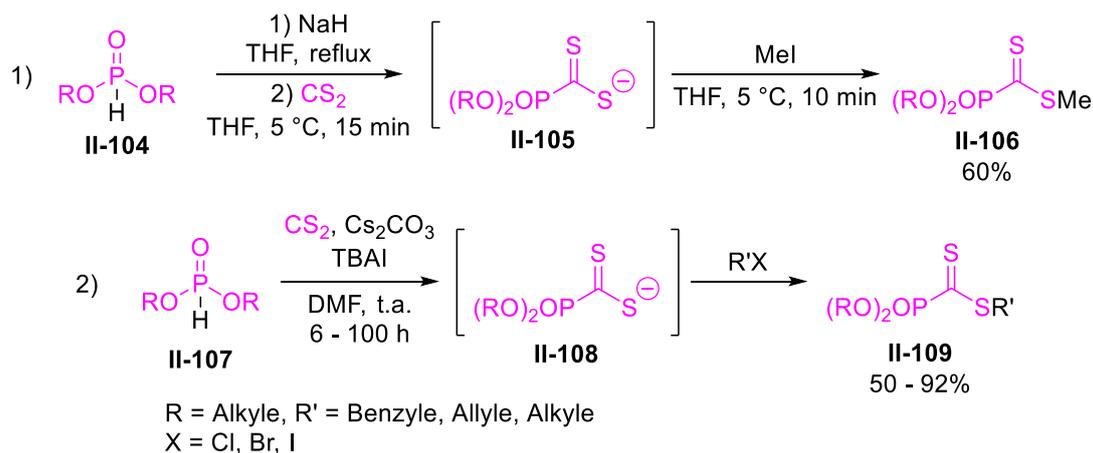
**Schéma 133.** Synthèse d'un phosphonodithioester à partir d'un phosphonate sulfonyle

Cette stratégie présente cependant un défaut important provenant de l'utilisation de dérivés sulfonylés. En effet, la formation de l'intermédiaire anionique dithiocarboxylate **II-100** conduit nécessairement en parallèle à la formation du benzenesulfinate **II-101** lui aussi nucléophile (Schéma 134). En employant cette stratégie sur nos dérivés peptidiques, une partie importante de notre agent alkylant (*i.e.* notre peptide) réagira donc avec ce benzenesulfinate formant un produit secondaire **II-103** non désiré qu'il faudra éliminer, consommant ainsi du peptide inutilement.



**Schéma 134.** Réaction secondaire causée par le benzenesulfinate

La seconde méthode s'appuie quant à elle sur le caractère électrophile du disulfure de carbone sur lequel peut s'additionner un nucléophile anionique. Cette réaction donne intermédiairement le sel de dithiocarboxylate désiré qui peut être *S*-alkylé par différents dérivés halogénés. Cette stratégie a notamment été employée pour la synthèse de dithioesters substitués par un groupement phosphonate par Grisley en 1961 (Schéma 135, eq. 1).<sup>238</sup> Dans cet exemple, le dialcyle phosphite de départ **II-104** est déprotoné par l'hydrure de sodium et donne, après addition sur CS<sub>2</sub>, le sel correspondant **II-105**. Ce dernier n'est ici pas isolé mais réagit directement sur l'iodure de méthyle pour donner le dithioester désiré **II-106** avec 60% de rendement. Par la suite, le groupe Salvatore a modifié ces conditions en substituant notamment le NaH par le Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pour obtenir des conditions plus douces (Schéma 135, eq. 2).<sup>224</sup> L'alkylation du sel intermédiaire **II-108** avec divers agents alkylant a conduit aux dithioesters **II-109** correspondant avec des rendements de 50 à 92%.

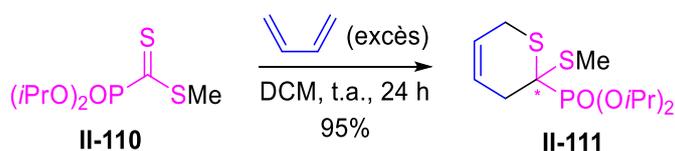


**Schéma 135.** Synthèse d'un phosphonodithioester à partir du phosphite et du disulfure de carbone

### 2.2.2. Les phosphonodithioesters en tant que diénophile

L'utilisation de phosphonodithioesters comme hétérodiénophiles dans la réaction de Diels-Alder a été initiée et développée par Masson et collaborateurs.<sup>230,239-241</sup> Leurs réactivités avec différents diènes non-activés ou activés ont été étudiées, leur activation par des acides de Lewis (achiraux et chiraux), ainsi que leurs applications pour la synthèse de molécules potentiellement bioactives (e.g. analogues de l'acide shikimique, thiasucres).

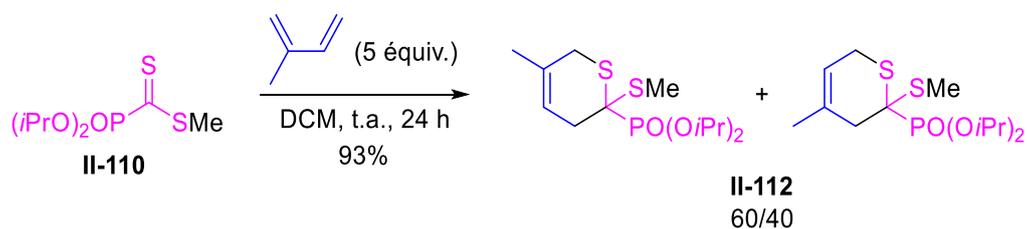
Dans une première étude réalisée en 2000, les auteurs ont tout d'abord employé le butadiène pour obtenir les adduits **II-111** correspondant avec un excellent rendement de 95% après 24 heures de réaction à température ambiante (Schéma 136).<sup>239</sup>



**Schéma 136.** Réaction de thia-Diels-Alder avec le butadiène gazeux en excès

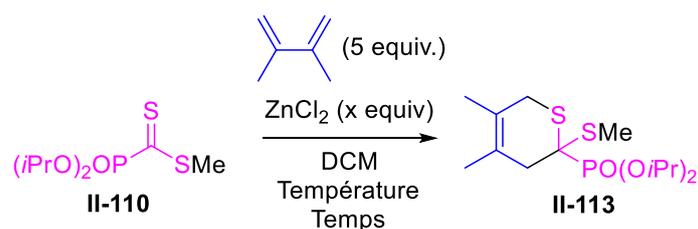
Lorsqu'un diène dissymétrique comme le 2-méthyl-butadiène a été employé, les adduits **II-112** ont alors été obtenus sous la forme de deux régioisomères dans un ratio 60/40 (Schéma 137). La régiosélectivité obtenue dans cette réaction est faible rapportée aux règles établies, mais reste en faveur du dérivé de 5-méthyl-thiopyrane-2-phosphonate. Ce résultat semble cohérent au vu des résultats observés dans la

littérature sur plusieurs dithioesters substitués par différents groupements mésomères attracteurs (CO<sub>2</sub>R, COR, CN).<sup>231,242</sup>



**Schéma 137.** Régiosélectivité observée pour la réaction de thia-Diels-Alder sur phosphonodithioesters

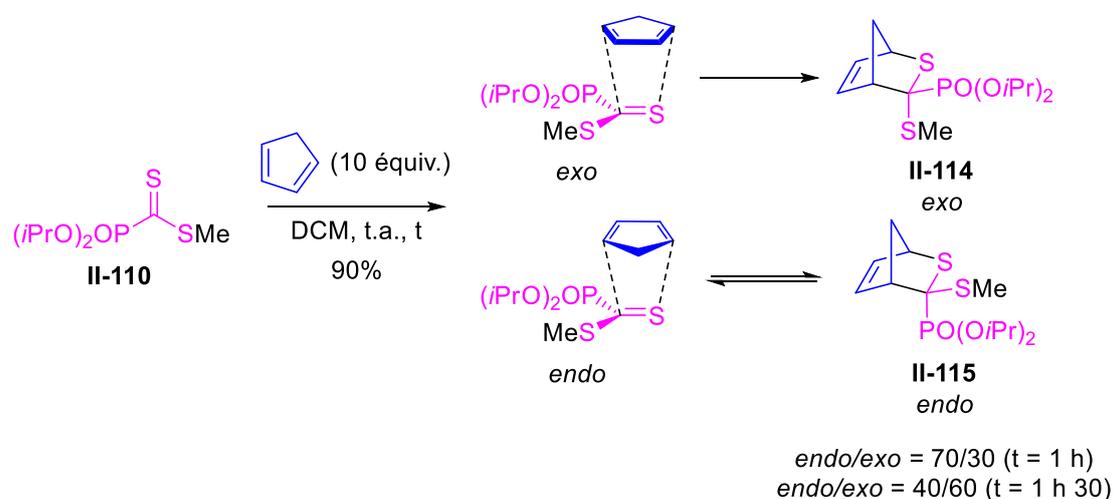
L'influence de la température sur la cinétique de cette réaction a également été évaluée. Le phosphonodithioester **II-110** a été mis en réaction avec un excès de 5 équivalents de 2,3-diméthyl-butadiène et a été transformé quantitativement en cycloadduit **II-113** attendu après 24 heures à température ambiante, alors que 6 heures ont été suffisantes à 50 °C (Tableau 22). Les rendements en produit isolé ont été similaires dans les deux cas. Finalement, l'utilisation des acides de Lewis comme catalyseurs dans cette réaction a également été envisagée pour obtenir de meilleures cinétiques à température ambiante. L'emploi de seulement 10 %mol de ZnCl<sub>2</sub> a tout d'abord permis de retrouver la cinétique observée à 50 °C avec un rendement de 97%. Lorsqu'un équivalent de ZnCl<sub>2</sub> a été utilisé, seulement 45 min ont été nécessaires pour atteindre la complétion avec un rendement de 98%.



Entrée	ZnCl <sub>2</sub> (équiv.)	Température	Temps	Rendement
1	-	t.a.	24 h	93%
2	-	50 °C	6 h	95%
3	0,1	t.a.	5 h	97%
4	1	t.a.	45 min	98%

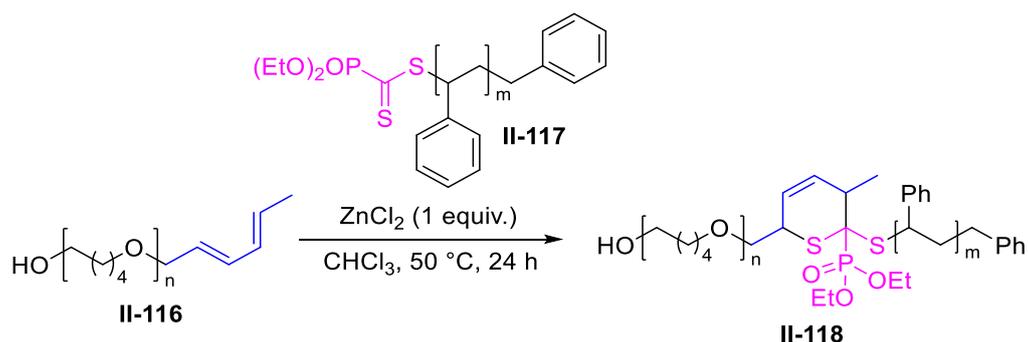
**Tableau 22.** Influence de la température et de ZnCl<sub>2</sub> sur la cinétique de la réaction de thia-Diels-Alder

Un diène très réactif, le cyclopentadiène, a également été employé. Dans ce cas, comme attendu, une heure seulement a été nécessaire pour atteindre une conversion complète vers les adduits isolés avec 90% de rendement. Ces adduits sont obtenus ici sous la forme de deux diastéréoisomères **II-114** et **II-115** issus des approches *exo* ou *endo* du cyclopentadiène par rapport au groupement phosphonate. Les auteurs ont observé qu'après une heure de réaction, le ratio *endo/exo* était de 70/30, alors qu'en prolongeant le temps de réaction d'une demi-heure, il était de 40/60. Cette observation semble mettre en évidence l'existence d'un équilibre par rétro-thia-Diels-Alder entre le produit cinétique *endo*, et le produit thermodynamique *exo* (Schéma 138).



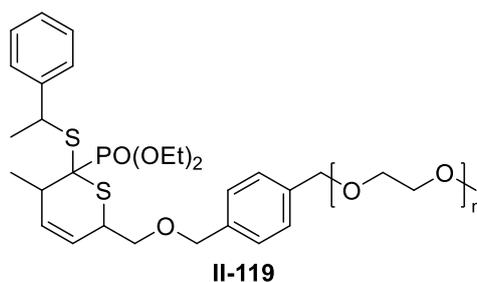
**Schéma 138.** Réaction de thia-Diels-Alder entre le cyclopentadiène et le phosphonodithioester

Inspiré par les travaux mentionnés précédemment, le groupe de Barner-Kowollik a employé pour la première fois en 2008 la réaction de thia-Diels-Alder avec des phosphonodithioesters en chimie des polymères, pour la synthèse de copolymères à blocs (Schéma 139).<sup>243</sup> Dans cet exemple, la réaction a été effectuée entre un diène acyclique **II-116** dérivé de l'alcool sorbique portant une chaîne poly( $\epsilon$ -caprolactone) et un polystyrène **II-117** terminé par un motif phosphonodithioester, obtenu préalablement par polymérisation RAFT.<sup>244</sup> La réaction a eu lieu dans le chloroforme et en présence d'un équivalent de  $ZnCl_2$ , pour obtenir une conversion complète vers **II-118** après 24 heures à 50 °C.

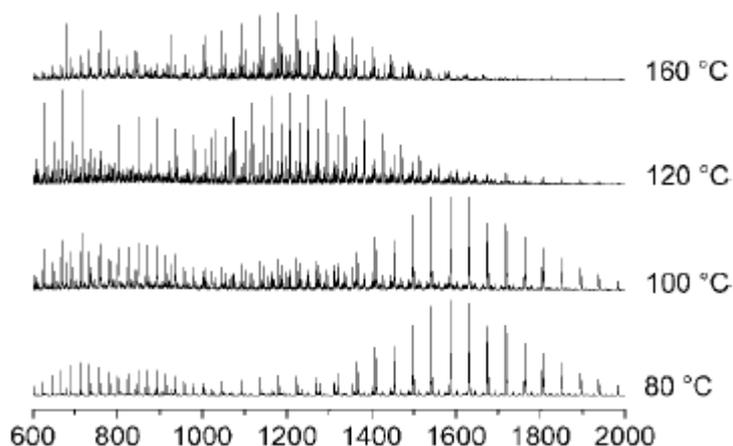


**Schéma 139.** Synthèse de copolymères à blocs par réaction de thia-Diels-Alder catalysée au  $\text{ZnCl}_2$

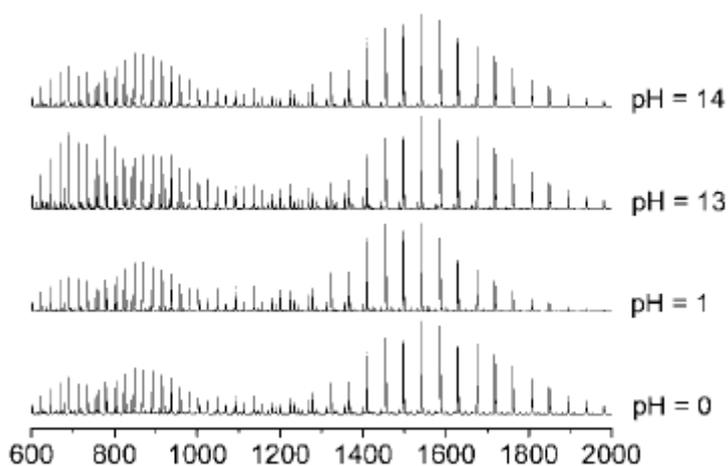
Suite à ces travaux, le groupe de Barner-Kowollik associe pour la première fois en 2008 la réaction de thia-Diels-Alder avec des dithioesters appauvris (tel un phosphonodithioester) au concept de chimie click.<sup>234a</sup> Dans ce contexte, mise à part la facilité de mise en place et les conditions réactionnelles douces, les auteurs ont également étudié la stabilité chimique des adduits formés à partir d'un phosphonodithioester par cette réaction de thia-Diels-Alder sur polymère (Figure 94). Ces adduits ont tout d'abord été chauffés dans le toluène pendant 24 heures à des températures allant de 80 °C à 160 °C avant d'être analysés par spectrométrie de masse (Figure 95). Les adduits ont démontré une stabilité parfaite à 80 °C, les premiers phénomènes de dégradations, notamment dû à la rétro-Diels-Alder, n'ont été observés qu'à partir de 100 °C. La stabilité des adduits vis-à-vis de leur hydrolyse acide ou basique a été ensuite examinée. Le cycloadduit **II-119** a été placé en solution aqueuse dans quatre conditions extrêmes de pH (0, 1, 13 et 14) pendant 24 heures avant d'analyser en masse les produits obtenus (Figure 96). Dans ces conditions acides ou basiques fortes, aucune hydrolyse n'a été observée, démontrant la robustesse de tels systèmes.



**Figure 94.** Structure des adduits étudiés en stabilité



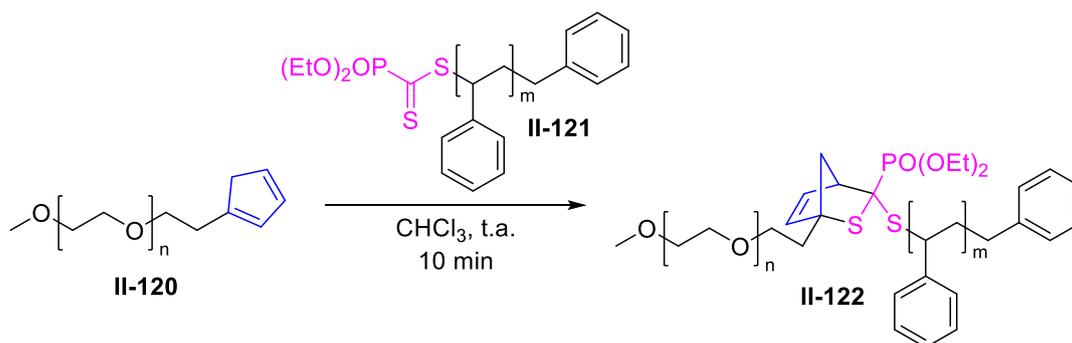
**Figure 95.** Stabilité thermique des adduits **II-119**



**Figure 96.** Stabilité vis-à-vis de l'hydrolyse des adduits **II-119**

Par la suite, l'équipe de Barner-Kowollik a illustré par de nombreux exemples les possibilités de cette cycloaddition comme réaction de chimie click en chimie des matériaux et/ou en bioconjugaison.

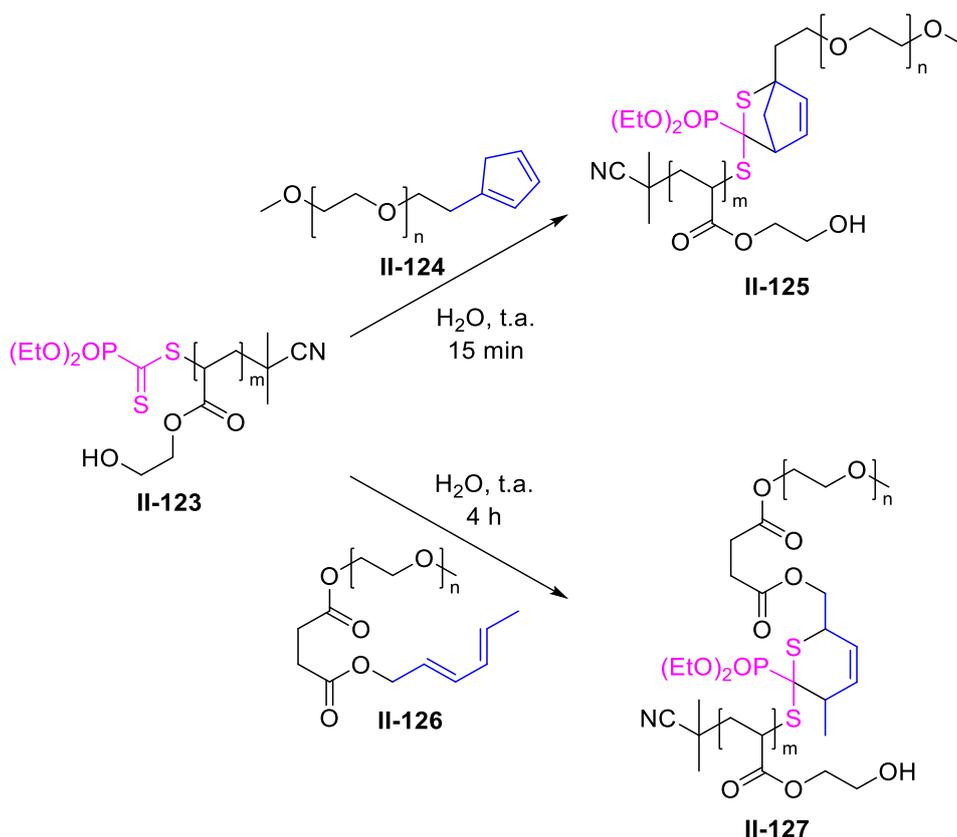
En 2009, l'équipe de Barner-Kowollik décrit l'utilisation de dérivés du cyclopentadiène **II-120** pour la synthèse de copolymères à blocs (Schéma 140).<sup>245</sup> Grâce à la réactivité élevée de ce diène, comparée à celle décrite précédemment pour le diène acyclique (Schéma 139), le produit **II-122** est ici obtenu dans le chloroforme après seulement dix minutes de réaction, à température ambiante, sans catalyseur.



**Schéma 140.** Synthèse de copolymères à blocs par réaction de thia-Diels-Alder avec le cyclopentadiène

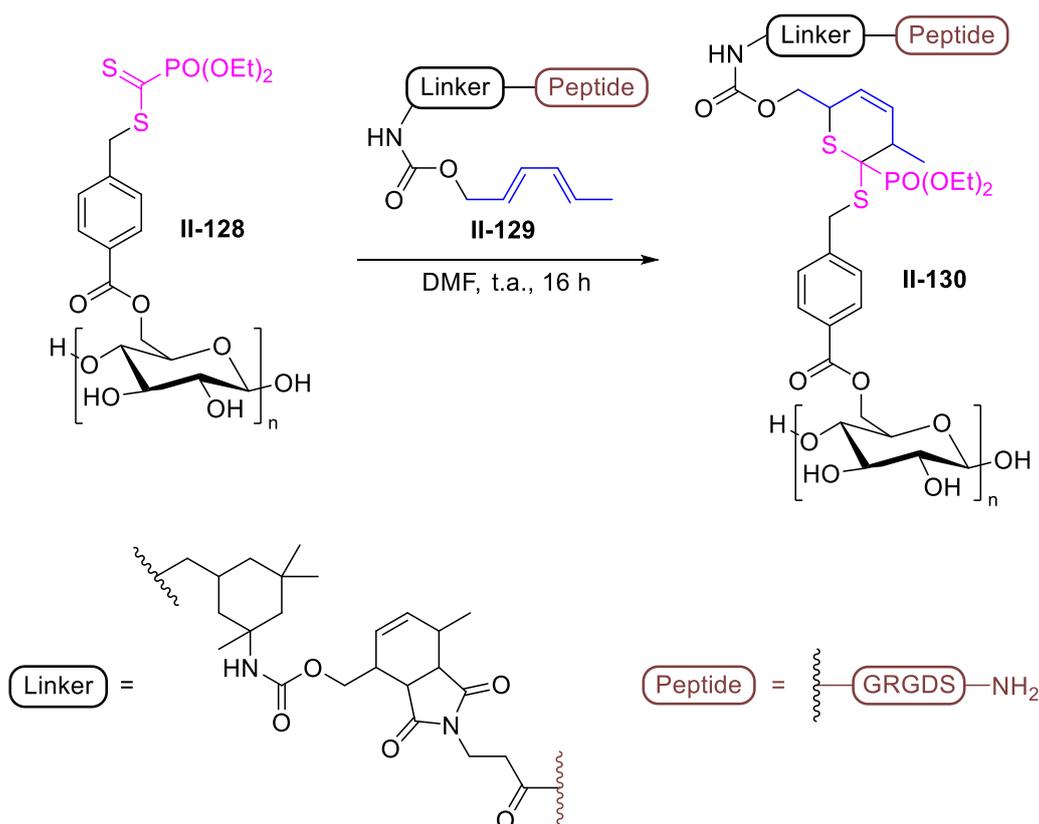
La réversibilité de la réaction d'un phosphonodithioester avec le cyclopentadiène observée auparavant (rétro-thia-Diels-Alder),<sup>239</sup> a également été exploitée par le groupe de Barner-Kowollik en 2014 et appliquée à l'obtention de polymères autoréparables par chauffage à 120 °C et retour à 50 °C.<sup>246</sup>

Le même groupe a ensuite envisagé l'utilisation de solvants aqueux pour accélérer cette réaction par effet hydrophobique de l'eau, toujours dans le cadre de la synthèse de copolymères à blocs (Schéma 141).<sup>247</sup> Pour le cyclopentadiène **II-124**, aucune différence n'a pu être observée entre un solvant aqueux et le chloroforme avec une complétion atteinte après 10-15 min dans les deux cas. En revanche, une conversion totale peut être observée après seulement quatre heures de réaction à température ambiante pour le diène acyclique **II-126** dérivé d'alcool sorbique là où 24 heures étaient nécessaires en solvant organique même à 50 °C et en présence d'un équivalent de ZnCl<sub>2</sub>.



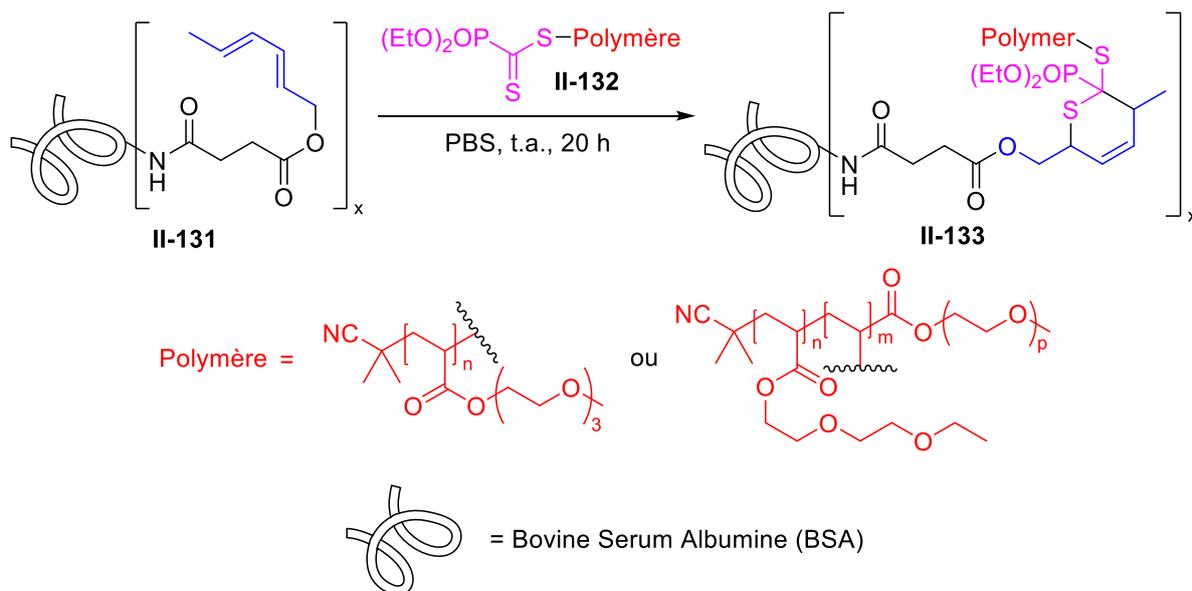
**Schéma 141.** Synthèse de copolymères à blocs en solvant aqueux par réaction de thia-Diels-Alder

Les auteurs ont appliqué ensuite pour la première fois cette réaction dans un contexte de bioconjugaison, pour la ligation d'un peptide dérivé de RGD à un polymère de cellulose (Schéma 142).<sup>248</sup> Le peptide **II-129** a été fonctionnalisé par le diène, tandis que le dithioester a été fixé sur la cellulose pour former **II-128**. Cette réaction est effectuée dans le DMF à température ambiante et permet d'obtenir le peptide immobilisé sur cellulose **II-130** après 16 heures de réaction. Cet exemple met ici en évidence la compatibilité entre le dithioester et certains résidus peptidiques (arginine, acide aspartique et sérine) dans un contexte de bioconjugaison.



**Schéma 142.** Fonctionnalisation de cellulose par un peptide à l'aide d'une réaction de thia-Diels-Alder

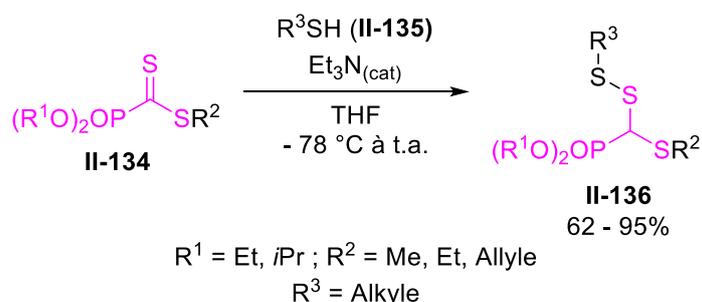
Enfin, en 2020, pendant la période de travaux de cette thèse, le groupe de Barner-Kowollik a publié l'utilisation de la réaction de Diels-Alder avec des phosphonodithioesters pour la modification d'une protéine, l'albumine de sérum bovin (BSA), par différentes chaînes polymères (Schéma 143).<sup>249</sup> Le diène est ici introduit par acylation des lysines de surface de la BSA (**II-131**), tandis que le dithioester porte lui la chaîne polymère (**II-132**). La réaction de ligation a été effectuée en conditions douces, à température ambiante et à un pH de 6 pour finalement introduire jusqu'à 7 chaînes polymères sur la BSA après 20 heures de réaction<sup>[d1]</sup>. Comme précédemment, cet exemple se situe dans un contexte de bioconjugaison sur substrat complexe (protéine).



**Schéma 143.** Fonctionnalisation de la BSA par différentes chaînes polymères à l'aide d'une réaction de thia-Diels-Alder

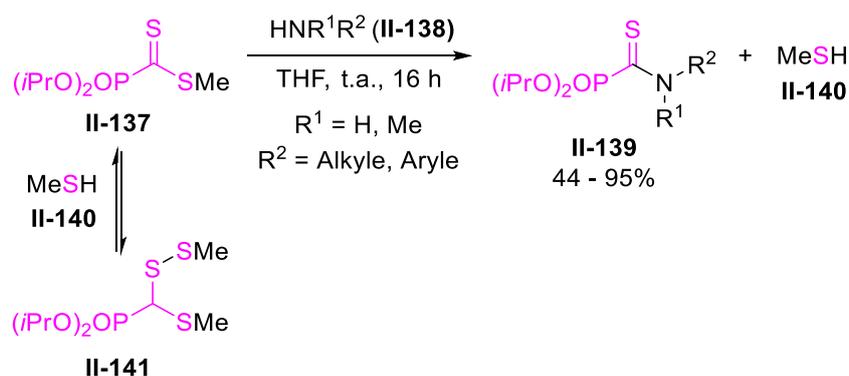
### 2.2.3. Réactivité des phosphonodithioesters vis-à-vis des nucléophiles

Comme précisé au paragraphe §1.2, de nombreux nucléophiles peuvent être présents lors des réactions de bioconjugaison et, en particulier dans le cas des peptides, les thiols et les amines qui font partie de leur structure. Certaines études ont décrit la sensibilité des dithioesters vis-à-vis de ces fonctions. C'est le cas notamment des thiols dont la réaction sur dithioesters appauvris a été décrite pour la première fois par le groupe de Masson en 1992.<sup>250</sup> Les thiols **II-135** sont en effet capables de réagir avec les phosphonodithioesters **II-134** à basse température et en présence d'une quantité catalytique de base par attaque thiophile pour donner les produits **II-136** correspondants avec des ponts disulfures avec de très bons rendements (Schéma 144).



**Schéma 144.** Attaque thiophile de thiols sur des phosphonodithioesters

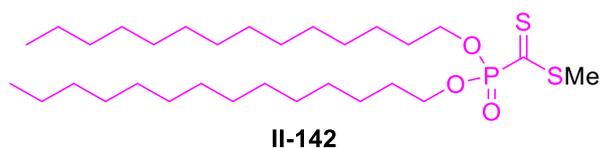
L'attaque d'amines primaires ou secondaires sur des dithioesters appauvris représente également une réaction secondaire possible lors d'étapes de bioconjugaison sur peptides. Cette réaction a été décrite par le groupe de Masson en 1994 à partir du phosphonodithioester **II-137** qui, mis en présence d'amines **II-138** primaires ou secondaires variées, a conduit aux phosphonothioamides **II-139** correspondants avec de bons rendements (Schéma 145).<sup>251</sup> Bien que la disparition de la coloration rouge soit quasi-instantanée indiquant une réaction extrêmement rapide, les auteurs ont montré que lorsque la réaction était stoppée immédiatement, le dérivé **II-141** issu de l'attaque thiophile du méthylmercaptan **II-140** relargué dans le milieu pouvait être isolé à hauteur de 30%. Cette réaction secondaire étant réversible et le méthylmercaptan étant volatile, son élimination par évaporation permet d'obtenir une conversion complète après 16 heures de réaction.



**Schéma 145.** Formation de thioamide par attaque nucléophile d'une amine sur un phosphonodithioester

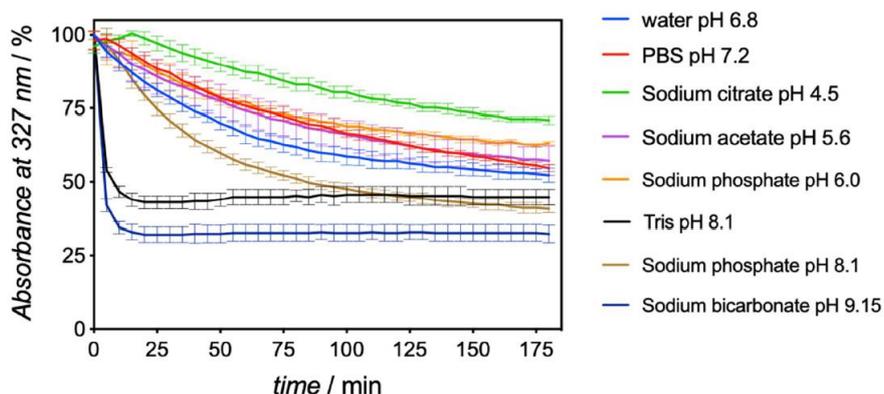
Cette réaction de thioacylation d'amines par un phosphonodithioester a été par la suite employée pour diverses applications allant de la modification de biomolécules telles que les aminoacides, peptides<sup>252</sup> ou le chitosane,<sup>253</sup> jusqu'à la synthèse d'hétérocycles (*N,S*)-phosphorylés.<sup>254</sup>

Très récemment, en 2021, le groupe de Jaffrès a décrit cette thioacylation d'amines comme une réaction click lors de son utilisation pour la modification rapide ( $k = 8 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) de liposomes en solution aqueuse, à partir de phosphonodithioesters lipidiques comme **II-142** (Figure 97).<sup>255</sup>



**Figure 97.** Phosphonodithioester lipidique employé par Jaffrès *et al.*

La plupart de ces réactions étant réalisées en présence ou dans l'eau, l'hydrolyse des dithioesters doit également être envisagée. Cette réaction a été étudiée en détails par le groupe de Barner-Kowollik en 2020 sur des dérivés de phosphonodithioesters (Figure 98).<sup>249</sup> Plusieurs solutions tampons ont été employées avec une échelle de pH allant de 4,5 à 9,15 et l'absorbance du dithioester à 327 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) a été suivie au cours du temps. Ces dithioesters présentent une cinétique de dégradation par hydrolyse directement liée au pH de la solution tampon employée. La cinétique la plus rapide peut être observée dans le tampon  $\text{NaHCO}_3$  (pH = 9,15) tandis qu'une dégradation plus lente est observée dans le tampon citrate (pH = 4,5). De plus, l'utilisation d'un tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane (tris) à pH = 8,1, induit également une dégradation extrêmement rapide du dithioester mais cette dernière doit être en grande partie due à l'amine primaire présente dans la structure du tris réagissant par thioacylation.



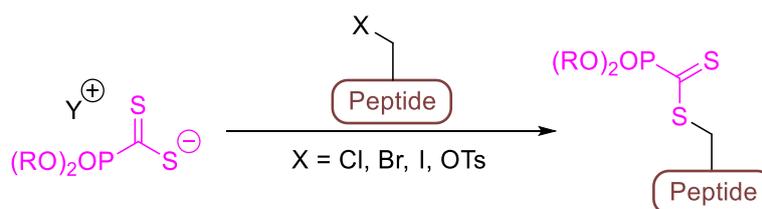
**Figure 98.** Stabilité d'un phosphonodithioester en solution tampon

# CHAPITRE 5.

## MARQUAGE DE PEPTIDES A L'AIDE D'OUTILS D'IMAGERIE

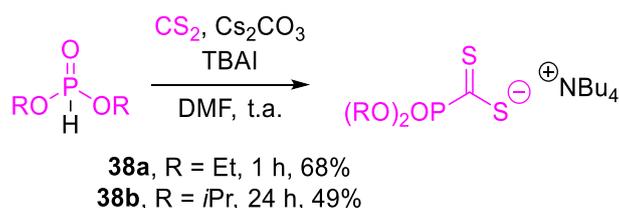
### 1. Introduction du motif phosphonodithioester sur peptide

Nous nous sommes ainsi intéressés dans un premier temps au développement d'une méthode d'introduction de phosphonodithioesters sur peptide. Pour ce faire nous nous sommes tournés vers l'utilisation de sels de dithiocarboxylate dont l'alkylation par des dérivés halogénés est une étape efficace et qui à l'aide des précurseurs adéquats représente une stratégie simple et directe de fonctionnalisation de peptides par des dithioesters (Schéma 146).



**Schéma 146.** Stratégie de synthèse pour la fonctionnalisation de peptides par un dithioester

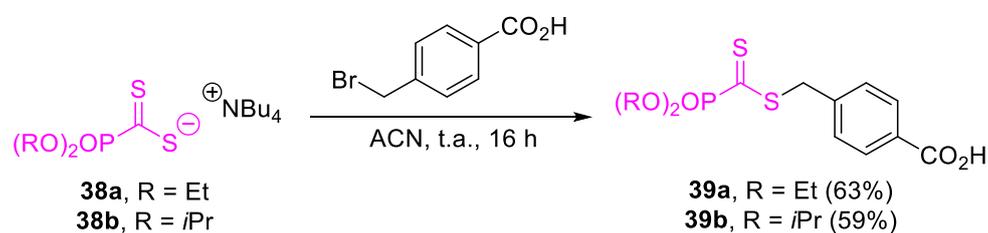
Dans notre cas, nous avons dans un premier temps travaillé sur la synthèse et l'isolement des sels de phosphonodithiocarboxylate. Nous nous sommes basés sur la procédure présentée ci-dessus décrite par le groupe de Salvatore<sup>224</sup> et nous avons réussi à isoler les sels phosphonodithiocarboxylate **38a** et **38b** avec de bons rendements (Schéma 147). Grâce au contre-cation tétrabutylammonium, ces sels présentent une bonne solubilité dans les solvants organiques, facilitant leur emploi par la suite.



**38a**, R = Et, 1 h, 68%  
**38b**, R = *i*Pr, 24 h, 49%

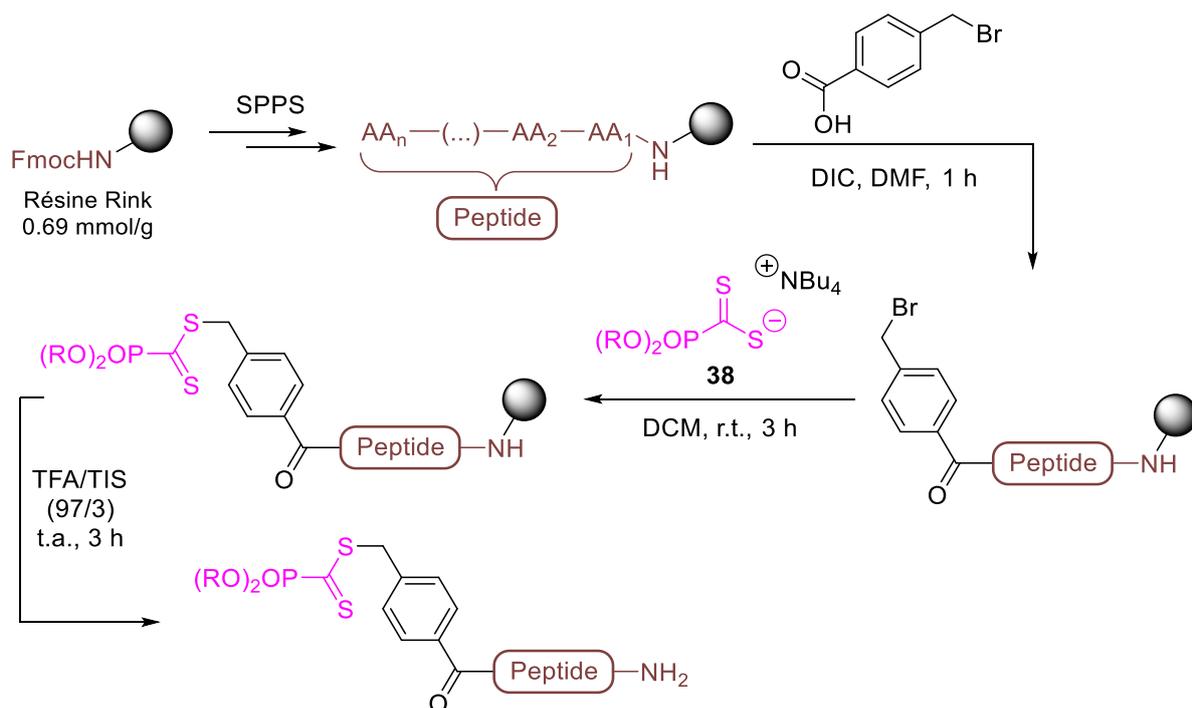
**Schéma 147.** Obtention des sels **38a** & **38b**

Nous avons par la suite synthétisé deux dithioesters modèles simples **39a** et **39b**, afin de pouvoir optimiser les conditions réactionnelles de notre réaction de click. L'agent alkylant employé ici est l'acide 4-(bromométhyl)benzoïque de manière à se rapprocher au plus près des exemples qui seront réalisés par la suite sur peptide. Ces alkylations ont été réalisées avec de bons rendements, dans des conditions douces, à température ambiante, dans l'acétonitrile comme solvant (Schéma 148). Nous avons également employé des dérivés de 2-chloroacétyle comme agent alkylant mais les rendements obtenus étant bien inférieurs, nous n'avons pas conservé ces dérivés pour la suite.



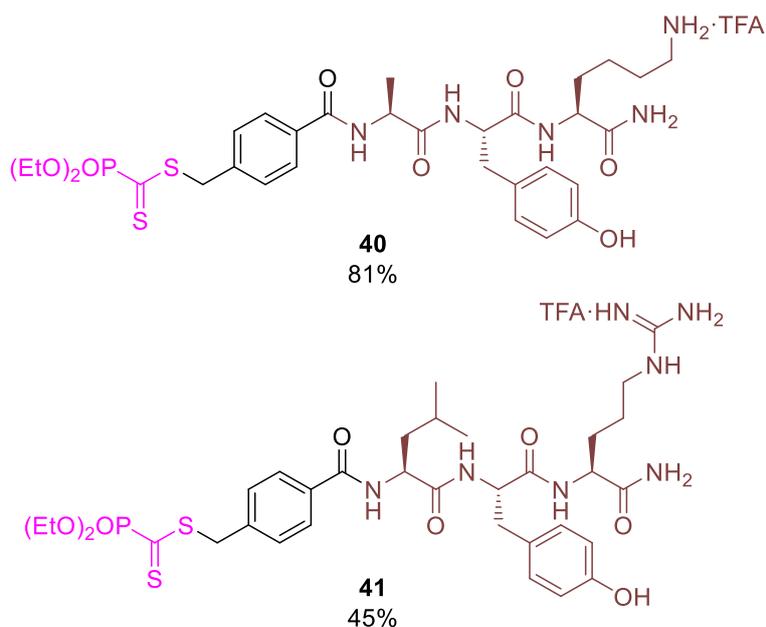
**Schéma 148.** Synthèses des phosphono-dithioesters modèles **40a** & **40b**

Suite à ces bons résultats, nous avons décidé de transférer cette méthodologie aux peptides supportés sur résine. Deux tripeptides modèles ont été sélectionnés contenant chacun un résidu apolaire afin d'en faciliter la purification, un résidu UV-actif et un résidu solubilisant. Le premier tripeptide **40** contient une alanine (A), une tyrosine (Y) et une lysine (K), et le deuxième **41** est constitué d'une leucine (L), une tyrosine (Y) et une arginine (R). Ils ont été obtenus par synthèse peptidique supportée selon une stratégie Fmoc/*t*Bu (Schéma 149). Au vu de la réactivité des amines primaires vis-à-vis de phosphonodithioesters (pour donner des thioamides), le choix d'introduction d'une lysine dans notre premier tripeptide **40** a été fait dans le but de s'assurer de la stabilité du dithioester pendant la synthèse peptidique et ensuite pour la réaction de thia-Diels-Alder. Après une déprotection de l'acide aminé *N*-terminal et le couplage de l'amine libre avec notre acide benzoïque, l'introduction du motif dithioester a pu être effectuée dans des conditions similaires à celles utilisées précédemment. Enfin, la coupure puis la déprotection finale en présence d'un mélange de TFA/TIS (97/3, v/v) nous a permis de générer les dithioester-peptides souhaités.



**Schéma 149.** Voies de synthèse des dithioester-peptides par synthèse supportée

Grâce à cette stratégie, nous avons pu obtenir les dithioester-tripeptides **40** et **41** avec de bons rendements de 81% et 45%, respectivement (Figure 99). Il est à noter que **40** et **41** ont été obtenus ici sous la forme de sel de trifluoroacétate sur la lysine et l'arginine évitant ainsi de possibles dégradations par thioacylation.



**Figure 99.** Structure des dithioester-tripeptidiques **40** et **41**

## 2. Optimisation du partenaire diénique par suivi cinétique

Concernant le partenaire diénique, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à un diène simple dérivé de l'alcool sorbique. Nous avons tout d'abord envisagé l'utilisation d'un lien amide et nous nous sommes ainsi concentrés sur l'obtention d'un précurseur au dérivé aminé correspondant. Cet alcool a ainsi été mis à réagir avec des dérivés phosphorés tels que  $\text{PBr}_3$  (Schéma 150) ou l'azoture de diphenylphosphoryle (Schéma 151). Cependant ces deux réactions ont mené à des mélanges de régioisomères inséparables et dans des proportions non négligeables. Ce résultat s'explique simplement par l'existence d'une compétition entre les mécanismes  $\text{S}_{\text{N}}2$  et  $\text{S}_{\text{N}}2'$  sur les différentes positions du système allylique lors de l'attaque du nucléophile : l'anion bromure avec  $\text{PBr}_3$  et azoture pour l'azoture de diphenylphosphoryle.

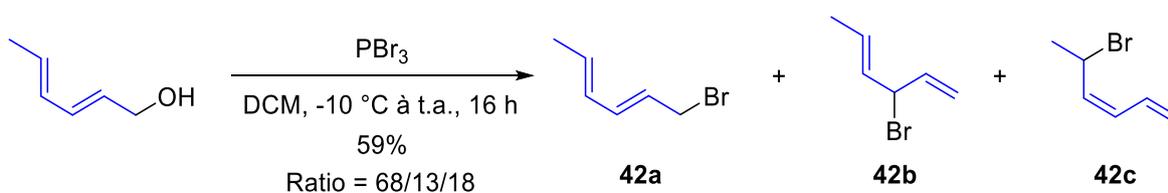


Schéma 150. Bromation de l'alcool sorbique par  $\text{PBr}_3$

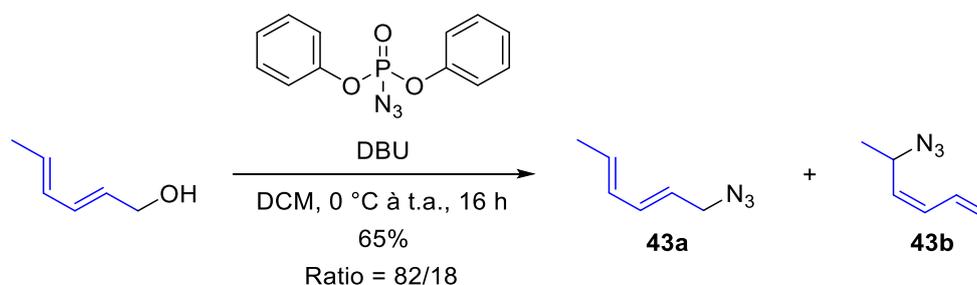
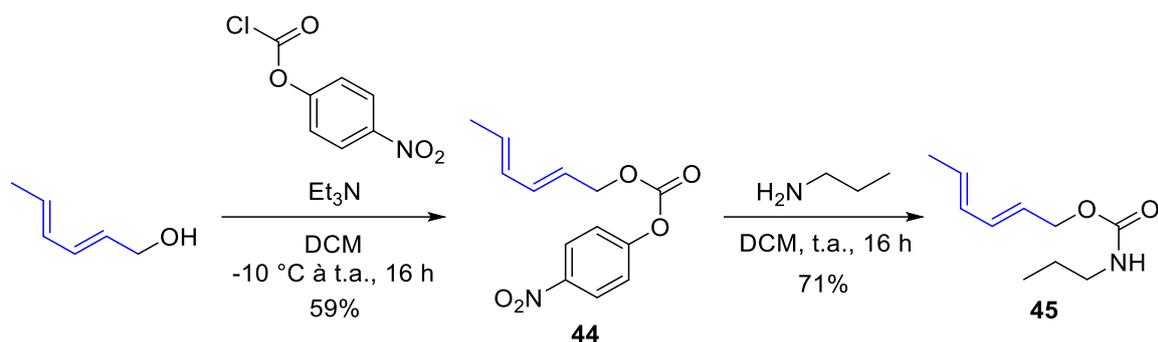


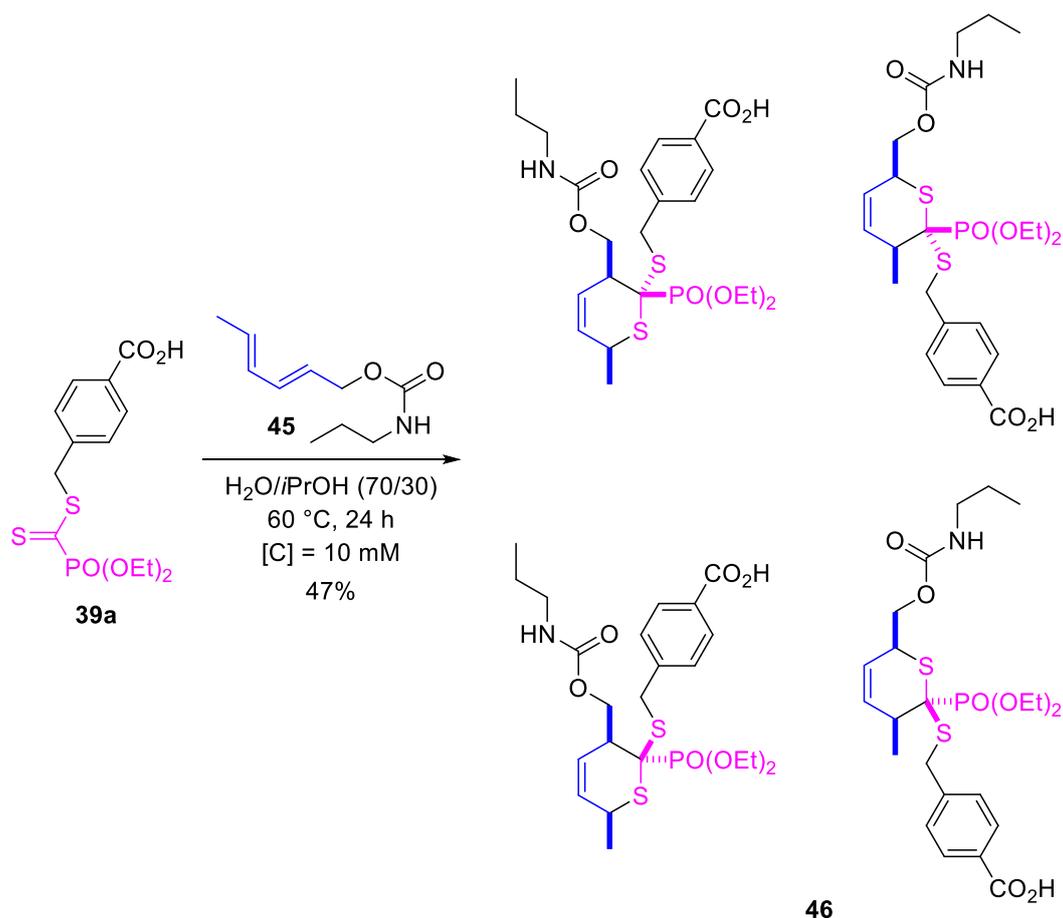
Schéma 151. Réaction de l'alcool sorbique avec l'azoture de diphenylphosphoryle

Nous avons donc opté pour une stratégie différente en faisant réagir cet alcool en présence de *p*-nitrophényl chloroformate afin d'obtenir le carbonate activé **44** correspondant avec un rendement de 59% (Schéma 152).<sup>256</sup> Ce dernier pourra ensuite réagir avec divers nucléophiles en fonction des applications visées. Dans un premier temps, ce carbonate a pu réagir avec la propylamine pour donner avec 71% de rendement le carbamate **45** associé qui nous servira de premier diène modèle.



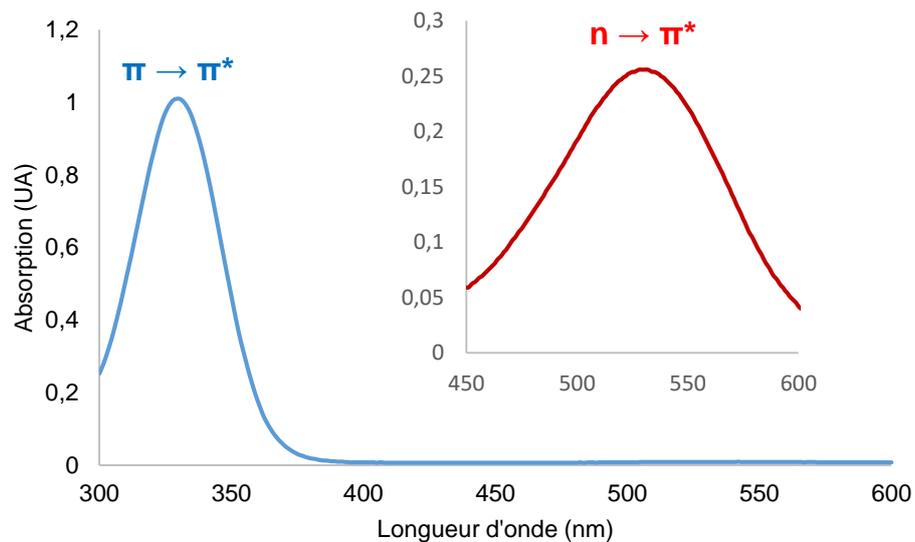
**Schéma 152.** Synthèse d'un diène acyclique modèle

Ce diène **45** a par la suite été employé comme partenaire dans la réaction de thia-Diels-Alder avec le phosphonodithioester **39a** dans un mélange  $\text{H}_2\text{O}/i\text{PrOH}$  (70/30) à  $60\text{ }^\circ\text{C}$  (Schéma 153). Les adduits **46** sont ainsi obtenus avec un rendement correct de 53% après 24 heures de réaction. Grâce à la RMN du  $^{31}\text{P}$  nous avons pu observer la présence de quatre adduits (régio et stéréoisomères), qui n'ont malheureusement pas pu être séparés par HPLC sur colonne C18. Il a néanmoins été possible d'estimer le pourcentage de chaque adduit par RMN du  $^{31}\text{P}$  comme suit : 15% (20,7 ppm), 24% (19,6 ppm), 29% (19,5 ppm) et 32% (18,3 ppm). Ceci illustre bien les faibles régiosélectivité et stéréosélectivité (*endo/exo*) de cette réaction lorsque le diène **45** est employé.

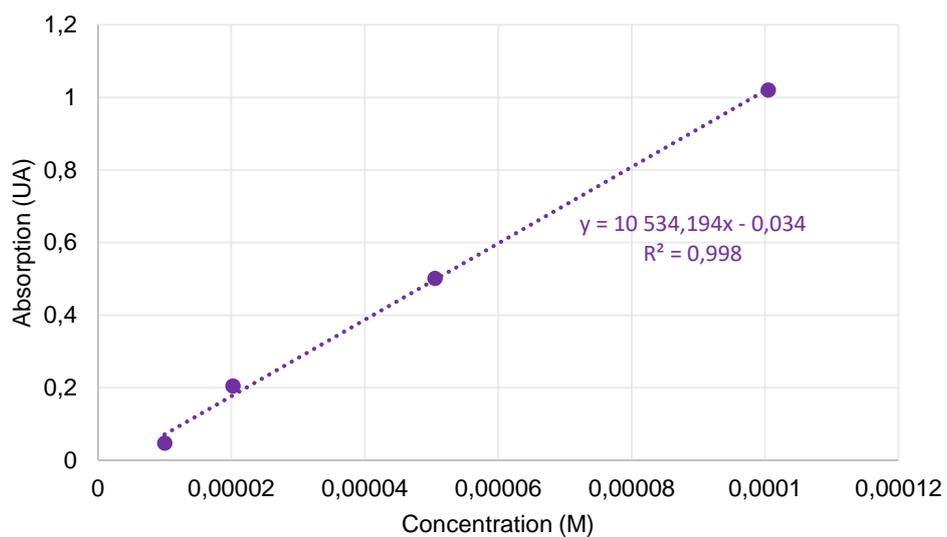


**Schéma 153.** Réaction de thia-Diels-Alder entre le diène **45** et le dithioester **39a**

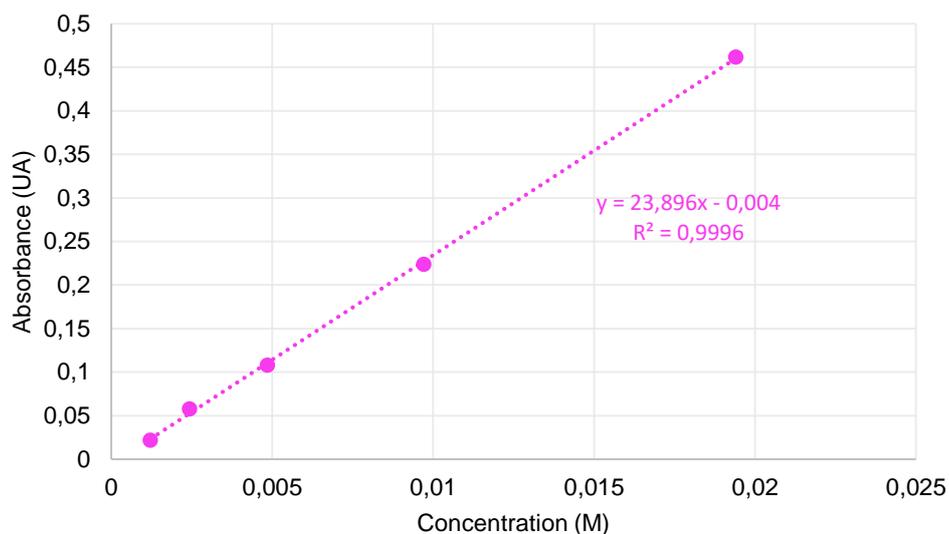
Afin de mieux estimer la cinétique de cette réaction, nous avons entrepris de mesurer la constante de vitesse d'ordre deux. Cette mesure a été effectuée par suivi spectrophotométrique de bandes d'absorption caractéristiques de notre composé. Les bandes d'absorption UV-vis du phosphonodithioester **39a** ont ainsi été mesurées dans un mélange  $\text{H}_2\text{O}/i\text{PrOH}$  (7/3) à  $60\text{ }^\circ\text{C}$ . Deux bandes d'absorption caractéristiques de cette espèce peuvent être observées à  $330\text{ nm}$  (transition  $\pi \rightarrow \pi^*$ ) et à  $530\text{ nm}$  (transition  $n \rightarrow \pi^*$ ) en travaillant respectivement à  $100\text{ }\mu\text{M}$  et  $10\text{ mM}$  (Figure 100). Les coefficients d'absorption molaire de ces deux transitions ont également été mesurés suivant la loi de Beer-Lambert pour donner des valeurs de  $\epsilon^{330\text{ nm}} = 1,05 \times 10^4\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Figure 101) et de  $\epsilon^{530\text{ nm}} = 23,9\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Figure 102).



**Figure 100.** Spectres d'absorption UV-Vis du phosphonodithioester **39a** à 100 μM (bleu) et 10 mM (rouge)

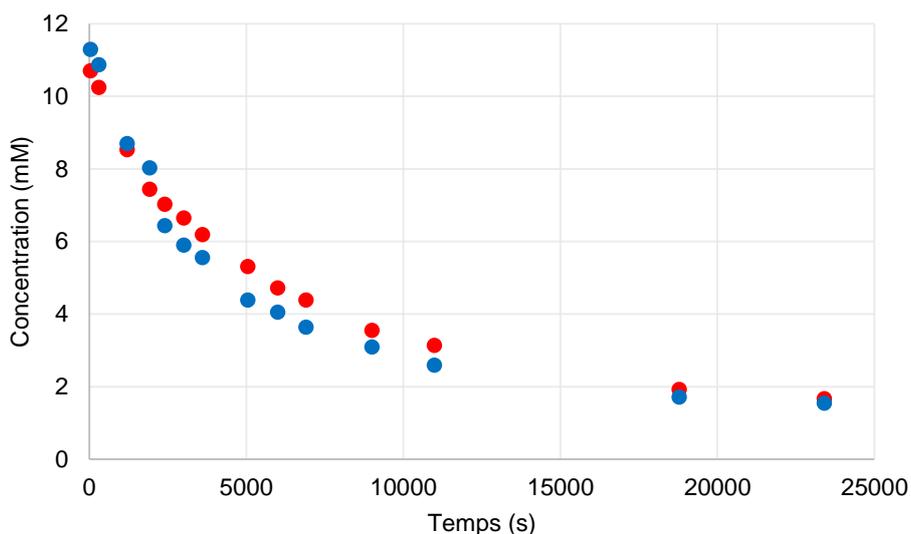


**Figure 101.** Détermination du coefficient d'absorption molaire du phosphonodithioester **39a** à 330 nm



**Figure 102.** Détermination du coefficient d'absorption molaire du phosphonodithioester **39a** à 530 nm

Pour effectuer de tels suivis, il a été important de respecter certains critères. D'une part, l'absorption mesurée doit être inférieure à 1 pour rester dans la gamme de linéarité de la loi de Beer-Lambert. D'autre part, il a été nécessaire d'effectuer les mesures sur un intervalle de temps petit par rapport au temps caractéristique de réaction, de façon à n'avoir que d'infimes variations pendant les mesures. Ces conditions peuvent être respectées en travaillant à 530 nm avec une concentration de 10 mM, notre réaction nécessitant plusieurs heures pour arriver à complétion avec une absorbance maximale de 0,23 au début de la réaction. Nous avons donc lancé deux réactions identiques (courbes bleue et rouge) dans les conditions précédentes et nous avons suivi à intervalles réguliers l'avancée de la réaction par mesure de l'absorbance du dithioester à 530 nm (Figure 103).

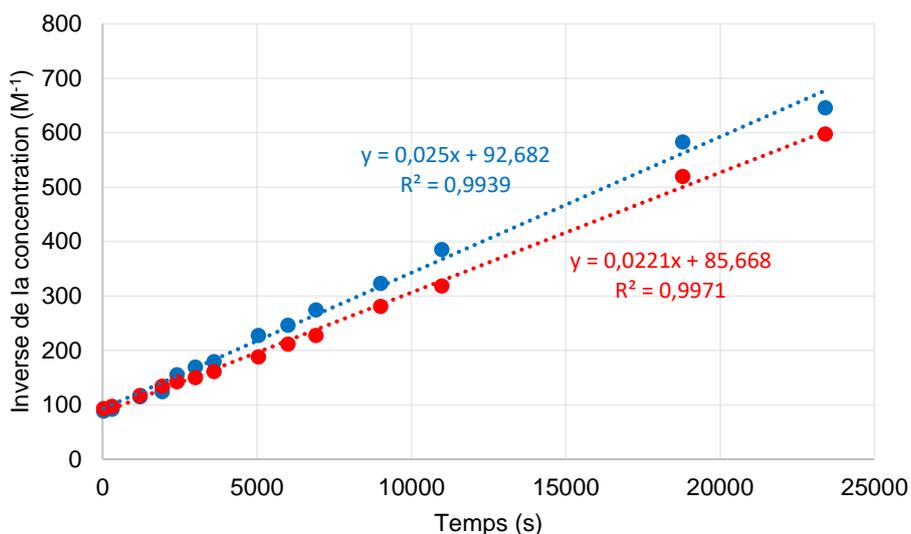


**Figure 103.** Evolution de la concentration en dithioester **39a** au cours des suivis cinétiques

Comme les deux réactifs ont été utilisés en quantités stœchiométriques, il est possible de simplifier la loi de vitesse classiquement utilisée pour une réaction d'ordre 2 de manière à obtenir la loi de vitesse simplifiée (E1). Par intégration de cette dernière, il est possible d'obtenir l'équation (E2) qui relie proportionnellement l'inverse de la concentration en réactif au temps. La constante de vitesse d'ordre 2 « k » peut ainsi être évaluée en traçant l'inverse de la concentration en dithioester par rapport au temps comme coefficient directeur de la meilleure régression linéaire. Dans le cas du diène acyclique une constante moyenne (n = 2) de  $0,024 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \pm 0,002 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  a ainsi été mesurée (Figure 104).

$$-\frac{d[R]}{dt} = k * [R]^2 \quad (\mathbf{E1})$$

$$\frac{1}{[R]} = \frac{1}{[R]_0} + kt \quad (\mathbf{E2})$$



**Figure 104.** Régression linéaires obtenues pour les deux suivis cinétiques de la réaction de thia-DA entre le dithioester **39a** et le diène **45**

L'une des applications visées pour cette réaction étant le marquage de peptides au fluor-18, il était donc nécessaire de travailler avec une réaction rapide dans les conditions de radiomarquage. Afin d'évaluer la cinétique nécessaire pour une réaction de radiomarquage, nous avons calculé l'évolution théorique des conversions de réactions d'ordre deux pour différentes constantes de vitesse. Nous nous sommes placés pour cela au plus proche des conditions employées en fluor-18 avec une concentration en espèce fluoré « [F] » de 5  $\mu\text{M}$  et un excès de partenaire [P] de 10 équivalents. Dans ces conditions, la loi de vitesse d'ordre deux (**E1**) peut ainsi être modifiée pour obtenir (**E2**) en approximant la concentration en partenaire [P] comme constante. L'intégration de cette dernière équation permet d'obtenir l'évolution de la concentration en espèce fluorée [F] en fonction du temps (**E3**).

$$\frac{d[F]}{dt} = k * [F] * [P] \quad (\mathbf{E1})$$

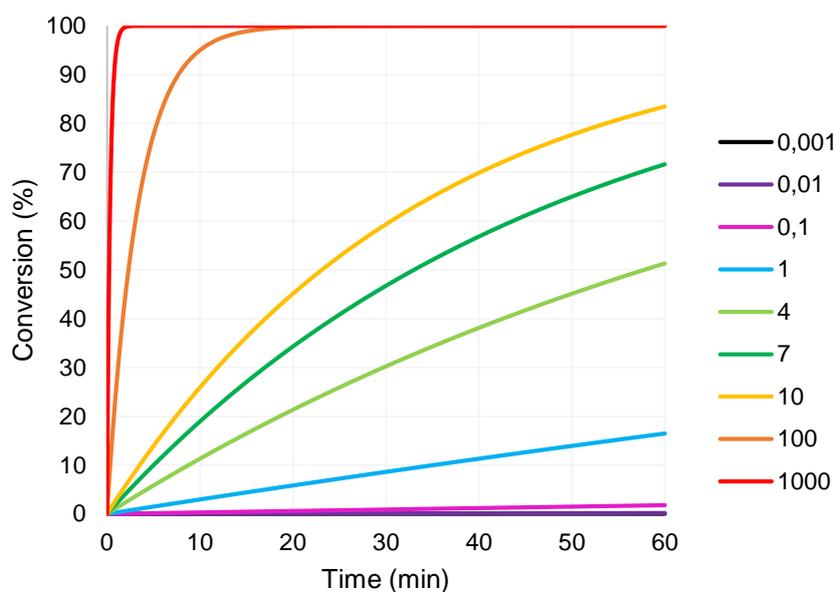
$$\frac{d[F]}{dt} = k_{app} * [F] \text{ avec } k_{app} = k * [P]_0 \quad (\mathbf{E2})$$

$$[F] = [F]_0 * e^{-k_{app}*t} \quad (\mathbf{E3})$$

Il est ensuite possible d'obtenir l'équation donnant la conversion (**E4**) en fonction du temps et de tracer cette dernière pour des constantes de vitesse entre  $10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et

$10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Figure 105). Suite à ces simulations, il apparaît clairement qu'une réaction possédant une constante cinétique inférieure à  $1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ne pourra être envisagée pour une application de radiomarquage au fluor-18.

$$C = \frac{[F]_0 - [F]}{[F]_0} = 1 - e^{-k_{app} \cdot t} \quad (\text{E4})$$

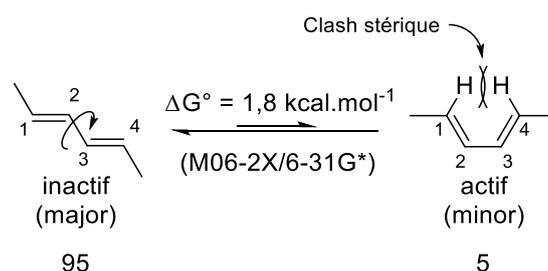


**Figure 105.** Evolution de la conversion d'une réaction d'ordre deux dans les conditions de radiomarquage avec différentes constantes de vitesse

Suite à ces simulations, il apparaît évidemment que ce couple dithioester/diène acyclique ne peut être envisagé pour cette application et qu'un des deux partenaires doit être optimisé de façon à atteindre une constante de vitesse d'ordre 2 supérieure à  $1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  afin d'obtenir une bonne conversion en moins d'une heure de réaction.

Nous nous sommes ainsi lancés à la recherche de diènes plus réactifs. En effet, le type de structure de notre diène **45** possède deux défauts principaux réduisant sa réactivité : l'un électronique et l'autre conformationnel. Le diène **45** étant substitué en positions 1 et 4 par deux groupements alkyle, est ainsi peu enrichi et donc peu réactif en réaction de Diels-Alder à demande normale. Une solution consisterait à introduire des groupements électrodonneurs (MeO, TMSO) comme dans le diène de Danishefsky, cependant ce type de structure serait instable dans le milieu réactionnel envisagé. Nous nous sommes donc concentrés sur l'aspect conformationnel. En effet, notre type de diène acyclique peut se trouver sous deux formes en solution : *s-trans*

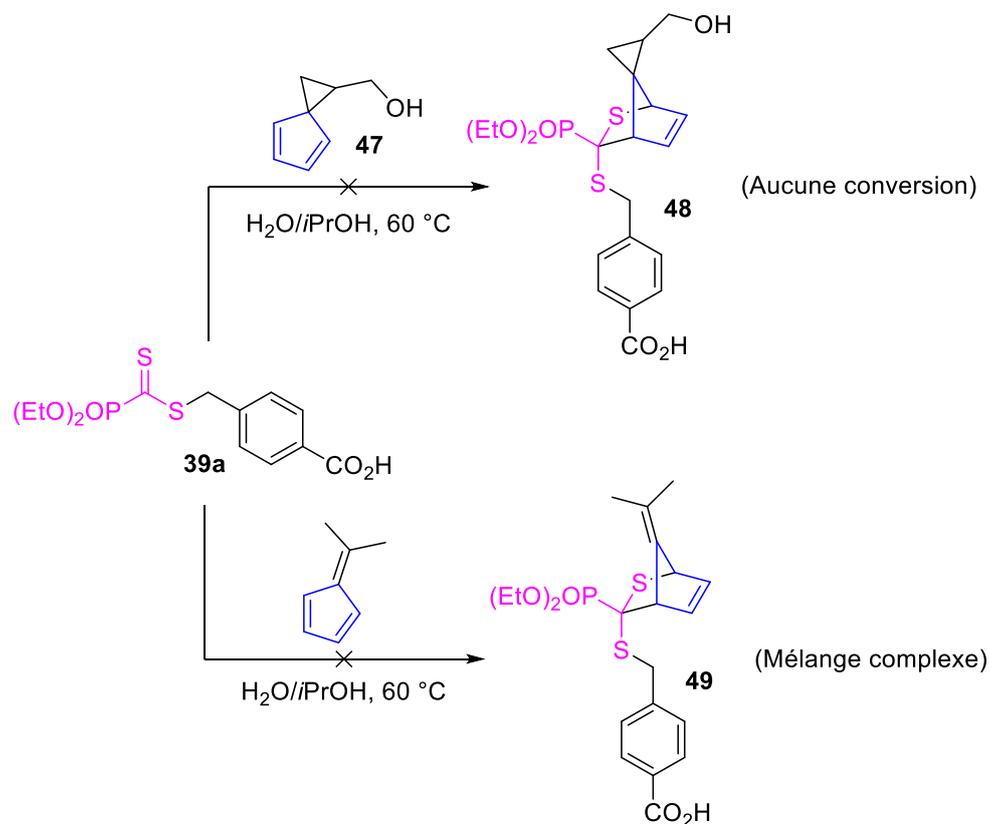
et *s-cis*. A cause des contraintes stériques provoquées par la proximité des atomes d'hydrogène portés par les carbones 1 et 4 du diène, la conformation *s-cis* est fortement minoritaire en solution (Figure 106). En calculant l'écart énergétique par DFT (M06-2X/6-31G\*) entre les deux conformations de l'hexa-2,4-diène et par la loi de statistique de Boltzmann, la forme *s-cis* ne représenterait que 5% de la population de diène. Or du point de vue de la réaction de Diels-Alder seule cette forme *s-cis* est active, d'où la faible réactivité de ce type de diène.



**Figure 106.** Equilibre entre les formes *s-cis* et *s-trans* de l'hexa-2,4-diène

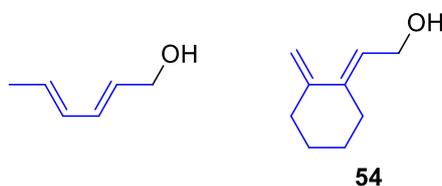
Une solution est d'utiliser une structure diénique endocyclique (C1 et C4 liés) ou exocyclique (C2 et C3 liés), de façon à bloquer le diène dans sa conformation active *s-cis*. L'exemple le plus connu de diène endocyclique est le cyclopentadiène dont la réactivité en Diels-Alder avec l'anhydride maléique est estimée être 1400 fois supérieure à celle du butadiène.<sup>257</sup> Cette impressionnante réactivité entraîne cependant sa dimérisation rapide à température ambiante.<sup>220</sup> Dans notre cas, comme plusieurs étapes de synthèse sont nécessaires pour obtenir un précurseur pour la radiofluoration qui a en général lieu à des températures élevées, l'utilisation de cyclopentadiènes ne nous a pas semblé adéquate. Un dérivé spirannique **47** de cyclopentadiène a cependant été décrit dans la littérature comme étant plus stable, tout en restant suffisamment réactif en réaction de Diels-Alder avec un maléimide).<sup>220</sup> Sa synthèse a été effectuée à partir de protocoles issus de la littérature (cf Partie Expérimentale).<sup>220,258</sup> Ce diène n'a cependant donné aucune conversion avec notre phosphonodithioester **39a** dans les conditions optimisées de thia-Diels-Alder (Schéma 154). Ceci pourrait s'expliquer par l'encombrement stérique du cyclopropyle du diène qui empêcherait l'approche d'un diénophile 1,1'-disubstitué (comme notre dithioester). Autour du même squelette cyclopentadiène, nous avons également envisagé l'emploi de dérivé de fulvènes comme le 6,6'-diméthylfulvène qui n'a malheureusement pas

permis d'obtenir une conversion complète après 2 heures de réaction et a mené à un mélange complexe (Schéma 154).



**Schéma 154.** Essai de thia-Diels-Alder avec des diènes dérivés de cyclopentadiènes

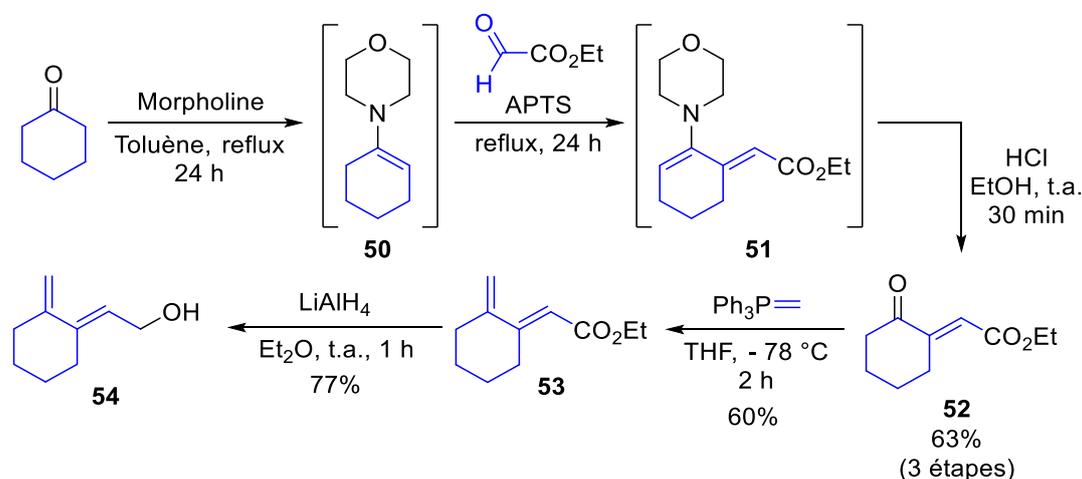
Nous nous sommes enfin tournés vers une structure diénique exocyclique **54** dérivée d'alcool sorbique, moins réactive que le cyclopentadiène mais environ 100 fois plus réactive que le butadiène (Figure 107).<sup>257</sup>



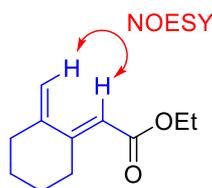
**Figure 107.** Alcool sorbique et son dérivé exocyclique

Nous avons tout d'abord synthétisé un dérivé de ce type de diène via une séquence simple et directe (Schéma 155). La cyclohexanone est tout d'abord mise à réagir avec la morpholine dans un Dean-Stark pour obtenir intermédiairement l'énamine **50** correspondante à laquelle est ajouté le glyoxalate d'éthyle et une quantité catalytique

d'acide *para*-toluènesulfonique. Après 24 heures de reflux sous Dean-Stark et hydrolyse acide de l'énamine, le produit désiré **52** est obtenu avec un rendement de 63%. Ce dernier est ensuite mis à réagir en présence du méthylènetriphénylphosphorane formé *in situ* pour obtenir par réaction de Wittig le système diénique **53** correspondant avec un rendement de 60%. La configuration de la première double liaison introduite a pu être confirmée par analyse NOESY avec le couplage des deux protons vinyliques « internes » (Figure 108). L'ester **53** ainsi obtenu est directement réduit par le LiAlH<sub>4</sub> pour donner l'alcool désiré **54** avec un rendement de 77%. Ce premier diène **54** comportant un groupement hydroxyle comme point d'ancrage peut ainsi être synthétisé en 3 étapes avec un rendement global de 37%.

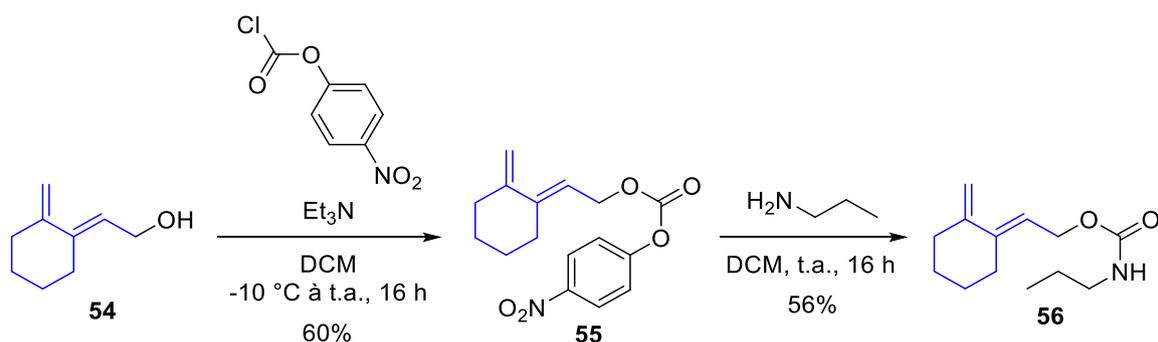


**Schéma 155.** Synthèse du diène exocyclique **54**



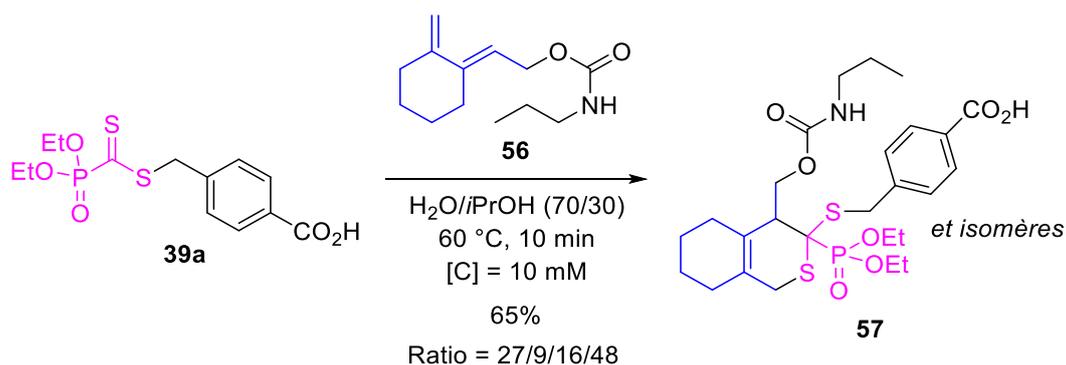
**Figure 108.** Couplage NOESY concluant sur la géométrie du diène **54**

Le *para*-nitrophényl chloroformate a ensuite été employé dans les conditions décrites précédemment pour le diène acyclique et a permis d'obtenir le carbonate activé souhaité **55** avec 60% de rendement (Schéma 156). Ce dernier a par la suite été couplé avec la propylamine pour donner le diène exocyclique modèle **56** avec 56% de rendement.



**Schéma 156.** Synthèse du diène exocyclique modèle **56**

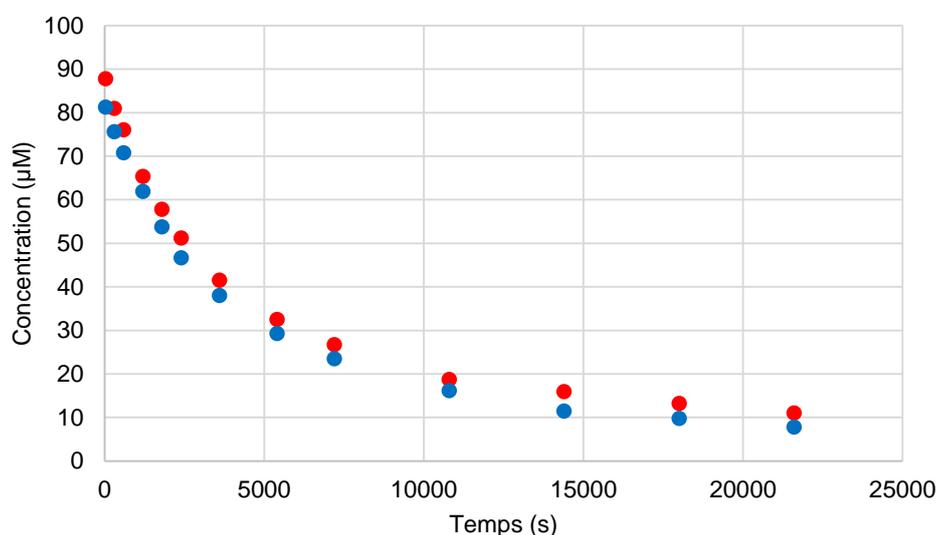
Comme nous l'avons espéré, l'emploi du diène **56** dans la réaction de thia-Diels-Alder avec le phosphonodithioester **39a** nous a permis d'obtenir les adduits **57** correspondants avec 65% de rendement après seulement 10 minutes de réaction à 60 °C et une concentration de 10 mM (Schéma 157). Quatre adduits ont également été obtenus en mélange inséparable dans ce cas, avec les pourcentages suivants mesurés par RMN du  $^{31}\text{P}$  : 24% (20,7 ppm), 11% (19,8 ppm), 17% (19,4 ppm) et 48% (18,3 ppm). Comparé au diène acyclique 1,4-disubstitué **45** décrit précédemment, ce diène cyclique **56** monosubstitué donne une meilleure sélectivité. Conformément aux règles de la réaction de Diels-Alder, nous avons supposé la formation majoritaire du régioisomère représenté dans le Schéma 157.



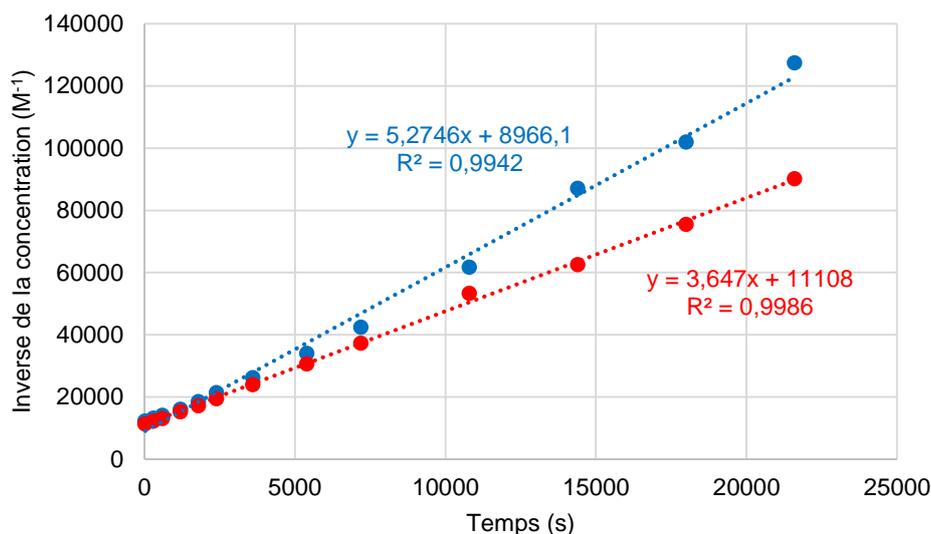
**Schéma 157.** Réaction de thia-Diels-Alder entre le diène modèle **56** et le dithioester **39a**

Cette réaction étant beaucoup plus rapide que celle avec le diène acyclique **45**, il ne nous était pas possible de suivre son avancement dans les mêmes conditions que celles présentées plus haut. La mesure du spectre d'absorbance de notre réaction prenant entre 30 secondes et 1 minute, ce temps d'analyse n'était donc plus

négligeable devant le temps de la réaction (quelques minutes). Nous avons malgré tout décidé d'employer la même méthode de suivi mais en travaillant à 330 nm plutôt que 530 nm. En effet, à cette longueur d'onde le dithioester **39a** possède un coefficient d'absorption molaire beaucoup plus élevé ( $10500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  contre  $24 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  à 530 nm) nous permettant ainsi de travailler à une concentration beaucoup plus faible de l'ordre de  $100 \mu\text{M}$ , augmentant ainsi le temps de réaction. Nous avons ainsi pu suivre lors de deux duplicats (courbes bleue et rouge) l'évolution de la réaction au cours du temps sur plusieurs heures (Figure 109) et obtenir une constante de vitesse moyenne ( $n = 2$ ) d'ordre 2 de  $4,5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \pm 0,8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  après régression linéaire (Figure 110). Cette cinétique étant suffisante pour la chimie du fluor-18, nous avons sélectionné ce diène pour la suite de l'étude.



**Figure 109.** Suivi cinétique de la disparition du dithioester **39a** au cours du temps en présence du diène exocyclique **56**

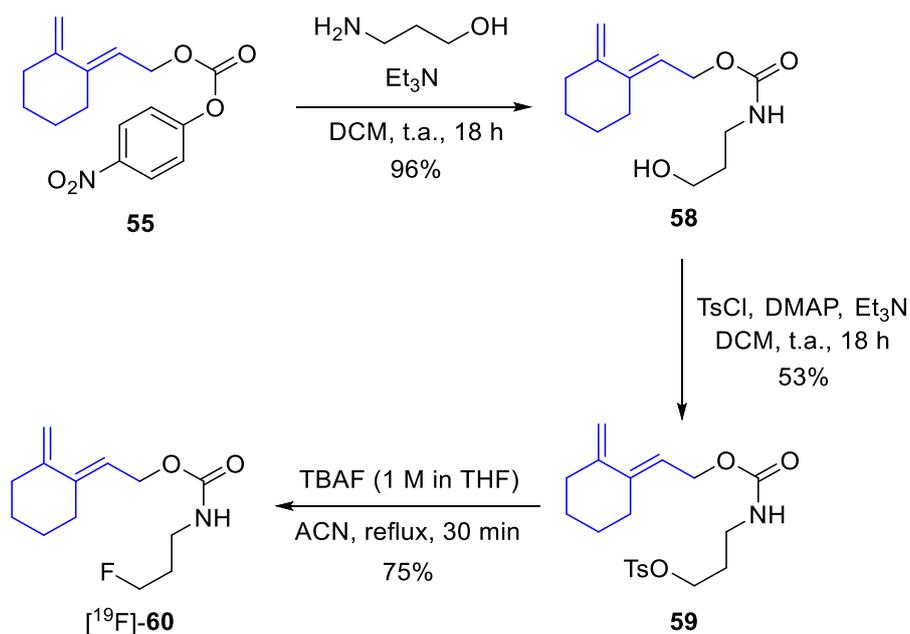


**Figure 110.** Régression linéaire des deux suivis cinétiques de la réaction de thia-DA entre le dithioester **39a** et le diène **56**

### 3. Application au radiomarquage de peptides par le <sup>18</sup>F

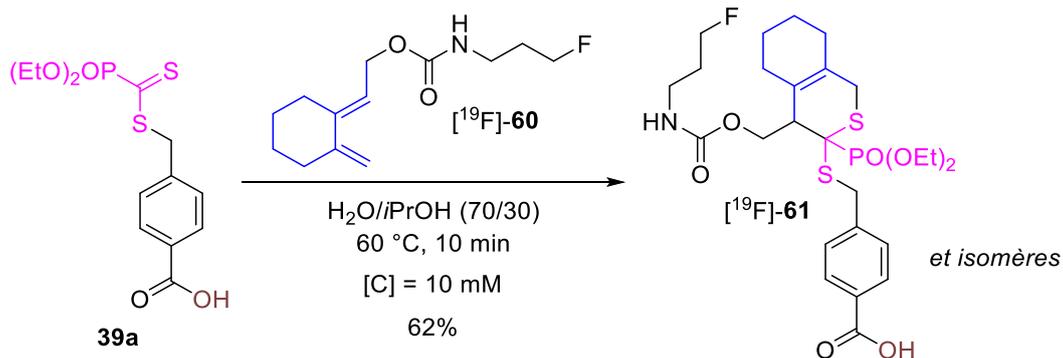
#### 3.1. Optimisation du marquage d'un tripeptide modèle

Avant d'employer notre réaction pour le radiomarquage de peptides au fluor-18, nous avons synthétisé dans un premier temps les références non-radioactives, c'est-à-dire marquées au fluor-19. Nous avons à nouveau employé le carbonate activé **55** que nous avons fait réagir avec du 1-aminopropanol dans le DCM pour obtenir le carbamate **58** correspondant avec un rendement de 96% (Schéma 158). Cet alcool a été ensuite activé par le chlorure de tosyloxy en présence de DMAP pour donner le tosylate **59** avec 53% de rendement. Il peut être noté que depuis la cyclohexanone, la synthèse du dérivé tosylé **59** a pu être effectuée à l'échelle de plusieurs grammes sans diminution des rendements. Enfin, le diène fluoré [<sup>19</sup>F]-**60** a été obtenu par traitement de **59** avec une solution de TBAF au reflux de l'acétonitrile avec un très bon rendement de 75%.

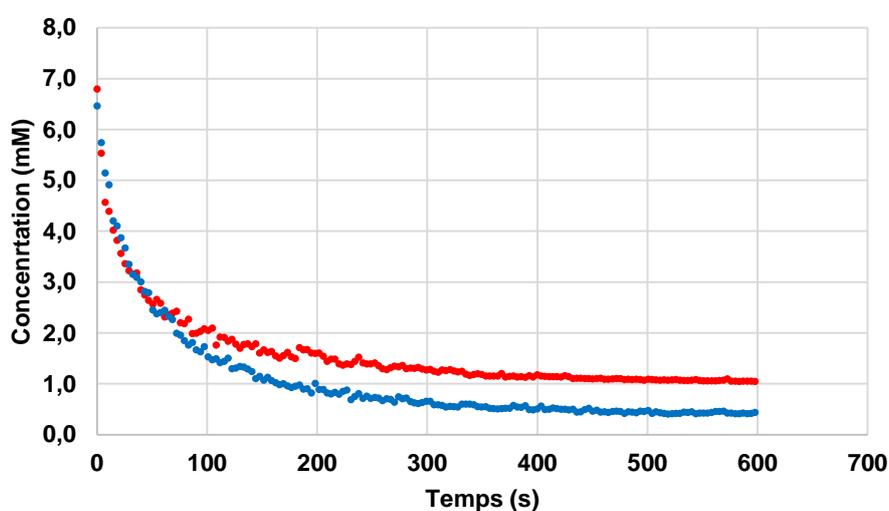


**Schéma 158.** Synthèse du diène fonctionnalisé **60** par un fluor-19

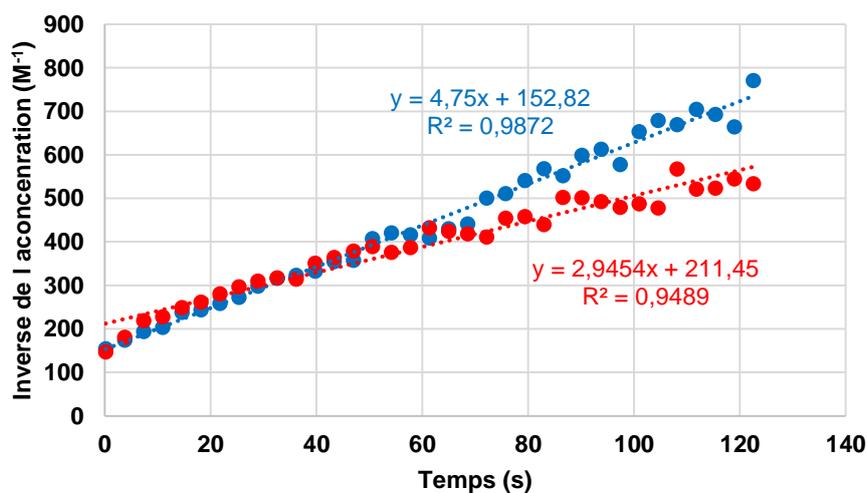
Ce diène fluoré [ $^{19}\text{F}$ ]-**60** nous a ensuite permis d'obtenir la référence non-radioactive des adduits issus de sa réaction avec le phosphonodithioester modèle **39a** avec 62% de rendement (Schéma 159). Ces adduits n'ont pas pu être séparés individuellement, mais leur ratio a pu être mesuré par RMN du  $^{31}\text{P}$  : 27% (20,8 ppm), 9% (19,8 ppm), 16% (19,4 ppm) et 48% (18,2 ppm), montrant une sélectivité similaire à celle obtenue précédemment. La constante de vitesse de ce diène fluoré [ $^{19}\text{F}$ ]-**60** a également été mesurée par suivi de l'absorbance du dithioester à 530 nm en réalisant la réaction directement dans la cuve d'analyse sous agitation et à 60 °C (Figure 111). Par régression linéaire nous avons calculé une constante de vitesse d'ordre 2 pour ce diène fluoré de  $3,9 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1} \pm 0,9 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  (Figure 112), confirmant ainsi les résultats obtenus sur le diène modèle **56** (Figure 110).



**Schéma 159.** Obtention des adduits non-radioactifs modèles [F]-61

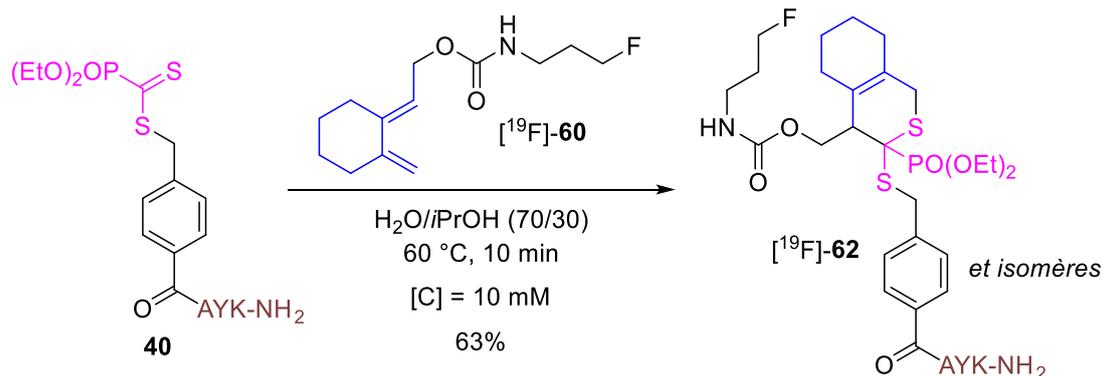


**Figure 111.** Suivi de l'absorbance du dithioester **39a** en présence du diène fluoré [F]-59 (n = 2)



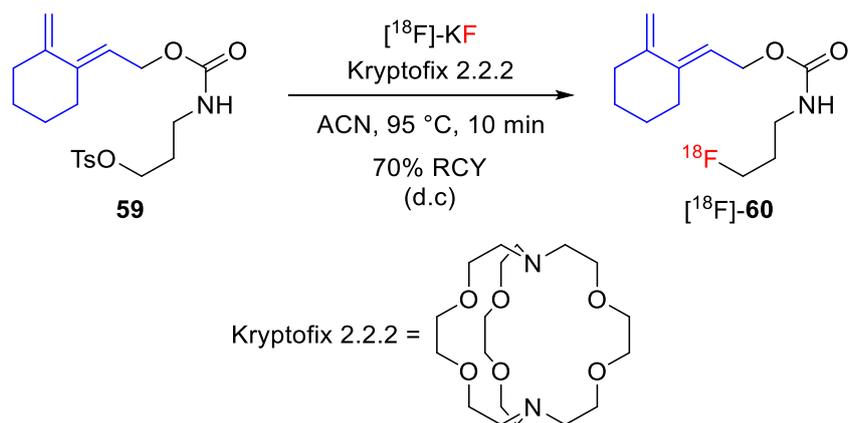
**Figure 112.** Régressions linéaires des deux suivis cinétiques de la réaction de thia-DA avec le dithioester **39a** le diène fluoré [F]-60

De la même manière, les adduits non-radioactifs ont également été obtenus avec un très bon rendement de 63% sur le dithioester tripeptidique **40** (Schéma 160). Lors de cette réaction, seuls les adduits de thia-Diels-Alder ont pu être observés par HPLC. Cet exemple démontre que sous réserve d'une protonation préalable de la lysine, aucune dégradation du phosphonodithioester-peptide par thioacylation n'est observée en solution avec ce peptide modèle.



**Schéma 160.** Obtention des adduits non-radioactifs  $[^{19}\text{F}]\text{-62}$  par réaction du diène fluoré  $[^{19}\text{F}]\text{-60}$  et du dithioester tripeptidique **40**

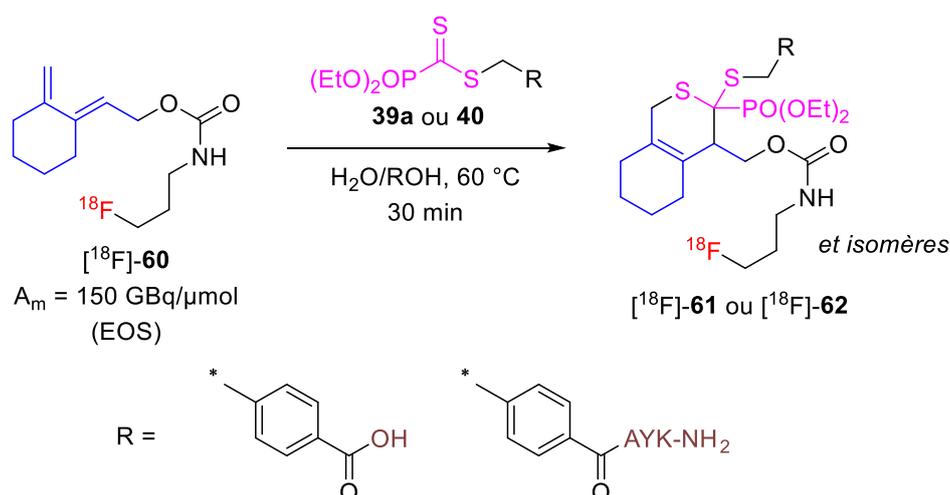
Ces deux références obtenues, nous nous sommes ensuite concentrés sur la radiofluoration de notre diène tosylate **59**. Cette étape a été effectuée dans des conditions classiques en fluor-18 en présence de  $[^{18}\text{F}]\text{KF}$  et de Kryptofix 2.2.2 dans l'acétonitrile avec un dcRCY de 70% et une pureté radiochimique de plus de 99% (Schéma 161). L'optimisation de cette réaction a principalement consisté en la réduction du temps de certaines étapes (temps de réaction, temps de rétention en HPLC semi-préparative...) sans diminution du rendement. En fin d'optimisation, cette réaction a été effectuée sur une durée d'environ une heure, purification et formulation comprise. Enfin, l'activité molaire de ce diène fluoré  $[^{18}\text{F}]\text{-60}$  a pu être mesurée à l'aide d'une droite de calibration obtenue à partir de la référence non-radioactive pour obtenir une valeur moyenne de  $150\text{ GBq}/\mu\text{mol}$  en fin de synthèse dans nos conditions expérimentales.



**Schéma 161.** Radiofluoration du diène **59**

Le diène fluoré [<sup>18</sup>F]-**60** obtenu il nous était possible d'étudier et d'optimiser l'étape de thia-Diels-Alder dans les conditions de radiomarquage, sur faible activité dans un premier temps (quelques dizaines de MBq). L'activité molaire du diène [<sup>18</sup>F]-**60** ayant été évaluée, il nous a été possible de mesurer précisément la quantité employée de diène **60** (comprenant [<sup>19</sup>F]-**60** et [<sup>18</sup>F]-**60**) pour chaque expérience (0,46 nmol pour chaque expérience). L'utilisation d'un grand excès (150 équivalents) de phosphonodithioester modèle **39a** à une concentration de 4 μM pour **60** et 60 °C a tout d'abord conduit à une conversion HPLC totale après 30 min (Tableau 23, Entrée 1). La réduction de l'excès de dithioester **39a** à 15 équivalents a permis d'obtenir une conversion HPLC de 83% (Entrée 2), démontrant la faisabilité de cette approche de radiofluoration. Par la suite, l'isopropanol a été substitué par l'éthanol, mieux toléré chez la souris et employé dans la formulation finale des solutions injectables. Des conditions similaires à celles obtenues avec le dithioester modèle **39a** ont pu être transposées au dithioester-tripeptide **40** pour obtenir une conversion HPLC de 88% (Entrée 3). La diminution de l'excès de dithioester et de la concentration a été évaluée, mais n'a conduit qu'à une conversion faible de 10% ou nulle (Entrées 4 et 5). Enfin, en revenant à une concentration de 4 μM pour **60**, il nous a été possible de diminuer la proportion en eau dans le mélange de solvants tout en conservant un très bon rendement HPLC de 77% (Entrée 6). La raison de la diminution de la proportion en eau qui joue un rôle important dans la cinétique de cette réaction (Entrées 6 vs 4) est davantage pratique que chimique. En effet après l'étape de fluoration de notre diène, ce dernier est formulé en solution dans 2 à 4 mL d'éthanol et doit être dilué par un certain volume d'eau. En travaillant dans un ratio 80/20 pour notre solvant, il nous

faudrait rajouter entre 8 et 16 mL d'eau contre 5 à 9 mL en travaillant à 70/30. Les réacteurs des automates de synthèse étant limités en taille, limiter la quantité de solvant employé est donc tout aussi primordial et permet d'éviter de reconcentrer le diène (risque de radiolyse, perte de temps) après formulation et d'avoir un volume constant et connu d'éthanol.



Entrée	Produit	Equivalents de dithioester	[59] <sup>a</sup> (μM)	Ratio H <sub>2</sub> O/ROH <sup>[c]</sup>	Ratio HPLC <sup>b</sup> Produit/[ <sup>18</sup> F]-60
1	[ <sup>18</sup> F]-61	150	4	70/30	100/0
2	[ <sup>18</sup> F]-61	15	4	70/30	83/17
3	[ <sup>18</sup> F]-62	13	3	80/20	88/12
4	[ <sup>18</sup> F]-62	6	1	80/20	10/90
5	[ <sup>18</sup> F]-62	6	1	60/40	0/100
<b>6</b>	<b>[<sup>18</sup>F]-62</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>70/30</b>	<b>77/23</b>

[a] Calculé avec une activité molaire moyenne de 150 GBq/μmol pour [<sup>18</sup>F]-59 et avec une quantité constante de diène fluoré (0,46 nmol) pour chaque expérience. [b] Ratio mesuré sur le canal radioactif. [c] *i*PrOH a été utilisé pour [<sup>18</sup>F]-61 et EtOH pour [<sup>18</sup>F]-62

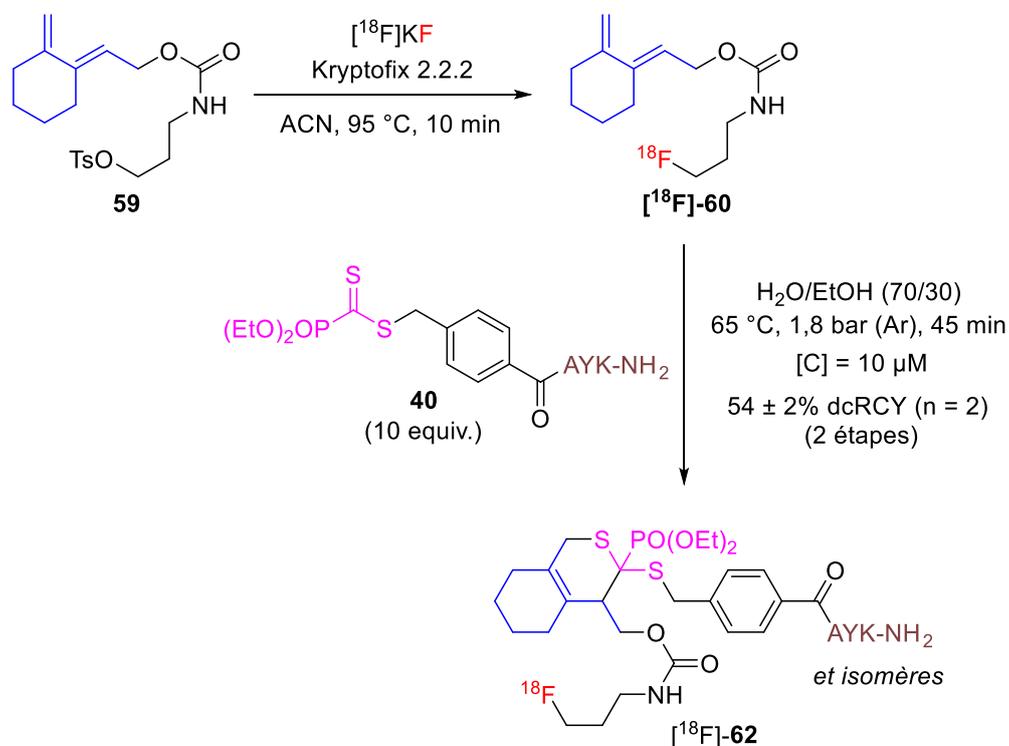
**Tableau 23.** Optimisation de la réaction de thia-Diels-Alder sur les dithioesters modèle et tripeptidique

Pour obtenir des activités volumiques suffisantes permettant de réaliser des expériences d'imagerie, il nous était nécessaire de transposer ces synthèses en cellules blindées (Figure 113). Les conditions n'étaient cependant pas directement transposables entre les expériences d'optimisation faites manuellement et celles réalisés sur automate. Nous avons ainsi dû augmenter la concentration à 10 μM et 10

équivalents de dithioester **40** ont été employés contre 6 équivalents lors de l'optimisation afin de faciliter les pesées. Ainsi, il a été possible d'obtenir dans ces conditions les adduits radiomarqués  $[^{18}\text{F}]\text{-61}$  avec un dcRCY de  $54 \pm 2\%$  ( $n = 2$ ) après 45 minutes de réaction de thia-Diels-Alder et 2 heures de procédé total comprenant les synthèses, purifications et formulations (Schéma 162). L'activité molaire de ce composé a été mesuré à une occasion et une valeur de  $90 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$  a été obtenue.

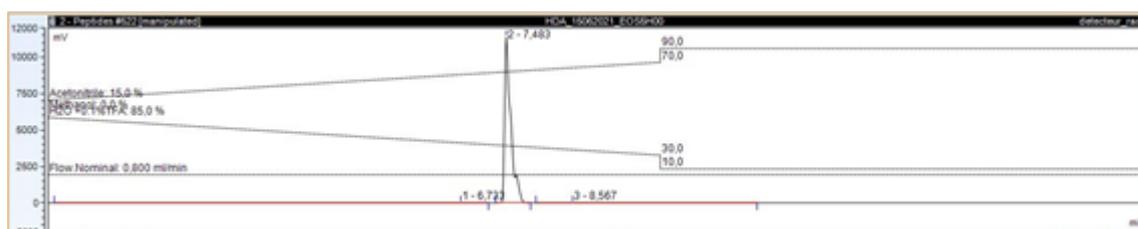


**Figure 113.** Cellules blindées utilisées en radiochimie (gauche) et automate de synthèse (droite)

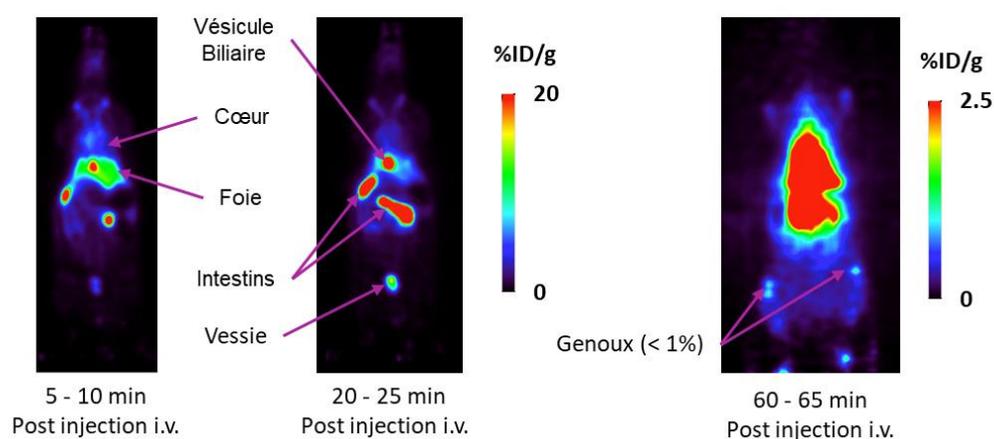


**Schéma 162.** Procédé d'obtention des adduits tripeptidiques  $[^{18}\text{F}]\text{-62}$  radiomarqués au fluor-18

Nous avons ensuite évalué la stabilité chimique et radiochimique de ce nouveau lien sur plusieurs heures afin de valider la possibilité d'administration à la souris. Notre tripeptide radiomarqué [ $^{18}\text{F}$ ]-**62** a ainsi été analysé par HPLC cinq heures après la fin de la synthèse et une pureté radiochimique de plus de 99% a pu être mesurée (Figure 114). Enfin, une dizaine de MBq de ce composé ont été injectés par voie intraveineuse chez une souris BALB/c qui a ensuite été imagée pendant une heure sous caméra TEP (Figure 115). Cette injection nous a permis d'estimer la stabilité de ce nouveau lien *in vivo*, notamment vis-à-vis de l'élimination du fluor-18 sous forme anion fluorure. Si cet anion est effectivement libéré, au vu de l'affinité de l'anion fluorure pour l'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_2$ ) des os, le marquage du squelette de cette souris devrait être ainsi observé sur les images. Sur l'ensemble du suivi, seule une très faible proportion de la dose injectée par gramme (moins de 1%DI/g) peut être observée au niveau des genoux de cette souris semblant indiquer une faible élimination de fluorure libre *in vivo*.



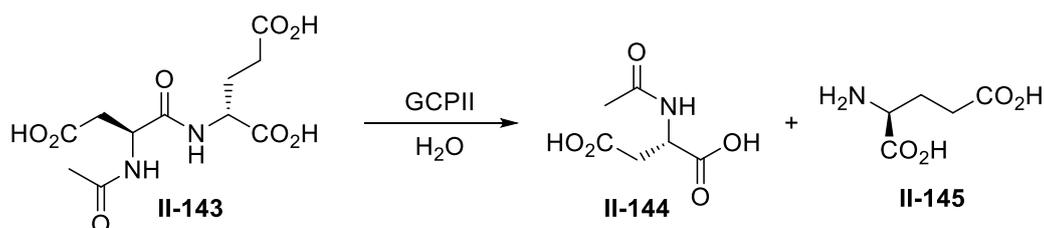
**Figure 114.** Stabilité des adduits [ $^{18}\text{F}$ ]-**62** après 5 heures en formulation (canal radioactif)



**Figure 115.** Vues coronales à différents temps d'une souris BALB/c injectée avec 11,3 MBq de [ $^{18}\text{F}$ ]-**62** par voie *i.v.* (veine de la queue)

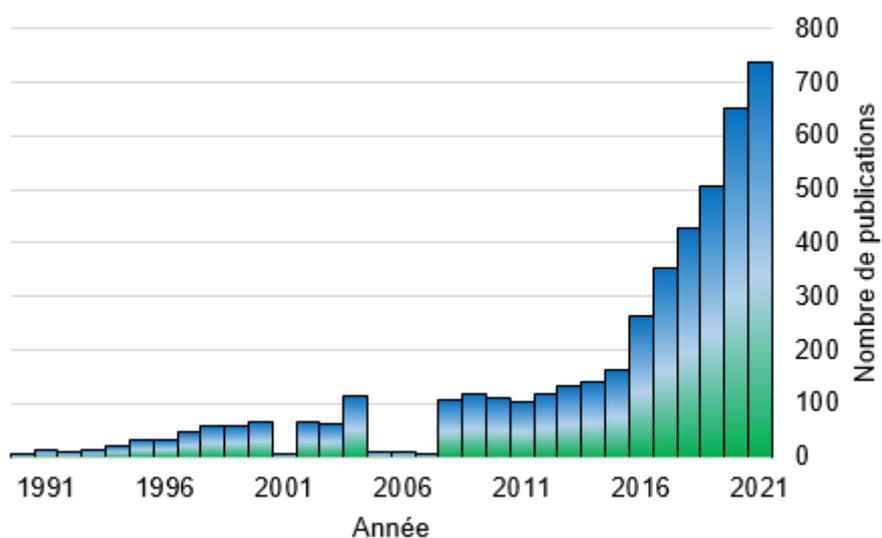
### 3.2. Le récepteur PSMA

Cette méthodologie optimisée, nous nous sommes ensuite tournés vers un peptide bioactif ligand du « Prostate-Specific Membrane Antigen » ou PSMA. Ce dernier est un récepteur transmembranaire de 750 acides aminés également appelé « Glutamate carboxypeptidase II » ou GCPII et capable d'hydrolyser le *N*-acetyl aspartylglutamate **II-143** (NAAG) en *N*-acetylaspartate **II-144** et glutamate **II-145** (Schéma 163).



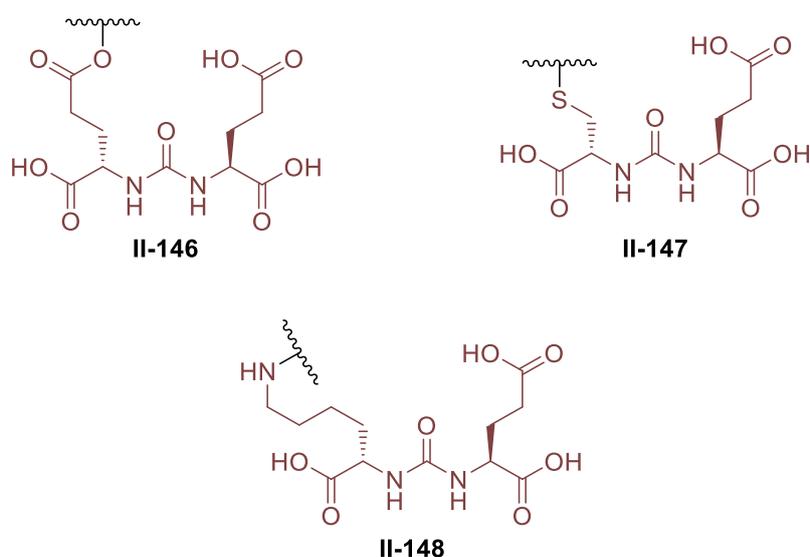
**Schéma 163.** Hydrolyse du *N*-acetyl aspartylglutamate **II-143** par GCPII

Le récepteur PSMA est exprimé dans différents tissus (reins, glandes salivaires,...) mais reste largement surexprimé à la surface de tumeurs malignes de la prostate. Cette surexpression est également directement liée à l'agressivité de la tumeur, ce récepteur étant exprimé 100 à 1000 fois plus pour une tumeur maligne que pour une tumeur bénigne. Il représente ainsi une cible de choix dans le diagnostic et/ou le traitement du cancer de la prostate, l'un des cancers les plus fréquemment diagnostiqué et avec l'une des plus hautes mortalités chez les hommes dans le monde. Cet intérêt du PSMA s'est notamment traduit par un nombre croissant de publications traitant des diverses applications pré-clinique ou cliniques ciblant ce récepteur pour le diagnostic ou la thérapie (Figure 116), ainsi que les récentes revues publiées à ce sujet ces dernières années.<sup>259</sup>



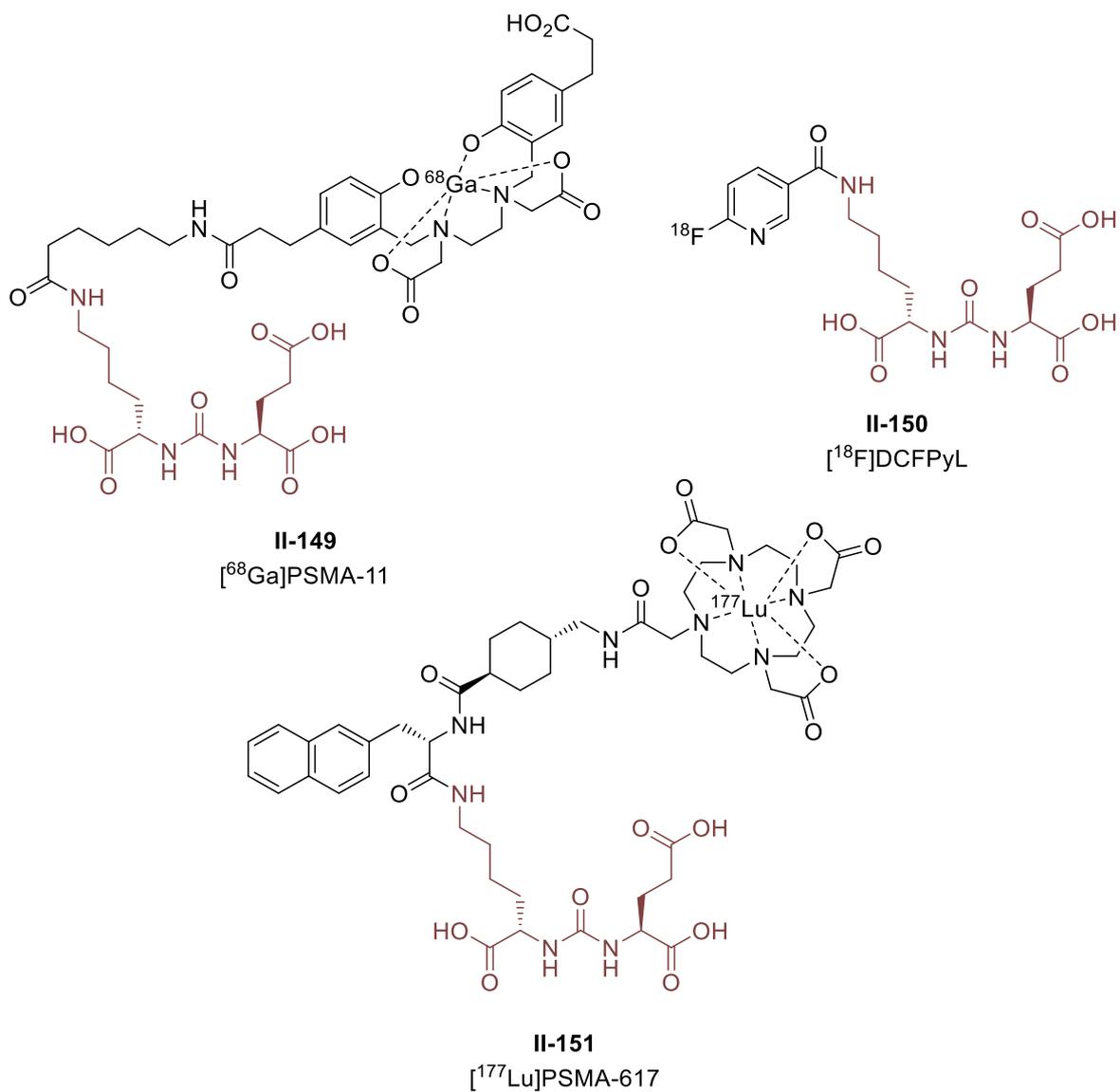
**Figure 116.** Fréquence de publications d'articles à propos du récepteur PSMA entre 1991 et 2021 (Source : Pubmed, recherche : "Prostate Specific Membrane Antigen")

Au sein de ces différentes études, diverses structures de ligands pseudo-dipeptidiques ciblant ce récepteur ont ainsi été décrites.<sup>260</sup> Ces structures ont été obtenues à partir de celle du NAAG par variation de la partie aspartate et introduction d'une fonction urée liant les deux acides aminés, la partie glutamate étant essentielle à l'activité. Pour la partie aspartate, différents points d'ancrage pour de futures fonctionnalisations notamment en radiomarquage ont été introduits par le biais d'acides glutamiques **II-146**, de cystéines **II-147** et de lysines **II-148**.

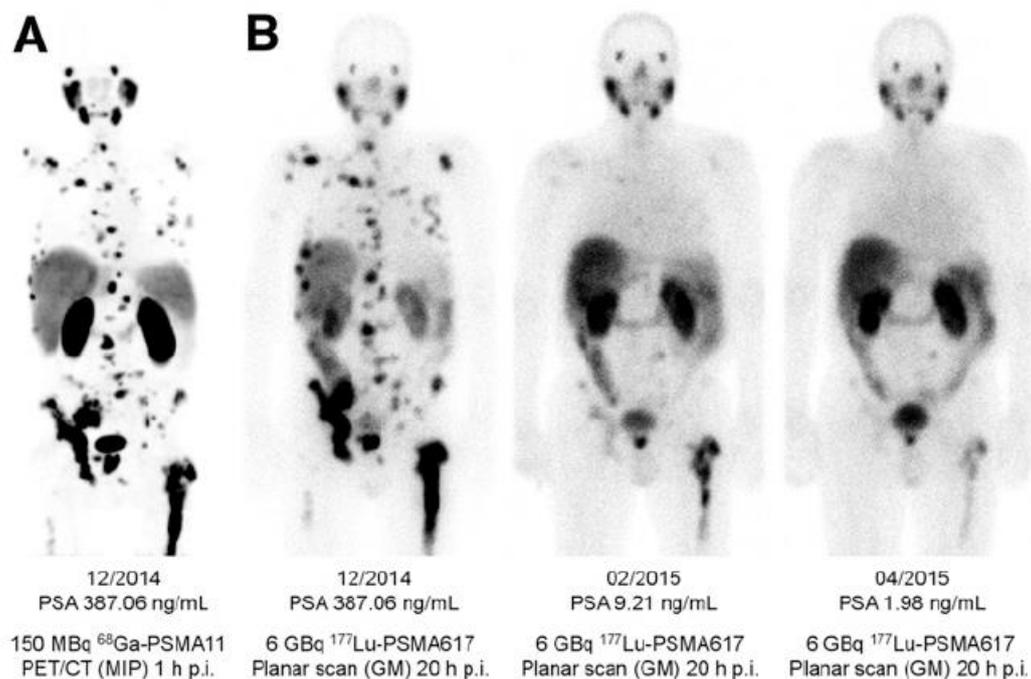


**Figure 117.** Structures de ligands pseudo-peptidiques du PSMA

L'utilisation de dérivés de lysines ont notamment conduit à plusieurs radioligands dont les applications en diagnostic et thérapeutiques ont été acceptées par la FDA ces dernières années (Figure 118). Le [<sup>68</sup>Ga]PSMA-11 **II-149** fut le premier radioligand accepté par cette organisation en 2020 pour le diagnostic par imagerie TEP de cancer de la prostate chez l'homme.<sup>261</sup> Un an après, un dérivé radiomarké au fluor-18, le [<sup>18</sup>F]DCFPyL **II-150**, a été accepté à son tour pour la même application mais en permettant sa plus large distribution sur le territoire américain.<sup>262</sup> Enfin, un dernier dérivé de cette structure, le [<sup>177</sup>Lu]PSMA-617 **II-151**, a également été accepté par la FDA pour le traitement par radiothérapie interne vectorisée du cancer de la prostate métastatique résistant à la castration (CPMRC).<sup>263</sup> Ce traitement a notamment pu conduire à d'impressionnantes rémissions même à des stades avancés comme illustré en Figure 119.<sup>264</sup> Ces trois structures semblent ainsi indiquer que de nombreuses modifications peuvent être effectuées sur cette chaîne latérale de lysine sans trop impacter l'affinité du ligand pour son récepteur PSMA. Ce pseudo-dipeptide semblait donc être l'application idéale de notre stratégie de radiomarquage de peptides par réaction de thia-Diels-Alder.



**Figure 118.** Structures du  $[^{68}\text{Ga}]$ PSMA-11 **II-149**,  $[^{18}\text{F}]$ -DCFPyL **II-150**,  $[^{177}\text{Lu}]$ PSMA-617 **II-151**



**Figure 119.** Image TEP obtenues avec  $^{68}\text{Ga}$ PSMA-11 (A) ou par CT avec  $^{177}\text{Lu}$ PSMA-617 (B) sur un patient atteint d'un CPMRC avant et après radiothérapie vectorisée interne à l'aide de  $^{177}\text{Lu}$ PSMA-617 II-151

### 3.3. Marquage d'un ligand pseudo-peptidique du PSMA

Nous nous sommes ensuite focalisés sur ce pseudo-dipeptide d'intérêt thérapeutique et diagnostic ligand du récepteur PSMA. Le dérivé fonctionnalisé par un groupement dithioester a été synthétisé à partir d'acide glutamique doublement protégé sous la forme d'esters de *tert*-butyle (Schéma 164). Ce composé de départ a permis de former la structure principale du ligand par couplage avec une lysine diprotégée après activation préalable par le triphosgène avec un excellent rendement de 89%. Le groupement Cbz présent sur ce dérivé **61** a pu être déprotégé par hydrogénolyse catalysée au Pd/C avec un rendement quantitatif. L'amine libre **62** ainsi obtenue a ensuite été acylée par le chlorure de 4-(chlorométhyl)benzoyle dans le DMF avec 78% de rendement pour obtenir **63**. Ce dernier a ensuite permis l'alkylation du sel de dithioester avec 73% de rendement et après une déprotection finale des esters *tert*-butyliques en présence de TFA nous avons pu obtenir le dérivé dithioester désiré **64** avec un rendement isolé de 75%.

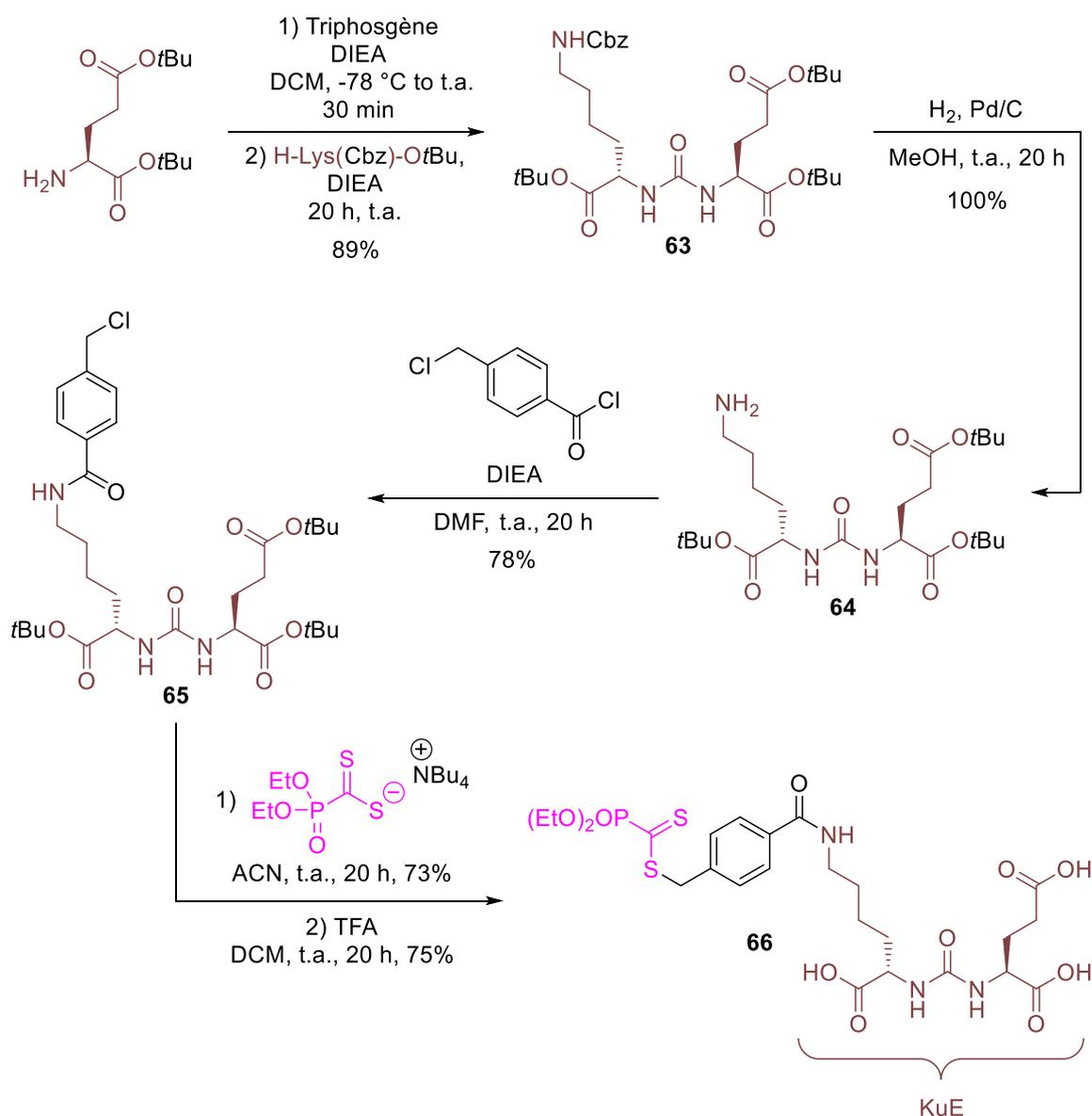
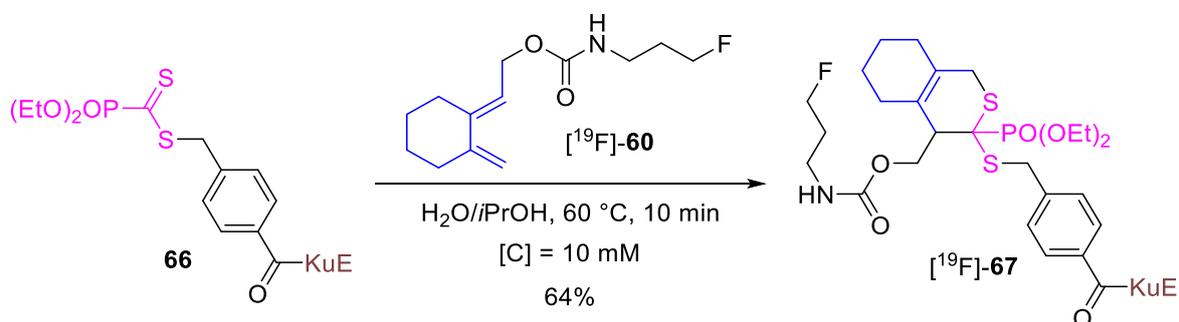


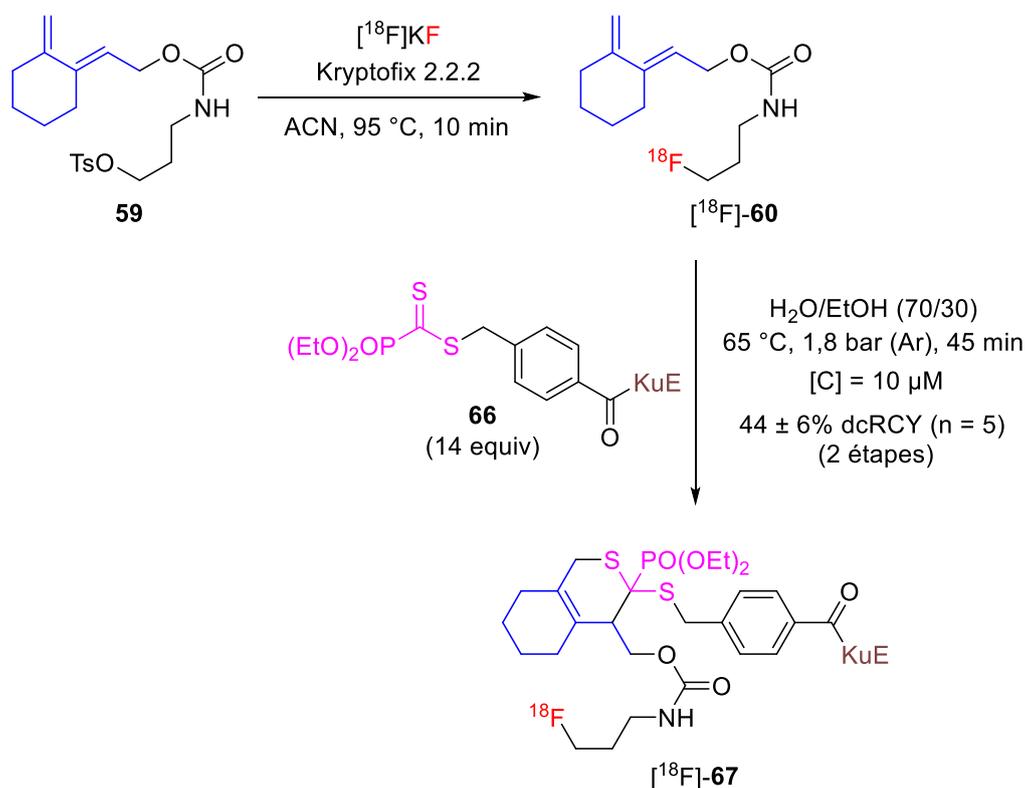
Schéma 164. Synthèse du ligand PSMA-dithioester **66**

A partir de ce dithioester **66** nous avons obtenu, par notre réaction de thia-Diels-Alder, les adduits non-radioactifs [<sup>19</sup>F]-**67** par réaction avec [<sup>19</sup>F]-**60** avec un rendement de 64% (Schéma 165). Ces adduits nous ont servis de référence pour la radiosynthèse qui a pu être effectuée dans des conditions très similaires à celles employées précédemment pour le radiomarquage de notre tripeptide modèle (Schéma 166). Le ligand radiomarqué du PSMA [<sup>18</sup>F]-**67** a ainsi été obtenu avec 44 ± 6% (n = 5) de dcRCY sur ces deux étapes avec une pureté radiochimique supérieure à 99% et toujours dans un temps inférieur à deux heures, synthèse, purification et formulation comprises. Comme précédemment, l'activité molaire de ce composé a pu être évaluée

à l'aide d'une courbe de calibration et une valeur très satisfaisante de  $80 \pm 20$  GBq/ $\mu$ mol ( $n = 3$ ) a été obtenue.

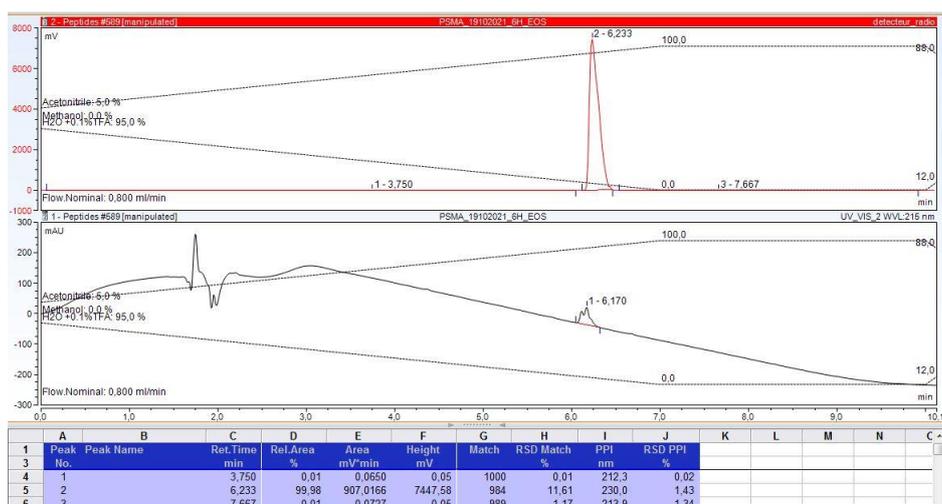


**Schéma 165.** Obtention des adduits froids par réaction de thia-Diels-Alder entre le diène fluoré [ $^{19}\text{F}$ ]-**60** et le dithioester **66**



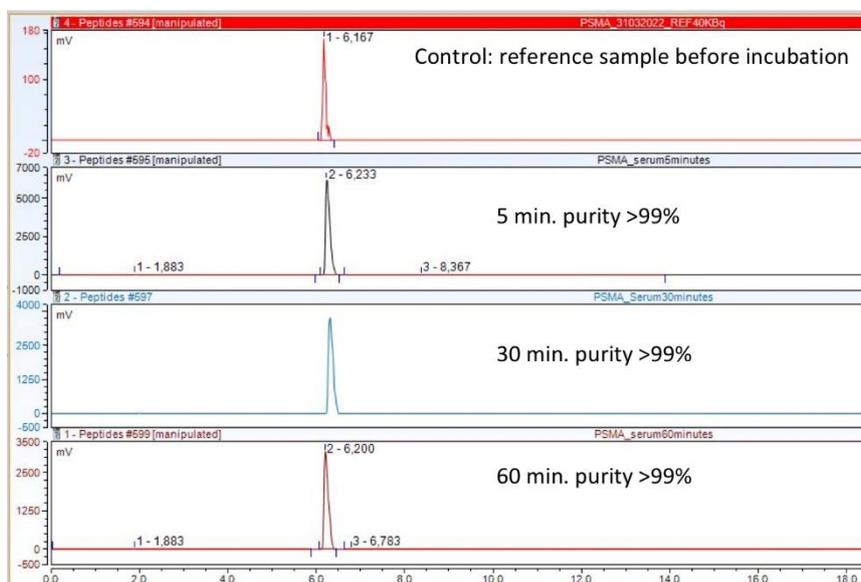
**Schéma 166.** Radiomarquage au fluor-18 du ligand du PSMA

Ce ligand radiomarqué [ $^{18}\text{F}$ ]-**67** du PSMA devant être évalué en tant que radiotraceur *in vivo* chez la souris xénotreffée à l'aide de cellules de cancer de la prostate exprimant ce récepteur, plusieurs mesures préalables ont été effectuées. Ainsi, six heures après la fin de la synthèse une pureté radiochimique de plus de 99% a été mesurée pour ce radioligand formulé dans l'éthanol (Figure 120).



**Figure 120.** Mesure de la stabilité chimique et radiochimique du radioligand [<sup>18</sup>F]-67

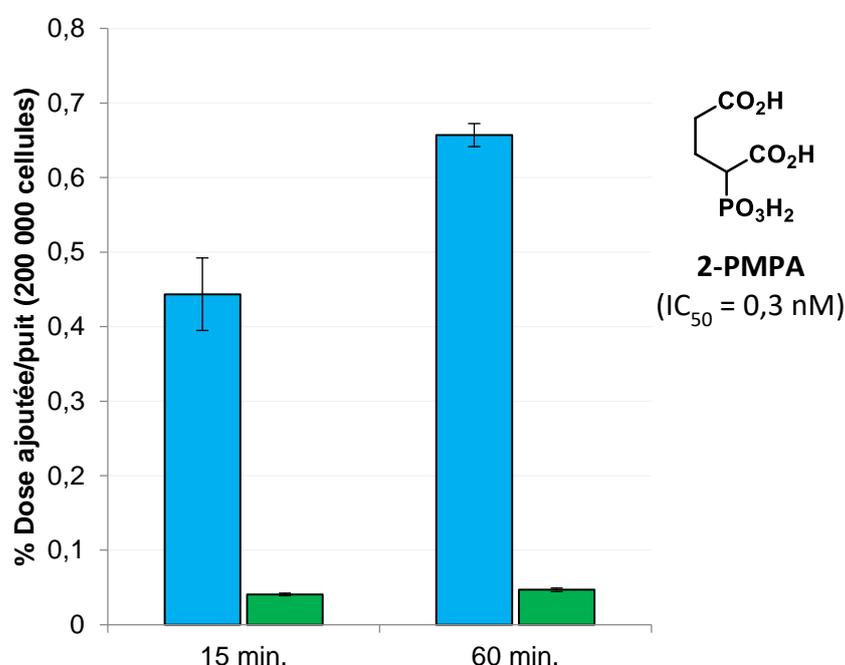
Une excellente stabilité a également été mesurée après 1 heure d'incubation dans du sérum pour [<sup>18</sup>F]-67, ou 2 heures dans du sang total de souris à 37 °C pour [<sup>19</sup>F]-67 (Figure 121).



**Figure 121.** Stabilité de [<sup>18</sup>F]-67 après différents temps d'incubation au sein de sérum de souris

La spécificité de ce nouveau radiotraceur pour son récepteur PSMA a tout d'abord été vérifiée lors d'expériences de captation cellulaire (Figure 122). Des cellules LNCaP ont été ici incubées en présence de [<sup>18</sup>F]-67 seul ou en compétition avec un excès de 2-PMPA, un ligand sélectif des récepteurs PSMA ( $IC_{50} = 0,3 \text{ nM}^{265}$ ). Après incubation,

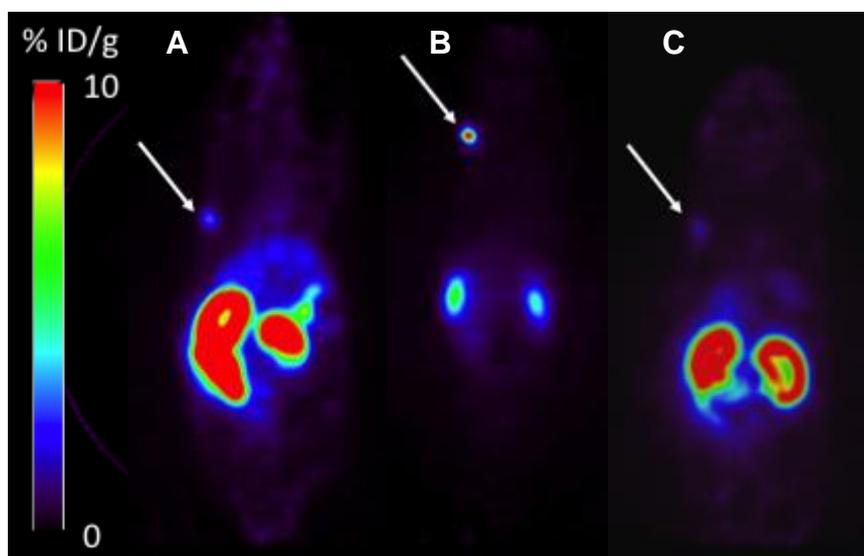
les cellules ont ensuite été lavées par une solution de NaCl 0,9%, dissoutes par une solution de NaOH 1 N et la solution obtenue a été comptée. Les valeurs ont ensuite été exprimées en pourcentage de la dose ajoutée par puit (%DA/p) et corrigées de la décroissance pour être ramenées au temps d'ajout du radiotracer sur les cellules. Lors de l'incubation avec [<sup>18</sup>F]-**67** seul, une captation à hauteur de 0,44%DA/p a pu être observée après 15 minutes et atteignant jusqu'à 0,66%DA/p après 60 minutes. En revanche, lors de l'incubation avec une solution de 2-PMPA et [<sup>18</sup>F]-**67**, cette captation a pu être fortement réduite à 0,04%DA/g (15 minutes) et 0,05%DA/g (60 minutes). Cette inhibition après compétition avec le 2-PMPA nous a ainsi permis de valider la spécificité de [<sup>18</sup>F]-**67** pour le récepteur PSMA sur cellules LNCaP.



**Figure 122.** Captation cellulaire de [<sup>18</sup>F]-**67** sur cellules LNCaP avec (vert) ou sans 2-PMPA (bleu)

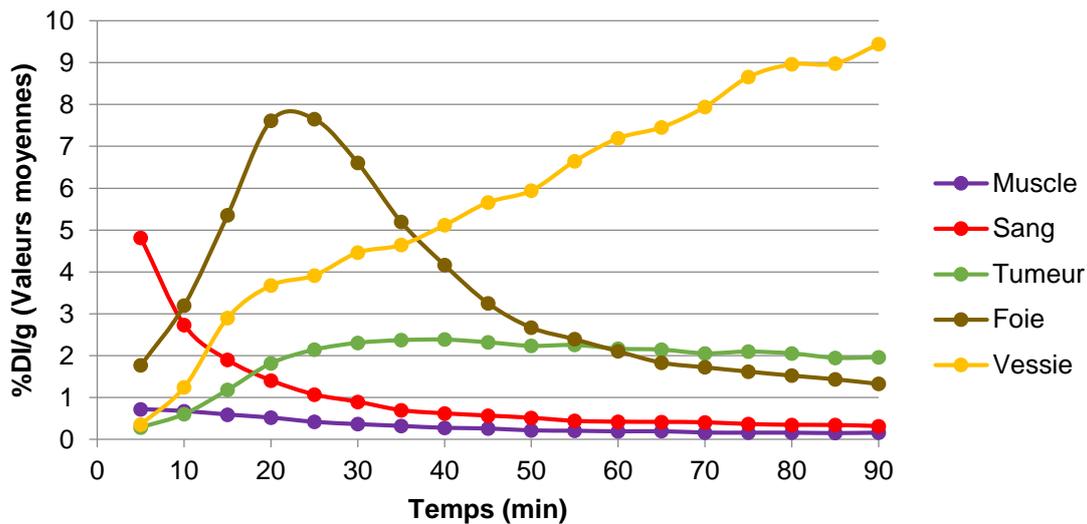
Les expériences d'imagerie ont ensuite été réalisées sur souris xénotransplantées à l'aide de cellules LNCaP en sous-cutané au niveau de l'épaule droite. La croissance tumorale a été poursuivie pendant au moins 35 jours mais seules des tumeurs de petites tailles ont pu être obtenues. Passé ce délai, chaque souris a été injectée avec environ 10 MBq de [<sup>18</sup>F]-**67** pour ensuite être imagée soit par 10 minutes d'acquisition statique une heure après injection, soit par acquisition dynamique directement après injection et pendant 90 minutes (18 images de 5 minutes). Des tumeurs ayant des

tailles fonctionnelles inférieures à 100 mm<sup>3</sup> ont pu être ainsi détectées efficacement par cette méthode (Figure 123). Ces images montrent également une captation importante des reins, un phénomène attendu au vu de la surexpression du récepteur PSMA au sein de cet organe.

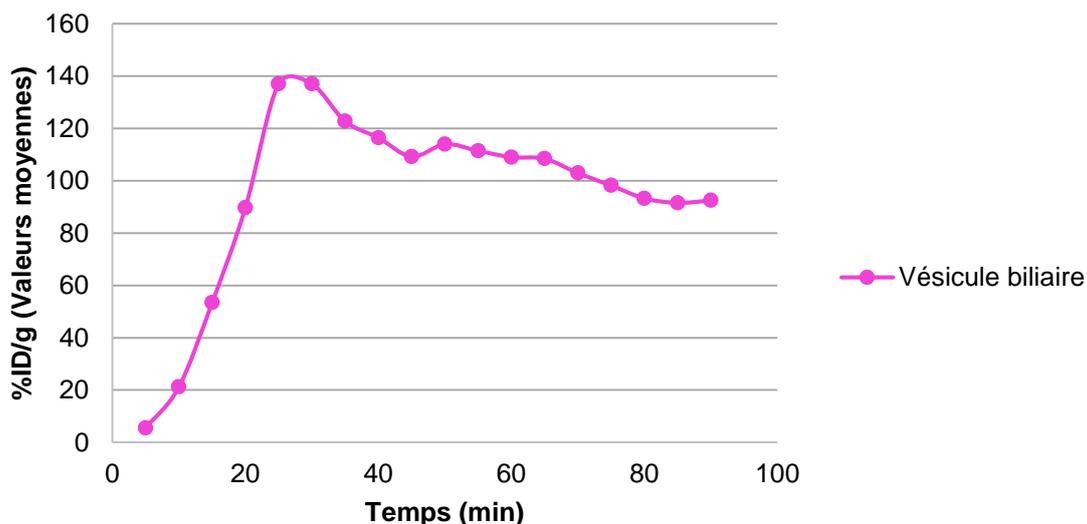


**Figure 123.** Sélection de plan coronaires de souris porteuses de tumeurs LNCap 60 minutes après injection *i.v.* d'environ 10 MBq de [<sup>18</sup>F]-**67** (A: Souris #525, 10,85 MBq ; B : Souris #529, 8,36 MBq ; C : Souris #530, 11,56 MBq). L'échelle est comprise entre 0 et 10% de la dose injectée par gramme. Les flèches blanches pointent vers les tumeurs

Enfin, des acquisitions dynamiques ont permis de mettre en évidence l'élimination rapide du compartiment sanguin de [<sup>18</sup>F]-**67** par la voie hépato-biliaire sans accumulation de ce dernier au sein du foie (Figure 124 et Figure 125). Cette élimination hépato-biliaire semble avoir lieu sans dégradation du radioligand, en effet seul [<sup>18</sup>F]-**67** a pu être observé au sein d'échantillons extraits à partir de foie et de vésicules biliaires de nos souris. Cette observation a pu être confirmée par la suite à l'aide d'une évaluation de la stabilité de [<sup>19</sup>F]-**67** au sein de microsomes de souris. Ce dernier a présenté une excellente stabilité dans ce milieu avec 90% de l'échantillon toujours intacte après une heure d'incubation.



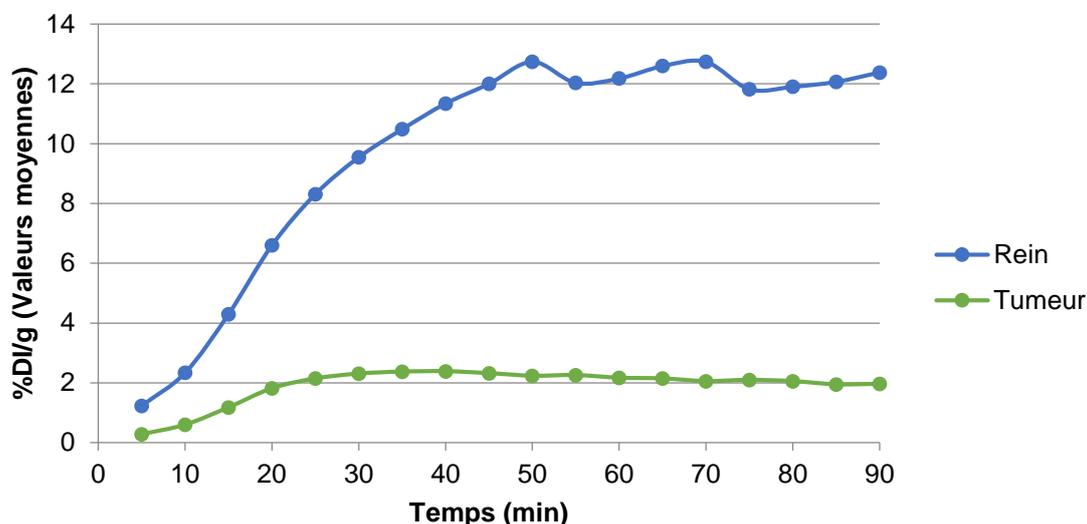
**Figure 124.** Valeurs de %DI/g mesurées au cours du temps au sein de différents organes chez la souris après injection *i.v.* de [ $^{18}\text{F}$ ]-67



**Figure 125.** Valeurs de %DI/g mesurées au cours du temps au sein de la vésicule biliaire chez la souris après injection *i.v.* de [ $^{18}\text{F}$ ]-67

La captation rénale a pu être observée de nouveau par acquisition dynamique et apparaît ici sous la forme d'un plateau à hauteur de 12%DI/g. L'obtention de ce plateau semble ici confirmer l'existence d'une interaction entre [ $^{18}\text{F}$ ]-67 et les tissus rénaux. En effet, dans le cas d'une simple élimination rénale de notre radiotraceur, une décroissance de cette captation aurait dû être observée comme pour le foie ci-dessus. Cette interaction spécifique a finalement pu être démontrée lors d'une expérience *in vivo* de compétition entre notre radiotraceur et le 2-PMPA. Après co-injection d'un large

excès de ce dernier, aucun signal provenant des reins n'a pu être détecté, confirmant une interaction spécifique de [<sup>18</sup>F]-67 avec les récepteurs PSMA présents sur cet organe.



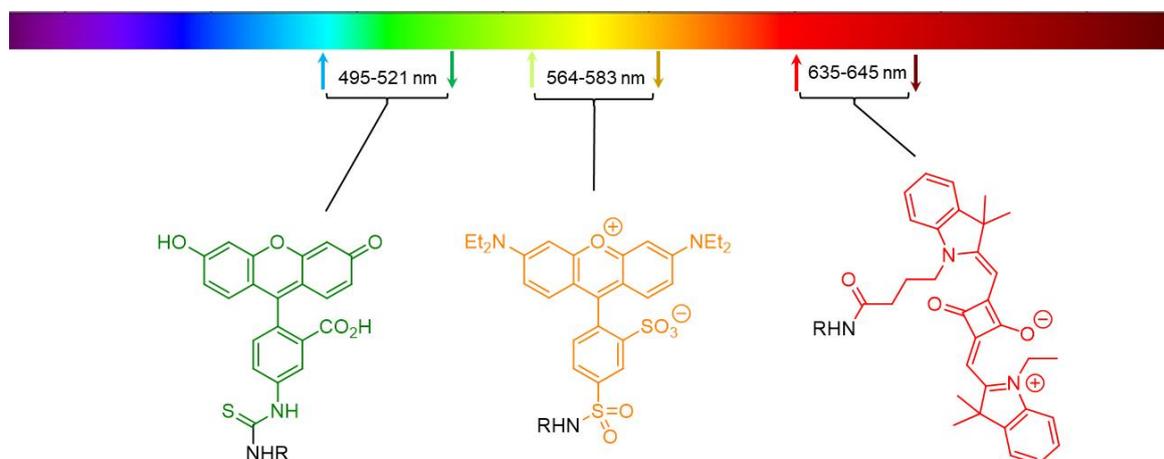
**Figure 126.** Valeurs de %DI/g mesurées au cours du temps au niveau des reins et de la tumeur chez la souris après injection *i.v.* de [<sup>18</sup>F]-67

#### 4. Application au marquage de peptides par des fluorophores

##### 4.1. Synthèses des précurseurs diéniques

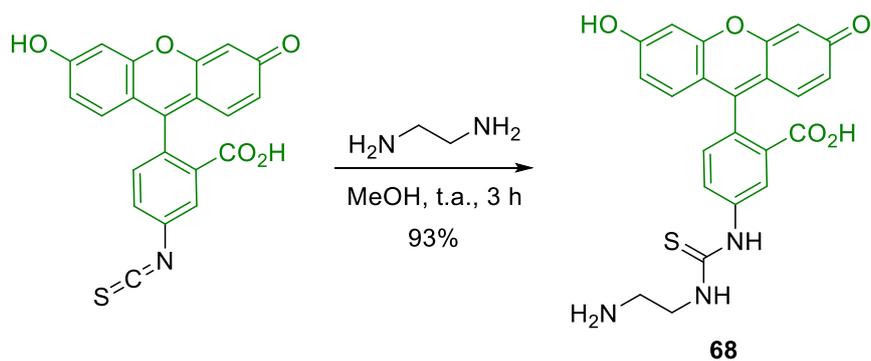
Suite à cette première étude de radiomarquage, nous nous sommes ensuite intéressés au marquage de phosphonodithioester-peptides à l'aide de divers fluorophores-diènes. Nous avons tout d'abord sélectionné trois fluorophores couvrant la gamme du visible du vert jusqu'au rouge (Figure 127), la fluorescéine ( $\lambda_{\text{abs}} \approx 495 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \approx 520 \text{ nm}$ ),<sup>266</sup> la lissamine rhodamine B ( $\lambda_{\text{abs}} \approx 565 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \approx 585 \text{ nm}$ )<sup>267</sup> et un dérivé de squaraine ( $\lambda_{\text{abs}} \approx 635 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \approx 645 \text{ nm}$ ).<sup>268</sup> Ces deux premiers fluorophores représentent déjà des outils d'intérêt en imagerie par fluorescence pour des applications en chémobiologie.<sup>269</sup> Le dérivé de squaraine employé dans cette étude est cependant beaucoup plus récent et a été développé au sein de notre groupe en 2015.<sup>268</sup> Les squaraines présentent des longueurs d'onde d'émission proche de la fenêtre thérapeutique<sup>270</sup> (« biological window ») qui pourrait mener à des applications en imagerie *ex vivo* et/ou *in vivo*. De plus, ces structures présentent des propriétés

fluorogènes en fonction de la polarité du solvant avec un rendement quantique qui chute modérément du dioxane vers l'eau.<sup>268</sup>

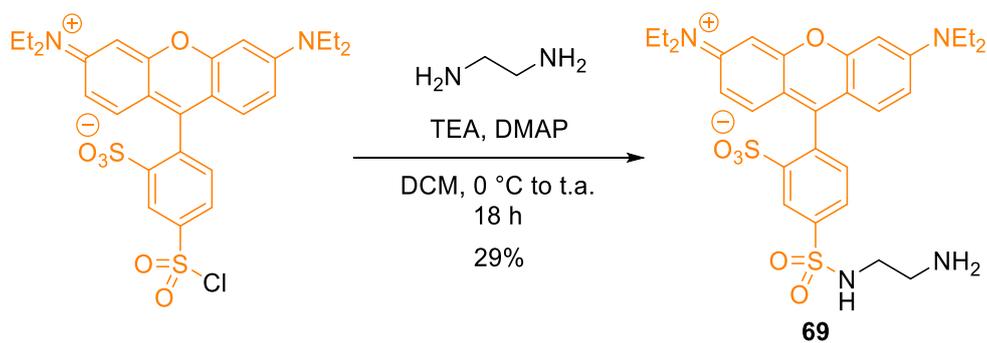


**Figure 127.** Structures et propriétés photo-physiques des fluorophores sélectionnés

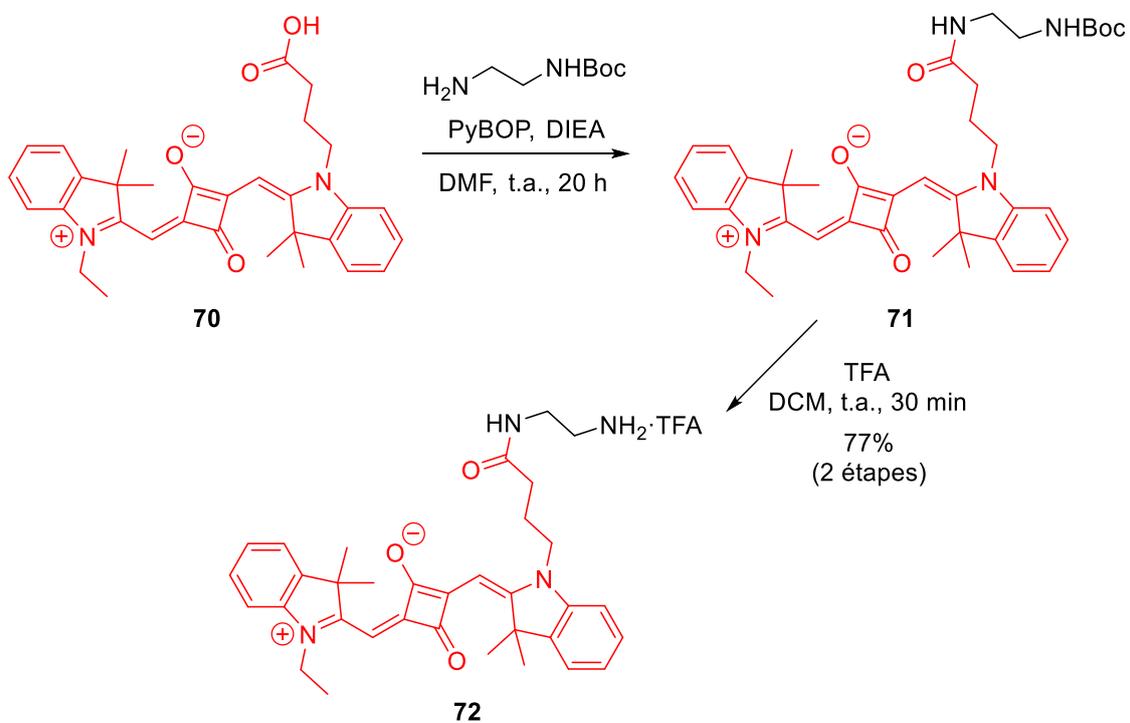
Pour obtenir nos différents fluorophore-diènes, nous avons opté pour une stratégie employant l'éthylènediamine comme linker entre ces deux partenaires. Nous avons donc commencé par faire réagir cette diamine sur divers précurseurs de fluorophores. La fluorescéine isothiocyanate a tout d'abord donné le dérivé thiourée **68** correspondant avec un excellent rendement de 93% (Schéma 167). A partir du dérivé de lissamine rhodamine B portant un chlorure de sulfonyle, la sulfonamide **69** a pu être obtenu avec un rendement faible de 29% (Schéma 168). Ce rendement peut s'expliquer par le fait que le chlorure de sulfonyle étant synthétisé au laboratoire, la présence du dérivé hydrolysé dans l'échantillon de départ est envisageable, réduisant ainsi le rendement. Enfin à partir d'une squaraine, elle aussi obtenue au laboratoire, il a été possible de coupler la *N*-Boc-éthylènediamine avec **70** à l'aide de PyBOP comme agent de couplage puis de déprotéger le groupement Boc en présence de TFA pour donner le produit **72** désiré avec un rendement de 77% sur ces deux étapes (Schéma 169).



**Schéma 167.** Synthèse du précurseur fluorescéine **68**



**Schéma 168.** Synthèse du précurseur lissamine rhodamine B **69**



**Schéma 169.** Obtention en deux étapes du précurseur squaraine **72**

Par la suite, ces trois précurseurs ont été couplés à nos diènes par réactions avec les carbonates activés correspondants **44** et **59** (Schéma 170). De cette façon, les diènes acyclique **73** et exocyclique **74** couplés à la fluorescéine ont été obtenus avec des rendements respectifs de 55% et 50%. Le diène **75** couplé à la lissamine rhodamine B a quant à lui été isolé avec 63% de rendement et celui couplé à la squaraine, **76**, a été obtenu avec 93% de rendement.

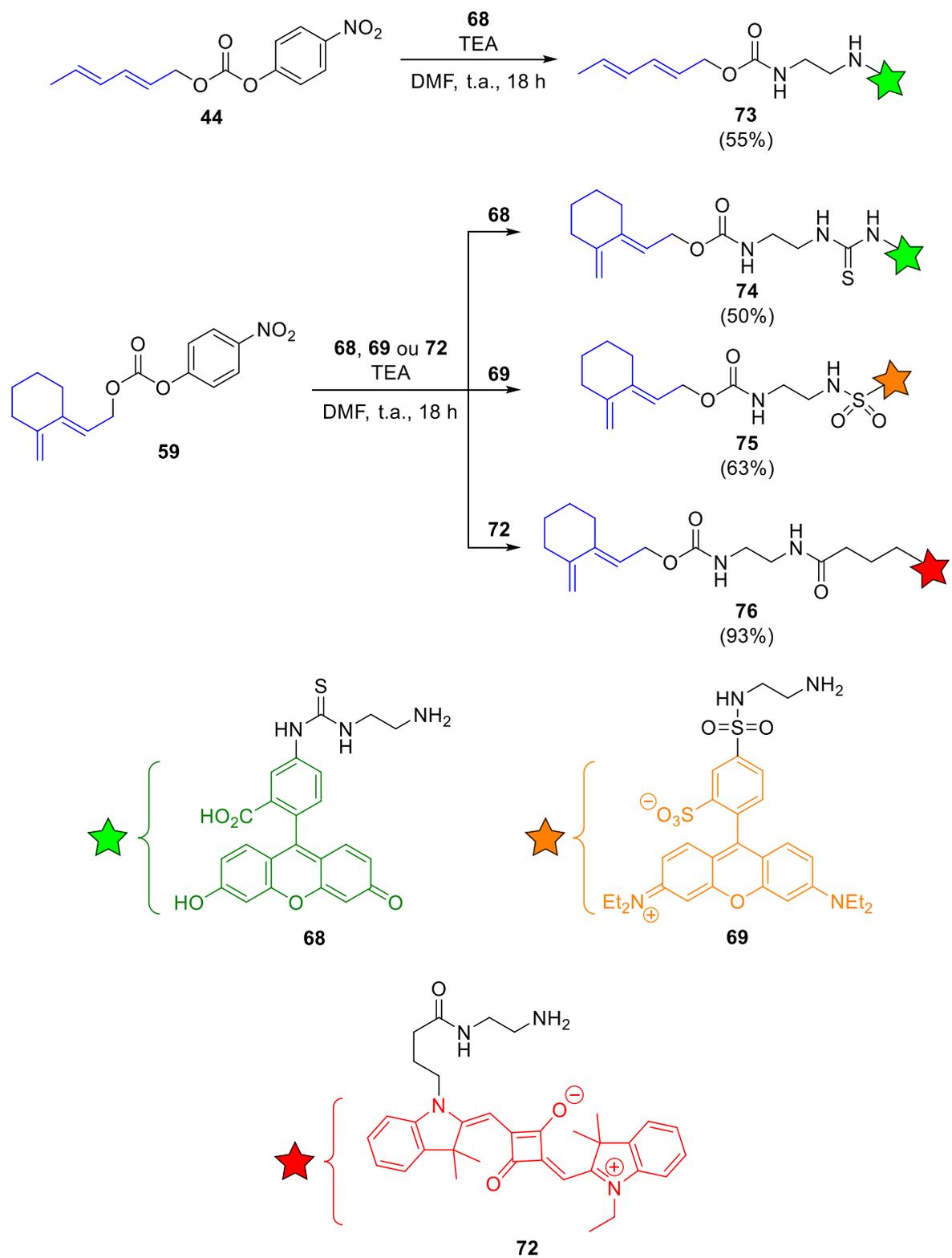
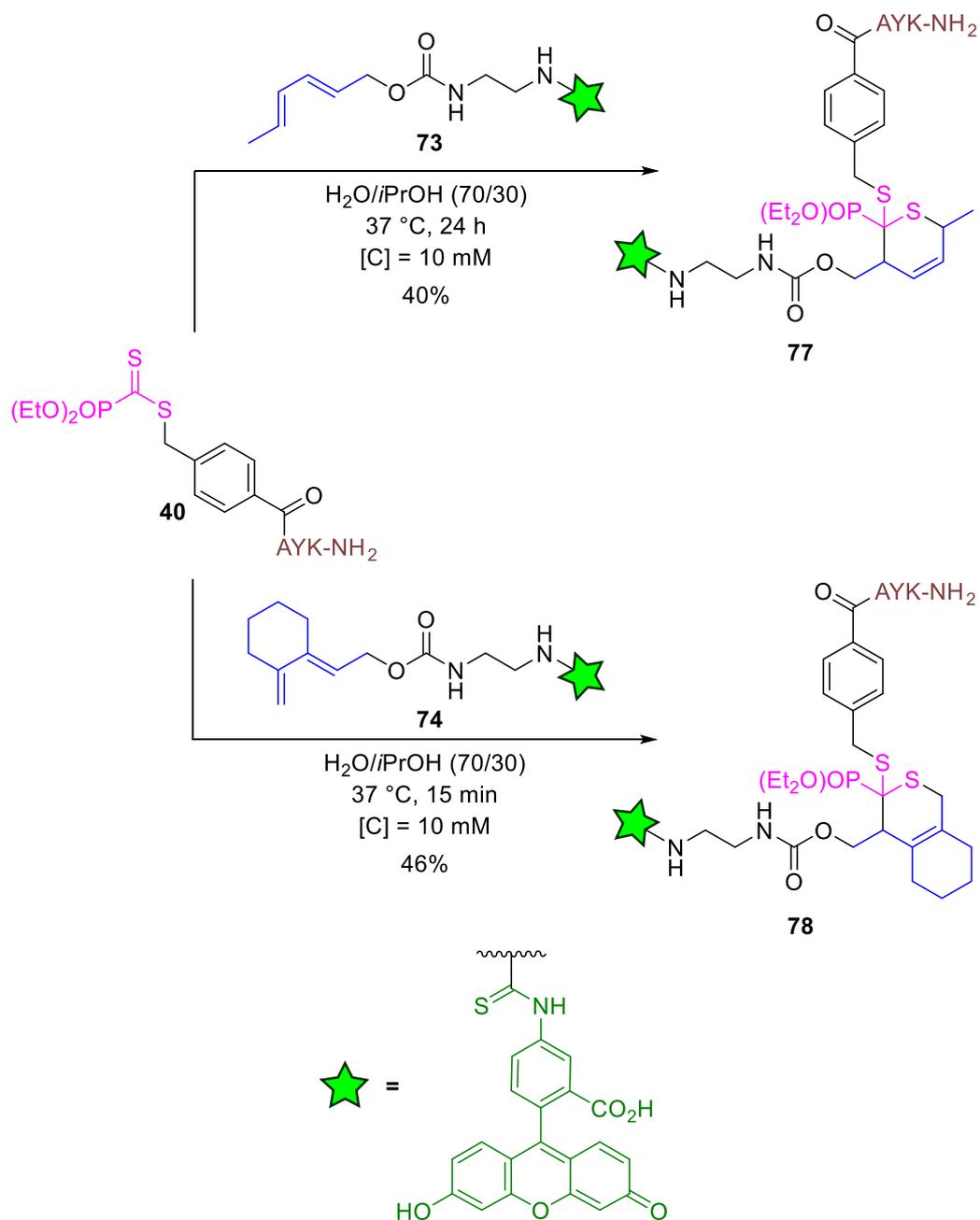


Schéma 170. Couplage des diènes et fluorophores

#### 4.2. Marquage d'un tripeptide modèle en conditions douces

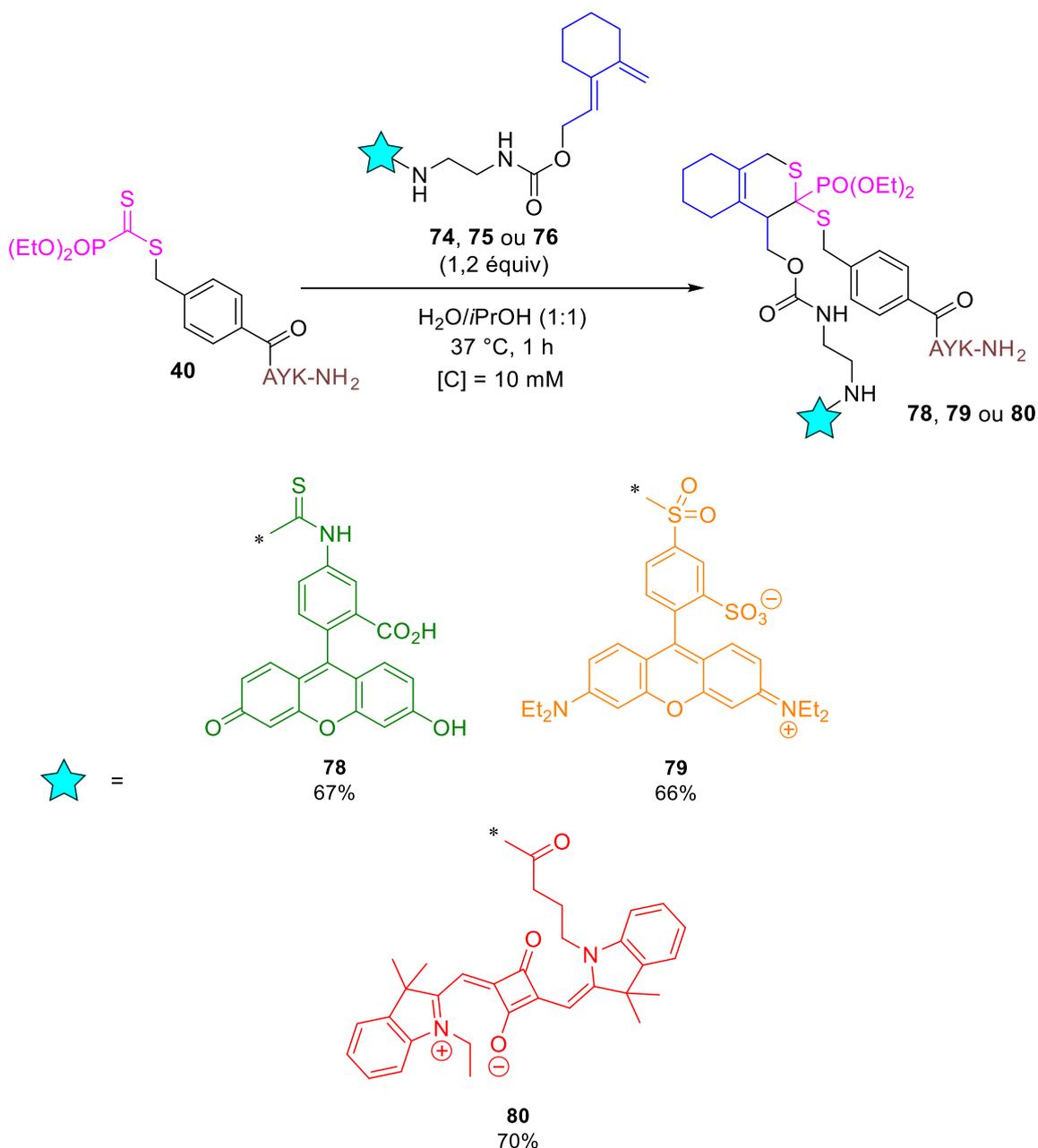
L'objectif de cette partie étant de développer une méthode généralisable de marquage de peptides par des fluorophores, nous avons décidé de modifier les conditions utilisées précédemment en fluor-18 pour obtenir des conditions plus douces. En effet, les stabilités thermique et photophysique limitées de certains fluorophores requièrent des réactions de marquage réalisées dans des conditions douces et dans des temps les plus courts possibles. Nous avons donc décidé de diminuer la température de notre réaction à 37 °C et de mesurer les temps de réactions nécessaires pour nos deux fluorescéine-diènes **73** et **74** en réaction de thia-Diels-Alder avec le phosphonodithioester **40**. Comme attendu, plusieurs heures ont été nécessaires au diène acyclique **73** pour atteindre une conversion totale (Schéma 171) là où le diène exocyclique **74** n'a nécessité que 15 min environ. Les rendements obtenus ici de 40% pour le diène acyclique et 46% pour le diène exocyclique sont légèrement inférieurs à ceux obtenus dans l'application précédente, mais restent convenables au vu des faibles quantités employées dans ces réactions.



**Schéma 171.** Marquage du tripeptide modèle par réaction de thia-Diels-Alder avec les diènes **73** et **74**

La fluorescéine étant plutôt soluble en milieu aqueux, l'utilisation d'un mélange 70/30 d'eau et d'isopropanol a permis de solubiliser l'ensemble des réactifs et produits. En revanche lors de l'utilisation des dérivés de lissamine rhodamine B et de squaraine, une faible solubilité des dérivés diéniques a été observée en début de réaction (Schéma 172). Pour répondre à cette limitation, nous avons décidé d'augmenter la proportion d'isopropanol dans le mélange de solvant pour arriver à un ratio de 1:1 permettant un bon équilibre entre solubilité et cinétique de réaction. Pour compenser

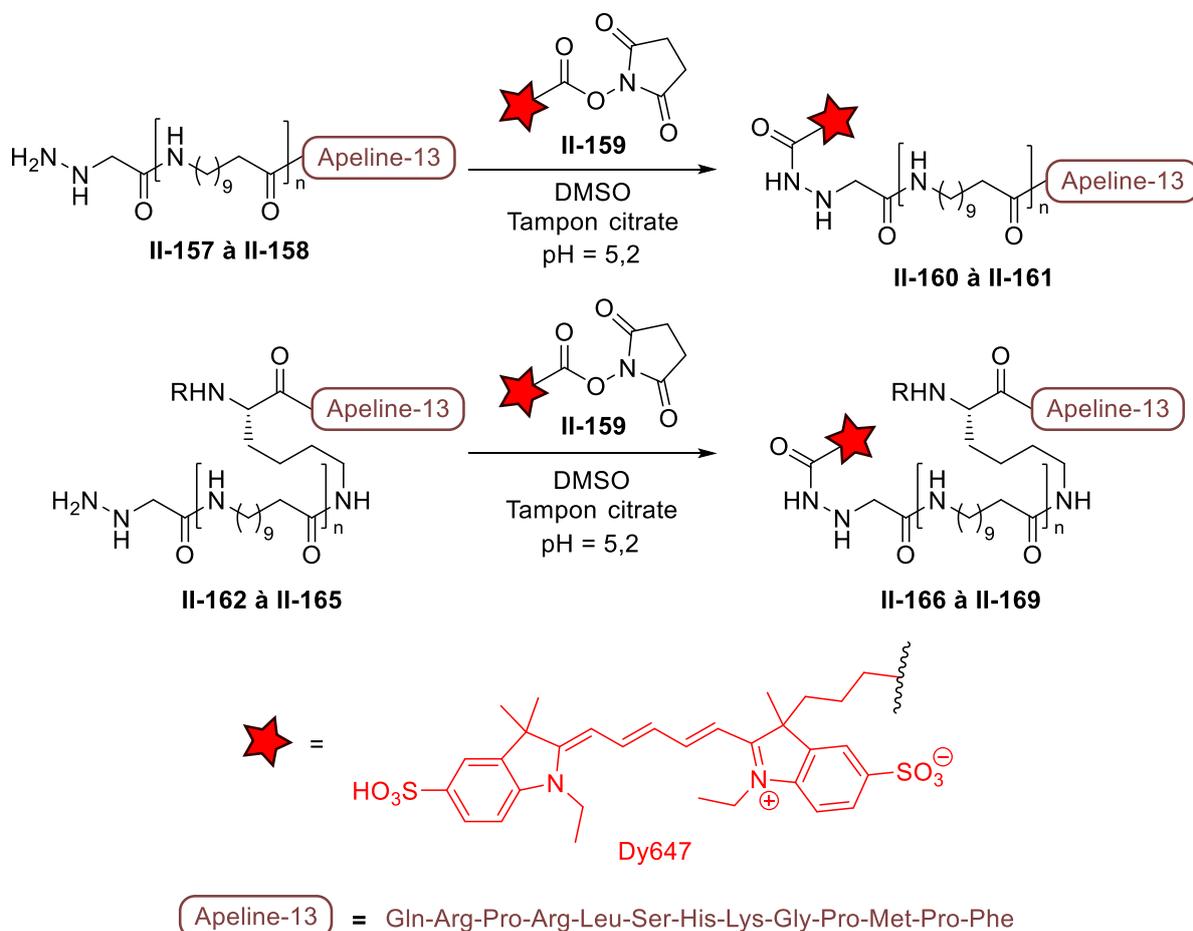
la possible perte de cinétique due à l'augmentation de la proportion d'isopropanol dans le milieu, nous avons décidé d'employer 1,2 équivalents de fluorophore-diène. Dans ces conditions, notre tripeptide a pu être marqué par les trois fluorophores dans des conditions douces et sans catalyseur en une heure pour conduire à **78**, **79** ou **80** avec de très bons rendements compris entre 66 et 70% (Schéma 172).



**Schéma 172.** Marquage du tripeptide modèle par trois fluorophores via la réaction de thia-Diels-Alder



récepteur, plusieurs groupes ont utilisé des dérivés d'apeline modifiés par des fluorophores<sup>273,281</sup> mais très peu de ligands fluorescents ont été décrits dans la littérature. Notre groupe s'est intéressé à cette question en 2016 via la modification de l'apeline-13 par un fluorophore émettant dans le rouge lointain, le Dy647.<sup>282</sup> Pour permettre cette fonctionnalisation, un motif hydrazino-glycine a préalablement été introduit en position *N*-terminale. Par la suite, une réaction d'acylation chimiosélective du motif hydrazino-glycine à pH 5,2 a pu être effectuée, malgré la présence d'une lysine dans la séquence peptidique (Tableau 24). Différents espaceurs ont été employés entre le peptide et ce motif hydrazine pour obtenir après ligation, six ligands fluorescents du récepteur APJ avec de bons rendements allant de 37% à 70%. Ces différents ligands ont également conservé leur affinité pour le récepteur APJ avec des valeurs de  $K_i$  du même ordre que pour la pyr-apeline-13 de départ ( $0,37 \pm 0,14$  nM) confirmant la possibilité de modifier la position *N*-terminale sans perturbation de l'activité du peptide.



Composé	n	R	Rendement	Affinité (nM)
II-160	0	-	70%	1,70 ± 0,20
II-161	1	-	65%	1,51 ± 0,08
II-166	0	H	37%	1,15 ± 0,24
II-167	1	H	46%	0,44 ± 0,09
II-168	0	Ac	49%	4,77 ± 0,70
II-169	1	Ac	58%	2,17 ± 0,17

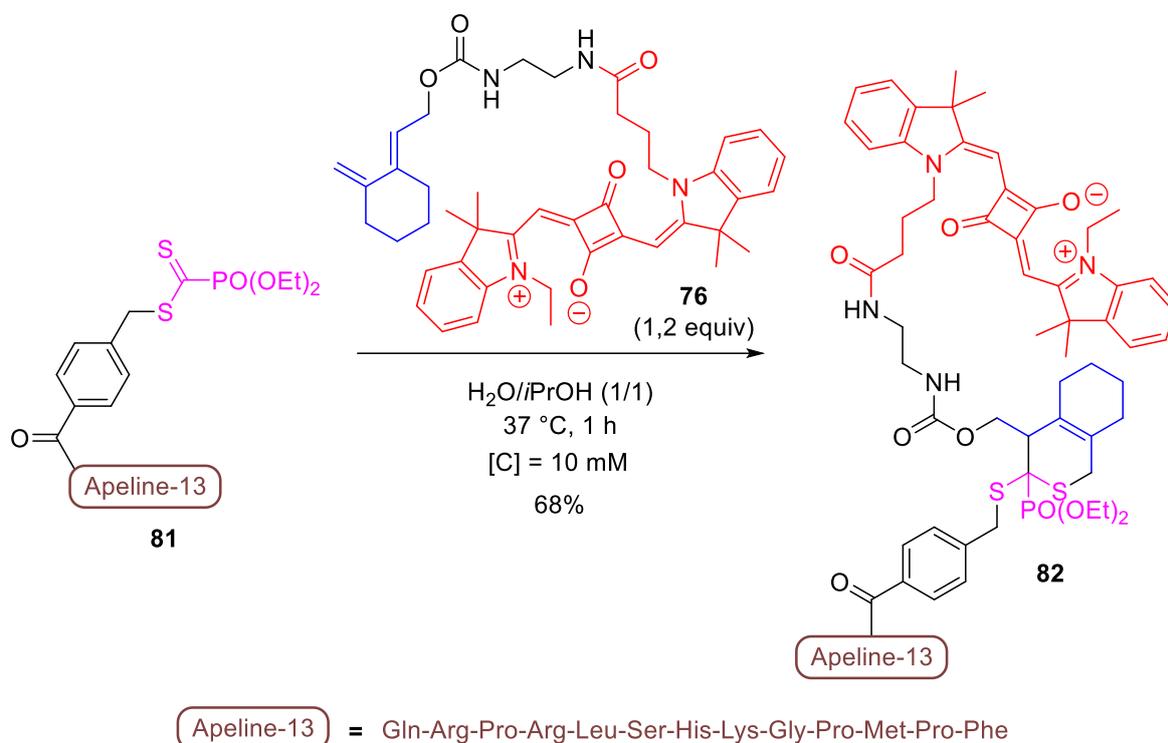
**Tableau 24.** Fonctionnalisation de l'apeline-13 par le Dy647 et affinités des ligands obtenues par mesure en radioliation

La méthode d'acylation chimiosélective d'une fonction hydrazine par un fluorophore activé sous la forme d'un ester de *N*-hydroxysuccinimide permet le marquage efficace du peptide par un fluorophore. En présence de résidus Lys dans la séquence du peptide, la réaction conduit cependant à la formation de 5 à 10% d'un dérivé diacylé. La réaction de thia-Diels-Alder doit permettre la fonctionnalisation du peptide avec une meilleure chimiosélectivité, malgré la présence de plusieurs nucléophiles dans la séquence de l'apeline-13.

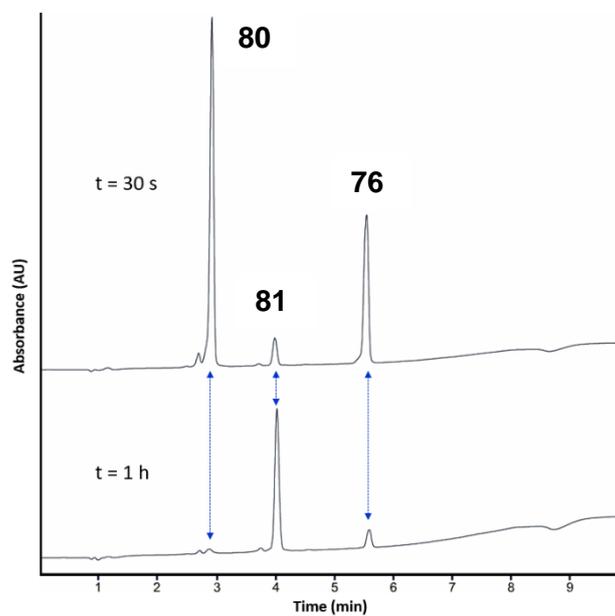
#### 4.2. Marquage de l'apeline-13 et microscopie

Nous avons donc choisi d'appliquer cette réaction au marquage d'un peptide d'intérêt thérapeutique connu du laboratoire, l'apeline-13. Ce peptide de treize acides aminés a été fonctionnalisé dans un premier temps par une fonction dithioester via la stratégie décrite précédemment avec un rendement de 24%. Par la suite, ce peptide-dithioester **81** a été mis en réaction dans les conditions développées précédemment en présence d'un léger excès de squaraine-diène **76** (1,2 équivalents) pour donner le peptide marqué **82** après une heure de réaction à 37 °C (Schéma 173). **82** est le seul produit de réaction (Figure 129) permettant ainsi une purification simple en phase inverse (H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA /ACN + 0,1% TFA). Une fois ce produit isolé, nous avons cependant rapidement observé une dégradation par oxydation de notre bioconjugué **82** même lorsque ce dernier était conservé dans l'obscurité à - 20 °C. Nous avons pu ensuite éviter ceci par utilisation d'acide acétique à 0,1% au sein des phases mobiles en remplacement du TFA, et obtenir notre bioconjugué **82** avec un très bon rendement

de 68% et une pureté supérieure à 95%, stable dans le temps, même après plusieurs mois au congélateur.

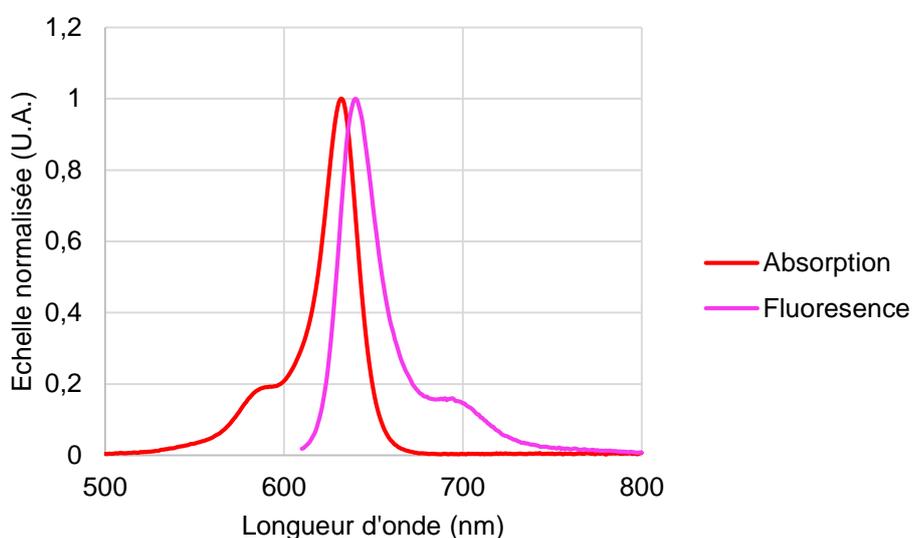


**Schéma 173.** Marquage de l'apeline-13 par réaction de thia-Diels-Alder avec le squaraine-diène **76**



**Figure 129.** Evolution de la réaction entre **76** et **81** après 1 h à  $37\text{ }^\circ\text{C}$

Les spectres d'absorption et d'émission de ce nouveau composé **82** ont ensuite été mesurés dans le méthanol (Figure 130) et ont présenté une allure similaire à ceux obtenus pour le fluorophore seul **70** avec un déplacement de Stokes faible (~ 10 nm).<sup>268</sup> Par la suite, nous avons également souhaité évaluer le caractère solvatochrome et fluorogène de notre sonde **82** en utilisant différents solvants de polarité décroissante : le dioxane, le DMF, l'éthanol, le méthanol, l'eau (Tableau 25). On retrouve ici les mêmes caractéristiques que celles du fluorophore seul **70** avec de faibles variations pour chaque maxima (sur une gamme de 10 nm) en fonction de la polarité du solvant employé. Les dérivés semblent donc faiblement solvatochromes.



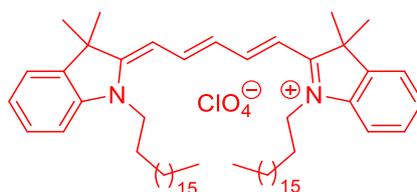
**Figure 130.** Superposition des spectres normalisés d'absorption et d'émission de fluorescence de **82** dans l'éthanol

Solvant	Absorption (nm)		Emission (nm)	
	70	82	70	82
1,4-dioxane	638	639	643	648
DMF	640	641	648	650
EtOH	631	632	636	641
MeOH	628	630	635	638
Eau	623	630	630	639
HEPES	-	630	-	639
HEPES/BSA 0,1%	-	638	-	646

**Tableau 25.** Propriétés d'absorption et d'émission de **70** et **82** dans différents solvants

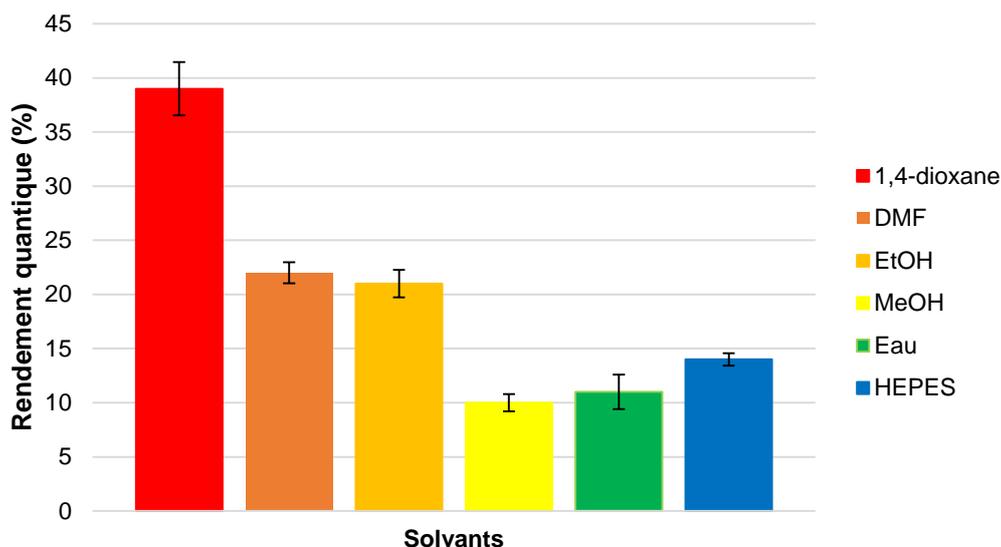
Un travail similaire a également été effectué en mesurant le rendement quantique de **82** dans les mêmes solvants afin d'évaluer le caractère fluorogène de cette nouvelle sonde. Les rendements quantiques ont été calculés ici par mesure relative à l'aide de l'équation (E5) développée à partir des travaux de Demas et Crosby<sup>283</sup> en prenant le DiD comme fluorophore de référence (Figure 131). Plusieurs paramètres photophysiques interviennent dans cette équation : le rendement quantique ( $\Phi$ ) l'absorbance ( $A$ ), l'aire du spectre de fluorescence ( $S$ ) et l'indice de réfraction des solvants employés ( $n$ ). Ces paramètres sont tous assignés d'un indice correspondant à la molécule considérée : « S » pour la molécule d'intérêt et « R » pour la référence.

$$\frac{\Phi_S}{\Phi_R} = \frac{1 - 10^{-A_R}}{1 - 10^{-A_S}} \times \frac{S_S}{S_R} \times \frac{n_S^2}{n_R^2} \quad (E5)$$



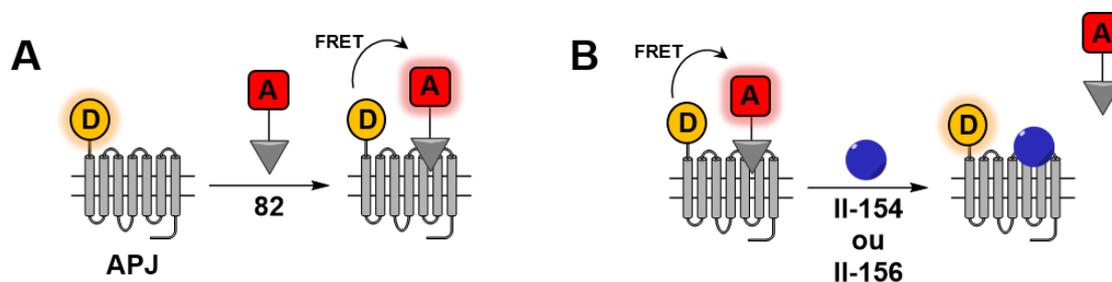
**Figure 131.** Structure du fluorophore DiD

Les valeurs obtenues pour **82** ont démontré un caractère fluorogène intéressant (Figure 132) avec une forte diminution de la fluorescence entre le dioxane et le tampon HEPES (TURN-ON de 2,79). L'ensemble de ces valeurs sont représentées ci-après en Figure 132. Ce phénomène est bien connu pour les fluorophores de type squaraine et représente un avantage important pour des applications en imagerie optique sur cellule. En effet, ce type de fluorophore possédant à la fois une fluorescence exaltée en environnement hydrophobe, à proximité des récepteurs membranaires par exemple, et très faible en solution aqueuse, des images cellulaires peuvent être obtenues sans lavage préalable du fluorophore restant en solution, ce dernier n'y fluorescant que très peu.



**Figure 132.** Influence de la polarité du solvant sur le rendement quantique de notre sonde **82**

L'affinité de **82** pour le récepteur APJ a ensuite été évaluée dans un essai utilisant le transfert d'énergie par résonance de type Förster résolu en temps (TR-FRET). Dans cet essai, le récepteur APJ est préalablement fonctionnalisé par un fluorophore, le lumi-4-Tb, capable d'interagir par FRET avec la sonde fluorescente venant se lier au récepteur. Cette liaison peut être évaluée en suivant le rapport des intensités de fluorescence (HTRF ratio) à 665 nm (sonde) sur 620 nm (lumi-4-Tb). La squaraine présente au sein de **82** possède en effet des propriétés d'absorption lui permettant de jouer le rôle d'accepteur de FRET dans le cadre d'un essai de saturation ou de compétition (avec **II-154** ou **II-156**) sur récepteur APJ exprimant l'enzyme SNAPtag et marqué au lumi-4-Tb (Figure 133).



**Figure 133.** Principe des expériences de saturation (A) et compétition (B) par TR-FRET

Afin de limiter les interactions entre notre sonde fluorescente et le plastique, nous avons dû employer un tampon contenant 0,5% d'acide pluronique au cours de ces essais. Cet essai nous a permis d'obtenir une courbe de saturation conduisant à un  $K_d$  de  $0,17 \pm 0,03$  nM pour cette sonde fluorescente **82**, confirmant la possibilité d'employer cette réaction de thia-Diels-Alder pour le marquage de peptides sans altérer leur affinité (Figure 134). Des expériences de compétition ont également été réalisées avec des ligands connues du récepteur APJ : la pyr-Apeline-13 (pE13F) et l'Apeline-17 (K17F). Le déplacement de notre sonde fluorescente par ces derniers a été réalisé avec succès et a permis d'obtenir les  $K_i$  de ces deux peptides :  $2,28 \pm 0,58$  nM pour l'apeline-13 et  $0,036 \pm 0,022$  nM pour l'apeline-17 (Tableau 26). Ces valeurs sont proches des affinités décrites dans la littérature par Valencia *et al.*<sup>284</sup> en TR-FRET ou par Iturrioz *et al.*<sup>273</sup> en radioliation permettant de valider la spécificité de **82** pour le récepteur APJ

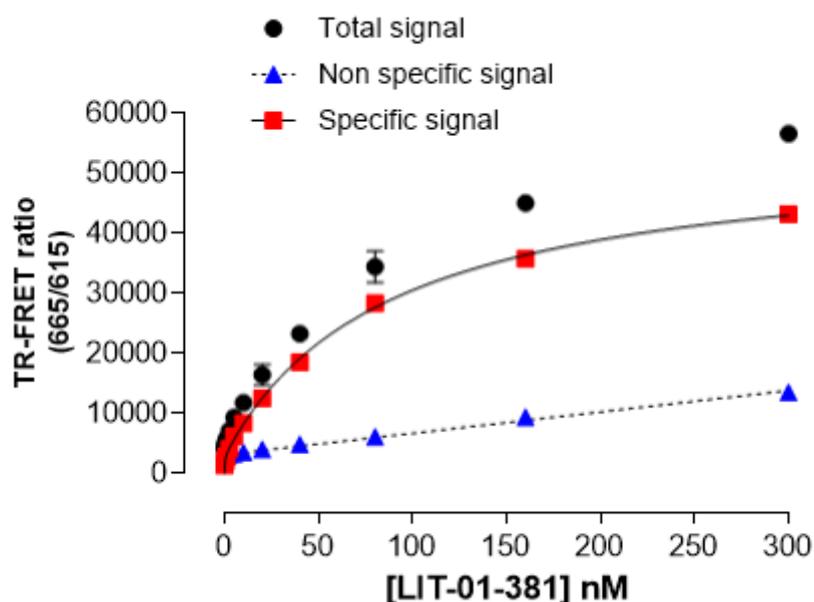
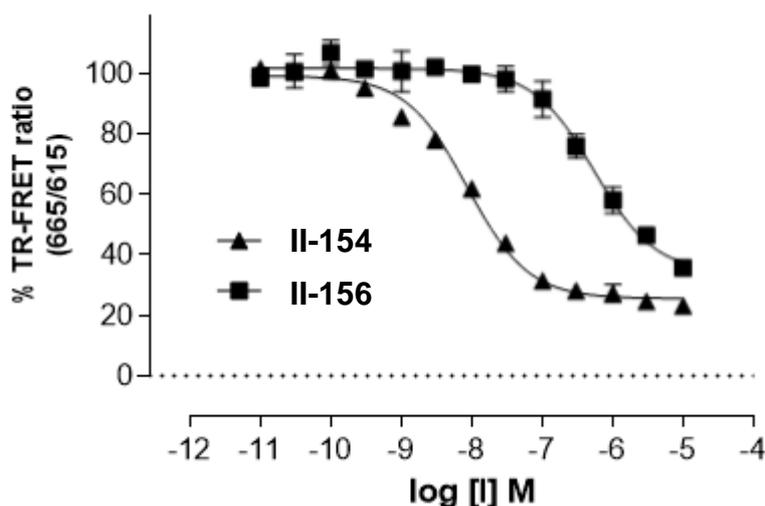


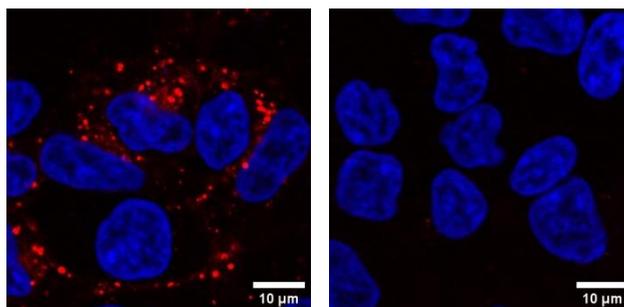
Figure 134. Courbe de saturation de **82** sur cellules HEK surexprimant le récepteur APJ



Peptides	K <sub>i</sub>		
	Notre étude	Valencia <i>et al.</i> <sup>284</sup>	Iturrioz <i>et al.</i> <sup>273</sup>
pyr-Apeline-13	2.88 ± 0.58 nM	2,93 ± 0,02 nM	0,37 ± 0,14 nM
Apeline-17	0,036 ± 0,022 nM	0,026 ± 0,004 nM	0,036 ± 0,002 nM

**Tableau 26.** Mesure du K<sub>i</sub> de la pyr-Apeline-13 et de l'Apeline-17 à l'aide la sonde **82**

Afin de valider cette nouvelle sonde fluorescente **82** pour l'imagerie, nous avons finalement réalisé une expérience de microscopie confocale sur cellules HEK surexprimant le récepteur APJ. Cette sonde étant fluorogénique, la microscopie a pu être réalisée sans lavage préalable du fluorophore tout en conservant un excellent rapport signal sur bruit. En raison de son caractère agoniste, **82** conduit à l'internalisation rapide du récepteur APJ après seulement 15 minutes d'incubation à 37 °C. Enfin, pour montrer la spécificité de notre sonde, une expérience de compétition a été réalisée en présence d'un large excès d'apeline-13 non fluorescente conduisant au déplacement total de **82**. Ces résultats montrent bien que l'introduction du fluorophore sur le peptide via un nouveau linker n'a pas d'impact sur l'affinité, l'activité fonctionnelle et la spécificité du ligand **82**.



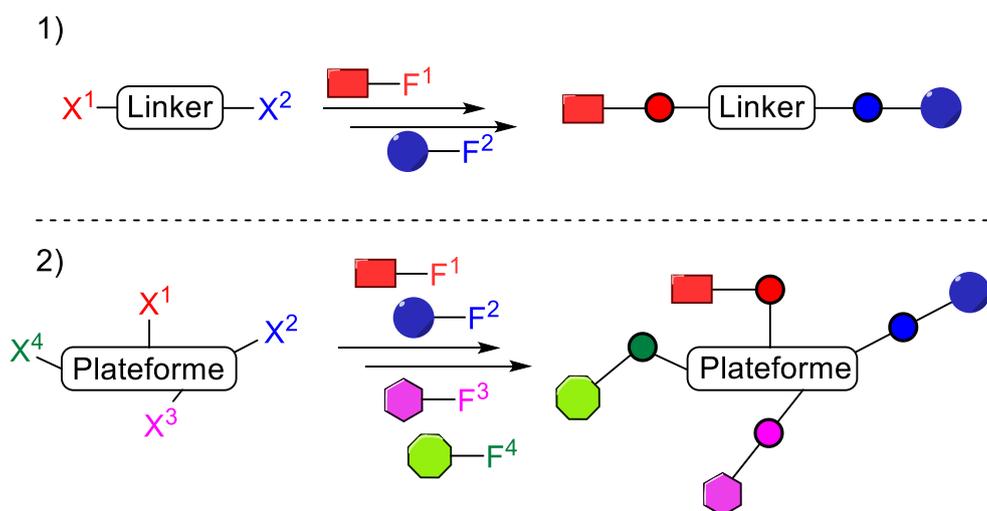
**Figure 135.** Microscopie confocale avec **82** sur cellules HEK293 surexprimant le récepteur APJ sans lavage préalable. Les images ont été obtenues avec (gauche) ou sans (droite) Apelin-13 en compétition. Concentrations : **82** (20 nM), Apelin-13 (10 µM).

## CHAPITRE 6.

# STRATEGIES « DOUBLE-CLICK » A L'AIDE DE LA REACTION DE THIA-DIELS-ALDER

### 1. Chimie "multi-click" : quelques exemples de la littérature

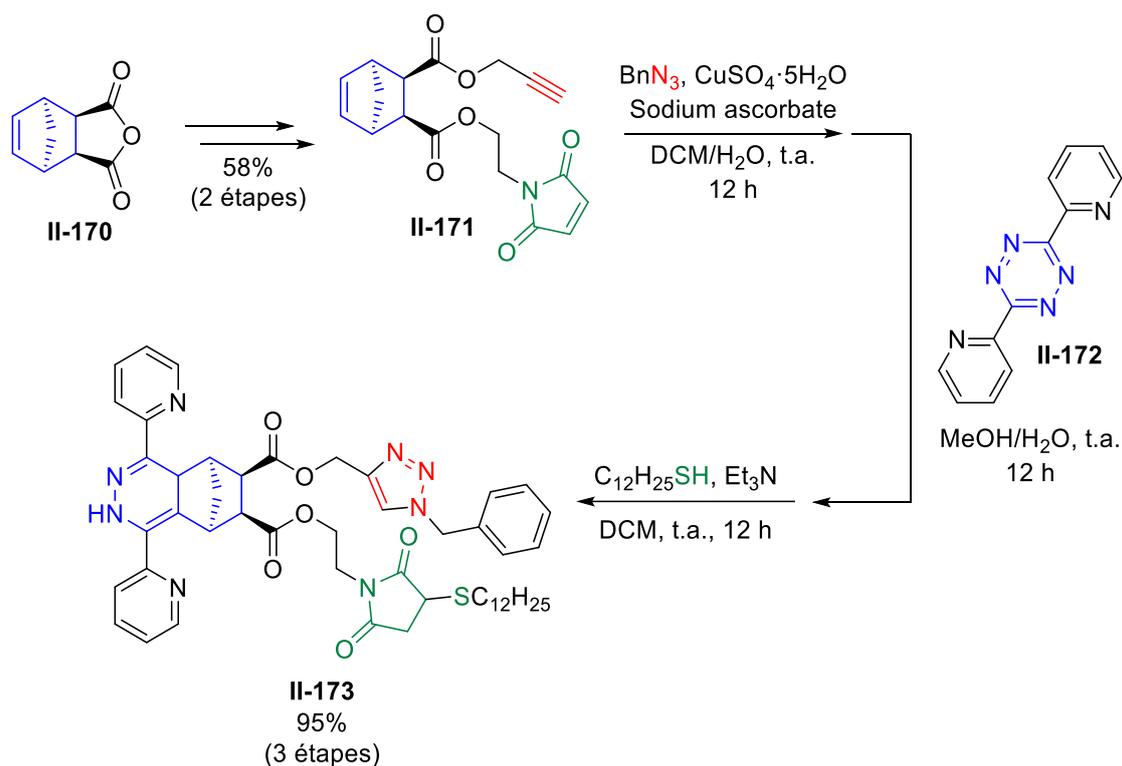
Suite au développement des réactions de "chimie click" au début des années 2000, de nombreux groupes se sont ensuite intéressés à l'étude de leur orthogonalité pour différentes applications. Deux réactions de « chimie click » peuvent par exemple être employées pour la mono-fonctionnalisation de biomolécules à l'aide d'un linker bifonctionnel (Schéma 174, éq. 1). Cette stratégie peut paraître superflue comparée à l'utilisation d'une simple réaction de click mais elle peut notamment permettre de réduire l'encombrement stérique entre la biomolécule et son partenaire (fluorophore, seconde biomolécule...). Les propriétés du linker (taille, hydrophilie, charges) peuvent également être modifiées afin de moduler les propriétés du bioconjugué final. Davantage de réactions de chimie click peuvent également être utilisées pour mener à la polyfonctionnalisation de biomolécules à l'aide d'une plateforme polyfonctionnelle centrale (Schéma 174, éq. 2). Une mini-revue publiée par le Beal et Jones en 2012 a mis en évidence les premiers travaux dans le domaine et montré leur intérêt.<sup>285</sup>



**Schéma 174.** Représentation générale de la stratégie : 1) "double-click" ; 2) « multi-click »

Plusieurs années après cette mini-revue, de nouvelles plateformes multifonctionnelles continuent à être décrites, illustrant les efforts constants de la communauté pour développer cette chimie. Nous avons sélectionné quelques exemples que nous présenterons ici.

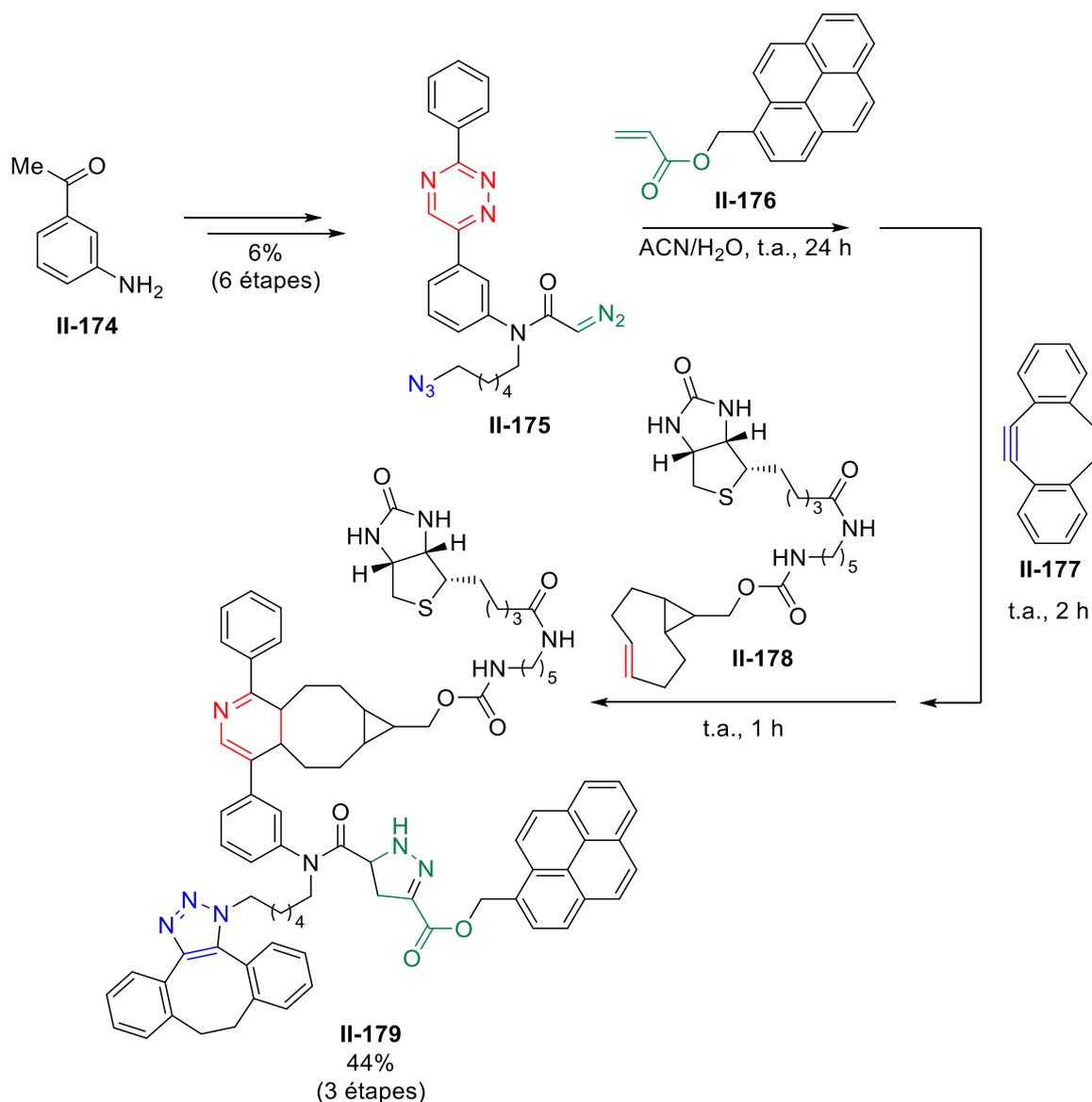
L'équipe de Slugovc<sup>286</sup> a notamment synthétisé en 2016 la plateforme trifonctionnelle **II-173** constituée d'un alcyne, d'un norbonène et d'un maléimide, conçue pour une séquence de trois réactions orthogonales, thiol-ène/CuAAC/IEDDA. Cette plateforme a été obtenue en deux étapes avec 58% de rendement global à partir de l'anhydride **II-170** (Schéma 175). Par la suite, chaque réaction click a été optimisée et un essai a été réalisé en version monotope simultanée, sans parvenir à rendre la réaction de CuAAC complète. Les auteurs ont expliqué ce résultat par une potentielle coordination du Cu(II) par la dipyridyle-tétrazine ou la dipyridyle-(dihydro)pyridazine formée par IEDDA, inhibant ainsi le processus de catalyse. Une séquence monotope séquentielle a ainsi été développée en commençant par la réaction de CuAAC, suivie de la réaction d'IEDDA, puis de l'addition de sulfa-Mickael, pour donner le composé final **II-173** souhaité avec un excellent rendement de 95% sur les trois étapes. Ces travaux permettent de mettre en évidence les limites de compatibilité pouvant être rencontrées sur ces plateformes multifonctionnelles lors de l'utilisation de réactions métallo-catalysées comme la CuAAC. Ces problématiques sont d'autant plus importantes ici où les réactifs et produits sont riches en hétéroatomes et peuvent ainsi devenir de très bons ligands des catalyseurs métalliques.



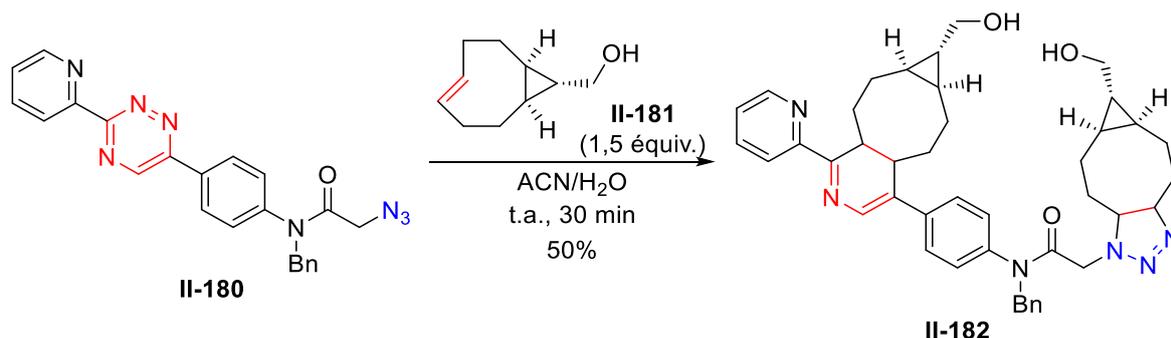
**Schéma 175.** Séquence monotope séquentielle CuAAC/IEDDA/Thiol-ène développée par le groupe de Slugovc

Yokoi *et al.* ont également développé en 2019 une nouvelle plateforme multifonctionnelle **II-175**, obtenue ici à partir de 3-amino-acétophénone **II-174** en 6 étapes avec un rendement global de 6% (Schéma 176).<sup>287</sup> Cette plateforme **II-175** était composée d'un azoture, d'une 1,2,4-triazine et d'une fonction diazo  $\alpha$ -carbonylé pouvant réagir respectivement en réaction de SPAAC, IEDDA et en cycloaddition (3+2) avec un alcène. Comme précédemment, les auteurs ont à nouveau évalué la chimiosélectivité des différentes fonctions et réactions mises en jeu sur le réactif modèle **II-180** présentant les fonctions azoture et 1,2,4-triazine (Schéma 177). Lorsque ce réactif a été mis en présence d'un dérivé de *trans*-cyclooctène **II-181** (1,5 équiv.), les auteurs ont observé la double cycloaddition sur la 1,2,4-triazine et l'azoture après seulement 30 minutes de réaction. Cette observation est principalement due à la grande réactivité du dérivé de *trans*-cyclooctène **II-181** capable de réagir en (4+2) et (3+2). L'utilisation d'un dérivé de cyclooctyne pour la réaction de SPAAC a démontré de son côté une excellente chimiosélectivité pour l'azoture sans réaction secondaire sur le motif 1,2,4-triazine. L'emploi de dibenzocyclooctyne est en effet connu dans la

littérature pour éviter toute réaction avec les motifs di(aryl)-tetrazine<sup>288</sup> et di(aryl)sydnone<sup>289</sup> à cause de contraintes stériques. La réaction de SPAAC a ainsi dû être réalisée en amont de la réaction d'IEDDA pour éviter tout problème de sélectivité lors de la triple fonctionnalisation de la plateforme **II-175**. Dans ces conditions, le produit de triple-click **II-179** a été obtenu avec un rendement global de 44% (soit 76% en moyenne par étape).

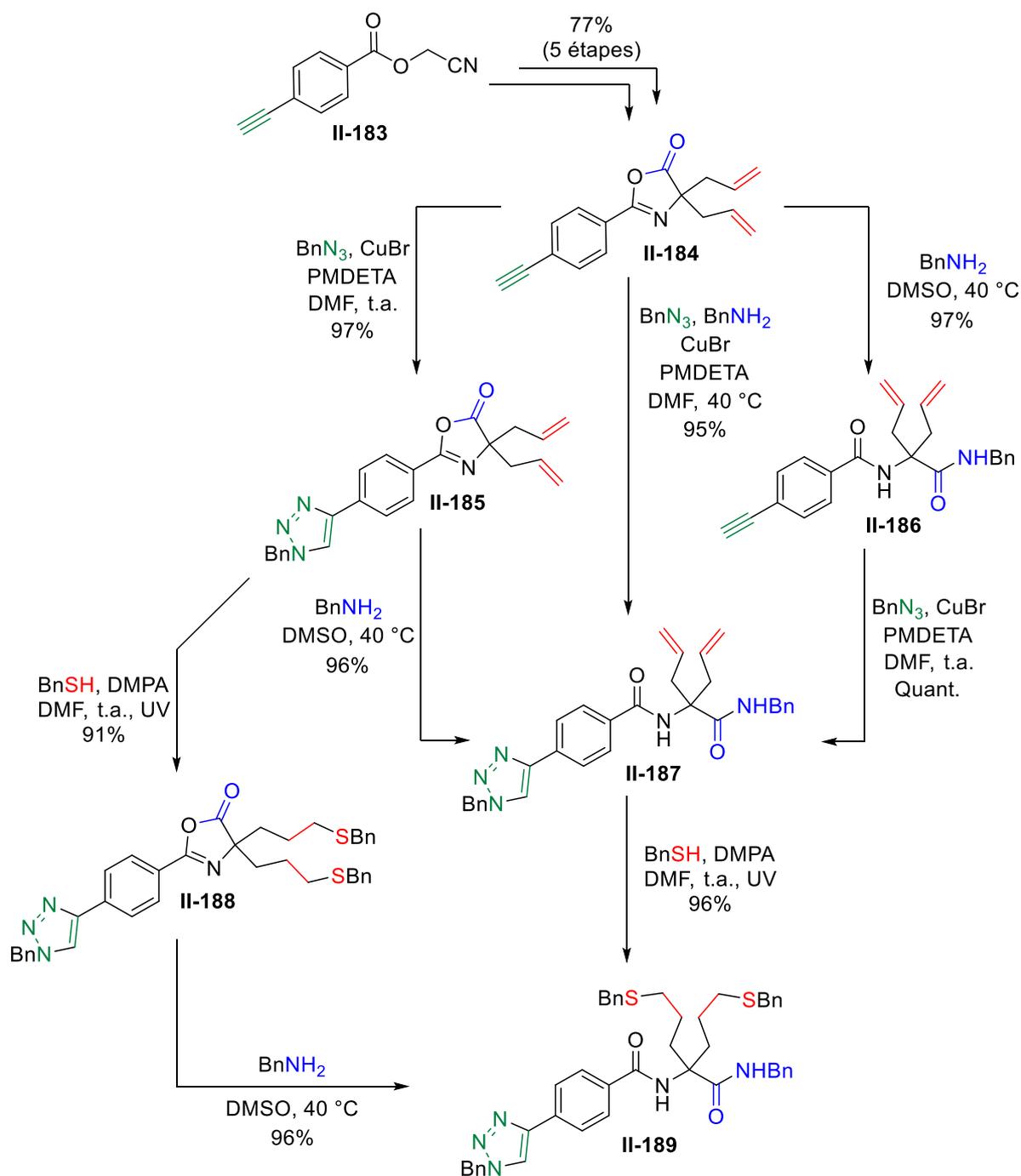


**Schéma 176.** Triple fonctionnalisation séquentielle monotope de **II-175** par réaction 1,3-dipolaire du diazo  $\alpha$ -carbonylé, IEDDA et SPAAC



**Schéma 177.** Double cycloaddition du dérivé de *trans*-cyclooctène **II-181** avec un réactif bifonctionnel 1,2,4-triazine/azoture **II-180**

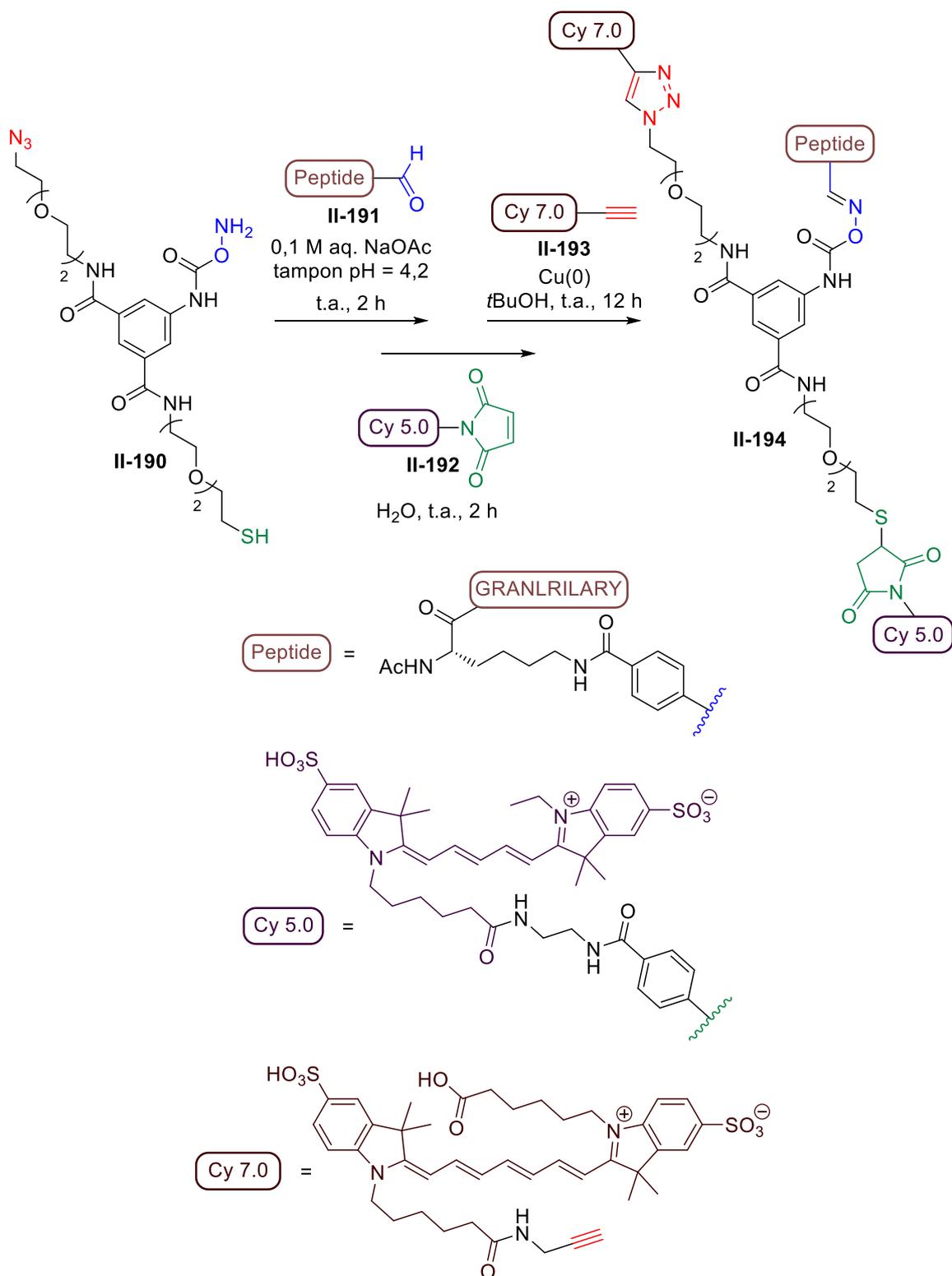
Enfin, le groupe de Pearson-Long et Bertus a décrit la même année une plateforme trifonctionnelle synthétisée en 5 étapes à partir de **II-183**, avec un rendement de 77%. Cette plateforme **II-184** peut réagir par CuAAC, aminolyse et réaction thiol-ène photoinduite (Schéma 178).<sup>290</sup> Les auteurs ont aussi démontré la très bonne chimiosélectivité de ce système en réalisant séquentiellement les trois réactions dans un ordre différent, avec d'excellents rendements, supérieurs à 90%. Au cours de ces essais, il peut cependant être noté que la réaction thiol-ène photoinduite a toujours été réalisée après la réaction de CuAAC, pour éviter la réaction parasite d'hydrothiolation de l'alcyne vrai par le benzylmercaptan, conduisant à un mélange de produits.



**Schéma 178.** Triple fonctionnalisation séquentielle monotope de **II-184** par réaction thiol-ène, IEDDA et SPAAC

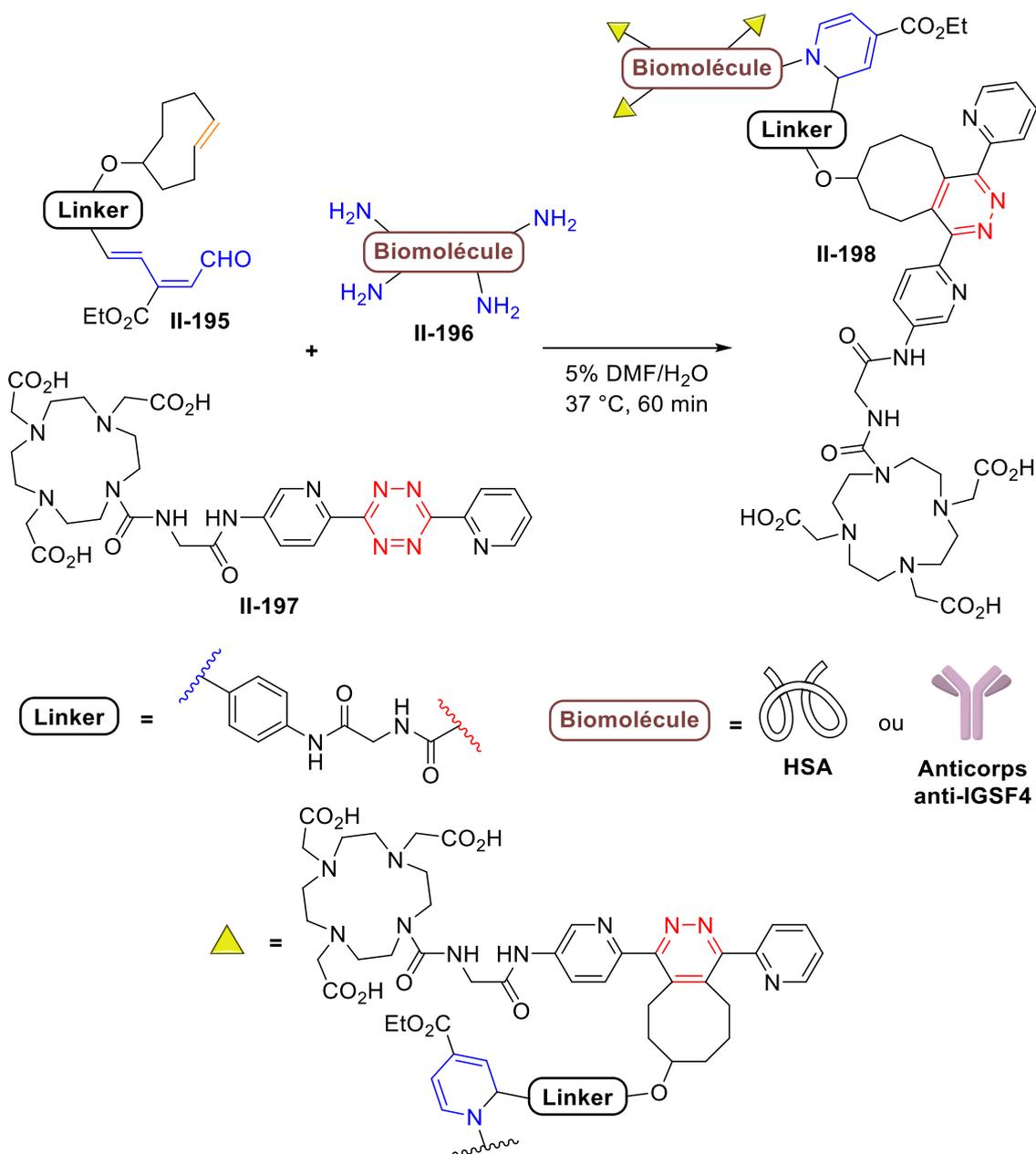
Cette stratégie « multi-click » a également été appliquée en bioconjugaison. Un premier exemple a été décrit par Viault *et al.*<sup>291</sup> en 2013 avec l'utilisation d'une plateforme aromatique trifonctionnelle **II-190** présentant une hydroxylamine, un thiol et un azoture (Schéma 179). Ces trois fonctions ont pu réagir chimiosélectivement avec leur partenaire respectif, un aldéhyde **II-191**, un maléimide **II-192** et un alcyne **II-193**,

pour permettre l'obtention de **II-194**, un peptide modèle lié à deux fluorophores avec un rendement global de 28%. Les auteurs n'ont cependant pas appliqué leur stratégie à un peptide bioactif, pour des applications en imagerie par exemple.



**Schéma 179.** Application de plateformes polyfonctionnelles au marquage de peptides par Viault *et al.*

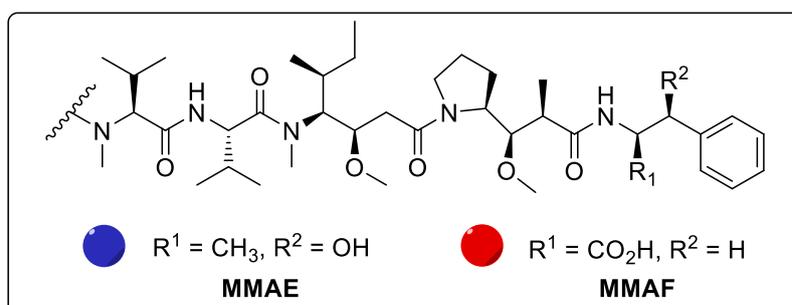
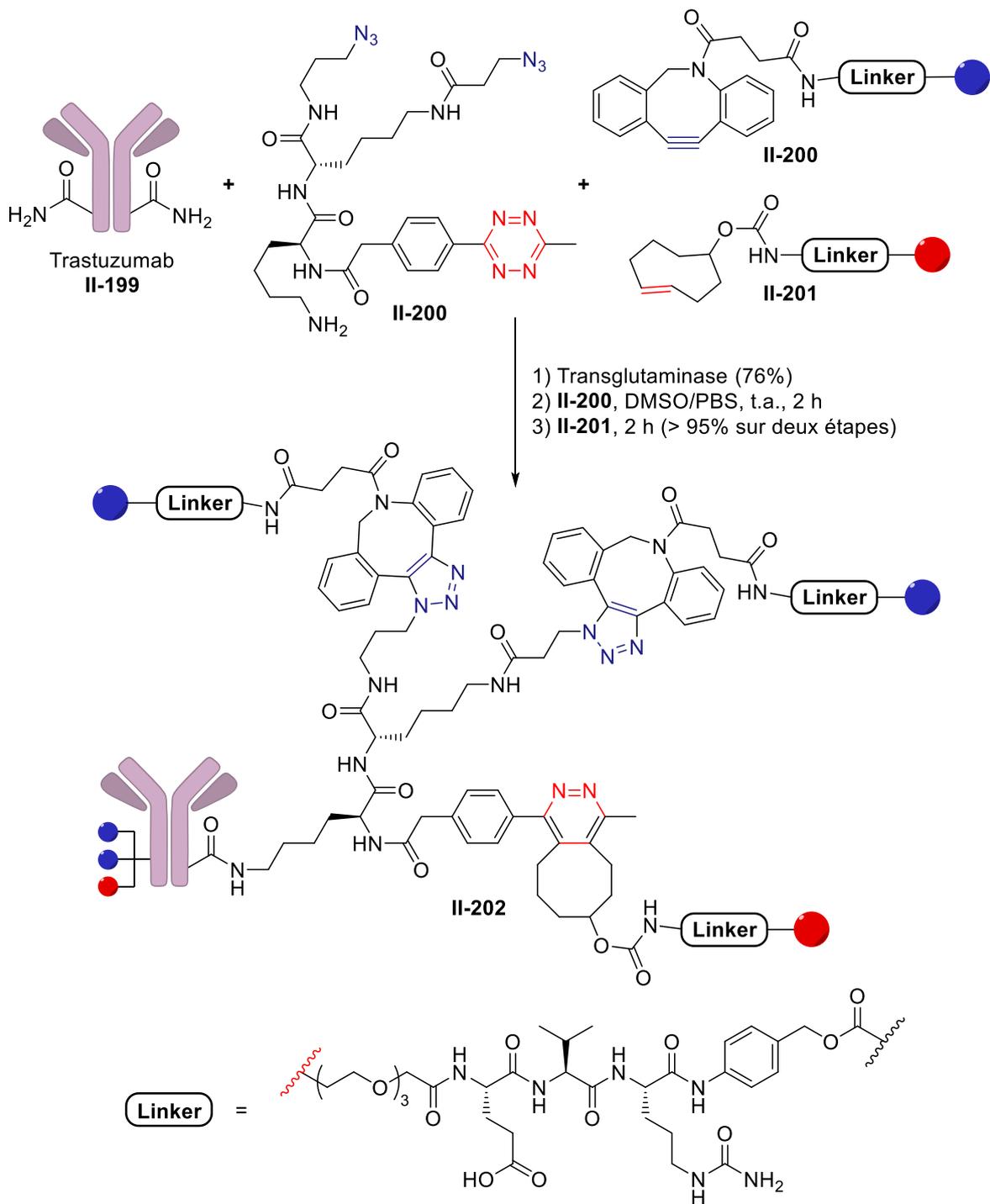
Quelques années plus tard, en 2016, Fujiki *et al.* ont démontré la possibilité d'utiliser une stratégie double-click pour la fonctionnalisation d'albumine de sérum humaine (HSA) ou d'anticorps, à l'aide de motif DOTA (Schéma 180).<sup>292</sup> Cette stratégie s'est appuyée sur l'utilisation de la réaction SPAAC d'une part et d'une réaction d'azaélectrocyclisation-6 $\pi$  entre un aldéhyde  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturés et une amine primaire, appelée réaction « RIKEN ». La réaction a été réalisée en version monotope tricomposante (3CR) pour donner le bioconjugué désiré **II-198** sans précision de rendement. Le motif DOTA a permis l'introduction de radiotraceurs métalliques comme le <sup>67</sup>Cu avec des RCY compris entre 51 et 80%, permettant de futures applications en radiothérapie ciblée. La même équipe a également appliqué avec succès cette stratégie à la fonctionnalisation d'HSA à l'aide de chaîne glycanes.<sup>293</sup>



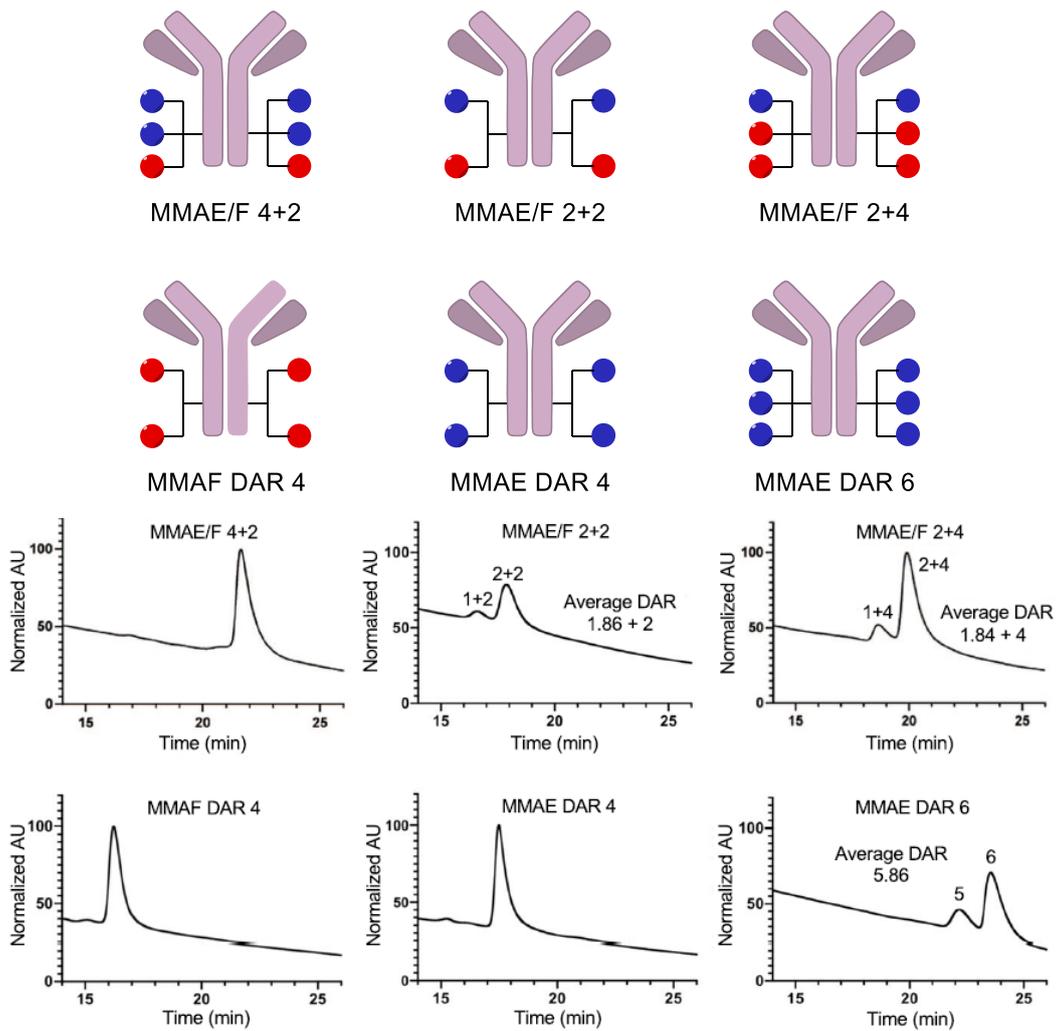
**Schéma 180.** Modification de biomolécules (HSA et anticorps) à l'aide d'une stratégie double-click SPAAC/RIKEN

Récemment, l'équipe de Tsuchikama<sup>294</sup> s'est également intéressée à l'utilisation d'une stratégie « multi-click » pour la fonctionnalisation de l'anticorps Trastuzumab **II-199** spécifique des récepteurs HER2 par deux peptides cytotoxiques : les monométhyl auristatines E et F (MMAE & MMAF). Les auteurs ont notamment sélectionné le réactif multifonctionnel **II-200** comprenant deux azotures, une tétrazine et une amine libre pour appliquer leur stratégie. L'amine libre a tout d'abord été employée pour l'introduction enzymatique de **II-200** sur la glutamine 295 (Q295) de la chaîne

principale de l'anticorps **II-199** avec un rendement de 76%. Les réactions de click ont ensuite été effectuées pour donner l'anticorps fonctionnalisé **II-202** et purifié avec un rendement supérieur à 95%. Cette stratégie a également permis la synthèse d'anticorps fonctionnalisés par diverses proportions de peptides cytotoxiques tout en conservant dans chaque cas une très bonne maîtrise du « drug-to-antibody ratio » (DAR) (Figure 136).



**Schéma 181.** Fonctionnalisation du Trastuzumab par différents peptides cytotoxiques à l'aide d'une stratégie "multi-click"



**Figure 136.** Design et caractérisations de anticorps obtenus

Enfin, cette stratégie « multi-click » a également pu être appliquée *in vivo* par l'équipe de Brindle à l'étude de la glycosylation de cellules (Schéma 182).<sup>295</sup> Cette équipe s'est appuyé sur la métabolisation du Ac<sub>4</sub>GalNAz **II-203** au sein des glycanes présents en surface des cellules afin de les marquer par une fonction azoture. Aux souris ainsi traitées, ont ensuite été administrés **II-205**, puis **II-207** quelques heures après, avant d'être finalement imagées. Parmi les résultats obtenus, cette stratégie a notamment permis d'obtenir une détection de tumeurs LL2 xenogreffées chez la souris (Figure 137). La spécificité de cette méthode a également été validée par le biais de souris non traitées au Ac<sub>4</sub>GalNAz **II-203** donnant de plus faibles valeurs de fluorescence au sein des tumeurs (-79% à -95%).

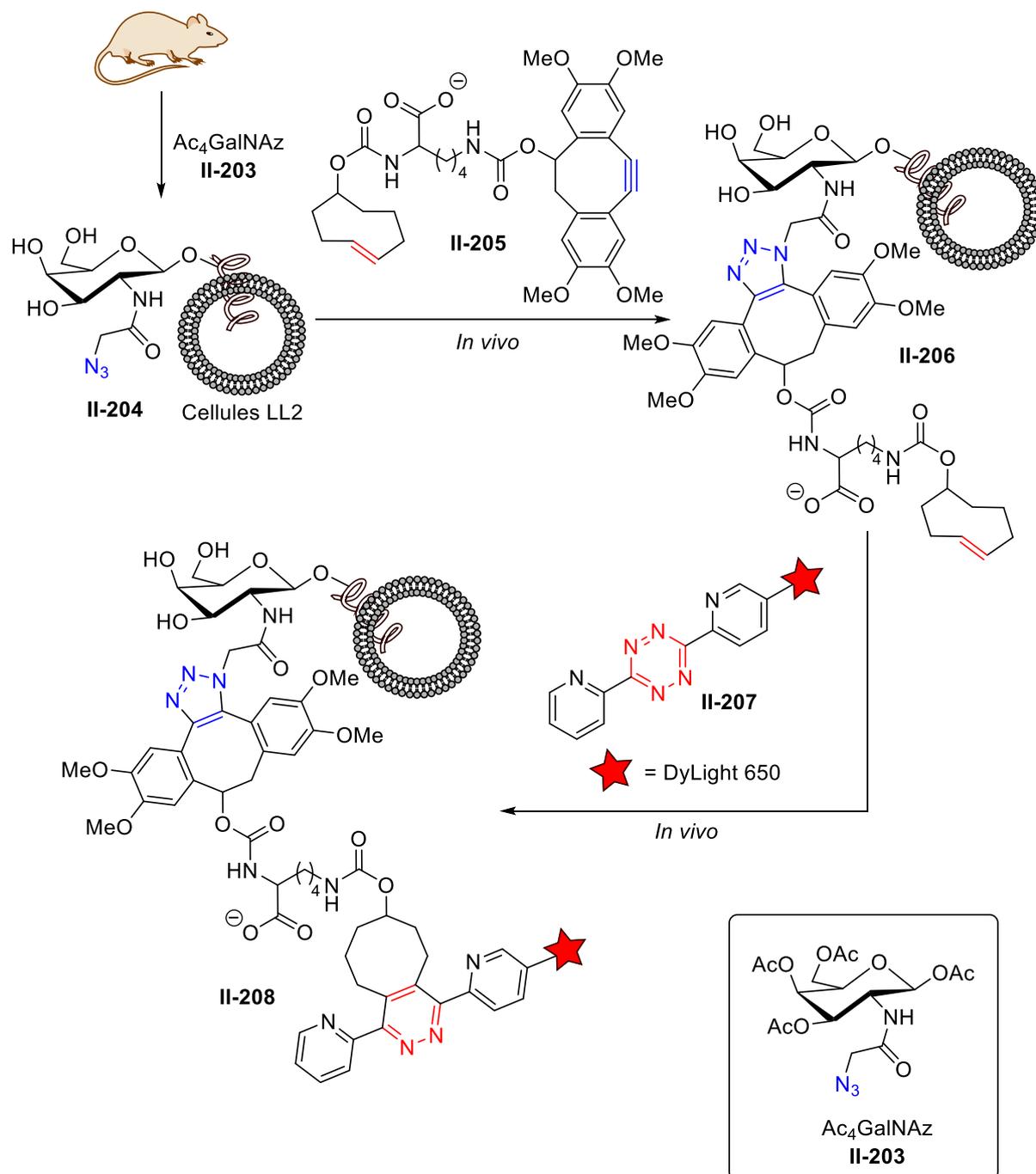
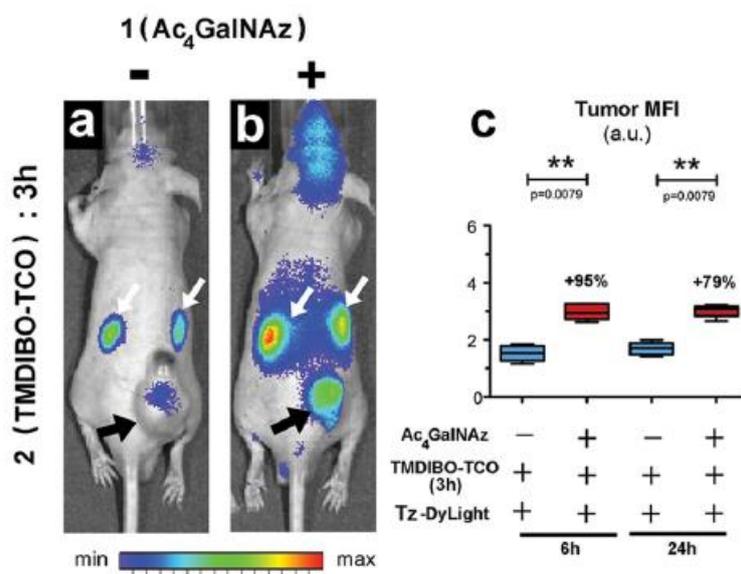


Schéma 182. Stratégie double click *in vivo* appliquée à la détection de tumeurs LL2



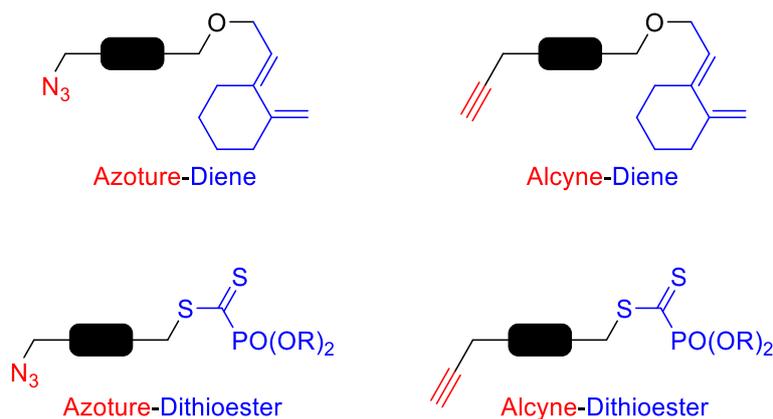
**Figure 137.** Images par fluorescence de souris vivantes xenogreffées par des cellules LL2 de cancers du poumons (A, B) et valeurs médianes de la fluorescence 6 h ou 24 h après injection de **II-207** (C)

## 2. Etude d'une stratégie double click : CuAAC/thia-DA

Au cours de cette partie, nous nous sommes intéressés à deux stratégies de double click. Une première méthode s'est appuyée sur la combinaison de la réaction de thia-Diels-Alder, présentée précédemment, et de la réaction de CuAAC. Nous avons sélectionné la réaction de CuAAC pour cette étude car elle est toujours la réaction de chimie click la plus utilisée en bioconjugaison et parce que les partenaires impliqués (azoture et alcyne) peuvent être introduit aisément et à moindre coût au sein de réactifs bifonctionnels.

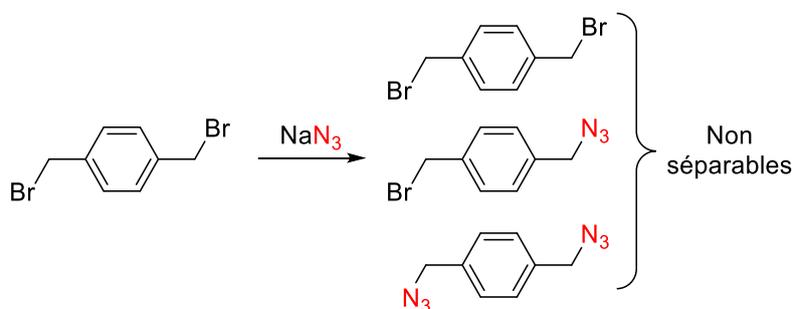
### 2.1. Synthèse des réactifs bi-fonctionnels et partenaires réactionnels

Afin de développer la stratégie de double-click CuAAC/thia-DA, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la synthèse de réactifs bifonctionnels nécessaires. Quatre combinaisons possibles de deux fonctions ont été envisagées : azoture-diène, alcyne-diène, azoture-dithioester et alcyne-dithioester (Figure 138).



**Figure 138.** Couples possibles pour la stratégie double click CuAAC/Thia-DA

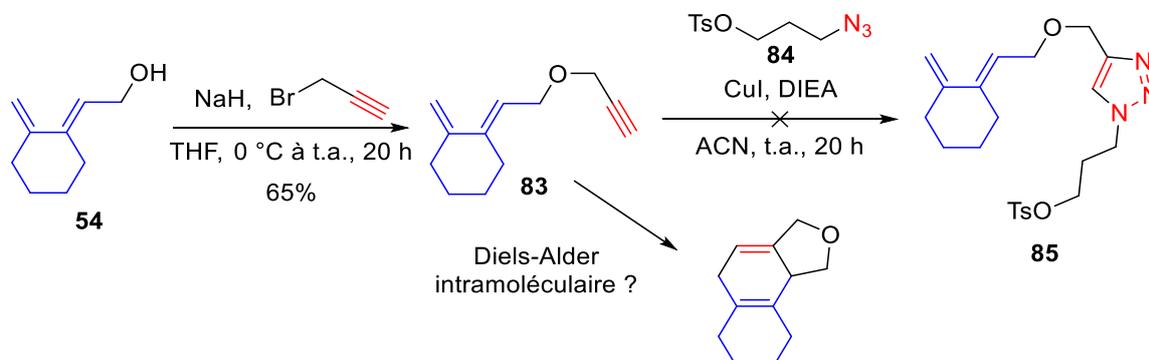
Le réactif azoture-dithioester n'a malheureusement pu être obtenu. Nous avons tenté d'introduire les deux fonctions concernées séquentiellement, par deux réactions de substitution nucléophile à partir du 1,4-bis (bromométhyl)benzène (Schéma 183). Lors des essais de désymétrisation de ce réactif par mono-substitution nucléophile avec du  $\text{NaN}_3$ , des mélanges de mono- et di-azotures et du produit de départ ont été obtenus. Leurs polarités étant trop proches, leur séparation a été impossible et n'a pas permis d'isoler le mono-azoture désiré.



**Schéma 183.** Essais de synthèse du réactif bifonctionnel

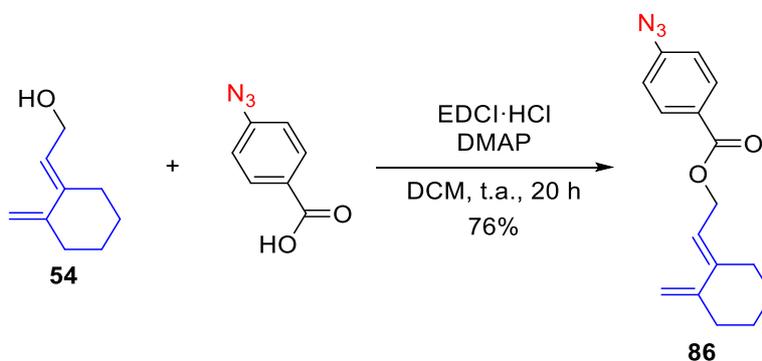
Le réactif bifonctionnel alcyne-diène **83** a été obtenu après réaction de Williamson sur **54** en présence de  $\text{NaH}$  et de bromure de propargyle avec un rendement de 65% (Schéma 184). Cependant, lorsque **83** a été mis à réagir avec l'azoture tosylé **84** en condition de CuAAC ( $\text{Cu}/\text{DIEA}$ ) la réaction n'a pas conduit au triazole **85** souhaité mais à la consommation rapide de **83** après une potentielle réaction de Diels-Alder intramoléculaire. Ce type de transformation est effectivement favorisée en présence

du cuivre, comme déjà décrit dans la littérature sur des substrats similaires.<sup>296</sup> Ce réactif a ainsi été exclu de notre étude.



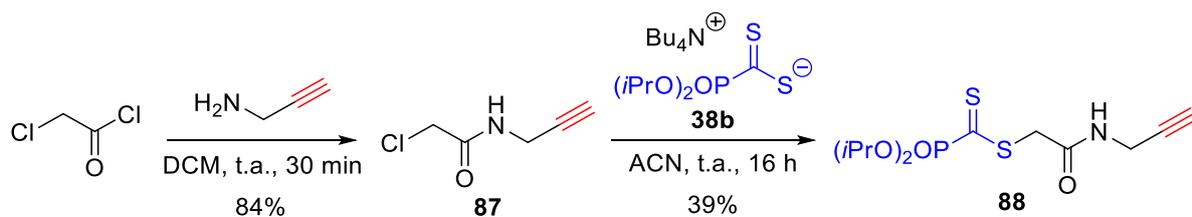
**Schéma 184.** Synthèse et utilisation du réactif bifonctionnel alcyne/diène **83**

Nous avons donc synthétisé un deuxième réactif bifonctionnel modèle, l'azoture-diène **86** (Schéma 185). Ce réactif **86** a été obtenu avec 76% de rendement par réaction d'estérification entre **54** et l'acide 4-azidobenzoïque commercial en présence d'EDCI et de DMAP (Schéma 185).



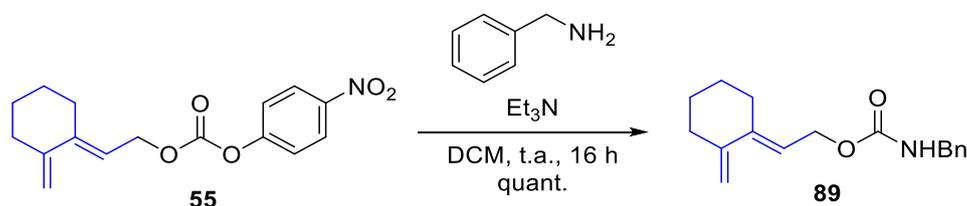
**Schéma 185.** Synthèse du réactif bifonctionnel azoture-diène **86**

Nous avons ensuite synthétisé le dernier réactif bifonctionnel modèle contenant un alcyne et un dithioester. L'alcyne a été introduit par réaction de la propargylamine sur le chlorure de chloroacétyle pour donner l'amide **87** correspondant avec 84% de rendement. Enfin l'alkylation du sel de dithioester **38b** permet d'obtenir le réactif bifonctionnel modèle **88** avec un rendement de 39%.



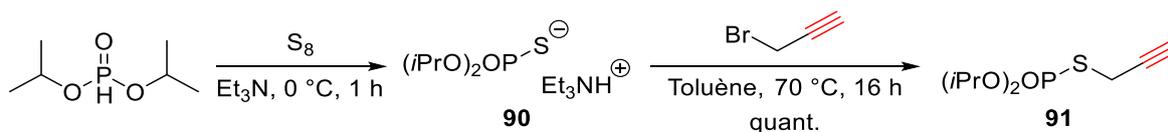
**Schéma 186.** Synthèse d'un réactif bifonctionnel alcyne-dithioester **88**

Pour étudier la séquence double-click avec les deux nouveaux réactifs bifonctionnels, nous avons également préparé des partenaires-modèle adéquats, un diène, un alcyne, et un azoture. Le diène modèle exocyclique **89** a été obtenu quantitativement par réaction entre le carbonate activé **55** et la benzylamine (Schéma 187).

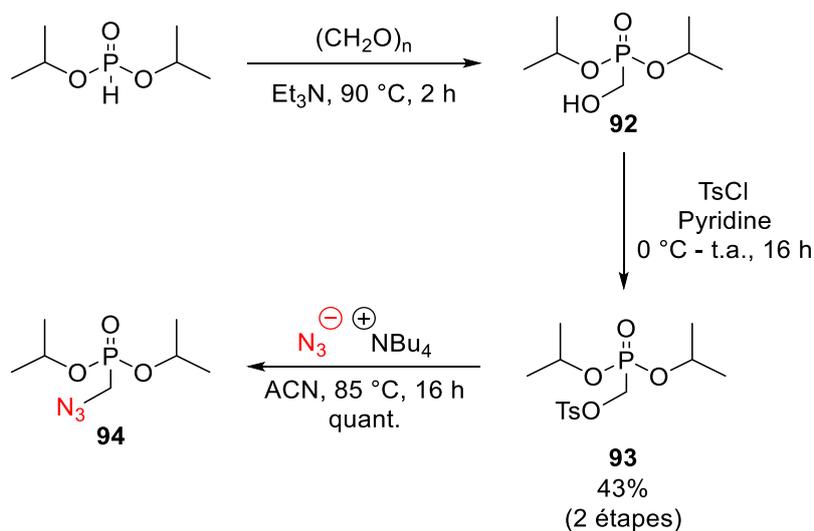


**Schéma 187.** Synthèse du diène modèle exocyclique **89**

Pour l'étude de la double-click, nous avons conçu deux partenaires modèles pour la cycloaddition (3+2), un alcyne et un azoture portant chacun une fonction phosphorée. Ceci permet tout d'abord de suivre plus facilement l'avancée de la réaction par RMN du  $^{31}\text{P}$ , mais aussi par l'intérêt biologique connu des fonctions phosphonate<sup>297</sup> et phosphorothioate.<sup>298</sup> L'alcyne phosphorylé **91** a été obtenu par la réaction entre le phosphite de diisopropyle et le soufre élémentaire en présence de triéthylamine pour donner le sel de phosphorothioate **90**, qui a été directement alkylé par le bromure de propargyle pour donner l'alcyne phosphorylé **91** désiré de façon quantitative (Schéma 188). L'azidophosphonate **94** a été synthétisé aussi à partir du phosphite de diisopropyle et du paraformaldéhyde en présence de triéthylamine, pour donner l'hydroxyméthylphosphonate **92** qui a été transformé directement en tosylate **93** correspondant avec 43% de rendement sur ces deux étapes (Schéma 189). La réaction de **93** avec l'azoture de tétrabutylammonium a permis d'obtenir le 2-azidophosphonate de diéthyle **94** souhaité quantitativement. Pour l'étude nous avons également sélectionné le 2-azidoacétate d'éthyle qui est disponible commercialement.



**Schéma 188.** Synthèse de l'alcyne phosphorylé **91**

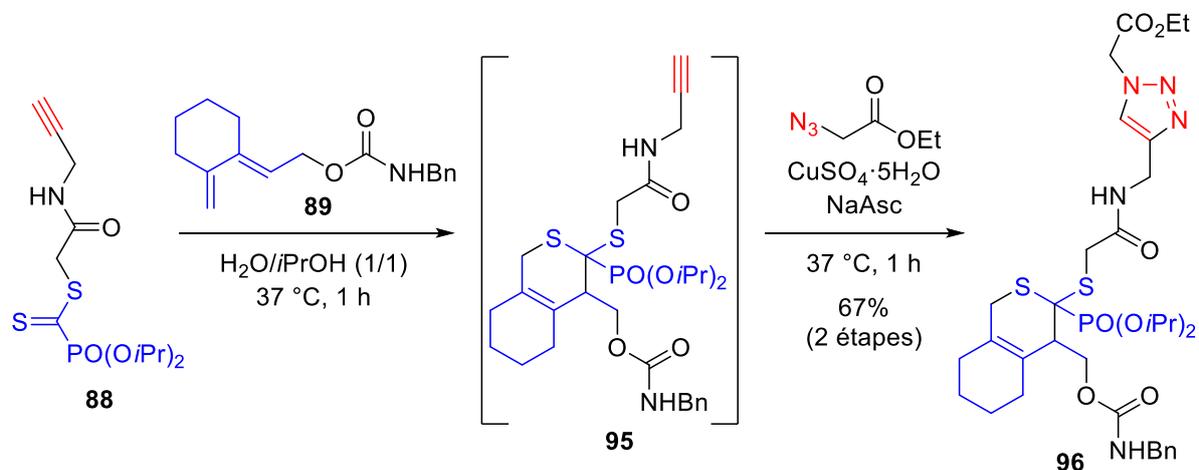


**Schéma 189.** Synthèse de l'azoture phosphorylé **94**

## 2.2. Etude de la séquence « double-click »

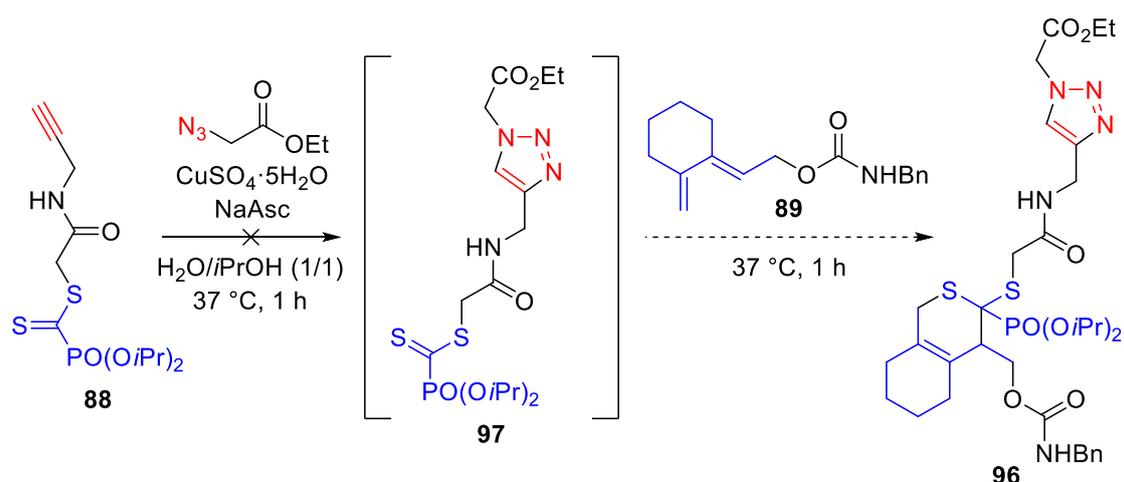
En ayant tous les partenaires réactionnels à disposition, nous nous sommes intéressés plus en détail aux conditions réactionnelles à employer pour la stratégie double-click. Nous avons tout d'abord choisi de conserver le mélange H<sub>2</sub>O/*i*PrOH comme solvant ainsi qu'une température de 37 °C, ces conditions douces permettant d'envisager des applications sur diverses biomolécules sensibles. Basé sur l'expérience du laboratoire dans l'application de la CuAAC sur peptides, la quantité de catalyseur nécessaire a été fixée à un équivalent de cuivre pour deux équivalents d'ascorbate de sodium. Enfin, les partenaires mono-fonctionnels ont été utilisés en léger excès (1,2 équivalents) de façon à consommer entièrement le réactif bifonctionnel. La séquence double-click thia-DA/CuAAC a été testée d'abord en version monotope (Schéma 190). Mis en réaction avec le diène modèle **89**, le dithioester-alcyne **88** a été totalement converti après une heure (suivi en CCM) en adduits de thia-Diels-Alder **95**. Ensuite, au mélange réactionnel obtenu ont été rajoutés le 2-azidoacetate d'éthyle et le système catalytique. La 2ème réaction a été complète après une heure et les triazoles-

dihydrothiopyranes souhaités **95** ont été isolés avec un bon rendement de 67% sur les deux étapes. Ces adduits **95** ont été obtenus sous la forme de quatre isomères dont les proportions ont été mesurées par RMN du  $^{31}\text{P}$  : 17% (19,7 ppm), 14% (18,3 ppm), 29% (17,9 ppm) et 40% (17,7 ppm).



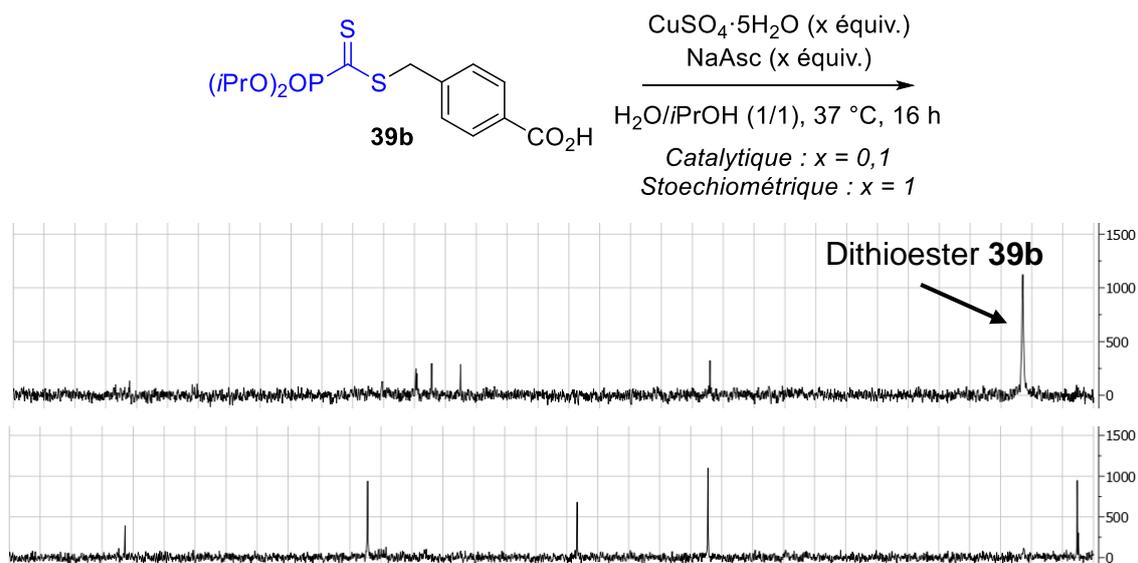
**Schéma 190.** Réaction de double-click (4+2)/(3+2) sur **85** en version monotope

Nous avons ensuite tenté d'effectuer la séquence réactionnelle inversée (Schéma 191) en réalisant d'abord la cycloaddition (3+2) suivie dans un second temps de la (4+2). Le réactif bifonctionnel **88** a ainsi été mis à réagir en conditions de CuAAC avec le 2-azidoacétate d'éthyle pendant une heure. L'analyse par RMN du  $^{31}\text{P}$  du mélange obtenu a cependant mis en évidence la disparition des signaux caractéristiques provenant du dithioester.



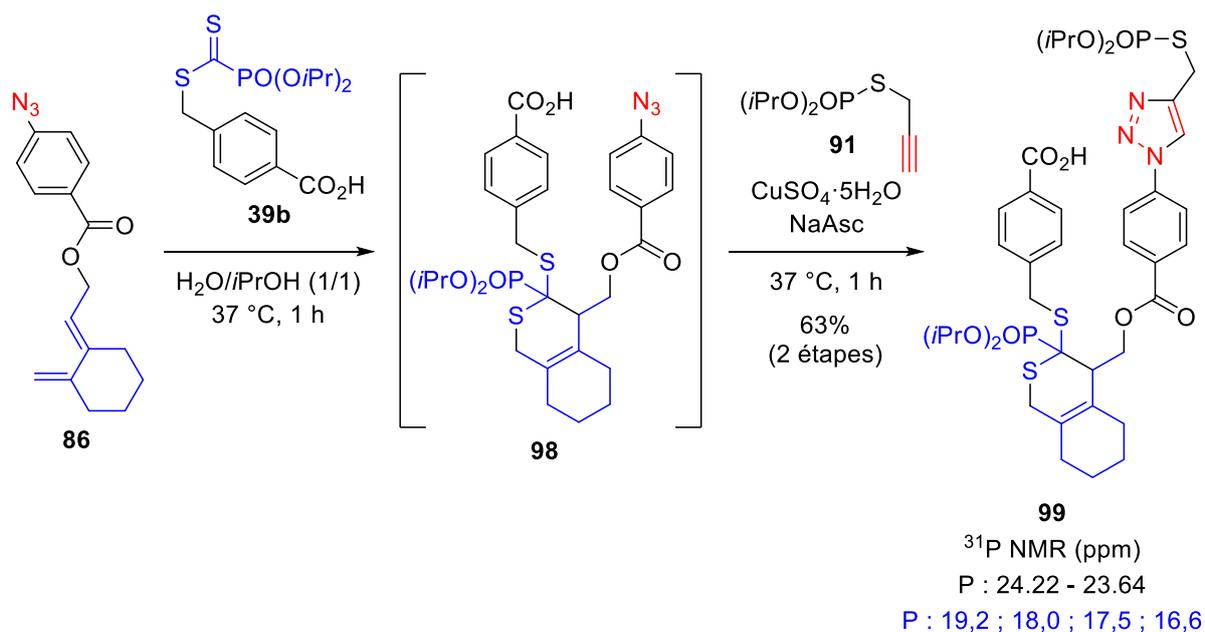
**Schéma 191.** Réaction de double-click (3+2)/(4+2) sur **88** en version monotope

La stabilité du dithioester en conditions de CuAAC a donc été évaluée en traitant le dithioester modèle **39b** en conditions catalytiques (0,1 éq de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et 0,2 éq de NaAsc) ou stœchiométriques (1 éq de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et 2 éq de NaAsc). Dans les deux cas, l'analyse des bruts réactionnels par RMN du  $^{31}\text{P}$  ont montré une dégradation du motif dithioester, partielle en conditions catalytiques et totale en conditions stœchiométriques (Schéma 192).

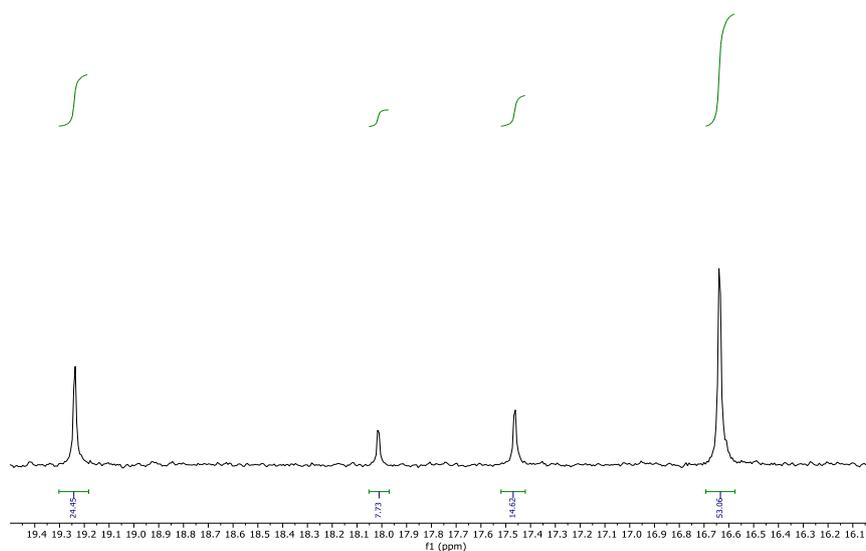


**Schéma 192.** Conditions réactionnelles employées pour l'étude de stabilité du dithioester **39b** en conditions de CuAAC et spectres RMN  $^{31}\text{P}$  associés (haut : conditions catalytiques, bas : conditions stœchiométriques)

Par la suite, nous avons évalué dans nos conditions de double-click thia-DA/CuAAC monotope le 2ème réactif bifonctionnel, l'azoture-diène **86** (Schéma 193). Ce dernier a pu réagir séquentiellement avec le dithioester modèle **39b**, puis avec l'alcyne phosphorylé **91**, pour donner les adduits **99** souhaités avec un rendement de 63% sur les deux étapes. Les adduits **99** ont également été obtenus dans ce cas sous la forme de quatre isomères, avec les proportions suivantes, mesurées par RMN du  $^{31}\text{P}$  sur les signaux du phosphore porté le carbone quaternaire stéréogène : 25% (19,2 ppm), 9% (18,0 ppm), 11% (17,5 ppm) et 55% (16,6 ppm) (Figure 139).



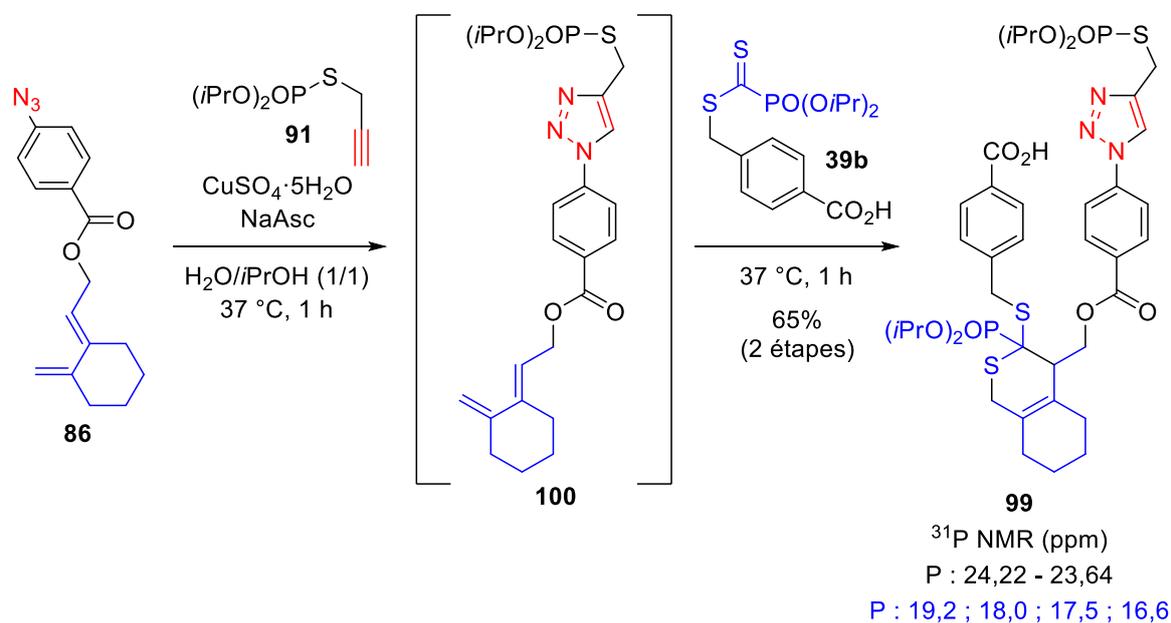
**Schéma 193.** Réaction de double-click (4+2)/(3+2) sur **86** en version monotope



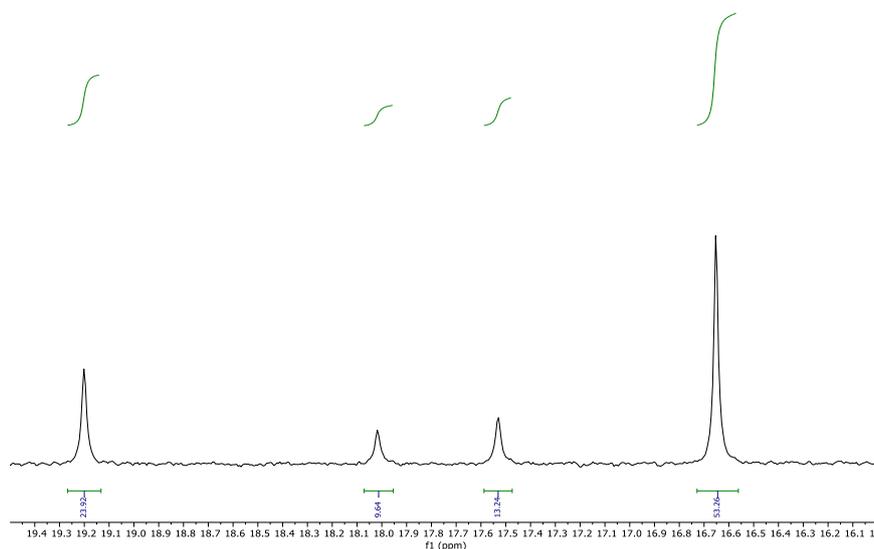
**Figure 139.** RMN  $^{31}\text{P}$  des adduits **99** obtenus par double-click (4+2)/(3+2)

Dans le cas de ce réactif bifonctionnel azoture-diène il a été également possible d'effectuer la séquence monotope inversée, CuAAC/thia-DA (Schéma 194), et obtenir les adduits désirés avec un rendement de 65% sur les deux étapes. Les quatre adduits **99** ont été obtenus dans des proportions similaires aux précédentes : 24% (19,2 ppm), 10% (18,0 ppm), 13% (17,5 ppm), 53% (16,6 ppm). Ce résultat démontre l'efficacité

de la réaction de thia-Diels-Alder qui permet grâce à sa cinétique élevée de limiter la dégradation du dithioester malgré la présence de cuivre et d'ascorbate dans le milieu.



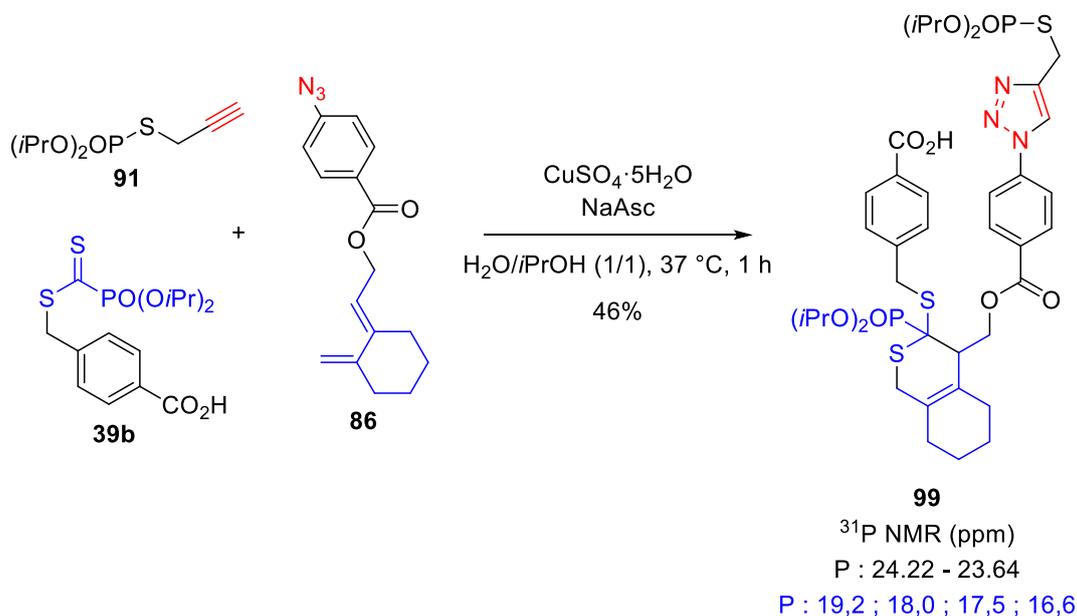
**Schéma 194.** Réaction de double-click (3+2)/(4+2) sur **86** en version monotope



**Figure 140.** Ratio en RMN  $^{31}P$  des adduits **99** obtenus par (3+2)/(4+2)

Enfin, la séquence a également été réalisée en version tricomposante (3CR) et a conduit aux produits souhaités **99** avec un rendement sur les deux étapes de 46%, un peu plus faible que précédemment, mais qui reste satisfaisant (Schéma 195). Ici encore,

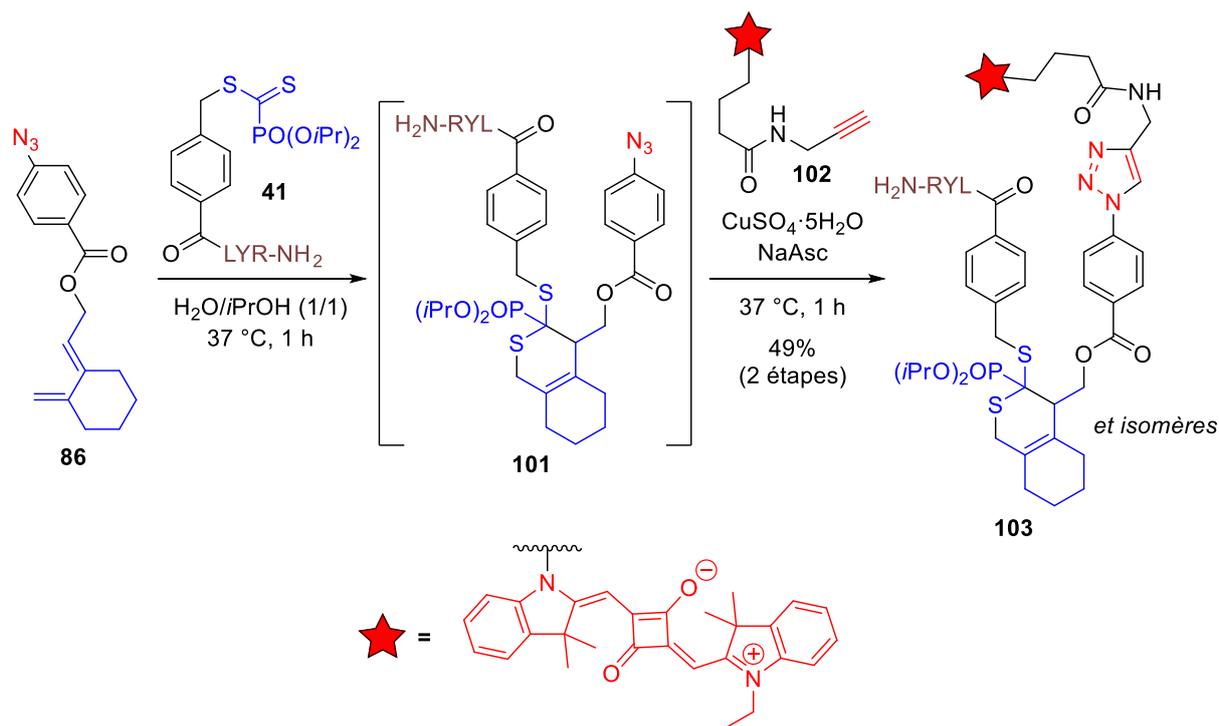
les proportions des quatre adduits **99** obtenus ont été similaires : avec 23% (19,2 ppm), 10% (18,0 ppm), 13% (17,4 ppm) et 54% (16,0 ppm).



**Schéma 195.** Réaction de double-click sur **99** en version tricomposante

Nous avons ainsi pu optimiser cette stratégie en modifiant le substrat bifonctionnel et l'ordre des réactions employées. Le réactif **88** a permis de mettre en évidence la sensibilité du dithioester au système catalytique utilisée en réaction de CuAAC. Cependant, en réalisant d'abord la réaction de thia-Diels-Alder puis la réaction de CuAAC, **88** a permis d'accéder aux adduits **96** de « double-click » avec un bon rendement de 67%. Nous avons également pu appliquer notre stratégie de « double-click » au réactif **86** en commençant par la (4+2) ou la (3+2) ou en version monotope pour conduire aux adduits **99** avec des rendements respectifs de 63%, 65% et 46%.

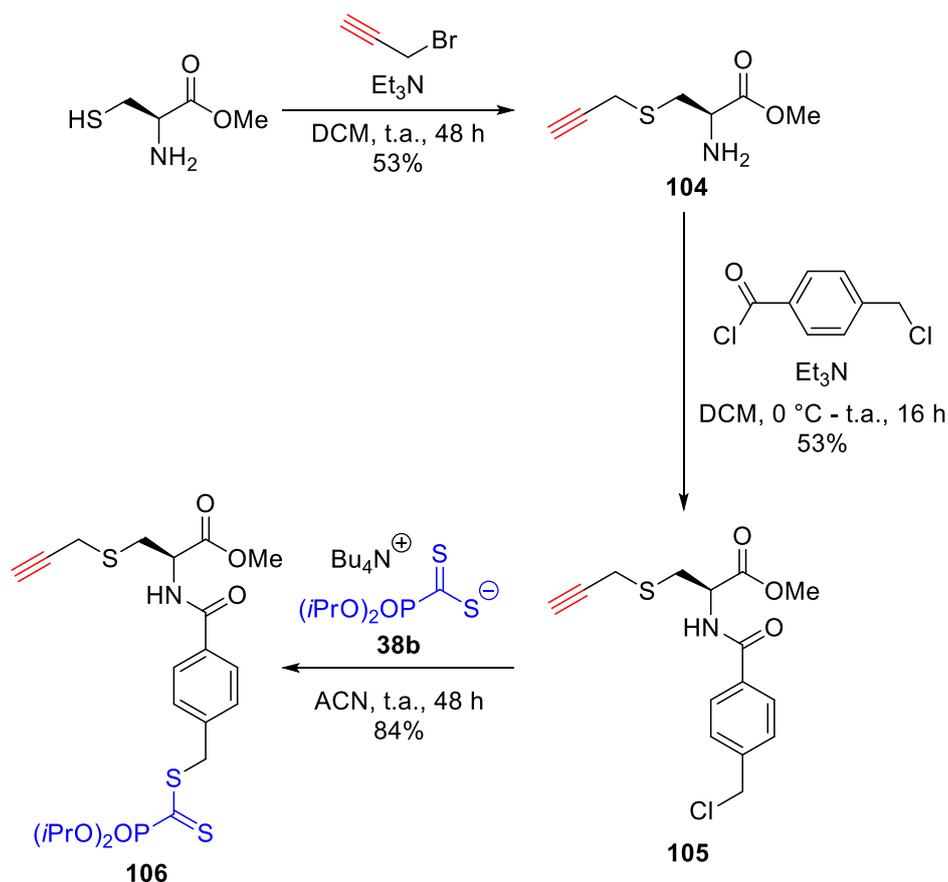
Compte tenu des résultats encourageants obtenus, nous avons décidé d'appliquer la stratégie double-click avec le réactif bifonctionnel azoture-diène **86** au dithioester-tripeptide **41**, avec comme troisième partenaire l'alcyne **102** portant un fluorophore, synthétisé par couplage peptidique entre la propargylamine et **70** (Schéma 196). La séquence monotope (4+2)/(3+2) a été sélectionnée pour cet exemple et a permis d'accéder au peptide marqué désiré **103** avec un rendement de 49% sur les deux étapes.



**Schéma 196.** Marquage du tripeptide Lyr par stratégie "double click"

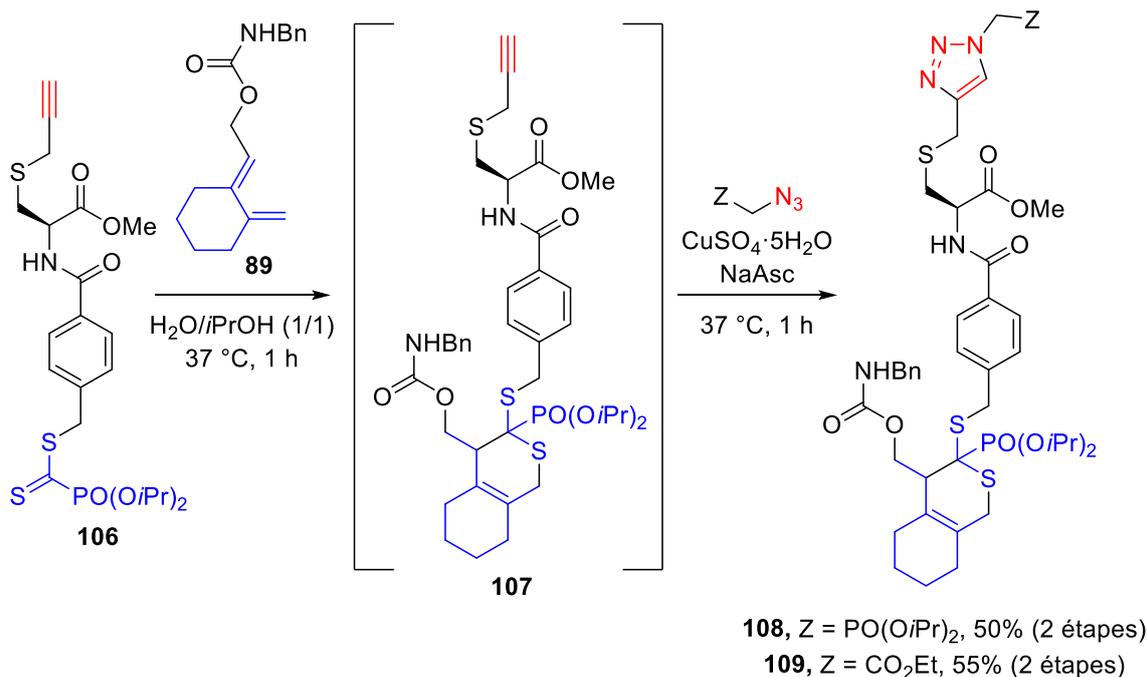
### 2.3. Applications à la double modification de peptides

Pour aller plus loin, nous avons également souhaité synthétiser un réactif multifonctionnel dérivé d'acide aminé pouvant être introduit sur peptide et permettant la double fonctionnalisation de ce dernier par la double-click thia-DA/CuAAC. Cette stratégie s'appuyant sur la fonctionnalisation d'un peptide supporté sur résine, des dérivés d'acides aminés comportant un diène ne pourraient pas être employés sans risquer leur dégradation lors du clivage du peptide en milieu acide (TFA). Nous avons donc envisagé pour une étude préliminaire le réactif modèle **106** comportant le couple alcyne-dithioester et accessible à partir l'ester méthylique de la L-cystéine (Schéma 197). La première étape de synthèse a été la S-alkylation par le bromure de propargyle (53% de rendement), suivie de la N-acylation par le chlorure de 4-(chlorométhyl)benzoyle, pour donner le produit **105** avec un rendement isolé de 53%. La deuxième étape a été réalisée par ajout lent de l'amine sur un excès du chlorure d'acyle de façon à limiter la formation de produits de N-benzoylation. Enfin, la réaction de S-benzoylation du sel de dithioester **38b** par le composé **105** a permis d'obtenir le dérivé souhaité avec 84% de rendement, soit un rendement de 24% sur trois étapes.



**Schéma 197.** Synthèse d'un dérivé d'acide aminé bifonctionnel alcyne-dithioester

Nous avons ensuite engagé l'alcyne-dithioester **106** dans une réaction monotope de double-click (4+2)/(3+2) avec des partenaires modèles, le diène **89** et deux azotures, l'azido phosphonate **94** et le 2-azidoacétate (Schéma 198). Les adduits **108** et **109** ont été obtenus avec un rendement sur les deux étapes de respectivement 50% et 55% et des sélectivités quasi identiques pour les deux cas, avec des ratios pour les quatre isomères de 25/15/20/40, mesurés en RMN <sup>31</sup>P.



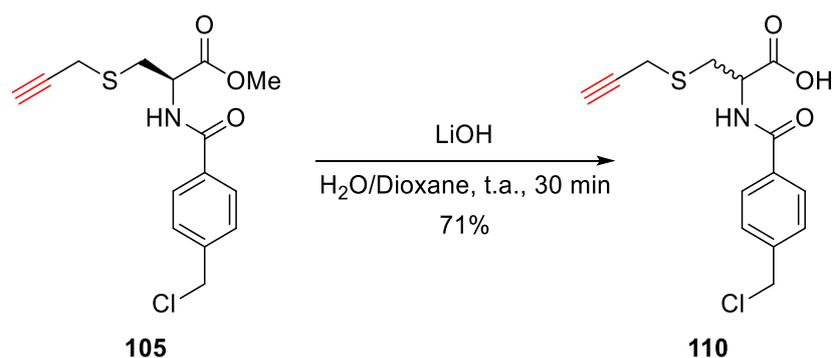
<sup>31</sup>P NMR (ppm)

P : 13,8 pour **108**

P : 19,2 ; 18,0 ; 17,5 ; 16,6

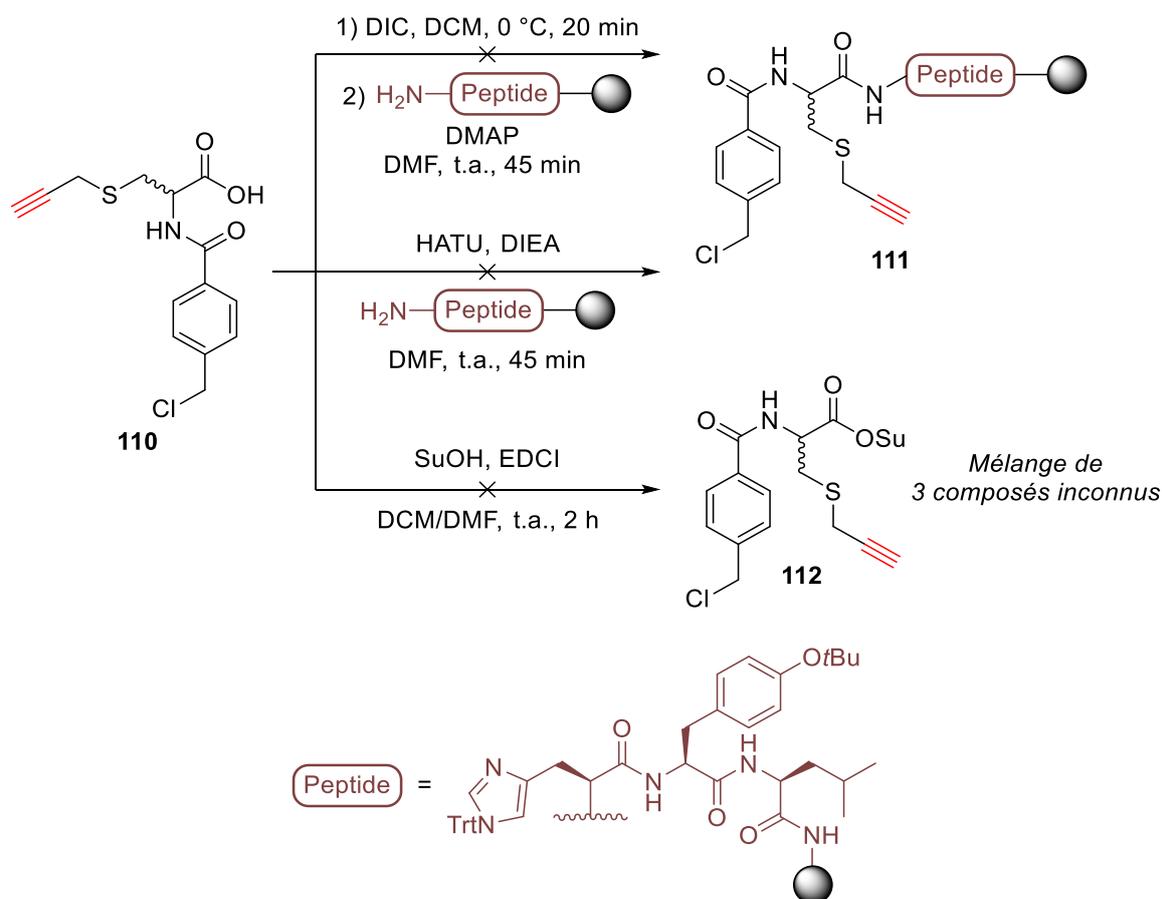
**Schéma 198.** Réactions de double-click (4+2)/(3+2) sur un acide aminé bifonctionnel

Suite aux bons résultats obtenus dans la réaction de double-click avec le réactif dérivé de la cystéine, nous avons souhaité l'introduire dans la structure d'un peptide par couplage peptidique sur support solide. Pour ce faire, nous avons d'abord hydrolysé l'ester méthylique présent au sein de **105** par saponification au LiOH. Cette étape a parfaitement fonctionné puisque l'acide carboxylique désiré **110** a été obtenu avec un rendement de 71% (Schéma 199). A ce stade nous n'avons pas vérifié si une racémisation (probable en milieu basique) du dérivé de la cystéine avait eu lieu. Ce phénomène pourrait notamment être quantifié par HPLC chirale et en cas de racémisation, l'utilisation d'une réaction plus douce comme l'hydroxide de triméthylétain pourrait permettre de s'en affranchir complètement.<sup>299</sup>



**Schéma 199.** Saponification de **105** par LiOH

Par la suite, avec les deux agents de couplage (DIC ou HATU) que nous avons utilisé, nous n'avons pas pu coupler cet acide carboxylique à un tripeptide modèle sur résine (Schéma 200). Nous avons ensuite tenté d'activer l'acide carboxylique sous la forme d'un ester de succinate, malheureusement seul un mélange de trois composés non identifiés a été obtenu sans trace de l'ester activé désiré **112**.



**Schéma 200.** Essais infructueux de couplages peptidiques ou d'activation de l'acide **110**

Ce projet est toujours en cours d'étude au laboratoire mais s'appuie maintenant sur l'utilisation du réactif trifonctionnel obtenu à partir de la Boc-Tyr-OH (Schéma 201).

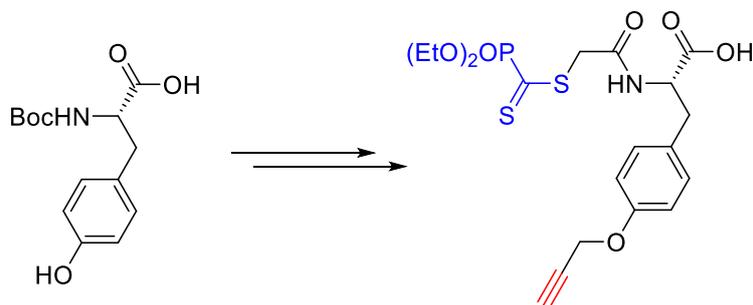
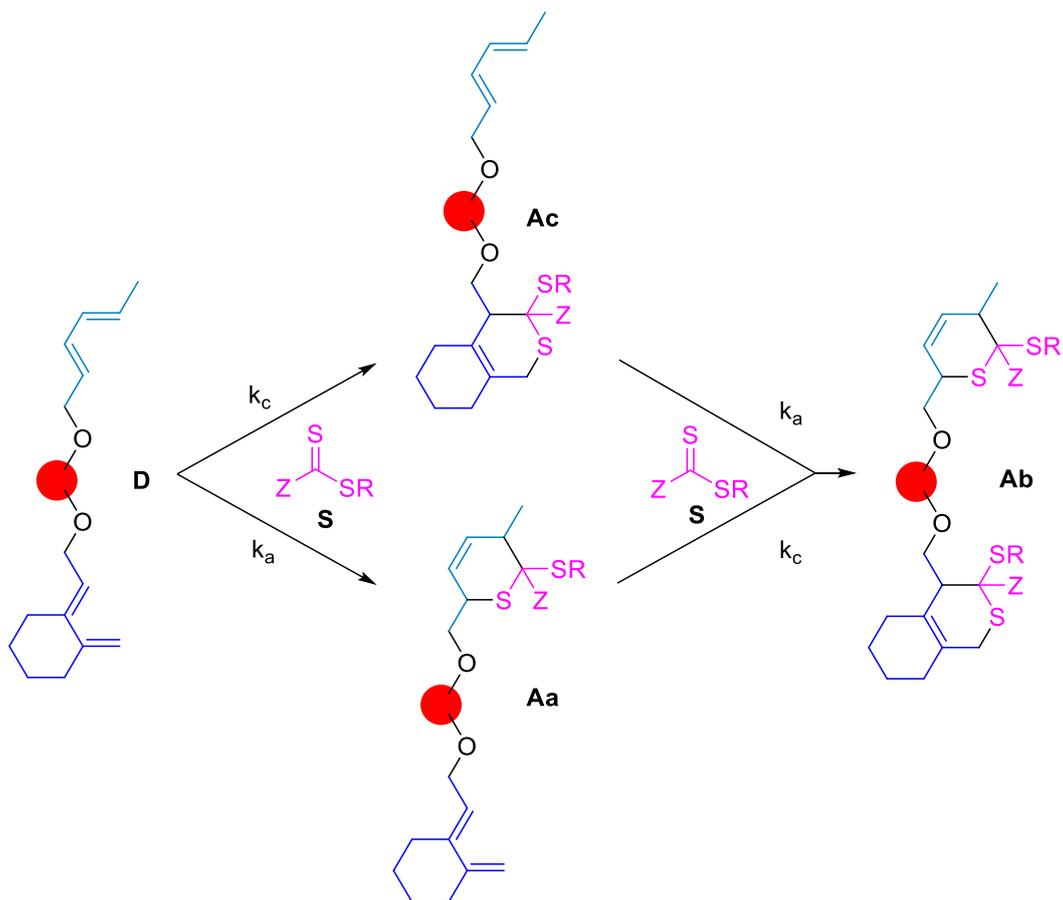


Schéma 201. Structure du nouveau réactif trifonctionnel dérivé de tyrosine

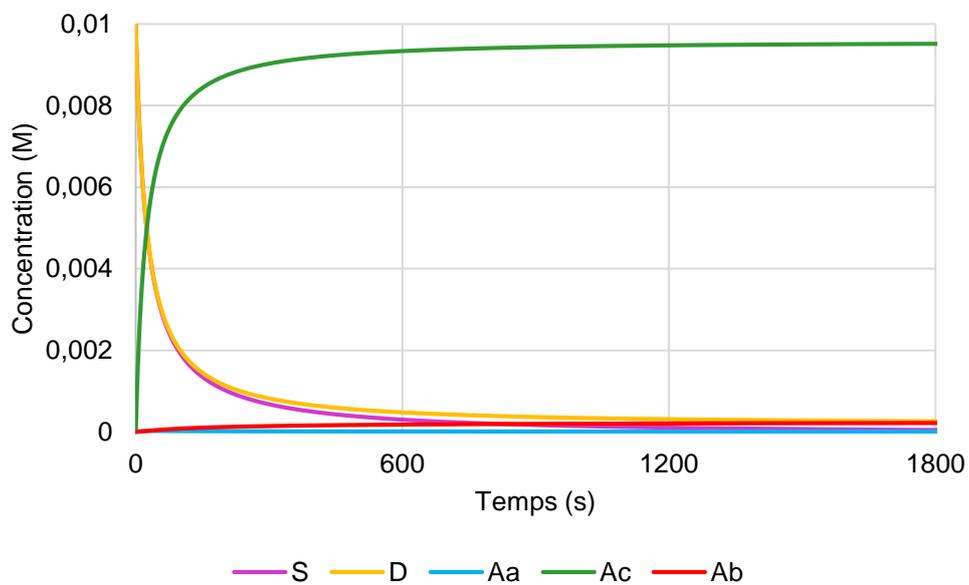
### 3. Etude d'une stratégie double click bis-thia-Diels-Alder par discrimination cinétique

#### 3.1. Concept

Nous avons également envisagé une deuxième stratégie de double-click exploitant la différence de réactivité observée entre les deux diènes acyclique et exocyclique décrits en §2. Afin d'évaluer le potentiel de cette stratégie, nous avons tout d'abord réalisé une étude cinétique théorique. A partir d'un réactif **D** portant les deux structures diéniques, l'ajout d'un dithioester pourrait conduire en théorie aux deux adduits **Ac** et **Aa** avec une constante de vitesse  $k_c$  et  $k_a$ , respectivement (Schéma 202). Chaque adduit peut également réagir une seconde fois avec le dithioester pour donner l'adduit **Ab** avec une constante de vitesse  $k_a$  pour **Ac** et  $k_c$  pour **Aa**. A partir du modèle décrit dans le Schéma 202, il est possible de tracer l'évolution des concentrations en chaque espèce au cours du temps (Figure 141). Nous avons sélectionné une concentration initiale en dithioester **S** et di-diène **D** de 10 mM (conditions stœchiométriques) et des constantes de vitesse de  $k_c = 4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et  $k_a = 0,025 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Après 30 minutes, cette simulation conduit à une conversion totale de **S** et à la formation quasi-exclusive de **Ac** (98% des adduits formés).



**Schéma 202.** Illustration de la stratégie « double thia-Diels-Alder »



**Figure 141.** Simulation de l'évolution des concentrations dans la stratégie « double thia-Diels-Alder »

Pour réaliser cette étude, une première plateforme bifonctionnelle **117** a été conçue autour d'un cœur aromatique portant deux bras « éthylène glycol » comme espaceurs hydrophiles liant chacun un des deux diènes (Figure 142). Une plateforme trifonctionnelle **129** a également été envisagée, portant un troisième bras fonctionnalisé par un azoture (Figure 143), ce dernier pouvant permettre par la suite l'introduction d'un motif supplémentaire par CuAAC.

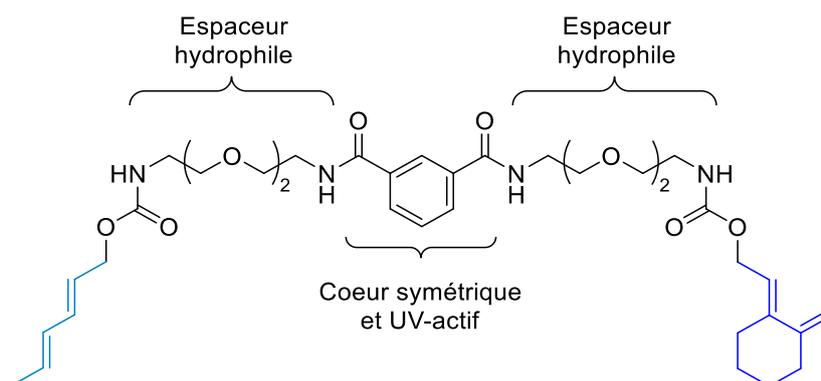


Figure 142. Plateforme bifonctionnelle **117**

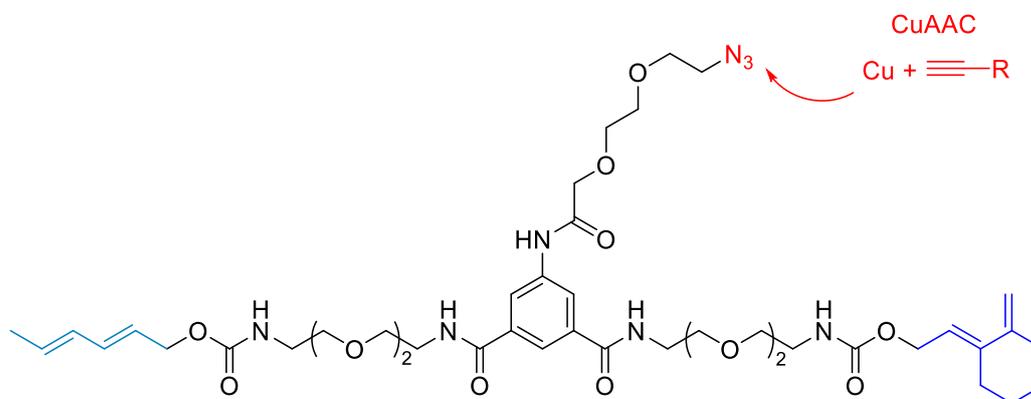
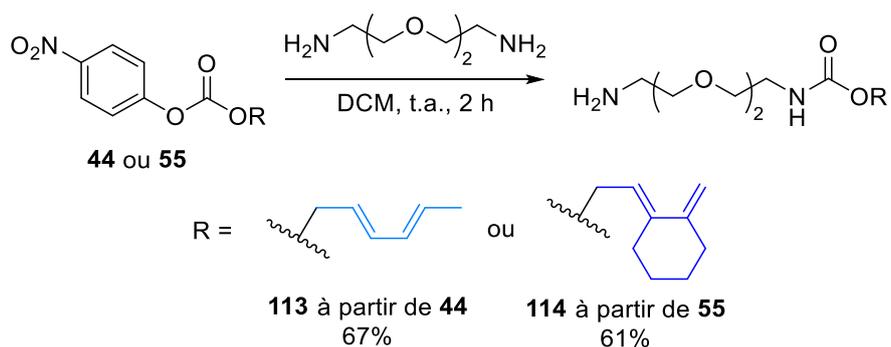


Figure 143. Plateforme trifonctionnelle **129**

### 3.2. Synthèse et applications de la plateforme bifonctionnelle

Pour accéder à la plateforme bifonctionnelle **117** nous avons utilisé la stratégie décrite par Viault *et al.*<sup>291</sup> à partir d'isophtalate de monométhyle commercial. Dans un premier temps, les deux bras diéniques **113** et **114** portant le motif éthylène glycol ont été obtenus par addition de la 2,2'-(Éthylènedioxy)bis(éthylamine) sur les carbonates activés **44** et **55** avec des rendements respectifs de 67% et 61% (Schéma 203).



**Schéma 203.** Synthèse des diènes **113** et **114**

Le diène acyclique **113** a été d'abord couplé via sa fonction amine terminale avec l'isophtalate de monométhyle, après activation de ce dernier par le PyBOP, pour conduire avec un rendement de 98% à **115**, dont la saponification par LiOH a fourni l'acide correspondant **116** avec un rendement de 62% (Schéma 204). Ce dernier a été ensuite couplé de la même manière le composé **114** portant le motif diénique exocyclique pour donner le di-diène **117** avec un rendement de 74%.

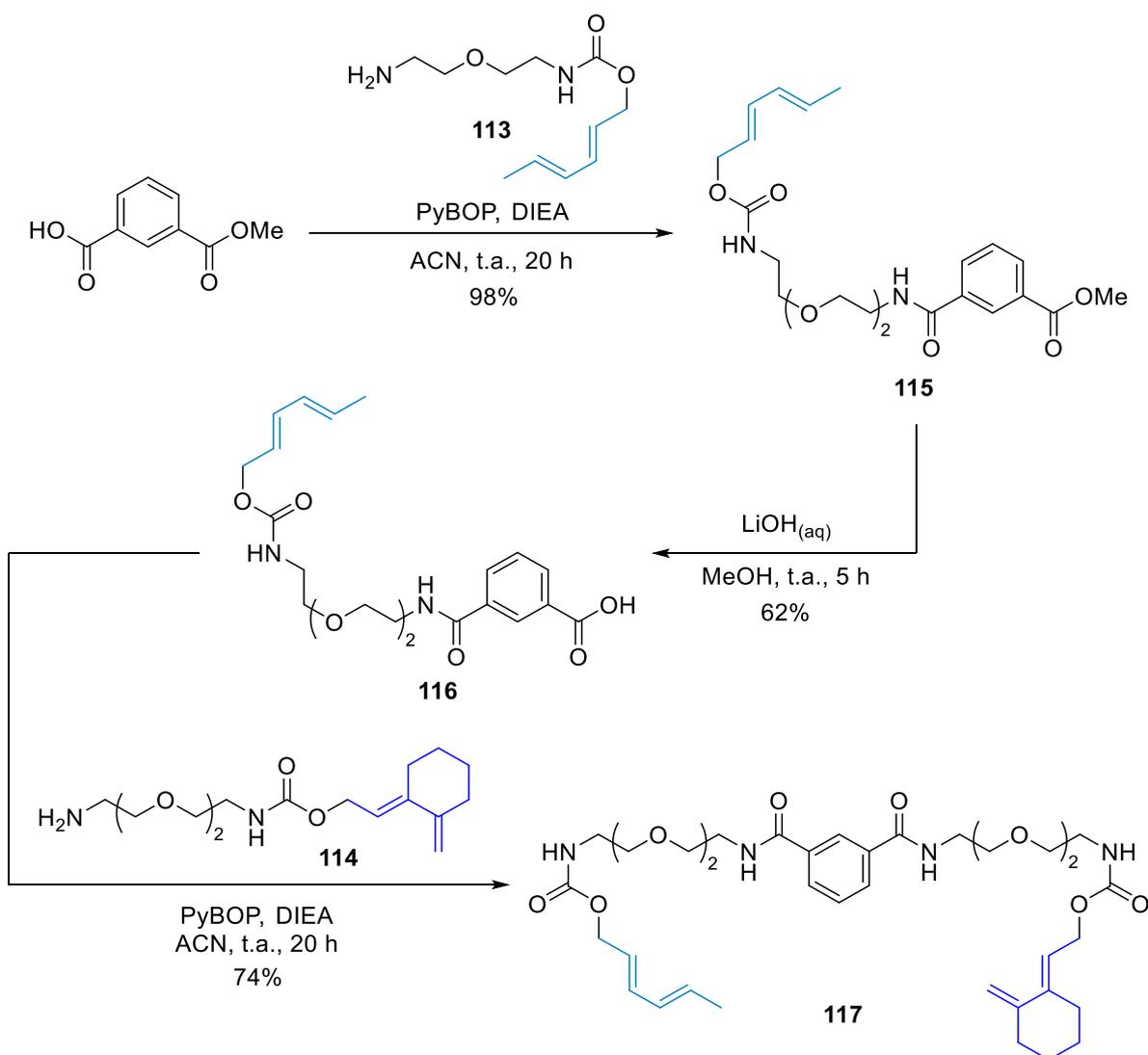
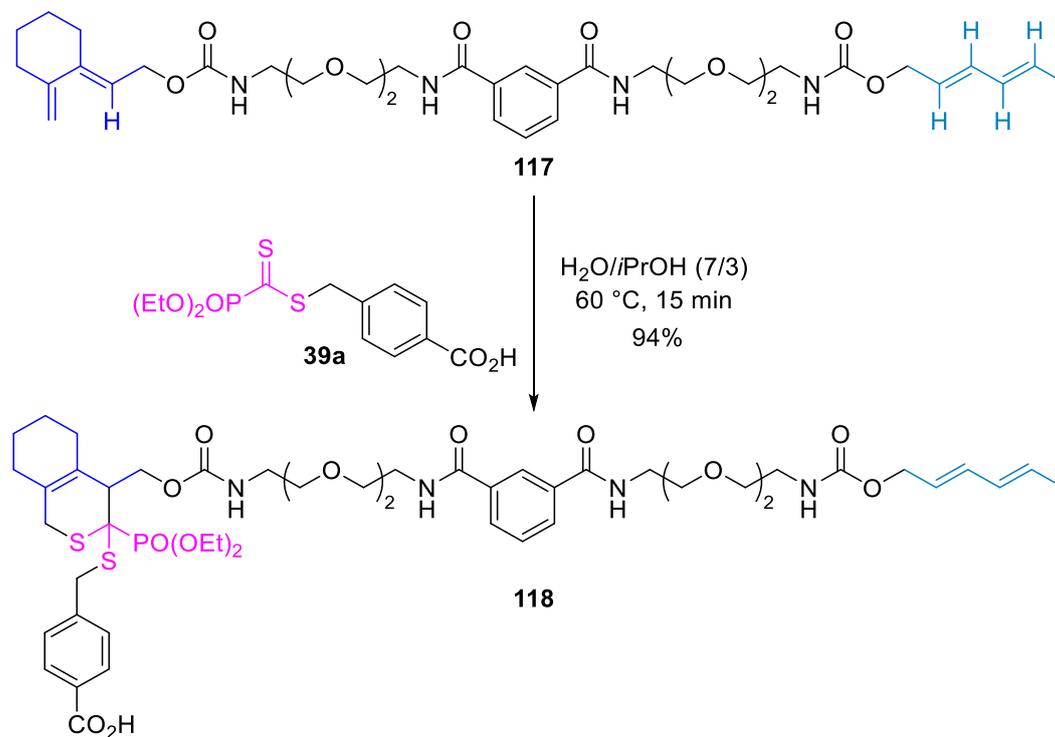


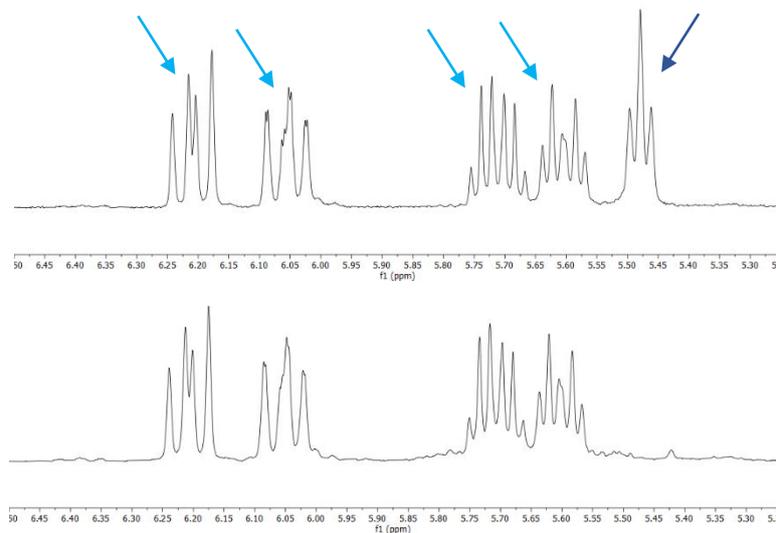
Schéma 204. Synthèse du di-diène **117**

Nous avons ensuite vérifié l'hypothèse émise sur la sélectivité de la première cycloaddition par rapport aux deux diènes présents dans la structure de **117**. Pour cela nous avons fait réagir le di-diène **117** et le dithioester **39a** dans un mélange H<sub>2</sub>O/PrOH (70/30) à 60°C et analysé les produits formés (Schéma 205). Après 15 minutes de réaction, une conversion totale vers les adduits **118** issus de la réaction de thia-Diels-Alder du diène cyclique a pu être observée par l'analyse en RMN <sup>1</sup>H du produit brut qui a montré la disparition des signaux vinyliques du diène cyclique (Figure 144) à 5,48 ppm, sans diminution ou modification des signaux du diène acyclique entre 5,60 ppm et 6,25 ppm. La RMN du <sup>31</sup>P du même composé a également mis en évidence la présence de quatre signaux correspondants aux adduits de thia-Diels-Alder dans une

proportion de 27% (20,3 ppm), 10,5% (19,7 ppm), 18,5% (19,4 ppm) et 44% (18,9 ppm) corroborant l'hypothèse d'une réaction sélective du diène exocyclique.



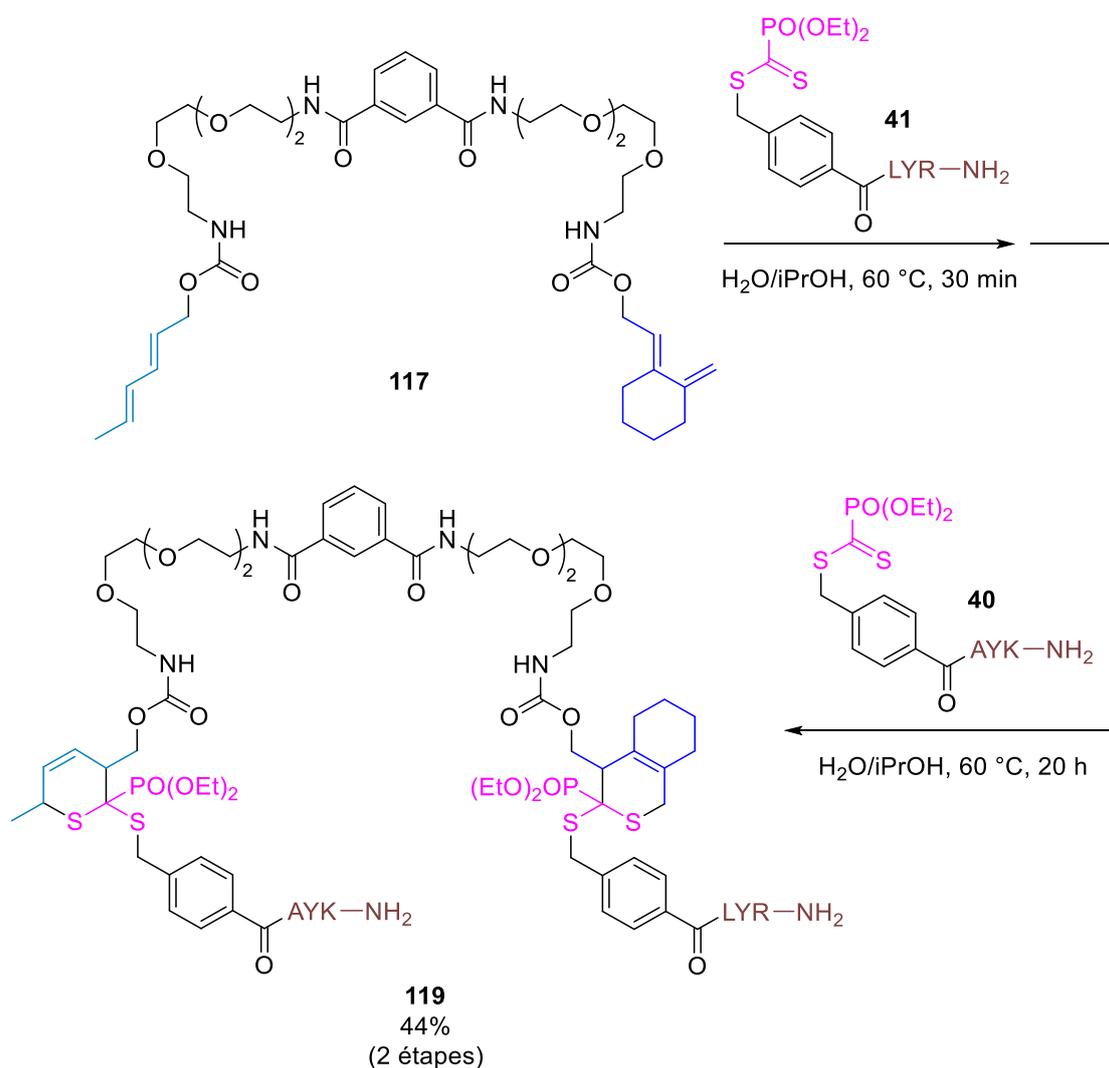
**Schéma 205.** Réaction de thia-Diels-Alder entre **39a** et **117**



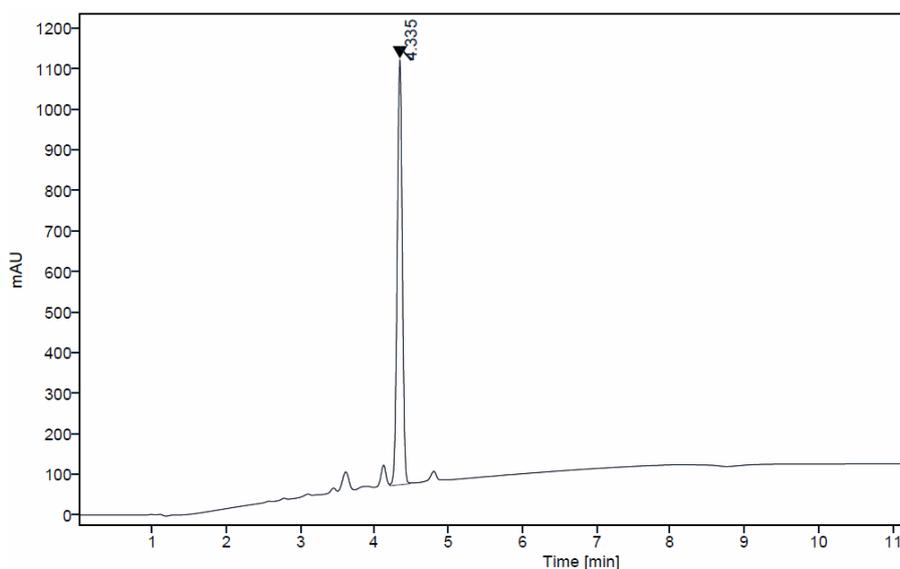
**Figure 144.** Evolution des signaux RMN  $^1\text{H}$  après réaction de thia-Diels-Alder entre **117** (haut) et **118** (bas)

Nous avons ensuite employé le di-diène **117** dans une réaction comprenant deux tripeptides différents **40** et **41** fonctionnalisés par un phosphonodithioester (Schéma

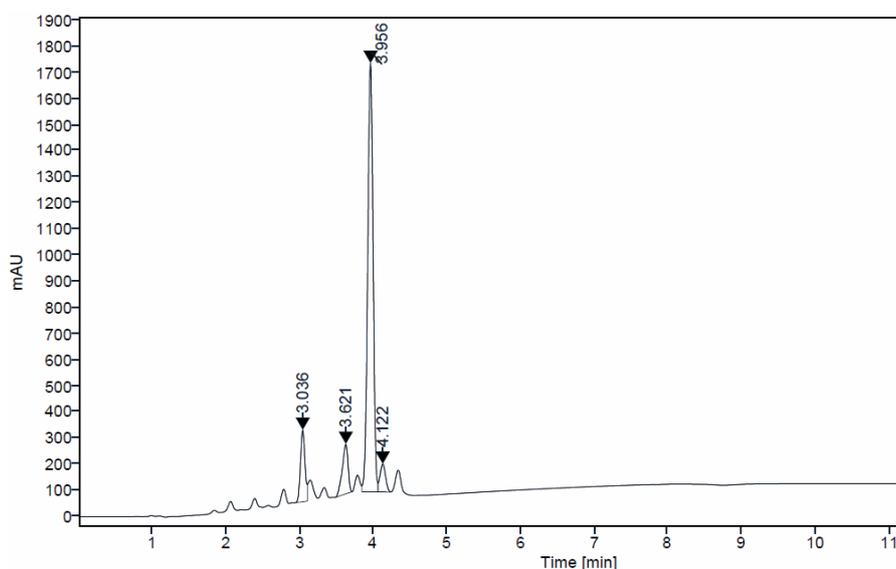
205). La première cycloaddition entre **117** et le premier dithioester-peptide **41** a conduit après 30 minutes à la formation quasi-quantitative des cycloadduits issus de la réaction du diène exocyclique (Figure 145). Nous avons ensuite rajouté à ce milieu le second dithioester-peptide **40** qui a réagi avec le diène acyclique pour donner après 20 h le produit désiré **119** avec un rendement de 44% sur les deux étapes. Cette réaction présente un profil de brut réactionnel propre en HPLC, avec un pic majoritaire correspondant au produit attendu (Figure 146).



**Schéma 206.** Réactions de « double thia-Diels-Alder » sur **117**



**Figure 145.** Profil HPLC à 254 nm après la première cycloaddition sur la plateforme bifonctionnelle



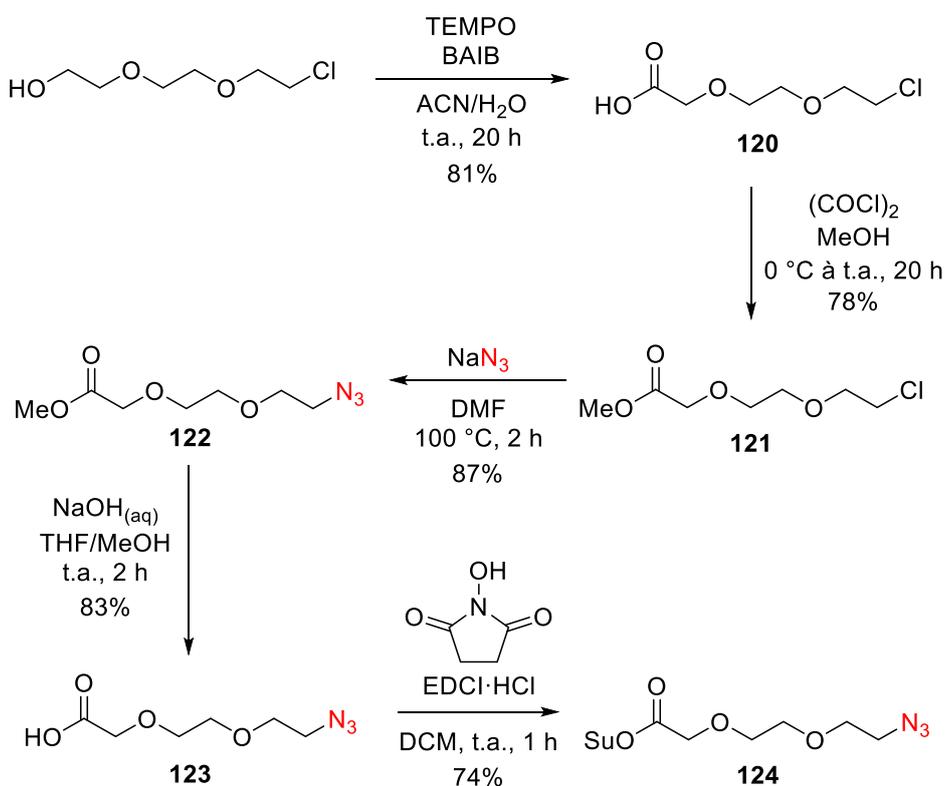
**Figure 146.** Profil HPLC à 254 nm après la seconde cycloaddition sur la plateforme bifonctionnelle

### 3.3. Synthèse et application d'une plateforme trifonctionnelle

Nous nous sommes ensuite intéressés à la seconde plateforme **129** portant trois fonctions distinctes, un azoture, un diène acyclique et un diène exocyclique. Pour la synthèse nous nous sommes basés de nouveau sur la stratégie décrite par Viault *et al.*<sup>291</sup> en utilisant cette fois-ci comme précurseur le monométhyl 5-nitroisophthalate.

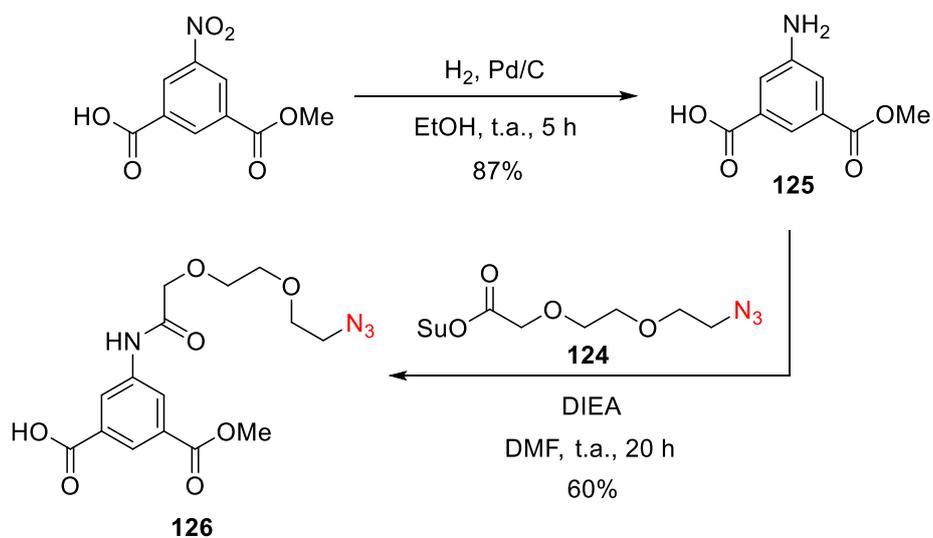
Nous nous sommes concentrés dans un premier temps sur la synthèse du bras PEG fonctionnalisé par un azoture (Schéma 207). Pour cette synthèse, le 2-(2-(2-

chloroéthoxy)ethoxy)éthan-1-ol a tout d'abord été oxydé en acide carboxylique **120** correspondant par action du bis(acetoxy)iodobenzène (BAIB) et du (2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)oxyl (TEMPO).<sup>300</sup> L'acide a ensuite été protégé sous la forme d'un ester méthylique **121** pour conduire à l'azoture **122** après substitution nucléophile.<sup>300</sup> La saponification de l'ester obtenu pour donner l'acide-azoture **123**,<sup>300</sup> suivie de la réaction avec le *N*-hydroxysuccinimide après activation par le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDCI), nous a permis d'obtenir l'ester activé **124** avec un rendement global de 34% sur les cinq étapes.<sup>301</sup>



**Schéma 207.** Synthèse du précurseur **124** du bras « azoture »

La synthèse a été ensuite poursuivie avec la réduction du groupement nitro du 5-nitro isophthalate de monométhyle en conditions d'hydrogénation pallado-catalysée pour donner le dérivé d'aniline **125** (Schéma 208).<sup>291</sup> Ce dernier a finalement été couplé à l'ester activé **124** précédemment synthétisé pour donner l'amide **126** correspondant avec un rendement global de 52% sur les deux étapes.

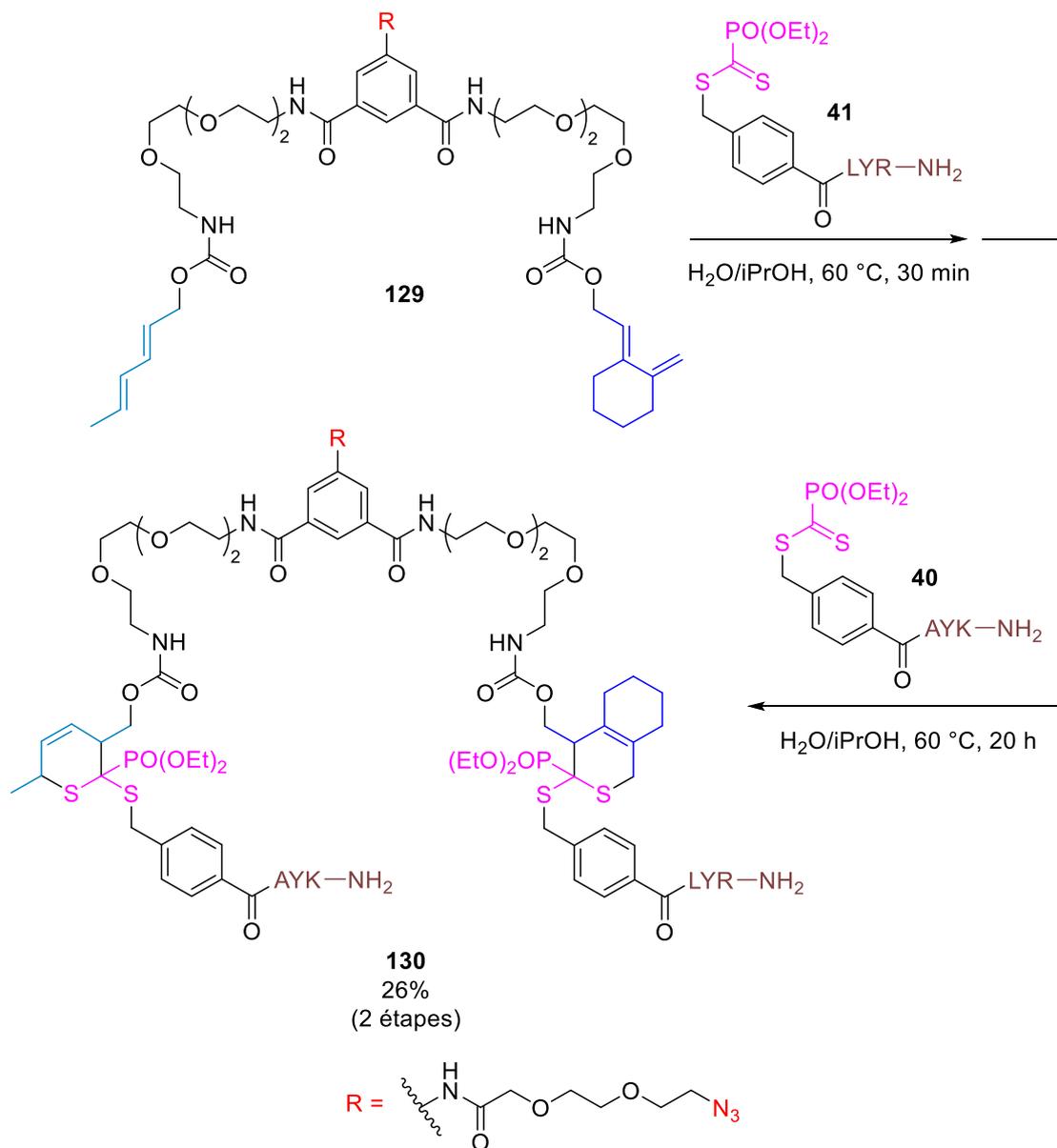


**Schéma 208.** Introduction du bras « azoture » sur le cœur aromatique

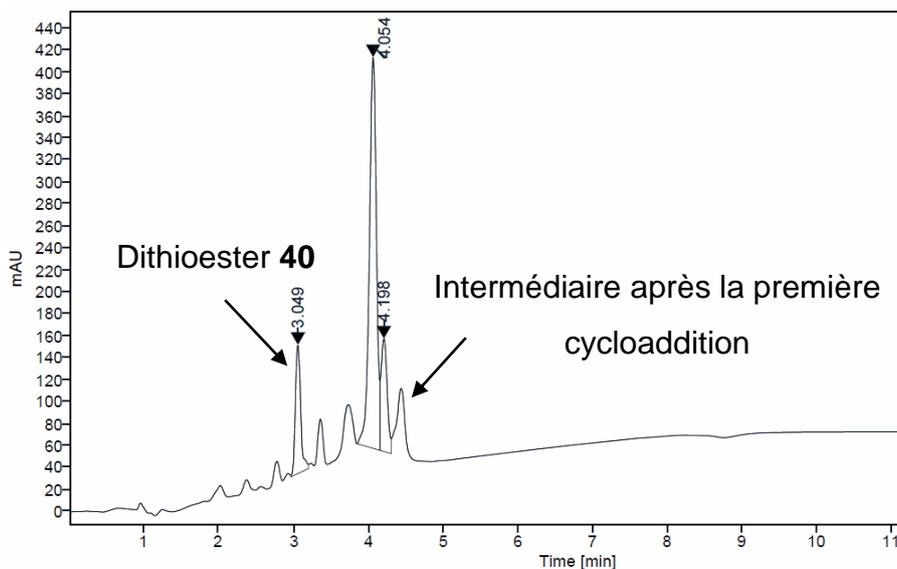
Une fois ce bras « azoture » introduit, nous avons réalisé la même séquence que celle décrite pour la plateforme bifonctionnelle (Schéma 209). Un premier couplage entre **126** et **113** au PyBOP nous a permis d'introduire le bras « diène acyclique » pour donner le composé monoester **127**. Sa saponification à l'aide de LiOH a ensuite conduit à l'acide carboxylique **128** correspondant, qui a été engagé dans la réaction de couplage avec **114** (le bras « diène cyclique ») pour conduire à la plateforme trifonctionnelle **129** avec un rendement global de 33% sur les trois étapes.



cette plateforme qui pourrait fortement ralentir la seconde réaction. Une solution pourrait être de rallonger les espaceurs « éthylène glycol » de façon à réduire l'encombrement autour des deux diènes.

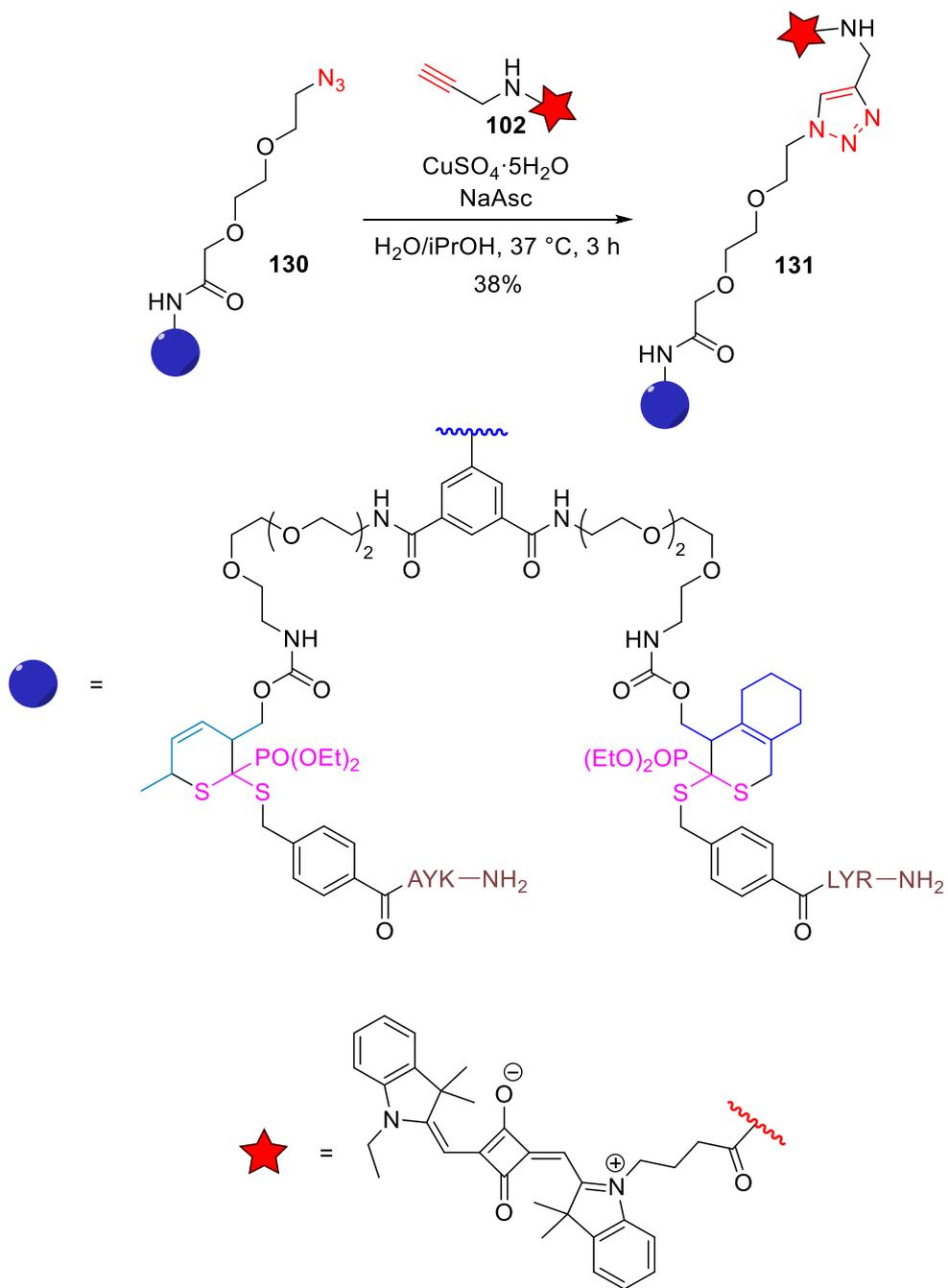


**Schéma 210.** Réactions de « double thia-Diels-Alder » sur la plateforme trifonctionnelle **130**



**Figure 147.** Profil HPLC à 254 nm après la seconde cycloaddition pour la plateforme trifonctionnelle

Enfin, nous avons fonctionnalisé le troisième bras par le biais d'une réaction CuAAC à l'aide de l'alcyne dérivé de squaraine **102**. Cette réaction nous a permis d'obtenir la plateforme trifonctionnalisée **131** après trois heures de réaction avec un rendement modéré de 38% (Schéma 211).



**Schéma 211.** Fonctionnalisation du bras « azoture » par réaction CuAAC



## Conclusion et perspectives de la seconde partie

Dans cette seconde partie, nous nous sommes intéressés à l'application d'une réaction de thia-Diels-Alder pour le marquage de peptides à visée thérapeutique. L'introduction d'un motif phosphonodithioester sur peptide a tout d'abord été développée, sur support ou en solution. Cette stratégie a conduit à l'obtention de plusieurs peptides ou pseudo-peptides fonctionnalisés par un dithioester et cela malgré la présence de plusieurs nucléophiles (amines, guanidines, histidines, alcools) au sein de leur séquence. Par la suite, nous avons conçu et synthétisé un diène exocyclique qui a permis d'obtenir une constante de vitesse suffisamment élevée pour rendre possible l'application de cette réaction en radiomarquage au fluor-18.

Ce radiomarquage a ainsi été effectué avec succès sur deux peptides avec des dcRCY (calculés à partir du [ $^{18}\text{F}$ ]) de  $54 \pm 2\%$  ( $n = 2$ ) et  $44 \pm 6\%$  ( $n = 5$ ) pour le tripeptide [ $^{18}\text{F}$ ]-**62** et le pseudopeptide-PSMA [ $^{18}\text{F}$ ]-**67** respectivement. [ $^{18}\text{F}$ ]-**67** a par la suite démontré une excellente stabilité dans le sérum et le sang de souris tout en conservant une bonne spécificité pour le récepteur PSMA. Enfin, [ $^{18}\text{F}$ ]-**67** a permis la détection efficace *in vivo* de tumeurs LNCap, sur un modèle de souris xenogreffées.

Cette réaction a également pu être appliquée au marquage de peptides à l'aide de fluorophores dans des conditions douces ( $\text{H}_2\text{O}/i\text{PrOH}$ ,  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , 1 h). Trois fluorophores (la fluoresceine, la rhodamine B et une squaraine) ont tout d'abord été employés avec succès pour le marquage chimiosélectif du tripeptide modèle **40** conduisant aux peptides fluorescents correspondant **78**, **79** et **80** avec de bons rendements compris entre 66 et 70%. Enfin, pour montrer l'étendue de la méthode, l'apeline-13 a été marquée à l'aide du fluorophore squaraine avec un rendement de 68%. L'affinité de la sonde **82** pour le récepteur APJ a été confirmée en utilisant un essai basé sur la technique de TR-FRET ( $K_d = 0,15 \pm 0,13\text{ nM}$ ). Sa spécificité pour la cible a été vérifiée par des expériences de compétition en présence d'une dose croissante de pyr-apeline-13 (**II-156**) et de l'apeline-17 (**II-154**) permettant ainsi le suivi du déplacement de la sonde **82** par TR-FRET. Enfin, son utilisation pour l'imagerie du récepteur APJ à la surface de cellules HEK surexprimant le récepteur APJ a été démontrée par microscopie confocale.

Nous avons également développé plusieurs stratégies de « double click » au cours de cette deuxième partie. Une première stratégie s'est appuyée sur l'association de la réaction de thia-Diels-Alder et de la réaction de CuAAC. L'utilisation de ces deux réactions a permis d'accéder aux produits désirés avec des rendements variant entre 40 et 70% sur les deux étapes. Dans un second temps, nous avons également envisagé d'exploiter la différence de réactivité entre les deux diènes employés dans cette deuxième partie (acyclique et exocyclique) pour une stratégie double click. Malgré une excellente sélectivité pour le diène exocyclique lors de la première réaction de thia-Diels-Alder, la seconde étape s'est avérée moins efficace avec des conversions incomplètes et des rendements finaux modérés (entre 26 et 44% sur les deux étapes).

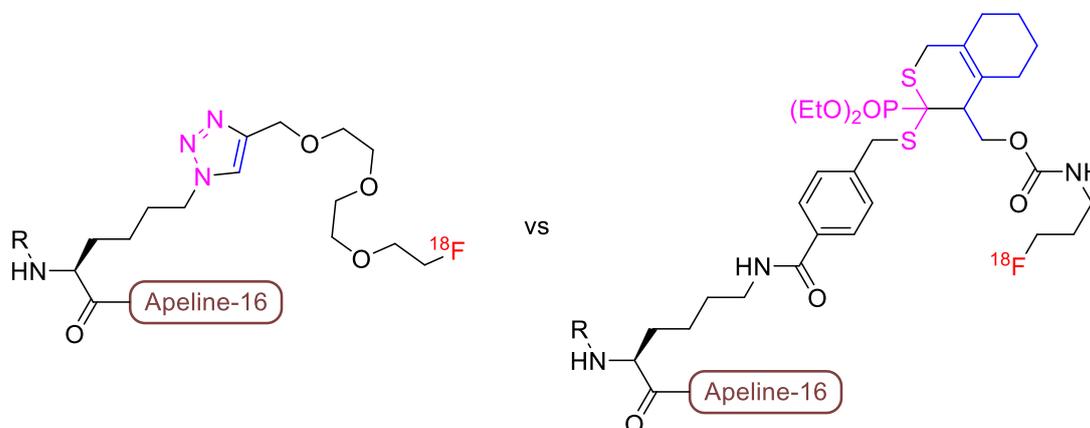
Cette réaction de thia-Diels-Alder a ainsi montré un fort potentiel en tant que réaction de chimie click dans un contexte de bioconjugaison (Tableau 27). Elle peut ainsi être considérée comme complémentaire aux réactions de SPAAC, IEDDA et SPSAC, toutes des alternatives non-catalysées à la réaction de CuAAC.

	Cycloadditions (3+2)		Cycloadditions (4+2)	
	SPAAC	Mesoionic	IEDDA	TDA
Partenaires	Azoture + Alcyne contraint	Sydnone + Alcyne contraint	Tétrazine + Alcène contraint (ou Alcyne contraint)	Dithioester + Diène
Catalyse	Non	Non	Non	Non
Etapes de synthèse précurseurs	BCN (4) DBCO (7)	BCN (4) DBCO (7)	BCN (4) TCO (3) s-TCO (3)	Dithioester (1) Diène (3)
Stabilité réactifs	Thiol sur alcyne	Thiol sur alcyne	Isomérisation TCO Thiol sur alcyne	Thiol sur dithioester
Défauts	Taille Coût Lipophilie	Taille Coût Lipophilie	Taille Coût Lipophilie Stabilité diazine	Lipophilie
Plusieurs isomères ?	Oui (2)	Oui (2)	Oui (> 2)	Oui (4)
Cinétique maximale	10 M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>	10 <sup>4</sup> M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>	10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>	4 M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>
Excès partenaire en <sup>18</sup> F	10 à 100 équiv.	~ 100 équiv.	2 à 20 équiv.	10 à 20 équiv
A <sub>m</sub> (GBq/μmol)	1 à 70	50	70 à 170	60 à 100

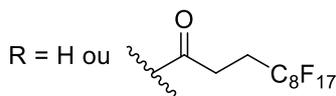
**Tableau 27.** Comparaison des propriétés des grandes réactions de click avec la TDA

Afin de poursuivre ce projet, plusieurs perspectives ont été envisagées. Notre méthode de radiomarquage sera tout d'abord appliquée à l'apeline-17 native et à son dérivé stabilisé par le biais d'une chaîne perfluorée (Figure 148). Ces deux molécules avaient été précédemment marquées par réaction de CuAAC à l'aide d'un dérivé fluoré de type azoture-pegylé. Ce linker avait cependant présenté une certaine instabilité *in vivo* pour l'apeline-17 native, caractérisée par la perte d'une petite molécule fluorée non identifiée à faible temps de rétention en HPLC. Cette dégradation constituait ainsi une limitation majeure à cette méthode vis-à-vis de l'étude de la biodistribution de peptides. L'utilisation de notre réaction de thia-Diels-Alder permettra tout d'abord de simplifier la radiosynthèse en s'affranchissant de l'utilisation de cuivre et d'additifs. Aucune

dégradation n'ayant été observée sur nos adduits lors de nos différents essais, l'utilisation de notre réaction pourrait permettre d'obtenir les différents radioligands dérivés de l'apeline-17 et de suivre leur biodistribution chez la souris.

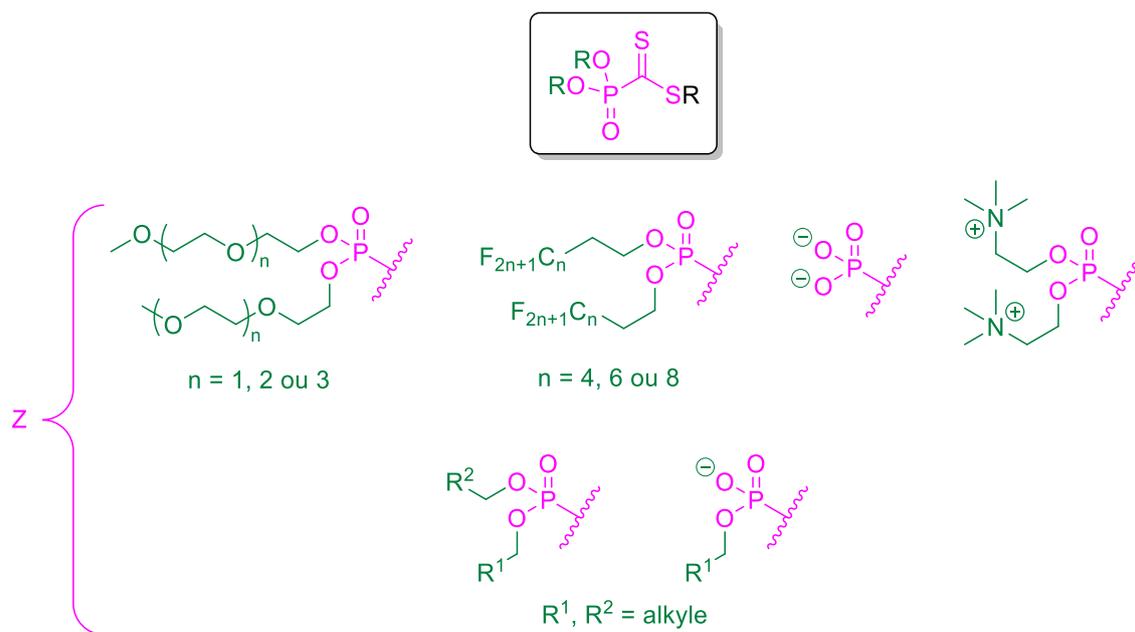


Apeline-16 = Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe



**Figure 148.** Radioligands dérivés de l'apeline-17 obtenus par CuAAC ou thia-Diels-Alder

La modification du partenaire phosphonodithioester sera également étudiée afin de modifier les propriétés physico-chimiques de ce dernier et des adduits de thia-Diels-Alder correspondant (Figure 149). Cette étude portera principalement sur la modification des deux chaînes portées par le groupement phosphonate (chaîne pégylées, perfluorées,...). La modification du phosphonate en acide phosphonique sera également étudiée afin d'obtenir des espèces chargées négativement et donc plus hydrosolubles. Enfin, l'utilisation de phosphonates dissymétriques mono- ou diester sera considérée afin d'augmenter la diversité autour de ce réactif et d'accéder à de nouvelles propriétés physico-chimiques.



**Figure 149.** Modifications des chaînes portées par le groupement phosphonate des phosphonodithioesters



---

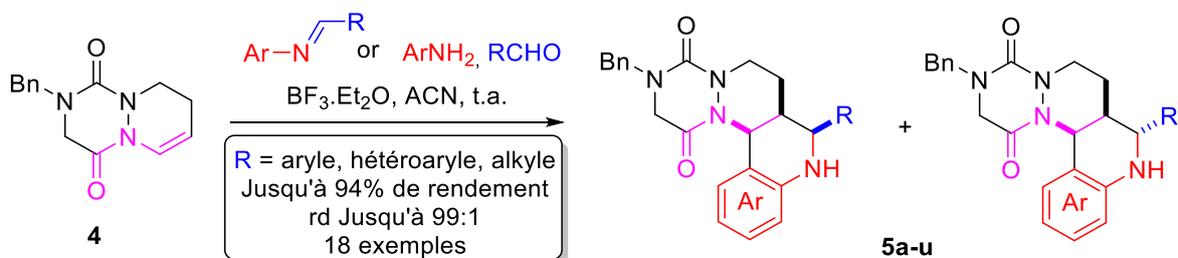
## **Conclusion générale et perspectives**

---



Les travaux réalisés lors de cette thèse ont ainsi ciblé le développement et l'application de nouvelles méthodologies de synthèse pour la diversité moléculaire et la chémobiologie. Ces deux objectifs ont été traités au cours de deux parties distinctes.

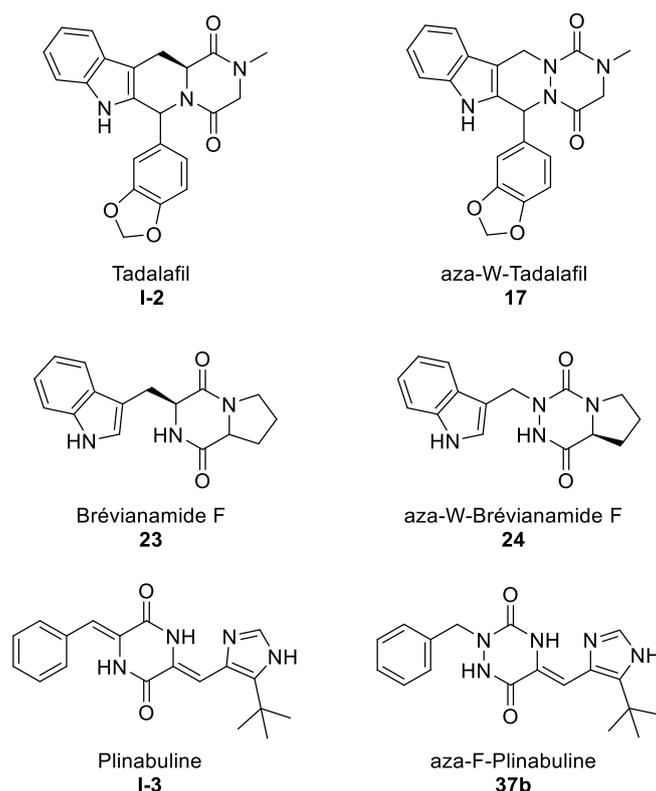
Dans une première partie, nous nous sommes intéressés à la diversification structurale de notre squelette aza-DCP par une réaction de Povarov. Tout d'abord le précurseur **4** a pu être obtenu à partir d'un dérivé de glycine et d'une réaction de cyclohydrocarbonylation du composé **2**. Nous avons ensuite cherché à étudier la réactivité de l'oléfine enrichie présente au sein de la structure de **4**, un énamide endocyclique à 6 chaînons, en tant que partenaire dans la réaction de Povarov. A notre connaissance, très peu d'exemples de réactions de Povarov comportant ce type d'alcène avaient été décrits dans la littérature. Après optimisation, cette réaction nous a permis d'accéder à une vingtaine de structures tétracycliques originales avec des rendements allant jusqu'à 94% (Schéma 212).<sup>302</sup> Ces structures ont été obtenues sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères séparables par HPLC semi-préparative. Des calculs théoriques ont également été effectués afin d'obtenir davantage de précision vis-à-vis du mécanisme de cette réaction. Ces calculs ont été réalisés par la Prof. Isabelle Chataigner de l'Université de Rouen.



**Schéma 212.** Réaction de Povarov appliquée à l'aza-DCP **4**

Afin de démontrer l'intérêt des aza-DCPs par rapport aux DCPs pour des applications en chimie thérapeutique, nous avons appliqué la stratégie de « scaffold hopping » à trois DCPs biologiquement actives : le tadalafil **I-2**, la brévianamide F **23** et la plinabuline **I-3** (Figure 150). Dans cette série, l'aza-W-tadalafil **17** n'a tout d'abord pas pu être obtenu en raison de la faible stabilité chimique de certains intermédiaires de synthèse. Nous avons obtenu la brévianamide F **23** et l'aza-brévianamide F **24**, mais les activités décrites dans la littérature pour la DCP **23** n'ont pu être reproduites sur

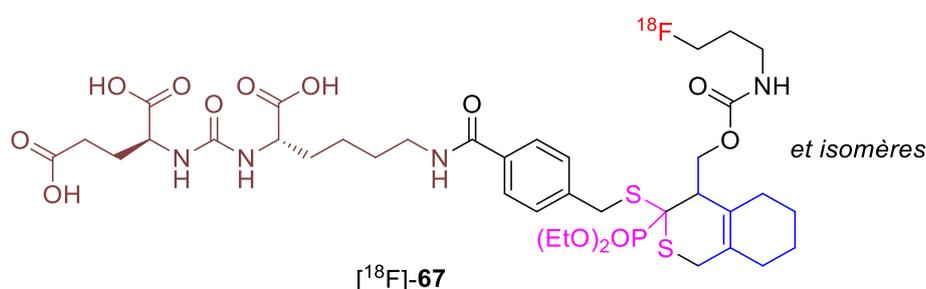
les bactéries et champignons ciblés, tandis que l'aza-DCP **24** ne s'est pas montrée non plus active. Enfin, la plinabuline **1-3** et l'aza-F-plinabuline **37b** ont également été obtenues et testées sur différentes lignées cellulaires cancéreuses en collaboration avec l'équipe du Dre M. Dontenwill (UMR 7021, Illkirch). Tandis que la plinabuline a présenté des activités anticancéreuses similaires à celles déjà décrites, l'analogue aza-DCP n'a pas donné d'activités satisfaisantes.



**Figure 150.** Structures des DCPs ciblées et de leurs équivalents aza-DCPs

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés au développement et à l'application d'une réaction de thia-Diels-Alder comme réaction de chimie click dans le cadre du marquage de peptides. Tout d'abord, la mise au point d'une méthode efficace pour l'introduction du groupement dithioester sur peptide a été étudiée permettant ainsi de fonctionnaliser efficacement un tripeptide modèle. Une optimisation de la structure du partenaire diénique a également été effectuée afin d'augmenter sa réactivité et d'obtenir une cinétique de réaction suffisamment rapide pour le marquage au fluor-18. La réaction a par la suite été appliquée au radiomarquage au fluor-18 d'un tripeptide modèle et d'un ligand pseudo-peptidique du « Prostate-Specific Membrane Antigen » (PSMA),<sup>16</sup> un récepteur surexprimé dans le cancer de la prostate. Ces réactions de

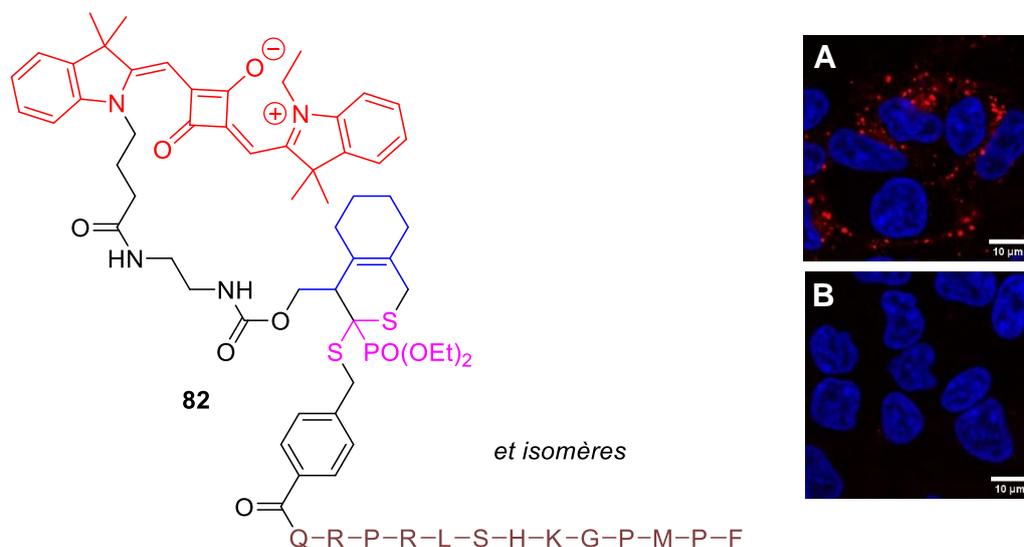
radiomarquage ont pu être totalement automatisées et nous ont permis d'obtenir [<sup>18</sup>F]-**67** (Figure 151) avec un rendement radiochimique corrigé de la décroissance de 45% ± 2 % (n=5). Des études de marquage du récepteur PSMA *in cellulo* et *in vivo* ont été effectuées sur cellules LNCap (cancer de la prostate humain) avec [<sup>18</sup>F]-**67** afin de vérifier son affinité pour ce récepteur malgré la présence de ce nouveau lien hétérocyclique. Enfin, des études de stabilité métabolique (sérum, sang total et microsomes de foie de souris) ont permis de valider la stabilité et le devenir de nos composés *in vivo*. La partie radiomarquage et radioimagerie a été réalisée en collaboration avec une équipe de l'UMR 7178 de l'IPHC. Grâce à ces travaux, j'ai également pu suivre une formation en radioprotection et radiochimie dispensée par cette même équipe de l'UMR 7178.



**Figure 151.** Structure du ligand du PSMA radiomarqué au fluor-18

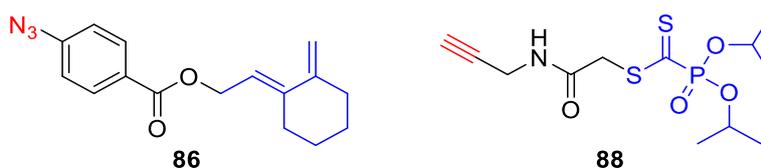
Nous avons ensuite souhaité évaluer le potentiel de cette réaction de bioconjugaison vis-à-vis du marquage de peptides avec différents fluorophores (émettant dans le spectre du vert au rouge lointain). Les conditions réactionnelles ont été légèrement modifiées afin d'être compatibles avec la stabilité et la solubilité des fluorophores. Dans ces nouvelles conditions, nous avons pu marquer notre tripeptide modèle par trois fluorophores en 1 heure seulement avec des rendements compris entre 65 et 70%. Nous avons sélectionné par la suite comme peptide d'intérêt biologique l'apeline-13, un peptide présentant des propriétés thérapeutiques intéressantes pour le traitement du diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires notamment.<sup>17</sup> L'apeline-13 a également pu être marquée par un fluorophore dérivé de squaraine émettant dans le rouge (Figure 152). L'affinité de ce nouveau ligand **82** pour son récepteur APJ a pu être évaluée par le biais d'un test de liaison TR-FRET ( $K_d = 0,15 \pm 0,13$  nM) et au laboratoire (collaboration avec la Dre Julie Karpenko) dans des expériences de

microscopie confocale sur cellules APJ-HEK-SNAP pour la détection et le suivi du récepteur au sein de cellules vivantes.



**Figure 152.** Structure du ligand fluorescent **82** (gauche) et images obtenues par microscopie confocale (droite) en absence (A) et présence (B) d'un excès de pyr-apéline-13 non marquée.

Nous nous sommes intéressés dans une dernière partie à la synthèse et la réactivité de composés bifonctionnels portant deux fonctions chimiques : d'une part, un diène ou un dithioester et d'autre part, un alcyne ou un azoture. Des réactions de cycloaddition (4+2) et (3+2) séquentielles ou 3CR ont tout d'abord été réalisées sur des dérivés bifonctionnels modèles (Figure 153) afin d'évaluer les meilleures combinaisons de réactifs et l'ordre pour effectuer les deux cycloadditions. Cette stratégie « double click » a par la suite été envisagée pour la mono- ou difonctionnalisation de peptides à l'aide d'unités moléculaires d'intérêt (fluorophores, vecteurs, second peptide). Une partie de ces travaux est toujours en cours au laboratoire. Deux étudiantes de M2 (CMS) financées par l'ITI InnoVec que j'ai encadrées ont participé activement à ce projet lors de leur stage.



**Figure 153.** Structures des réactifs bifonctionnels **86** et **88**

Une seconde stratégie « double click » s'est intéressée à l'utilisation des diènes acycliques et exocycliques développés lors de cette thèse afin d'exploiter leur différence de réactivité. Ces travaux préliminaires ont montré de bons résultats qui seront validés par la suite au laboratoire.

En conclusion, nous avons développé deux réactions d'hétérocycloadditions, réactions de Povarov et de thia-Diels-Alder, que nous avons ensuite appliqué respectivement à la diversification structurale des aza-DCPs et au marquage de peptides à visée thérapeutique. Plusieurs molécules obtenues lors de la première partie ont pu être archivées au sein de la chimiothèque du laboratoire et seront potentiellement incluses au sein de la nouvelle chimiothèque de l'Institut du Médicament de Strasbourg (IMS) pour de futurs criblages. La seconde partie a permis de démontrer l'intérêt de notre réaction de thia-Diels-Alder dans un contexte de bioconjugaison et permettra dans le futur le développement de nouveaux ligands fluorescents ou radiomarqués pour l'étude de système biologique.



---

## **Partie expérimentale**

---



## 1. General methods

### 1.1. Commercial reagents and consumables

#### 1.1.1. *For classical chemistry*

Reagents were obtained from commercial sources (Merck, TCI, Fisher scientific, Fluorochem...) and were used without any further purification. Deuterated solvents ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{MeOH-}d_4$ ,  $\text{DMSO-}d_6$ ) were purchased from Euriso-top.

Thin-layer chromatography was performed on Merck silica gel 60F254 plates. VWR silica gel (40-63  $\mu\text{m}$ ) was used for chromatography columns.

#### 1.1.2. *For radiochemistry*

$\text{K}_2\text{CO}_3$  99.99% and Kryptofix  $\text{K}_{2.2.2}$  (4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo-[8.8.8]-hexacosane), anhydrous ACN 99.8%, ethanol (absolute, HPLC grade), propan-2-ol (HPLC grade), hydrochloric acid, trifluoroacetic acid (HPLC grade), sodium acetate (analytical grade) and acetic acid (HPLC grade) were purchased from Merck.  $[\text{}^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$  ( $[\text{}^{18}\text{O}]$  98%) for  $[\text{}^{18}\text{F}]$ -fluorine production was purchased from Nukem isotopes GmbH-Germany. Pure  $\text{H}_2\text{O}$  (18.2  $\text{M}\Omega$ ) was produced with a Purelab option Q purification system (Veolia®). Sodium chloride 0.9% sterile solution was purchased from B BRAUN medical.  $[\text{}^{18}\text{F}]$ -fluorine production was performed with an ACSI® 24 MeV cyclotron by proton irradiation of a 1mL volume niobium target at an energy of 16.5 MeV and an intensity of 35  $\mu\text{A}$ . After 5 minutes of cooling the radioactivity was transferred to the hot cell under He pressure then the transfer lines and the target were rinsed twice (2x1 mL) with pure water. Total transferred activity was measured (well counter in the hot cell) and further transferred to the Raytest module reception vial under He pressure. Residual activity in the intermediate vial after transfer was counted to determine the activity used in each radiosynthesis (a typical activity of 23-24 GBq for a 11  $\mu\text{A}\cdot\text{h}$  irradiation was transferred in the hot cell).

Accell plus QMA carbonate light cartridges were obtained from Waters (130 mg sorbent, Part No 186004051) and used as received, C18 SepPak (tC18 environmental WAT 036800 and C18 WAT 020515) were purchased from Waters and pre-

conditioned with 5 mL of ACN or 5 mL of ethanol followed by 10 mL of pure H<sub>2</sub>O before use.

### 1.1. Reverse Phase HPLC purification

Semi-preparative reverse-phase HPLC purifications were performed on a Waters SunFire C18 OBD Prep column (5 µm, 19 × 150 mm) on a Gilson PLC2020 system. Reverse-phase flash purifications were performed on prepacked Puriflash C18 columns from Interchim on a Gilson PLC2020 system.

### 1.2. Characterisations of pure compounds

#### 1.1.3. *Reverse Phase HPLC analyses*

##### Method A, RP-HPLC

VISMIONES: Analytical reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was performed on an Agilent Technologies 1200 series HPLC system with a Ascentis Express C18 column (2.7 µm, 4.6 mm × 75 mm) using a linear gradient (5% to 100% in 7 min, flow rate of 1.6 mL·min<sup>-1</sup>) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm.

##### Method B, RP-HPLC

7 MIN JOUR GDE COLONNE: Analytical reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was performed on an Agilent Technologies 1200 series HPLC system with a Kinetex EVO C18 column (2.7 µm, 4.6 mm × 150 mm) using a linear gradient (5% to 100% in 7 min, flow rate of 1.5 mL·min<sup>-1</sup>) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm.

##### Method C, RP-HPLC

5 A 100 7 MIN C18: Analytical reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was performed on an Agilent Technologies 1260 Infinity II HPLC system with a Kinetex EVO C18 column (2.7 µm, 4.6 mm × 150 mm) using a linear gradient

(5% to 100% in 7 min, flow rate of 1.5 mL·min<sup>-1</sup>) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm.

#### Method D, RP-HPLC

5 A 100 7 MIN C8: Analytical reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was performed on an Agilent Technologies 1260 Infinity II HPLC system with a Waters SymmetryShield RP8 column (2.7 μm, 4.6 mm × 150 mm) using a linear gradient (5% to 100% in 7 min, flow rate of 2.2 mL·min<sup>-1</sup>) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm.

#### Method E, RP-HPLC

HPLC Dionex® U3000 equipped with a UV-Vis DAD detector, a radioactivity detector (NaI) and a 20 μL injection loop was used for radio-chemical conversion determination, quality control and molar activity determination (columns, eluents and gradients are reported in each experimental section). The radioactive detector is placed after the UV-Vis DAD detector generating a delay (function of tubing length and flow) between the two signals. The difference observed between the shape of radioactive signals versus UV-Vis detection is due to the difference in size of the detection cells and the rate of acquisition of both detector (1 Hz for the radioactive channel versus 5 Hz for UV-Vis channel).

#### 1.1.4. NMR analyses

<sup>1</sup>H NMR spectra were recorded at 400 MHz and 500 MHz, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded at 101 MHz and 126 MHz, <sup>19</sup>F NMR spectra were recorded at 376 MHz and 471 MHz and <sup>31</sup>P NMR spectra were recorded at 162 MHz and 202 MHz on a Bruker Advance spectrometer. Spectra were recorded at 298K unless specified otherwise. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm), coupling constants (J) are reported in hertz (Hz). Signals are described as s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), p (pentuplet), h (hexuplet), hept (heptuplet) and m (multiplet). The mention “br” has been added for broad signals.

#### 1.1.5. *MS analyses*

Low resolution mass spectra (LRMS) and high resolution mass spectra (HRMS) were obtained on an Agilent Technologie 6520 Accurare-Mass Q.Tof LC/MS apparatus equipped with a Zorbax SB C18 column (1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1  $\times$  50 mm) using electrospray ionization mode (ESI-TOF) and a time-of-flight analyzer (TOF).

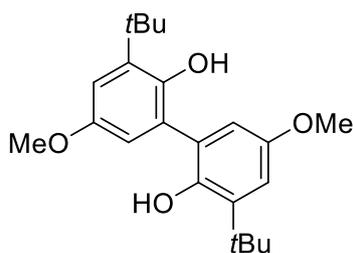
## 2. Experimental procedures

### 2.1. Partie I : Diversification structurale des Aza-DCPs

#### 2.1.1. *Diversification des aza-DCPs par la réaction de Povarov*

##### 2.1.1.1 *Chemical syntheses*

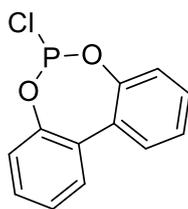
### **3,3'-di-tert-butyl-5,5'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-2,2'-diol (SI-1)**



In a 2L-three necked RBF, 2-tert-butyl-4-methoxyphenol (1 eq., 10 g, 55.5 mmol) was dissolved in methanol (400 mL). A solution of potassium hexacyanoferrate(III) (2 eq., 36.5 g, 110 mmol) and KOH (7 eq., 21.8 g, 388 mmol) in water (400 mL) was added dropwise through an addition funnel over an hour. The reaction mixture was stirred overnight at r.t. MeOH was evaporated and to this residue was then added 260 mL of water and the aqueous phase was extracted with 3\*200 mL of EtOAc. The organic phases were gathered, washed twice with water, brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. To this residue was added *n*-heptane and the pink solid that precipitated was filtered, washed three times with *n*-heptane and dried under vacuo. The product was isolated as a pink/orange solid (14 g, **71%**) and was used without further purification in the next step.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.96 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H, **CH<sup>A</sup>**), 6.63 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H, **CH<sup>A</sup>**), 5.01 (s, 2H, **OH**), 3.78 (s, 6H, O-**CH<sub>3</sub>**), 1.43 (s, 18H, C(**CH<sub>3</sub>**)<sub>3</sub>).

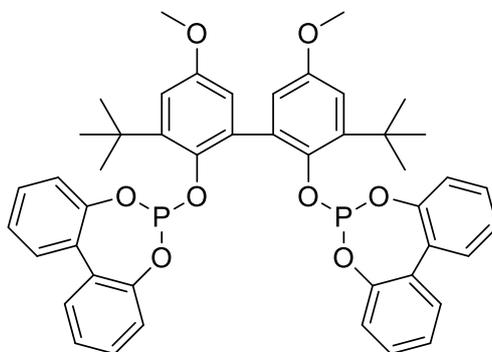
## 6-chlorodibenzo[d,f][1,3,2]dioxaphosphepine (SI-2)



2,2'-biphenol (1 eq., 2.2 g, 2.65 mL, 11.8 mmol) was azeotropically dried over toluene in vacuo three times and was suspended in  $\text{PCl}_3$  (9.05 eq., 14.7 g, 9.35 mL, 106 mmol) at room temperature under argon. The resulting mixture was heated at refluxing temperature for 6 hours with vigorous stirring. After cooling, the remaining  $\text{PCl}_3$  was removed under reduced pressure and the trace amounts of  $\text{PCl}_3$  were further azeotropically evaporated with dry toluene (3\*5 mL). The product was obtained as a yellow oil (2.81g) with toluene still present. From the  $^1\text{H}$  NMR analysis a yield at most **85%** could be estimated with 2.5 g of the desired product in this sample.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.51 (dd,  $J = 7.5, 1.9$  Hz, 2H,  $\text{CH}^{\text{Ar}}$ ), 7.42 (td,  $J = 7.7, 1.9$  Hz, 2H,  $\text{CH}^{\text{Ar}}$ ), 7.39 – 7.36 (m, 2H,  $\text{CH}^{\text{Ar}}$ ), 7.25 (dt,  $J = 7.9, 1.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}^{\text{Ar}}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  149.3 (d,  $J = 5.6$  Hz), 131.0 (d,  $J = 3.5$  Hz), 130.2 (d,  $J = 1.7$  Hz), 129.5, 126.3 (d,  $J = 1.4$  Hz), 122.3 (d,  $J = 2.2$  Hz);  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  179.60.

## 6,6'-((3,3'-di-tert-butyl-5,5'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-2,2'-diyl)bis(oxy))didibenzo[d,f]-[1,3,2]dioxaphosphepine or BiPhePhos (3)

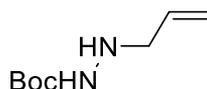


To a solution of **SI-2** (2.75 eq., 1890 mg, 6.71 mmol) dissolved in toluene (2.1 mL) and ACN (7.4 mL) at  $-5^\circ\text{C}$  was added **SI-1** (1 eq., 874 mg, 2.44 mmol) dissolved in pyridine

(7.25 eq., 1399 mg, 1.43 mL, 17.7 mmol). 0.2 mL of pyridine is used to wash the vial and the solution is added dropwise. The reaction mixture was stirred vigorously at -5 °C for 2h (white precipitate appeared). After 2 h, the solid is filtrated and washed w/ 10 mL of cold ACN and 20 mL of cold heptane. The solid is then recrystallised in 80 mL of ACN and the white crystals are filtered, washed with cold ACN to give BiPhePhos **3** as colourless crystals (1.15 g, **60%**). To perform the NMR, CDCl<sub>3</sub> must be treated with basic Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> to avoid degradation of the product.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.44 (dd, *J* = 7.5, 1.9 Hz, 2H, CH<sup>Ar</sup>), 7.37 (dd, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 2H, CH<sup>Ar</sup>), 7.30 (td, *J* = 7.6, 1.9 Hz, 2H, CH<sup>Ar</sup>), 7.24 (td, *J* = 7.4, 1.4 Hz, 2H, CH<sup>Ar</sup>), 7.18 – 7.10 (m, 4H, CH<sup>Ar</sup>), 7.09 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H, CH<sup>Ar</sup>), 7.03 (td, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 2H, CH<sup>Ar</sup>), 6.84 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H, CH<sup>Ar</sup>), 6.76 (dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 2H, CH<sup>Ar</sup>), 3.82 (s, 6H, O-CH<sub>3</sub>), 1.33 (s, 18H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 145.9.

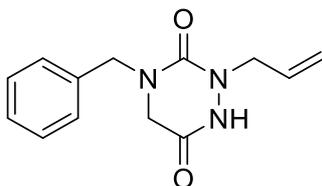
#### ***tert*-Butyl 2-allylhydrazinecarboxylate (SI-3).**



To a dry 100 mL flask were added *tert*-butyl carbazate (3 equiv., 13.2 g, 98.7 mmol), potassium carbonate (1 equiv., 4.56 g, 32.9 mmol) and 95 mL of anhydrous THF/DMF (9:1, v/v). The suspension was heated to 80 °C. A solution of allyl bromide (1 equiv., 2.88 mL, 32.9 mmol) dissolved in 13 mL of anhydrous THF/DMF (9:1, v/v) was added over 3 h and the mixture was allowed to stir overnight at 80 °C. Then, the mixture was concentrated *in vacuo* to a slurry and the crude was diluted with water/EtOAc. The aqueous layer was extracted twice with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated. The crude product was purified on silica gel chromatography (25% to 33% EtOAc in *n*-heptane) to yield the title compound as a colorless oil (3.5 g, **62%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.22 (br s, 1H), 5.80 (ddt, *J* = 17.1, 10.3, 6.4 Hz, 1H), 5.18 (br dd, *J* = 17.1, 1.8 Hz, 1H), 5.11 (br d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 3.71 (br s, 1H), 3.42 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.42 (s, 9H); **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.9, 134.5, 118.3, 80.6, 54.7, 28.5; **R<sub>f</sub>** : 0.26 (30% EtOAc in *n*-heptane).

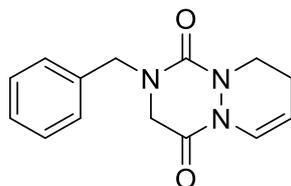
## 2-allyl-4-benzyl-1,2,4-triazinane-3,6-dione (**2**)



In a dry RBF (round-bottom flask) under argon, to a solution of triphosgene (0.335 equiv, 1.05 g, 3.5 mmol) in anhydrous THF (61.9 mL), was added dropwise over 5 minutes a solution of ethyl 2-(benzylamino)acetate (1 equiv, 2 g, 10.3 mmol) and DIEA (2.1 equiv., 3.78 mL, 21.6 mmol) in anhydrous THF (13 mL) and DCM (13 mL). The mixture was stirred at room temperature for 15 min. A solution of *N*-(prop-2-en-1-yl)(tert-butoxy)carbohydrazide **SI-3** (1 equiv., 1.78 g, 10.3 mmol) and DIEA (1.1 equiv, 1.88 mL, 11.3 mmol) in anhydrous THF (15 mL) was added dropwise and the mixture was heated at 40°C overnight. The mixture was filtered and evaporated in vacuo. A mixture TFA/water (95/5, 13 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature for 1 h before being evaporated. The crude mixture was purified on silica gel eluting with 70% ethyl acetate in *n*-heptane to afford the 2-allyl-4-benzyl-1,2,4-triazinane-3,6-dione **2** as a pale yellow amorphous solid (1.45 g, **57%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.37-7.23 (m, 5H, **CH<sup>A</sup>**), 5.82 (ddt, *J* = 17.2, 10.2, 6.2 Hz, 1H, **CH=CH<sub>2</sub>**), 5.32 (broad d, *J* = 17.2 Hz, 1H, **CH=CH<sup>H<sup>trans</sup></sup>**), 5.29 (bs d, *J* = 10.2 Hz, 1H, **CH=CH<sup>H<sup>cis</sup></sup>**), 4.51 (s, 2H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.17 (broad d, *J* = 6.5 Hz, 2H, **CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>**), 3.67 (s, 2H, **N-CH<sub>2</sub>-CO**). **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.9, 154.5, 135.8, 131.3, 129.1, 128.5, 128.3, 120.7, 51.0, 50.5, 48.8. **HRMS** (ESI-TOF): Calculated. for C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 246.1246, Found: 246.1243 (Δ<sub>HRMS</sub> = 1.22 ppm); **R<sub>f</sub>** = 0.26 (70% EtOAc in *n*-heptane).

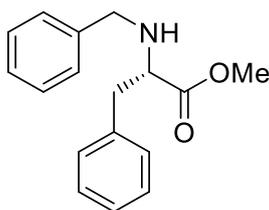
## 2-benzyl-2,3,8,9-tetrahydropyridazino[1,2-a][1,2,4]triazine-1,4-dione (4)



A solution of  $\text{Rh}(\text{CO})_2(\text{acac})_2$  (0.25 mol%, 3.55 mg, 13.7  $\mu\text{mol}$ ) and Biphephos **3** (0.75 mol%, 32.5 mg, 41.2  $\mu\text{mol}$ ) in anhydrous THF (2 mL), prepared in a Schlenk glassware under an argon atmosphere, was introduced under argon into a stainless steel autoclave containing the 2-allyl-4-benzyl-1,2,4-triazinane-3,6-dione **2** (1 equiv., 1.35 g, 5.5 mmol) and pyridinium *para*-toluenesulfonate (1 equiv., 1.38 g, 5.5 mmol) in anhydrous THF (50 mL). The reactor was purged three times with  $\text{H}_2/\text{CO}$  (1:1, 5 bars) and filled with  $\text{H}_2/\text{CO}$  (1:1, 5 bars) before being heated to 70 °C and stirred for 16 h. The reactor was then cooled to ambient temperature and vented to ambient pressure. The reaction mixture was evaporated. The residue was retaken in EtOAc and washed with brine, the organic phase was then dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated. The crude product was purified on gel silica eluting with 50% ethyl acetate in heptane to afford product **4** as a pale yellow amorphous solid (1 g, 71%).

**$^1\text{H}$  NMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.35-7.26 (m, 5H,  $\text{CH}^{\text{Ar}}$ ), 7.06 (dt,  $J = 8.4, 2.0$  Hz, 1H, N- $\text{CH}=\text{CH}$ ), 5.29 (dt,  $J = 8.4, 4.3$  Hz, 1H, N- $\text{CH}=\text{CH}$ ), 4.50 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.85 (t,  $J = 5.5$  Hz, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ), 3.68 (s, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 2.33-2.27 (m, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ).  **$^{13}\text{C}$  NMR** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  160.5, 155.0, 135.9, 129.1, 128.5, 128.2, 120.2, 107.3, 50.8, 48.8, 40.2, 22.5. **HRMS** (ESI-TOF): calcd. for  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 258.1236, Found : 258.1243 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 2.71$  ppm);  $R_f = 0.33$  (50% EtOAc in *n*-heptane).  $t_R = 3.41$  min (Method A).

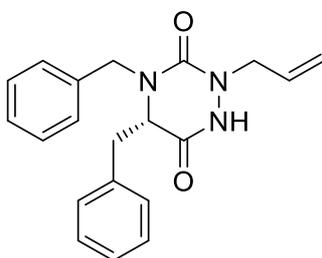
### Methyl benzyl-L-phenylalaninate (SI-4)



To a solution of methyl L-phenylalaninate hydrochloride (1 equiv., 1 g, 4.64 mmol) in MeOH (5 mL) is added benzaldehyde (1.1 equiv., 0.541 g, 0.515 mL, 5.1 mmol) and TEA (1 equiv., 0.469 g, 0.644 mL, 4.64 mmol) and the reaction mixture is stirred at r.t. for 90 min. The reaction mixture was then cooled to 0°C and NaBH<sub>4</sub> (2 eq., 0.351 g, 9.27 mmol) was added portionwise over 30 minutes. The reaction was allowed to warm up over 15 minutes. Then, the mixture was concentrated under reduced pressure to a slurry. Water was added to the crude and the aqueous layer was extracted three times with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated in vacuo. The crude was purified on silica gel chromatography (10 EtOAc in *n*-heptane) to obtain the desired product (1.01 g, **81%**) as a colorless oil.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.34-7.17 (m, 10H), 3.58 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.67 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 3.58 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.05-2.95 (m, 2H), 1.86 (br s, 1H).

### (S)-2-allyl-4,5-dibenzyl-1,2,4-triazinane-3,6-dione (SI-5)

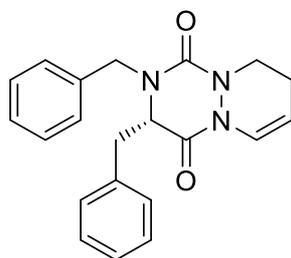


In a dry round-bottom flask under argon, to a solution of triphosgene (0.335 eq., 132 mg, 0.44 mmol) in anhydrous THF (8 mL), was added dropwise over 5 minutes a solution of Methyl benzyl-L-phenylalaninate **SI-4** (1 eq., 352 mg, 1.31 mmol) and DIEA (2.1 eq., 0.479 mL, 2.75 mmol) in anhydrous THF (1.6 mL) et DCM (1.6 mL). The

mixture was stirred at room temperature for 15 minutes. A solution of *N*-(prop-2-en-1-yl)(tert-butoxy)carbohydrazide (1 eq., 225 mg, 1.31 mmol) and DIEA (1.1 eq., 0.238 mL, 1.44 mmol) in anhydrous THF (1.9 mL) was added dropwise and the mixture was heated at 40°C overnight. The mixture was filtered and evaporated in vacuo. A mixture TFA/water (95/5, v/v) was added and the mixture was stirred at room temperature for 2 hours. Volatiles were evaporated and the crude mixture was purified by silica gel chromatography (50% EtOAc in *n*-heptane) to afford the product **SI-5** as a yellow solid (220 mg, 50%).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.88 (br s, 1H), 7.27-7.15 (m, 6H), 7.12-7.05 (m, 4H), 5.50 (ddt, *J* = 17.1, 10.2, 6.2 Hz, 1H), 5.12-5.02 (m, 2H), 5.02-4.94 (m, 1H), 3.88 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 3.79 (dd, *J* = 15.7, 6.0 Hz, 1H), 3.67-3.52 (m, 2H), 2.93 (dd, *J* = 13.7, 5.3 Hz, 1H), 2.85 (dd, *J* = 13.7, 6.6 Hz, 1H); **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164.6, 153.2, 136.0, 135.3, 131.3, 129.8, 128.9, 128.8, 128.2, 128.0, 127.4, 120.4, 60.0, 50.2, 49.1, 35.6; **R<sub>f</sub>** = 0.25 (50% EtOAc in *n*-heptane).

### **(S)-2,3-dibenzyl-2,3,8,9-tetrahydropyridazino[1,2-a][1,2,4]triazine-1,4-dione (6)**



A solution of Rh(CO)<sub>2</sub>(acac)<sub>2</sub> (3 mol%, 4.15 mg, 0.016 mmol) and Biphephos (9 mol%, 38 mg, 0.048 mmol) in anhydrous THF (1.5 mL), prepared in a Schlenk glassware under an argon atmosphere, was introduced under argon into a stainless steel autoclave containing the (*S*)-2-allyl-4,5-dibenzyl-1,2,4-triazinane-3,6-dione (**SI-5**) (1 equiv., 180 mg, 0.54 mmol) and pyridinium *para*-toluenesulfonate (1 equiv., 134 mg, 0.54 mmol) in anhydrous THF (10 mL). The reactor was purged three times with H<sub>2</sub>/CO (1:1, 5 bars) and filled with H<sub>2</sub>/CO (1:1, 5 bars) before being heated to 70 °C and stirred for 16 h. The reactor was then cooled to ambient temperature and vented to ambient pressure. The reaction mixture was evaporated. The residue was retaken in EtOAc and washed with brine, the organic phase was then dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and

concentrated. The crude product was purified on gel silica eluting with 30% to 50% EtOAc in *n*-heptane to afford product **6** as a pale yellow oil (130 mg, 70%).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.35-7.17 (m, 8H), 7.15-7.10 (m, 2H), 7.00 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 5.23-5.17 (m, 1H), 5.08 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H), 4.15-4.08 (m, 1H), 4.04 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H), 3.90 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H), 3.01 (dd, *J* = 14.3, 5.1 Hz, 1H), 2.96 (dd, *J* = 14.3, 5.1 Hz, 1H), 2.34-2.23 (m, 1H), 2.05-1.89 (m, 2H); **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160.7, 152.7, 136.2, 135.3, 129.9, 129.1, 129.0, 128.5, 128.2, 127.6, 119.8, 108.1, 59.5, 49.1, 39.9, 36.1, 22.7; **R<sub>f</sub>** = 0.42 (50% EtOAc in *n*-heptane).

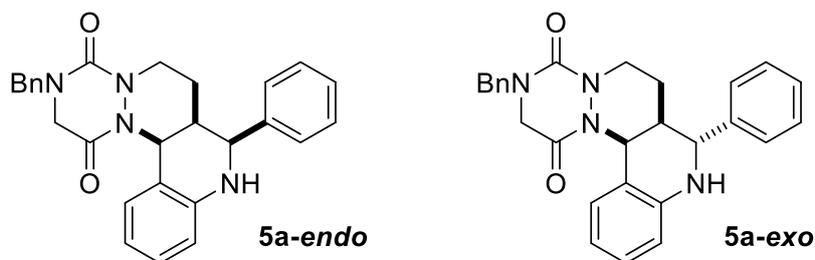
### **For the Povarov reactions :**

**General Procedure A (two-component reaction):** To a round bottom flask under argon was placed the imine (0.18 mmol, 1 equiv) in ACN (1 mL) and BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> (22 μL, 1 equiv) was added to the reaction mixture which was stirred for 5 min at room temperature. Enamide **4** (46 mg, 0.18 mmol, 1 equiv) in ACN (1 mL) was then added to the solution and stirred at room temperature until completion (monitored by HPLC). The solvent was removed under vacuo and DMSO (500 μL) was added and the crude product **5** obtained as a mixture of two diastereoisomers **5-endo** and **5-exo** was purified by reversed-phase chromatography using a linear gradient (5 or 10% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL·min<sup>-1</sup>) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to afford separated pure products **5-endo** and **5-exo**.

**General Procedure B (three-component reaction):** To a round bottom flask under argon was placed enamide **4** (37.4 mg, 0.15 mmol, 1 equiv) in ACN (1 mL), the aldehyde (0.15 mmol, 1 equiv) and the aniline (0.15 mmol, 1 equiv) with ACN (1 mL). BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> (28 μL, 1.5 equiv) was then added to the reaction mixture which was stirred until completion (monitored by HPLC) at room temperature. The solvent was removed under vacuo, DMSO (500 μL) was added and the crude product **4** obtained as a mixture of two diastereoisomers **5-endo** and **5-exo** was purified by reversed-phase chromatography using a linear gradient (5 or 10% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL·min<sup>-1</sup>) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v).

Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to afford separated pure products **5-endo** and **5-exo**.

**3-benzyl-8-phenyl-2,3,6,7,7a,8,9,13b-octahydro-[1,2,4]triazino-[2',1':1,2]pyridazino-[4,3c]quinoline-1,4-dione (5a-endo & 5a-exo)**



(**5a**) was obtained according to the **General Procedure A**, performed on a 0.18 mmol scale (53 mg, **69%**) and according to the **General Procedure B**, performed on a 0.15 mmol scale (35 mg, **59%**).

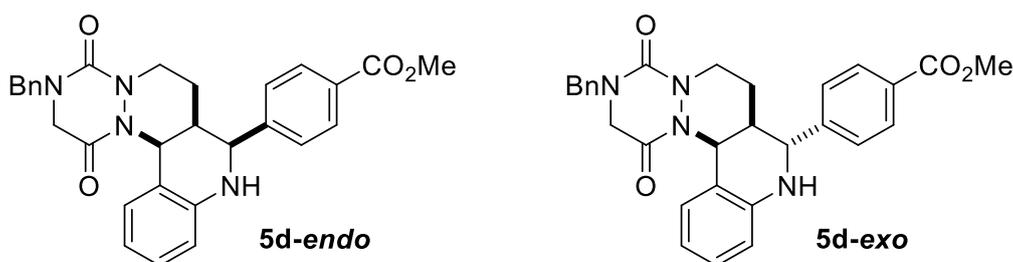
**5a-endo**: white amorphous solid (by procedure A: 22 mg, **29%**; by procedure B: 13 mg, **23%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.45-7.30 (m, 10H, **CH<sup>Ph</sup>**), 7.10 (t, *J* = 7.6, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.80 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.71 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.62 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.16 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CO-N-**CH-Ph**), 4.84 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, NH-**CH-Ph**), 4.75 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.35 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 4.22 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 3.90 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 3.82 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 2.92 (td, *J* = 12.7, 3.0 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 2.22-2.11 (m, 1H, CH-**CH-CH**), 1.92 (qd, *J* = 13.0, 4.9 Hz, 1H, CH-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N**), 1.37 (dd, *J* = 13.6, 3.1 Hz, 1H, CH-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N**). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 163.8 (C-CO-N), 155.8 (N-CO-N), 144.6 (**C<sub>q</sub><sup>Aniline</sup>**), 140.3 (**C<sub>q</sub><sup>Ph</sup>**), 136.0 (**C<sub>q</sub><sup>Ph</sup>**), 128.9 (**CH<sup>Ph</sup>**), 128.73 (**CH<sup>Ph</sup>**), 128.68 (**CH<sup>Ph</sup>**), 128.5 (**CH<sup>Aniline</sup>**), 128.07 (**CH<sup>Ph</sup>**), 128.02 (**CH<sup>Ph</sup>**), 126.8 (**CH<sup>Ph</sup>**), 126.5 (**CH<sup>Aniline</sup>**), 118.7 (**CH<sup>Aniline</sup>**), 116.1 (**C<sub>q</sub><sup>Aniline</sup>**), 115.0 (**CH<sup>Aniline</sup>**), 58.8 (CH, 1H, NH-**CH-Ph**), 52.2 (CH, CO-N-**CH-Ph**), 50.4 (CH<sub>2</sub>, **CH<sub>2</sub>Ph**), 48.3 (CH<sub>2</sub>, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 45.0 (CH<sub>2</sub>, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 37.7 (CH, CH-**CH-CH**), 19.2 (CH<sub>2</sub>, CH-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N**). **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 438.2056, Found: 438.2049 (Δ<sub>HRMS</sub> = 1.60 ppm); t<sub>R</sub> = 5.00 min (Method A).

**5a-exo**: white amorphous solid (by procedure A: 31 mg, **40%**; by procedure B: 22 mg, **36%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.48-7.18 (m, 10H, **CH<sup>Ph</sup>**), 7.12 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.75 (dt, *J* = 7.8, 1.3 Hz, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.69-6.59 (m, 2H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 5.99 (bs, 1H, **NH**), 5.43 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, CO-N-**CH**-Ph), 4.73 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.52-4.40 (m, 2H, NH-**CH**-Ph + CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 4.25 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 3.87 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 3.80 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 3.16 (td, *J* = 12.7, 3.1 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 2.25 (m, 1H, CH-**CH**-CH), 2.03 (qd, *J* = 12.8, 4.7 Hz, 1H, CH-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N**), 1.87 (dd, *J* = 13.4, 3.3 Hz, 1H, CH-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N**). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 163.5 (C-**CO-N**), 155.9 (N-**CO-N**), 143.7 (**C<sub>q</sub><sup>Aniline</sup>**), 143.3 (**CH<sup>Ar</sup>**), 135.8 (**CH<sup>Ar</sup>**), 128.98 (**CH<sup>Ar</sup>**), 128.93 (**CH<sup>Ar</sup>**), 128.88 (**CH<sup>Ar</sup>**), 128.5 (**CH<sup>Ar</sup>**), 128.1 (**CH<sup>Ar</sup>**), 127.6 (**CH<sup>Ar</sup>**), 126.4 (**CH<sup>Ar</sup>**), 125.5 (**CH<sup>Aniline</sup>**), 117.7 (**CH<sup>Aniline</sup>**), 114.7 (**C<sub>q</sub><sup>Aniline</sup>**), 113.6 (**CH<sup>Aniline</sup>**), 58.7 (CH, NH-**CH**-Ph), 50.5 (CH, CO-N-**CH**-Ph), 48.3 (CH<sub>2</sub>, **CH<sub>2</sub>Ph** or N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 48.0 (CH<sub>2</sub>, **CH<sub>2</sub>Ph** or N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 44.9 (CH<sub>2</sub>, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 37.1 (CH, CH-**CH**-CH), 26.2 (CH<sub>2</sub>, CH-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N**). **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 438.2056, Found: 438.2043 (Δ<sub>HRMS</sub> = 2.97 ppm); t<sub>R</sub> = 4.84 min (Method A).

**Methyl 4-(3-benzyl-1,4-dioxo-1,2,3,4,6,7,7a,8,9,13b-decahydro-[1,2,4]triazino[2',1':1,2]-pyridazino[4,3-c]quinolin-8-yl)benzoate (5d-endo & 5d-exo)**



(**5d**) was obtained according to the **General Procedure A**, performed on a 0.16 mmol scale (52 mg, **63%**).

**5d-endo**: white amorphous solid (20 mg, **24%**).

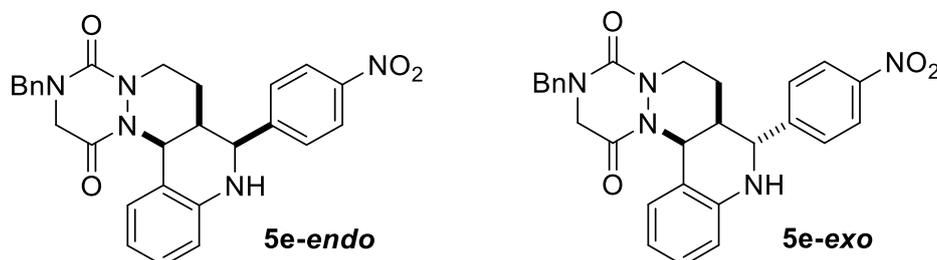
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.10 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, **CH<sup>P-Ph</sup>**), 8.01 (dt, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H, **CH<sup>P-Ph</sup>**), 7.63 (dt, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H, **CH<sup>P-Ph</sup>**), 7.49 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, **CH<sup>P-Ph</sup>**), 7.42-7.30 (m, 5H, **CH<sup>Ph</sup>**), 7.12 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.81 (dt, *J* = 7.8, 1.3

Hz, 1H,  $\text{CH}^{\text{Aniline}}$ ), 6.73 (td,  $J = 7.5, 1.1$  Hz, 1H,  $\text{CH}^{\text{Aniline}}$ ), 6.66 (dd,  $J = 8.1, 1.2$  Hz, 1H,  $\text{CH}^{\text{Aniline}}$ ), 6.16 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, CO-N- $\text{CH}$ -Ph), 4.89 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H, NH- $\text{CH}$ -Ph), 4.73 (d,  $J = 14.8$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.41-4.29 (m, 1H, CH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -N), 4.23 (d,  $J = 14.8$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.95 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 3.89 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H, N- $\text{CH}_2$ -CO), 3.81 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H, N- $\text{CH}_2$ -CO), 3.24 (bs, 1H,  $\text{NH}$ ), 2.90 (td,  $J = 12.7, 3.0$  Hz, 1H, CH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -N), 2.23-2.14 (m, 1H, CH- $\text{CH}$ -CH), 1.92 (qd,  $J = 12.9, 4.8$  Hz, 1H, CH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -N), 1.28 (dd,  $J = 13.5, 3.4$  Hz, 1H, CH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -N).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.8, 163.8, 155.7, 144.3, 140.8, 135.9, 131.2, 130.7, 129.3, 128.9, 128.8, 128.8, 128.5, 128.1, 127.8, 126.5, 119.1, 116.2, 115.2, 58.5, 52.3, 52.1, 50.5, 48.3, 44.9, 37.6, 19.1. **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for  $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 496.2111, Found: 496.2102 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 1.81$  ppm);  $t_{\text{R}} = 4.73$  min (Method A).

**5d-exo**: white amorphous solid (32 mg, **39%**).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.81 (m, 2Hv), 7.35 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H,  $\text{CH}^{\text{p-Ph}}$ ), 7.31-7.19 (m, 6H,  $\text{CH}^{\text{p-Ph}} + \text{CH}^{\text{Ph}}$ ), 7.03 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H,  $\text{CH}^{\text{Aniline}}$ ), 6.64-6.60 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H,  $\text{CH}^{\text{Aniline}}$ ), 6.56 (m, 2H,  $\text{CH}^{\text{Aniline}}$ ), 5.25 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H, CO-N- $\text{CH}$ -Ph), 4.62 (d,  $J = 14.7$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.43-4.31 (m, 2H, NH- $\text{CH}$ -Ph + CH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -N), 4.13 (d,  $J = 14.7$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.79 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 3.72 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H, N- $\text{CH}_2$ -CO), 3.65 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H, N- $\text{CH}_2$ -CO), 3.04 (td,  $J = 12.6, 3.0$  Hz, 1H, CH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -N), 2.22-2.13 (m, 1H, CH- $\text{CH}$ -CH), 1.92 (qd,  $J = 13.0, 4.8$  Hz, 1H, CH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -N), 1.75 (dd,  $J = 13.4, 3.4$  Hz, 1H, CH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -N).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.8, 163.5, 155.7, 144.2, 143.0, 135.9, 130.7, 130.1, 129.1, 129.1, 128.9, 128.8, 128.7, 128.5, 128.2, 128.1, 126.9, 126.4, 117.9, 114.7, 113.7, 58.2, 52.2, 50.5, 48.3, 47.6, 44.8, 37.0, 26.1. **HRMS** (ESI-TOF) : Calculated for  $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 496.2111, Found: 496.2104 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 1.41$  ppm);  $t_{\text{R}} = 4.90$  min (Method A).

**3-benzyl-8-(4-nitrophenyl)-2,3,6,7,7a,8,9,13b-octahydro-[1,2,4]triazino[2',1':1,2]-pyridazi-no[4,3 -c]quinolone-1,4-dione (5e-endo & 5e-exo)**



(5e) was obtained according to the **General Procedure A**, performed on a 0.17 mmol scale (50 mg, **61%**) and according to the **General Procedure B**, performed on a 0.17 mmol scale (31 mg, **38%**).

**5e-endo**: yellow amorphous solid (by procedure A: 21 mg, **26%**; by procedure B: 10 mg, **13%**).

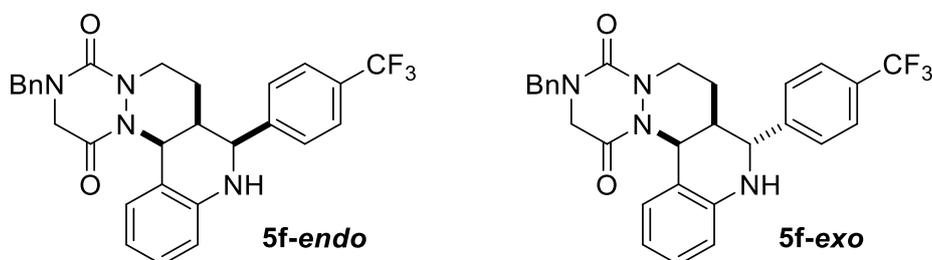
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.32-8.24 (m, 2H, **CH<sup>p</sup>-Ph**), 7.67-7.60 (m, 2H, **CH<sup>p</sup>-Ph**), 7.43-7.30 (m, 5H, **CH<sup>Ph</sup>**), 7.13 (m, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.83 (dt, *J* = 7.9, 1.3 Hz, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.80-6.72 (m, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.67 (dd, *J* = 8.1, 1.1 Hz, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.17 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CO-N-**CH-Ph**), 4.94 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, NH-**CH-Ph**), 4.73 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.35 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 4.23 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 3.89 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 3.82 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 2.91 (td, *J* = 12.7, 2.9 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 2.20 (m, 1H, CH-**CH-CH**), 1.93 (qd, *J* = 12.9, 4.8 Hz, 1H, CH-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N**), 1.24 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H, CH-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N**). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 163.9, 155.7, 147.8, 143.9, 135.9, 129.0, 128.9, 128.5, 128.1, 127.7, 126.6, 124.0, 119.6, 116.3, 115.5, 58.5, 51.9, 50.5, 48.3, 44.8, 37.6, 19.2. **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 483.1907, Found: 483.1901 (Δ<sub>HRMS</sub> = 1.24 ppm); **t<sub>R</sub>** = 4.73 min (Method A).

**5e-exo**: yellow amorphous solid (by procedure A: 29 mg, **35%**; by procedure B: 21 mg, **25%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.17 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, **CH<sup>p</sup>-Ph**), 7.45-7.30 (m, 7H, **CH<sup>p</sup>-Ph + CH<sup>Ph</sup>**), 7.16 (m, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.75-6.66 (m, 3H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 5.34 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, CO-N-**CH-Ph**), 4.71 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.55 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, NH-**CH-Ph**),

4.46 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 4.25 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.84 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CO), 3.77 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CO), 3.55 (bs, 1H, NH), 3.16 (td, *J* = 12.6, 3.1 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 2.30-2.20 (m, 1H, CH-CH-CH), 2.05 (qd, *J* = 12.8, 4.8 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 1.88 (dd, *J* = 13.4, 3.2 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 163.5, 155.8, 151.0, 147.5, 142.5, 135.7, 129.3, 128.9, 128.5, 128.2, 126.7, 126.5, 124.3, 118.4, 114.5, 113.8, 58.2, 50.8, 48.2, 47.5, 44.8, 36.7, 26.0. HRMS (ESI-TOF): Calculated for C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 483.1907, Found: 483.1908 (Δ<sub>HRMS</sub> = 0.21 ppm); t<sub>R</sub> = 4.87 min (Method A).

**3-benzyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-2,3,6,7,7a,8,9,13b-octahydro-[1,2,4]triazino-[2',1':1,2]pyridazino[4,3-c]quinoline-1,4-dione (5f-endo & 5f-exo)**



(5f). was obtained according to the **General Procedure A**, performed on a 0.16 mmol scale (53 mg, **66%**).

**5f-endo**: white amorphous solid (28 mg, **35%**).

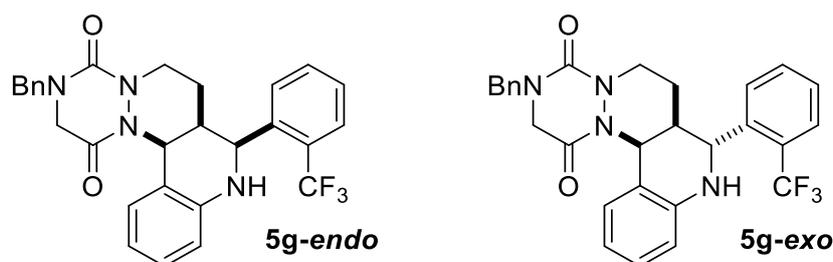
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.67 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, CH<sup>*P*</sup>-Ph), 7.59-7.54 (d, *J* = 8.1 Hz, CH<sup>*P*</sup>-Ph), 7.44-7.28 (m, 5H, CH<sup>*P*</sup>), 7.12 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, CH<sup>*Aniline*</sup>), 6.81 (dt, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H, CH<sup>*Aniline*</sup>), 6.75 (m, 1H, CH<sup>*Aniline*</sup>), 6.65 (dd, *J* = 8.1, 1.1 Hz, 1H, CH<sup>*Aniline*</sup>), 6.17 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CO-N-CH-Ph), 4.90 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, NH-CH-Ph), 4.74 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.35 (m, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 4.23 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.90 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CO), 3.82 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CO), 2.92 (td, *J* = 12.7, 2.9 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 2.46 (bs, 1H, NH), 2.18 (m, 1H, CH-CH-CH), 1.93 (qd, *J* = 12.9, 4.8 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 1.33-1.27 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.9, 155.7, 144.4, 144.2, 135.8, 128.90, 128.89, 128.5, 128.2, 127.2, 126.5, 125.7 (q, <sup>3</sup>J<sub>C-F</sub> = 3.9 Hz), 119.3, 116.1, 115.3, 58.6, 52.1, 50.5, 48.2, 44.9, 37.6, 19.1. <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H} NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -63.23. HRMS (ESI-TOF):

Calculated for C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 506.1930, Found: 506.1917 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 2.57$  ppm);  $t_{\text{R}} = 5.19$  min (Method A).

**5f-exo**: white amorphous solid (25 mg, **31%**).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.56 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, **CH<sup>p</sup>-Ph**), 7.42-7.29 (m, 7H, **CH<sup>p</sup>-Ph** + **CH<sup>Ph</sup>**), 7.14 (m, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.75-6.63 (m, 3H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 5.38 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H, CO-N-**CH-Ph**), 4.71 (d,  $J = 14.7$  Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.54-4.42 (m, 2H, NH-**CH-Ph** + CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 4.26 (d,  $J = 14.7$  Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 3.84 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 3.77 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 3.15 (td,  $J = 12.6, 3.1$  Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 2.99 (bs, 1H, **NH**), 2.30-2.19 (m, 1H, CH-**CH-CH**), 2.05 (qd,  $J = 12.9, 4.9$  Hz, 1H, CH-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N**), 1.87 (dd,  $J = 13.3, 3.1$  Hz, 1H, CH-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N**). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  163.6, 155.9, 147.6, 142.8, 135.6, 129.2, 128.9, 128.5, 128.2, 126.4, 126.1, 126.0 (q,  $J = 3.7$  Hz), 118.1, 114.4, 113.7, 58.3, 50.6, 48.2, 47.8, 44.87, 36.8, 26.1. <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H} NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -63.17. HRMS (ESI-TOF): Calculated for C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 506.1930, Found: 506.1926 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 0.79$  ppm);  $t_{\text{R}} = 5.34$  min (Method A).

**3-benzyl-8-(2-(trifluoromethyl)phenyl)-2,3,6,7,7a,8,9,13b-octahydro-[1,2,4]triazino-[2',1':1,2]pyridazino[4,3-c]quinoline-1,4-dione (5g-endo & 5g-exo)**



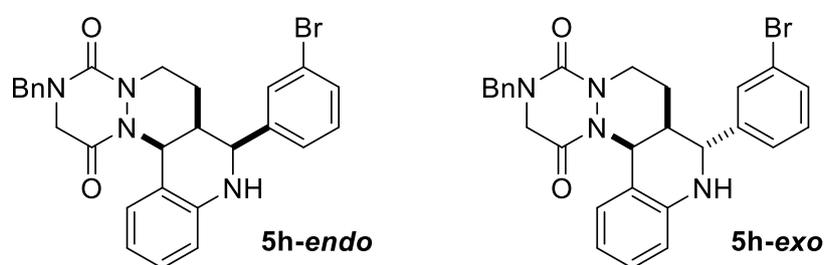
(**5g**) was obtained according to the **General Procedure A** as a mixture of inseparable diastereomers, performed on a 0.2 mmol scale (75 mg, **75%**).

**5g-endo & 5g-exo**: white amorphous solid.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.97 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, **2gA**), 7.78-7.71 (m, 1H, **2gA**), 7.64 (q,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 7.54-7.27 (m, 14H), 7.13 (dt,  $J = 9.9, 7.4$  Hz, 2H), 6.81-6.66 (m, 4H), 6.64-6.57 (m, 2H), 6.14 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, **2gA**), 5.61 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H, **2gB**),

5.21 (s, 1H), 4.84 (s, 1H), 4.77 (d,  $J = 14.7$  Hz, 1H, **2gB**), 4.74 (d,  $J = 14.8$  Hz, 1H, **2gA**), 4.42 (tdd,  $J = 13.1, 4.9, 2.4$  Hz, 2H), 4.28 (d,  $J = 14.7$  Hz, 1H, **2gB**), 4.22 (d,  $J = 14.8$  Hz, 1H, **2gA**), 3.94 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H, **2gA**), 3.87 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H, **2gB**), 3.86 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H, **2gA**), 3.82 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H, **2gB**), 3.13 (td,  $J = 12.7, 3.2$  Hz, 1H, **2gB**), 2.96 (td,  $J = 12.8, 2.9$  Hz, 1H, **2gA**), 2.29-2.13 (m, 2H), 2.11-1.89 (m, 2H), 1.84 (dd,  $J = 13.4, 3.4$  Hz, 1H, **2gB**), 1.46 (dd,  $J = 13.3, 3.4$  Hz, 1H, **2gA**).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  163.8, 163.7, 159.0, 158.6, 158.1, 157.8, 157.74, 156.01, 156.0, 144.6, 143.3, 143.1, 138.5, 135.6, 135.5, 132.7, 131.8, 129.2, 129.1, 129.0, 128.9, 128.6, 128.5, 128.3, 127.8, 127.8, 126.6, 126.6, 126.5, 126.1, 119.3, 117.9, 116.1, 116.1, 115.4, 113.6, 113.4, 54.6, 52.6 (**2gA**), 50.62, 50.55, 48.1, 47.8 (**2gB**), 45.1 (**2gB**), 44.86 (**2gA**), 36.0, 35.9, 26.2 (**2gB**), 19.5 (**2gA**).  $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$  NMR (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  . -58.89, -59.09. HRMS (ESI-TOF): Calculated for  $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 506.1930, Found: 506.1927 & 506.1926 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 0.59$  ppm & 0.79 ppm);  $t_{\text{R}} = 5.41$  min, 5.49 min (Method B).

**3-benzyl-8-(3-bromophenyl)-2,3,6,7,7a,8,9,13b-octahydro-[1,2,4]triazino[2',1':1,2]pyrida-zino-[4,3-c]quinoline-1,4-dione (5h-endo & 5h-exo)**



(**5h**) was obtained according to the **General Procedure B**, performed on a 0.19 mmol scale (39 mg, **41%**).

**5h-endo**: white amorphous solid (11 mg, **11%**).

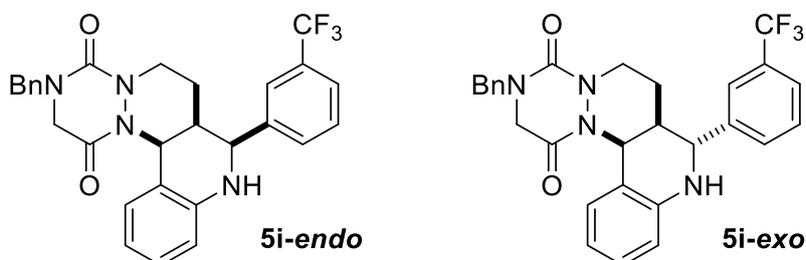
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.59 (t,  $J = 1.9$  Hz, 1H,  $\text{CH}^{\text{PhBr}}$ ), 7.47 (ddd,  $J = 7.8, 2.1, 1.2$  Hz, 1H,  $\text{CH}^{\text{PhBr}}$ ), 7.44-7.22 (m, 7H,  $\text{CH}^{\text{PhBr}} + \text{CH}^{\text{Ph}}$ ), 7.11 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H,  $\text{CH}^{\text{Aniline}}$ ), 6.81 (dt,  $J = 7.8, 1.4$  Hz, 1H,  $\text{CH}^{\text{Aniline}}$ ), 6.77-6.70 (m, 1H,  $\text{CH}^{\text{Aniline}}$ ), 6.64 (dd,  $J = 8.0, 1.1$  Hz, 1H,  $\text{CH}^{\text{Aniline}}$ ), 6.14 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, CO-N-CH-Ph), 4.79 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H, NH-CH-Ph), 4.74 (d,  $J = 14.7$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.36 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N),

4.22 (d,  $J = 14.7$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.89 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H, N- $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 3.81 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H, N- $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 3.19 (bs, 1H,  $\text{NH}$ ), 2.92 (td,  $J = 12.7, 2.9$  Hz, 1H, CH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$ ), 2.22-2.10 (m, 1H, CH- $\text{CH-CH}$ ), 1.89 (qd,  $J = 13.0, 4.9$  Hz, 1H, CH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$ ), 1.32 (dd,  $J = 14.0, 3.0$  Hz, 1H, CH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.8, 155.8, 144.2, 142.7, 135.9, 131.2, 130.3, 129.8, 128.9, 128.8, 128.5, 128.1, 126.5, 125.4, 122.9, 119.1, 116.1, 115.2, 58.3, 52.1, 50.5, 48.2, 44.9, 37.6, 19.1. **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for  $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{BrN}_4\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 516.1161, Found: 516.1152 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 1.74$  ppm);  $t_{\text{R}} = 5.10$  min (Method A).

**5h-exo**: white amorphous solid (29 mg, **30%**).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.44-7.29 (m, 7H,  $\text{CH}^{\text{PhBr}} + \text{CH}^{\text{Ph}}$ ), 7.18-7.10 (m, 3H,  $\text{CH}^{\text{PhBr}} + \text{CH}^{\text{Aniline}}$ ), 6.74-6.61 (m, 3H,  $\text{CH}^{\text{Aniline}}$ ), 5.39 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H, CO-N- $\text{CH-Ph}$ ), 4.73 (d,  $J = 14.7$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.57 (bs, 1H,  $\text{NH}$ ), 4.50-4.40 (m, 2H, NH- $\text{CH-Ph} + \text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$ ), 4.25 (d,  $J = 14.7$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.86 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H, N- $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 3.80 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H, N- $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 3.16 (td,  $J = 12.6, 3.1$  Hz, 1H, CH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$ ), 2.31-2.21 (m, 1H, CH- $\text{CH-CH}$ ), 2.01 (qd,  $J = 12.8, 4.7$  Hz, 1H, CH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$ ), 1.84 (dd,  $J = 13.4, 3.2$  Hz, 1H, CH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.6, 156.0, 146.0, 142.8, 135.6, 130.8, 130.6, 129.2, 128.9, 128.8, 128.5, 128.2, 126.3, 124.2, 123.0, 118.0, 114.4, 113.7, 58.1, 50.6, 48.2, 47.9, 44.9, 36.9, 26.0. **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for  $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{BrN}_4\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 516.1161, Found: 516.1146 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 2.90$  ppm);  $t_{\text{R}} = 5.31$  min (Method A).

**3-benzyl-8-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2,3,6,7,7a,8,9,13b-octahydro-[1,2,4]triazino-[2',1':1,2]pyridazino[4,3-c]quinoline-1,4-dione (5i-endo & 5i-exo)**



**(5i)** was obtained according to the **General Procedure A**, performed on a 0.16 mmol scale (48 mg, **60%**).

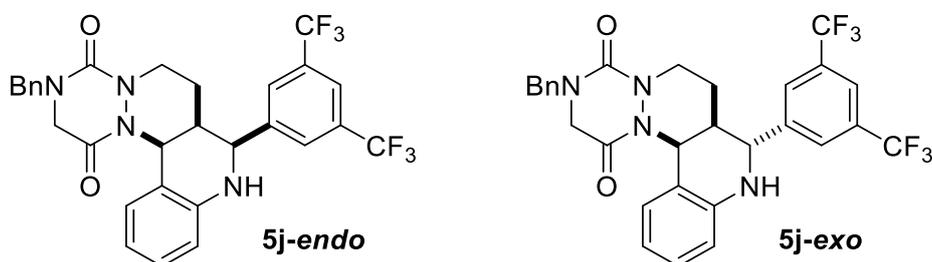
**5i-endo:** white amorphous solid (19 mg, **24%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.62 (s, 1H, CH<sup>PhCF<sub>3</sub></sup>), 7.55 (m, 2H, CH<sup>PhCF<sub>3</sub></sup>), 7.46 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, CH<sup>PhCF<sub>3</sub></sup>), 7.32 (m, 2H, CH<sup>Ph</sup>), 7.30-7.23 (m, 3H, CH<sup>Ph</sup>), 7.05 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, CH<sup>Aniline</sup>), 6.73 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, CH<sup>Aniline</sup>), 6.67 (td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H, CH<sup>Aniline</sup>), 6.60 (dd, *J* = 8.0, 1.1 Hz, 1H, CH<sup>Aniline</sup>), 6.09 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CO-N-CH-Ph), 4.80 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, NH-CH-Ph), 4.66 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.28 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 4.15 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.83 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CO), 3.76 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CO), 2.85 (td, *J* = 12.7, 2.9 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 2.11 (m, 1H, CH-CH-CH), 1.85 (qd, *J* = 12.9, 4.8 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 1.27-1.13 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.9, 155.8, 144.2, 141.4, 135.8, 131.0 (q, <sup>2</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 32.4 Hz), 130.2, 129.2, 128.89, 128.87, 128.5, 128.3, 128.1, 126.5, 124.9 (q, <sup>3</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 3.8 Hz), 123.5 (q, <sup>3</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 3.9 Hz), 119.3, 116.2, 115.4, 58.6, 52.1, 50.5, 48.2, 44.9, 37.6, 19.0. **<sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H} NMR** (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -63.18; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 506.1930, Found: 506.1926 (Δ<sub>HRMS</sub> = 0.59 ppm); **t<sub>R</sub>** = 5.31 min (Method B).

**5i-exo:** white amorphous solid (29 mg, **36%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.47-7.43 (m, 1H, CH<sup>PhCF<sub>3</sub></sup>), 7.40 (bs, 1H, CH<sup>PhCF<sub>3</sub></sup>), 7.39-7.22 (m, 7H, CH<sup>PhCF<sub>3</sub></sup> + CH<sup>Ph</sup>), 7.10-7.05 (m, 1H, CH<sup>Aniline</sup>), 6.65-6.57 (m, 3H, CH<sup>Aniline</sup>), 5.31 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, CO-N-CH-Ph), 4.76 (s, 1H, NH), 4.66 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.43 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, NH-CH-Ph), 4.38 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 4.17 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.79 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CO), 3.72 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CO), 3.10 (td, *J* = 12.7, 3.1 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 2.19 (m, 1H, CH-CH-CH), 1.96 (qd, *J* = 12.9, 4.9 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 1.84-1.76 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N); **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.6, 156.0, 144.7, 142.8, 135.5, 131.2 (q, *J* = 32.2 Hz), 129.6, 129.2, 128.9, 128.5, 128.2, 126.3, 124.6 (q, *J* = 3.8 Hz), 122.5 (q, *J* = 3.8 Hz), 118.1, 114.3, 113.7, 58.2, 50.6, 48.2, 47.8, 44.9, 36.9, 26.0. **<sup>19</sup>F NMR{<sup>1</sup>H}** (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -63.01; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 506.1930, Found: 506.1933 (Δ<sub>HRMS</sub> = 0.59 ppm); **t<sub>R</sub>** = 5.53 min (Method B).

**3-benzyl-8-(2-(trifluoromethyl)phenyl)-2,3,6,7,7a,8,9,13b-octahydro-[1,2,4]triazino-[2',1':1,2]pyridazino[4,3-c]quinoline-1,4-dione (5j-endo & 5j-exo)**



(5j) was obtained according to the **General Procedure A**, performed on a 0.17 mmol scale (74 mg, **74%**).

**2jA:** white amorphous solid (32 mg, **32%**).

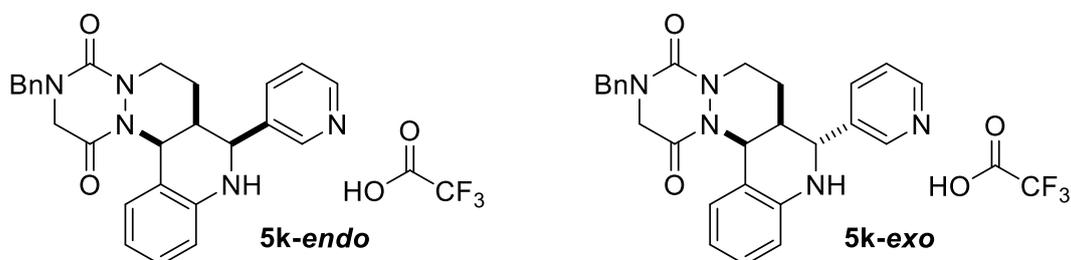
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.20 (s, 2H, **CH<sup>PhCF<sub>3</sub></sup>**), 8.09 (s, 1H, **CH<sup>PhCF<sub>3</sub></sup>**), 7.45-7.29 (m, 5H, **CH<sup>Ph</sup>**), 7.08 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.79 (dd, *J* = 8.1, 1.1 Hz, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.71-6.57 (m, 2H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.42 (bs, 1H, **NH**), 6.03 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, CO-N-**CH-Ph**), 5.10 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, NH-**CH-Ph**), 4.61 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.20 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.13 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 4.04 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 3.78 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 2.98 (td, *J* = 12.8, 2.9 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 2.33-2.22 (m, 1H, CH-**CH-CH**), 1.52 (qd, *J* = 13.0, 4.9 Hz, 1H, CH-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N**), 1.01 (dd, *J* = 13.4, 3.8 Hz, 1H, CH-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N**); **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.8, 155.7, 143.7, 143.2, 135.8, 132.2 (q, <sup>2</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 33.3 Hz), 129.0, 128.9, 128.5, 128.1, 127.0, 126.6, 122.1, 119.9, 116.4, 115.7, 58.4, 51.8, 50.5, 48.2, 44.7, 37.6, 19.0; **<sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H} NMR** (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -62.77; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 574.1803, Found: 574.1824 (Δ<sub>HRMS</sub> = 3.66 ppm); **t<sub>R</sub>** = 4.99 min (Method B).

**2jB:** white amorphous solid (42 mg, **42%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.04 (s, 1H, **CH<sup>PhCF<sub>3</sub></sup>**), 7.99 (s, 2H), 7.44-7.36 (m, 2H, **CH<sup>PhCF<sub>3</sub></sup>**), 7.44 – 7.28 (m, 5H, **CH<sup>Ph</sup>**), 7.11 (m, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.85 (bs, 1H, **NH**), 6.80 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.60-6.51 (m, 2H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 4.98 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CO-N-**CH-Ph**), 4.72 (bs, 1H, NH-**CH-Ph**), 4.60 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.19 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.23-4.12 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 4.05 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, N-

CH<sub>2</sub>-CO), 3.72 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CO), 3.22 (td, *J* = 12.9, 2.7 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 2.44-2.37 (m, 1H, CH-CH-CH), 1.93 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 1.61 (qd, *J* = 12.8, 4.9 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.5, 155.6, 146.5, 142.1, 135.9, 132.3 (d, *J* = 33.5 Hz), 129.4, 128.9, 128.5, 128.1, 126.6, 126.0, 124.2, 122.0, 118.7, 114.5, 113.8, 58.0, 50.5, 48.3, 47.3, 44.6, 36.9, 26.1; <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H} NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -62.79; HRMS (ESI-TOF): Calculated for C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 574.1803, Found: 574.1816 (Δ<sub>HRMS</sub> = 2.26 ppm); t<sub>R</sub> = 5.16 min (Method B).

**3-benzyl-8-(pyridin-3-yl)-2,3,6,7,7a,8,9,13b-octahydro-[1,2,4]triazino[2',1':1,2]pyridazino[4,3-c]quinoline-1,4-dione (5k-endo & 5k-exo)**



(**5k**) was obtained as a trifluoroacetate salt according to the **General Procedure B** (2.5 equiv of BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O were used for this example), performed on a 0.16 mmol scale (46 mg, **51%**).

**5k-endo**: pale yellow amorphous solid isolated as a TFA salt (38 mg, **42%**).

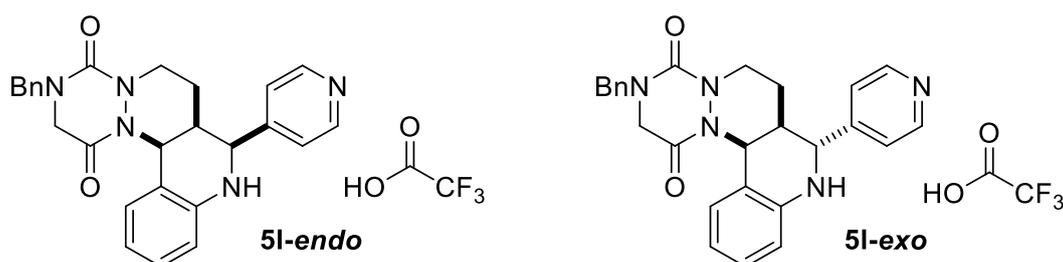
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.86 (s, 1H, CH<sup>Pyr</sup>), 8.75 (dd, *J* = 5.3 Hz, 1H, CH<sup>Pyr</sup>), 8.32 (dt, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 1H, CH<sup>Pyr</sup>), 7.82 (dd, *J* = 8.0, 5.3 Hz, 1H, CH<sup>Pyr</sup>), 7.49-7.13 (m, 5H, CH<sup>Ph</sup>), 7.12 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, CH<sup>Aniline</sup>), 6.75 (dd, *J* = 8.1, 1.1 Hz, 1H, CH<sup>Aniline</sup>), 6.70-6.55 (m, 2H, CH<sup>Aniline</sup>), 6.39 (bs, 1H, NH), 6.02 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CO-N-CH-Ph), 5.05 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, NH-CH-Ph), 4.60 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.19 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.14 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CO), 4.04 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 3.78 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, N-CH<sub>2</sub>-CO), 2.97 (td, *J* = 12.7, 2.8 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 2.28-2.18 (m, 1H, CH-CH-CH), 1.52 (qd, *J* = 13.0, 4.9 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 1.09 (dd, *J* = 13.2, 3.5 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 164.1, 155.8, 145.7, 145.2, 144.9, 140.2, 139.1, 137.5, 129.0, 128.7, 128.5, 128.0,

126.1, 125.6, 117.7, 116.3, 115.7, 55.2, 51.3, 49.9, 48.7, 44.6, 36.3, 19.3. **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 439.2008, Found: 439.2004 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 0.91$  ppm);  $t_{\text{R}} = 3.41$  min (Method A).

**5k-exo**: pale yellow amorphous solid isolated as a TFA salt (8 mg, **9%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.64 (m, 2H, **CH<sup>Pyr</sup>**), 7.99 (dt,  $J = 8.2, 1.9$  Hz, 1H, **CH<sup>Pyr</sup>**), 7.69 (dd,  $J = 8.0, 5.1$  Hz, 1H, **CH<sup>Pyr</sup>**), 7.46-7.36 (m, 2H, **CH<sup>Ph</sup>**), 7.31 (m, 3H, **CH<sup>Ph</sup>**), 7.09 (m, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.77 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.60-6.50 (m, 2H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 5.03 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, CO-N-**CH**-Ph), 4.66 (s, 1H, NH-**CH**-Ph), 4.57 (d,  $J = 14.8$  Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.20 (d,  $J = 14.8$  Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.20-4.10 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 4.05 (d,  $J = 15.5$  Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 3.73 (d,  $J = 15.4$  Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 3.19 (td,  $J = 12.7, 2.9$  Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 2.38-2.28 (m, 1H, CH-**CH-CH**), 1.94-1.86 (m, 1H, CH-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N**), 1.62 (qd,  $J = 12.9, 4.8$  Hz, 1H, CH-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N**). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  164.0, 155.7, 145.8, 144.9, 144.4, 142.0, 138.1, 137.5, 129.2, 129.0, 128.6, 128.0, 126.2, 125.6, 116.6, 114.4, 114.1, 54.6, 49.9, 48.6, 46.7, 44.8, 35.6, 25.6. **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 439.2008, Found: 439.2021 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 2.96$  ppm);  $t_{\text{R}} = 3.56$  min (Method A).

**3-benzyl-8-(pyridin-4-yl)-2,3,6,7,7a,8,9,13b-octahydro-[1,2,4]triazino[2',1':1,2]pyridazino[4,3-c]quinoline-1,4-dione (5l-endo & 5l-exo)**



(**5l**) was obtained as a TFA salt according to the **General Procedure B** (2.5 equivalents of BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O were used for this example), performed on a 0.15 mmol scale (38 mg, **47%**).

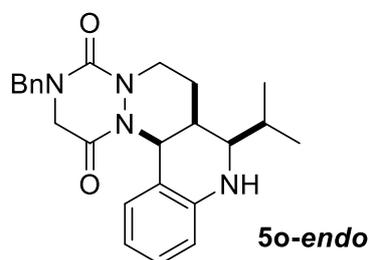
**5l-endo**: pale yellow amorphous solid isolated as a TFA salt (30 mg, **37%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.94-8.86 (m, 2H, **CH<sup>Pyr</sup>**), 8.04-7.93 (m, 2H, **CH<sup>Pyr</sup>**), 7.46-7.37 (m, 2H, **CH<sup>Ph</sup>**), 7.37-7.29 (m, 3H, **CH<sup>Ph</sup>**), 7.09 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.79 (dd, *J* = 8.0, 1.1 Hz, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.68-6.59 (m, 2H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.48 (bs, 1H, **NH**), 6.05 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, CO-N-**CH-Ph**), 5.12 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, NH-**CH-Ph**), 4.61 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.20 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.15 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 4.02 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 3.79 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 2.97 (td, *J* = 12.7, 2.9 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 2.31 (m, 1H, CH-**CH-CH**), 1.49 (qd, *J* = 13.1, 4.9 Hz, 1H, CH-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N**), 1.00 (dd, *J* = 13.7, 3.5 Hz, 1H, CH-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N**). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, DMSO) δ 164.1, 155.8, 145.4, 144.4, 137.5, 129.0, 128.7, 128.5, 128.0, 126.1, 124.8, 117.9, 116.3, 115.8, 56.7, 51.3, 49.9, 48.7, 44.6, 36.1, 19.4. **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 439.2008, Found: 439.2004 (Δ<sub>HRMS</sub> = 0.91 ppm); t<sub>R</sub> = 3.94 min (Method B).

**5I-exo**: pale yellow amorphous solid isolated as a TFA salt (8 mg, **10%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.82-8.70 (m, 2H, **CH<sup>Pyr</sup>**), 7.78-7.70 (m, 2H, **CH<sup>Pyr</sup>**), 7.45-7.35 (m, 2H, **CH<sup>Ph</sup>**), 7.45-7.26 (m, 3H, **CH<sup>Ph</sup>**), 7.14-7.05 (m, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.87 (bs, 1H, **NH**), 6.80 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.58-6.50 (m, 2H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 4.98 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CO-N-**CH-Ph**), 4.71 (s, 1H, NH-**CH-Ph**), 4.57 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.20 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.20-4.10 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 4.05 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 3.73 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 3.20 (td, *J* = 12.7, 2.9 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 2.36 (m, 1H, CH-**CH-CH**), 1.94 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H, CH-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N**), 1.62 (qd, *J* = 12.9, 4.8 Hz, 1H, CH-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N**). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, DMSO) δ 164.0, 155.7, 145.4, 144.1, 137.5, 129.3, 129.0, 128.6, 128.0, 126.2, 123.6, 116.8, 114.5, 114.2, 56.3, 49.9, 48.6, 46.7, 44.8, 35.0, 25.7. **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 439.2008, Found: 439.2008 (Δ<sub>HRMS</sub> = 0 ppm); t<sub>R</sub> = 4.06 min (Method B).

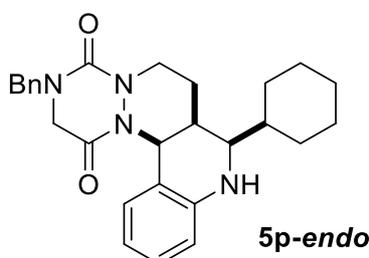
**3-benzyl-8-isopropyl-2,3,6,7,7a,8,9,13b-octahydro-[1,2,4]triazino[2',1':1,2]pyridazino-[4,3-c]quinoline-1,4-dione (5o-endo)**



(**5o-endo**) was obtained as a white amorphous solid according to the **General Procedure B**, performed on a 0.16 mmol scale (47 mg, **70%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.73 (bs, 1H, **NH**), 7.44-7.29 (m, 5H, **CH<sup>Ph</sup>**), 7.19-7.10 (m, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.85-6.67 (m, 3H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 5.87 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CO-N-**CH**-Ph), 4.76 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.44-4.34 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>**-N), 4.24 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 3.97 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>**-CO), 3.89 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>**-CO), 3.24-3.07 (m, 2H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>**-N + NH-**CH**-Ph), 2.34-2.28 (m, 1H, CH-**CH**-CH), 1.95-1.66 (m, 3H, CH-**CH<sub>2</sub>**-CH<sub>2</sub>-N + **CH**(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.11 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH(**CH<sub>3</sub>**)<sub>2</sub>), 1.00 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH(**CH<sub>3</sub>**)<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.9, 156.2, 135.3, 129.1, 129.0, 128.5, 128.3, 126.2, 60.7, 52.3, 50.6, 47.9, 45.1, 32.4, 28.6, 19.8, 18.9; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 404.2212, Found: 404.2232 (Δ<sub>HRMS</sub> = 4.95 ppm); **t<sub>R</sub>** = 5.27 min (Method B).

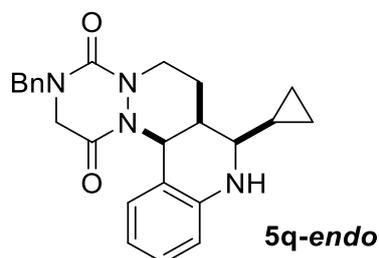
**3-benzyl-8-cyclohexyl-2,3,6,7,7a,8,9,13b-octahydro-[1,2,4]triazino[2',1':1,2]pyridazino-[4,3-c]quinoline-1,4-dione (5p-endo)**



(**5p-endo**) was obtained as a white amorphous solid according to the **General Procedure B**, performed on a 0.15 mmol scale (66 mg, **90%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.43-7.30 (m, 5H, **CH<sup>Ph</sup>**), 7.09-7.05-6.95 (m, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.72 (dt, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.65 (td, *J* = 7.5, 1.2 Hz, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.52 (dd, *J* = 8.0, 1.1 Hz, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 5.85 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CO-N-**CH**-Ph), 4.76 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.45-4.35 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>**-N), 4.20 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 3.91 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>**-CO), 3.82 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>**-CO), 3.19-3.02 (m, 2H m, 2H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>**-N + NH-**CH**-Ph), 2.26-2.10 (m, 1H, CH-**CH**-CH), 1.95 (broad d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 1.89-1.67 (m, 4H), 1.66-1.60 (m, 1H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**), 1.54-1.44 (m, 1H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**), 1.39-1.12 (m, 3H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**), 1.04-0.92 (m, 2H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.7, 155.9, 144.3, 135.8, 128.9, 128.7, 128.7, 128.5, 128.1, 126.3, 118.3, 116.2, 114.6, 58.8, 52.3, 50.5, 48.2, 45.0, 37.8, 32.0, 28.5, 26.1, 25.8, 25.7, 19.1; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 444.2525, Found: 444.2520 (Δ<sub>HRMS</sub> = 1.13 ppm); t<sub>R</sub> = 5.19 min (Method A).

**3-benzyl-8-cyclopropyl-2,3,6,7,7a,8,9,13b-octahydro-[1,2,4]triazino[2',1':1,2]pyridazino-[4,3-c]quinoline-1,4-dione (5q-endo)**

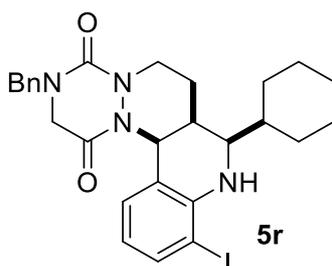


**(5q-endo)** was obtained as a white amorphous solid according to the **General Procedure B**, performed on a 0.16 mmol scale (30 mg, **47%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.44-7.29 (m, 5H, **CH<sup>Ph</sup>**), 7.14-7.05 (m, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.77-6.68 (m, 2H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.66-6.59 (m, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 5.85 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, CO-N-**CH**-Ph), 4.76 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.47-4.43 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>**-N), 4.24 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 3.95 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>**-CO), 3.86 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>**-CO), 3.18 (td, *J* = 12.2, 4.2 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>**-N), 2.63 (dd, *J* = 9.7, 2.4 Hz, 1H, NH-**CH**-Ph), 2.30-2.17 (m, 1H, CH-**CH**-CH), 1.98-1.86 (m, 2H, CH-**CH<sub>2</sub>**-CH<sub>2</sub>-N), 1.14-0.98 (m, 1H, **CH<sup>cyclopropyle</sup>**), 0.68 (tt, *J* = 9.1, 4.9 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub><sup>cyclopropyle</sup>**), 0.59 (tt, *J* = 8.9, 4.8 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub><sup>cyclopropyle</sup>**), 0.34 (dq, *J* = 9.3, 4.7 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub><sup>cyclopropyle</sup>**), 0.26 (dq, *J* = 9.7, 4.9 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub><sup>cyclopropyle</sup>**). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.8,

156.0, 143.9, 135.7, 128.9, 128.8, 128.5, 128.2, 126.4, 118.6, 116.1, 114.6, 60.2, 52.1, 50.5, 48.1, 45.1, 35.1, 19.8, 13.0, 3.9, 1.7; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 402.2056, Found: 402.2052 ( $\Delta_{\text{HRMS}}$  = 0.99 ppm);  $t_{\text{R}}$  = 4.21 min (Method A).

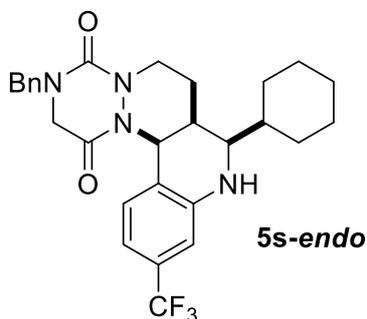
**3-benzyl-8-cyclohexyl-10-iodo-2,3,6,7,7a,8,9,13b-octahydro-[1,2,4]triazino[2',1':1,2]pyridazino[4,3-c]quinoline-1,4-dione (5r-endo)**



(**5r-endo**) was obtained as a light-yellow amorphous solid according to the **General Procedure B**, performed on a 0.2 mmol scale (68 mg, **62%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.53 (dt,  $J$  = 7.8, 1.2 Hz, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 7.41-7.28 (m, 5H, **CH<sup>Ph</sup>**), 6.69 (dt,  $J$  = 7.7, 1.3 Hz, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.36 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 5.85 (d,  $J$  = 5.1 Hz, 1H, CO-N-**CH-Ph**), 4.75 (d,  $J$  = 14.7 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.46 (bs, 1H, **NH**), 4.41-4.37 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 4.20 (d,  $J$  = 14.7 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 3.89 (d,  $J$  = 15.8 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 3.80 (d,  $J$  = 15.8 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 3.19 (dd,  $J$  = 9.8, 2.3 Hz, 1H, NH-**CH-Ph**), 3.09 (td,  $J$  = 12.4, 3.7 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 2.23-2.13 (m, 1H, CH-**CH-CH**), 2.04 (d,  $J$  = 12.8 Hz, 1H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**), 1.92-1.86 (m, 1H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**), 1.84-1.50 (m, 6H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**), 1.44-1.13 (m, 3H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**), 1.13-0.90 (m, 2H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  163.7, 155.8, 143.6, 138.4, 135.8, 128.9, 128.5, 128.1, 126.5, 119.1, 116.8, 84.4, 59.0, 52.2, 50.5, 48.2, 44.9, 37.7, 31.8, 30.2, 28.5, 26.2, 25.8, 19.1; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>I<sub>1</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 570.1492, Found: 570.1504 ( $\Delta_{\text{HRMS}}$  = 2.10 ppm);  $t_{\text{R}}$  = 7.37 min (Method A).

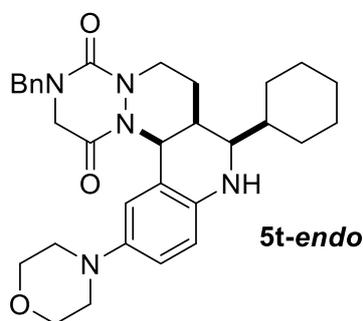
**3-benzyl-8-cyclohexyl-11-(trifluoromethyl)-2,3,6,7,7a,8,9,13b-octahydro-[1,2,4]triazino-[2',1':1,2]pyridazino[4,3-c]quinoline-1,4-dione (5s-endo)**



(**5s-endo**) was obtained as a white amorphous solid according to the **General Procedure B**, performed on a 0.16 mmol scale (48 mg, **58%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.43-7.29 (m, 5H, **CH<sup>Ph</sup>**), 6.84-6.75 (m, 2H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.75-6.71 (m, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 5.83 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CO-N-**CH-Ph**), 4.74 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.44-4.36 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 4.24 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 3.92 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 3.83 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 3.17 (dd, *J* = 9.7, 2.2 Hz, 1H, NH-**CH-Ph**), 3.10 (td, *J* = 12.4, 3.6 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 2.26-2.20 (m, 1H, CH-**CH-CH**), 1.99-1.89 (m, 1H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**), 1.89-1.61 (m, 6H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**), 1.53-1.43 (m, 1H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**), 1.39-1.13 (m, 3H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**), 1.09-0.91 (m, 2H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.6, 155.8, 144.7, 135.8, 130.9 (q, <sup>2</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 32.0 Hz), 128.9, 128.5, 128.2, 126.9, 125.4, 119.5, 114.1 (q, <sup>3</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 3.8 Hz), 110.9 (q, <sup>3</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 4.0 Hz), 58.6, 51.8, 50.5, 48.2, 44.9, 37.7, 30.0, 28.5, 26.1, 25.7, 25.7, 19.2. **<sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H} NMR** (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -63.7; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 512.2399, Found: 512.2394 (Δ<sub>HRMS</sub> = 0.98 ppm); **t<sub>R</sub>** = 5.92 min (Method A).

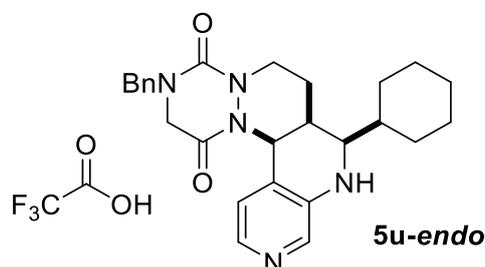
**3-benzyl-8-cyclohexyl-12-morpholino-2,3,6,7,7a,8,9,13b-octahydro-[1,2,4]triazino-[2',1':1,2]pyridazino[4,3-c]quinoline-1,4-dione (5t-endo)**



(**5t-endo**) was obtained as a light-purple amorphous solid according to the **General Procedure B**, performed on a 0.18 mmol scale (80 mg, **86%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.42-7.29 (m, 5H, **CH<sup>Ph</sup>**), 7.21 (broad d, *J* = 8.8 Hz, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 7.03 (s, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 6.54 (broad d, *J* = 8.7 Hz, 1H, **CH<sup>Aniline</sup>**), 5.83 (bs, 1H, CO-N-**CH-Ph**), 4.76 (d, *J* = 14.5 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.38 (d, *J* = 14.5 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.47-4.31 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N**), 4.09 (bs, 4H, **CH<sub>2</sub><sup>Morpopholine</sup>**), 3.94 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 3.76 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>-CO**), 3.38 (bs, 4H, **CH<sub>2</sub><sup>Morpopholine</sup>**), 3.21-3.03 (m, 2H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-N** + NH-**CH-Ph**), 2.21 (bs, 1H, CH-**CH-CH**), 1.97-1.61 (m, 8H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**), 1.47 (bs, 1H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**), 1.26-1.20 (m, 4H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**), 1.03-0.99 (m, 2H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.63, 156.10, 145.43, 135.56, 132.71, 128.94, 128.90, 128.22, 121.03, 118.94, 117.77, 115.22, 64.34, 58.57, 55.00, 51.46, 50.69, 48.09, 45.39, 37.63, 31.40, 30.03, 28.49, 26.04, 25.72, 25.64, 19.10; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>31</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 529.3053, Found: 529.3041 (Δ<sub>HRMS</sub> = 2.27 ppm); **t<sub>R</sub>** = 4.85 min (Method B).

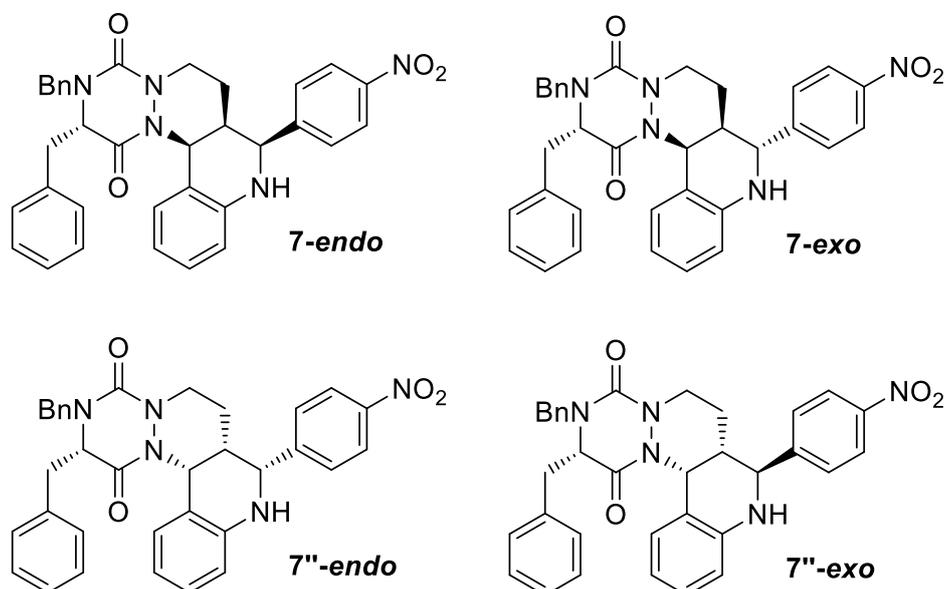
**11-benzyl-6-cyclohexyl-5,6,6a,7,8,11,12,14a-octahydro[1,2,4]triazino[2',1':1,2]-pyridazi-no[4,3-c][1,7]naphthyridine-10,13-dione (5u-endo)**



(**5u-endo**) was obtained as a light yellow solid (TFA salt) according to the **General Procedure B** (2.5 equiv of BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O were used for this example), performed on a 0.19 mmol scale (20 mg, **18%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.85 (dd, *J* = 4.8, 1.4 Hz, 1H, **CH<sup>Pyr</sup>**), 7.44-7.35 (m, 4H, **CH<sup>Ar</sup>**), 7.33-7.25 (m, 2H, **CH<sup>Ar</sup>**), 7.22 (q, *J* = 9.4, 5.8 Hz, 1H, **CH<sup>Ar</sup>**), 5.82 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, CO-N-**CH**-Ph), 4.52 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.30 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 4.08 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>**-CO), 4.06-3.97 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>**-N), 3.74 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, N-**CH<sub>2</sub>**-CO), 3.27 (dd, *J* = 9.7, 2.2 Hz, 1H, NH-**CH**-Ph), 3.16 (td, *J* = 12.6, 2.8 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>**-N), 2.25-2.15 (m, 2H, CH-**CH**-CH + **CH<sup>Aliphatic</sup>**), 1.74 (d, *J* = 17.5 Hz, 3H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**), 1.69-1.60 (m, 2H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**), 1.48-1.09 (m, 5H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**), 1.05-0.84 (m, 2H, **CH<sup>Aliphatic</sup>**). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, DMSO) δ 164.5, 155.3, 143.3, 137.4, 128.9, 128.1, 127.7, 124.6, 57.8, 49.9, 48.9, 37.8, 30.8, 30.1, 28.4, 26.3, 25.9, 25.8, 19.8; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>26</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 445.2478, Found: 445.2490 (Δ<sub>HRMS</sub> = 2.70 ppm); **t<sub>R</sub>** = 4.62 min (Method B).

**(2S)-2,3-dibenzyl-8-(4-nitrophenyl)-2,3,6,7,7a,8,9,13b-octahydro-[1,2,4]triazino-[2',1':1,2]pyridazino[4,3-c]quinoline-1,4-dione (7-endo, 7-exo, 7''-endo & 7''-exo)**

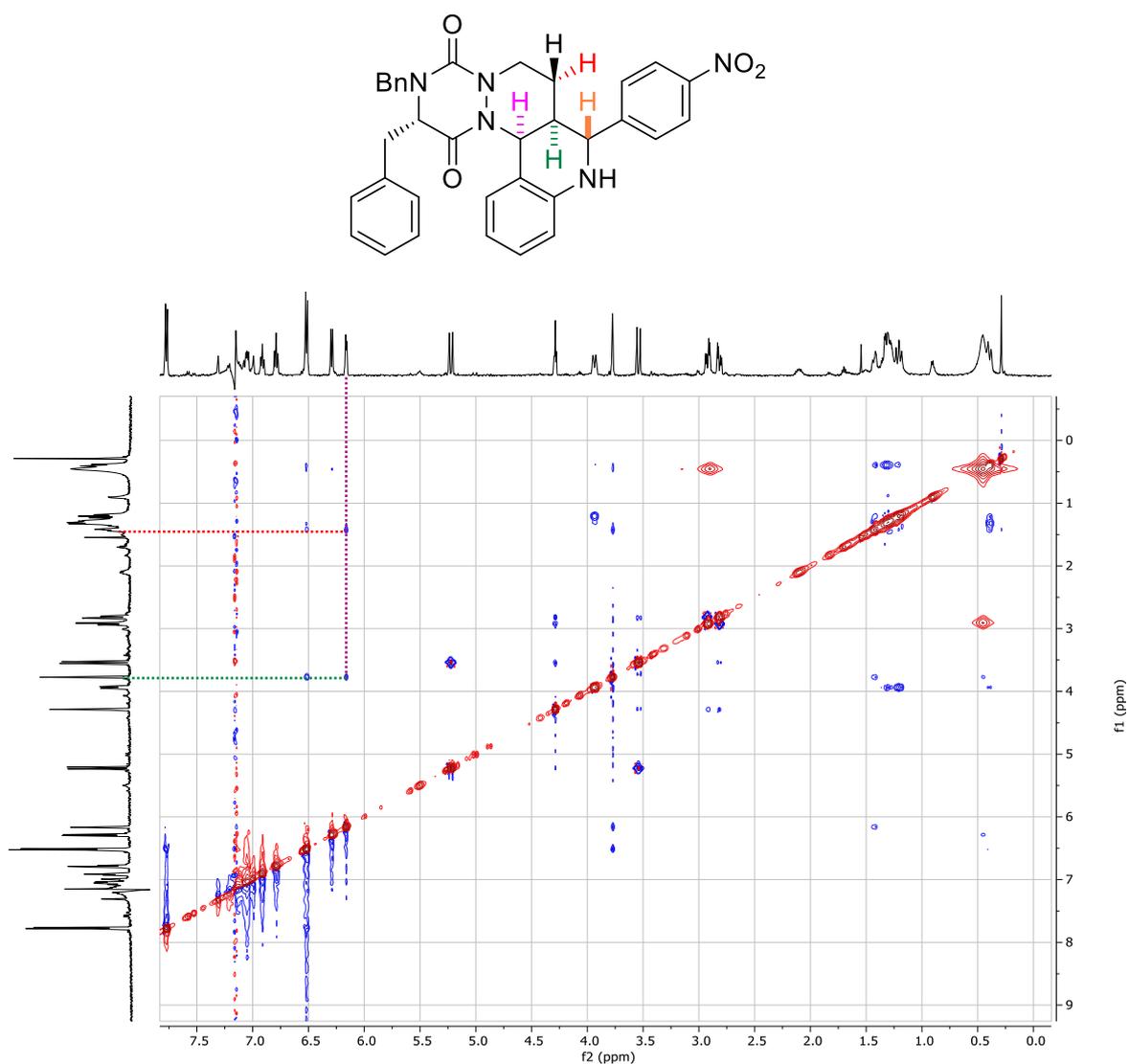


(7) was obtained according to the **General Procedure A**, performed on a 0.09 mmol scale (4 mg, 7%).

Partial <sup>1</sup>H NMR analysis of one fraction:

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) δ 7.81 – 7.74 (m, 2H), 6.91 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.79 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.58 – 6.48 (m, 2H), 6.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), **6.16 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H)**, 5.22 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H), 4.29 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H), 3.94 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), **3.77 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H)**, 3.54 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H), 2.92 (dd, *J* = 13.9, 4.7 Hz, 1H), 2.81 (dd, *J* = 13.9, 4.5 Hz, 1H), **2.17 - 2.02 ppm (m, 1H)**.

## NOESY experiment:



**Figure 154.** NOESY spectrum of the isolated fraction of **7**

### 2.1.1.2 *Theoretical calculations*

#### **Computational details<sup>1</sup>**

Computations were run by using the Gaussian 09, Revision D.01, set of programs.<sup>1303</sup> Full geometry optimizations were carried out in the absence of symmetry constraints at the M062X/6-31+G(d,p) level of theory. Solvation by acetonitrile was taken into account by using a solvation model based on density (SMD). The nature of the minima (or TS) were checked by harmonic frequency evaluations to show the presence of no (or one and only one) imaginary frequencies. The connectivity between reactants and

<sup>1</sup> Performed by Isabelle Chataigner (UMR 6014, COBRA, Rouen)

products was confirmed by IRC calculations and computing force constants at every step. After the IRC calculations, all adducts were optimized. The harmonic frequencies were used unscaled for the evaluation of the thermodynamic data of the reaction. They were computed by using the standard Gaussian values ( $T = 298.15$  K and  $P = 1$  atm). The activation/reaction Gibbs free energies were computed as the difference between the separated reactants and the TS/products.

## Total energy and cartesian coordinates<sup>2</sup>

D



Electronic Energy = -625.955914 a.u.

Sum of electronic and thermal free energies = - 625.796142 a.u.

Number of imaginary frequencies: 0

N	-0.12504	0.48160	0.24321
N	0.04652	0.27605	1.61816
C	1.28311	-0.23316	2.05543
C	2.28763	-0.49006	1.21167
C	2.18286	-0.19443	-0.25819
C	1.08918	0.84841	-0.47681
C	-1.04429	0.38320	2.43713
H	1.32057	-0.39135	3.12612
H	3.20470	-0.90319	1.61840
H	3.13546	0.18658	-0.63972
H	1.41597	1.82292	-0.09969
C	-1.22274	-0.08385	-0.38529
N	-2.27747	-0.27833	0.46428
O	-1.23809	-0.32111	-1.59030
O	-0.97748	0.26931	3.65176
C	-2.32832	0.56215	1.65744
H	-3.15429	0.23785	2.29047
H	-2.46858	1.62336	1.40266
C	-3.54641	-0.70495	-0.10637
H	-4.15450	-1.14445	0.68640
H	-4.08845	0.13777	-0.55360
H	-3.36041	-1.45504	-0.87430
H	0.81279	0.94522	-1.52562
H	1.94938	-1.10519	-0.82384

---

<sup>2</sup> Performed by Isabelle Chataigner (UMR 6014, COBRA, Rouen)

I<sub>1</sub>



Electronic Energy = -325.567492 a.u.

Sum of electronic and thermal free energies = -325.475267 a.u.

Number of imaginary frequencies: 0

C	-0.07900	-0.22372	-0.00331
C	-0.04003	-0.06704	1.38684
C	1.17930	0.11452	2.03449
C	2.37096	0.10697	1.30602
C	2.33421	-0.08120	-0.07593
C	1.11566	-0.24535	-0.73380
H	-0.97192	-0.07623	1.94510
H	1.19979	0.25269	3.11153
H	3.32207	0.23490	1.81384
H	3.25805	-0.10751	-0.64651
H	1.08906	-0.41534	-1.80668
N	-1.34448	-0.40864	-0.61649
C	-1.58056	0.19757	-1.70906
H	-0.86882	0.88747	-2.17664
H	-2.53779	0.03842	-2.20383

### BF<sub>3</sub>- I<sub>1</sub>



Electronic Energy = -650.092552 a.u.

Sum of electronic and thermal free energies = -649.991075 a.u.

Number of imaginary frequencies: 0

C	-0.05647	0.05229	0.10530
C	0.07720	0.39720	1.45015
C	1.34180	0.36651	2.03289
C	2.45508	-0.01794	1.28474
C	2.30346	-0.37985	-0.05344
C	1.04477	-0.35112	-0.64937
H	-0.78979	0.69847	2.02813
H	1.45427	0.64348	3.07635
H	3.43716	-0.04575	1.74662
H	3.16264	-0.69679	-0.63609
H	0.91611	-0.66182	-1.68182
N	-1.36206	0.09624	-0.50163
C	-1.50995	0.54141	-1.69019
B	-2.64060	-0.42881	0.34220
H	-0.66331	0.93767	-2.24607
H	-2.50023	0.52578	-2.13465
F	-3.65404	-0.68636	-0.56793
F	-2.24293	-1.57389	1.01362
F	-3.00069	0.58330	1.22413

**(E)-BF<sub>3</sub>-I<sub>2</sub>**



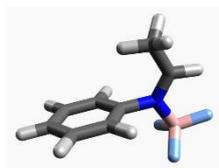
Electronic Energy = -689.399169 a.u.

Sum of electronic and thermal free energies = -689.273949 a.u.

Number of imaginary frequencies: 0

C	0.01561	-0.02543	0.02592
C	0.24146	0.82805	1.10488
C	1.46371	0.76835	1.76879
C	2.44180	-0.14261	1.36336
C	2.19746	-0.99703	0.28964
C	0.97780	-0.94361	-0.38571
H	-0.52731	1.53221	1.40911
H	1.65247	1.43619	2.60359
H	3.39138	-0.18735	1.88776
H	2.95181	-1.71161	-0.02466
H	0.76823	-1.61222	-1.21588
N	-1.24102	0.05772	-0.67925
C	-1.21777	0.28666	-1.94480
B	-2.61847	-0.16732	0.13558
C	-2.40539	0.40036	-2.81878
H	-0.23977	0.41478	-2.40997
F	-3.33313	-1.16709	-0.51858
F	-2.28800	-0.55813	1.42285
F	-3.31710	1.03643	0.13127
H	-2.30045	1.31421	-3.41189
H	-2.38227	-0.43668	-3.52750
H	-3.35131	0.40101	-2.28269

**(Z)-BF<sub>3</sub>-I<sub>2</sub>**



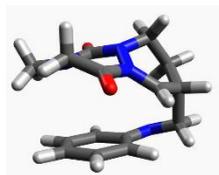
Electronic Energy = -689.401761 a.u.

Sum of electronic and thermal free energies = -689.275072 a.u.

Number of imaginary frequencies: 0

C	-0.25610	-0.10275	-0.11409
C	0.00888	1.06973	0.58762
C	1.30644	1.30260	1.04247
C	2.31429	0.36821	0.80200
C	2.02919	-0.80465	0.10163
C	0.73675	-1.04777	-0.35981
H	-0.78619	1.78739	0.76373
H	1.52746	2.21614	1.58566
H	3.32210	0.55368	1.16074
H	2.81143	-1.53377	-0.08499
H	0.49373	-1.95424	-0.90675
N	-1.60163	-0.36648	-0.56954
C	-1.94735	-0.16516	-1.78993
B	-2.61266	-0.95953	0.52350
C	-1.08498	0.36795	-2.86575
H	-2.97635	-0.42230	-2.03472
F	-3.82224	-1.22235	-0.10541
F	-2.03328	-2.12039	1.02530
F	-2.75391	-0.00191	1.52260
H	-1.63241	1.15828	-3.38803
H	-0.12543	0.74038	-2.50945
H	-0.92134	-0.43449	-3.59542

### TSa (D+ I<sub>1</sub> (endo))



Electronic Energy = -951.489699 a.u. ( $\Delta E_e^\ddagger = 21.15 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

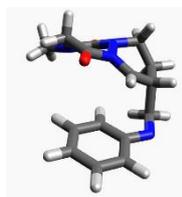
Sum of electronic and thermal free energies = -951.212703 a.u. ( $\Delta G^\ddagger = 36.84 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 1 at -233.5959

C	3.17529	-1.06927	1.70990
C	2.35517	0.41881	1.33739
N	2.57764	-2.14152	1.08821
C	1.38888	-2.53777	1.60584
C	1.08141	0.48328	1.98517
N	-0.08846	0.52009	1.31449
N	-0.10429	0.60601	-0.07745
C	1.06248	1.27267	-0.64425
C	2.33855	0.57904	-0.18429
C	-1.33757	0.43313	1.96300
C	-2.44714	0.09978	0.99514
N	-1.93887	-0.76372	-0.06379
C	-0.85692	-0.34204	-0.77493
C	0.57049	-3.41292	0.82293
C	-0.70493	-3.75363	1.21784
C	-1.24272	-3.25915	2.42634
C	-0.45024	-2.45705	3.23543
C	0.84735	-2.09299	2.84786
O	-1.43906	0.56461	3.15897
O	-0.57268	-0.68584	-1.91586
C	-2.86100	-1.70490	-0.67921
H	0.98368	0.65166	3.05174
H	3.03958	1.09228	1.85876
H	3.21299	1.15122	-0.50530
H	1.03337	2.31595	-0.31265
H	-3.22277	-0.42994	1.54967
H	-2.87150	1.03275	0.59526
H	-3.38411	-2.24768	0.11080
H	-3.59342	-1.18997	-1.31270
H	-2.29534	-2.40942	-1.28900
H	0.94409	1.23690	-1.72656
H	2.38584	-0.40927	-0.65143
H	1.46157	-1.54369	3.55237
H	4.16464	-0.85306	1.29827

H	3.21524	-1.04304	2.80633
H	-0.83443	-2.09884	4.18709
H	-2.25072	-3.52776	2.72872
H	0.97705	-3.77625	-0.11817
H	-1.30853	-4.40074	0.58593

TSa (D+I<sub>1</sub> (exo))



Electronic Energy = -951.485635 a.u. ( $\Delta E_e^\ddagger = 23.70 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

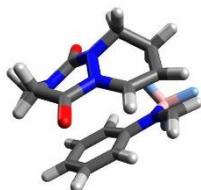
Sum of electronic and thermal free energies = -951.210737 a.u. ( $\Delta G^\ddagger = 38.07 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 1 at -116.1474

C	0.14816	-2.71091	2.52226
C	1.48306	-2.88310	2.99434
N	2.61020	-2.56938	2.30584
C	2.42606	-2.01746	1.05176
C	2.07850	-0.34350	1.04191
C	0.94839	-0.06329	1.88030
H	-0.04394	-2.40570	1.49841
H	3.35033	-2.00663	0.46746
H	1.61454	-2.42516	0.43212
H	2.97912	0.02845	1.53354
C	1.93525	0.09784	-0.41497
C	0.92217	1.23008	-0.53195
H	1.27865	2.13071	-0.02189
H	0.68946	1.47072	-1.56809
H	2.90447	0.42081	-0.80263
H	1.59474	-0.74313	-1.02993
N	-0.33945	0.84752	0.09570
N	-0.20740	0.42500	1.42019
C	-1.37071	0.50608	2.23540
O	-1.30918	0.34440	3.42568
C	-2.61193	0.71854	1.40867
C	-1.40226	0.30573	-0.64024
N	-2.47933	0.00707	0.14119
C	-0.95286	-3.01904	3.33314
C	-0.78682	-3.50592	4.62261
C	0.52340	-3.69136	5.10768
C	1.61972	-3.38909	4.32536
C	-3.70901	-0.42447	-0.51185
O	-1.34647	0.17877	-1.85478
H	0.98643	-0.17313	2.95884
H	-3.45723	0.31376	1.96579
H	-2.76534	1.79754	1.25860
H	-4.28183	0.43328	-0.88360

H	-3.45754	-1.07645	-1.34742
H	-4.31078	-0.97732	0.21139
H	2.62741	-3.53203	4.70883
H	0.67544	-4.07723	6.11293
H	-1.95377	-2.87626	2.93098
H	-1.64515	-3.74501	5.24265

TSa (D+ BF<sub>3</sub>-I<sub>1</sub> (endo))



Electronic Energy = -1276.041957 a.u. ( $\Delta E^\ddagger = 4.08 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

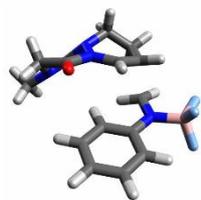
Sum of electronic and thermal free energies = -1275.753999 a.u. ( $\Delta G^\ddagger = 20.84 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 1 at -409.1171

C	2.87488	-0.95232	1.68382
C	2.23245	0.82335	1.00490
N	2.28174	-1.99200	1.07465
C	1.01246	-2.44187	1.51811
C	1.02260	0.93196	1.67244
N	-0.17412	0.78926	1.05858
N	-0.23929	0.73551	-0.33564
C	0.89253	1.35295	-1.01871
C	2.21112	0.76898	-0.50814
C	-1.37913	0.68945	1.78082
C	-2.52924	0.25408	0.91024
N	-2.05203	-0.66514	-0.11488
C	-1.03118	-0.25213	-0.92129
C	0.27557	-3.33899	0.72324
C	-0.98554	-3.76538	1.12509
C	-1.54806	-3.30998	2.31894
C	-0.81715	-2.43295	3.11674
C	0.45329	-2.00654	2.73125
O	-1.41942	0.88669	2.97113
O	-0.83376	-0.64452	-2.06415
C	-3.01703	-1.60342	-0.67039
H	0.94950	1.12850	2.73772
H	3.05911	1.32197	1.50365
H	3.05192	1.33377	-0.91846
H	0.84752	2.42977	-0.82668
H	-3.24883	-0.26018	1.54886
H	-3.01077	1.14373	0.47639
H	-2.48757	-2.36320	-1.24524
H	-3.54983	-2.08203	0.15324
H	-3.73718	-1.09513	-1.32337
H	0.74785	1.16751	-2.08164
H	2.29518	-0.26243	-0.86548

H	0.99426	-1.34569	3.39906
H	3.89421	-0.76515	1.36597
H	2.68789	-0.76973	2.73484
H	-1.22883	-2.07300	4.05506
H	-2.53655	-3.63941	2.62431
H	0.67959	-3.69204	-0.21758
H	-1.53720	-4.45266	0.48992
B	3.01324	-2.70956	-0.11817
F	4.28616	-2.14505	-0.26504
F	3.12645	-4.07399	0.18687
F	2.30553	-2.56245	-1.32206

TSa (D+ BF<sub>3</sub>-I<sub>1</sub> (exo))



Electronic Energy = -1276.03975 a.u. ( $\Delta E_e^\ddagger = 5.47 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Sum of electronic and thermal free energies = -1275.754916 a.u. ( $\Delta G^\ddagger = 20.27 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 1 at -396.8876

C	1.42410	-3.50356	4.18083
C	1.18347	-2.78965	2.99144
C	-0.13772	-2.40777	2.70193
C	-1.17941	-2.74163	3.56852
C	-0.93437	-3.45241	4.73859
C	0.37774	-3.82930	5.03508
N	2.26354	-2.47934	2.13435
B	3.74528	-2.68581	2.60780
F	4.00849	-4.05273	2.78684
C	2.04996	-1.82578	0.98004
F	4.60286	-2.17059	1.62794
F	3.95293	-2.00337	3.81731
C	2.14220	0.14765	1.09100
C	1.07092	0.41020	1.93274
N	-0.13895	0.79790	1.47076
N	-0.29577	1.11217	0.11788
C	0.92207	1.59783	-0.52297
C	2.05681	0.58929	-0.35972
C	-1.29703	0.80237	2.27516
C	-2.54994	0.84558	1.43595
N	-2.33846	0.06978	0.21718
C	-1.29184	0.42586	-0.58273
O	-1.23481	0.70384	3.47553
O	-1.21750	0.22850	-1.78782
C	-3.50482	-0.54264	-0.40503
H	-0.39057	-1.86949	1.79540
H	2.89156	-1.82831	0.29655

H	1.07627	-1.90572	0.50474
H	3.11245	0.15505	1.57928
H	1.17893	2.54961	-0.04780
H	0.67499	1.77330	-1.56883
H	3.00352	1.04120	-0.66646
H	1.87300	-0.26503	-1.02273
H	1.11689	0.28394	3.01068
H	-3.35669	0.39721	2.01591
H	-2.80448	1.89281	1.21657
H	-3.17168	-1.24775	-1.16603
H	-4.06532	-1.07830	0.36289
H	-4.15163	0.21069	-0.87000
H	2.42954	-3.81530	4.43418
H	0.59362	-4.38573	5.94248
H	-2.18962	-2.43208	3.31518
H	-1.74813	-3.70927	5.40932

### TSa (D+(E)-BF<sub>3</sub>-I<sub>2</sub> (endo))



Electronic Energy = -1315.33590174 a.u. ( $\Delta E_e^\ddagger = 12.04 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

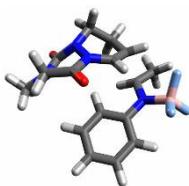
Sum of electronic and thermal free energies = -1315.022744 a.u. ( $\Delta G^\ddagger = 29.71 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 1 at -490.3840

C	3.39769	-1.25677	1.86677
C	2.33032	0.24174	1.15037
N	2.92016	-2.41934	1.34040
C	1.59805	-2.77206	1.70249
C	1.11722	0.23978	1.84058
N	-0.08594	0.06174	1.25316
N	-0.17199	0.03740	-0.13682
C	0.92660	0.68352	-0.84657
C	2.26419	0.13109	-0.35672
C	-1.28354	0.06789	2.00332
C	-2.50719	-0.17830	1.16024
N	-2.20729	-1.02580	0.02047
C	-1.13550	-0.74446	-0.76489
C	0.70625	-3.20599	0.70756
C	-0.62095	-3.46556	1.02591
C	-1.08810	-3.28677	2.33131
C	-0.20345	-2.87212	3.32389
C	1.13237	-2.61525	3.01621
O	-1.27899	0.26001	3.19497
O	-1.00262	-1.10569	-1.93041
C	-3.28984	-1.83520	-0.51392
H	1.05159	0.44055	2.90580
H	3.03844	0.94002	1.59077
H	3.08684	0.68136	-0.82023
H	0.86441	1.76239	-0.66397
H	-3.24450	-0.67410	1.79419
H	-2.91410	0.79705	0.85199

H	-2.88839	-2.52075	-1.25933
H	-3.73938	-2.40637	0.30232
H	-4.05907	-1.20878	-0.98123
H	0.76210	0.48287	-1.90378
H	2.34757	-0.91755	-0.66253
H	1.81308	-2.31864	3.80844
C	4.80640	-0.83738	1.53365
H	3.12125	-1.04737	2.89644
H	-0.54882	-2.74345	4.34537
H	-2.13004	-3.48009	2.57050
H	1.05348	-3.31507	-0.31495
H	-1.30215	-3.79018	0.24424
B	3.70161	-3.28537	0.28896
F	5.03141	-3.45332	0.70874
F	3.09843	-4.54862	0.21581
F	3.70195	-2.69296	-0.98803
H	4.99424	0.16436	1.92191
H	5.50320	-1.53008	2.01241
H	4.99563	-0.84952	0.45755

### TSa (D+(E)-BF<sub>3</sub>-I<sub>2</sub> (exo))



Electronic Energy = -1315.33218 a.u. ( $\Delta E_e^\ddagger = 14.37 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

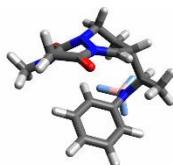
Sum of electronic and thermal free energies = -1315.019807 a.u. ( $\Delta G^\ddagger = 31.55 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 1 at -486.6255

C	1.32593	-3.94535	4.10205
C	1.32831	-3.19127	2.91429
C	0.09514	-2.94218	2.28963
C	-1.09779	-3.39976	2.85084
C	-1.09119	-4.12573	4.03811
C	0.13347	-4.40159	4.65187
N	2.55660	-2.74667	2.36978
B	3.75570	-2.37260	3.30762
F	4.68914	-3.42304	3.35883
C	2.58681	-2.39982	1.05283
F	4.38457	-1.21441	2.80989
F	3.29363	-2.08987	4.59948
C	2.21457	-0.49284	0.71676
C	1.28604	-0.12300	1.68738
N	0.00897	0.19210	1.41475
N	-0.41960	0.32766	0.08960
C	0.65466	0.65845	-0.84378
C	1.79851	-0.35023	-0.73640
C	-0.97899	0.28129	2.42815
C	-2.37057	0.19822	1.85618
N	-2.37306	-0.71570	0.71961
C	-1.50870	-0.46678	-0.30352
O	-0.68049	0.34565	3.59269
O	-1.65151	-0.83739	-1.45983
C	-3.60892	-1.42869	0.42307
H	0.04015	-2.40552	1.35011
C	3.88825	-2.54689	0.29943

H	1.74365	-2.77694	0.47811
H	3.23210	-0.23212	0.99927
H	1.00258	1.66495	-0.59279
H	0.20761	0.66895	-1.83649
H	2.64254	-0.01568	-1.34427
H	1.45972	-1.31177	-1.14334
H	1.52965	-0.09997	2.74731
H	-3.02710	-0.19123	2.63461
H	-2.70650	1.20753	1.57621
H	-3.39033	-2.25601	-0.25212
H	-4.01363	-1.82187	1.35705
H	-4.34894	-0.76799	-0.04333
H	2.26493	-4.18863	4.58574
H	0.16399	-4.98798	5.56559
H	-2.03352	-3.18368	2.34085
H	-2.01923	-4.48464	4.47192
H	3.78198	-2.16978	-0.71948
H	4.72415	-2.04686	0.78577
H	4.10269	-3.62034	0.24244

### Ts<sub>a</sub> (D<sup>+</sup>(Z)-BF<sub>3</sub>-I<sub>2</sub> (endo))



Electronic Energy = -1315.33280 a.u. ( $\Delta E_e^\ddagger = 15.61 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Sum of electronic and thermal free energies = -1315.022539 a.u. ( $\Delta G^\ddagger = 30.54 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 1 at -454.2340

C	4.09152	-1.13760	1.12188
C	2.85663	-0.50506	1.29844
C	1.68306	-1.18048	0.94960
C	1.73665	-2.48764	0.46769
C	2.96941	-3.12326	0.31246
C	4.14523	-2.44271	0.63288
N	2.76943	0.82640	1.80937
B	2.40450	1.94603	0.81327
F	1.19399	1.66700	0.13981
C	2.91498	1.04247	3.15225
H	2.94674	2.11003	3.36447
F	2.28167	3.16635	1.49931
F	3.42023	2.05589	-0.16312
C	1.31075	0.80050	4.13060
C	1.11834	-0.58350	4.24841
N	0.07689	-1.23155	3.71306
N	-1.05290	-0.53412	3.27155
C	-1.13522	0.84569	3.74520
C	0.18336	1.57026	3.47591
C	-1.62706	-0.92333	2.05169
N	-1.44503	-2.24213	1.77236
C	-1.16007	-3.14943	2.87476
C	0.03700	-2.65473	3.64105
O	0.91198	-3.32626	4.12092
C	-2.07647	-2.79217	0.57952
O	-2.25404	-0.13485	1.35809
H	1.81870	-1.23438	4.76464

H	1.74978	1.22659	5.03231
H	0.14005	2.59235	3.85903
H	-1.35281	0.81720	4.81754
H	-0.91702	-4.13595	2.47921
H	-2.01105	-3.23975	3.56640
H	-1.97860	-2.07582	-0.23608
H	-1.56302	-3.71735	0.31171
H	-3.13850	-3.00170	0.75143
H	-1.97225	1.29848	3.21696
H	0.33548	1.62108	2.39195
H	5.00357	-0.60135	1.36850
C	3.95665	0.26609	3.92904
H	5.10819	-2.92736	0.50125
H	3.01457	-4.14087	-0.06385
H	0.73559	-0.65995	1.04775
H	0.81651	-3.00503	0.20910
H	3.87196	0.48091	4.99701
H	3.88781	-0.81256	3.77561
H	4.94579	0.59454	3.59240

### TSa (D+(Z)-BF<sub>3</sub>-I<sub>2</sub> (exo))



Electronic Energy = -1315.33193 a.u. ( $\Delta E_e^\ddagger = 16.16 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Sum of electronic and thermal free energies = -1315.019341 a.u. ( $\Delta G^\ddagger = 32.55 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 1 at -423.9283

C	1.59223	-3.54918	4.16101
C	1.20504	-2.70682	3.09560
C	-0.13666	-2.28522	3.05744
C	-1.04275	-2.68162	4.04402
C	-0.64648	-3.50693	5.08934
C	0.68289	-3.93774	5.13441
N	2.17121	-2.31541	2.15031
B	3.68283	-2.35779	2.55318
F	4.15118	-3.68534	2.59905
C	1.85534	-1.72276	0.94983
F	4.43616	-1.64836	1.60366
F	3.86191	-1.76171	3.81457
C	1.94223	0.17378	1.06294
C	0.84244	0.48967	1.86876
N	-0.31117	0.95101	1.36403
N	-0.36164	1.42228	0.05060
C	0.92979	1.84054	-0.48695
C	1.95429	0.71583	-0.36085
C	-1.51261	1.00588	2.12336
C	-2.70777	1.28070	1.24945
N	-2.52378	0.64373	-0.05071
C	-1.40694	0.97394	-0.76297
O	-1.51112	0.79018	3.30711
O	-1.30215	0.93673	-1.98040
C	-3.72919	0.29406	-0.79258
H	-0.50894	-1.65786	2.26127
H	2.73391	-1.70888	0.31135
C	0.61583	-2.12976	0.16651
H	2.88503	0.19474	1.60216
H	1.24883	2.71921	0.08227
H	0.75462	2.12379	-1.52340
H	2.95111	1.09455	-0.60054
H	1.71757	-0.06697	-1.08812

H	0.82989	0.32296	2.94225
H	-3.58497	0.85758	1.73933
H	-2.83894	2.36934	1.15826
H	-3.45385	-0.31937	-1.64962
H	-4.38691	-0.27713	-0.13556
H	-4.25302	1.19058	-1.14425
H	2.61270	-3.90666	4.21961
H	1.01774	-4.58901	5.93679
H	-2.06896	-2.33124	3.97951
H	-1.35442	-3.81560	5.85208
H	0.86119	-2.15102	-0.89649
H	0.31165	-3.13638	0.46792
H	-0.25058	-1.47499	0.29073

**zwitterionic intermediate endo-ZI<sub>1</sub> (D<sup>+</sup> BF<sub>3</sub>-I<sub>1</sub> (endo))**



Electronic Energy = -1276.054586 a.u. ( $\Delta E_e = -3.84 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Sum of electronic and thermal free energies = -1275.766046 a.u. ( $\Delta G_r = 13.28 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 0

C	2.54716	0.43723	0.98443
C	1.65565	1.58096	0.37440
N	2.12480	-0.88202	0.58056
C	0.81924	-1.24178	0.89911
C	0.37373	1.69824	1.09372
N	-0.78808	1.79765	0.50258
N	-0.92891	1.90006	-0.87894
C	0.28990	2.33640	-1.56538
C	1.46304	1.46792	-1.13500
C	-2.02808	1.80749	1.27164
C	-3.21953	1.49344	0.41124
N	-2.84903	0.62960	-0.69675
C	-1.80180	0.96603	-1.48734
C	0.01254	-1.95016	-0.02151
C	-1.31299	-2.23889	0.27341
C	-1.88733	-1.83568	1.48656
C	-1.09567	-1.17044	2.41702
C	0.24044	-0.87722	2.13293
O	-2.00426	2.02706	2.44527
O	-1.60691	0.56861	-2.62498
C	-3.85802	-0.28403	-1.21463
H	0.34183	1.79866	2.17594
H	2.19041	2.50735	0.63998
H	2.37839	1.77156	-1.64922
H	0.44779	3.38772	-1.30357
H	-3.95016	0.98330	1.04179
H	-3.65324	2.44493	0.06860
H	-3.37717	-1.00256	-1.87752
H	-4.31621	-0.81178	-0.37589
H	-4.63182	0.25751	-1.77038
H	0.08307	2.25725	-2.63093

H	1.25267	0.42895	-1.40493
H	0.84858	-0.39404	2.89188
H	3.55941	0.60275	0.61449
H	2.57009	0.57423	2.07197
H	-1.51041	-0.87228	3.37621
H	-2.92876	-2.05541	1.70244
H	0.43227	-2.24502	-0.97823
H	-1.91524	-2.76751	-0.46114
B	2.94160	-1.67510	-0.43734
F	4.30640	-1.33216	-0.31199
F	2.78732	-3.06113	-0.19841
F	2.56802	-1.43897	-1.79110

**zwitterionic intermediate exo-ZI<sub>1</sub> (D<sup>+</sup> BF<sub>3</sub>-I<sub>1</sub> (exo))**



Electronic Energy = -1276.051314 a.u. ( $\Delta E_e = -1.79 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

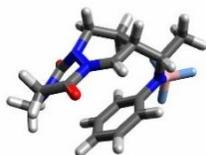
Sum of electronic and thermal free energies = -1275.765156 a.u. ( $\Delta G_r = 13.84 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 0

C	0.78819	-2.18673	2.50044
C	0.79261	-1.76608	1.14648
C	-0.43553	-1.84498	0.44811
C	-1.59391	-2.31388	1.07429
C	-1.57982	-2.72180	2.40326
C	-0.37021	-2.65301	3.10466
N	1.95218	-1.27436	0.56724
B	3.19536	-0.94471	1.40299
F	3.76821	-2.10677	1.97538
C	1.89114	-0.82752	-0.79818
F	4.15998	-0.33061	0.57885
F	2.88591	-0.05396	2.46400
C	1.37161	0.64351	-0.98051
C	0.26657	0.95896	-0.05993
N	-0.81582	1.58734	-0.41697
N	-1.01472	2.09974	-1.69686
C	0.21455	2.25084	-2.48135
C	1.03392	0.96868	-2.43205
C	-1.90435	1.82363	0.54336
C	-3.16219	2.24847	-0.15559
N	-3.25621	1.58536	-1.44800
C	-2.22955	1.73099	-2.32536
O	-1.71861	1.64509	1.70699
O	-2.30181	1.60925	-3.53587
C	-4.59013	1.32020	-1.97740
H	-0.50755	-1.56183	-0.59703
H	2.89046	-0.84056	-1.23257
H	1.26583	-1.48615	-1.40591
H	2.19171	1.28486	-0.61626
H	0.77031	3.08940	-2.05069
H	-0.10080	2.50734	-3.49087
H	1.95387	1.08513	-3.00954
H	0.45578	0.14894	-2.87420

H	0.33241	0.73409	1.00268
H	-4.00731	1.95777	0.46851
H	-3.14807	3.34428	-0.25159
H	-4.50862	0.61966	-2.80768
H	-5.19244	0.87307	-1.18560
H	-5.06713	2.24288	-2.32562
H	1.70655	-2.14901	3.07410
H	-0.32771	-2.96802	4.14402
H	-2.51523	-2.35608	0.49894
H	-2.48183	-3.08613	2.88441

**zwitterionic intermediate endo-*E*-Z12 (D+(*E*)-BF<sub>3</sub>-I<sub>2</sub> (endo))**



Electronic Energy = -1315.348090 a.u. ( $\Delta E_e = 4.39 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Sum of electronic and thermal free energies = -1315.032452 a.u. ( $\Delta G_r = 23.62 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 0

C	2.41452	0.49067	0.96873
C	1.42109	1.55575	0.34981
N	2.04412	-0.86014	0.56462
C	0.71139	-1.18557	0.84959
C	0.12603	1.55638	1.05616
N	-1.03818	1.61892	0.46122
N	-1.16223	1.74327	-0.91626
C	0.03013	2.25354	-1.59550
C	1.26408	1.47313	-1.16615
C	-2.27914	1.64728	1.22905
C	-3.48559	1.44972	0.35561
N	-3.17922	0.63273	-0.80334
C	-2.09959	0.91766	-1.56889
C	-0.16951	-1.62965	-0.16015
C	-1.51141	-1.85302	0.11853
C	-2.02300	-1.64055	1.40536
C	-1.16036	-1.23365	2.41948
C	0.18926	-1.00472	2.14695
O	-2.25063	1.82995	2.40953
O	-1.92480	0.55393	-2.72250
C	-4.23786	-0.21359	-1.33314
H	0.08127	1.63630	2.13930
H	1.85423	2.52627	0.64353
H	2.15226	1.88367	-1.65286
H	0.12143	3.31413	-1.33701
H	-4.24955	0.95543	0.95858
H	-3.85661	2.44640	0.07145
H	-3.81919	-0.86377	-2.10026
H	-4.64410	-0.82092	-0.52054
H	-5.03967	0.39087	-1.77134
H	-0.16725	2.15949	-2.66181
H	1.16440	0.42993	-1.47656
H	0.85393	-0.69786	2.94999

C	3.84329	0.86922	0.59222
H	2.32300	0.60554	2.05685
H	-1.53458	-1.08227	3.42802
H	-3.07684	-1.80640	1.61077
H	0.20761	-1.77033	-1.16872
H	-2.17389	-2.17479	-0.68115
B	2.84707	-1.70166	-0.42960
F	4.19134	-1.85107	-0.00679
F	2.28036	-2.99503	-0.51089
F	2.88414	-1.15962	-1.74609
H	4.02549	1.90780	0.88151
H	4.55642	0.23352	1.11833
H	4.02214	0.76996	-0.48207

**zwitterionic intermediate *exo-E-ZI*<sub>2</sub> (D+(*E*)-BF<sub>3</sub>-I<sub>2</sub> (*exo*))**



Electronic Energy = -1315.348983 a.u. ( $\Delta E_e = 3.83 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Sum of electronic and thermal free energies = -1315.033679 a.u. ( $\Delta G_r = 22.85 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 0

C	0.65788	1.55366	0.63361
C	-0.74348	-1.51968	-0.18049
C	0.17696	-1.22126	0.84838
N	1.54964	-1.42726	0.66043
C	2.43046	-0.26660	0.76238
C	2.89895	0.09708	2.17332
C	-0.33107	-0.67845	2.04638
C	-1.68930	-0.38585	2.18611
C	-2.57469	-0.64019	1.14295
C	-2.09374	-1.23247	-0.03179
C	1.85769	0.97534	-0.00558
C	1.65152	0.71986	-1.49669
C	0.81297	1.83871	-2.09502
N	-0.47948	1.92558	-1.41247
N	-0.39832	1.95258	-0.02557
C	-1.54698	2.52748	0.67404
C	-2.74572	2.65013	-0.22272
N	-2.75862	1.61593	-1.23987
C	-1.65274	1.38097	-1.98219
B	2.04840	-2.62172	-0.13612
F	3.39689	-2.88798	0.21504
O	-1.61953	0.80011	-3.05635
C	-4.05115	1.11784	-1.68712
O	-1.45043	2.84607	1.82084
F	1.26029	-3.75901	0.15477
F	2.02381	-2.43634	-1.55138
H	0.58911	1.67158	-3.14695
H	1.30589	2.80978	-1.97923

H	2.62430	0.66888	-1.99260
H	1.14694	-0.23770	-1.64882
H	2.61776	1.76194	0.14070
H	-0.37651	-1.94927	-1.10824
H	3.33144	-0.52433	0.19577
H	0.63417	1.79479	1.69312
H	-3.63451	2.55766	0.40339
H	-2.73135	3.65971	-0.66099
H	-4.63727	0.82310	-0.81343
H	-4.59380	1.88698	-2.24740
H	-3.89009	0.25250	-2.32866
H	0.34105	-0.50970	2.88057
H	-2.04960	0.04247	3.11721
H	-2.77792	-1.44825	-0.84872
H	-3.63018	-0.40301	1.24403
H	3.70042	0.84118	2.11717
H	2.10898	0.50426	2.80960
H	3.29394	-0.79975	2.65900

**zwitterionic intermediate endo-Z-Zl<sub>2</sub> (D+(Z)-BF<sub>3</sub>-I<sub>2</sub> (endo))**



Electronic Energy = -1315.348887 a.u. ( $\Delta E_e = 5.51 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Sum of electronic and thermal free energies = -1315.034171 a.u. ( $\Delta G_r = 23.24 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 0

C	2.15115	-0.97689	-0.28022
C	1.49935	0.18808	-0.73342
C	0.43899	0.03338	-1.65325
C	0.02036	-1.22989	-2.04917
C	0.64129	-2.38050	-1.54629
C	1.71957	-2.24422	-0.67695
N	1.85931	1.45732	-0.26366
B	1.82230	2.66462	-1.18602
F	0.53327	3.26294	-1.32095
C	1.76345	1.69753	1.17391
H	1.67520	2.78299	1.29028
F	2.68364	3.66964	-0.67535
F	2.25452	2.29692	-2.48110
C	0.41868	1.15340	1.77211
C	0.33887	-0.32303	1.78341
N	-0.73006	-0.99787	1.44992
N	-1.93304	-0.38978	1.11144
C	-2.05482	1.00093	1.55277
C	-0.81982	1.78992	1.14739
C	-2.58911	-0.85162	-0.05198
N	-2.40701	-2.17336	-0.27337
C	-1.94202	-3.03568	0.79640
C	-0.73911	-2.46123	1.48938
O	0.14061	-3.05027	2.04195
C	-3.00939	-2.80398	-1.43886
O	-3.27155	-0.09876	-0.73011
H	1.14089	-0.93572	2.18680
H	0.47310	1.40642	2.84474
H	-0.90358	2.82653	1.48333
H	-2.17787	0.98587	2.64087
H	-1.65079	-4.00322	0.38341
H	-2.71692	-3.20110	1.56012
H	-3.17790	-2.04512	-2.20180

H	-2.32415	-3.56358	-1.82311
H	-3.96490	-3.27289	-1.17965
H	-2.96365	1.38613	1.09435
H	-0.73028	1.79507	0.05784
H	3.01794	-0.88580	0.36561
C	2.97350	1.27169	2.00998
H	2.23404	-3.12437	-0.30136
H	0.29792	-3.36551	-1.84996
H	-0.06910	0.91791	-2.02723
H	-0.81424	-1.32251	-2.73976
H	2.89881	1.70225	3.01405
H	3.07545	0.18920	2.11975
H	3.88497	1.65020	1.53891

**zwitterionic intermediate exo-Z-Zl<sub>2</sub> (D+(Z)-BF<sub>3</sub>-l<sub>2</sub> (exo))**



Electronic Energy = -1315.33840504 a.u. ( $\Delta E_e = 12.09$  kcal.mol<sup>-1</sup>)

Sum of electronic and thermal free energies = -1315.025164 a.u. ( $\Delta G_r = 28.90$  kcal.mol<sup>-1</sup>)

Number of imaginary frequencies: 0

C	0.87243	-2.45040	2.54304
C	0.67236	-1.79555	1.30213
C	-0.65836	-1.72897	0.83113
C	-1.71726	-2.27599	1.55927
C	-1.50014	-2.91113	2.77738
C	-0.18853	-2.98895	3.25769
N	1.75494	-1.23671	0.63329
B	3.05310	-0.91886	1.38606
F	3.80574	-2.08527	1.68897
C	1.69063	-0.89377	-0.77879
F	3.86572	-0.07441	0.59625
F	2.78523	-0.25433	2.60809
C	1.20323	0.59571	-1.00761
C	0.13668	0.99375	-0.07730
N	-0.88681	1.72062	-0.41746
N	-1.03338	2.28745	-1.68081
C	0.20386	2.33372	-2.46681
C	0.88318	0.97006	-2.45191
C	-1.94968	2.03092	0.55433
C	-3.15729	2.60656	-0.12447
N	-3.31692	2.00385	-1.43972
C	-2.28139	2.07482	-2.31523
O	-1.78401	1.78987	1.70910
O	-2.36702	2.00815	-3.52922
C	-4.67094	1.89188	-1.97158
H	-0.89424	-1.25474	-0.11364
H	2.72713	-0.85955	-1.11555
C	1.00281	-1.91869	-1.69277
H	2.05526	1.19878	-0.64753
H	0.84322	3.10126	-2.02010
H	-0.08582	2.64307	-3.46896
H	1.80276	0.99555	-3.04127
H	0.20888	0.23574	-2.90273

H	0.18632	0.74069	0.97974
H	-4.02757	2.37934	0.49142
H	-3.03274	3.69823	-0.17971
H	-4.65872	1.22574	-2.83336
H	-5.31217	1.47007	-1.19656
H	-5.05677	2.87109	-2.27551
H	1.87684	-2.54154	2.94002
H	0.01463	-3.48604	4.20267
H	-2.72297	-2.19671	1.15475
H	-2.32498	-3.33971	3.33773
H	1.43248	-1.84357	-2.69517
H	1.20646	-2.92513	-1.31509
H	-0.07662	-1.80081	-1.79314

### TSb (D+ BF<sub>3</sub>-I<sub>1</sub> (endo))



Electronic Energy = -1276.05146858 a.u. ( $\Delta E_e^\ddagger = -1.88 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Sum of electronic and thermal free energies = -1275.761777 a.u. ( $\Delta G^\ddagger = 15.96 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 1 at -225.4927

N	0.15156	0.34446	0.17423
N	0.08560	0.23225	1.56118
C	1.18530	0.04031	2.31648
C	2.55873	0.15080	1.74003
C	2.57175	0.16908	0.20923
C	1.38200	0.94826	-0.32412
C	-1.21069	0.23685	2.13792
H	1.03012	0.29772	3.35915
H	2.93408	1.10501	2.13682
H	3.51188	0.60989	-0.13481
H	1.39789	1.99306	0.00457
C	-0.64507	-0.50754	-0.59695
N	-1.79192	-0.86047	0.04070
O	-0.32706	-0.83866	-1.73241
O	-1.36734	0.38170	3.32363
C	-2.28883	-0.00942	1.11187
H	-3.11435	-0.51158	1.61823
H	-2.64559	0.96055	0.73508
C	-2.73321	-1.74713	-0.62456
H	-2.17824	-2.44748	-1.24853
H	-3.29056	-2.29892	0.13548
H	-3.43503	-1.18647	-1.25306
H	1.32526	0.91411	-1.41124
H	2.51507	-0.85053	-0.18173
C	1.15624	-2.09255	3.06602
C	3.53438	-0.93185	2.30361
H	1.70968	-1.71271	3.91793
C	-0.20248	-2.44407	3.25382
N	3.18236	-2.23084	1.77075
H	4.54338	-0.67969	1.97726
H	3.51769	-0.89241	3.39850
C	1.88475	-2.59564	1.95005
C	1.18253	-3.39001	0.99564
C	-0.87467	-3.15945	2.29221

H	-0.70704	-2.11637	4.15746
H	-1.92818	-3.39604	2.40649
C	-0.16188	-3.63210	1.15982
H	1.70480	-3.76539	0.12258
H	-0.69037	-4.20276	0.40058
B	4.11663	-2.96755	0.78624
F	5.43780	-2.54695	1.01557
F	4.01660	-4.35622	1.00630
F	3.79461	-2.71539	-0.56837

### TSb (D+ BF<sub>3</sub>-I<sub>1</sub> (exo))



Electronic Energy = -1276.031739 a.u. ( $\Delta E_e^\ddagger = 10.50 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

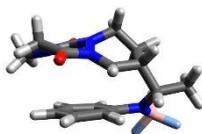
Sum of electronic and thermal free energies = -1275.743684 a.u. ( $\Delta G^\ddagger = 27.32 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 1 at -347.7138

C	0.49603	-2.28560	2.19054
C	1.15429	-0.25210	2.22980
C	1.58612	-2.87865	2.88850
N	2.85841	-2.80394	2.32743
C	3.38868	-1.42684	2.32320
C	2.51446	-0.40380	1.61270
C	2.46123	-0.53982	0.09400
C	1.52274	0.51682	-0.47536
N	0.20450	0.43587	0.15163
N	0.19917	0.41509	1.54674
C	1.33406	-3.45762	4.14705
C	0.05497	-3.44080	4.68387
C	-1.02320	-2.84432	4.00293
C	-0.80337	-2.28766	2.76107
C	-0.91304	-0.08269	-0.51490
N	-2.05848	0.02873	0.21738
C	-2.11108	1.08005	1.22763
C	-0.98270	0.86221	2.20042
O	-1.02723	0.95615	3.39927
C	-3.31493	-0.40088	-0.38236
O	-0.83469	-0.53778	-1.64681
B	3.90595	-3.84255	2.72673
F	3.34337	-5.13506	2.68411
F	4.99089	-3.77417	1.82289
F	4.42974	-3.62772	4.03367
H	1.35952	0.38806	-1.54426
H	1.91739	1.52117	-0.29076
H	3.46644	-0.39254	-0.30963
H	2.12980	-1.54304	-0.19602
H	2.96210	0.57956	1.84871
H	0.58248	-2.18688	1.10894
H	3.55458	-1.08457	3.35747
H	4.35801	-1.44344	1.81969
H	1.07583	-0.11902	3.30660

H	-3.04907	1.00984	1.77807
H	-2.02599	2.08331	0.78619
H	-4.02442	-0.62075	0.41740
H	-3.73026	0.37461	-1.03639
H	-3.13798	-1.30403	-0.96569
H	2.15146	-3.90529	4.70170
H	-0.11195	-3.88410	5.66183
H	-1.62881	-1.85839	2.19591
H	-2.01328	-2.83814	4.44636

### TSb (D+(E)-BF<sub>3</sub>-I<sub>2</sub> (endo))



Electronic Energy = -1315.344462 a.u. ( $\Delta E_e^\ddagger = 6.66 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

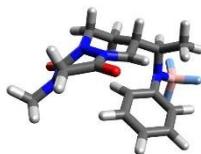
Sum of electronic and thermal free energies = -1315.028397 a.u. ( $\Delta G^\ddagger = 26.16 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 1 at -225.4370

C	0.12375	1.23130	1.23303
C	0.03784	-0.82026	2.09757
C	0.73490	-1.32601	0.96253
N	2.06777	-1.06599	0.81173
C	2.47351	0.24942	1.30852
C	3.92180	0.61295	1.00209
C	1.50783	1.31794	0.67291
C	1.55769	1.29747	-0.85899
C	0.35495	2.01261	-1.44991
N	-0.86333	1.40420	-0.93219
N	-0.96747	1.39860	0.45320
C	-2.25795	1.55251	1.01468
C	-3.35400	1.38359	-0.00617
N	-2.95129	0.46327	-1.05830
C	-1.77384	0.69131	-1.70205
C	-0.03826	-1.96768	-0.05151
C	-1.39809	-2.10468	0.09995
C	-2.06871	-1.67417	1.27456
C	-1.34209	-1.08347	2.27826
O	-2.40717	1.76877	2.19166
O	-1.51283	0.34669	-2.84961
C	-4.00275	-0.26674	-1.74880
B	2.96957	-1.97132	-0.06783
F	3.11415	-1.48032	-1.38610
F	4.24955	-2.08602	0.50684
F	2.40623	-3.26133	-0.12811
H	-0.03707	1.56335	2.25376
H	1.87061	2.28398	1.05094
H	2.48067	1.77696	-1.19593
H	0.34400	3.07581	-1.18272
H	-4.22532	0.98069	0.51266
H	-3.61425	2.37528	-0.40677
H	-4.62960	0.40599	-2.34635
H	-3.54824	-1.00636	-2.40730

H	-4.62323	-0.77406	-1.00639
H	0.31655	1.91285	-2.53378
H	1.56201	0.26620	-1.22125
H	0.61212	-0.49457	2.95812
H	2.34393	0.31960	2.39482
H	-1.81846	-0.76515	3.20020
H	-3.13812	-1.83348	1.37586
H	0.44792	-2.30617	-0.95915
H	-1.97442	-2.55266	-0.70580
H	4.60585	-0.00409	1.58465
H	4.16270	0.49184	-0.05716
H	4.08284	1.65923	1.27668

### TSb (D+(E)-BF<sub>3</sub>-I<sub>2</sub> (exo))



Electronic Energy = -1315.328759 a.u. ( $\Delta E_e^\ddagger = 16.52 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

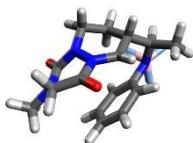
Sum of electronic and thermal free energies = -1315.015493 a.u. ( $\Delta G^\ddagger = 34.26 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 1 at -349.4588

C	0.26056	1.06278	0.26813
C	-0.67200	-0.87441	0.26463
C	0.33490	-1.62080	0.93798
N	1.60672	-1.69187	0.37688
C	2.34027	-0.40491	0.39126
C	2.73184	0.02045	1.81246
C	0.00646	-2.22121	2.16818
C	-1.25958	-2.05928	2.71224
C	-2.24651	-1.29140	2.06544
C	-1.95691	-0.71883	0.84447
C	1.58924	0.71436	-0.33942
C	1.51274	0.55048	-1.85396
C	0.73421	1.71690	-2.44862
N	-0.58370	1.83693	-1.82597
N	-0.59913	1.83089	-0.43096
C	-1.70819	2.44971	0.21383
C	-2.78191	2.83584	-0.76760
N	-2.88414	1.78692	-1.77560
C	-1.76423	1.49761	-2.49811
B	2.44399	-2.95152	0.58298
F	2.96700	-3.10715	1.89966
O	-1.75041	1.03573	-3.62994
C	-4.18708	1.56585	-2.38972
O	-1.74655	2.55030	1.41219
F	1.64952	-4.08848	0.30750
F	3.54624	-2.92074	-0.30215
H	0.55579	1.59047	-3.51519
H	1.26771	2.65861	-2.28283
H	2.52813	0.54561	-2.25925
H	1.04284	-0.40281	-2.12095
H	2.15910	1.63925	-0.13509
H	-0.57765	-0.76419	-0.81522
H	3.25465	-0.57224	-0.18512

H	0.18352	1.22421	1.34044
H	-3.72329	2.91254	-0.22398
H	-2.53947	3.81308	-1.20980
H	-4.93118	1.47132	-1.59695
H	-4.46161	2.39628	-3.05038
H	-4.15623	0.64277	-2.96747
H	0.76283	-2.79208	2.69653
H	-1.48548	-2.51948	3.67040
H	-2.72061	-0.16630	0.30029
H	-3.22576	-1.17003	2.51633
H	3.32004	0.94326	1.78961
H	1.85054	0.19104	2.44156
H	3.32973	-0.76251	2.28375

### TSb (D+(Z)-BF<sub>3</sub>-I<sub>2</sub> (endo))



Electronic Energy = -1315.344040 a.u. ( $\Delta E_e^\ddagger = 8.56 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Sum of electronic and thermal free energies = -1315.029071 a.u. ( $\Delta G^\ddagger = 26.44 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 1 at -253.3831

C	0.05080	1.16162	1.29563
C	-0.10693	-0.95083	1.97724
C	0.69443	-1.42733	0.90003
N	2.01872	-1.12612	0.84375
B	3.00001	-1.91742	-0.04522
F	2.92843	-1.54307	-1.40783
C	1.44029	1.25918	0.74643
C	1.48062	1.27311	-0.78410
C	0.33402	2.09680	-1.34149
N	-0.92885	1.54649	-0.86523
N	-1.02470	1.42813	0.51962
C	-2.32421	1.50944	1.07520
C	-3.40271	1.36667	0.03035
N	-2.96013	0.50182	-1.05284
C	-1.77855	0.77909	-1.66459
C	2.42970	0.19684	1.31774
C	0.03626	-2.12336	-0.15990
C	-1.32674	-2.29868	-0.12589
C	-2.11185	-1.86340	0.97543
C	-1.49272	-1.24935	2.03423
O	-2.49245	1.63497	2.26259
O	-1.47235	0.45313	-2.80536
C	-3.97127	-0.25543	-1.77316
C	2.70753	0.36049	2.81607
F	4.31044	-1.67282	0.41012
F	2.72042	-3.29417	0.05300
H	-0.11841	1.41964	2.33585
H	1.80087	2.22408	1.13566
H	2.44193	1.68200	-1.10810
H	0.38949	3.14108	-1.01432
H	-4.27176	0.92026	0.51603
H	-3.67767	2.36896	-0.33142
H	-3.47839	-0.97783	-2.42342
H	-4.59547	-0.78447	-1.04960

H	-4.60211	0.40201	-2.38312
H	0.29776	2.06263	-2.42941
H	1.40064	0.25476	-1.17533
H	0.38793	-0.67319	2.89802
H	3.37693	0.40024	0.81041
H	-2.05405	-0.95824	2.91626
H	-3.18030	-2.05580	0.98558
H	0.61086	-2.46545	-1.01373
H	-1.81648	-2.78502	-0.96559
H	1.81615	0.50597	3.43044
H	3.24424	-0.51681	3.18781
H	3.34578	1.23772	2.95991

TSb (D+(Z)-BF<sub>3</sub>-I<sub>2</sub> (exo))



Electronic Energy = -1315.326535 a.u. ( $\Delta E_e^\ddagger = 19.54 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

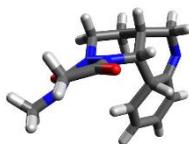
Sum of electronic and thermal free energies = -1315.011649 a.u. ( $\Delta G^\ddagger = 37.38 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 1 at -376.6175

C	0.25633	0.95858	0.26349
C	-0.64993	-0.91499	0.15346
C	0.37550	-1.61000	0.85162
N	1.63132	-1.74369	0.24386
C	2.36875	-0.45626	0.33541
H	2.46099	-0.17940	1.40068
C	0.11696	-2.03771	2.16550
C	-1.12733	-1.82658	2.74158
C	-2.15971	-1.17167	2.04235
C	-1.92556	-0.73227	0.75867
C	1.60578	0.68943	-0.34614
C	1.55555	0.63567	-1.87212
C	0.75233	1.81775	-2.39865
N	-0.57281	1.86663	-1.78834
N	-0.59368	1.78950	-0.39533
C	-1.70817	2.36430	0.26592
C	-2.78921	2.76473	-0.70509
N	-2.86585	1.75185	-1.75276
C	-1.73607	1.51883	-2.48192
B	2.40977	-3.02126	0.58898
F	3.14335	-2.90862	1.80450
O	-1.70583	1.10057	-3.63080
C	-4.16056	1.52039	-2.37918
O	-1.75829	2.41913	1.46819
F	1.49938	-4.09579	0.71984
F	3.32418	-3.34721	-0.43655
H	0.59220	1.75555	-3.47403
H	1.26077	2.75957	-2.16628
H	2.57047	0.69673	-2.27137
H	1.11765	-0.30949	-2.21252
H	2.14788	1.60862	-0.05736
H	-0.57787	-0.86999	-0.93282
C	3.77854	-0.55698	-0.23852

H	0.19299	1.07570	1.34368
H	-3.73288	2.79865	-0.16112
H	-2.57015	3.76318	-1.11015
H	-4.90545	1.37681	-1.59443
H	-4.45473	2.36678	-3.01060
H	-4.10330	0.62028	-2.99041
H	0.90129	-2.53714	2.72438
H	-1.30435	-2.16367	3.75931
H	-2.71348	-0.24162	0.19025
H	-3.12603	-1.02118	2.51191
H	4.23603	0.43726	-0.24662
H	4.39853	-1.21265	0.37464
H	3.76762	-0.95009	-1.25764

**endo-C<sub>1</sub> (D+l<sub>1</sub> (endo))**



Electronic Energy = -951.543891 a.u. ( $\Delta E_e = -12.85 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Sum of electronic and thermal free energies = -951.262530 a.u. ( $\Delta G_r = 5.57 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 0

C	3.30450	0.37150	1.05573
C	2.11078	1.04621	0.38233
N	3.28040	-1.08253	0.94791
C	2.13747	-1.66129	0.97801
C	0.83749	0.57785	1.09225
N	-0.34346	1.09032	0.39954
N	-0.38165	0.84594	-0.97632
C	0.77236	1.37528	-1.70674
C	2.04561	0.77905	-1.12424
C	-1.42559	1.57646	1.06241
C	-2.63647	1.77940	0.17899
N	-2.68826	0.72604	-0.83040
C	-1.57798	0.57992	-1.61945
C	2.08882	-3.11318	0.76260
C	0.93148	-3.73402	0.46130
C	-0.32385	-2.99352	0.36967
C	-0.37980	-1.69764	0.71343
C	0.81035	-0.97628	1.28769
O	-1.43418	1.78026	2.27105
O	-1.60533	0.22520	-2.79560
C	-3.98404	0.49063	-1.45171
H	0.80330	1.04683	2.07587
H	2.19278	2.12914	0.53785
H	2.91737	1.22407	-1.61509
H	0.77884	2.47043	-1.61720
H	-3.52076	1.70906	0.81258
H	-2.60834	2.78132	-0.27470
H	-4.72648	0.35814	-0.66236
H	-4.28235	1.33166	-2.09026
H	-3.93626	-0.41476	-2.05590
H	0.63644	1.09840	-2.75158
H	2.05551	-0.29745	-1.33182
H	0.71507	-1.12590	2.37926
H	4.23734	0.72920	0.60945

H	3.33114	0.64990	2.11979
H	-1.32587	-1.16374	0.66929
H	-1.21340	-3.51109	0.02336
H	3.03749	-3.64291	0.76703
H	0.92533	-4.79892	0.24551

**exo-C<sub>1</sub> (D+l<sub>1</sub> (exo))**



Electronic Energy = -951.544619 a.u. ( $\Delta E_e = -13.31 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

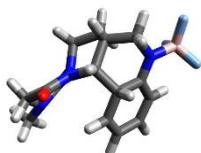
Sum of electronic and thermal free energies = -951.263504 a.u. ( $\Delta G_r = 4.96 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 0

C	0.76467	-1.31507	0.58064
C	1.94050	-1.75866	1.43304
N	3.13740	-1.36194	1.18512
C	3.32663	-0.57121	-0.02619
C	2.24188	0.49363	-0.35447
C	0.96694	0.22228	0.45691
H	0.87888	-1.74429	-0.42945
H	4.30620	-0.09086	0.02781
H	3.37351	-1.28392	-0.86302
H	2.60821	1.48432	-0.06379
C	1.97555	0.49527	-1.86690
C	0.76002	1.33109	-2.23099
H	0.91384	2.39176	-1.98961
H	0.50684	1.23187	-3.28624
H	2.86184	0.87078	-2.38900
H	1.79844	-0.53046	-2.21328
N	-0.38132	0.83012	-1.46434
N	-0.19077	0.92599	-0.08374
C	-1.13161	1.48763	0.72213
O	-0.98889	1.61475	1.93254
C	-2.39925	1.88097	-0.00246
C	-1.65336	0.77159	-2.00523
N	-2.66181	0.95100	-1.09593
C	-0.58213	-1.71397	1.10255
C	-0.73264	-2.46494	2.20366
C	0.42899	-2.91914	2.96856
C	1.68519	-2.58894	2.61063
C	-4.02915	0.91753	-1.59490
O	-1.82767	0.55815	-3.20274
H	1.07755	0.62015	1.46719
H	-3.21649	1.82180	0.71752
H	-2.32168	2.91952	-0.35709
H	-4.30189	1.86093	-2.08501

H	-4.13259	0.10321	-2.31120
H	-4.70069	0.74456	-0.75158
H	2.54892	-2.90646	3.18825
H	0.25766	-3.52840	3.85182
H	-1.44984	-1.38681	0.53222
H	-1.72233	-2.75152	2.54647

**endo-BF<sub>3</sub>-C<sub>1</sub> (D+ BF<sub>3</sub>-I<sub>1</sub> (endo))**



Electronic Energy = -1276.080797 a.u. ( $\Delta E_e = -20.29 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Sum of electronic and thermal free energies = -1275.790122 a.u. ( $\Delta G_r = -1.82 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 0

N	-1.06804	1.23558	-0.89775
N	-1.14290	1.48063	0.47509
C	0.00419	1.03435	1.25010
C	1.32835	1.48936	0.61949
C	1.34252	1.41503	-0.91675
C	0.05290	1.94520	-1.52269
C	-2.26544	1.98429	1.05487
H	-0.10898	1.51479	2.22149
H	1.49833	2.52702	0.92450
H	2.19600	1.98988	-1.28966
H	-0.06565	3.02244	-1.34398
C	-2.22276	0.95370	-1.62070
N	-3.38321	1.08415	-0.91029
O	-2.15976	0.60049	-2.79405
O	-2.34808	2.22610	2.25289
C	-3.42206	2.14255	0.09457
H	-4.34215	2.05147	0.67267
H	-3.39395	3.14236	-0.36317
C	-4.63237	0.80453	-1.60510
H	-4.51536	-0.09581	-2.20757
H	-5.41366	0.64168	-0.86030
H	-4.92342	1.63697	-2.25781
H	0.00740	1.74534	-2.59301
H	1.46627	0.38158	-1.25678
C	0.00141	-0.52012	1.50384
C	2.44293	0.63076	1.22303
H	0.30765	-0.61006	2.56342
C	-1.35627	-1.13158	1.42563
N	2.29506	-0.76044	0.77164
H	3.42159	0.98581	0.90494
H	2.40002	0.66425	2.32042
C	1.09281	-1.27255	0.79142
C	0.79407	-2.55077	0.18868

C	-1.57461	-2.31636	0.83318
H	-2.16603	-0.59124	1.90932
H	-2.56586	-2.75652	0.80911
C	-0.47566	-3.02482	0.20484
H	1.58107	-3.09666	-0.31530
H	-0.68619	-3.97203	-0.28405
B	3.55034	-1.54371	0.20178
F	4.69159	-0.79226	0.47244
F	3.63147	-2.78686	0.83750
F	3.39568	-1.71819	-1.17793

**exo-BF<sub>3</sub>-C<sub>1</sub> (D+ BF<sub>3</sub>-I<sub>1</sub> (exo))**



Electronic Energy = -1276.081868 a.u. ( $\Delta E_e = -20.96 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

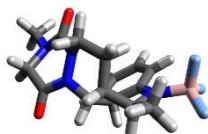
Sum of electronic and thermal free energies = -1275.789723 a.u. ( $\Delta G_r = -1.57 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 0

C	-0.32825	-0.52030	0.51743
C	0.07126	0.95454	0.36207
C	0.78346	-1.38599	1.04575
N	2.03809	-1.05354	0.94063
C	2.47485	0.28513	0.48910
C	1.44204	1.06503	-0.30731
C	1.37605	0.63513	-1.77775
C	0.26911	1.39128	-2.50226
N	-0.99401	1.23546	-1.77166
N	-0.92644	1.65502	-0.43956
C	0.38875	-2.65721	1.63301
C	-0.88964	-2.84763	2.03458
C	-1.92410	-1.83999	1.87740
C	-1.65551	-0.72622	1.18076
C	-2.20891	1.22735	-2.44099
N	-3.24575	1.78255	-1.74049
C	-2.92466	2.91534	-0.87645
C	-1.82330	2.53208	0.08604
O	-1.77251	2.92293	1.24548
C	-4.54448	1.82705	-2.39914
O	-2.31136	0.73922	-3.56269
B	3.20531	-2.02470	1.43836
F	3.15478	-3.20577	0.69281
F	4.42134	-1.37815	1.23821
F	3.02286	-2.29367	2.79697
H	0.10435	0.99950	-3.50530
H	0.51398	2.46067	-2.56354
H	2.33398	0.85332	-2.25966
H	1.20698	-0.44546	-1.86509
H	1.73966	2.11989	-0.27223
H	-0.47748	-0.92132	-0.50739
H	2.76622	0.83593	1.39045
H	3.37363	0.14664	-0.11383

H	0.07988	1.44480	1.33806
H	-3.80369	3.17096	-0.28387
H	-2.62346	3.80024	-1.45623
H	-5.30849	2.01377	-1.64226
H	-4.58271	2.62071	-3.15600
H	-4.73952	0.86876	-2.87938
H	1.13778	-3.41543	1.81753
H	-1.14909	-3.78350	2.52187
H	-2.41999	0.02652	1.00452
H	-2.90198	-2.01160	2.31414

**endo-*E*-BF<sub>3</sub>-C<sub>2</sub> (D+(*E*)-BF<sub>3</sub>-I<sub>2</sub> (endo))**



Electronic Energy = -1315.370755 a.u. ( $\Delta E_e = -9.83 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Sum of electronic and thermal free energies = -1315.052194 a.u. ( $\Delta G_r = 11.23 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 0

C	-0.08607	1.00854	1.17161
C	-0.15373	-0.53923	1.42944
C	0.90369	-1.32771	0.70060
N	2.14434	-0.90350	0.74568
C	2.35388	0.51336	1.16809
C	3.73217	1.06223	0.79890
C	1.25099	1.38129	0.52494
C	1.25325	1.27404	-1.01066
C	-0.01522	1.85434	-1.61685
N	-1.16704	1.22319	-0.96737
N	-1.21629	1.50084	0.39999
C	-2.32018	2.04008	0.98386
C	-3.48005	2.22166	0.03134
N	-3.48450	1.14678	-0.95620
C	-2.33567	0.96316	-1.67389
C	0.50866	-2.52075	-0.01423
C	-0.78835	-2.91505	-0.02039
C	-1.83314	-2.21461	0.69936
C	-1.53972	-1.08249	1.35762
O	-2.38485	2.29548	2.18014
O	-2.29547	0.58049	-2.83931
C	-4.74936	0.89021	-1.63078
B	3.38835	-1.84149	0.39968
F	3.76441	-1.64011	-0.93142
F	4.43210	-1.52240	1.26813
F	3.04389	-3.17893	0.61086
H	-0.16507	1.50392	2.13912
H	1.45942	2.42066	0.79926
H	2.12289	1.80700	-1.40650
H	-0.07356	2.94042	-1.46342
H	-4.39677	2.16935	0.61920
H	-3.42395	3.21269	-0.44242
H	-5.02327	1.71652	-2.29854
H	-4.66670	-0.02618	-2.21441

H	-5.52645	0.76714	-0.87389
H	-0.08080	1.63278	-2.68181
H	1.33134	0.23059	-1.33389
H	0.15919	-0.64466	2.48399
H	2.22758	0.55671	2.26019
H	-2.31068	-0.52446	1.88335
H	-2.84592	-2.60216	0.67019
H	1.24255	-3.05391	-0.60213
H	-1.06393	-3.78504	-0.60991
H	4.51010	0.70558	1.47018
H	4.00738	0.80286	-0.22686
H	3.68951	2.15220	0.87236

**exo-E-BF<sub>3</sub>-C<sub>2</sub> (D+(E)-BF<sub>3</sub>-I<sub>2</sub> (exo))**



Electronic Energy = -1315.381265 a.u. ( $\Delta E_e = -16.43 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Sum of electronic and thermal free energies = -1315.062437 a.u. ( $\Delta G_r = 4.80 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 0

C	0.12495	0.96488	0.43736
C	-0.46778	-0.43796	0.61937
C	0.52047	-1.47131	1.09004
N	1.80732	-1.32899	0.93784
C	2.42624	-0.02680	0.57430
C	2.92879	0.63724	1.85732
C	-0.04680	-2.68747	1.64889
C	-1.33130	-2.70011	2.07757
C	-2.20983	-1.54839	1.97983
C	-1.79312	-0.46102	1.31381
C	1.49579	0.87101	-0.23649
C	1.35989	0.41772	-1.69467
C	0.36418	1.30244	-2.43494
N	-0.90604	1.33610	-1.70097
N	-0.77518	1.77371	-0.37912
C	-1.55948	2.75813	0.13586
C	-2.61031	3.26257	-0.82529
N	-3.06824	2.17516	-1.68469
C	-2.11168	1.47916	-2.37255
B	2.81896	-2.51703	1.28124
F	2.71811	-2.82048	2.64195
O	-2.27619	0.99071	-3.48693
C	-4.35013	2.37949	-2.34596
O	-1.45651	3.15672	1.28932
F	2.47907	-3.62911	0.50475
F	4.11096	-2.09957	0.97544
H	0.14453	0.91558	-3.42930
H	0.75291	2.32663	-2.51945
H	2.33567	0.48984	-2.18476
H	1.04103	-0.63070	-1.75342
H	1.93465	1.87637	-0.23146
H	-0.70090	-0.81310	-0.40076
H	3.28522	-0.27011	-0.05461
H	0.19396	1.47495	1.39958

H	-3.45034	3.62099	-0.22926
H	-2.20997	4.10537	-1.40782
H	-5.08617	2.66155	-1.59069
H	-4.28883	3.17112	-3.10344
H	-4.66135	1.45230	-2.82603
H	0.58576	-3.55170	1.80002
H	-1.71413	-3.60315	2.54497
H	-2.43607	0.40653	1.18625
H	-3.19185	-1.59116	2.43822
H	3.48114	1.54685	1.60583
H	2.09469	0.90021	2.51566
H	3.59812	-0.03194	2.40388

**endo-Z-C<sub>2</sub> (D+(Z)-BF<sub>3</sub>-I<sub>2</sub> (endo))**



Electronic Energy = -1315.379352 a.u. ( $\Delta E_e = -13.60$  kcal.mol<sup>-1</sup>)

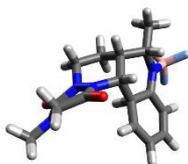
Sum of electronic and thermal free energies = -1315.060848 a.u. ( $\Delta G_r = 6.50$  kcal.mol<sup>-1</sup>)

Number of imaginary frequencies: 0

C	-0.12083	0.83969	1.07555
C	-0.17807	-0.72745	1.10110
C	1.06157	-1.43429	0.60328
N	2.24153	-0.88496	0.70909
B	3.58172	-1.68059	0.40260
F	3.62823	-1.98845	-0.96195
C	1.19409	1.32909	0.46432
C	1.17777	1.24062	-1.06783
C	-0.07240	1.89349	-1.63752
N	-1.24719	1.28350	-1.00490
N	-1.25363	1.43699	0.38409
C	-2.30094	2.00649	1.04020
C	-3.46889	2.33932	0.13905
N	-3.56466	1.36044	-0.93947
C	-2.44496	1.17191	-1.70169
C	2.35811	0.54555	1.07027
C	0.90820	-2.77196	0.06904
C	-0.32422	-3.27013	-0.19264
C	-1.54161	-2.53272	0.07188
C	-1.47294	-1.32298	0.64956
O	-2.31766	2.18074	2.25219
O	-2.45458	0.90494	-2.89938
C	-4.85510	1.26786	-1.60843
C	2.50632	0.70450	2.58328
F	4.66019	-0.86915	0.74953
F	3.60156	-2.85226	1.16648
H	-0.20102	1.20312	2.09939
H	1.32083	2.37926	0.75356
H	2.06911	1.73409	-1.46786
H	-0.08020	2.97383	-1.43815
H	-4.37371	2.29079	0.74542
H	-3.36173	3.36381	-0.24669
H	-4.85334	0.41132	-2.28157
H	-5.62822	1.13029	-0.85009

H	-5.07320	2.17518	-2.18575
H	-0.16018	1.72020	-2.70966
H	1.19880	0.19637	-1.40147
H	-0.13802	-0.99171	2.17729
H	3.27525	0.89778	0.59316
H	-2.37693	-0.76588	0.87902
H	-2.49610	-2.97003	-0.20085
H	1.79123	-3.33999	-0.19163
H	-0.40410	-4.25621	-0.64172
H	1.65996	0.27483	3.12809
H	3.41641	0.20320	2.92253
H	2.57856	1.76671	2.83526

**exo-Z-BF<sub>3</sub>-C<sub>2</sub> (D+(Z)-BF<sub>3</sub>-I<sub>2</sub> (exo))**



Electronic Energy = -1315.367511 a.u. ( $\Delta E_e = -6.17 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Sum of electronic and thermal free energies = -1315.049230 a.u. ( $\Delta G_r = 13.80 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Number of imaginary frequencies: 0

C	0.12891	1.05426	0.51642
C	-0.47449	-0.32918	0.79997
C	0.49904	-1.42281	1.18260
N	1.77105	-1.34451	0.86887
C	2.36126	0.03567	0.73300
H	2.30770	0.44715	1.74886
C	-0.08730	-2.57619	1.83166
C	-1.33606	-2.50601	2.36236
C	-2.17829	-1.33390	2.27754
C	-1.75134	-0.27657	1.56821
C	1.49132	0.91505	-0.16248
C	1.34628	0.40049	-1.59888
C	0.34274	1.25506	-2.36490
N	-0.92309	1.31685	-1.62380
N	-0.78372	1.81893	-0.32619
C	-1.54321	2.84682	0.13793
C	-2.59997	3.30909	-0.83801
N	-3.07500	2.18375	-1.63741
C	-2.13156	1.44297	-2.29557
B	2.74397	-2.60158	0.72508
F	3.60958	-2.62961	1.82307
O	-2.30890	0.90239	-3.38326
C	-4.35976	2.36810	-2.29909
O	-1.41822	3.31182	1.26416
F	2.02228	-3.79278	0.64558
F	3.45334	-2.45342	-0.46914
H	0.11650	0.82650	-3.34055
H	0.72855	2.27546	-2.49527
H	2.31012	0.44422	-2.11374
H	1.01750	-0.64647	-1.60525
H	1.94744	1.91257	-0.18939
H	-0.78701	-0.73221	-0.19096
C	3.82739	0.08773	0.32066

H	0.22890	1.61886	1.44521
H	-3.43140	3.70460	-0.25333
H	-2.19900	4.11818	-1.46609
H	-5.08752	2.69380	-1.55345
H	-4.29640	3.12244	-3.09348
H	-4.68345	1.42210	-2.73157
H	0.52066	-3.44769	2.02103
H	-1.69940	-3.36098	2.92633
H	-2.35158	0.62553	1.47775
H	-3.12692	-1.32079	2.80292
H	4.15239	1.12239	0.46446
H	4.45102	-0.54957	0.94939
H	3.98539	-0.18372	-0.72303

## P<sub>2</sub>-cis



Electronic Energy = -990.897332 a.u.

Sum of electronic and thermal free energies = -990.587955 a.u.

Number of imaginary frequencies: 0

N	-0.30539	-0.34314	0.37290
N	-0.09771	0.26263	1.61547
C	1.05533	-0.24394	2.35973
C	2.32192	-0.15951	1.49310
C	2.08311	-0.80290	0.12373
C	0.83945	-0.21745	-0.53375
C	-0.99305	1.13319	2.14579
H	1.15917	0.44015	3.20635
H	2.55439	0.90339	1.34983
H	2.93957	-0.62538	-0.53345
H	0.99170	0.84565	-0.76809
C	-1.58681	-0.52202	-0.11821
N	-2.57266	0.04405	0.64717
O	-1.79134	-1.15613	-1.15064
O	-0.83075	1.68842	3.22747
C	-2.24413	1.30082	1.31293
H	-3.05493	1.56580	1.99234
H	-2.10894	2.12212	0.59355
C	-3.94278	-0.08665	0.17135
H	-4.61827	0.13147	1.00083
H	-4.14925	0.60727	-0.65360
H	-4.11090	-1.10665	-0.17270
H	0.57954	-0.75399	-1.44562
H	1.96019	-1.88707	0.23060
C	0.81728	-1.65861	2.87200
C	3.47446	-0.79276	2.28208
C	-0.45041	-2.07691	3.28280
N	3.16322	-2.20026	2.51580
C	4.81834	-0.68514	1.57782
H	3.54048	-0.25530	3.24307
C	1.90334	-2.55172	2.97809
H	3.92431	-2.74230	2.90988
C	1.68341	-3.83613	3.50904
C	-0.66671	-3.35030	3.80435
H	-1.28783	-1.38837	3.18771
H	-1.66071	-3.65299	4.11744

C	0.41543	-4.22780	3.91821
H	2.52480	-4.52062	3.58736
H	0.27092	-5.22430	4.32619
H	5.61281	-1.08900	2.21376
H	4.81719	-1.24557	0.63812
H	5.05247	0.36198	1.36391

## P<sub>2</sub>-trans



Electronic Energy = -990.896853 a.u.

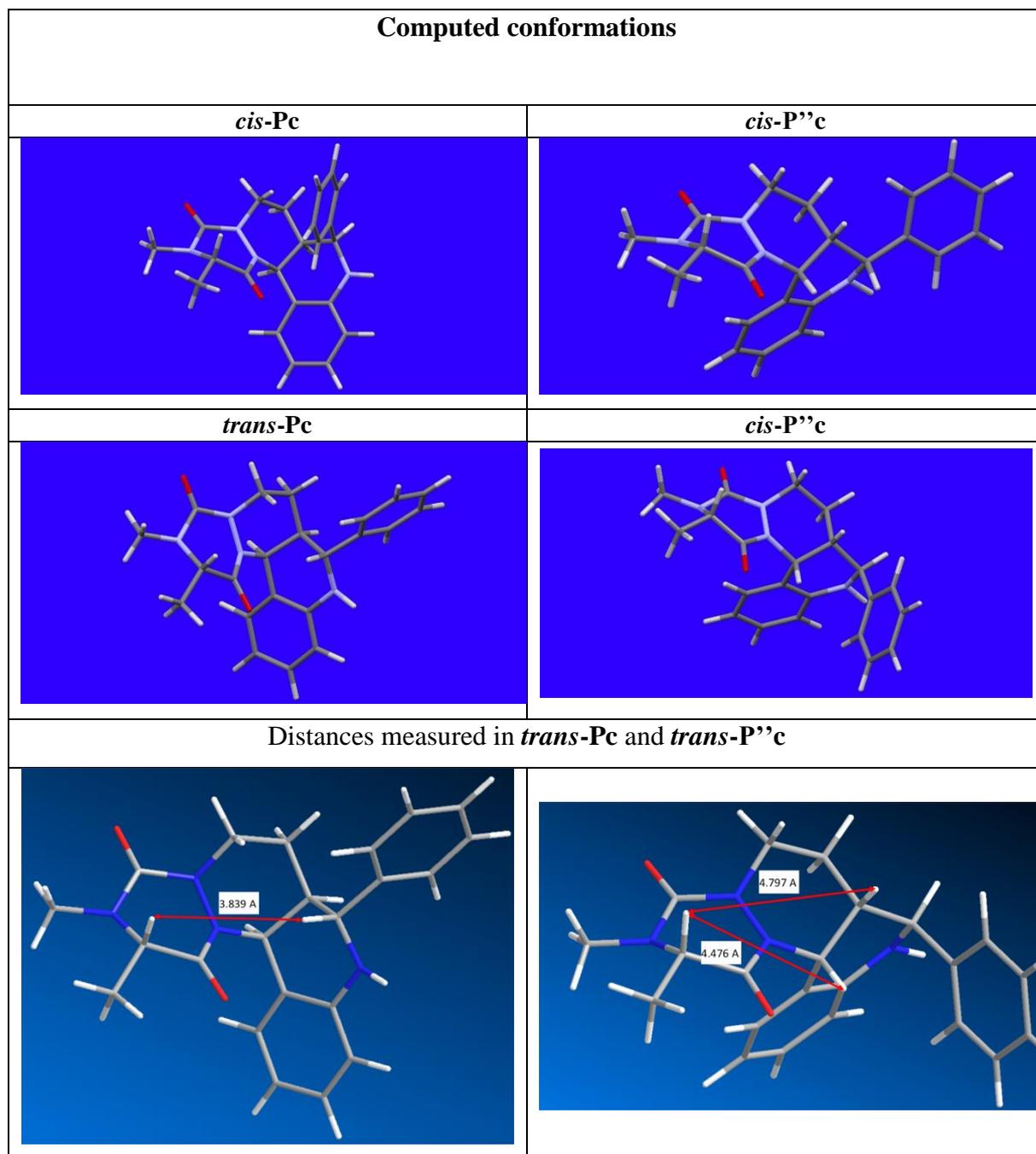
Sum of electronic and thermal free energies = -990.587664 a.u.

Number of imaginary frequencies: 0

N	-0.29822	-0.33442	0.37200
N	-0.11236	0.26198	1.62281
C	1.03258	-0.23942	2.38446
C	2.30922	-0.14405	1.53460
C	2.08964	-0.78552	0.16195
C	0.85961	-0.19829	-0.51716
C	-1.02034	1.12534	2.14395
H	1.10922	0.44483	3.23382
H	2.53802	0.91960	1.39410
H	2.96762	-0.61272	-0.46922
H	1.01204	0.86676	-0.74215
C	-1.57097	-0.51836	-0.13896
N	-2.57149	0.03548	0.61646
O	-1.75597	-1.14555	-1.17927
O	-0.87760	1.67622	3.23064
C	-2.25977	1.29045	1.29340
H	-3.08188	1.54765	1.96210
H	-2.11845	2.11619	0.58027
C	-3.93378	-0.09987	0.11983
H	-4.62256	0.10566	0.94154
H	-4.13320	0.60060	-0.70133
H	-4.08963	-1.11756	-0.23653
H	0.61541	-0.73001	-1.43619
H	1.95930	-1.86867	0.26758
C	0.80232	-1.65699	2.88675
C	3.47414	-0.78773	2.29598
C	-0.46450	-2.08363	3.29285
N	3.15335	-2.19336	2.53231
H	4.34994	-0.76841	1.63744
C	3.81749	-0.04848	3.59105
C	1.89457	-2.54411	2.99346
H	3.91321	-2.74844	2.90823
C	1.67759	-3.83118	3.52253
C	-0.67660	-3.35887	3.81039
H	-1.30450	-1.39825	3.19667
H	-1.66990	-3.66773	4.11954
C	0.41082	-4.23037	3.92605

H	2.52212	-4.51162	3.60280
H	0.27070	-5.22860	4.33143
H	4.71294	-0.48365	4.04555
H	4.01417	1.01035	3.39121
H	3.00294	-0.11964	4.31975

## 1.5. Computed conformations for compounds P

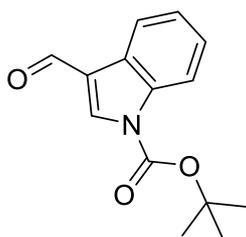


## 2.1.2. Synthèses et évaluations d'aza-analogues de DCPs bioactives

### 2.1.2.1 Chemical syntheses

Cette partie n'ayant pu être menée à bien, seules les analyses RMN <sup>1</sup>H ont été réalisées.

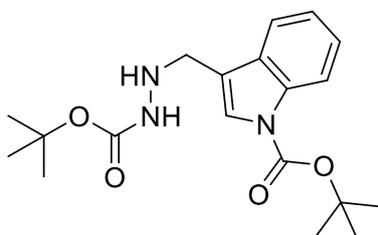
#### **tert-butyl 3-formyl-1H-indole-1-carboxylate (8)**



3-indole aldehyde (1 eq., 500 mg, 3.44 mmol) and Boc<sub>2</sub>O (1.1 eq., 826 mg, 3.79 mmol) were added to ACN (5.2 mL) before DMAP (10 mol%, 42.1 mg, 0.344 mmol) was added. The resulting solution was stirred overnight, and then the solvent was removed under reduced pressure. The solid residue was dissolved in DCM and washed with a saturated NaHCO<sub>3</sub> solution and water. Concentration in vacuo yielded the desired product **8** as white solid (0.72 g, **85%**).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.09 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.20 – 8.05 (m, 2H), 7.53 – 7.35 (m, 2H), 1.67 (s, 10H).

#### **tert-butyl 3-((2-(tert-butoxycarbonyl)hydrazineyl)methyl)-1H-indole-1-carboxylate (9)**

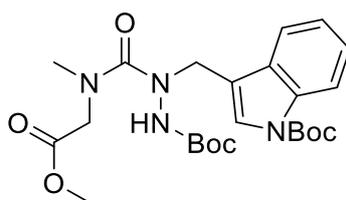


In a round-bottom flask were dissolved *tert*-butyl 3-formyl-1H-indole-1-carboxylate **8** (1 eq., 855 mg, 3.49 mmol) and *tert*-butyl carbazate (1 eq., 460 mg, 3.49 mmol) in THF

(5 mL). The reaction mixture is stirred at room temperature overnight. The volatiles are then evaporated and the slurry is retaken in THF (25 mL) before sodium cyanoborohydride (3 eq., 660 mg, 10.5 mmol) and acetic acid (5 eq., 1 mL, 17.4 mmol) are added to the solution. The reaction mixture is then stirred for 24 h at room temperature. The solvent is then evaporated and the residue is retaken in EtOAc and washed with brine, NaHCO<sub>3</sub>, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue is dissolved in MeOH (20 mL) and 4.2 mL of 1M NaOH is added. This solution is then stirred at room temperature for 1 hour. The volatiles are evaporated under vacuo before EtOAc is added. The organic phase is then washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated. Finally, the crude is purified by silica gel chromatography (20% EtOAc in *n*-heptane) to afford the product **9** as a white solid or a colourless oil (630 mg, **50%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.14 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, **NH**), 7.71 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, **CH<sup>Indole</sup>**), 7.55 (s, 1H, **CH<sup>Indole</sup>**), 7.32 (ddd, *J* = 8.4, 7.2, 1.4 Hz, 1H, **CH<sup>Indole</sup>**), 7.28 – 7.23 (m, 2H, **CH<sup>Indole</sup>**), 6.08 (s, 1H, **NH**), 4.18 – 4.13 (m, 2H, **NH-CH<sub>2</sub>**), 1.66 (s, 9H, C(**CH<sub>3</sub>**)<sub>3</sub>), 1.47 (s, 9H, C(**CH<sub>3</sub>**)<sub>3</sub>)).

**Tert-butyl 3-((2-(tert-butoxycarbonyl)-1-((2-methoxy-2-oxoethyl)(methyl)carbamoyl)hydrazineyl)methyl)-1H-indole-1-carboxylate (10)**

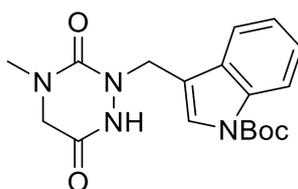


To a solution of triphosgene (0.35 eq., 176 mg, 0.6 mmol) in anhydrous THF (11 mL), under argon, was added dropwise a solution of sarcosine methyl ester hydrochloride (0.74 eq., 176 mg, 1.26 mmol) and DIEA (2.1 eq., 0.59 mL, 3.57 mmol) in anhydrous THF (2 mL) et DCM (2 mL). The mixture was stirred at room temperature for 15 minutes. A solution of carbazate **9** (1 eq., 615 mg, 1.7 mmol) and DIEA (1.1 eq., 0.31 mL, 1.87 mmol) in anhydrous THF (2.5 mL) was added dropwise and the mixture was heated at 40°C overnight. The reaction mixture was evaporated, retaken in EtOAc and H<sub>2</sub>O and phases were separated. The aqueous phase was then extracted twice EtOAc.

The organic phases were gathered and washed with saturated NaHCO<sub>3</sub>, 10% citric acid and brine. The organic phases were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The crude was then purified by silica gel chromatography (20% to 50% EtOAc in *n*-heptane) to afford the product **10** as a white foam (426 mg, 69%).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.15 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, **NH**), 7.63 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, **CH<sup>Indole</sup>**), 7.57 (s, 1H, **CH<sup>Indole</sup>**), 7.34 (ddd, *J* = 8.4, 7.2, 1.3 Hz, 1H, **CH<sup>Indole</sup>**), 7.25 (ddd, *J* = 8.9, 6.5, 1.1 Hz, 1H, **CH<sup>Indole</sup>**), 6.05 (s, 1H, **NH**), 4.72 (s, 2H, N-**CH<sub>2</sub>**-Indole), 3.98 (s, 2H, CO-**CH<sub>2</sub>**-N), 3.71 (s, 3H, CO<sub>2</sub>**CH<sub>3</sub>**), 3.02 (s, 3H, N**CH<sub>3</sub>**), 1.67 (s, 9H, C(**CH<sub>3</sub>**)<sub>3</sub>), 1.43 (s, 9H, C(**CH<sub>3</sub>**)<sub>3</sub>); **R<sub>f</sub>** = 0.46 (50% EtOAc in *n*-heptane).

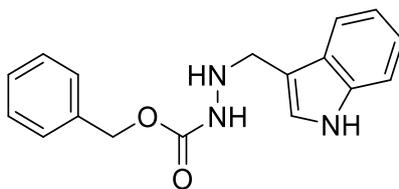
**tert-butyl 3-((4-methyl-3,6-dioxo-1,2,4-triazinan-2-yl)methyl)-1H-indole-1-carboxylate (12)**



Semicarbazide **10** (1 eq., 100 mg, 0.20 mmol) was dissolved in dioxane (10 mL) and HCl 4N in dioxane (2.67 mL) was added. The reaction mixture was stirred for 48 hours at room temperature before evaporation of the volatiles. The crude was purified by reversed-phase chromatography using a linear gradient (10 to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL.min<sup>-1</sup>) of solvent B (ACN, v/v) in solvent A (H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to afford **12** as a white solid (38 mg, **53%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, **NH**), 7.72 – 7.65 (m, 2H, **CH<sup>Indole</sup>**), 7.36 (ddd, *J* = 8.5, 7.2, 1.3 Hz, 1H, **CH<sup>Indole</sup>**), 7.30 – 7.22 (m, 2H, **CH<sup>Indole</sup>**), 4.90 (s, 2H, N-**CH<sub>2</sub>**-Indole), 3.79 (s, 2H, CO-**CH<sub>2</sub>**-N), 2.99 (s, 3H, N**CH<sub>3</sub>**), 1.68 (s, 9H, C(**CH<sub>3</sub>**)<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.4 (**C<sub>q</sub>**), 126.6 (**CH<sup>Indole</sup>**), 125.3 (**CH<sup>Indole</sup>**), 123.2 (**CH<sup>Indole</sup>**), 119.6 (**CH<sup>Indole</sup>**), 115.5 (**CH<sup>Indole</sup>**), 113.3 (**C<sub>q</sub><sup>Indole</sup>**), 51.1 (**CH<sub>2</sub>**), 43.2 (**CH<sub>2</sub>**), 35.0 (**CH<sub>3</sub>**), 28.1 (**C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>**).

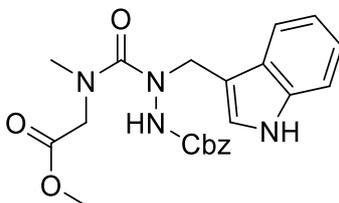
## Benzyl 2-((1H-indol-3-yl)methyl)hydrazine-1-carboxylate (**14**)



In a round-bottom flask are dissolved 3-indolecarboxaldehyde (1 eq., 2 g, 13.8 mmol) and carbobenzoxyhydrazide (1 eq., 2.3 g, 13.8 mmol) in THF (8 mL). The reaction mixture is stirred at room temperature overnight. The volatiles are then evaporated and the slurry is retaken in THF (21 mL) before sodium cyanoborohydride (3 eq., 2.6 g, 41.3 mmol) and acetic acid (5 eq., 4 mL, 69 mmol) are added to the solution. The reaction mixture is then stirred for 24 h at room temperature. The solvent is then evaporated and the residue is retaken in EtOAc and washed with brine, NaHCO<sub>3</sub>, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residue is dissolved in MeOH (40 mL) and 16 mL of 1M NaOH is added. This solution is then stirred at room temperature for 1 hour. The volatiles are evaporated under vacuo before EtOAc is added. The organic phase is then washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated. Finally, the crude is purified by silica gel chromatography (55% EtOAc in *n*-heptane) to afford the product **14** as a white solid or a colourless oil (2.5g, **63%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.90 (s, 1H, **NH**), 8.70 (s, 1H, **NH**), 7.64 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, **CH<sup>Indole</sup>**), 7.42 – 7.29 (m, 5H, **CH<sup>Bn</sup>**), 7.26 – 7.22 (m, 1H, **CH<sup>Indole</sup>**), 7.07 (ddd, *J* = 8.1, 7.0, 1.2 Hz, 1H, **CH<sup>Indole</sup>**), 6.98 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, **CH<sup>Indole</sup>**), 5.09 (s, 2H, **CH<sub>2</sub>-Bn**), 4.56 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, **NH<sup>amine</sup>**), 4.05 (s, 2H, **CH<sub>2</sub>-Indole**); **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, DMSO) δ 157.5 (**CO**), 137.5 (**C<sub>q</sub><sup>Ar</sup>**), 136.7 (**C<sub>q</sub><sup>Ar</sup>**), 128.8 (**CH<sup>Ph</sup>**), 128.3 (**CH<sup>Ph</sup>**), 128.2 (**CH<sup>Ph</sup>**), 127.6 (**C<sub>q</sub><sup>Ar</sup>**), 124.6 (**CH<sup>Indole</sup>**), 121.5 (**CH<sup>Indole</sup>**), 119.2 (**CH<sup>Indole</sup>**), 118.8 (**CH<sup>Indole</sup>**), 111.8 (**CH<sup>Indole</sup>**), 111.6 (**C<sub>q</sub><sup>Ar</sup>**), 65.8 (**CH<sub>2</sub>-Ph**), 46.8 (**CH<sub>2</sub>-Indole**); **R<sub>f</sub>** = 0.23 (50% EtOAc in *n*-heptane).

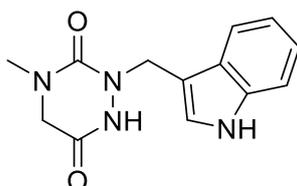
**Benzyl 2-((1H-indol-3-yl)methyl)-2-((2-methoxy-2-oxoethyl)(methyl)carbamoyl)hydrazine-1-carboxylate (15)**



To a solution of triphosgene (0.335 eq., 106 mg, 0.36 mmol) in anhydrous THF (6 mL), under argon, was added dropwise a solution of sarcosine methyl ester hydrochloride (1 eq., 142 mg, 1.02 mmol) and DIEA (2.1 eq., 0.35 mL, 2.13 mmol) in anhydrous THF (1.25 mL) et DCM (1.25 mL). The mixture was stirred at room temperature for 15 minutes. A solution of carbazate **14** (1 eq., 300 mg, 1.02 mmol) and DIEA (1.1 eq., 0.18 mL, 1.12 mmol) in anhydrous THF (1.5 mL) was added dropwise and the mixture was heated at 40°C overnight. The reaction mixture was evaporated, retaken in EtOAc and H<sub>2</sub>O and phases were separated. The aqueous phase was then extracted twice EtOAc. The organic phases were gathered and washed with saturated NaHCO<sub>3</sub>, 10% citric acid and brine. The organic phases were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The crude was then purified by silica gel chromatography (20% to 50% EtOAc in *n*-heptane) to afford the product **15** as a white foam (230 mg, **54%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.18 (s, 1H, **NH**), 7.57 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, **CH<sup>indole</sup>**), 7.42 – 7.29 (m, 6H, **CH<sup>indole</sup>** + **CH<sup>Ph</sup>**), 7.19 (ddd, *J* = 8.2, 7.0, 1.2 Hz, 1H, **CH<sup>indole</sup>**), 7.08 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, **CH<sup>indole</sup>**), 5.13 (s, 2H, O-**CH<sub>2</sub>**-Ph), 4.75 (bs, 2H, CO-**CH<sub>2</sub>**), 3.97 (bs, 2H, N-**CH<sub>2</sub>**-Indole), 3.64 (s, 3H, CO<sub>2</sub>**CH<sub>3</sub>**), 3.00 (s, 3H, N**CH<sub>3</sub>**).

**2-((1H-indol-3-yl)methyl)-4-methyl-1,2,4-triazinane-3,6-dione (16)**

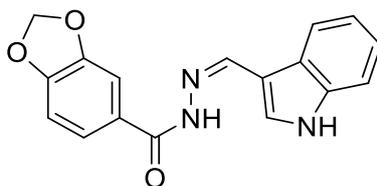


Semicarbazide **15** (1 eq., 600 mg, 1.41 mmol) was dissolved MeOH (30 mL) and Pd/C 10% (19.8 mg) is added. The suspension is placed under an atmosphere of H<sub>2</sub> with a

balloon and stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was filtered on Celite and concentrated under vacuo. The crude was purified by reversed-phase chromatography using a linear gradient (10 to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL.min<sup>-1</sup>) of solvent B (ACN, v/v) in solvent A (H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to afford the desired product **16** as a white solid (147 mg, **40%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO)  $\delta$  11.01 (s, 1H, **NH**), 10.35 (s, 1H, **NH**), 7.57 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, C<sub>q</sub>-**CH<sup>indole</sup>**-CH), 7.36 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, C<sub>q</sub>-**CH<sup>indole</sup>**-CH), 7.30 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H, **CH<sup>indole</sup>**-NH), 7.08 (ddd,  $J = 8.1, 6.9, 1.2$  Hz, 1H, C<sub>q</sub>-**CH<sup>indole</sup>**-CH), 6.99 (ddd,  $J = 7.9, 7.0, 1.1$  Hz, 1H, C<sub>q</sub>-**CH<sup>indole</sup>**-CH), 4.71 (s, 2H, N-**CH<sub>2</sub>**-Indole), 3.47 (s, 2H, CO-**CH<sub>2</sub>**-N), 2.74 (s, 3H, N**CH<sub>3</sub>**); **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, DMSO)  $\delta$  136.8, 126.8, 126.1, 121.7, 119.3, 112.0, 43.6, 34.7; **R<sub>f</sub>** = 0.35 (5% MeOH in DCM).

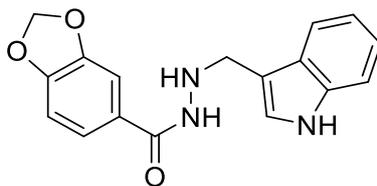
**(Z)-N-((1H-indol-3-yl)methylene)benzo[d][1,3]dioxole-5-carbohydrazide (19)**



To a suspension of hydrazide (1 eq., 2 g, 11.1 mmol) and indole-3-carboxaldehyde (1 eq., 1.61 g, 11.1 mmol) in EtOH (30 mL) is added AcOH (0.25 eq, 159  $\mu$ L, 2.78 mmol). The reaction mixture is heated to reflux for 3 hours before being cooled back to 0 °C. A white solid precipitated out of solution and a filtration was performed. The white solid was washed with cold EtOH before being dried under vacuo to afford the product (3.2 g, **95%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO)  $\delta$  11.57 (s, 1H, **NH**), 11.38 (s, 1H, **NH**), 8.60 (s, 1H, **HC=N-NH**), 8.30 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, **CH<sup>Ar</sup>**), 7.81 (s, 1H, **CH<sup>Ar</sup>**), 7.53 (dt,  $J = 8.2, 1.6$  Hz, 1H, **CH<sup>Ar</sup>**), 7.48 (t,  $J = 1.8$  Hz, 1H, **CH<sup>Ar</sup>**), 7.44 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, **CH<sup>Ar</sup>**), 7.20 (t,  $J = 7.0$  Hz, 1H, **CH<sup>Ar</sup>**), 7.15 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H, **CH<sup>Ar</sup>**), 7.05 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, **CH<sup>Ar</sup>**), 6.13 (s, 2H, O-**CH<sub>2</sub>**-O).

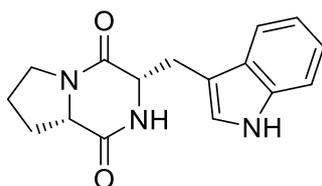
***N*-((1*H*-indol-3-yl)methyl)benzo[*d*][1,3]dioxole-5-carbohydrazide (**20**)**



Hydrazone **19** (1 eq., 120 mg, 0.39 mmol) was suspended in THF (2.5 mL) and NaBH<sub>3</sub>CN (3 eq., 59 mg, 1.17 mmol) was added along with AcOH (5 eq., 112  $\mu$ L, 1.95 mmol). The reaction was stirred for 24 hours at room temperature before being concentrated in vacuo. The residue was retaken in EtOAc and washed with brine, saturated NaHCO<sub>3</sub> and brine again. The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. MeOH (3.5 mL) was then added along with 1M aqueous NaOH (1.2 eq., 0.47 mL, 0.47 mmol). This solution was stirred for 2 hours at room temperature (slightly exothermic at this scale). The volatiles were removed and AcOEt was added, phases separated and the organic phase was washed with brine. The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated. The crude product was purified by silica gel chromatography (70% EtOAc in *n*-heptane) to afford the product **20** as a white solid (80 mg, **66%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO)  $\delta$  10.95 (s, 1H, NH<sup>indole</sup>), 10.02 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 1H, C(O)NH-NH), 7.72 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, CH<sup>Ar</sup>), 7.46 (dd,  $J$  = 8.1, 1.7 Hz, 1H, CH<sup>Ar</sup>), 7.41 – 7.35 (m, 2H, CH<sup>Ar</sup>), 7.31 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H, CH<sup>Ar</sup>), 7.09 (ddd,  $J$  = 8.2, 7.0, 1.3 Hz, 1H, CH<sup>Ar</sup>), 7.01 (ddd,  $J$  = 8.0, 7.0, 1.1 Hz, 1H, CH<sup>Ar</sup>), 6.99 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H, CH<sup>Ar</sup>), 6.10 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-O), 5.12 (q,  $J$  = 6.2 Hz, 1H, NH-NH-CH<sub>2</sub>), 4.10 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 2H, NH-NH-CH<sub>2</sub>); **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, DMSO)  $\delta$  165.2 (C=O), 150.2, 147.8, 136.7, 127.6, 127.6, 124.7, 122.6, 121.5, 119.2, 118.9, 111.9, 111.6, 108.4, 107.6, 102.1 (O-CH<sub>2</sub>-O), 47.2 (NH-NH-CH<sub>2</sub>).

## Brévianamide F (23)



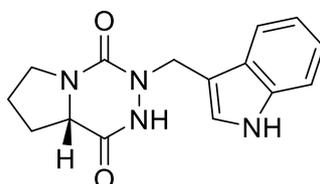
To a solution of Cbz-Trp-OH (1 eq., 1 g, 2.96 mmol) in DMF (20 mL) was added HOBt (1.1 eq., 437 mg, 3.24 mmol). This solution was cooled down to 0 °C and a solution of EDCI (1.1 eq., 620 mg, 3.24 mmol) in DMF (35 mL) was added over 5 minutes. The reaction mixture was stirred for 1 hour at this temperature and 30 minutes at room temperature. Finally, a solution of Pro-OMe-HCl (1 eq., 490 mg, 2.96 mmol) and DIEA (2.15 eq., 1.06 mL, 6.39 mmol) in DMF (15 mL) was added and stirring was continued overnight at room temperature. Volatiles were removed in vacuo and the residue was dissolved in DCM. The organic phase was washed with H<sub>2</sub>O twice, saturated NaHCO<sub>3</sub> twice, 10% citric acid twice and brine. The organic phase was then dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo to afford **22** as a white foam (1.06 g, **80%**).

**22** (1 eq., 500 mg, 1.11 mmol) was dissolved in MeOH (10 mL) and the solvent was evaporated. The residue was dissolved back in MeOH (25 mL) and Pd/C 10% (81 mg) was added. The flask was flushed with a balloon of H<sub>2</sub> for 5 minutes and the atmosphere was maintained along with the stirring overnight. The reaction mixture was then filtered on Celite, evaporated and purified by reversed-phase chromatography using a linear gradient (5% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL.min<sup>-1</sup>) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to afford the product as a white solid (244 mg, **77%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.28 (s, 1H, NH<sup>indole</sup>), 7.59 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, CH<sup>indole</sup>), 7.40 (dt, *J* = 8.2, 0.9 Hz, 1H, CH<sup>indole</sup>), 7.24 (ddd, *J* = 8.2, 7.1, 1.2 Hz, 1H, CH<sup>indole</sup>), 7.17 – 7.11 (m, 2H, CH<sup>indole</sup>), 6.28 (s, 1H, NH<sup>DCP</sup>), 4.45 – 4.36 (m, 1H, CH<sup>tryptophane</sup>), 4.08 (ddd, *J* = 8.4, 6.5, 1.5 Hz, 1H, CH<sup>proline</sup>), 3.75 (ddd, *J* = 15.1, 3.8, 1.0 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-Indole), 3.71 – 3.52 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.02 (dd, *J* = 15.1, 10.4 Hz, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 2.38 – 2.24 (m, 1H, CH<sub>2</sub><sup>proline</sup>), 2.08 – 1.82 (m, 3H, CH<sub>2</sub><sup>proline</sup>); **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.0 (CO), 165.5 (CO), 136.7 (C<sub>q</sub><sup>indole</sup>), 126.7 (C<sub>q</sub><sup>indole</sup>), 123.7 (CH<sup>indole</sup>), 122.8 (CH<sup>indole</sup>), 120.0 (CH<sup>indole</sup>), 118.5 (CH<sup>indole</sup>), 111.6 (CH<sup>indole</sup>), 109.5

( $C_q^{indole}$ ), 59.2 (CH), 54.9 (CH), 45.5 ( $CH_2$ -Indole), 28.2 ( $CH_2^{proline}$ ), 26.9 ( $CH_2^{proline}$ ), 22.5 ( $CH_2^{proline}$ ).

**(S)-3-((1H-indol-3-yl)methyl)hexahydropyrrolo[1,2-d][1,2,4]triazine-1,4-dione (24)**

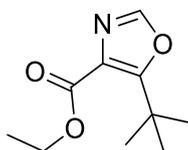


To a solution of BTC (0.35 eq., 246 mg, 0.83 mmol) in THF (15.2 mL) under argon is added dropwise during 10 min a solution of methyl pyrrolidine-2-carboxylate hydrochloride (1 eq., 392 mg, 2.37 mmol) with DIEA (2.1 eq., 643 mg, 0.823 mL, 4.98 mmol) in DCM (2.95 mL) et THF (3.5 mL). The solution is stirred at room temperature for 30 min. Then a solution of **15** (1 eq., 700 mg, 2.37 mmol) and DIEA (1.1 eq., 336 mg, 0.431 mL, 2.61 mmol) in THF (1.94 mL) is added dropwise. The reaction mixture is stirred overnight at 40 °C. Then the reaction is cooled down to room temperature and the salts are filtered off. The filtrate is then evaporated to a slurry and retaken in MeOH (50 mL) and Pd/C 10% (180 mg) is added. The suspension is placed under an atmosphere of H<sub>2</sub> with a balloon and stirred overnight at room temperature. The reaction mixture is then filtered over Celite and evaporated. The crude is finally purified by reversed-phase chromatography using a linear gradient (5 to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL.min<sup>-1</sup>) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to afford the product as a white solid (70 mg, **10%**).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.01 (s, 1H, NH), 10.25 (s, 1H, NH), 7.57 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H,  $CH^{Ph-indole}$ ), 7.37 (dt, *J* = 8.1, 1.0 Hz, 1H,  $CH^{Ph-indole}$ ), 7.32 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H,  $CH^{indole}$ ), 7.09 (ddd, *J* = 8.2, 7.0, 1.3 Hz, 1H,  $CH^{Ph-indole}$ ), 7.00 (ddd, *J* = 8.0, 7.0, 1.1 Hz, 1H,  $CH^{Ph-indole}$ ), 5.08 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H,  $CH_2$ -N), 4.33 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H,  $CH_2$ -N), 3.53 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, CH-CO), 3.44 – 3.27 (m, 3H,  $CH_2^{proline}$ ), 2.04 – 1.91 (m, 1H,  $CH_2^{proline}$ ), 1.91 – 1.71 (m, 2H,  $CH_2^{proline}$ ) ; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 153.9 (CO), 136.3 ( $C^{indole}$ ), 126.4 ( $C^{indole}$ ), 125.3 ( $C^{indole}$ ), 121.2 ( $C^{indole}$ ), 118.8 ( $C^{indole}$ ), 118.6 ( $C^{indole}$ ), 111.5 ( $C^{indole}$ ), 109.8 ( $C^{indole}$ ), 56.8 (CH-CO), 44.7, 41.9, 26.6, 22.5;

**HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 285.1352, Found: 285.1354 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 0.7$  ppm) ;  $t_{\text{R}} = 2.989$  min (Method C).

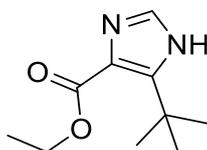
### Ethyl 5-(tert-butyl)oxazole-4-carboxylate (**25**)



To a solution of ethyl isocyanoacetate (1 eq., 5 g, 4.85 mL, 44.202 mmol) in THF (45 mL) were added DBU (1.22 eq., 8.22 g, 8.066 mL, 53.99 mmol) and pivalic anhydride (1.22 eq., 10.057 g, 11.052 mL, 54 mmol), and the mixture was stirred overnight at room temperature. After the solvent was removed by evaporation in vacuo, the residue action was extracted with AcOEt (200 mL), washed with 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10% citric acid, and saturated NaCl three times. The organic phases were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The residual oil was purified by silica gel chromatography (20% EtOAc in *n*-heptane) to afford the desired product **25** as a yellow oil (7.2 g, **83%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.65 (s, 1H, **CH<sup>imidazole</sup>**), 4.30 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.38 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.33 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);  $R_f = 0.3$  (20% EtOAc in *n*-heptane).

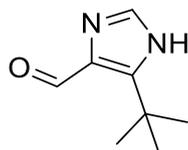
### Ethyl 5-(tert-butyl)-1H-imidazole-4-carboxylate (**26**)



Oxazole **25** (2 g, 10.14 mmol, 1 equiv) was dissolved in formamide (12 mL) and the solution was heated at 165 °C overnight. The reaction mixture was cooled to room temperature and was diluted in EtOAc (50 mL), washed with brine three times, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated. The crude was purified by silica gel chromatography (0.5% to 1% MeOH in AcOEt) to yield the desired product **26** as a pale yellow amorphous solid (1.01 g, **51%**).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.47 (s, 1H,  $\text{CH}^{\text{imidazole}}$ ), 5.80 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 4.26 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.43 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.25 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ );  $R_f = 0.3$  (1% MeOH in EtOAc).

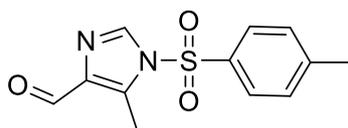
### 5-(tert-butyl)-1H-imidazole-4-carbaldehyde (**27b**)



To a solution of **26** (1 equiv., 700 mg, 3.57 mmol) in THF (14 mL) was added portionwise, at 0 °C,  $\text{LiAlH}_4$  (1 equiv., 135 mg, 3.57 mmol). The reaction mixture was stirred for 4 hours at room temperature before being cooled back to 0 °C. Saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$  was added and the reaction mixture was filtered over Celite. The filtrate was then extracted with EtOAc and the organic phase was washed with 10%  $\text{NaHCO}_3$  and brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated in vacuo. The crude was retaken in acetone (15 mL) and  $\text{MnO}_2$  (7.22 equiv., 2.24 g, 25.77 mmol) was added. The suspension was stirred at room temperature for 2 hours before being filtrated over Celite. The filtrate was then evaporated and purified by silica gel chromatography (80% EtOAc in *n*-heptane) to afford the desired product **27b** as an off-white amorphous solid (230 mg, 42%).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.06 (s, 1H,  $\text{CHO}$ ), 7.70 (s, 1H,  $\text{CH}^{\text{imidazole}}$ ), 1.48 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ );  $R_f = 0.3$  (80% EtOAc in *n*-heptane).

### 5-methyl-1-tosyl-1H-imidazole-4-carbaldehyde (**28a**)

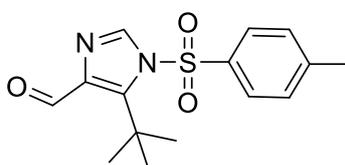


To a solution of imidazole **27a** (1 equiv., 800 mg, 7.27 mmol) in DCM (4 mL), cooled down to 0 °C, was added dropwise DBU (2.55 equiv., 2.77 mL, 18.53 mmol) and TsCl (2 equiv., 2.77 g, 14.53 mmol). The reaction mixture turned yellow and was stirred 4 hours at room temperature. The solution was then quenched with 10 mL of 1M HCl

and extracted twice with  $\text{CHCl}_3$  (20 mL). The organic phases were gathered and washed with brine (20 mL), dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_2$  and concentrated. The crude was purified by silica gel column chromatography (1% MeOH in  $\text{CHCl}_3$ ) to afford the product **28a** as an off-white amorphous solid (1.75 g, **91%**).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.94 (s, 1H,  $\text{CHO}$ ), 8.13 (s, 1H,  $\text{CH}^{\text{imidazole}}$ ), 7.88 – 7.71 (m, 2H,  $\text{CH}^{\text{Ar}}$ ), 7.44 – 7.37 (m, 2H,  $\text{CH}^{\text{Ar}}$ ), 2.61 (s, 3H,  $\text{CH}_3^{\text{imidazole}}$ ), 2.47 (s, 3H,  $\text{CH}_3^{\text{Tosyle}}$ );  $R_f \approx 0.3$  (1% MeOH in  $\text{CHCl}_3$ ).

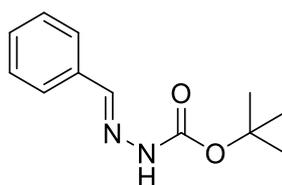
### 5-(tert-butyl)-1-tosyl-1H-imidazole-4-carbaldehyde (**28b**)



To a solution of imidazole **27b** (1 equiv., 80 mg, 0.53 mmol) in DCM (0.8 mL), cooled down to 0 °C, was added dropwise DBU (2.55 equiv., 0.2 mL, 1.35 mmol) and TsCl (2 equiv., 210 mg, 1.09 mmol). The reaction mixture turned yellow and was stirred 4 hours at room temperature. The solution was then quenched with 10 mL of 1M HCl and extracted twice with  $\text{CHCl}_3$  (20 mL). The organic phases were gathered and washed with brine (20 mL), dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated. The crude was purified by silica gel column chromatography (2% MeOH in  $\text{CHCl}_3$ ) to afford the product **28b** as a pale yellow amorphous solid (74 mg, **46%**).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.11 (d,  $J = 0.6$  Hz, 1H,  $\text{CHO}$ ), 8.33 (d,  $J = 0.6$  Hz, 1H,  $\text{CH}^{\text{imidazole}}$ ), 7.98 – 7.90 (m, 2H,  $\text{CH}^{\text{Ar}}$ ), 7.42 – 7.30 (m, 2H,  $\text{CH}^{\text{Ar}}$ ), 2.45 (s, 3H,  $\text{CH}_3^{\text{Tosyle}}$ ), 1.41 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3^{\text{imidazole}}$ );  $R_f \approx 0.3$  (2% MeOH in  $\text{CHCl}_3$ ).

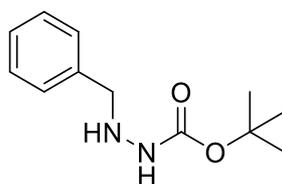
### tert-butyl (E)-2-benzylidenehydrazine-1-carboxylate (**29**)



*tert*-butyl carbazate (1 eq., 4 g, 30.3 mmol), benzaldehyde (1.3 eq., 3.98 mL, 39.4 mmol) in Et<sub>2</sub>O (20 mL) were all mixed and stirred overnight at room temperature. The mixture was then filtrated and washed with cold ether to give **29** as a white powder (6.31g, **95%**).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.91 (s, 1H, **NH**), 8.01 (s, 1H, **NH**), 7.61 (m, 2H, **H<sup>Ar</sup>**), 7.49 – 7.35 (m, 3H, **H<sup>Ar</sup>**), 3.34 (s, 1H N=**CH**-Ph), 1.49 (s, 9H, C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

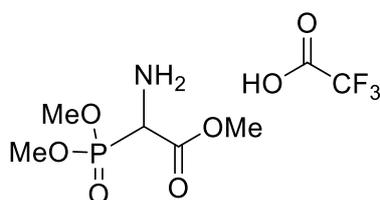
### ***tert*-butyl 2-benzylhydrazine-1-carboxylate (30)**



**14** (1 eq., 5.3 g, 24 mmol) is suspended in THF (20 mL) under argon. NaBH<sub>3</sub>CN (2.5 eq., 3.78 g, 60.2 mmol) is added as well as acetic acid (3.5 eq., 4.83 mL, 84.2 mmol). The reaction is stirred for 24 hours at room temperature. Solvent was evaporated, then diluted in AcOEt and water. NaHCO<sub>3</sub> was added until pH = 9. The organic phase was washed with brine, NaHCO<sub>3</sub>, brine, then dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The residue was then dissolved in MeOH (5 mL) and NaOH 2 M (5 mL). It was stirred for 2 hours at room temperature. Solvents were evaporated and the mixture was diluted in AcOEt and water. The organic phase was separated and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The crude was purified by silica gel chromatography (20% EtOAc in *n*-pentane) to afford **30** as a clear oil (5.03g, **94%**).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.36 –7.16 (m, 5H, **H<sup>Ar</sup>**), 5.96 (s, 1H, **NH**), 3.89 (s, 2H, **CH**<sub>2</sub>), 1.38 (s, 9H, C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

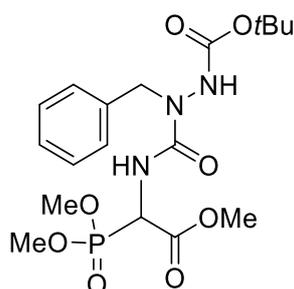
### **Methyl 2-amino-2-(dimethoxyphosphoryl)acetate 2,2,2-trifluoroacetate (32)**



To a round bottom flask equipped with a stir bar was added **31** (1 eq., 1 g, 3.36 mmol), triisopropylsilane (1.05 eq., 0.72 mL, 3.53 mmol), and DCM (25 mL). The reaction mixture was cooled to 0°C and TFA (10 eq., 2.5 mL, 33.64 mmol) was slowly added. The reaction slowly warmed to room temperature and the mixture was stirred for 24 hours. The DCM was concentrated under reduced pressure and to the mixture was added toluene to form an azeotrope with TFA, which was subsequently concentrated under reduced pressure. The reaction mixture was further dried on the high vacuum and subsequently triturated with Et<sub>2</sub>O to afford the product as an off-white solid (1.02 g, **96%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.94 (s, 3H, **NH<sub>3</sub>**), 5.08 (d, J = 20.5 Hz, 1H, **P-CH**), 3.92 – 3.74 (m, 9H, **P-(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** and **CO-OCH<sub>3</sub>**).

***tert*-butyl 2-benzyl-2-((1-(dimethoxyphosphoryl)-2-methoxy-2-oxoethyl)carbamoyl)hydrazine-1-carboxylate (**33**)**

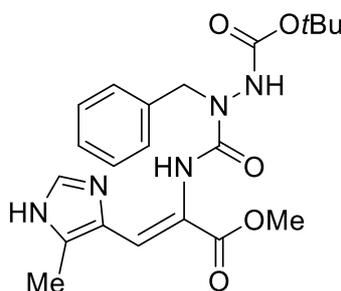


The reaction was carried out under an argon atmosphere. **32** (1 equiv., 758 mg, 2.55 mmol) was dissolved in dry DCM (20 mL). 2-chloropyridine (3 equiv., 0.72 mL, 7.65 mmol) was added, followed by Tf<sub>2</sub>O (1.5 equiv., 0.36 mL, 3.82 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 50 min. *tert*-butyl 2-benzylhydrazine-1-carboxylate (3 equiv., 1.70 g, 7.65 mmol) was then added, and the mixture was stirred at room temperature for 24 hours. The solvent was evaporated and the residue was purified by silica gel chromatography (100% EtOAc) to afford **33** as a viscous oil (1.09 g, **96%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 7.30-7.19 (m, 5H, **CH<sup>A</sup>**), 6.77-6.66 (bs, 1H, **NH**), 6.36 (d, J = 11.2 Hz, 1H, **NH**), 5.19-5.10 (m, 1H, **P-CH**), 4.56-4.11 (bs, 2H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 3.87-3.69 (m, 9H, **POCH<sub>3</sub>** and **COOCH<sub>3</sub>**), 1.37 (s, 9H, **C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>**); **<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 162 MHz) δ (ppm) 18.73; **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ (ppm) 167.3 (**CO**), 157.1 (d,

$^2J_{CP} = 5.4$  Hz,  $\text{COOCH}_3$ ), 154.3 ( $\text{CO}$ ), 135.5 ( $\text{C}_q^{\text{Ar}}$ ), 128.9 ( $\text{CH}^{\text{Ar}}$ ), 128.7 ( $\text{CH}^{\text{Ar}}$ ), 127.9 ( $\text{CH}^{\text{Ar}}$ ), 82.5 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 54.5 (d,  $^2J_{CP} = 6.9$  Hz,  $\text{POCH}_3$ ), 53.3 ( $\text{COOCH}_3$ ), 51.5 (d,  $^1J_{CP} = 151$  Hz, P- $\text{CH}$ ), 51.2 (bs,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 27.9 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for  $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_8\text{P}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 446.1692, Found: 446.1700 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 1.79$  ppm);  $R_f = 0.4$  (100% EtOAc);  $t_R = 4.17$  min (Method C).

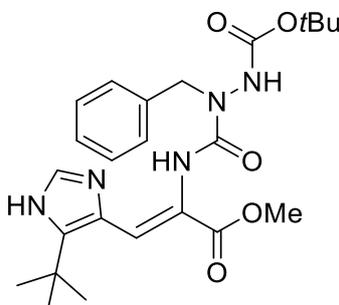
**tert-butyl (Z)-2-benzyl-2-((3-methoxy-1-(5-methyl-1H-imidazol-4-yl)-3-oxoprop-1-en-2-yl) carbamoyl)hydrazine-1-carboxylate (35a)**



The reaction was carried out under an argon atmosphere. To a solution of **28a** (178 mg, 0.675 mmol, 1 eq) and **33** (300 mg, 0.675 mmol, 1 eq) in dry DCM (7 mL) cooled to  $0^\circ\text{C}$ , was added dropwise DBU (0.2 mL, 1.35 mmol, 2 eq). The reaction was stirred at room temperature for 6 h. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in dry THF (10 mL). Tetrabutylammonium fluoride supported on silica gel (loading 1.5 mmol/g, 900 mg, 1.35 mmol, 2 eq) was added and the slurry was stirred vigorously stirred at room temperature for 1 h. The mixture was then filtered and purified by silica gel chromatography (1% MeOH in  $\text{CHCl}_3$ ) to afford **35a** as a pale yellow oil (225 mg, **78%**).

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 8.53 (s, 1H,  $\text{CH}^{\text{imidazole}}$ ), 7.32-7.25 (m, 6H,  $\text{CH}^{\text{Ar}}$  and  $\text{C}=\text{CH}$ ), 5.08-4.76 (bs, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.51-4.27 (bs, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.85 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 2.46 (s, 3H,  $\text{CH}_3^{\text{imidazole}}$ ), 1.41 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  (ppm) 166.5 ( $\text{CO}$ ), 156.6 ( $\text{CO}$ ), 155.6 (N-CO-N), 143.9 ( $\text{C}^{\text{imidazole}}$ ), 140.0 ( $\text{C}_q^{\text{imidazole}}$ ), 138.3 ( $\text{C}_q^{\text{imidazole}}$ ), 135.8 ( $\text{C}_q^{\text{Ar}}$ ), 129.0 ( $\text{C}^{\text{Ar}}$ ), 128.6 ( $\text{C}^{\text{Ar}}$ ), 127.9 ( $\text{C}^{\text{Ar}}$ ), 125.4 ( $\text{C}=\text{CH}$ ), 113.7 ( $\text{C}=\text{CH}$ ), 82.5 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 52.2 ( $\text{COOCH}_3$ ), 51.7 (bs,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 28.1 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 22.2 ( $\text{CH}_3$ ); **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{NaO}_5$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 452.1910, Found: 452.1895 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 3.32$  ppm);  $R_f = 0.3$  (5% MeOH in  $\text{CHCl}_3$ );  $t_R = 3.40$  min (Method C).

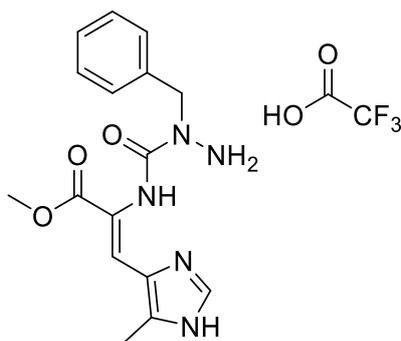
**tert-butyl (Z)-2-benzyl-2-((1-(5-(tert-butyl)-1H-imidazol-4-yl)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-2-yl)carbamoyl)hydrazine-1-carboxylate (35b)**



The reaction was carried out under an argon atmosphere. To a solution of **28b** (275 mg, 0.450 mmol, 2 eq) and **33** (200 mg, 0.450 mmol, 1 eq) in dry DCM (5 mL) cooled to 0°C, was added dropwise DBU (0.13 mL, 0.900 mmol, 2 eq). The reaction was stirred at room temperature for 16 h. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in dry THF (8 mL). Tetrabutylammonium fluoride supported on silica gel (loading 1.5 mmol/g, 600 mg, 1.35 mmol, 2 eq) was added and the slurry was stirred vigorously stirred at room temperature for 1 h. The mixture was then filtered and purified by column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 99/1) to afford **35b** as a pale yellow oil (129 mg, 61 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (MeOD, 400 MHz): δ (ppm) 8.86 (s, 1H, C<sup>H</sup><sub>imidazole</sub>), 7.54 (s, 1H, C=CH), 7.37-7.25 (m, 5H, C<sup>H</sup><sub>Ar</sub> + NH), 4.74-4.47 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.86 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 1.50 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>imidazole</sup>), 1.42 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>Boc</sup>); **<sup>13</sup>C NMR** (MeOD, 100 MHz): δ (ppm) 166.2 (CO), 157.8 (N-CO-N), 137.1 (C<sup>imidazole</sup>), 134.9 (C<sup>q</sup><sub>Ar</sub>), 130.2 (C<sup>Ar</sup>), 129.8 (C<sup>q</sup><sub>imidazole</sub>), 129.6 (C<sup>Ar</sup>), 129.2 (C=CH), 129.0 (C<sup>Ar</sup>), 123.3 (C<sup>q</sup><sub>imidazole</sub>), 118.6 (C=CH), 83.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>Boc</sup>), 53.5 (COOCH<sub>3</sub>), 53.1 (CH<sub>2</sub>Ph), 33.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>imidazole</sup>), 30.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>imidazole</sup>), 28.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>Boc</sup>); **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 472.2560, Found: 472.2568 (Δ<sub>HRMS</sub> = 1.69 ppm); R<sub>f</sub> = 0.45 (5% MeOH in CHCl<sub>3</sub>); t<sub>R</sub> = 3.90 min (Method C).

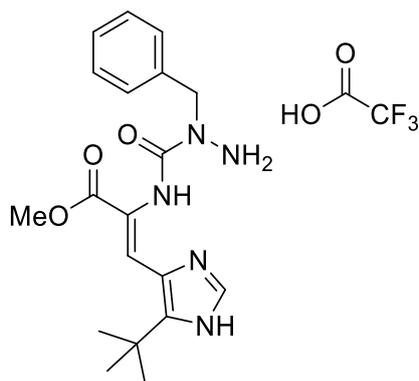
**Methyl (Z)-2-(1-benzylhydrazine-1-carboxamido)-3-(5-methyl-1H-imidazol-4-yl)acrylate-trifluoroacetate (36a)**



**35a** (75 mg, 0.175 mmol, 1 eq) was dissolved in a mixture of TFA (1.9 mL) and H<sub>2</sub>O (0.1 mL) and stirred at room temperature for 1 h. The volatiles were evaporated. The crude was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography on a SunFire C18 column (5  $\mu$ m, 19  $\times$  150 mm) using a linear gradient (5% to 95% in 40 min) with a flow-rate of 18 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup> of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to afford **36a** as a white amorphous powder (68 mg, **88%**).

<sup>1</sup>H NMR (MeOD, 500 MHz):  $\delta$  (ppm) 8.68 (s, 1H, **CH<sup>imidazole</sup>**), 7.40-7.34 (m, 2H, **CH<sup>Ar</sup>**), 7.34-7.27 (m, 3H, **CH<sup>Ar</sup>**), 7.13 (s, 1H, **C=CH**), 4.67 (s, 2H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 3.86 (s, 3H, **COOCH<sub>3</sub>**), 3.35 (bs, 2H, **NH<sub>2</sub>**), 2.38 (s, 3H, **CH<sub>3</sub><sup>imidazole</sup>**); <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 125 MHz):  $\delta$  (ppm) 166.7 (**CO**), 159.2 (N-**CO**-N), 137.6 (**C<sub>q</sub><sup>Ar</sup>**), 135.1 (**C<sup>imidazole</sup>**), 131.8 (**C<sub>q</sub><sup>imidazole</sup>**), 130.8 (**C<sub>q</sub><sup>imidazole</sup>**), 129.8 (**C<sup>Ar</sup>**), 129.3 (**C<sup>Ar</sup>**), 128.9 (**C<sup>Ar</sup>**), 126.0 (**C=CH**), 115.4 (**C=CH**), 54.1 (**CH<sub>2</sub>Ph**), 53.3 (**COOCH<sub>3</sub>**), 9.8 (**CH<sub>3</sub>**); **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 330.1561, Found: 330.1566 ( $\Delta_{\text{HRMS}}$  = 1.51 ppm); **R<sub>f</sub>** = 0.3 (10% MeOH in CHCl<sub>3</sub>); **t<sub>R</sub>** = 2.59 min (Method C).

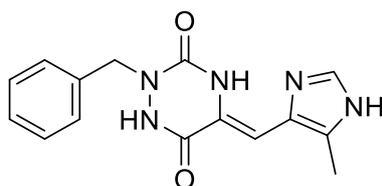
**methyl (Z)-2-(1-benzylhydrazine-1-carboxamido)-3-(5-(tert-butyl)-1H-imidazol-4-yl)acrylate-trifluoroacetate (36b)**



**35b** (35 mg, 0.077 mmol, 1 eq) was dissolved in a mixture of TFA (0.9 mL) and H<sub>2</sub>O (0.5 mL) and stirred at room temperature for 1 h. The volatiles were evaporated. The crude was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography on a SunFire C18 column (5  $\mu$ m, 19  $\times$  150 mm) using a linear gradient (5% to 95% in 40 min) with a flow-rate of 18 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup> of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to afford **36a** as a white amorphous powder (32 mg, 89 %).

<sup>1</sup>H NMR (MeOD, 500 MHz):  $\delta$  (ppm) 8.80 (s, 1H, C<sup>H</sup><sub>imidazole</sub>), 7.40-7.23 (m, 6H, C<sup>H</sup><sub>Ar</sub> and C=CH), 4.63 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.88 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 2.38 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz):  $\delta$  (ppm) 166.3 (CO), 158.3 (N-CO-N), 137.6 (C<sup>q</sup><sub>Ar</sub>), 134.1 (C<sup>imidazole</sup>), 130.4 (C<sup>q</sup><sub>imidazole</sub>), 129.9 (C<sup>Ar</sup>), 129.5 (1C, C<sup>q</sup><sub>imidazole</sub>), 129.2 (C<sup>Ar</sup>), 128.9 (C<sup>Ar</sup>), 123.9 (C=CH), 115.0 (C=CH), 54.0 (CH<sub>2</sub>Ph), 53.6 (COOCH<sub>3</sub>), 33.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 30.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); HRMS (ESI-TOF): Calculated for C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 372.2030, Found: 372.2037 ( $\Delta$ <sub>HRMS</sub> = 1.88 ppm); R<sub>f</sub> = 0.30 (10% MeOH in CHCl<sub>3</sub>); t<sub>R</sub> = 3.14 min (Method C).

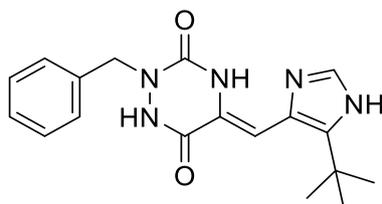
**(Z)-2-benzyl-5-((5-methyl-1H-imidazol-4-yl)methylene)-1,2,4-triazinane-3,6-dione (37a)**



**36a** (48 mg, 0.108 mmol, 1 eq) and *para*-toluenesulfonic acid (20 mg, 0.216 mmol, 2 eq) were dissolved in toluene (3 mL) and reflux for 2 h. The volatiles were evaporated. The crude was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography on a SunFire C18 column (5  $\mu$ m, 19  $\times$  150 mm) using a linear gradient (5% to 95% in 40 min) with a flow-rate of 18 mL.min<sup>-1</sup> of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to afford **37a** as a white amorphous powder (27 mg, 82 %).

<sup>1</sup>H NMR (MeOD, 500 MHz):  $\delta$  (ppm) 8.49 (s, 1H, CH<sup>imidazole</sup>), 7.44-7.40 (m, 2H, CH<sup>Ar</sup>), 7.33-7.23 (m, 3H, CH<sup>Ar</sup>), 6.45 (s, 1H, C=CH), 4.18 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 2.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub><sup>imidazole</sup>); <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 125 MHz):  $\delta$  (ppm) 163.7 (N-CO-C), 154.8 (N-CO-N), 137.7 (C<sup>q</sup><sup>Ar</sup>), 135.8 (C<sup>imidazole</sup>), 131.3 (C<sup>q</sup><sup>imidazole</sup>), 130.4 (C<sup>Ar</sup>), 129.4 (C<sup>Ar</sup>), 128.8 (C<sup>Ar</sup>), 128.1 (C<sup>q</sup><sup>imidazole</sup>), 127.1 (C=CH), 98.3 (C=CH), 54.7 (CH<sub>2</sub>Ph), 9.5 (CH<sub>3</sub>); HRMS (ESI-TOF): Calculated for C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 298.1304, Found: 298.1311 ( $\Delta_{\text{HRMS}}$  = 2.35 ppm); R<sub>f</sub> = 0.15 (10% MeOH in CHCl<sub>3</sub>); t<sub>R</sub> = 2.67 min (Method C).

**(Z)-2-benzyl-5-((5-(tert-butyl)-1H-imidazol-4-yl)methylene)-1,2,4-triazinane-3,6-dione or aza-F-plinabulin (37b)**



**36b** (32 mg, 0.066 mmol, 1 eq) and *para*-toluenesulfonic acid (20 mg, 0.132 mmol, 2 eq) were dissolved in toluene (1.7 mL) and reflux for 2 h. The volatiles were evaporated. The crude was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography on a SunFire C18 column (5  $\mu$ m, 19  $\times$  150 mm) using a linear gradient (5% to 95% in 40 min) with a flow-rate of 18 mL.min<sup>-1</sup> of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to afford **37b** as a white amorphous powder (16 mg, 72 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (MeOD, 500 MHz): δ (ppm) 8.58 (s, 1H, **CH<sup>imidazole</sup>**), 7.39-7.29 (m, 4H, **CH<sup>Ar</sup>**), 7.29-7.22 (m, 1H, **CH<sup>Ar</sup>**), 5.89 (s, 1H, **C=CH**), 4.79 (s, 2H, **CH<sub>2</sub>Ph**), 1.39 (s, 9H, **C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>**); **<sup>13</sup>C NMR** (MeOD, 125 MHz): δ (ppm) 151.0 (**N-CO-C**), 150.0 (**N-CO-N**), 140.1 (**C<sup>Ar</sup>**), 138.4 (**C<sup>imidazole</sup>**), 133.9 (**C<sup>imidazole</sup>**), 129.6 (**C<sup>imidazole</sup>**), 129.5 (**C<sup>Ar</sup>**), 128.9 (**CH<sup>Ar</sup>**), 128.7 (**C<sup>Ar</sup>**), 123.5 (**C=CH**), 90.2 (**C=CH**, only seen on HSQC spectrum), 53.1 (**CH<sub>2</sub>Ph**), 32.8 (**C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>**), 30.0 (**C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>**); **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 340.1773, Found: 340.1776 (Δ<sub>HRMS</sub> = 0.88 ppm); **R<sub>f</sub>** = 0.35 (10% MeOH in CHCl<sub>3</sub>); **t<sub>R</sub>** = 3.10 min (Method C).

### 2.1.2.2 Biological evaluations

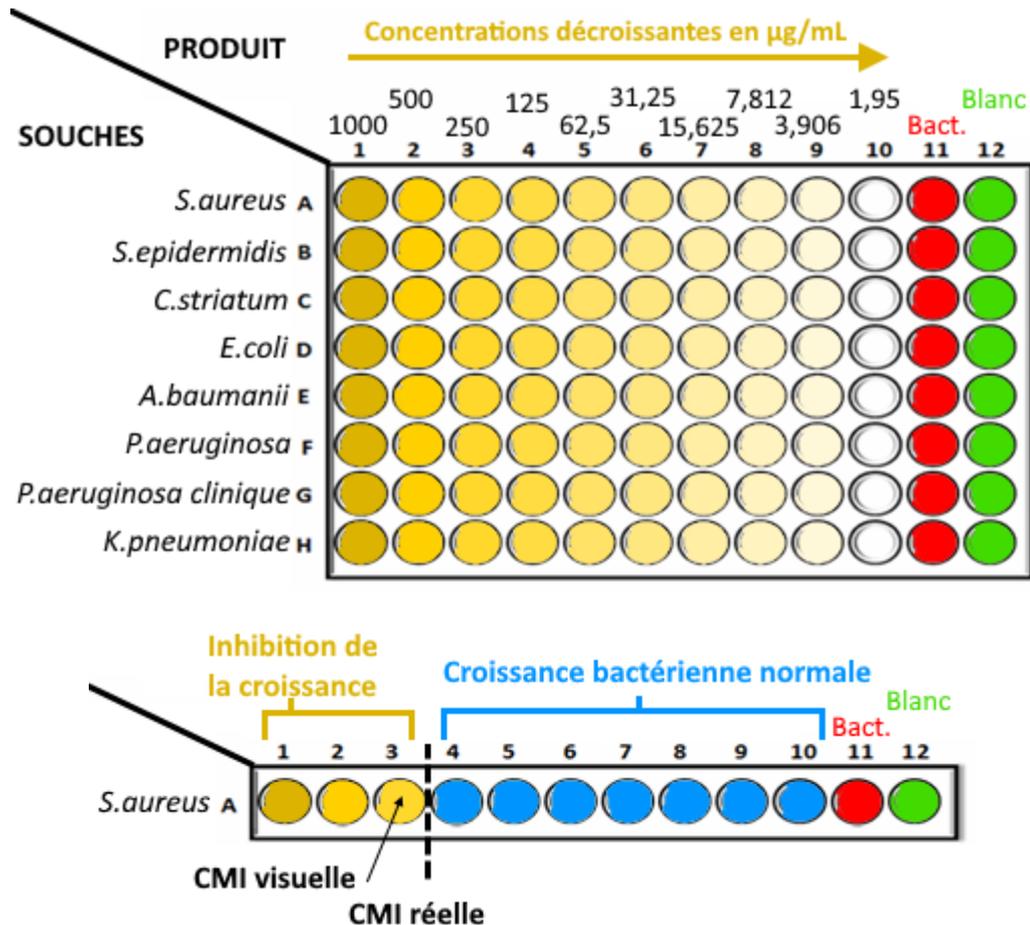
#### Brevianamide F & aza-W-Brevianamide F<sup>3</sup>

Les composés ont été solubilisés dans du DMSO à 100 mg/mL pour les 2 types de tests. Tous les tests ont été conduits sur les 8 souches suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium striatum*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, *P. aeruginosa* B25 and *Klebsiella pneumoniae*.

D'une part, les plaques 96 puits sont préparées de manière à avoir une concentration décroissante du produit le long de chaque ligne, avec une bactérie différente par ligne (Schéma 1). Ainsi sur chaque ligne on pourra lire la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice de croissance bactérienne) du composé pour la souche en présence : ce sera le premier puit en partant de la plus petite concentration où les bactéries ne se seront pas développées (Schéma 2).

---

<sup>3</sup> Performed by Elora Aubert (UMR 7200, Equipe CBIP, Illkirch)



Chaque puit contient 100 µL de milieu MHII (Mueller-Hinton, 22g/L), sauf le blanc (puit n°12) qui en contient 200 µL (sert à vérifier que la plaque n'a pas eu de contaminations).

Sont ensuite rajoutés dans les puits n°1, 100 µL de MHII supplémentaires et 2 µL du composé en solution à 100 mg/mL dans du DMSO.

Concentration en composé :

-  $m_{\text{composé\_puit1}} = 100 \mu\text{g}/\mu\text{L} * 2 \mu\text{L} = 200 \mu\text{g}$

-  $C_{\text{composé\_puit1}} = 200 \mu\text{g} / 200 \mu\text{L} = 1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (soit 1000 µg/mL).

Pourcentage en DMSO :  $(2\mu\text{L} / 200 \mu\text{L}) * 100 = 1\%$ .

Une dilution en cascade est ensuite faite jusqu'au puit n°10 en prélevant 100 µL du puit n°1 et en homogénéisant avec les 100 µL de milieu du puit suivant, et ainsi de suite (dilution au demi entre chaque puit).

Des pré-cultures de chaque souche ont été lancées la veille (MHII, 37°C, 220 rpm, pendant ~16h). La DO est mesurée et ajustée à 0,0002. 100µL de culture bactérienne diluée sont ensuite ajoutés dans les puits 1 à 11 de la ligne assignée, le puit 11 étant

un contrôle négatif afin de s'assurer que la souche pousse correctement. Les concentrations finales testées sont donc les suivantes du puit 1 au puit 10: 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62.5 µg/mL, 31.25 µg/mL, 15.625 µg/mL, 7.812 µg/mL, 3.906 µg/mL, 1.95 µg/mL, 0.975 µg/mL. Les plaques sont ensuite mises à l'étuve à 37°C et sous agitation à 750 rpm. Au bout de 24h, les CMI sont lues comme expliqué en début de paragraphe.

D'autre part, les boîtes ont été préparées de manière à avoir un dépôt de chaque composé avec un témoin positif (tobramycine : antibiotique aminoside) et un témoin négatif (DMSO) sur un même gel. Les gels ont été préparés à l'avance et conservés à 4°C (boîtes de Pétri, milieu Mueller-Hinton II 22g/L, agar 15 g/L). Des pré-cultures de chaque souche ont été lancées la veille (MHII, 37°C, 220 rpm, pendant ~16h). La DO est mesurée et ajustée à 0,002. 300 µL de culture bactérienne sont ensuite étalés sur le gel puis laissés séchés pendant environ 20 minutes. Sont ensuite déposés les composés en gouttes de 3 µL : aza-W-brevianamide F ; brevianamide F ; DMSO ; Tobramycine (100 mg/mL dans eau milliQ). Après avoir laissé sécher environ 10 minutes, les boîtes sont refermées et mises à l'étuve à 37°C. Au bout de 24h, la présence ou de l'absence d'halo d'inhibition de la croissance (zone où les bactéries ne se seront pas développées) a été observée pour les 4 dépôts.

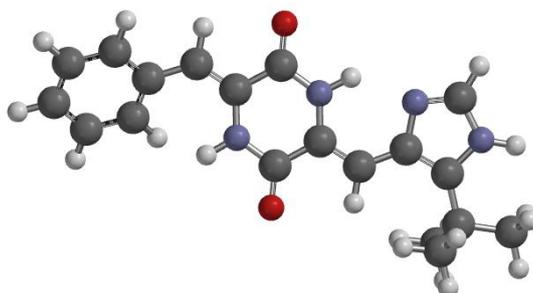
#### *Plinabuline & aza-F-plinabuline*<sup>4</sup>

96 heures après exposition à la plinabuline ou l'aza-F-plinabuline, les cellules ont étéensemencées à 5000 cellules/puit pour chaque lignée dans une plaque de 96 puits. Les cellules ont été incubées dans l'Incucyte® ZOOM (Essen BioScience) à 37°C pendant 7 jours (168 heures). Ce bioimageur permet, de manière non-invasive, une quantification en temps réel du comportement des cellules au sein d'un environnement stable et contrôlé ainsi qu'une capture d'images en haute définition. La confluence cellulaire reflétant la capacité de croissance cellulaire a été mesurée toutes les 4 heures. Les résultats ont été analysés par le logiciel Incucyte® et normalisés par rapport à la condition non traitée de chaque lignée cellulaire. Les résultats sont exprimés selon le ratio de confluence cellulaire en fonction du temps (heures)

---

<sup>4</sup> Performed by Chloé Bernhard and Sophie Martin (UMR 7020, LBP, Illkirch)

2.1.2.3 *Theoretical calculations, total energy and cartesian coordinates*



**I-3**

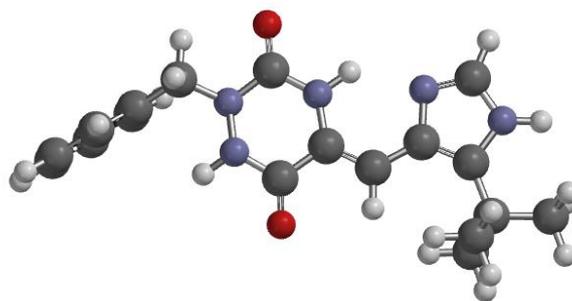
Electronic Energy = -1122.777366 a.u.

Number of imaginary frequencies: 0

Cartesian Coordinates (Angstroms)

Atom	X	Y	Z
-----	-----	-----	-----
1 C C1	1.0923685	0.5062463	-0.3240529
2 O O1	1.7375596	-0.0105029	-1.2303823
3 C C4	-0.4106081	1.8501062	1.7926074
4 O O2	-1.0682543	2.4129663	2.6604738
5 C C3	0.9889870	2.2556049	1.4460355
6 C C6	-0.2700461	0.0689646	0.0755753
7 N N1	-0.9142605	0.7908106	1.0798514
8 H H5	-1.8627953	0.4845226	1.3098136
9 N N2	1.6059593	1.5617303	0.4004895
10 H H4	2.5097566	1.8830091	0.0742216
11 C C2	-0.8221236	-0.9929621	-0.5654712
12 H H3	-0.1890863	-1.4348729	-1.3242466
13 C C5	-2.1313797	-1.5535292	-0.3314709
14 C C7	-2.7349050	-2.6529580	-0.9461937
15 N N3	-2.9968606	-1.0061715	0.6121505
16 N N4	-3.9741054	-2.7380927	-0.3425233
17 H H8	-4.6780795	-3.4307130	-0.5500278
18 C C8	-4.0828773	-1.7362706	0.5775431
19 H H9	-4.9670324	-1.5921052	1.1834939
20 C C9	-2.2763266	-3.6227194	-2.0232847
21 C C10	-3.3659270	-4.6786281	-2.3063142
22 H H6	-3.0154493	-5.3737061	-3.0764466
23 H H10	-4.2920649	-4.2234374	-2.6802423
24 H H11	-3.5979222	-5.2756571	-1.4151619
25 C C11	-1.9895071	-2.8539101	-3.3359727

26 H H2	-1.6581571	-3.5484837	-4.1171159
27 H H12	-1.2080047	-2.1009943	-3.2025233
28 H H13	-2.8899288	-2.3420758	-3.6936128
29 C C12	-0.9982662	-4.3601540	-1.5557552
30 H H7	-0.6560843	-5.0529084	-2.3339360
31 H H14	-1.1924550	-4.9379741	-0.6452596
32 H H15	-0.1820042	-3.6644335	-1.3434724
33 C C13	1.5497116	3.2763567	2.1357813
34 H H16	0.8729045	3.7425440	2.8458291
35 C C14	2.8883107	3.8551564	2.0145875
36 H H1	3.9704293	2.0478495	1.4924738
37 C C15	4.0355850	3.1212302	1.6471196
38 H H17	2.1859548	5.8009348	2.6217359
39 C C16	3.0539814	5.2223603	2.3158242
40 H H19	4.3939161	6.8963066	2.4444025
41 C C17	4.2973726	5.8384017	2.2148490
42 H H20	6.3903990	5.5799493	1.7473565
43 C C18	5.4183598	5.1007197	1.8244195
44 H H18	6.1512346	3.1485404	1.2751192
45 C C20	5.2817212	3.7389494	1.5517124



**37b**

Electronic Energy = -625.955914 a.u.

Number of imaginary frequencies: 0

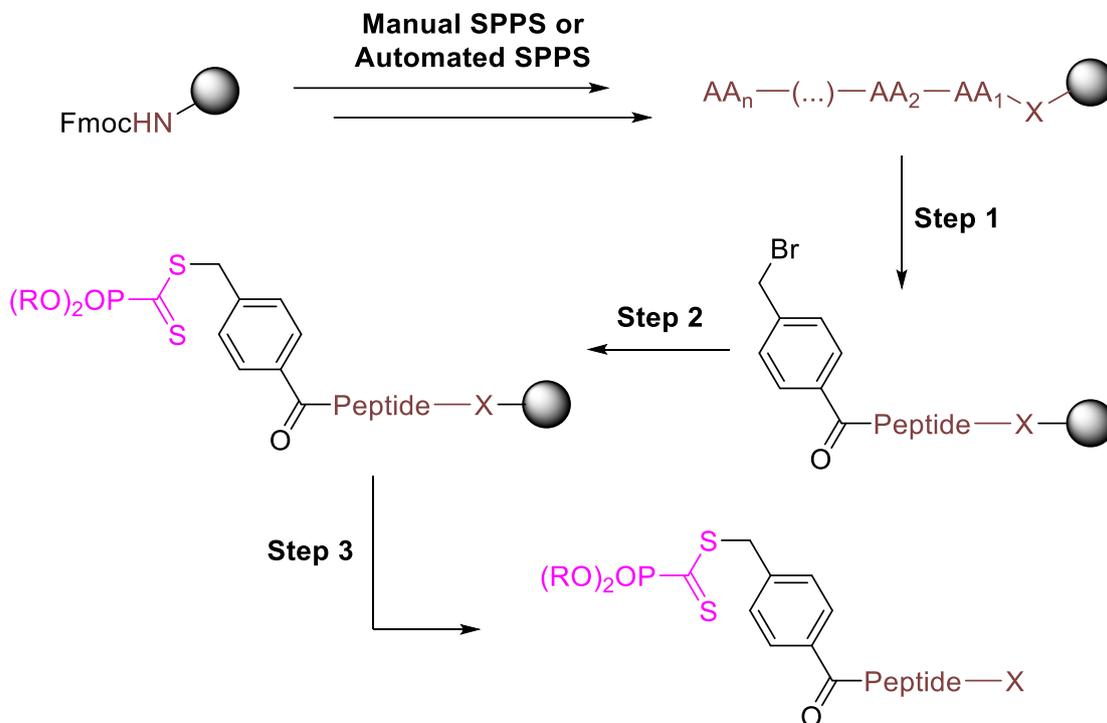
Cartesian Coordinates (Angstroms)

Atom	X	Y	Z
1 C C1	1.0923683	0.5062462	-0.3240527
2 O O1	1.7375592	-0.0105029	-1.2303821
3 C C4	-0.4106080	1.8501058	1.7926070
4 O O2	-1.0682541	2.4129658	2.6604732
5 C C3	0.9889868	2.2556044	1.4460352
6 C C6	-0.2700460	0.0689646	0.0755753
7 N N1	-0.9142603	0.7908104	1.0798511
8 H H5	-1.8627949	0.4845225	1.3098133
9 N N2	1.6059590	1.5617299	0.4004894
10 H H4	2.5097560	1.8830087	0.0742216
11 C C2	-0.8221234	-0.9929618	-0.5654711
12 H H3	-0.1890862	-1.4348726	-1.3242463
13 C C5	-2.1313792	-1.5535289	-0.3314708
14 C C7	-2.7349044	-2.6529575	-0.9461935
15 N N3	-2.9968600	-1.0061713	0.6121504
16 N N4	-3.9741045	-2.7380921	-0.3425232
17 H H8	-4.6780785	-3.4307123	-0.5500277
18 C C8	-4.0828765	-1.7362702	0.5775430
19 H H9	-4.9670313	-1.5921048	1.1834937
20 C C9	-2.2763262	-3.6227186	-2.0232842
21 C C10	-3.3659263	-4.6786271	-2.3063136
22 H H6	-3.0154487	-5.3737050	-3.0764459
23 H H10	-4.2920640	-4.2234365	-2.6802417
24 H H11	-3.5979214	-5.2756559	-1.4151616
25 C C11	-1.9895067	-2.8539094	-3.3359720
26 H H2	-1.6581567	-3.5484829	-4.1171150
27 H H12	-1.2080044	-2.1009939	-3.2025226
28 H H13	-2.8899282	-2.3420753	-3.6936120
29 C C12	-0.9982659	-4.3601530	-1.5557549

30 H H7	-0.6560841	-5.0529073	-2.3339355
31 H H14	-1.1924547	-4.9379730	-0.6452594
32 H H15	-0.1820041	-3.6644327	-1.3434721
33 C C13	1.5497113	3.2763560	2.1357809
34 H H16	0.8729043	3.7425432	2.8458285
35 C C14	2.8883100	3.8551555	2.0145871
36 H H1	3.9704284	2.0478491	1.4924735
37 C C15	4.0355841	3.1212296	1.6471192
38 H H17	2.1859543	5.8009336	2.6217353
39 C C16	3.0539808	5.2223592	2.3158236
40 H H19	4.3939151	6.8963051	2.4444020
41 C C17	4.2973717	5.8384004	2.2148486
42 H H20	6.3903976	5.5799481	1.7473561
43 C C18	5.4183586	5.1007186	1.8244191
44 H H18	6.1512332	3.1485398	1.2751189
45 C C20	5.2817201	3.7389486	1.5517121

## 2.2. Partie II : Fonctionnalisation de peptides par réaction « click » de thia-Diels-Alder pour des applications en imagerie

### 2.2.1. *General procedure for solid phase peptide synthesis*



**Manual SPPS:** The amino acids suitable for a Fmoc/*t*Bu strategy were introduced on a rink resin (0.69 mmol.g<sup>-1</sup>) or a Wang-Phe (0.70 mmol.g<sup>-1</sup>) following a classical procedure for manual solid phase peptide synthesis (SPPS). It was performed in polypropylene tubes equipped with polyethylene frits and polypropylene caps using an orbital agitator shaking device. The Fmoc-protected resin was swollen for 1 h in DCM and the excess of solvent was removed by filtration. N-terminal-Fmoc-group was removed by using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min). All Fmoc-deprotection steps were performed in the same way. The piperidine solution was drained off and the resin was washed three times with successively DMF, DCM and MeOH. All Fmoc-protected amino acids (4 equiv) were coupled in DMF (2.5 mL per 0.1 mmol of resin) for 45 min using HATU (3.8 equiv) and DIEA (12 equiv) as activating agents. The excess of solvent was removed by filtration and the resin was washed three times with successively DMF, DCM and MeOH. With the three amino acids coupled on the resin, N-terminal-Fmoc-group was removed by using a 20% (v/v) solution of piperidine in DMF (2 times for 15 min).

**Automated SPPS:** The amino acids suitable for a Fmoc/*t*Bu strategy were introduced on a Wang-Phe resin (0.70 mmol.g<sup>-1</sup>) following a classical procedure for manual solid phase peptide synthesis (SPPS). It was performed using a Liberty Blue synthesizer (CEM, France) by standard Fmoc solid-phase chemistry on a preloaded Wang resin (0.67 mmol.g<sup>-1</sup> resin, 0.1 mmol scale), or on a Rink amide resin (0.42 mmol.g<sup>-1</sup>) using DMF as solvent. The coupling of each amino acid (2M) was carried out using DIC (1M) and Oxyma (1M). Fmoc groups were removed using a 20% v/v solution of piperidine in DMF. Washing steps were performed using DMF. At the end of peptide synthesis, the resin was washed with DCM and MeOH and then dried in DCM.

**Step 1:** 4-(bromomethyl)benzoic acid (10 equiv) was dissolved in DCM at 0 °C in a round-bottom flask and a solution of DIC (5 equiv) in DCM was added. The reaction mixture was stirred 20 min at 0 °C and evaporated under reduced pressure. The resulting slurry was suspended in DMF (3 mL per 0.1 mmol of resin) and transferred in the tube containing the resin, previously swollen in DMF for 20 min and filtered. DMAP (0.1 equiv) was added and the resin was shaken for 1 hour. The excess of solvent was removed by filtration and the resin was washed three times with successively DMF, DCM and MeOH and a final DCM wash was performed.

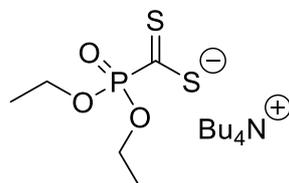
**Step 2:** Phosphonodithioformate salt **38a** or **38b** (3 equiv) was then dissolved in DCM (3 mL per 0.1 mmol of resin) and added on the resin which was shaken for 3 h before being filtered and washed as previously.

**Step 3:** Peptide cleavage and deprotection was performed with a solution of TFA/TIS (6 mL per 0.1 mmol of resin, 97/3 v/v).

## 2.2.2. Application au radiomarquage de peptide a l'aide du $^{18}\text{F}$

### 2.2.2.1 Chemical syntheses

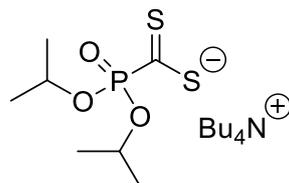
#### Tetrabutylammonium (diethoxyphosphoryl)methanedithioate (**38a**)



Diethyl phosphite (1 equiv, 0.83 g, 0.77 mL, 6 mmol) was placed in DMF (35 mL). Then cesium carbonate (3 equiv, 5.86 g, 18 mmol) and TBAI (3 equiv, 6.65 g, 18 mmol) were added under inert atmosphere. This solution was stirred for 10 min at room temperature then  $\text{CS}_2$  (3 equiv, 1.37 g, 1.09 mL, 18 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for an additional hour at the same temperature. The salts were filtered and washed with EtOAc before evaporating the filtrate under reduced pressure. The residue was taken in EtOAc/*n*-heptane (10 mL/5 mL), filtered and washed with *n*-heptane. Finally, the filtrate was evaporated under reduced pressure to give the corresponding dithioformate salt **38a** as a brown oil (1.87 g, **68%**). Product **38a** was used directly in the next step.

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.23 (p,  $J = 7.1$  Hz, 4H, P-O-**CH**<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.29 - 3.17 (m, 8H, N(**CH**<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>), 1.71 - 1.55 (m, 8H, N(CH<sub>2</sub>-**CH**<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>), 1.43 (h,  $J = 7.4$  Hz, 8H, N(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-**CH**<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>), 1.31 (td,  $J = 7.0, 0.7$  Hz, 6H, P-O-CH<sub>2</sub>-**CH**<sub>3</sub>), 0.98 (t,  $J = 7.3$  Hz, 12H, N(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-**CH**<sub>3</sub>)<sub>4</sub>).  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  63.4 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 7.2$  Hz, P-O-**CH**<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 58.9 (N(**CH**<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>), 24.1 (N(CH<sub>2</sub>-**CH**<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>), 19.8 (N(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-**CH**<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>), 16.5 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 6.3$  Hz, P-O-**CH**<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 13.7 (N(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-**CH**<sub>3</sub>)<sub>4</sub>).  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -2.5.

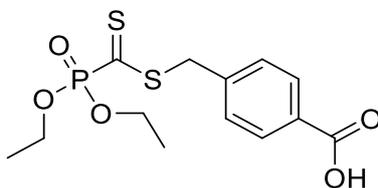
### Tetrabutylammonium (diisopropoxyphosphoryl)methanedithioate (**38b**)



To a solution of diisopropyl phosphite (1 equiv., 1.66 g, 1.67 mL, 10 mmol) in anhydrous DMF (75 mL) were added cesium carbonate (3 equiv., 9.77 g, 30 mmol) and TBAI (3 equiv., 11.081 g, 30 mmol). The reaction media was stirred for 10 minutes at room temperature under an argon atmosphere. Then CS<sub>2</sub> (3 equiv., 13.36 mmol, 1.08 mL) was added dropwise and the solution was stirred overnight at room temperature. A pink/reddish solution is observed. The salts were filtered and washed with ethyl acetate. After evaporation of solvents, the filtrate is treated again with ethyl acetate/heptane (2/1, v/v) (30 mL), filtered, washed with heptane, dried and concentrated under vacuo. Salt **38b** (4.5 g, **93%**) salt was obtained as a dark red oil. Product **38a** was used directly in the next step.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.81 (dp, J = 7.1, 6.2 Hz, 2H, CH(iPr)), 3.32 – 3.23 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 1.64 (dq, J = 11.8, 7.6 Hz, 8H, CH<sub>2</sub>), 1.44 (h, J = 7.3 Hz, 8H, CH<sub>2</sub>), 1.34 (d, J = 6.2 Hz, 12H, CH<sub>3</sub> (iPr)), 0.99 (t, J = 7.3 Hz, 12H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>). **<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -3.35.

### 4-(((diethoxyphosphoryl)carbonothioyl)thio)methyl)benzoic acid (**39a**)

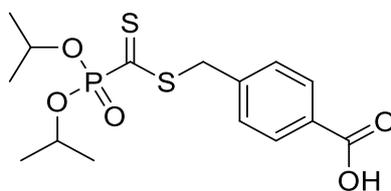


To a solution of dithioester salt **38a** (1 equiv, 640 mg, 1.4 mmol) in ACN (6 mL) was added 4-(bromomethyl)benzoic acid (1.5 equiv, 450 mg, 2.1 mmol). The reaction mixture was stirred overnight and then diluted in EtOAc and washed with brine. The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. Purification on gel silica column chromatography with EtOAc/*n*-heptane/AcOH (59/40/1) gave the

corresponding dithioester as a pink oil. The product was precipitated in pentane with the help of ultrasounds to give **39a** as a pink amorphous solid (310 mg, 63%).<sup>304</sup>

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.98 - 7.80 (m, 2H, **CH<sup>Ar</sup>**), 7.28 - 7.17 (m, 2H, **CH<sup>Ar</sup>**), 4.38 (s, 2H, **S-CH<sub>2</sub>**), 4.23 - 4.01 (m, 4H, **P-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>**), 1.21 (td, *J* = 7.1, 0.8 Hz, 6H, **P-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>**). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 227.6 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 176.1 Hz, **C=S**), 170.6 (**C=O**), 139.9 (**C<sub>q</sub><sup>Ar</sup>**), 130.6 (**C<sup>Ar</sup>**), 129.4 (**C<sup>Ar</sup>**), 129.3 (**C<sub>q</sub><sup>Ar</sup>**), 65.0 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 7.0 Hz, **P-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>**), 39.8 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 2.9 Hz, **S-CH<sub>2</sub>**), 16.3 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 6.2 Hz, **P-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>**). **<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -3.0; **R<sub>f</sub>** = 0.30 (70% EtOAc in *n*-heptane + 1% AcOH); **t<sub>R</sub>** = 4.06 min (Method D).

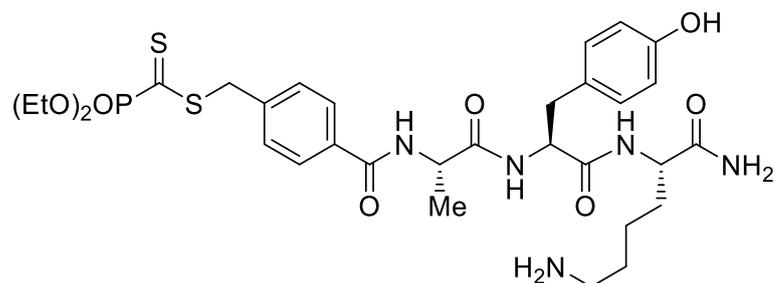
#### 4-(((diisopropoxyphosphoryl)carbonothioyl)thio)methyl)benzoic acid (**39b**)



To a solution of dithioester salt **38b** (1 equiv, 1.1 g, 2.3 mmol) in ACN (11 mL) was added 4-(bromomethyl)benzoic acid (1.5 equiv, 779 mg, 3.6 mmol). The reaction mixture was stirred overnight and then diluted in EtOAc and washed with brine. The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. Purification on gel silica column chromatography with EtOAc/*n*-heptane/AcOH (59/40/1) gave the corresponding dithioester as a pink oil. The product was precipitated in pentane with the help of ultrasounds to give **39b** as a pink amorphous solid (503 mg, **59%**).<sup>305</sup>

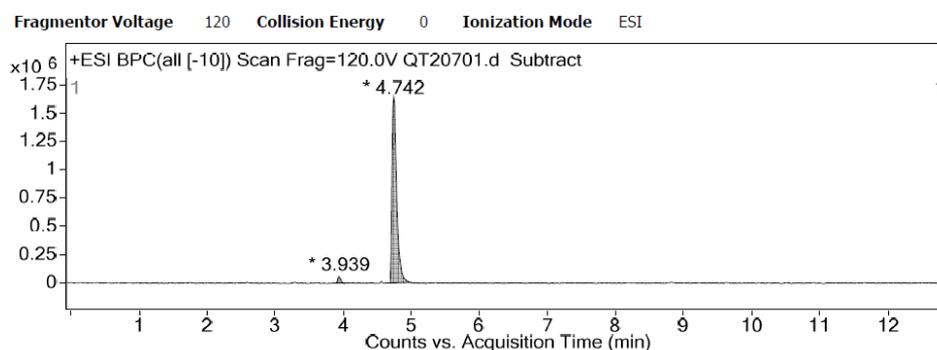
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.95 – 7.84 (m, 2H, **H<sup>Ar</sup>**), 7.30 – 7.21 (m, 2H, **H<sup>Ar</sup>**), 4.79 – 4.63 (m, 2H, **CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**), 4.37 (s, 2H, **CH<sub>2</sub>S**), 1.21 (dd, *J* = 22.8, 5.9 Hz, 12H, **CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 229.3 (d, *J* = 176.8 Hz, **C=S**), 170.6 (**C=O**), 140.1 (**C<sub>q</sub><sup>Ar</sup>**), 130.6 (**CH<sup>Ar</sup>**), 129.4 (**CH<sup>Ar</sup>**), 129.2 (**C<sub>q</sub><sup>Ar</sup>**), 74.2 (d, *J* = 7.1 Hz, **CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**), 39.9 (d, *J* = 2.8 Hz, **CH<sub>2</sub>S**), 24.1 (d, *J* = 3.7 Hz, **CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**), 23.7 (d, *J* = 5.5 Hz, **CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**); **<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -4.4; **R<sub>f</sub>** = 0.30 (70% EtOAc in *n*-heptane + 1% AcOH); **t<sub>R</sub>** = 4.06 min (Method D).

## Dithioester-(Ala-Tyr-Lys)-NH<sub>2</sub> (40)

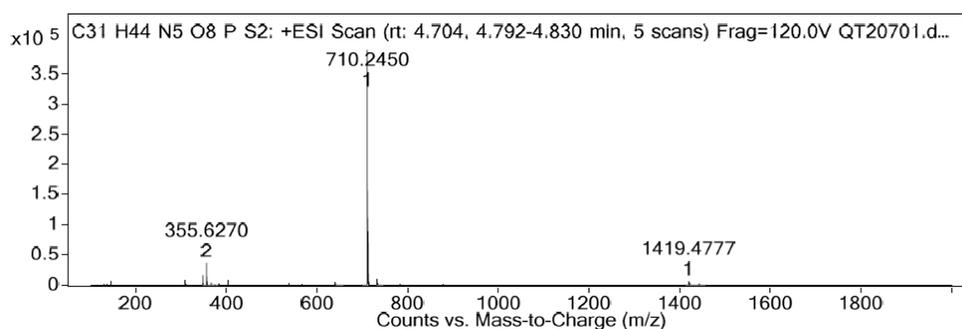


For phosphonodithioester-tripeptide **40**, peptide elongation was performed following the **manual SPPS** method on 0.11 mmol and **38a** was used in **step 2**. After **step 3**, the TFA solution was filtered and the resin was then washed with DCM, solvents were evaporated and the desired dithioester-peptide was precipitated by trituration in cold Et<sub>2</sub>O and washed by trituration three times with Et<sub>2</sub>O (the supernatant was removed with a syringe each time). The resulting dithioester-tripeptide **40** was isolated as a pink amorphous solid (73 mg, 81%) used without further purification.

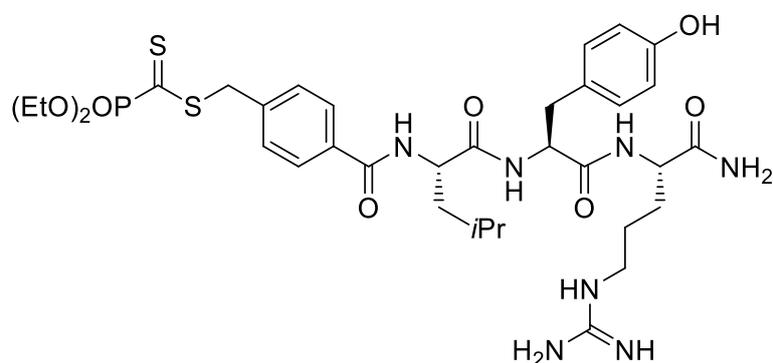
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO)  $\delta$  9.16 (s, 1H), 8.55 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 7.89 (dd,  $J = 8.1$ , 3.7 Hz, 2H), 7.83 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.65 (s, 3H), 7.50 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.20 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.00 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 6.58 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 4.66 (s, 2H), 4.39 (q,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 4.16 (dtd,  $J = 8.8$ , 4.3, 2.0 Hz, 4H), 2.93 (dd,  $J = 14.0$ , 4.6 Hz, 1H), 2.75 (q,  $J = 8.2$  Hz, 4H), 1.73 - 1.62 (m, 1H), 1.50 (s, 4H), 1.35 - 1.20 (m, 11H); **<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR** (202 MHz, DMSO)  $\delta$  -2.64; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>31</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>PS<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 710.2447, Found: 710.2450 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 0.42$  ppm);  $t_{\text{R}} = 3.14$  min (Method D).



Integration Peak List									
Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%		
1	3.858	3.939	4.035	57475.4	162269.53	2.01	1.97		
2	4.678	4.742	5.012	1642571.3	8065370.36	100	98.03		



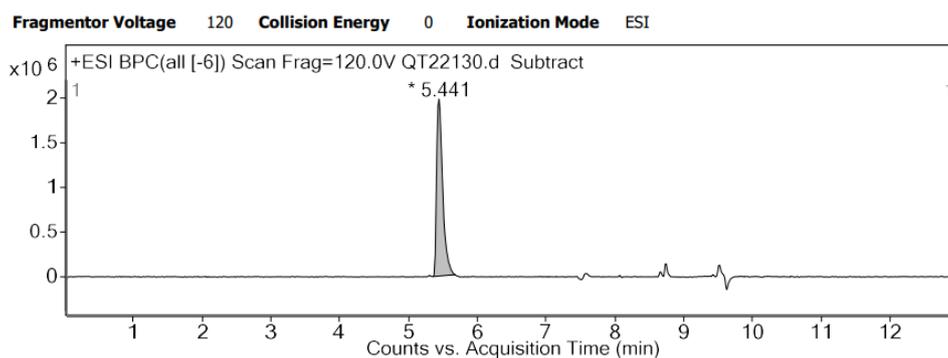
### Dithioester-(Leu-Tyr-Arg)-NH<sub>2</sub> (**41**)



For phosphonodithioester-tripeptide **41**, peptide elongation was performed following the **manual SPPS** method on 0.25 mmol and **39b** was used in **step 2**. After **step 3**, the TFA solution was filtered and the resin was then washed with DCM, solvents were evaporated and the desired dithioester-peptide was precipitated by trituration in cold Et<sub>2</sub>O and washed by trituration three times with Et<sub>2</sub>O (the supernatant was removed with a syringe each time). The resulting pink solid was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5 μm, 19 × 150 mm) using a linear gradient (5% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL.min<sup>-1</sup>) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to give dithioester-tripeptide **41** as a pink amorphous solid (113 mg, **45%**).

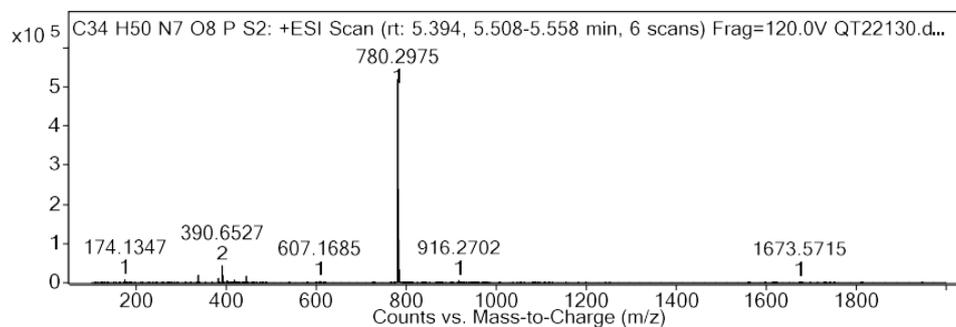
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO) δ 9.16 (s, 1H), 8.49 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.86 - 7.79 (m, 2H), 7.60 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.55 - 7.46 (m, 2H), 7.25 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.02 - 6.94 (m, 3H), 6.65 - 6.54 (m, 2H), 4.66 (s, 2H), 4.43 (tt, *J* = 10.2, 6.1 Hz, 2H), 4.24 - 4.10 (m, 5H), 3.08 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H),

2.93 (dd,  $J = 14.0, 4.5$  Hz, 1H), 2.73 (dd,  $J = 14.0, 9.1$  Hz, 1H), 1.77 - 1.36 (m, 7H), 1.27 (t,  $J = 7.0$  Hz, 6H), 0.88 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H), 0.83 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H).;  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (202 MHz, DMSO)  $\delta$  -2.63;  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  229.4 (d,  $J = 172.2$  Hz), 173.5, 172.4, 171.3, 166.6, 157.2, 156.3, 138.1, 134.0, 130.6, 129.6, 128.4, 128.0, 115.3, 64.9 (d,  $J = 6.8$  Hz), 54.5, 52.6, 52.4, 40.9, 36.8, 29.6, 25.5, 24.8, 23.4, 21.9, 16.6 (d,  $J = 5.8$  Hz); HRMS (ESI-TOF): Calculated for  $\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{N}_7\text{O}_8\text{PS}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 780.2978, Found: 780.2975 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 0.38$  ppm);  $t_{\text{R}} = 3.92$  min (Method C);  $t_{\text{R}} = 3.61$  min (Method D).

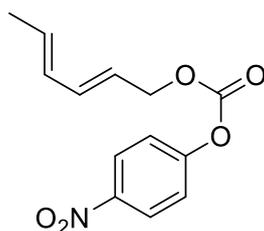


#### Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	5.357	5.441	5.677	1984208.63	12389325.59	100	100



### (2E,4E)-hexa-2,4-dien-1-yl (4-nitrophenyl) carbonate (**44**)

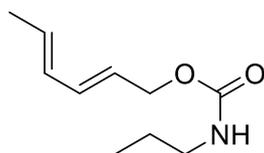


CAS RN : 233272-08-7

(2E,4E)-hexadien-1-ol (1 equiv, 1 g, 1.15 mL, 10.2 mmol) was dissolved in DCM (50 mL) and 4-nitrophenyl chloroformate (1.1 equiv, 2.3 g, 11.2 mmol) was added. The mixture was cooled to -10 °C in an ice-salt bath before TEA (2 equiv, 2.06 g, 2.83 mL, 20.4 mmol) was added dropwise. The reaction mixture turned yellow and was stirred letting it return to room temperature overnight. The reaction mixture was partitioned between EtOAc (15 mL mmol<sup>-1</sup>) and saturated NH<sub>4</sub>Cl<sub>(aq)</sub> (7.5 mL mmol<sup>-1</sup>). The organic phase was washed with saturated NH<sub>4</sub>Cl<sub>(aq)</sub> (2 × 7.5 mL mmol<sup>-1</sup>), dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and concentrated under reduced pressure. The crude product is purified by silica gel chromatography (5% EtOAc in *n*-heptane) affording the desired product **44** as an off-white amorphous solid (1.59 g, **59%**).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.19 - 8.10 (m, 2H, CH<sup>Ar</sup>), 7.34 - 7.17 (m, 2H, CH<sup>Ar</sup>), 6.28 - 6.19 (m, 1H, CH<sup>diene</sup>), 6.02 - 5.89 (m, 1H, CH<sup>diene</sup>), 5.75 - 5.64 (m, 1H, CH<sup>diene</sup>), 5.61 - 5.51 (m, 1H, CH<sup>diene</sup>), 4.64 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH=CH-CH<sub>2</sub>-O), 1.65 (dd, *J* = 6.7, 1.6 Hz, 3H, CH=CH-CH<sub>3</sub>). R<sub>f</sub> ≈ 0.3 (5% EtOAc in *n*-heptane).

### (2E,4E)-hexa-2,4-dien-1-yl propylcarbamate (**45**)

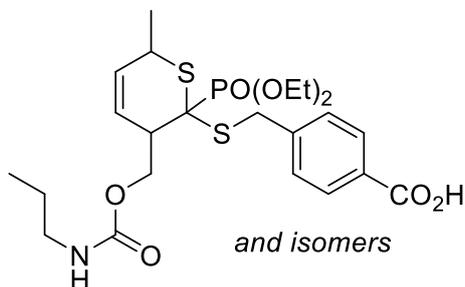


To a solution of a propylamine (1 equiv, 180 mg, 0.25 mL, 3.0 mmol) in DCM (7 mL) was added TEA (2 equiv, 615 mg, 0.84 mL, 6.1 mmol) and a solution of **44** (1 equiv, 800 mg, 3.0 mmol) in DCM (3.55 mL). The reaction mixture was left overnight at room temperature. The solvent was removed in vacuo and the resulting yellow oil was

redissolved in DCM and washed several times with brine, saturated NaHCO<sub>3</sub>, and 2 M NaOH until the organic phase was colourless. The organic phase was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and concentrated in vacuo to give **45** a pale yellow oil (400 mg, **71%**). Product **45** was used without further purification.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.29 - 6.15 (m, 1H, **CH<sup>diene</sup>**), 6.08 – 6.00 (m, 1H, **CH<sup>diene</sup>**), 5.80 - 5.67 (m, 1H, **CH<sup>diene</sup>**), 5.67 – 5.56 (m, 1H, **CH<sup>diene</sup>**), 4.73 (s, 1H, **NH**), 4.54 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH=CH-**CH<sub>2</sub>**-O), 3.12 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H, NH-**CH<sub>2</sub>**), 1.74 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH=CH-**CH<sub>3</sub>**), 1.50 (h, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>**-CH<sub>3</sub>), 0.90 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>3</sub>**); **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 154.4, 134.3, 130.9, 130.6, 124.6, 65.2, 42.8, 23.2, 18.1, 11.2. **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>NNaO<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 206.1157, Found : 206.1157 (Δ<sub>HRMS</sub> = 0 ppm); **R<sub>f</sub>** ≈ 0.3 (5% EtOAc in *n*-heptane).

**4-(((2-(diethoxyphosphoryl)-6-methyl-3-(((propylcarbamoyl)oxy)methyl)-3,6-dihydro-2H-thiopyran-2-yl)thio)methyl)benzoic acid (46)**



Dithioester **39a** (1 equiv, 35 mg, 0.1 mmol) was dissolved in IPA (1.5 mL) and diene **45** (1 equiv, 18 mg, 0.1 mmol) was dissolved in *i*PrOH (1.5 mL) and H<sub>2</sub>O (7 mL). The diene solution was heated to 60°C and the solution got clearer before the dithioester solution was added. The reaction was complete after 24 hours (checked by HPLC). Isopropanol and water were evaporated, then the residue was dissolved in DMSO and directly purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5 μm, 19 × 150 mm) using a linear gradient (10% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL·min<sup>-1</sup>) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Two fractions containing the desired products were freeze-dried to give the purified products **46** as a white amorphous foam (25 mg, **47%**).

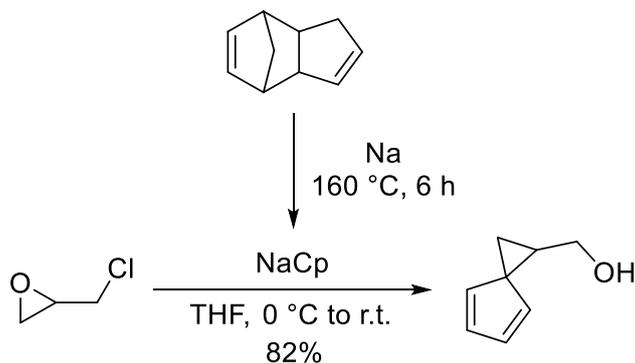
**<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 19.9, 19.6, 19.5, 18.6 (17/25/25/33); **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>23</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>7</sub>PS<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 532.1593, Found: 532.1596 (Δ<sub>HRMS</sub> = 0.19 ppm); t<sub>R</sub> = 4.77 - 4.83min (Method B).

Two fractions containing each one pair of isomers were isolated for NMR analysis.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.00 (dd, *J* = 8.5, 2.3 Hz, 2H), 7.45 - 7.36 (m, 2H), 6.00 - 5.87 (m, 1H), 5.86 - 5.80 (m, 1H), 4.71 (d, *J* = 10.3 Hz, 2H), 4.43 - 4.19 (m, 5H), 4.16 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.12 (s, 4H), 1.49 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.43 (dd, *J* = 7.2, 2.4 Hz, 3H), 1.41 - 1.34 (m, 6H), 0.93 - 0.84 (m, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.0, 156.2, 143.1, 132.1, 130.4, 129.6, 128.2, 65.4 (d, *J* = 7.4 Hz), 65.2, 64.0 (d, *J* = 7.9 Hz), 42.8, 40.4, 35.5, 35.1, 23.2, 20.9, 16.5 (d, *J* = 5.5 Hz), 16.4 (d, *J* = 5.9 Hz), 11.2. **<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 19.6.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.98 - 7.92 (m, 2H), 7.42 - 7.34 (m, 2H), 5.71 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 5.62 (m, 1H), 4.56 (s, 1H), 4.34 - 4.17 (m, 5H), 4.10 (d, *J* = 12.1 Hz, 2H), 3.52 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 3.07 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.63 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 1.45 (h, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 1.25 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.85 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.11, 143.32, 130.84, 130.44, 129.51, 128.11, 125.83, 66.4, 64.9, 55.7, 42.9, 39.54, 36.46, 32.48, 23.18, 18.99, 16.45 (d, *J* = 5.7 Hz), 16.37 (d, *J* = 5.8 Hz), 11.19. **<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 18.2.

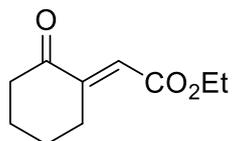
### Spiro[2.4]hepta-4,6-dien-1-ylmethanol (**47**)



A two-necked round bottom flask greased on every joint was first carefully put under vacuo, flame-dried before being flushed with argon. This process was repeated twice. Then dicyclopentadiene (23 mL) was added to the flask followed by sodium metal (2.35 equiv, 25.2 mmol, 0.88 g). The suspension was heated to reflux for 7 hours, sodium melted and a white solid precipitated. After 7 hours, the solid is decanted and the supernatant was carefully removed. The white solid was then washed three times with pentane by removal of the pentane supernatant. Then 80 mL of THF were added and a brown solution was obtained. This solution was cooled to 0 °C with an ice bath and a solution of epichlorohydrin (1 equiv, 10.7 mmol, 0.84 mL) in THF (12.5 mL) was added dropwise. The ice bath was removed and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction was then quenched with water and the solution is poured in a separatory funnel. Saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> (70 mL) is added along with Et<sub>2</sub>O (70 mL) and the organic phase is separated. The aqueous phase is extracted with Et<sub>2</sub>O (50 mL) and the organic phases are gathered, washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated. The crude mixture was purified by silica gel chromatography (33% EtOAc in *n*-Heptane) to afford the product **47** as a clear oil (1.08 g, **82%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.64 (ddd, *J* = 5.2, 2.3, 1.5 Hz, 1H, **CH<sup>vinyl</sup>**), 6.50 (ddd, *J* = 5.1, 2.2, 1.4 Hz, 1H, **CH<sup>vinyl</sup>**), 6.26 (ddd, *J* = 5.2, 2.1, 1.4 Hz, 1H, **CH<sup>vinyl</sup>**), 6.11 (ddd, *J* = 5.1, 2.0, 1.5 Hz, 1H, **CH<sup>vinyl</sup>**), 3.99 (dd, *J* = 11.8, 6.0 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>-OH**), 3.58 (dd, *J* = 11.7, 8.6 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>-OH**), 2.44 (tdd, *J* = 8.6, 7.1, 5.9 Hz, 1H, **CH<sup>cycloprop</sup>**), 1.87 (dd, *J* = 8.6, 4.4 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub><sup>cycloprop</sup>**), 1.68 (dd, *J* = 7.1, 4.4 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub><sup>cycloprop</sup>**), 1.45 (s, 1H, **OH**); **R<sub>f</sub>** = 0.22 (33% EtOAc in *n*-Heptane).

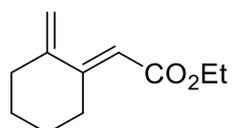
### Ethyl (E)-2-(2-oxocyclohexylidene)acetate (**52**)



Following a procedure described in the literature,<sup>306</sup> to a mixture of cyclohexanone (1.15 equiv, 6.63 g, 7 mL, 67.6 mmol) in toluene (90 mL) was added morpholine (1.73 equiv, 8.86 g, 8.95 mL, 101.7 mmol) and the reaction vessel was fitted with a Dean Stark apparatus and heated to 130 °C for 16 hours. The reaction mixture was cooled to room temperature and Ethyl glyoxylate (1 equiv, 12 g, 11.63 mL, 58.8 mmol) and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.04 equiv, 0.45 g, 2.4 mmol) were added and the mixture was refluxed with a Dean Stark for a further 24 hours. The reaction mixture was cooled to room temperature and solvent removed in vacuo. The crude residue was dissolved in EtOH (10 mL) and treated with HCl (2M, 10 mL) and stirred at room temperature for 30 minutes. Water (30 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 x 40 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo before being purified via column chromatography (5% EtOAc in *n*-heptane) to afford **52** as an oil (6.71 g, **63%**).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.47 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, C=CH-CH<sub>2</sub>), 4.20 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.09 (td, *J* = 6.5, 2.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-C=CH), 2.53 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CO), 1.98 - 1.87 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.87 - 1.74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). *R*<sub>f</sub> ≈ 0.3 (5% EtOAc in *n*-heptane).

### Ethyl (E)-2-(2-methylenecyclohexylidene)acetate (**53**)

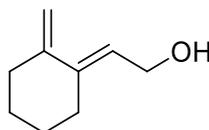


Following a procedure described in the literature,<sup>306</sup> to a suspension of methyltriphenylphosphonium bromide (1 equiv, 11.5 g, 32 mmol) in dry THF (96 mL) was added *n*-BuLi (1 equiv, 12.9 mL, 32 mmol, 2.5 M in hexanes) at -78 °C and the mixture was stirred and allowed to warm to room temperature. After 45 minutes the mixture

was cooled back down to -78 °C and diene **52** (1 equiv, 5.9 g, 32 mmol) in THF (32 mL) was added dropwise over 10 minutes. The mixture was stirred at this temperature for a further 30 minutes before being warmed to 0 °C, quenched with water (100 mL), extracted with DCM (3 x 100 mL), dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated in vacuo. The crude product was purified by gel column chromatography (2% EtOAc in *n*-heptane) to afford the pure product **53** as a clear to pale yellow oil (3.47 g, **60%**). (*Note:* this dienylyl esters are isolable however, they are known to decompose within two days in the fridge).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.83 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H, C=CH-CH<sub>2</sub>), 4.99 (dt, *J* = 2.0, 1.0 Hz, 1H, C=CH<sub>2</sub>), 4.76 (q, *J* = 1.4 Hz, 1H, C=CH<sub>2</sub>), 4.16 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.94 – 2.88 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.35 – 2.29 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.73 – 1.64 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). *R<sub>f</sub>* ≈ 0.3 (2% EtOAc in *n*-heptane).

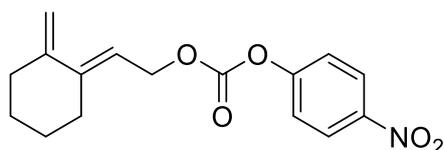
#### **(E)-2-(2-methylenecyclohexylidene)ethan-1-ol (**54**)**



A mixture of diene-ester **53** (1 equiv, 3.47 g, 19.3 mmol), Et<sub>2</sub>O (100 mL), and LAH (1.14 equiv, 833 mg, 22 mmol) was stirred at r.t. for 1 h, then cooled to 0 °C, and treated with aqueous 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (150 mL). The aqueous phase was extracted with Et<sub>2</sub>O (3 x 100 mL), the combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), and concentrated. The crude product was purified on silica gel chromatography (30% EtOAc in *n*-heptane) to afford the pure product **54** as a clear oil (2.06 g, **77 %**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.66 (tt, *J* = 7.0, 1.5 Hz, 1H, C=CH-CH<sub>2</sub>), 4.86 (dd, *J* = 2.4, 1.2 Hz, 1H, C=CH<sub>2</sub>), 4.62 (dt, *J* = 2.6, 1.4 Hz, 1H, C=CH<sub>2</sub>), 4.19 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, C=CH-CH<sub>2</sub>-O), 2.29 – 2.23 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.75 - 1.53 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.36 (bs, 1H, OH). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 150.5, 143.8, 121.6, 108.3, 58.9, 35.3, 28.8, 26.9, 26.3. *R<sub>f</sub>* ≈ 0.3 (30% EtOAc in *n*-heptane).

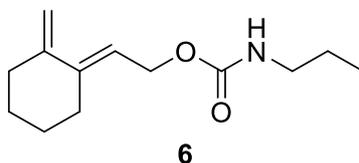
### (E)-2-(2-methylenecyclohexylidene)ethyl-(4-nitrophenyl)carbonate (**55**)



**54** (1 equiv, 2.06 g, 14.9 mmol) was dissolved in DCM (75 mL) and 4-nitrophenyl chloroformate (1.1 equiv, 3.3 g, 16.4 mmol) was added. The mixture was cooled to -10°C in an ice-salt bath before Et<sub>3</sub>N (2 equiv, 4.1 mL, 29.8 mmol) was added dropwise. The reaction mixture turned yellow and was stirred overnight letting it slowly return to room temperature. The reaction mixture was partitioned between EtOAc (250 mL) and saturated NH<sub>4</sub>Cl<sub>(aq)</sub> (100 mL). The organic phase was washed with saturated NH<sub>4</sub>Cl<sub>(aq)</sub> (2 × 100 mL), dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and concentrated under reduced pressure. Chromatography (5% EtOAc in *n*-heptane) afforded the corresponding product **55** as a white to pale yellow amorphous solid (2.72 g, **60%**).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.32 - 7.95 (m, 2H, CH<sup>Ar</sup>), 7.34 - 7.17 (m, 2H, CH<sup>Ar</sup>), 5.53 (tt, *J* = 7.4, 1.5 Hz, 1H, C=CH-CH<sub>2</sub>), 4.78 (dt, *J* = 2.2, 1.1 Hz, 1H, C=CH<sub>2</sub>), 4.70 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, C=CH-CH<sub>2</sub>-O), 4.56 (dt, *J* = 2.6, 1.4 Hz, 1H, C=CH<sub>2</sub>), 2.41 - 1.90 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.70 - 1.34 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 155.7, 152.5, 149.9, 148.2, 145.4, 125.3, 121.8, 114.7, 109.3, 65.5, 35.3, 29.1, 26.8, 26.2. R<sub>f</sub> ≈ 0.3 (5% EtOAc in *n*-heptane).

### (E)-2-(2-methylenecyclohexylidene)ethyl propylcarbamate (**56**)

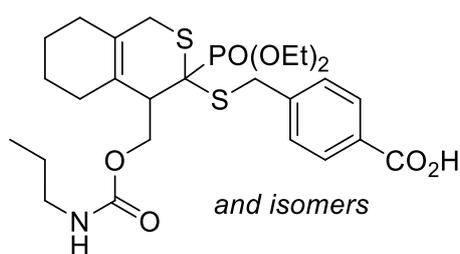


To a solution of propylamine (1 equiv, 43 mg, 0.06 mL, 0.72 mmol) in DCM (1.7 mL) was added Et<sub>3</sub>N (2 equiv, 0.2 mL, 1.44 mmol) and a solution of **55** (1 equiv, 220 mg, 0.72 mmol) in DCM (0.8 mL). The reaction mixture was left overnight at room temperature. The solvent was removed in vacuo and the resulting yellow oil was redissolved in DCM and washed several times with brine, saturated NaHCO<sub>3</sub>, and 2 M

NaOH until the organic phase was colourless. The organic phase was dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) and concentrated in vacuo to give **56** as a pale yellow oil (90 mg, **56%**). Product **56** was used without further purification.

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.54 (t,  $J = 7.1$  Hz, 1H,  $\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2$ ), 4.83 (dd,  $J = 2.4, 1.2$  Hz, 1H,  $\text{C}=\text{CH}_2$ ), 4.80 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 4.59 (bs,  $\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}$ ), 4.57 (s, 1H,  $\text{C}=\text{CH}_2$ ), 3.11 (q,  $J = 6.7$  Hz, 2H,  $\text{NH}-\text{CH}_2$ ), 2.29 – 2.18 (m, 4H,  $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 1.66 – 1.55 (m, 4H,  $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 1.48 (h,  $J = 7.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ), 0.88 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156.6, 150.2, 145.2, 117.2, 108.5, 61.0, 42.7, 35.3, 28.9, 26.9, 26.1, 23.2, 11.2. **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for  $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NNaO}_2$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 246.1470 ; 246.1467 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 1.22$  ppm).

#### 4-(((3-(diethoxyphosphoryl)-4-(((propylcarbamoyl)oxy)methyl)-3,4,5,6,7,8-hexahydro-1H-isothiochromen-3-yl)thio)methyl)benzoic acid (**57**)



Dithioester **39a** (1 equiv, 20 mg, 0.06 mmol) was dissolved in IPA (0.86 mL) and diene **56** (1 equiv, 13 mg, 0.06 mmol) was dissolved in *i*PrOH (0.86 mL) and  $\text{H}_2\text{O}$  (4 mL). The diene solution was heated to  $60^\circ\text{C}$  and the solution got clearer before the dithioester solution was added. The reaction was complete after 10 minutes (checked by HPLC). Isopropanol and water were evaporated, then the residue was dissolved in DMSO and directly purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5  $\mu\text{m}$ ,  $19 \times 150$  mm) using a linear gradient (10% to 95% in 40 min, flow-rate of  $18 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired products were freeze-dried to give the purified products **57** as a white amorphous foam (19 mg, **57%**).

**$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  20.7, 19.8, 19.4, 18.3 (22/10/18/50); **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for  $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{NO}_7\text{PS}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 572.1906, Found: 572.1912 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 1.05$  ppm);  $t_{\text{R}} = 5.12 - 5.18$  min (Method B).

Two fractions containing each one pair of isomers were isolated for NMR analysis.

Characteristic NMR signals of fraction 1:

Ratio Majo/mino = 55/45

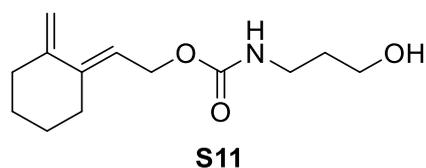
**$^1\text{H}$  NMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.01 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ , Maj), 8.00 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ , min), 7.46 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ , Maj), 7.42 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ , min), 4.80 - 4.50 (m, 3H), 4.39 - 3.72 (m, 16H), 3.55 (m, 1H), 3.10 - 2.98 (m, 6H), 2.86 - 2.76 (m, 2H), 2.27 - 1.36 (m, 14H), 1.51 - 1.35 (m, 6H), 1.32 - 1.21 (m, 12H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 0.91 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , Maj), 0.86 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , min).  **$^{13}\text{C}$  NMR** (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.5 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 170.4 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 143.8, 143.1, 130.3, 130.3, 129.6, 129.4, 128.4, 128.1, 65.8, 64.8 (d,  $J = 7.6$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 64.6 (d,  $J = 7.7$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 64.1 (d,  $J = 7.9$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 53.60 (d,  $J = 161.6$  Hz,  $\text{C}_q\text{P}$ ), 44.3, 42.7, 42.4, 36.7, 36.3, 35.0, 32.2, 30.9, 30.6, 30.3, 29.1, 23.2, 22.9, 22.9, 22.8, 22.5, 16.58 (d,  $J = 5.6$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ , Maj), 16.52 (d,  $J = 5.8$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ , min), 11.2 ( $\text{CH}_3$ , Maj), 11.1 ( $\text{CH}_3$ , min).  **$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  20.7 (Maj), 19.44 (min).

Characteristic NMR signals of fraction 2:

Ratio Majo/mino = 75/25

**$^1\text{H}$  NMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.01 (d,  $J = 8.4$  Hz,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ , 2H), 8.01 (d,  $J = 8.4$  Hz,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ , 2H), 7.45 (d,  $J = 8.1$  Hz,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ , 2H), 7.41 (d,  $J = 7.9$  Hz,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ , 2H), 4.79 - 3.95 (m,  $\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ , 17H), 3.48 - 2.97 (m, 6H), 2.78 - 2.48 (m, 3H), 2.42 - 1.72 (m, 9H), 2.00 - 1.38 (m, 22H), 1.40 - 1.32 (m, 12H,  $\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 0.91 (t,  $J = 7.4$  Hz, 6H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).  **$^{13}\text{C}$  NMR** (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.2 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 156.6, 143.4, 130.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ , Maj), 129.5 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ , Maj), 129.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ , Maj), 128.4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ , min), 125.8, 65.5, 65.0, 64.8, 64.6, 64.1, 45.4, 42.8, 37.6, 36.5, 36.2, 31.6, 31.1, 30.4, 27.7, 23.2, 23.02, 22.98, 22.6, 16.5 ( $\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ , Maj), 16.2 (d,  $J = 6.1$  Hz,  $\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ , min), 11.22 ( $\text{CH}_3$ , Maj), 11.19 ( $\text{CH}_3$ , min).  **$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  19.8 (min), 18.3 (Maj).

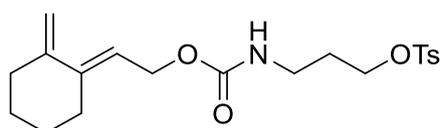
**(E)-2-(2-methylenecyclohexylidene)ethyl (3-hydroxypropyl)carbamate (58)**



To a solution of 3-aminopropanol (1.5 equiv, 1.04 mL, 13.6 mmol) in DCM (21 mL) was added TEA (3 equiv, 3.8 mL, 27.2 mmol) and a solution of **S10** (1 equiv, 2.72 g, 9 mmol) in DCM (10 mL). The reaction mixture was left overnight at room temperature. The solvent was removed in vacuo and the resulting yellow oil was redissolved in DCM and washed several times with brine, saturated NaHCO<sub>3</sub>, and 2 M NaOH until the organic phase was colourless. The organic phase was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and concentrated in vacuo to give **S11** as a yellow oil (2.06 g, 96%). The product was used without further purification.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.55 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, C=CH-CH<sub>2</sub>), 5.11 (bs, 1H, NH), 4.90 - 4.79 (m, 1H, C=CH<sub>2</sub>), 4.66 - 4.56 (m, 3H, C=CH<sub>2</sub> + C=CH-CH<sub>2</sub>-O), 3.65 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-OH), 3.31 (q, *J* = 6.2 Hz, 2H, NH-CH<sub>2</sub>), 2.32 - 2.19 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.75 - 1.55 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH + CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 157.6, 150.2, 145.7, 116.9, 108.6, 61.4, 59.5, 37.6, 35.3, 32.7, 28.9, 26.9, 26.1. **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>NNaO<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 262.1419, Found: 262.1414 (Δ<sub>HRMS</sub> = 1.91 ppm).

**(E)-3-(((2-(2-methylenecyclohexylidene)ethoxy)carbonyl)amino)propyl-4-methylbenzenesulfonate (59)**

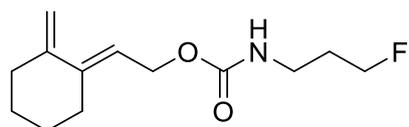


To a solution of **58** (1 equiv, 2.06 g, 8.6 mmol) in DCM (50 mL) was added TEA (1 equiv, 1.2 mL, 8.6 mmol) and DMAP (0.1 equiv, 100 mg, 0.86 mmol) and stirred 5 minutes at r.t. Then *p*-toluenesulfonyl chloride (1.05 equiv, 1.72 g, 9 mmol) was added and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Evaporation of the

solvent gave the crude product which was purified by gel column chromatography (40% EtOAc in *n*-heptane) giving product **59** as a clear oil (1.81 g, **53%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.75 - 7.62 (m, 2H, **CH<sup>Ar</sup>Ts**), 7.25 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, **CH<sup>Ar</sup>Ts**), 5.45 (tt, *J* = 7.1, 1.5 Hz, 1H, C=**CH-CH<sub>2</sub>**), 4.76 (dd, *J* = 2.4, 1.1 Hz, 1H, C=**CH<sub>2</sub>**), 4.74 (s, 1H, **NH**), 4.53 (dd, *J* = 2.6, 1.3 Hz, 1H, C=**CH<sub>2</sub>**), 4.48 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, C=**CH-CH<sub>2</sub>-O**), 3.99 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, **CH<sub>2</sub>-OTs**), 3.13 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H, **NH-CH<sub>2</sub>**), 2.35 (s, 3H, **CH<sub>3</sub>Ts**), 2.16 (td, *J* = 7.3, 3.8 Hz, 4H, **CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>**), 1.76 (p, *J* = 6.3 Hz, 2H, **CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OTs**), 1.63 - 1.44 (m, 4H, **CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>**). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 156.5, 150.2, 145.5, 145.0, 132.9, 129.9, 127.9, 117.0, 108.6, 67.8, 61.2, 37.2, 35.3, 29.1, 28.9, 26.9, 26.1, 21.7. **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>NNaO<sub>5</sub>S [M+Na]<sup>+</sup>: 416.1508, Found: 416.1518 (Δ<sub>HRMS</sub> = 2.40 ppm). **R<sub>f</sub>** ≈ 0.3 (40% EtOAc in *n*-heptane).

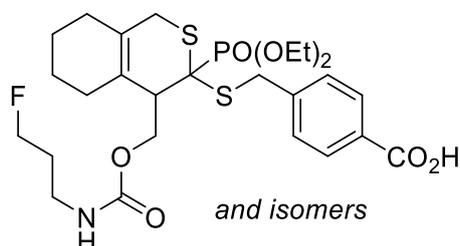
### (**E**)-2-(2-methylenecyclohexylidene)ethyl-(3-fluoropropyl)carbamate ([**<sup>19</sup>F**]-**60**)



To a solution of **59** (1 equiv, 75 mg, 0.19 mmol) in ACN (2.93 mL) was added TBAF (1.51 equiv, 75.39 mg, 0.085 mL, 0.29 mmol) and the mixture was stirred 30 minutes at reflux. The solvent was carefully evaporated, and the crude was purified on gel silica column chromatography (20% EtOAc in *n*-heptane) to give the corresponding product [**<sup>19</sup>F**]-**60** as a clear oil (35 mg, **75%**).

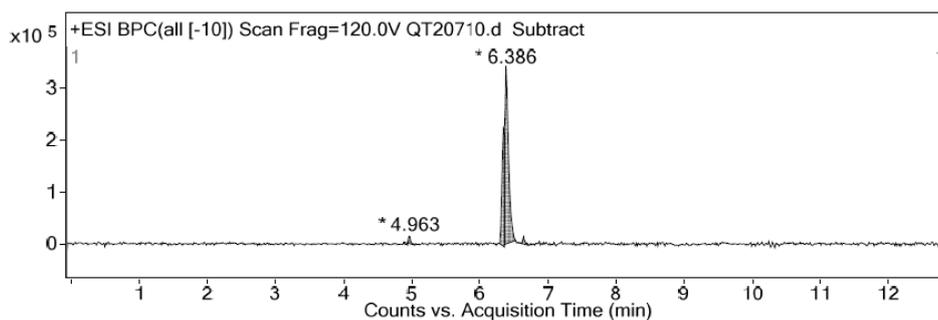
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.57 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, C=**CH-CH<sub>2</sub>**), 4.89 (bs, 1H), 4.86 (m, 1H), 4.64 - 4.59 (m, 3H), 4.52 (dt, <sup>2</sup>*J*<sub>H-F</sub> = 47.2, *J* = 6.1 Hz, 2H, **CH<sub>2</sub>-F**), 3.33 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H, **NH-CH<sub>2</sub>**), 2.26 (m, 4H, **CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>**), 1.92 (dp, <sup>3</sup>*J*<sub>H-F</sub> = 27.6, *J* = 6.0 Hz, 2H, **CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-F**), 1.63 (m, 4H, **CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>**). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 156.6, 150.2, 145.5, 117.0, 108.6, 82.1 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 164.3 Hz), 61.1, 37.7, 35.3, 30.7 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 19.5 Hz), 28.9, 26.9, 26.1. **<sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H} NMR** (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -221.0. **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>FNNaO<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 264.1376, Found: 264.1381 (Δ<sub>HRMS</sub> = 1.89 ppm); **R<sub>f</sub>** = 0.40 (30% EtOAc in *n*-heptane).

**4-(((3-(diethoxyphosphoryl)-4-(((3-fluoropropyl)carbamoyl)oxy)methyl)-3,4,5,6,7,8-hexahydro-1H-isothiochromen-3-yl)thio)methyl)benzoic acid ([<sup>19</sup>F]-61)**



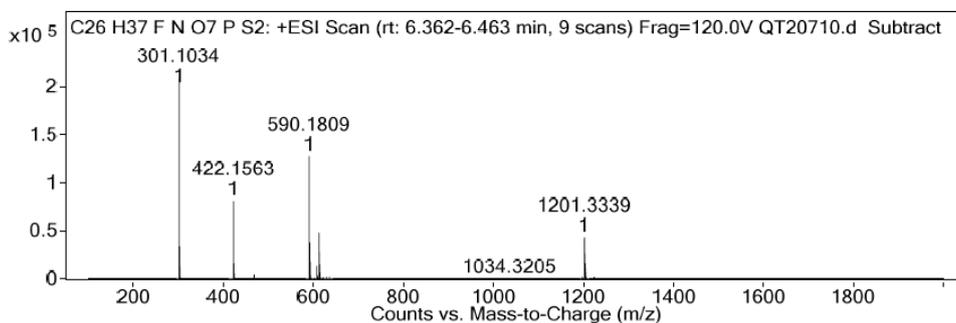
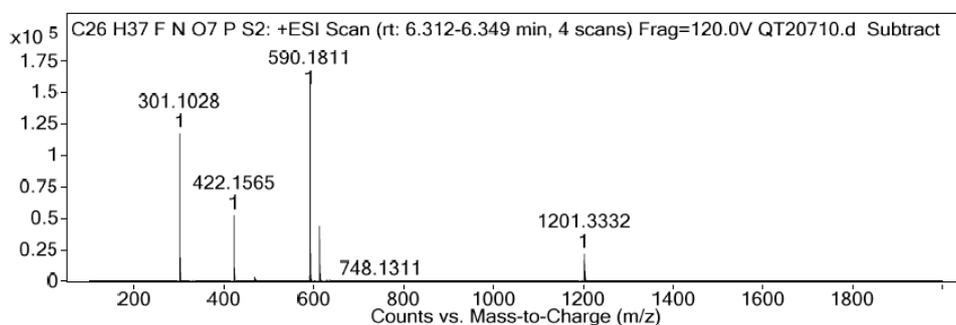
Dithioester **39a** (1 equiv, 49 mg, 0.14 mmol) was dissolved in *i*PrOH (2.2 mL) and diene [<sup>19</sup>F]-**60** (1 equiv, 34 mg, 0.14 mmol) was dissolved in *i*PrOH (2.2 mL) and H<sub>2</sub>O (10 mL). The diene solution was heated to 60 °C and the solution got clearer before the dithioester solution was added. The reaction was complete after 10 minutes (checked by HPLC). Isopropanol and water were evaporated, then the residue was dissolved in DMSO and directly purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5 μm, 19 × 150 mm) using a linear gradient (10% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL.min<sup>-1</sup>) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired products were freeze-dried to give the purified products [<sup>19</sup>F]-**61** as a white amorphous foam (54 mg, **66%**).

<sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H} NMR (471 MHz, DMSO) δ -76.55 (F-TFA), -221.49, -221.51, -221.55, -221.57 (F-cycloadducts: 11/23/19/47); <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 20.8, 19.8, 19.4, 18.2 (27/9/16/48); HRMS (ESI-TOF): Calculated for C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>FNO<sub>7</sub>PS<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 590.1811, Found: 590.1811, 590.1809 (Δ<sub>HRMS</sub> = 0 ppm & 0.34 ppm); t<sub>R</sub> = 5.29 – 5.36 min (Method C).



Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	4.886	4.963	5.048	13608.02	23997.55	1.93	1.28
2	6.295	6.346	6.359	226871.06	575841	46.41	30.75
3	6.359	6.386	6.528	344342.68	1240832.25	100	66.25
4	6.554	6.643	6.721	14268.32	32195.06	2.59	1.72



Two fractions containing each one pair of isomers were isolated for NMR analysis.

Characteristic NMR signals of fraction 1:

Ratio Majo/mino = 55/45

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.02 (d, *J* = 3.1 Hz, CH<sub>Ar</sub>, 2H), 8.00 (d, *J* = 3.3 Hz, CH<sub>Ar</sub>, 2H), 7.49 - 7.44 (m, CH<sub>Ar</sub>, 2H), 7.44 - 7.39 (m, CH<sub>Ar</sub>, 2H), 5.78 - 3.53 (m, 23H), 3.41 - 2.80 (m, 8H), 2.32 - 1.42 (m, 21H), 1.36 (dt, *J* = 11.9, 7.1 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 12H); **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.5 (C=O), 170.4 (C=O), 156.3, 156.1, 143.8, 143.1, 130.34,

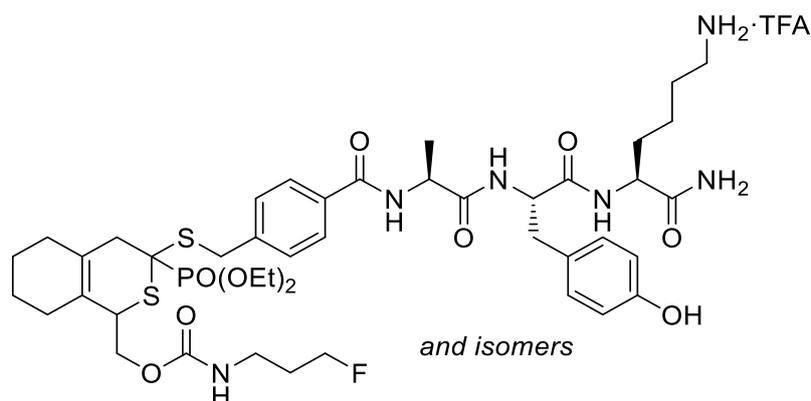
130.29, 129.6, 129.4, 129.3, 128.6, 128.3, 127.6, 126.3, 82.6, 81.3, 66.0, 65.0 (d,  $J = 9.2$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 64.7 (d,  $J = 7.4$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 64.6 (d,  $J = 7.7$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 64.0 (d,  $J = 7.8$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 54.7 (d,  $J = 161.2$  Hz,  $\text{C}_q\text{P}$ ), 53.6 (d,  $J = 161.4$  Hz,  $\text{C}_q\text{P}$ ), 44.3, 42.3, 37.7, 36.8, 36.4, 35.1, 32.2, 30.9, 30.7, 30.5, 30.4, 29.1, 22.9, 22.9, 22.8, 22.5, 16.59 (d,  $J = 5.5$  Hz,  $(\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2)$ ), 16.52 (d,  $J = 5.7$  Hz,  $(\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2)$ );  $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$  NMR (471 MHz, DMSO)  $\delta$  -76.55 (F-TFA), -221.54 (Maj), -221.56 (min);  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  20.8 (Maj), 19.4 (min).

Characteristic NMR signals of fraction 2:

Ratio Majo/mino = 80/20

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.01 (m,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ , 2H), 7.48 - 7.43 (m,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ , 2H), 7.40 (d,  $J = 8.0$  Hz,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ , 2H), 5.88 - 3.93 (m, 22H), 3.55 - 2.15 (m, 12H), 2.07 - 1.46 (m, 18H), 1.46 - 1.27 (m,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ , 12H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.1 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 156.6, 156.2, 143.2, 143.0, 130.3, 129.5, 129.4, 128.6, 127.6, 127.6, 126.0, 82.6, 81.3, 66.4, 65.6 (d,  $J = 7.9$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 65.0, 64.7 (d,  $J = 7.8$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 64.6 (d,  $J = 7.4$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 64.1 (d,  $J = 8.3$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 55.2 (d,  $J = 157.8$  Hz,  $\text{C}_q\text{P}$ , Maj), 52.5 (d,  $J = 159.6$  Hz,  $\text{C}_q\text{P}$ , min), 45.3, 37.8, 37.5, 37.5, 36.5, 36.2, 31.6, 31.0, 30.7, 30.6, 30.4, 29.5, 27.7, 27.6, 23.0, 23.0, 23.0, 22.6, 16.52 (d,  $J = 5.6$  Hz,  $(\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2)$ , Maj), 16.20 (d,  $J = 6.6$  Hz,  $(\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2)$ , min);  $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$  NMR (471 MHz, DMSO)  $\delta$  -76.55 (F-TFA), -221.50 (min), -221.56 (Maj);  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  19.8 (min), 18.3 (Maj).

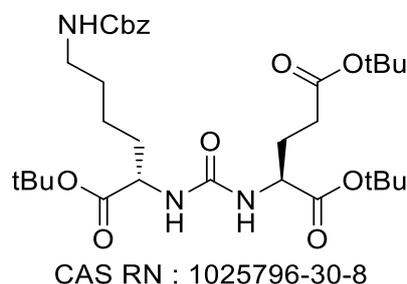
## [<sup>19</sup>F]-Adducts-(Ala-Tyr-Lys)-NH<sub>2</sub> (**62**)



First, diene [<sup>19</sup>F]-**60** (2.93 mg, 12 μmol) was dissolved in *i*PrOH (60 μL) in a small vial and was heated to 60°C under stirring. Then dithioester-tripeptide **40** (10 mg, 12 μmol) was dissolved in H<sub>2</sub>O (540 μL, MQ grade) and this solution was added on the diene solution. After 2 minutes, the pink colour of dithioester-tripeptide **40** vanished and completion was confirmed by HPLC analysis. *i*PrOH was evaporated and the aqueous crude solution was directly purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5 μm, 19 × 150 mm) using a linear gradient (10% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL·min<sup>-1</sup>) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired products were freeze-dried to give the purified products [<sup>19</sup>F]-**62** as a white amorphous foam (8.1 mg, **63%**).

<sup>19</sup>F NMR (471 MHz, DMSO) δ -76.55 (F-TFA), -222.33, -222.34, -222.35, -222.36 (F-cycloadducts); <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR (202 MHz, DMSO) δ 20.33, 19.79, 19.43, 18.94 (22/9/20/49); HRMS (ESI-TOF): Calculated for C<sub>44</sub>H<sub>65</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>10</sub>PS<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 951.3925, Found: 951.3918 (Δ<sub>HRMS</sub> = 0.74 ppm); t<sub>R</sub> = 3.77 min (Method D).

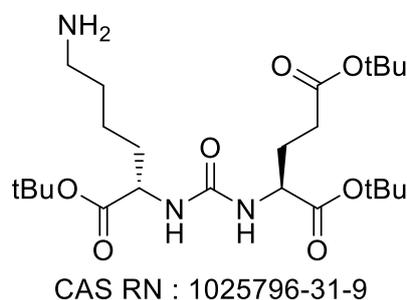
**Tri-tert-butyl 3,11-dioxo-1-phenyl-2-oxa-4,10,12-triazapentadecane-9,13,15-tricarboxylate (63)**



*L*-Glutamic di-*tert*-butyl ester hydrochloride (1.7 equiv, 674.27 mg, 2.28 mmol) was suspended in DCM (20 mL) and Et<sub>3</sub>N (5.5 equiv, 740 mg, 1.02 mL, 7.3 mmol) was added and the solution was cooled down to -78°C. Then a solution of triphosgene (0.57 equiv, 227 mg, 0.13 mL, 0.76 mmol) in DCM (6.6 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred 30 min at r.t. Then H-Lys(Z)-*Ot*Bu hydrochloride (1 equiv, 500 mg, 1.34 mmol) was added, followed by Et<sub>3</sub>N (1 equiv, 136 mg, 0.19 mL, 1.34 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was diluted in DCM (30 mL) and washed twice with 60 mL of water. The organic phase was dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The crude oil was then purified by gel silica chromatography (50% EtOAc in *n*-heptane) to afford the pure product **61** as a clear oil (740 mg, **89%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.39 - 7.27 (m, 5H, **CH<sup>A</sup>**), 5.18 - 4.99 (m, 5H), 4.32 (s, 2H), 3.18 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.40 - 2.20 (m, 2H), 2.16 - 2.00 (m, 1H), 1.91 - 1.71 (m, 2H), 1.71 - 1.56 (m, 3H), 1.52 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.48 - 1.39 (m, 27H, C(**CH<sub>3</sub>**)<sub>3</sub>). **R<sub>f</sub>** ≈ 0.3 (50% EtOAc in *n*-heptane).

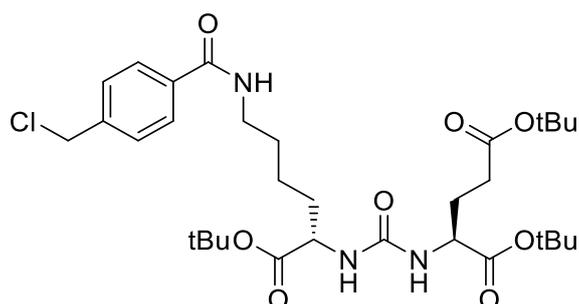
**Di-tert-butyl ((6-amino-1-(tert-butoxy)-1-oxohexan-2-yl)carbamoyl)glutamate (64)**



**63** (1 equiv, 740 mg, 1.19 mmol) was dissolved in MeOH (25 mL) and the flask was purged with Argon. Then Pd/C (24 mg) was added and H<sub>2</sub> was bubbled in the reaction mixture for 5 min. The solution was then stirred overnight under an H<sub>2</sub> balloon. The next day the reaction mixture was filtered on Celite with MeOH and the solvent was carefully evaporated to afford **64** as a white amorphous foam (600 mg, **100%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.18 (s, 3H), 4.51 - 4.18 (m, 2H), 3.11 (s, 2H), 2.43 - 2.24 (m, 2H), 2.12 - 2.01 (m, 1H), 1.94 - 1.69 (m, 5H), 1.66 - 1.51 (m, 2H), 1.49 - 1.37 (m, 27H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

**Di-tert-butyl ((1-(tert-butoxy)-6-(4-(chloromethyl)benzamido)-1-oxohexan-2-yl)carbamoyl)glutamate (65)**

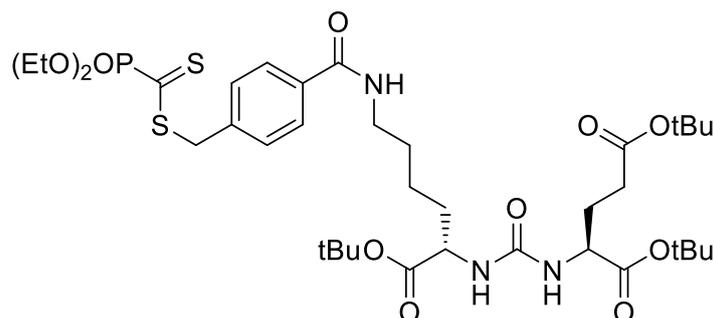


**64** (1 equiv, 160 mg, 0.33 mmol) was dissolved in DMF (4.6 mL) then DIEA (2 equiv, 87 mg, 0.11 mL, 0.67 mmol) and 4-(chloromethyl)benzoyl chloride (2 equiv, 127 mg, 0.67 mmol) were added sequentially. The solution was stirred at room temperature for 16 h and the solvent was evaporated. The crude was directly purified by silica gel

chromatography (40% EtOAc in *n*-heptane) to afford the product **65** as an amorphous white foam after careful evaporation of the solvent (166 mg, **78%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.93 - 7.81 (m, 2H, *CH<sup>A</sup>*), 7.46 - 7.33 (m, 2H, *CH<sup>A</sup>*), 7.18 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 5.55 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 4.57 (s, 2H), 4.21 (dt, *J* = 11.5, 5.6 Hz, 2H), 3.56 - 3.28 (m, 2H), 2.37 - 2.15 (m, 2H), 1.99 (m, 1H), 1.74 (m, 2H), 1.67 - 1.47 (m, 3H), 1.51 - 1.33 (m, 28H, C(*CH*<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.8, 172.5, 172.4, 167.4, 157.5, 140.6, 134.8, 128.6, 127.9, 82.6, 82.0, 80.9, 53.7, 53.3, 45.6, 39.9, 32.6, 31.7, 29.0, 28.2, 28.1, 28.1, 23.1.; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>ClN<sub>3</sub>NaO<sub>8</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 662.3184, Found: 662.3207 (Δ<sub>HRMS</sub> = 3.47 ppm); *R<sub>f</sub>* ≈ 0.3 (40% EtOAc in *n*-heptane).

**di-tert-butyl ((1-(tert-butoxy)-6-(4-(((diethoxyphosphoryl)carbonothioyl)thio)-methyl)-benzamido)-1-oxohexan-2-yl)carbamoyl)glutamate (SI-7)**

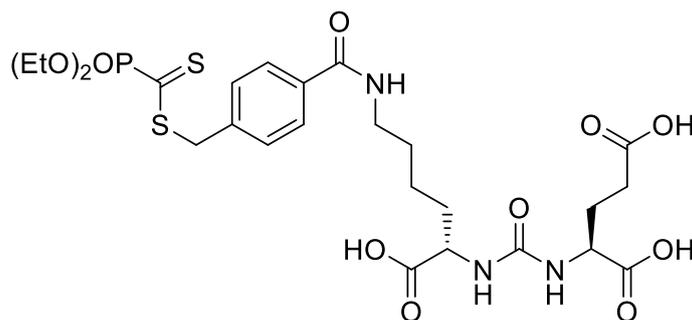


Phosphonodithioformate salt **38a** (1 equiv, 119 mg, 0.26 mmol) was dissolved in ACN (1 mL) and the benzyl chloride derivative **65** (167 mg, 0.28 mmol) dissolved in ACN (1 mL) was added. The mixture was stirred at room temperature for 16 h as it became pinker. The solvent is evaporated, and the product was directly purified by silica gel chromatography (80% EtOAc in *n*-heptane) to afford **SI-7** as a pink oil (156 mg, **73%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.79 - 7.73 (m, 2H, *CH<sup>A</sup>*), 7.25 (m, 3H), 5.64 (s, 1H), 5.48 (s, 1H), 4.39 (s, 2H), 4.24 - 4.08 (m, 5H), 3.43 - 3.19 (m, 2H), 2.30 - 2.11 (m, 2H), 1.94 (m, 2H), 1.79 - 1.60 (m, 2H), 1.49 (m, 3H), 1.32 (s, 9H, C(*CH*<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.32 (s, 9H, C(*CH*<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.30 (s, 9H, C(*CH*<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.26 (td, *J* = 7.1, 0.8 Hz, 6H, P-O-CH<sub>2</sub>-*CH*<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 228.01 (d, *J* = 175.3 Hz), 173.1, 172.5, 172.3, 157.5, 137.0, 134.5, 129.3, 128.0, 82.3, 81.7, 80.7, 64.9 (d, *J* = 6.9 Hz), 53.6, 53.5, 53.1, 40.2 (d, *J* = 2.9 Hz), 39.9, 32.5, 31.7, 29.0, 28.2, 28.13, 28.07, 28.03, 23.1, 16.4 (d, *J* = 6.1 Hz); **HRMS** (ESI-

TOF): Calculated for C<sub>37</sub>H<sub>61</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub>PS<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 818.3485, Found: 818.3505 ( $\Delta_{\text{HRMS}}$  = 2.44 ppm);  $R_f$  = 0.29 (80% EtOAc in *n*-heptane).

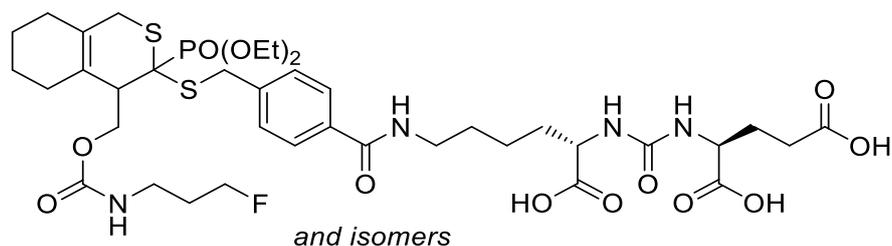
**((1-carboxy-5-(4-(((diethoxyphosphoryl)carbonothioyl)thio)methyl)benzamido)pentyl)-carbamoyl)glutamic acid (66)**



Tri-*tert*-butyl ester **SI-6** (1 equiv, 156 mg, 0.19 mmol) was dissolved in DCM (2 mL) and TFA (0.5 mL) was added. The mixture is stirred overnight at room temperature for the full deprotection. The volatiles were removed in vacuo and the crude mixture was purified in reversed phase chromatography with a gradient from 5% solvent A (ACN + 0.1% TFA) in solvent B (H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA) in 40 min. Detection was set at 220 nm and 254 nm. The fractions containing the product were freeze-dried to afford the desired product **66** as a pink amorphous solid (93 mg, **75%**).

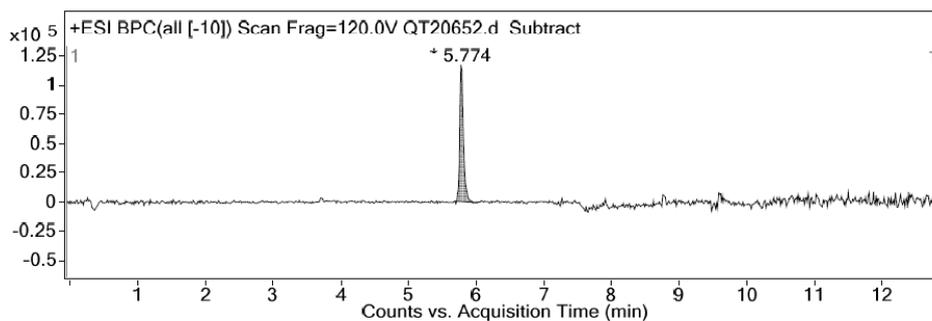
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, MeOD)  $\delta$  7.83 – 7.71 (m, 2H,  $\text{CH}^{\text{Ar}}$ ), 7.54 – 7.39 (m, 2H,  $\text{CH}^{\text{Ar}}$ ), 4.65 (s, 2H), 4.35 – 4.18 (m, 6H), 3.38 (td,  $J$  = 7.0, 2.2 Hz, 2H), 2.49 – 2.32 (m, 2H), 2.20 – 2.08 (m, 1H), 1.94 – 1.81 (m, 2H), 1.75 – 1.59 (m, 3H), 1.54 – 1.43 (m, 2H), 1.35 (td,  $J$  = 7.0, 0.8 Hz, 6H, P-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, MeOD)  $\delta$  173.7, 173.4, 173.2, 168.2, 158.6, 158.6, 137.9, 134.1, 129.1, 127.4, 65.1, 65.1, 52.8, 52.2, 39.3, 39.1, 39.0, 31.6, 29.5, 28.5, 27.1, 22.7, 15.2, 15.2; **<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR** (202 MHz, DMSO)  $\delta$  -3.39; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>25</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub>PS<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 650.1607, Found: 650.1627 ( $\Delta_{\text{HRMS}}$  = 3.08 ppm);  $t_R$  = 3.74 min (Method B).

## [<sup>19</sup>F]-Adducts-PSMA ([<sup>19</sup>F]-67)



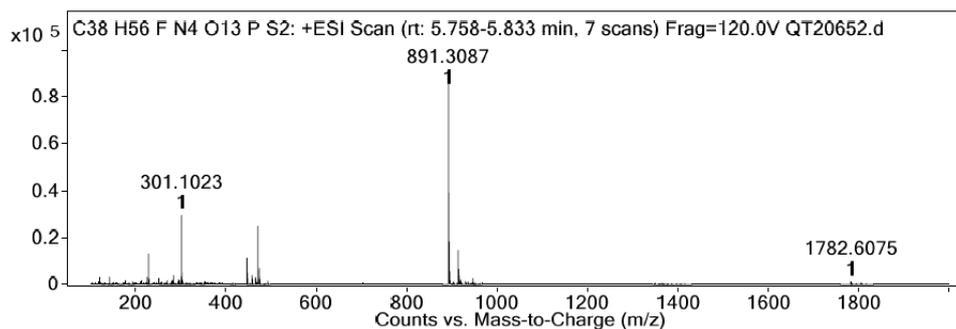
Phosphonodithioester **66** (1 equiv, 31 mg, 0.048 mmol) was dissolved in *i*PrOH (0.72 mL) and diene [<sup>19</sup>F]-**60** (1 equiv, 13 mg, 0.048 mmol) was dissolved in *i*PrOH (0.72 mL) and H<sub>2</sub>O (3.4 mL). The diene solution was heated to 60°C and the solution got clearer before the dithioester solution was added. The reaction was complete after 10 minutes (checked by HPLC). Isopropanol was evaporated and the aqueous crude solution was directly purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5 μm, 19 × 150 mm) using a linear gradient (10% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL.min<sup>-1</sup>) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired peptide were freeze-dried to give the purified product [<sup>19</sup>F]-**67** as a white amorphous foam (27 mg, **64%**).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.43 (q, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.78 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 2H), 7.44 - 7.04 (m, 3H), 6.32 (t, *J* = 9.1 Hz, 2H), 4.72 - 2.96 (m, 19H), 2.37 - 1.41 (m, 18H), 1.39 - 1.22 (m, 8H); <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H} NMR (376 MHz, DMSO) δ -221.00, -221.01, -221.03; <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR (162 MHz, DMSO) δ 20.4, 19.8, 19.5, 18.9 (27/9/16/48); HRMS (ESI-TOF): Calculated for C<sub>38</sub>H<sub>57</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>13</sub>PS<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 891.3085, Found: 891.3087 (Δ<sub>HRMS</sub> = 0.22 ppm); t<sub>R</sub> = 4.45 - 4.47 min (Method C).



Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	5.684	5.774	6.019	116765.24	437453.51	100	100



Two fractions containing each one a pair of isomers were isolated for NMR analysis. Samples were too small for  $^{13}\text{C}$  analysis.

Characteristic NMR signals of fraction 1:

Ratio Maj/min = 83/17

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8.43 (q,  $J = 5.4$  Hz, 1H), 7.78 (dd,  $J = 8.4, 2.1$  Hz, 2H), 7.39 (dd,  $J = 14.3, 8.3$  Hz, 3H), 6.32 (t,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 4.73 - 2.85 (m, 19H), 2.30 - 1.47 (m, 18H), 1.28 (qd,  $J = 7.0, 1.2$  Hz, 8H).  $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$  NMR (376 MHz, DMSO)  $\delta$  -221.00 (Maj), -221.03 (min);  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz, DMSO)  $\delta$  19.5 (min), 18.9 (Maj).

Characteristic NMR signals of fraction 1:

Ratio Maj/min = 70/30

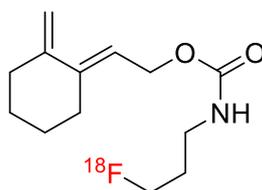
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8.42 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 7.82 - 7.71 (m, 2H), 7.44 - 7.05 (m, 3H), 6.32 (t,  $J = 9.1$  Hz, 2H), 4.63 - 2.94 (m, 19H), 2.29 - 1.46 (m, 18H), 1.40 - 1.21 (m, 8H);  $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$  NMR (376 MHz, DMSO)  $\delta$  -221.00 (min), -221.03 (Maj);  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz, DMSO)  $\delta$  20.4 (Maj), 18.9 (min).

### 2.2.2.2 Radiochemical syntheses<sup>5</sup>

A Raytest R&D synchrom dual reactor was used for the automated radiosynthesis with some modifications. Reactor 1 is used for the synthesis of the prosthetic group ([<sup>18</sup>F]-**60**) and the second reactor is used for the thia-Diels alder reaction. Outlet of the pump and vents are connected to gas bags to avoid any radioactive releases in the hot cell ventilation system, 3 additional valves (G3-G5) and a 12 mL vial were added to measure the <sup>18</sup>F activity transferred from the target. The system is equipped with a semi preparative HPLC (Knauer) including an isocratic pump, a 254 nm fixed wavelength UV detector, a radioactivity detector and a 5 mL stainless steel injection loop. Purification of [<sup>18</sup>F]-**60** was done on a synchronis 250x10 mm (5 μm) semi-preparative column.

For the synthesis of [<sup>18</sup>F]-**62** a second HPLC purification on a semi-preparative Kinetex column was necessary. An USB remotely controlled 6 ways-2 positions Titan MX II valve (Rheodyne) was inserted as a column selector enabling to shift between the two different columns. Injection loop and tubing common for the two purifications processes are washed automatically with ACN after use. For the purification of [<sup>18</sup>F]-**62** a gradient was obtained by adding an automated injection pump (KdScientific) performing a direct injection of ACN at a flow rate of 3.5 mL/min in the solvent bottle (50 mL, ACN/H<sub>2</sub>O + 0.1 % TFA, 20/80 v/v) with constant stirring. A second dilution flask (50 mL falcon tube) was added for the dilution of the final product in water before C18 seppak formulation.

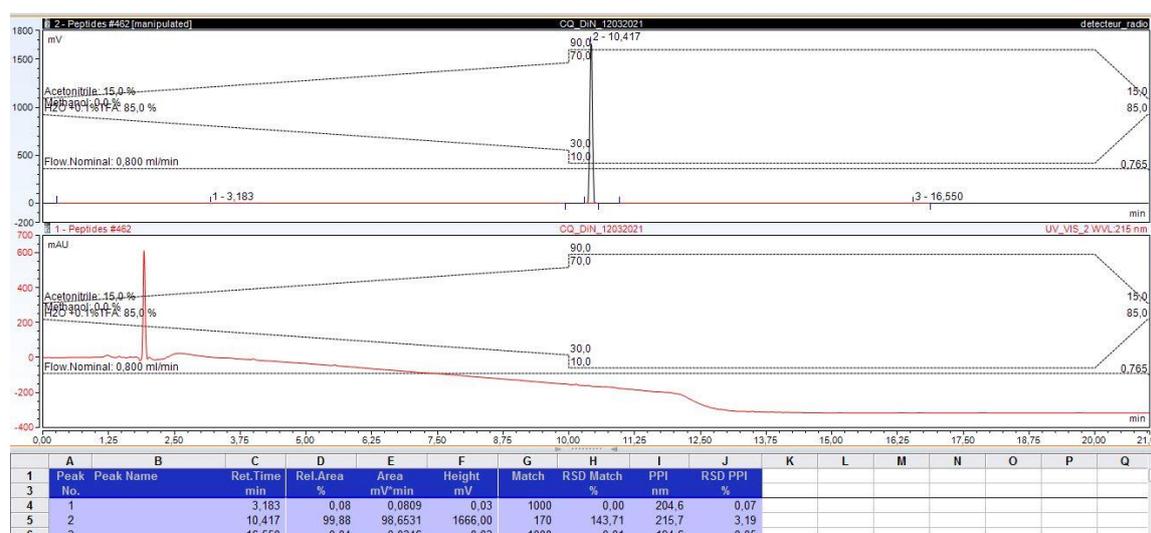
#### **(E)-2-(2-methylenecyclohexylidene)ethyl (3-(fluoro-<sup>18</sup>F)propyl)carbamate ([<sup>18</sup>F]-**60**)**



Automated synthesis on a Raytest R&D Synchrom EVO III module. [<sup>18</sup>F]-fluorine was produced by proton irradiation (16 MeV) of 1 mL of [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O (>97%) by a TR-24 cyclotron (ACSI). The target content was transferred under He pressure into the hot

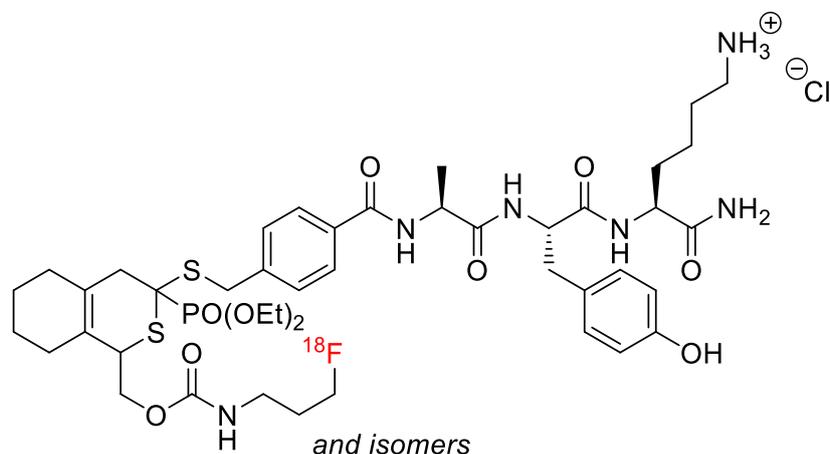
<sup>5</sup> Performed with Patrice Marchand (UMR 7178, IPHC, Strasbourg)

cell, counted and transferred under He flow onto the synthesis module. Starting activity 23,00-23,05 GBq at 08H53. The whole activity was trapped on a QMA cartridge (Waters Sep-Pak Light Accell plus QMA, ref 186004051). After drying the [<sup>18</sup>F]-fluorine was eluted into the reactor with a solution of Kryptofix 2.2.2 (Aldrich, 14 mg in 800 microliters of ACN) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Aldrich 0,59 mg in 360 microliters of water). The solution was evaporated under reduced pressure and an argon flow at 90°C with iterative additions of ACN (3 times, total volume used 1.7 mL). After evaporation, the tosylate **59** (5.0 mg, 12-13 micromoles) in 1 mL of ACN was added and the sealed reactor was heated at 95°C during 10 minutes. After cooling down to 45°C, the crude solution was diluted with H<sub>2</sub>O (2.1 mL) and ACN (2 mL). The whole solution was injected in HPLC (5mL injection loop) and purified on a Synchronis C18 column (thermoscientific, 250x10 mm, 5 microns) using ACN/H<sub>2</sub>O (60/40 v/v) at a flow rate of 4 mL/minute (conversion according to semi-preparative HPLC on radioactive channel = 90%, t<sub>R</sub> = 15'01"). The collected solution (3 min., 12 mL) was diluted in 38 mL of water and passed through two C18 cartridges (tC18 environmental WAT 036800 and C18 WAT 020515, WATERS). The cartridges were then washed with 3 mL of water to remove the solvents and dried under Argon flow. The purified product [<sup>18</sup>F]-**60** was eluted with 1.85 mL of Ethanol (HPLC grade). The mean molar activity (end of synthesis) was determined at 150 GBq/μmol with this solution using a calibration curve at 215 nm; t<sub>R</sub> = 10.42 min (Method E).

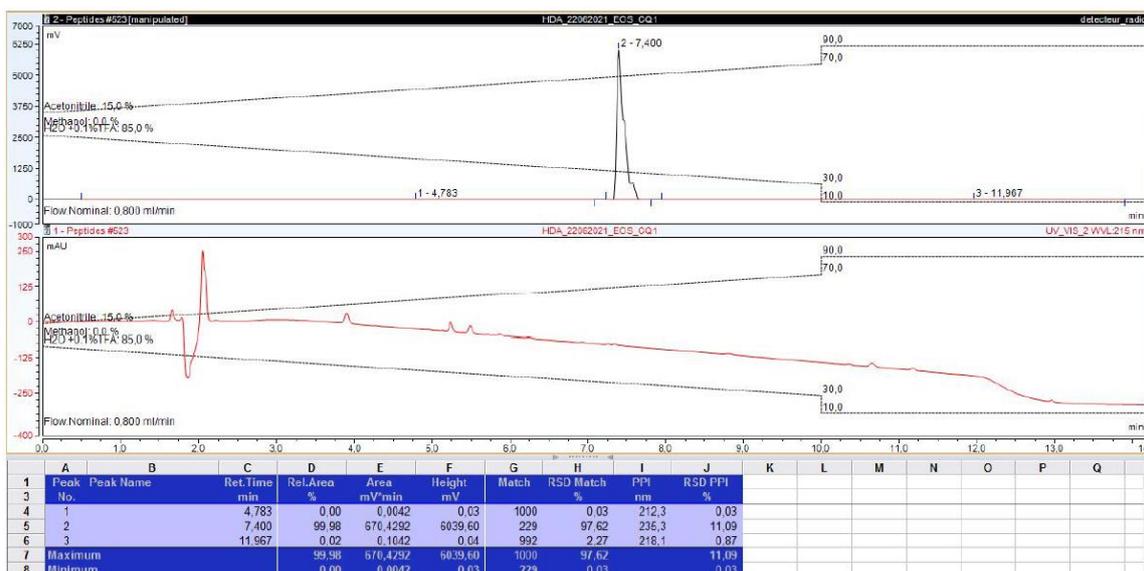


**Figure 155.** HPLC analysis of the hot diene [<sup>18</sup>F]-**60** with a radioactive detector (top) and a 215 nm UV detector (bottom). The radioactive purity (> 99%) was obtained by integration of the product compared with the rest of the chromatogram.

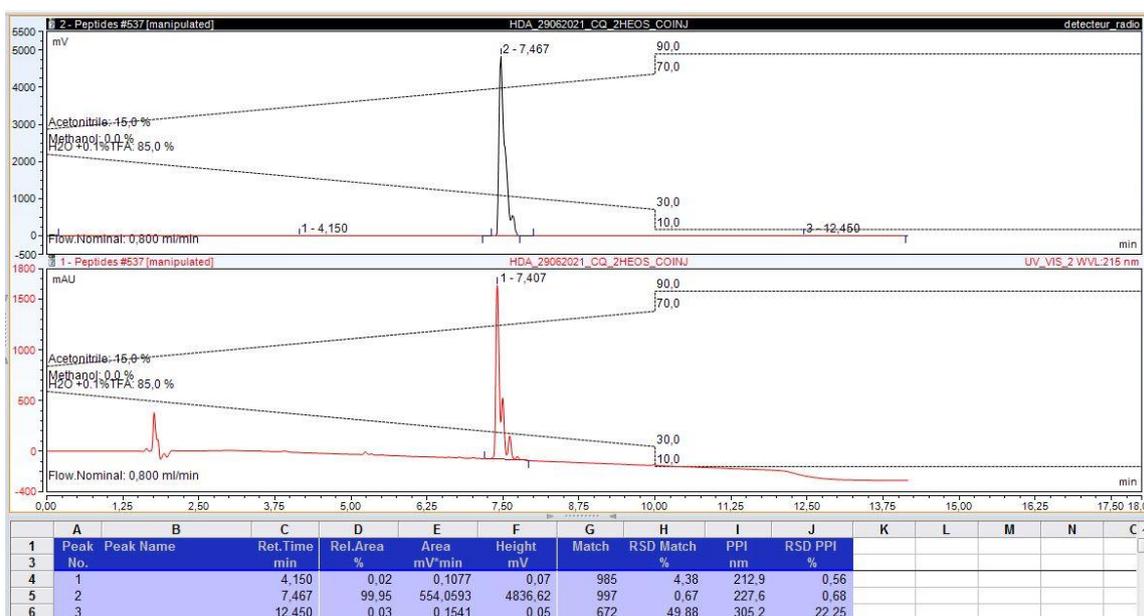
### [<sup>18</sup>F]-Adducts-(Ala-Tyr-Lys)-NH<sub>2</sub> ([<sup>18</sup>F]-62)



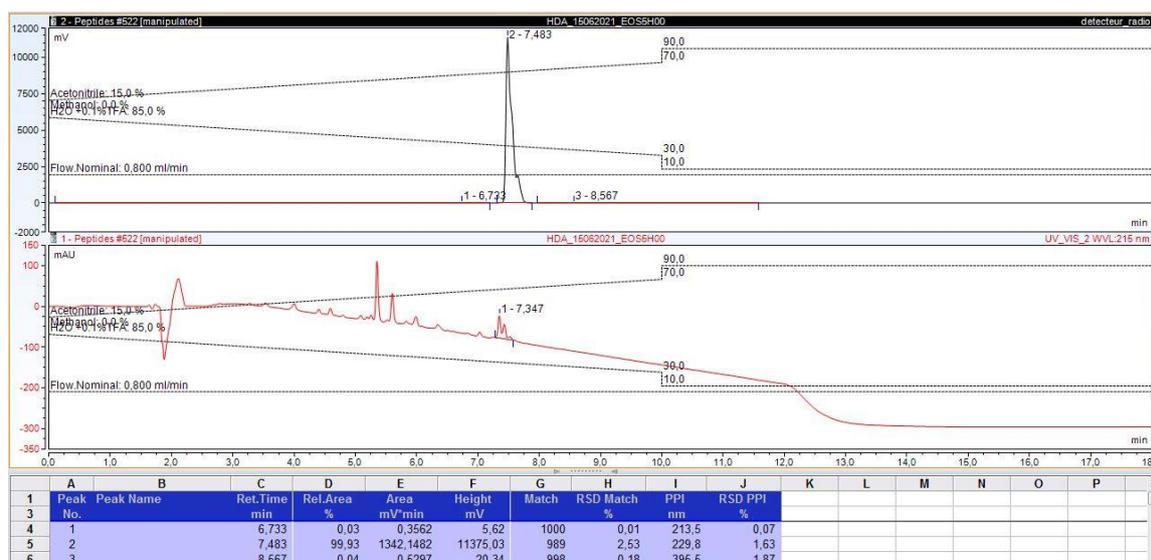
The purified fluorinated-diene [<sup>18</sup>F]-**60** was eluted with 1.85 mL of ethanol (HPLC grade) directly into the pre-heated (65°C) second reactor. After addition of the tripeptide-dithioester **40** (0.6 mg, 0.7 μmole) in 4.2 mL of water (containing 0.15% AcOH) the reactor was set under pressure (Argon, 1800 mBars) and close. The solution was stirred and heated for 45 minutes at 65°C. The solution was diluted with 12 mL of water, passed over a C18 cartridge (C18 WAT 020515, WATERS) and after short drying the cartridge was washed with 2.5 mL of Et<sub>2</sub>O, dried under Argon pressure and washed again with 7.5 mL of H<sub>2</sub>O/EtOH 95/5. The final product [<sup>18</sup>F]-**62** was eluted with a 0.2 M solution of HCl in EtOH (1.15 mL) in a vial containing 4 mL of water. A radiochemical yield of **26.5%** (**54%** decay corrected yield from start of synthesis SOS) was obtained after 112 minutes of synthesis (including purification and formulation) and with a radioactive purity above 99% (analytical HPLC, Method E). The mean molar activity (end of synthesis) was determined at 90 GBq/μmol with this solution using a calibration curve at 215 nm; *t<sub>R</sub>* = 7.40 min (Method E).



**Figure 156.** HPLC analysis of the hot adducts [ $^{18}\text{F}$ ]-62 with a radioactive detector (top) and a 215 nm UV detector (bottom). The radioactive purity was obtained by integration of the product compared with the rest of the chromatogram.

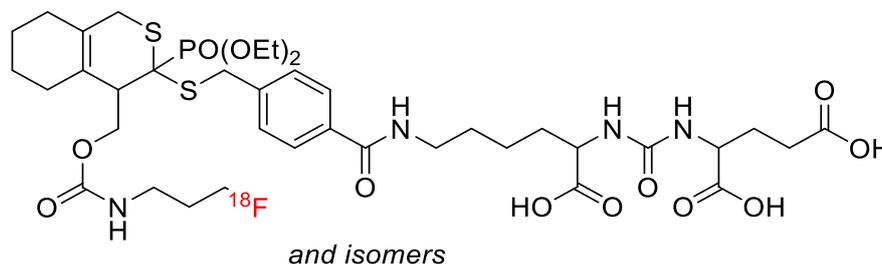


**Figure 157.** HPLC analysis of the co-injection of the cold and hot adducts [ $^{18}\text{F}$ ]-62 with a radioactive detector (top) and a 215 nm UV detector (bottom).



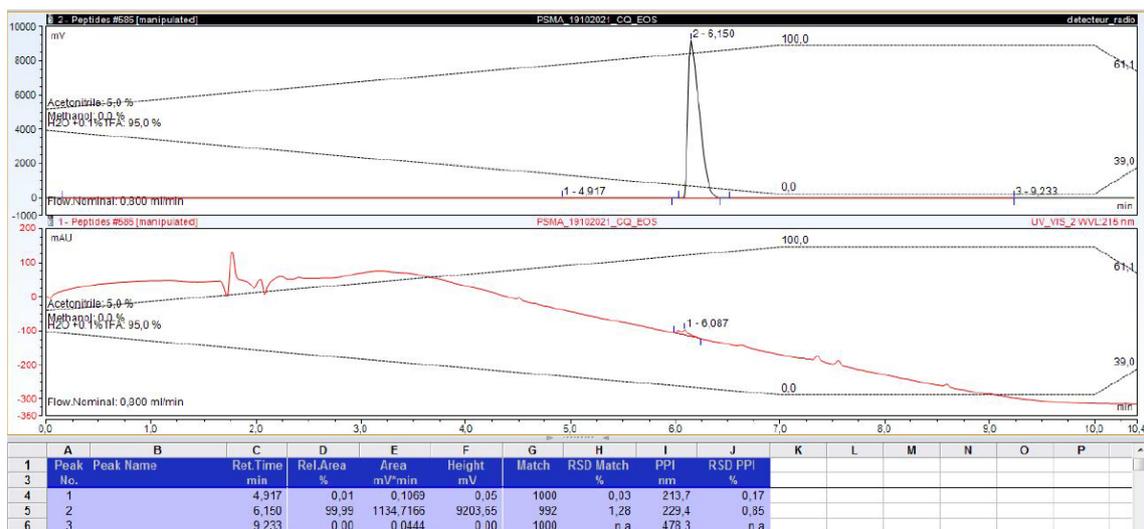
**Figure 158.** HPLC analysis of the hot adducts [ $^{18}\text{F}$ ]-**62** five hours after the end of the synthesis with a radioactive detector (top) and a 215 nm UV detector (bottom). The radioactive purity (> 99%) was obtained by integration of the product compared with the rest of the chromatogram.

### [ $^{18}\text{F}$ ]-Adducts-PSMA ([ $^{18}\text{F}$ ]-**67**)

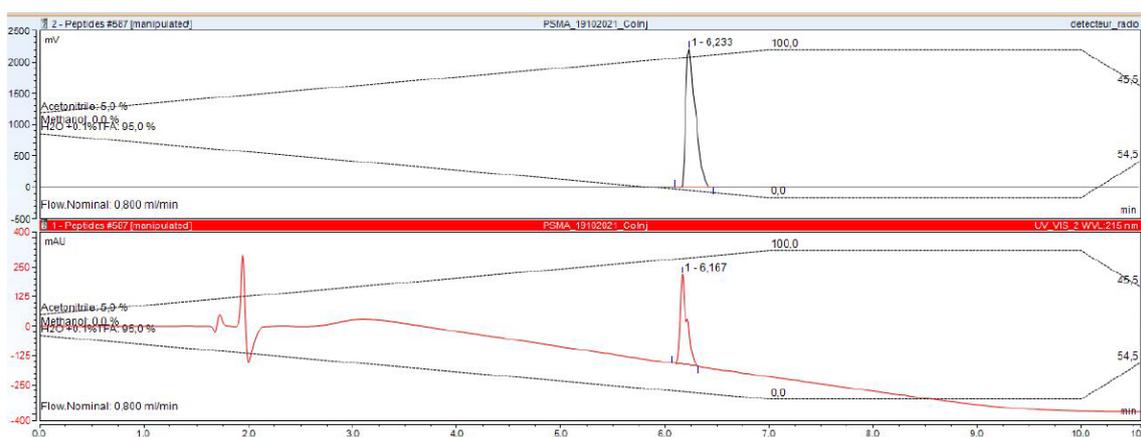


The purified fluorinated-diene [ $^{19}\text{F}$ ]-**60** was eluted with 1.85 mL of ethanol (HPLC grade) directly into the pre-heated (65°C) second reactor. After addition of the PSMA-dithioester **66** (1+/- 0.1 mg, 1.5  $\mu\text{mole}$ ) in 3.28 mL of water (containing 0.15% AcOH) and 0.08 mL of EtOH, the reactor was set under pressure (Argon, 1800 mBars) and close. The solution was stirred and heated 45 minutes at 62-65°C. After cooling at 50°C the solution was injected in HPLC (5 mL injection loop) and purified on a Kinetex EVO C18 column (thermoscientific, 150x10 mm, 5 microns) using H<sub>2</sub>O/ACN + 0.1% TFA (80/20 v/v) at a flow rate of 4 mL/minute with an increasing gradient of ACN (addition 3.75 mL/min over 10 minutes with mixing). The purified product (Rt = 11 min, 4 mL) was collected and diluted in 30 mL of water and passed over a C18 cartridge (C18 WAT 020515, WATERS). The cartridge was washed with 5 mL of water to remove solvent and TFA and then dried before elution with 1 mL of Ethanol. The

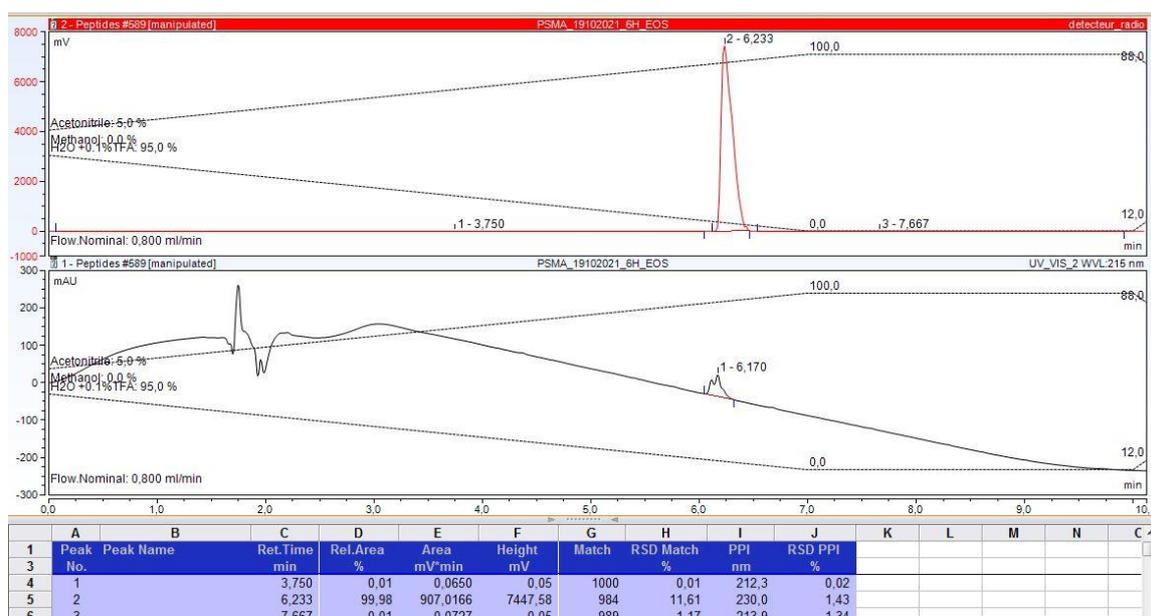
collected fraction was further diluted with NaCl 0.9% (9 mL). A radiochemical yield of **20.5%** (**47%** decay corrected yield from start of synthesis SOS) was obtained after 130 minutes of synthesis (including purification and formulation) and with a radioactive purity above 99% (analytical HPLC, Method E). The mean molar activity (end of synthesis) was determined at 60 GBq/ $\mu$ mol with this solution using a calibration curve at 254 nm;  $t_R = 6.09$  min (Method E).



**Figure 159.** HPLC analysis of the hot adducts [ $^{18}\text{F}$ ]-**67** with a radioactive detector (top) and a 215 nm UV detector (bottom). The radioactive purity (> 99%) was obtained by integration of the product compared with the rest of the chromatogram.



**Figure 160.** HPLC analysis of the co-injection of the cold and hot adducts [ $^{18}\text{F}$ ]-**67** with a radioactive detector (top) and a 215 nm UV detector (bottom).



**Figure 161.** HPLC analysis of the hot adducts [ $^{18}\text{F}$ ]-**67** six hours after the end of the synthesis with a radioactive detector (top) and a 215 nm UV detector (bottom). The radioactive purity (> 99%) was obtained by integration of the product compared with the rest of the chromatogram.

### 2.2.2.3 Biological evaluation of radioligand [ $^{18}\text{F}$ ]-**67**<sup>6</sup>

#### Cell culture

A frozen ampoule of LNCaP cells was purchased from DSMZ (ACC 256, German collection of microorganisms and cell culture GmbH, Germany). After thawing, cells were grown in 75 cm<sup>2</sup> flasks containing 12 mL RPMI-1640 media (Gibco 21875034) supplemented with 20% inactivated fetal bovine serum, 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco 15140122), 1% Glutamax (Gibco 35050038). Cells were maintained and cultured at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere twice per week. At 70-80% confluency cells were harvested (with 2 mL of trypsin-EDTA) and seeded again.

#### Cellular uptake

##### [ $^{18}\text{F}$ ]-PSMA incubation

Adherent LNCaP cells (200 000 cells per well) were maintained at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> in humidified atmosphere (incubator Incusafe, phcbi). After 4 hours, the culture medium was removed by aspiration (Vacusip, INTEGRA) and replaced by HBSS

<sup>6</sup> Performed by Patrice Marchand and Lionel Thomas (UMR 7178, IPHC, Strasbourg).

preheated at 37 °C. The radiotracer (15 microliters, 4.51 MBq) was dissolved in preheated (37 °C) HBSS before use. To each well of the 6-wells plates were added 100 microliters of <sup>18</sup>F-radiotracer to reach a final volume of 1mL per well. Cells were then incubated 15 minutes or 1 hour in humidified atmosphere at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. After incubation, the radioactive solution was removed by gentle aspiration and cells were washed 3 times with cold (5°C) NaCl solution (1mL each time, 0.9% NaCl, Bbraun). After washing, cells were covered with 1mL of 1N NaOH and let to dissolve 30 minutes at room temperature. The solutions were set in tubes and counted on a HIDEX gamma counter for 3 minutes each. Results (mean values n = 3 and standard deviation) are expressed as the percentage of the added dose per 200 000 cells (per well) and all values are decay corrected to the time of addition of the radiotracer onto the cells.

#### Incubation with 2-PMPA (mixed solution)

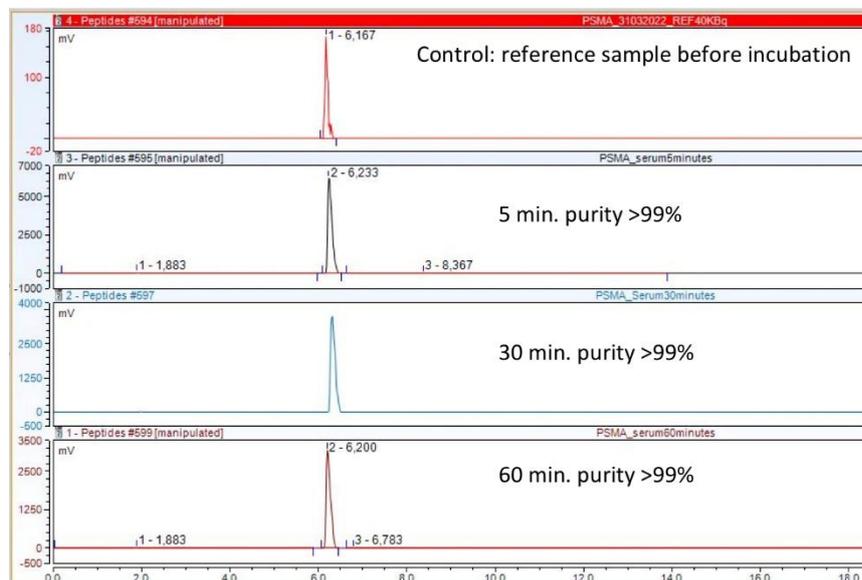
To evaluate the specificity of [<sup>18</sup>F]-**67** on PSMA receptors the same experiment was carried out in presence of 2-PMPA (Aldrich, 1mg/mL in HBSS).

To each well (containing 200 000 cells and 800 microliters of HBSS) was added 200 microliters of a solution of <sup>18</sup>F tracer pre-mixed with 2-PMPA (Aldrich, 1mg/mL in HBSS) 1/1 (v/v) to reach a final volume of 1mL per well. Plates were incubated 15 and 60 minutes at 37°C in humidified atmosphere under 5% CO<sub>2</sub>. After incubations cells were treated following the general protocol (see above).

#### **Ex-vivo stability in mouse serum of [<sup>18</sup>F]-**67****

Serum from mice was obtained from ThermoFischer scientific and used as such (100 microliters per test). To eppendorf tubes containing serum was added 50 microliters of formulated <sup>18</sup>F-PSMA (10% ethanol in 0.9% NaCl). The content was mixed (vortex 15 seconds) and incubated in a water bath at 37 °C with gentle stirring. After the incubation time (5, 30, 60 minutes) tubes were set on ice and treated by addition of 50 microliters of ACN (containing 0.1% TFA). After mixing (vortex) tubes were centrifuged (8000 RPM, 3 minutes) and the liquid phase was collected and filtered on 0.2 micrometers PTFE filter (Whatman, 13 mm). After filtration, samples were analysed by reverse phase HPLC (column Kinetex EVO C18 150x4.6 mm, Phenomenex) with a

mobile phase ACN/H<sub>2</sub>O (containing 0.1% TFA) using a fast gradient (5/95 to 100/0 within 10 minutes). Percentages of recovered activity (decay corrected to addition time) after incubation and treatment were higher than 90%.



**Figure 162.** HPLC analysis of purified <sup>18</sup>F-PSMA [<sup>18</sup>F]-67 and analysis of product extracted from mice serum at various time points (5 min, 30 min, 60 min).

### Ex-vivo stability in liver extract of [<sup>18</sup>F]-67

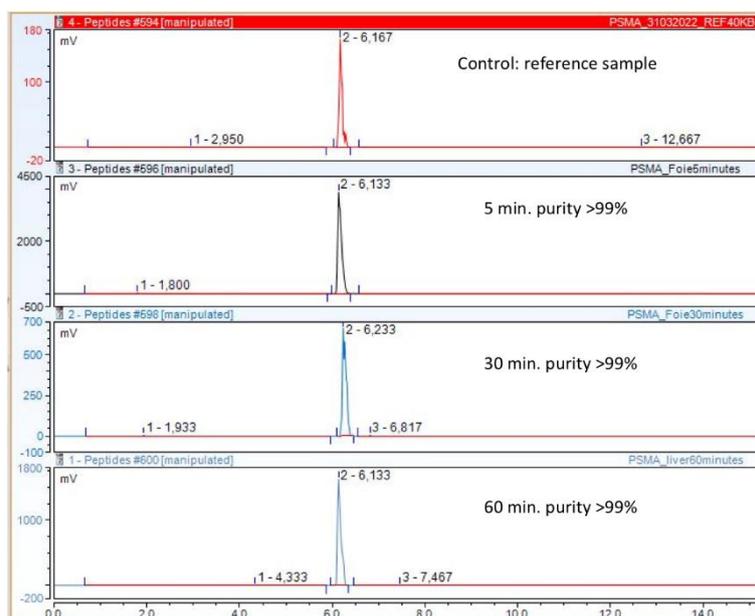
A whole liver (nude NMRI male mouse) was frozen at -20°C before being crushed (Ultra Turrax) with glass beads in presence of 2 mL of a 0.5% SDS solution (sodium dodecyl sulfate). The resulting slurry was centrifuged twice at 13 000 RPM during 3 minutes, the liquid was discarded and the extract was set in Eppendorf tubes (120 mg per tube).

To eppendorf tubes containing 120 mg of liver extract was added 50 microliters of formulated <sup>18</sup>F-PSMA (10% ethanol in 0.9% NaCl). The content was mixed (vortex 15 seconds) and incubated in a water bath at 37°C with gentle stirring.

After the incubation time (5, 30, 60 minutes) tubes were set on ice and treated by addition of 100 microliters of CH<sub>3</sub>CN (containing 0.1% TFA). After mixing (vortex) tubes were centrifuged (8000 RPM, 3 minutes), the liquid phase was collected and filtered (0.2 micrometers PTFE filter, Whatman, 13 mm).

After filtration, samples were analyzed by reverse phase HPLC (column Kinetex EVO C18 150x4.6 mm, Phenomenex) with a mobile phase CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (containing 0.1% TFA) using a fast gradient (5/95 to 100/0 within 10 minutes).

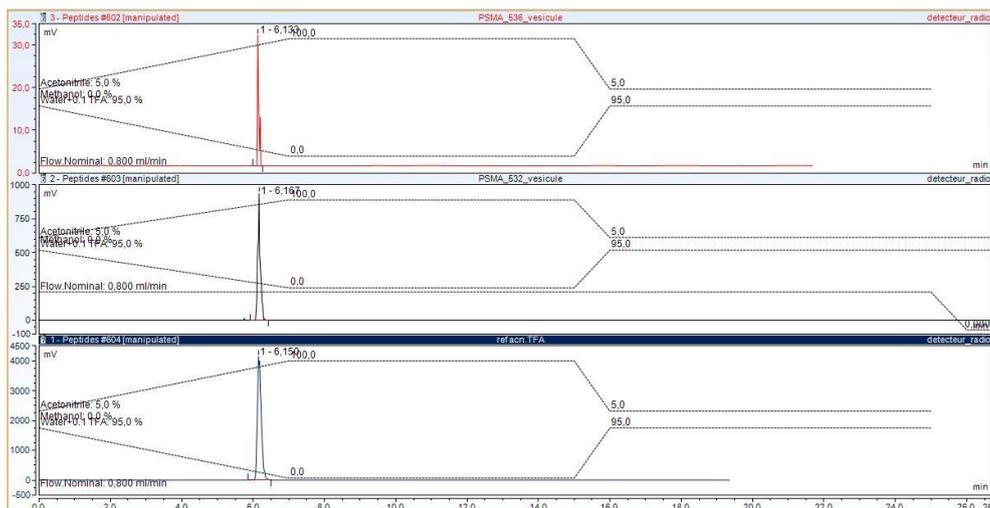
The following activities (decay corrected) were recovered after extraction, 27%, 19% and 53% at 5, 30 and 60 minutes respectively.



**Figure 163.** HPLC chromatogram (radioactive channel) of [ $^{18}\text{F}$ ]-67 incubated with liver extract at 5, 30 and 60 minutes.

### Ex-vivo stability in gall Bladder extract of [ $^{18}\text{F}$ ]-67

Two athymic nude mice (NMRI-Foxn1 nu/nu) were i.v. injected (tail vein) with [ $^{18}\text{F}$ ]-PSMA (11-12 MBq) formulated in 0.9% NaCl. After 15 minutes of biodistribution (under 2.5% isoflurane in air) mice were killed by cardiac puncture under deep anaesthesia. The gall bladder was carefully removed and counted. Each sample was crushed in presence of 100 microliters of  $\text{CH}_3\text{CN}$  containing 0.1% TFA. The content was mixed (vortex, 1 minute), centrifuged (3 minutes at 9000 RPM) and the supernatant was collected and filtered (13 mm Whatmann filter, cellulose acetate, 0.2 micrometers). The percentages of recovered activity (decay corrected) were 20 and 47% respectively. After filtration samples were analysed by reverse phase HPLC (column Kinetex EVO C18 150x4.6 mm, Phenomenex) with a mobile phase  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (containing 0.1% TFA) using a fast gradient (5/95 to 100/0 within 10 minutes).



**Figure 164.** HPLC chromatograms of the extracts of gall bladder 15 minutes post *i.v.* injection of radioligand [ $^{18}\text{F}$ ]-67 (radioactive channel only).

### **Ex-vivo Stability in whole mice blood using [ $^{19}\text{F}$ ]-67 (non-radioactive form)**

Stability in whole blood of mice was performed using the non-radioactive compound [ $^{19}\text{F}$ ]-67. Analytical method was developed and a calibration curve was realized using a Shimadzu LC-MS/MS 8030 (UPLC coupled to a triple quadrupole mass detector using a phenomenex kinetex column 2.6  $\mu\text{m}$  C18 100A $^\circ$ , 50 x 2.1 mm and a gradient  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  containing 0.5%  $\text{HCO}_2\text{H}$  at 0.5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). A stock solution of [ $^{19}\text{F}$ ]-67 in DMSO (10 mM) was prepared and further diluted to 0.1 mM with DMSO. The solution was added to whole mice blood (total volume 400  $\mu\text{L}$ ) to reach a final concentration of 1  $\mu\text{M}$ . Samples were incubated at 37  $^\circ\text{C}$  during 5, 15, 30, 60 and 120 min under agitation. For each assay, 20  $\mu\text{L}$  were withdrawn and mixed with 100  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  (1/1) containing 0.5% of  $\text{ZnSO}_4$ . Samples were mixed 5 minutes (vortex), then centrifuged 5 minutes at 15 000 G (at 16  $^\circ\text{C}$ ). Each sample was analyzed by LC-MS/MS (3  $\mu\text{L}$  injected volume) and the concentration of [ $^{19}\text{F}$ ]-67 was determined using the calibration curve.

The compound was found to be stable over 120 min under these conditions with no apparent variations of the concentration of [ $^{19}\text{F}$ ]-67 during the incubation time.

### **Ex-vivo Stability in mice liver microsomes using [ $^{19}\text{F}$ ]-61, [ $^{19}\text{F}$ ]-62 and [ $^{19}\text{F}$ ]-67 (non-radioactive forms)**

Stability in whole blood of mice was performed using the non-radioactive compounds [<sup>19</sup>F]-61, and [<sup>19</sup>F]-67. Analytical method was developed and a calibration curve was realized using a Shimadzu LC-MS/MS 8030 (UPLC coupled to a triple quadrupole mass detector using a phenomenex kinetex column 2.6 μm C18 100A°, 50 x 2.1 mm and a gradient H<sub>2</sub>O/MeCN containing 0.5% HCO<sub>2</sub>H at 0.5 mL.min<sup>-1</sup>). A stock solution of [<sup>19</sup>F]-61 or [<sup>19</sup>F]-67 in DMSO (10 mM) was prepared and further diluted to 0.1 mM with DMSO. The solution was added to a phosphate buffer containing mice liver microsomes (total volume 400 mL) to reach a final concentration of 1 μM. Samples were incubated at 37 °C during 2, 10, 20, 40 and 60 min under agitation. For each assay, 70 mL were withdrawn and mixed with 70 mL of MeCN at 0°C. Samples were mixed 5 minutes (vortex), set in an ultrasound bath for 1 min and then centrifuged 5 minutes at 15 000 G (at 16 °C). Each sample was analyzed by LC-MS/MS (3 mL injected volume) and the concentration of [<sup>19</sup>F]-61 or [<sup>19</sup>F]-67 was determined using the calibration curve.

Compounds [<sup>19</sup>F]-61 or [<sup>19</sup>F]-67 exhibited half-lives of 9 ± 1 min, >60 min.

#### **Injection of LNCAP cells to Nude NMRI male mice via subcutaneous injection**

4-week-old, athymic nude male mice (NMRI-Foxn1 nu/nu) were purchased from Janvier Laboratories (Saint Berthevin, France) and housed under pathogen-free conditions. All *in vivo* procedures were carried out following experimental protocols and guidelines for the well-being and use of animals and were approved by the Strasbourg ethics committee for animal experimentation and the French ministry of research (CREMEAS, Strasbourg, France, Apafis #9919).

Animals were housed with constant temperature (22°C) and humidity (40%) and a 12-h light–dark cycles. They were allowed free access to food and water until the beginning of the imaging procedure.

LNCap cells were purchased from DSMZ (German collection of microorganisms and cell culture GmbH, Germany).

Under anesthesia (2.5% isoflurane in air), 10x10<sup>6</sup> cells in 70 microliters of PBS/Matrigel (Corning) 1:1 (v/v) were injected on the back of the right shoulder of 7 weeks old athymic nude male mice. Growth of tumors was monitored by caliper measurements (long and small axis), a minimum of 35 days of growth was necessary to obtain tumors of 10 to 100 mm<sup>3</sup>.

## **Injection of [<sup>18</sup>F]-67, PET imaging and quantification**

9.2 ± 2 MBq of [<sup>18</sup>F]-67 were diluted in 0.9% NaCl for injection to reach a total volume of 200 µl. The mice were maintained under 2.5% isoflurane anaesthesia and injected *via* the tail vein. After injection the mice were quickly placed under the PET imaging system and a 90 min dynamic acquisition was performed (start time 4 min after the end of injection). For static acquisition, mice were kept awake for 60 min before a 10 min acquisition scan. During acquisition, mice were kept under an atmosphere of isoflurane (2-3% in air) and heated. Mice were placed tail first and supine.

VOI (volume of interest) were manually drawn on coronal, sagittal and axial views for the tumor and the organs. For blood activity measurement from PET images a VOI was located inside the heart on the first frame of the dynamic acquisition and propagated over the 18 frames.

A VOI (identical to the one used for the tumor) was set on the opposite shoulder (left shoulder) to be used as a reference tissue for quantification.

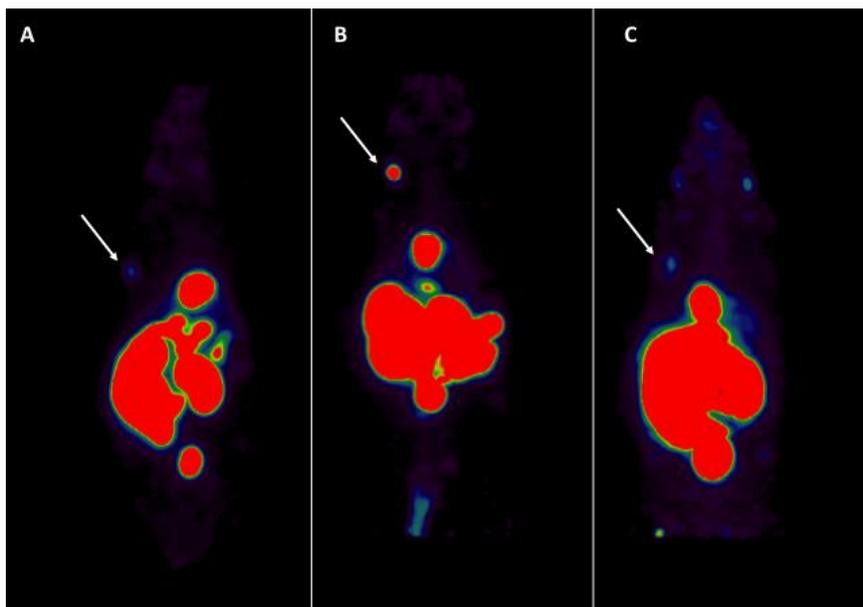
For Liver quantification a VOI was located on the left and/or right lobe of liver (with exclusion of gall bladder).

For Kidneys, a VOI was set on one of the kidneys (right or left indifferently).

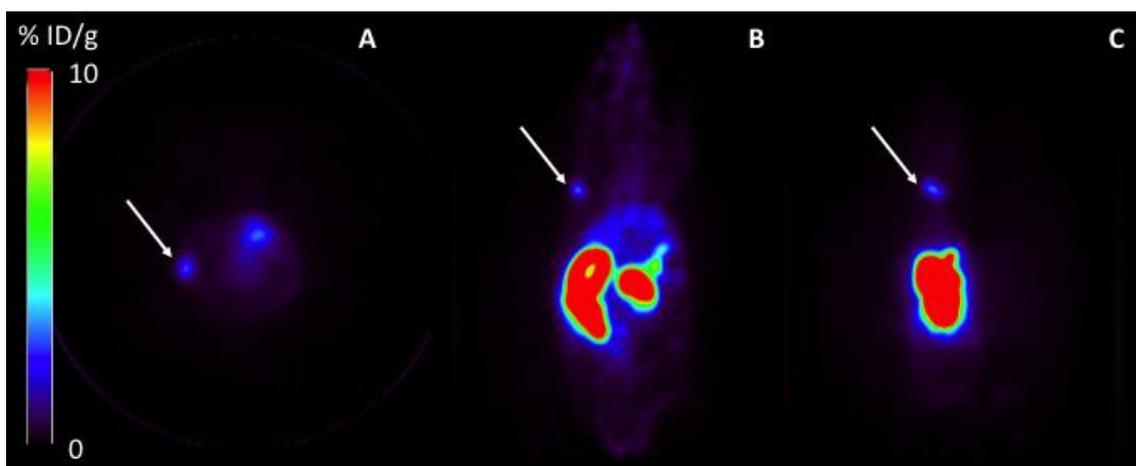
All values (mean values and standard deviations) obtained are expressed as percentage of injected dose per gram (% ID/g, assuming 1 mL = 1g) and corrected for decay (to the time of injection).

## **Additional PET Images**

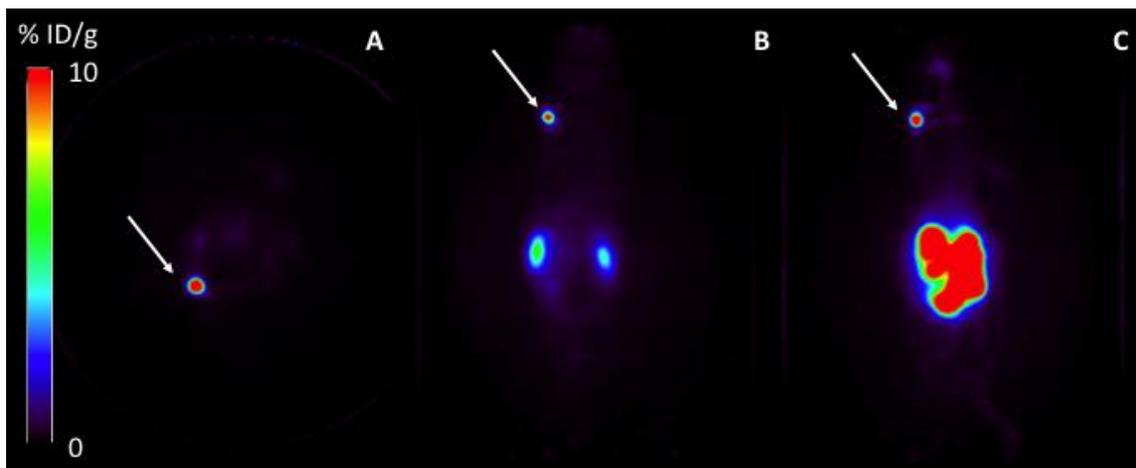
MIP (Maximum Intensity Projection) images were obtained using OSIRIX software. The white arrow pointing at the tumor. Axial, Coronal and Sagittal views of mice were obtained using Amide software. The white arrow pointing at the tumor. All images are scaled from 0 to 10% of the injected dose per gram (%ID/G, assessing 1 g = 1 mL).



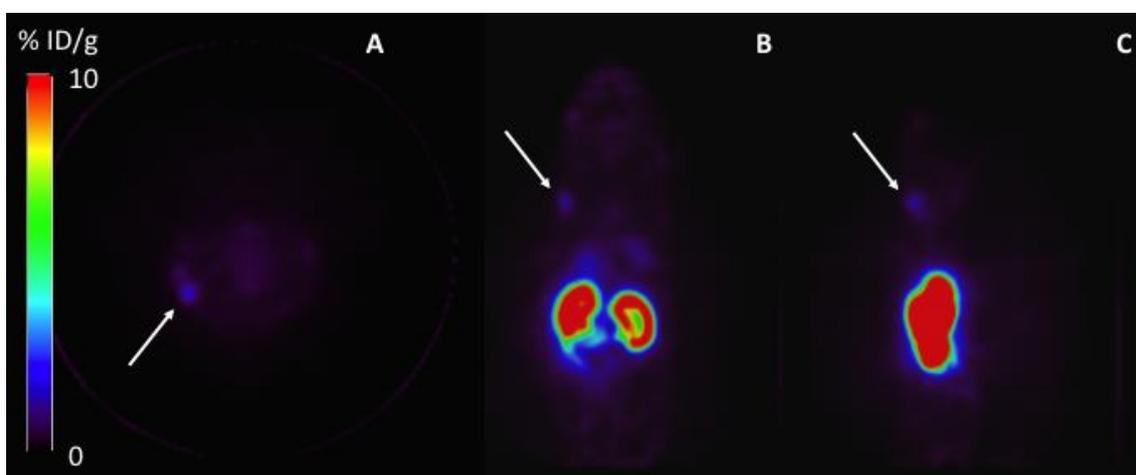
**Figure 165.** Maximum Intensity Projections. A) Mouse #525 60 min post-injection of 10.85 MBq of [ $^{18}\text{F}$ ]-67. B) Mouse 529 60 min post-injection of 8.36 MBq of [ $^{18}\text{F}$ ]-67. C) Mouse #530 60 min post-injection of 11.56 MBq of [ $^{18}\text{F}$ ]-67. White arrow pointing at the tumor.



**Figure 166.** Mouse # 525. 60 minutes post injection of 10.85 MBq of [ $^{18}\text{F}$ ]-67. A) Axial view. B) Coronal view. C) Sagittal view. White arrow pointing at the tumor.



**Figure 167.** Mouse # 529. 60 minutes post injection of 8.36 MBq of  $[^{18}\text{F}]\text{-67}$ . A) Axial view. B) Coronal view. C) Sagittal view. White arrow pointing at the tumor.

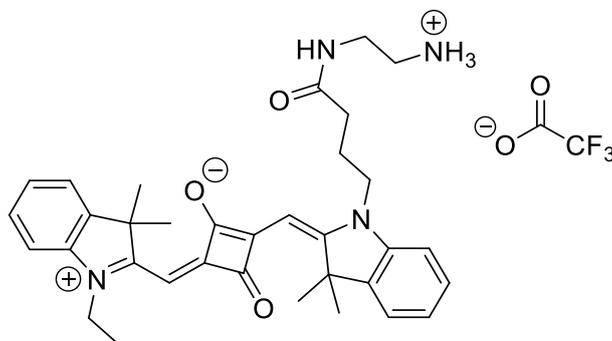


**Figure 168.** Mouse # 530. 60 minutes post injection of 11.56 MBq of  $[^{18}\text{F}]\text{-67}$ . A) Axial view. B) Coronal view. C) Sagittal view. White arrow pointing at the tumor.

## 2.2.3. Application au marquage de peptides à l'aide de fluorophores

### 2.2.3.1 Chemical syntheses

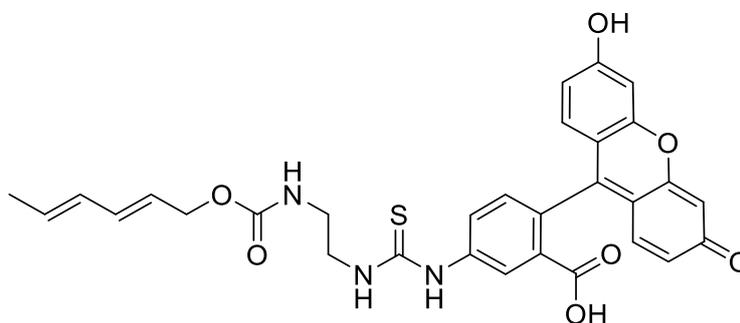
#### SQ-CO<sub>2</sub>H (72)



To a stirred solution of **70** (1 eq., 36 mg, 0.071 mmol) and *N*-Boc-ethylenediamine (1.5 eq., 17 mg, 0.11 mmol) in dry DMF (2.1 mL), PyBOP (1.5 eq., 55 mg, 0.11 mmol) and DIEA (8 eq., 0.1 mL, 0.56 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The resulting mixture was purified by reverse phase flash chromatography using a linear gradient (10% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL.min<sup>-1</sup>) of ACN in H<sub>2</sub>O. Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to give **71** a blue foam. The residue was then dissolved in DCM (2.1 mL) and treated with TFA (2.1 mL) for 30 min. The volatiles were removed under vacuum, H<sub>2</sub>O and ACN were added and the residue was lyophilized to give the desired product as a dark blue amorphous solid (37 mg, **78%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO) δ 8.01 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.69 (s, 3H), 7.45 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.35 - 7.20 (m, 4H), 7.09 (dtd, *J* = 8.2, 5.0, 2.9 Hz, 2H), 5.73 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H), 4.05 (q, *J* = 7.4 Hz, 4H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.21 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 2.78 (h, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>·TFA), 2.20 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.88 (p, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.61 (d, *J* = 3.9 Hz, 12H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO) δ 181.1, 179.4, 179.0, 172.6, 169.4, 169.3, 142.7, 142.2, 142.0, 141.9, 128.5, 128.4, 124.2, 124.1, 122.7, 110.7, 110.6, 86.5, 86.2, 49.2, 49.2, 42.9, 39.3, 38.5, 37.0, 32.3, 27.0, 26.9, 22.8, 12.2. **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>34</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 553.3179, Found: 553.3179 (Δ<sub>HRMS</sub> = 0 ppm); t<sub>R</sub> = 4.01 min (Method D).

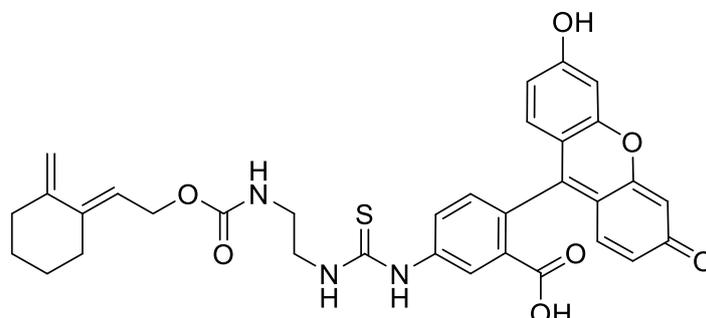
**5-(3-(2-((((2E,4E)-hexa-2,4-dien-1-yl)oxy)carbonyl)amino)ethyl)thioureido)-2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoic acid (73)**



Acyclic carbonate diene **44** (1 eq., 18 mg, 0.067 mmol) was dissolved in DMF (1 mL) and Et<sub>3</sub>N (3 eq., 28  $\mu$ L, 0.2 mmol) was added. **68** (1 eq., 30 mg, 0.067 mmol) was dissolved in DMF (0.5 mL) and added to the previous solution. The mixture was stirred at room temperature overnight, evaporated and purified by reverse phase flash chromatography using a linear gradient (10% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL.min<sup>-1</sup>) of ACN in H<sub>2</sub>O. Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to give the desired pure product **73** as a purple amorphous foam (21 mg, 55%).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO)  $\delta$  10.13 (bs, 2H), 10.01 (bs, 1H), 8.21 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.74 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.31 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 1H), 7.19 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 6.69 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 2H), 6.65 - 6.54 (m, 4H), 6.24 (dd,  $J$  = 15.2, 10.4 Hz, 1H, CH=C<sup>H<sup>diene</sup></sup>), 6.07 (ddd,  $J$  = 15.2, 10.6, 1.9 Hz, 1H, CH=C<sup>H<sup>diene</sup></sup>), 5.73 (dq,  $J$  = 13.7, 6.7 Hz, 1H, CH=C<sup>H<sup>diene</sup></sup>), 5.63 (dt,  $J$  = 15.2, 6.3 Hz, 1H, CH=C<sup>H<sup>diene</sup></sup>), 4.49 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 2H, C=CH-CH<sub>2</sub>O), 3.60 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 3.24 (q,  $J$  = 6.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 1.79 - 1.65 (m, 3H, C=CH-CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO)  $\delta$  184.6, 181.2, 168.9, 160.0, 156.8, 152.4, 133.8, 131.1, 130.7, 129.5, 125.9, 124.6, 113.0, 110.2, 102.7, 64.5, 44.2, 18.3; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>30</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 574.1645, Found : 574.1648 ( $\Delta_{\text{HRMS}}$  = 0.52 ppm);  $t_{\text{R}}$  = 4.51 min (Method B).

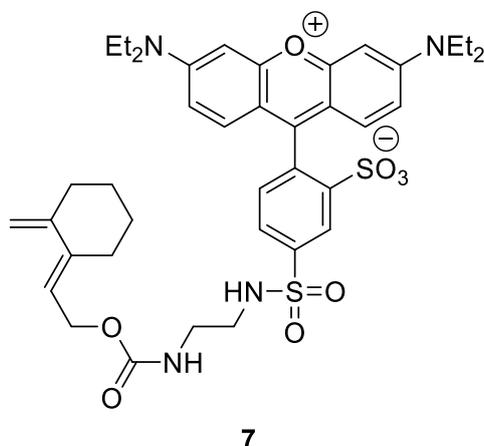
**(E)-2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)-5-(3-(2-(((2-(2-methylenecyclohexylidene)-ethoxy)carbonyl)amino)ethyl)thioureido)benzoic acid (74)**



Exocyclic carbonate diene **59** (1 eq., 26 mg, 0.085 mmol) was dissolved in DMF (1.5 mL) and Et<sub>3</sub>N (3 eq., 36  $\mu$ L, 0.26 mmol) was added. **68** (1 eq., 38 mg, 0.085 mmol) was dissolved in DMF (0.7 mL) and added to the previous solution. The mixture was stirred at room temperature overnight, evaporated and purified by reverse phase flash chromatography using a linear gradient (5% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL.min<sup>-1</sup>) of ACN in H<sub>2</sub>O. Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to give the desired pure product **74** as a yellow amorphous foam (26 mg, **50%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO)  $\delta$  10.13 (bs, 2H), 10.00 (bs, 1H), 8.20 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.74 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.29 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H), 7.19 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 6.69 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 2H), 6.64 - 6.54 (m, 4H), 5.51 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 1H, C=CH-CH<sub>2</sub>-O), 4.86 - 4.77 (m, 1H), 4.64 (dt,  $J$  = 2.6, 1.4 Hz, 1H, C=CH<sub>2</sub>), 4.54 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 2H, C=CH-CH<sub>2</sub>-O), 3.60 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 3.36 (bs, 3H), 3.24 (q,  $J$  = 6.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 2.22 (dt,  $J$  = 17.3, 6.1 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.67 - 1.50 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO)  $\delta$  181.2, 168.9, 159.9, 156.9, 152.4, 150.1, 147.8, 144.6, 141.6, 129.5, 127.1, 124.5, 118.3, 117.3, 113.0, 110.2, 109.1, 102.7, 83.5, 60.4, 44.2, 35.1, 28.7, 26.7, 26.0; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>33</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 614.1961, Found: 614.1959 ( $\Delta_{\text{HRMS}}$  = 0.33 ppm);  $t_{\text{R}}$  = 4.85 min (Method B).

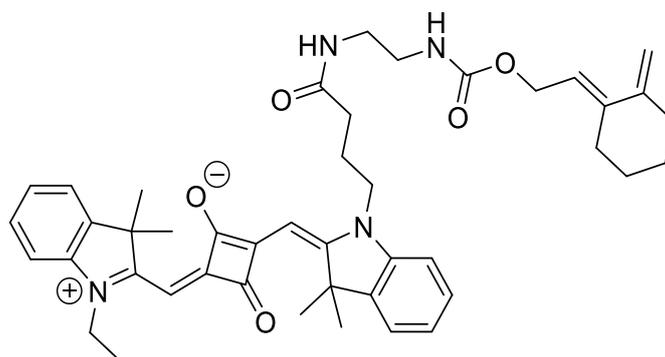
**(E)-2-(3,6-bis(diethylamino)xanthylium-9-yl)-5-(N-(2-(((2-(2-methylenecyclohexylidene)-ethoxy)carbonyl)amino)ethyl)sulfamoyl)benzenesulfonate (75)**



Exocyclic carbonate diene **59** (1 eq., 10 mg, 0.032 mmol) was dissolved in DMF (1 mL) and Et<sub>3</sub>N (3 eq., 13  $\mu$ L, 0.087 mmol) was added. **69** (1 eq., 19 mg, 0.032 mmol) was dissolved in DMF (0.5 mL) and added to the previous solution. The mixture was stirred at room temperature overnight, evaporated and purified by reverse phase flash chromatography using a linear gradient (5% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>) of ACN in H<sub>2</sub>O. Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to give the desired pure product **75** as a purple amorphous foam (15 mg, **63%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO)  $\delta$  8.41 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 8.02 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 1H), 7.93 (dd,  $J$  = 8.0, 1.9 Hz, 1H), 7.47 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.20 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 1H), 7.07 - 6.97 (m, 4H), 6.94 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 2H), 5.48 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 1H, C=CH-CH<sub>2</sub>-O), 4.80 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H, C=CH<sub>2</sub>), 4.65 - 4.59 (m, 1H, C=CH<sub>2</sub>), 3.77 - 3.54 (m, 8H, N(CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.09 (q,  $J$  = 6.5 Hz, 2H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 2.91 (q,  $J$  = 6.6 Hz, 2H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 2.21 (dt,  $J$  = 14.0, 5.9 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.55 (tq,  $J$  = 10.6, 5.0 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.21 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 12H, N(CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO)  $\delta$  158.0, 157.6, 156.7, 155.5, 150.1, 148.6, 144.6, 141.9, 133.6, 133.2, 131.1, 127.0, 126.2, 118.3, 114.1, 114.0, 109.1, 95.9, 60.4, 45.7, 42.6, 35.1, 28.7, 26.7, 26.0, 12.9; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>39</sub>H<sub>49</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 769.2992, Found: 769.2991 ( $\Delta_{\text{HRMS}}$  = 0.13 ppm);  $t_{\text{R}}$  = 4.96 min (Method D).

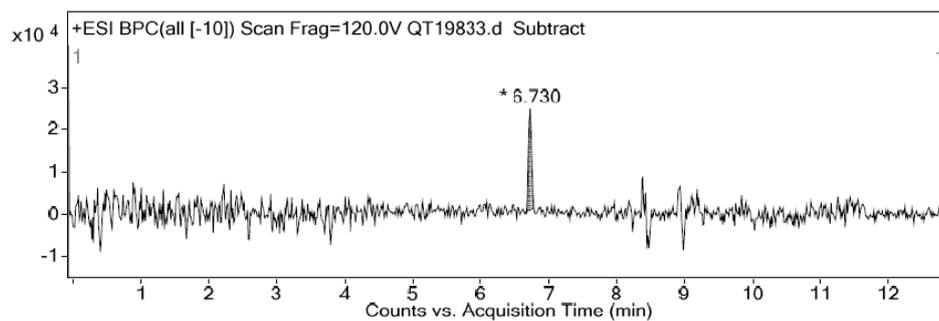
## SQ-exocyclid diene (**76**)



Exocyclic carbonate diene **59** (1 eq., 7.7 mg, 0.026 mmol) was dissolved in DMF (1 mL) and Et<sub>3</sub>N (3 eq., 11  $\mu$ L, 0.077 mmol) was added. **70** (1 eq., 17 mg, 0.026 mmol) was dissolved in DMF (0.5 mL) and added to the previous solution. The mixture was stirred at room temperature overnight, evaporated and purified by reverse phase flash chromatography using a linear gradient (10% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL.min<sup>-1</sup>) of ACN in H<sub>2</sub>O. Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to give the desired pure product **76** as a blue amorphous foam (17 mg, **93%**).

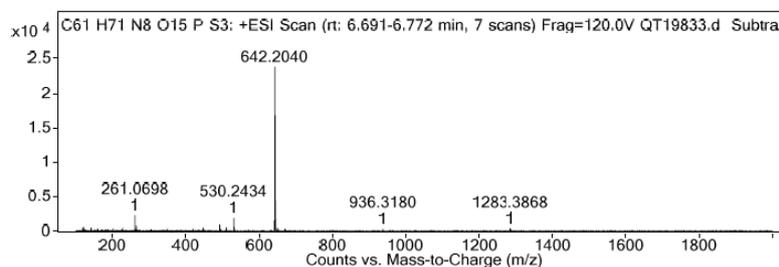
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO)  $\delta$  7.94 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H), 7.57 - 7.47 (m, 2H), 7.40 - 7.26 (m, 4H), 7.16 (m, 3H), 5.80 (d,  $J$  = 4.9 Hz, 2H), 5.53 - 5.41 (m, 1H, C=CH-CH<sub>2</sub>-O), 4.78 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H, C=CH<sub>2</sub>), 4.62 (dt,  $J$  = 2.7, 1.4 Hz, 1H, C=CH<sub>2</sub>), 4.47 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 2H, C=CH-CH<sub>2</sub>-O), 4.12 (m, 4H), 3.18 - 2.97 (m, 4H), 2.21 (m, 6H), 1.92 (p,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.68 (s, 6H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.68 (s, 6H), 1.55 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.28 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, DMSO)  $\delta$  181.1, 179.5, 179.2, 171.8, 169.4, 169.2, 156.7, 150.1, 144.5, 142.7, 142.2, 142.0, 128.5, 124.2, 124.1, 122.8, 122.7, 118.3, 110.7, 110.6, 109.1, 86.5, 86.2, 60.2, 49.2, 49.2, 43.0, 39.1, 38.4, 35.1, 32.4, 28.7, 27.0, 26.9, 26.7, 26.0, 22.9, 12.2.; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>44</sub>H<sub>53</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 717.4016, Found 717.4011 ( $\Delta_{\text{HRMS}}$  = 0.70 ppm); **t<sub>R</sub>** = 5.59 min (Method D).



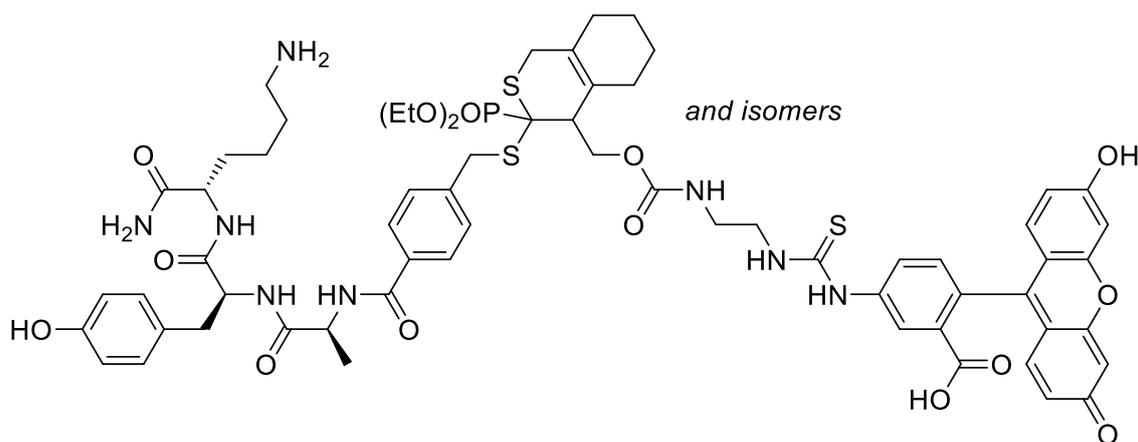


Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	6.638	6.73	6.786	23980.67	75519.66	100	100



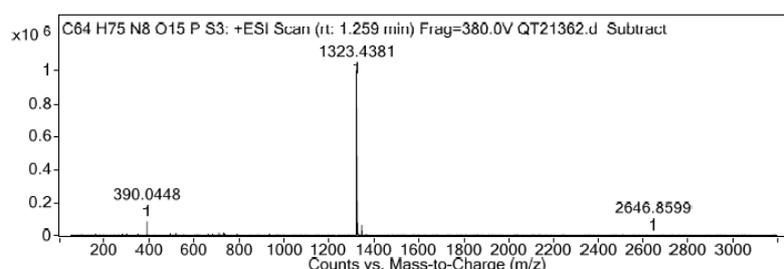
### Fluorescein-exocyclic-Adducts-(Ala-Tyr-Lys)-NH<sub>2</sub> (78)



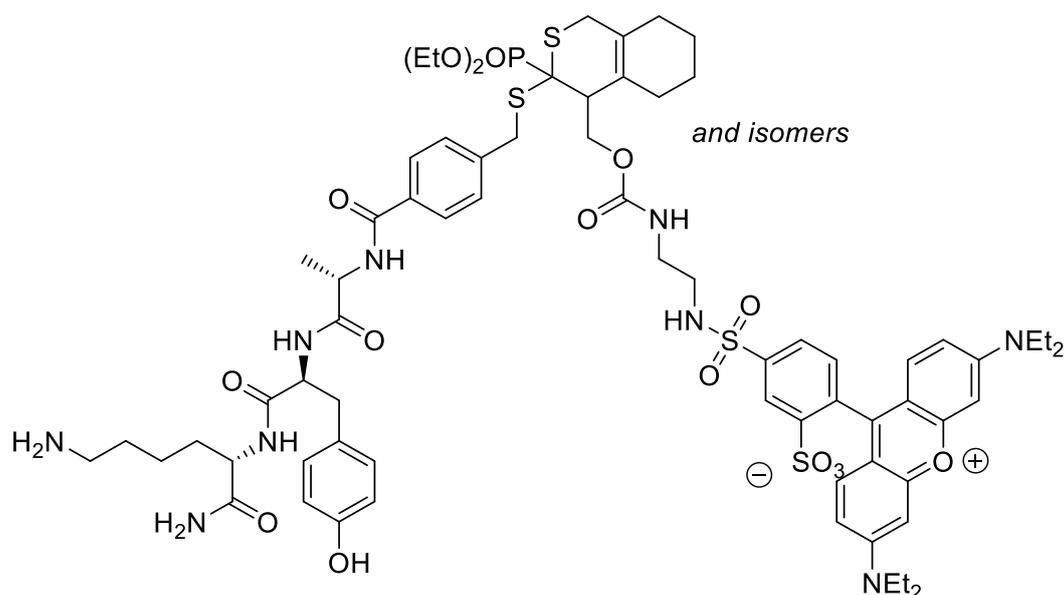
Phosphonodithioester-tripeptide **40** (1 eq., 4.5 mg, 5.5  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in *i*PrOH (275  $\mu\text{L}$ ) and was added to a solution of **74** (1.2 eq., 4 mg, 6.5  $\mu\text{mol}$ ) in H<sub>2</sub>O (275  $\mu\text{L}$ ). The mixture was stirred for 1 hour at 37 °C until complete conversion and the reaction mixture was evaporated and lyophilised. The crude was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5  $\mu\text{m}$ , 19  $\times$  150 mm) using a linear gradient (5% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ ) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O,

v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to give the purified adduct **78** as a yellow amorphous foam (5.3 mg, **67%**).

**HRMS** (ESI-TOF; Direct infusion) Calculated for  $C_{64}H_{76}N_8O_{15}PS_3$   $[M+H]^+$ : 1323.4330, Found: 1323.4381 ( $\Delta_{HRMS} = 3.85$  ppm);  $t_R = 4.05$  min (Method D).



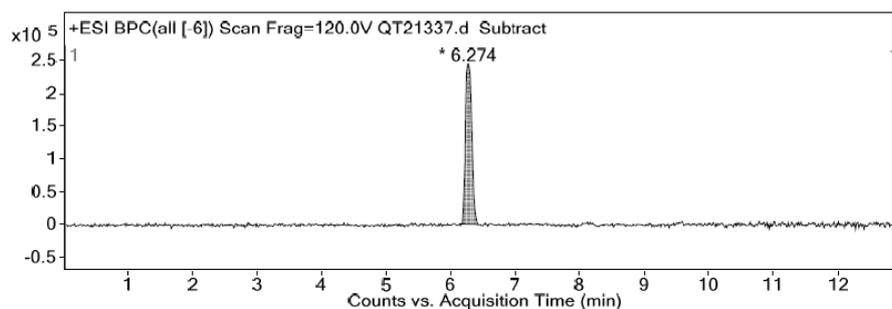
### RhodamineB-exocyclic-Adducts-(Ala-Tyr-Lys)-NH<sub>2</sub> (**79**)



Phosphonodithioester-tripeptide **40** (1 eq., 5.6 mg, 6.8  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in *i*PrOH (345  $\mu\text{L}$ ) and was added to a solution of **75** (1.2 eq., 6.2 mg, 8.1  $\mu\text{mol}$ ) in  $\text{H}_2\text{O}$  (345  $\mu\text{L}$ ). The mixture was stirred for 1 hour at 37  $^\circ\text{C}$  until complete conversion and the reaction mixture was evaporated and lyophilised. The crude was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5  $\mu\text{m}$ , 19  $\times$  150 mm) using a linear gradient (5% to 95% in 40 min, flow-rate of 18  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1%

TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to give the purified adduct **79** as a purple amorphous foam (7.1 mg, **66%**).

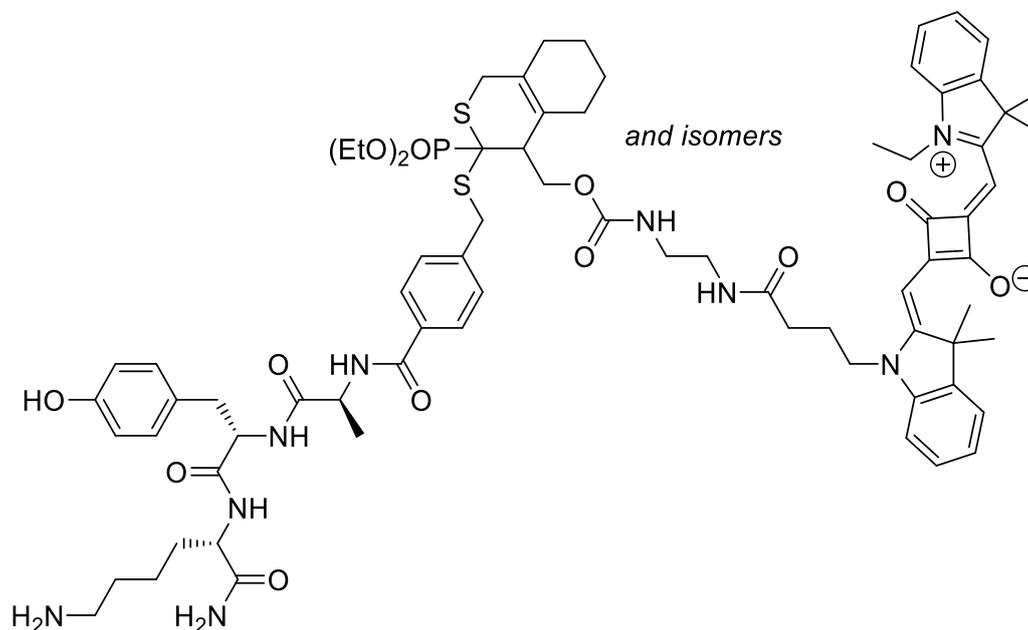
**HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>70</sub>H<sub>94</sub>N<sub>9</sub>O<sub>16</sub>PS<sub>4</sub> [M+2H]<sup>2+</sup>: 737.7720, Found: 737.7731 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 1.49$  ppm);  $t_{\text{R}} = 4.25$  min (Method D).



Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	6.138	6.274	6.43	243789.53	1653495.98	100	100

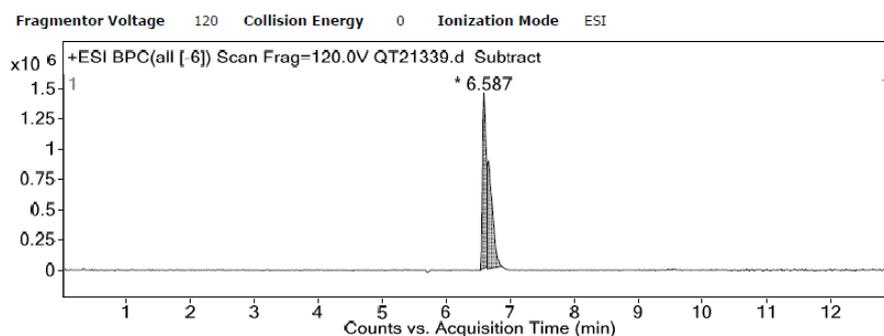
### Squaraine-exocyclic-Adducts-(Ala-Tyr-Lys)-NH<sub>2</sub> (**80**)



Phosphonodithioester-tripeptide **40** (1 eq., 4.5 mg, 5.5  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in *i*PrOH (275  $\mu\text{L}$ ) and was added to a solution of **76** (1.2 eq., 4.7 mg, 6.6  $\mu\text{mol}$ ) in H<sub>2</sub>O (275  $\mu\text{L}$ ). The mixture was stirred for 1 hour at 37 °C until complete conversion and the reaction mixture was evaporated and lyophilised. The crude was purified by semi-

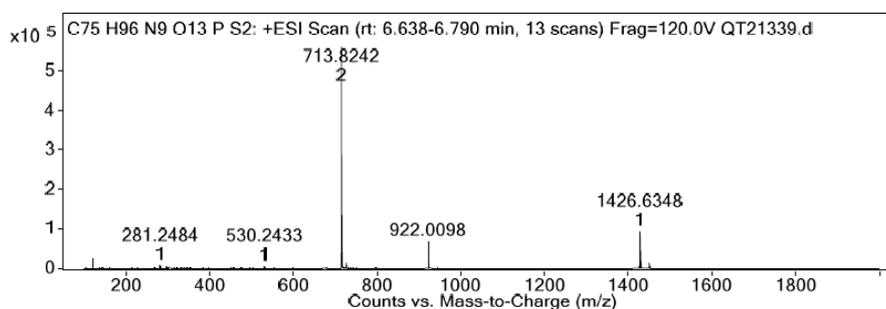
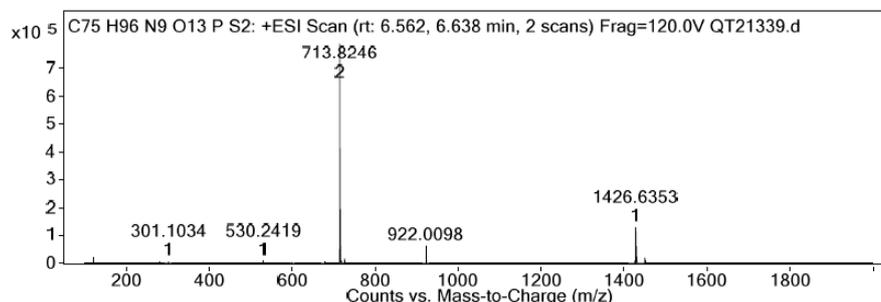
preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5  $\mu\text{m}$ , 19  $\times$  150 mm) using a linear gradient (5% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL $\cdot$ min $^{-1}$ ) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H $_2$ O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to give the purified adduct **80** as a blue amorphous foam (5.9 mg, **70%**).

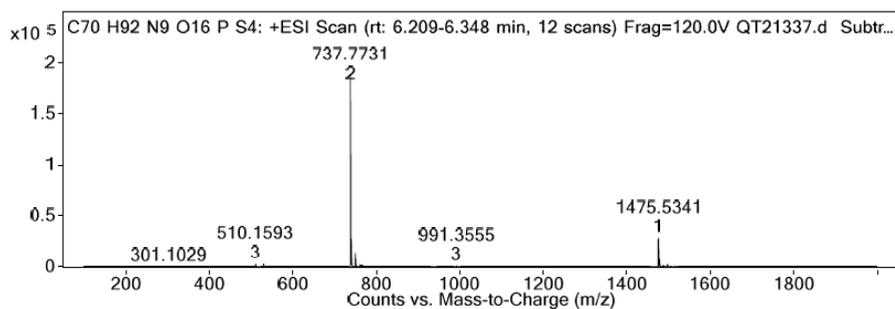
**HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C $_{75}$ H $_{97}$ N $_9$ O $_{13}$ PS $_2$  [M+H] $^+$ : 1426.6380, Found: 1426.6353, 1426.6348 ( $\Delta_{\text{HRMS}}$  = 1.89 ppm & 2.24 ppm);  $t_{\text{R}}$  = 4.58 min (Method D).



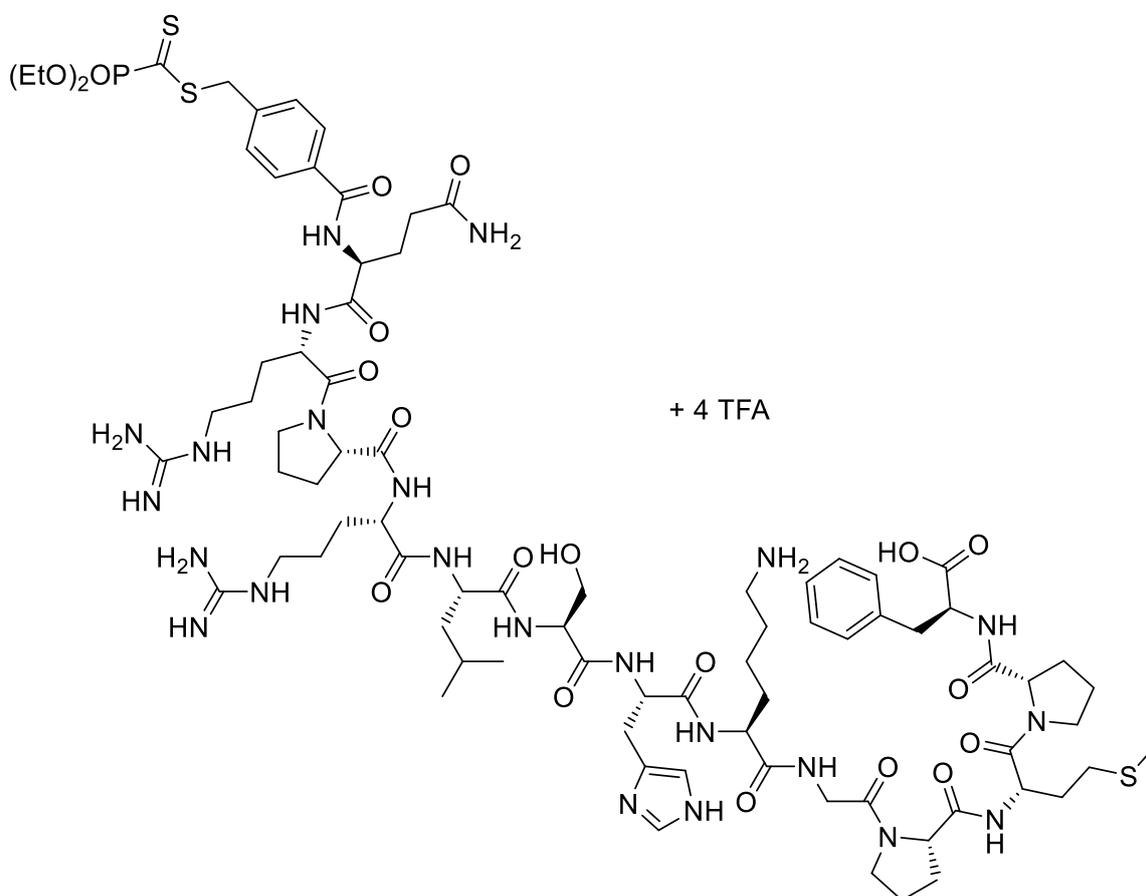
Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	6.523	6.587	6.638	1455052.11	5562334.75	100	52.37
2	6.638	6.663	6.866	890572.63	5058113.6	90.94	47.63





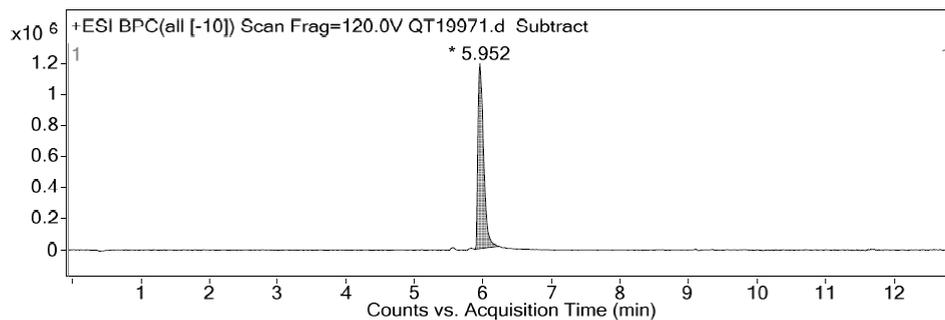
### Dithioester-Apeline-13 (**81**)



For phosphonodithioester-Q13F **81**, peptide elongation was performed following the **automated SPSS** method and **39a** was used in **step 2**. After **step 3**, the TFA solution was filtered and poured in cold Et<sub>2</sub>O to precipitate the peptide as a pink solid. This solid was then centrifuged, the Et<sub>2</sub>O was discarded and this process was repeated 3 times. The resulting pink solid was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5 μm, 19 × 150

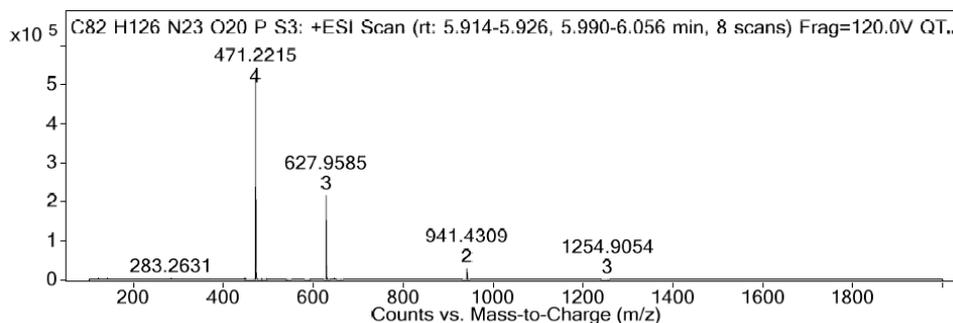
mm) using a linear gradient (5% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL.min<sup>-1</sup>) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to give the purified phosphonodithioester-Q13F **81** as a pink amorphous solid (54 mg, **24%**).

**HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>82</sub>H<sub>128</sub>N<sub>23</sub>O<sub>20</sub>PS<sub>3</sub> [M+2H]<sup>2+</sup>: 940.9305, Found: 940.9293 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 1.28$  ppm);  $t_{\text{R}} = 3.33$  min (Method C).

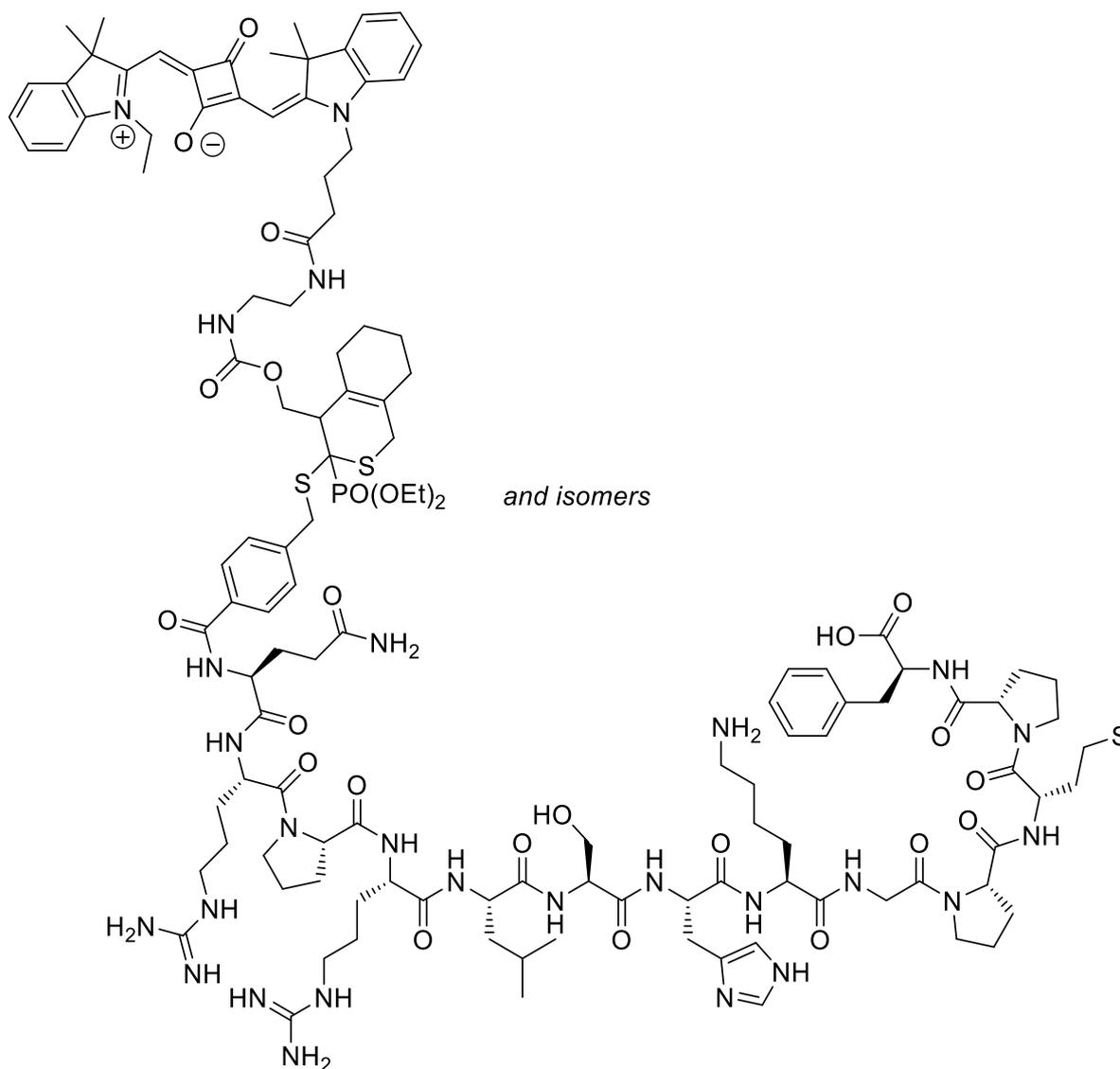


**Integration Peak List**

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	5.874	5.952	6.232	1192468.43	6893661.6	100	100

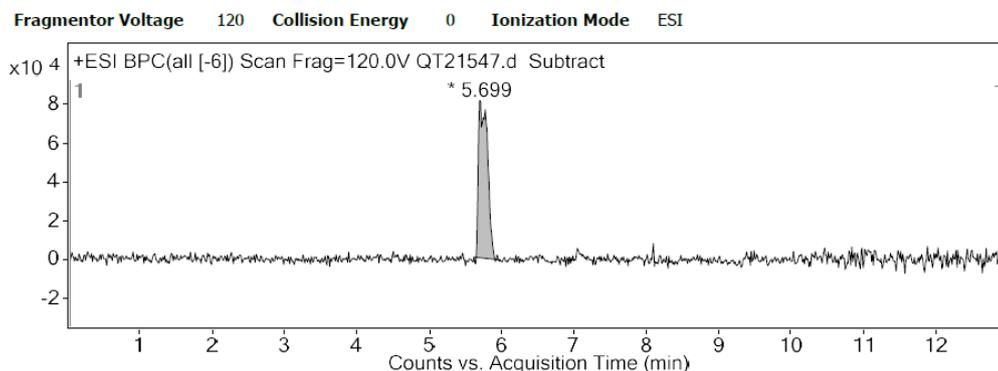


## Squaraine-exocyclic-Adducts-(Apeline-13)-OH (**82**)



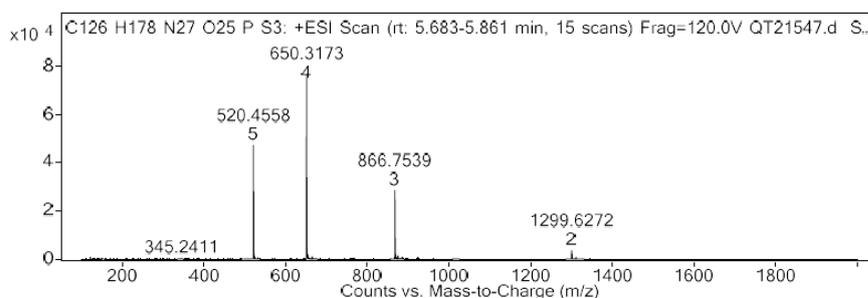
Phosphonodithioester-Q13F **81** (1 eq., 5.6 mg, 2.4  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in  $\text{H}_2\text{O}$  (120  $\mu\text{L}$ ) and was added to a solution of **76** (1.2 eq., 2 mg, 2.9  $\mu\text{mol}$ ) in *i*PrOH (120  $\mu\text{L}$ ). The mixture was stirred for 1 hour at 37  $^\circ\text{C}$  until complete conversion and the reaction mixture was evaporated and lyophilised. The crude was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5  $\mu\text{m}$ , 19  $\times$  150 mm) using a linear gradient (5% to 95% in 40 min, flow-rate of 18  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) of solvent B (0.1% AcOH in ACN, v/v) in solvent A (0.1% AcOH in  $\text{H}_2\text{O}$ , v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to give the purified adduct **82** as a blue amorphous foam (4.6 mg, 68%).

**HRMS (ESI-TOF):** Calculated for  $C_{126}H_{182}N_{27}O_{25}PS_3 [M+4H]^{4+}$ : 650.0675, Found 650.0676 ( $\Delta_{HRMS} = 0.15$  ppm);  $t_R = 4.07$  min (Method D);  $t_R = 8.13$  min (Method E).



**Integration Peak List**

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	5.62	5.699	5.981	81528.19	707960.89	100	100



**Peak List**

$m/z$	$z$	Abund
520.2562	5	30697.32
520.4558	5	47014.66
520.6555	5	42376.27
520.8557	5	28262.92
650.0676	4	51177.6
650.3173	4	78183.14
650.5669	4	69205.25
650.8165	4	45779.62
651.067	4	25161.81
866.7539	3	28513.4

### 2.2.3.2 Photophysical characterisation

#### General information

Absorption spectra were recorded on a Cary 4000 spectrophotometer (Varian) and fluorescence spectra on a FluoroMax 3 (Jobin Yvon, Horiba) spectrofluorometer. The excitation wavelength was 600 nm and the recorded emission spectral range was 610-800 nm. Unless specified, all fluorescence spectra were corrected for instrumental factors. The absorbance of sample solutions at the excitation wavelength were kept below 0.05 to avoid inner filter effects. Data treatment was performed using OriginPro 8.6.

#### Determination of fluorescence quantum yields

Determination of relative fluorescence quantum yields (QY) was performed using DiD in MeOH as a reference (QY = 33%).<sup>307</sup>

### 2.2.3.3 *Confocal microscopy imaging*<sup>7</sup>

HEK293 cells stably overexpressing the SNAP-APJ receptor (prepared at PCBIS, Strasbourg) were cultured in Eagle's minimal essential medium (EMEM, SIGMA M5650) with 10% FBS, 100 U/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin, 2 mM of glutamine and 500 µg/mL of G418 at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. 70-80% cell confluence was maintained by removal of a portion of the culture and replacement with fresh medium twice a week. Cells were seeded into 35 mm ibiTreat µ-dish (IBiDi) at 100 000 cells per dish 3 days before imaging.

For fluorescence microscopy studies, the culture medium was removed, the cells were washed with HEPES buffer (137,5 mM NaCl ; 1,25 mM MgCl<sub>2</sub> ; 1,25 mM CaCl<sub>2</sub> ; 6 mM KCl ; 0,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 5,6 mM glucose ; 10 mM Hepes ; 0,1% BSA) and incubated either with a mixture of 20 nM of the probe and 1 µg/mL of Hoechst 33342 in HEPES buffer (1 mL), or with a mixture of 20 nM of the probe, 10 µM of non-fluorescent competitor Apelin-13 and 1 µg/mL of Hoechst 33342 in HEPES buffer (1 mL) for 15 min at 37 °C prior to the imaging.

Fluorescence laser scanning confocal microscopy was performed on a Leica TCS SPE-II microscope with an HXC PL APO 63x/1.40 OIL CS objective. Squaraine was excited with a 635 nm 18 mW laser at 30% intensity and detected at 645 - 750 nm. Hoechst 33342 was excited with a 405 nm 25 mW laser at 15% intensity and detected at 430 - 480 nm. The pinhole was set to 1 airy unit, the photomultiplier gain was set to 800 V. The images were acquired at 1.5x magnification as a mean of 2 scans in 1024x1024 size. An additional 2x magnification was applied upon processing. All images were processed with ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda). The same brightness and contrast parameters for the squaraine channel were applied to all the images.

### 2.2.3.4 *Saturation and competition curves*<sup>8</sup>

#### **TR-FRET binding assay**

---

<sup>7</sup> Performed by Julie Karpenko (UMR 7200, Equipe CBIP, Illkirch).

<sup>8</sup> Performed by Christel Valencia (UMS 3286, PCBIS, Illkirch).

Briefly, ready-to-use Tag-liteS ApelinR labeled cells (Cellcust, lot FRUSAPELI01, Cisbio Bioassays) from frozen aliquots were thawed, washed once in the Tag-liteS labeling medium (Ref: LABMED, Cisbio Bioassays), and distributed in white 384-well small volume plates (5000 cells per well). For saturation assays, increasing concentrations (0–300 nM) of fluorescent ligand **82** diluted in the Tag-liteS labeling medium supplemented with 1% DMSO were added to the cells and incubated at room temperature for 1 hour. For each concentration, non specific binding was determined by adding excess unlabeled pyr-apelin-13 diluted in the same buffer. For competition assays, increasing concentrations of competitor ligands **II-154** or **II-156** (from 0.01 nM to 10  $\mu$ M) diluted in the Tag-liteS labeling medium supplemented with 1% DMSO were first added to the cells, then a fixed concentration of **82** (160 nM) was added, and the plate was incubated at room temperature for 1 hour. In both assays, plates were read in an HTRF-compatible multi-well plate reader (Envision, PerkinElmer) with a classic HTRF protocol (excitation at 337 nm, donor emission measured at 615 nm and acceptor emission at 665 nm, 50 ms delay, 400 ms integration). The TR-FRET signal was collected both at 665 and 615 nm, and HTRF ratios were obtained by dividing the acceptor signal (665 nm) by the donor signal (620 nm) and multiplying this value by 10 000.

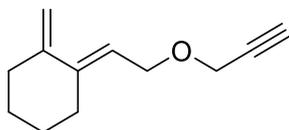
### **Data analysis and statistics**

$K_d$  values of the fluorescent and radioactive ligands were determined from saturation curves of the specific binding using GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).  $K_i$  values of the compounds were determined from binding competition experiments according to the Cheng–Prusoff equation.<sup>308</sup> S/N calculations were performed by dividing the mean of the maximum value ( $\lambda_{max}$ ) by that of the minimum value ( $\lambda_{min}$ ) obtained from the sigmoid fits. Comparisons between values are reported as means  $\pm$  SEM.

## 2.2.4. Stratégies « double click » à l'aide de la réaction de thia-Diels-Alder

### 2.2.4.1 Etude d'une stratégie « double click » : CuAAC/thia-DA

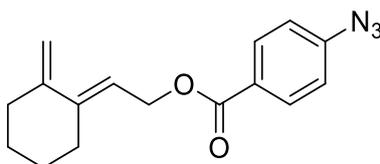
#### (E)-1-methylene-2-(2-(prop-2-yn-1-yloxy)ethylidene)cyclohexane (**83**)



NaH (1.12 eq., 48.5 mg, 1.21 mmol) suspended in THF (2 mL) at 0 °C and alcohol X (1 eq., 150 mg, 1.09 mmol) in solution in 0.5 mL of THF was added dropwise. Reaction mixture was stirred at 0 °C for 45 minutes (solution may become yellow) and propargyl bromide in toluene (80% w/w) (1.049 eq., 169.3 mg, 0.12 mL, 1.14 mmol) was added dropwise as well (solution may turn brown). The reaction mixture was stirred overnight with the temperature slowly going back to room temperature before being quenched with ice cold water and extracted with DCM three times. The organic phases were gathered, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The crude product was purified on gel silica chromatography (5% EtOAc in *n*-heptane) to afford the desired compound **83** as a clear to pale yellow oil (125 mg, **65%**).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.59 (tt, *J* = 7.0, 1.5 Hz, 1H, C=CH-CH<sub>2</sub>-O), 4.88 (dd, *J* = 2.3, 1.2 Hz, 1H, C=CH<sub>2</sub>), 4.63 (dt, *J* = 2.7, 1.4 Hz, 1H, C=CH<sub>2</sub>), 4.15 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-C≡CH), 4.13 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.43 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, C≡CH), 2.34 - 2.22 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.71 - 1.59 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

#### (E)-2-(2-methylenecyclohexylidene)ethyl 4-azidobenzoate (**86**)

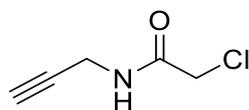


To a solution of the 4-azidobenzoic acid (1 eq., 138 mg, 1 mmol), EDCI·HCl (1.2 eq., 230 mg, 1.2 mmol) and DMAP (0.1 eq., 0.1 mmol, 12 mg) in DCM (1 mL) was added

the alcohol **54** (1 eq., 1 mmol, 160 mg) in DCM (1 mL). The reaction was stirred at room temperature overnight before diluted with CHCl<sub>3</sub> (25 mL). The organic phase was washed with H<sub>2</sub>O (25 mL) and brine (25 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuo. The crude mixture is then purified by silica gel chromatography (1% EtOAc in *n*-heptane) to yield the pure diene-azide **86** as a pale yellow oil (210 mg, **76%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.26 - 8.18 (m, 2H, **CH<sup>Ar</sup>**), 7.30 - 7.19 (m, 2H, **CH<sup>Ar</sup>**), 5.89 (tt, *J* = 7.1, 1.5 Hz, 1H, C=**CH-CH<sub>2</sub>-O**), 5.10 (dd, *J* = 2.4, 1.1 Hz, 1H, C=**CH<sub>2</sub>**), 5.06 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, C=CH-**CH<sub>2</sub>-O**), 4.85 (dt, *J* = 2.6, 1.5 Hz, 1H, C=**CH<sub>2</sub>**), 2.55 (tt, *J* = 5.0, 2.2 Hz, 2H, **CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>**), 2.51 - 2.43 (m, 2H, **CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>**), 1.86 (dq, *J* = 6.4, 3.5 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>**); **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165.8, 150.1, 146.1, 144.7, 131.5, 127.0, 118.8, 116.4, 108.7, 61.4, 35.3, 29.1, 26.9, 26.2; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 306.1218, Found: 306.1217 (Δ<sub>HRMS</sub> = 0.33 ppm); **R<sub>f</sub>** ≈ 0.3 (2% EtOAc in *n*-heptane).

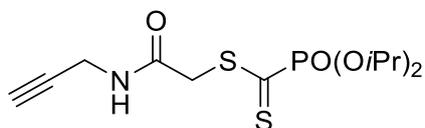
### 2-chloro-N-(prop-2-yn-1-yl)acetamide (**87**)



2-Chloroacetyl chloride (1.2 eq., 1290.81 mg, 0.909 mL, 11.43 mmol) was added dropwise to a solution of propargylamine (1 eq., 524.6 mg, 0.61 mL, 9.52 mmol) in DCM (100 mL). DIEA (1.2 eq., 1477.19 mg, 1.99 mL, 11.43 mmol) was added dropwise to the reaction mixture, which turned brown. The reaction mixture was stirred for 30 min, and the solvents were removed under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel chromatography (3% MeOH in DCM). The solvents were removed under reduced pressure yielding the acetamide as two fractions corresponding to the desired product **87** in NMR as light-brown to brown amorphous solids (1.05 g, **84%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.82 (bs, 1H, **NH**), 4.09 (dd, *J* = 5.4, 2.6 Hz, 2H, NH-**CH<sub>2</sub>-C≡CH**), 4.06 (s, 2H, S-**CH<sub>2</sub>-CO**), 2.27 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, C≡**CH**); **R<sub>f</sub>** = 0.53 (5% MeOH in DCM).

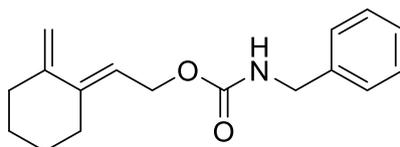
**2-oxo-2-(prop-2-yn-1-ylamino)ethyl (diisopropoxyphosphoryl)methanedithioate (88)**



Phosphonodithioester salt **38b** (1 eq., 483.75 mg, 1 mmol) was dissolved in ACN (4 mL) and **87** (2 eq., 263.12 mg, 2 mmol) dissolved in ACN (1 mL) was added to the reaction mixture. This solution was stirred overnight at room temperature before being evaporated. The residue was retaken in EtOAc and washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The crude was purified by silica gel chromatography (2.5% MeOH in DCM) to yield the product **88** as a pink oil (130 mg, 39%).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.63 (bs, 1H, **NH**), 4.85 (dhept, <sup>3</sup>J<sub>P-H</sub> = 7.3 Hz, <sup>2</sup>J<sub>H-H</sub> = 6.2 Hz, 2H, O-**CH**(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.05 (s, 2H, S-**CH**<sub>2</sub>-CO), 4.00 (dd, *J* = 5.3, 2.6 Hz, 2H, NH-**CH**<sub>2</sub>-C≡CH), 2.21 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, C≡**CH**), 1.39 (d, *J* = 6.2 Hz, 6H, O-CH(**CH**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.35 (d, *J* = 6.2 Hz, 6H O-CH(**CH**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 230.13 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-P</sub> = 176.7 Hz, C=S), 165.23 (C=O), 78.80 (C-**C**≡CH), 74.31 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.1 Hz, O-**CH**(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 71.92 (H**C**≡C), 38.85 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 3.1 Hz, S-**CH**<sub>2</sub>-CO), 29.61 (N-**CH**<sub>2</sub>-C≡CH), 24.1 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 3.7 Hz, O-CH(**CH**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.7 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.4 Hz, O-CH(**CH**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>PS<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 338.0650, Found: 338.0654 (Δ<sub>HRMS</sub> = 1.18 ppm); **R<sub>f</sub>** = 0.18 (5% MeOH in DCM).

**(E)-2-(2-methylenecyclohexylidene)ethyl benzylcarbamate (89)**

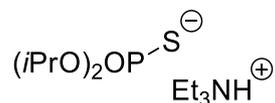


To a solution of an benzylamine (1.5 eq., 59.88 mg, 0.061 mL, 0.56 mmol) in DCM (0.88 mL) was added Et<sub>3</sub>N (3.032 eq., 114.32 mg, 0.16 mL, 1.13 mmol) and a solution of **55** (1 eq., 113 mg, 0.37 mmol) in DCM (0.44 mL). The reaction mixture was left

overnight at room temperature. The solvent was removed in vacuo and the resulting yellow oil was redissolved in DCM and washed several times with brine, saturated NaHCO<sub>3</sub>, and 2 M NaOH until the organic phase was colourless. The organic phase was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and concentrated in vacuo to give **89** as a colourless oil (100 mg, quant.). The product was used without further purification.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.36 – 7.14 (m, 5H, **CH<sup>Ar</sup>**), 5.54 (tt, *J* = 7.0, 1.5 Hz, 1H, C=**CH-CH<sub>2</sub>**), 4.96 (s, 1H, **NH**), 4.82 (td, *J* = 2.3, 1.0 Hz, 1H, C=**CH<sub>2</sub>**), 4.60 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, C=CH-**CH<sub>2</sub>**), 4.59 (dt, *J* = 2.6, 1.5 Hz, 1H, C=**CH<sub>2</sub>**), 4.32 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, NH-**CH<sub>2</sub>-Ph**), 2.32 – 2.14 (m, 4H, **CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>**), 1.65 – 1.52 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>**); **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.6 (**CO**), 150.2 (**C<sub>q</sub><sup>vinyl</sup>**), 145.6 (**C<sub>q</sub><sup>vinyl</sup>**), 138.6 (**C<sub>q</sub><sup>Ar</sup>**), 128.7 (**C<sup>Ar</sup>**), 127.50 (**C<sup>Ar</sup>**), 127.46 (**C<sup>Ar</sup>**), 117.0 (**C<sup>vinyl</sup>**), 108.6 (**C<sup>vinyl</sup>**), 61.3 (C=CH-**CH<sub>2</sub>-O**), 45.1 (NH-**CH<sub>2</sub>-Ph**), 35.3 (**CH<sub>2</sub><sup>aliphatic</sup>**), 28.9 (**CH<sub>2</sub><sup>aliphatic</sup>**), 26.9 (**CH<sub>2</sub><sup>aliphatic</sup>**), 26.2 (**CH<sub>2</sub><sup>aliphatic</sup>**); **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>Na [M+H]<sup>+</sup>: 294.1470, Found: 294.1471 (Δ<sub>HRMS</sub> = 0.34 ppm);

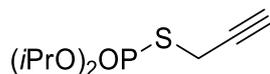
### triethylammonium *O,O*-diisopropyl phosphorothioate (**90**)



To a round-bottom flask, diisopropyl phosphite (1 eq., 10 mmol, 1.66 g) and sulfur (1 eq., 10 mmol, 0.32 g) are added. Then triethylamine (2.4 mL) is added dropwise (exothermic reaction). After 1 hour, the reaction is stopped and the excess triethylamine is evaporated. The intermediate product is obtained as a brown oil and is used without further purification for the next step.

**<sup>31</sup>P NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 55.34.

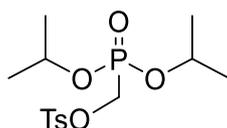
### O,O-diisopropyl S-(prop-2-yn-1-yl) phosphorothioate (91)



To a round-bottom flask equipped with a condenser are added ammonium phosphorothioate (1 eq, 10 mmol, 2.99 g) and propargyl bromide (1.5 eq., 15 mmol, 1.78 g) in toluene (30 mL). The mixture is heated overnight at 70 °C, then allowed to reach room temperature. The reaction mixture is then hydrolysed with H<sub>2</sub>O and extracted with ethyl acetate. Then the organic layers are dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under vacuo. Compound **91** is obtained as a brown oil and is used without further purification (2.36 g, quant.).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.79 (dp, *J* = 9.0, 6.2 Hz, 2H, O-**CH**(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.58 (dd, *J* = 13.2, 2.7 Hz, 2H, -S-**CH**<sub>2</sub>-C:CH), 2.30 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>-C≡**CH**), 1.39 (dd, *J* = 10.7, 6.2 Hz, 12H, O-CH-(**CH**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 129.0 (**C**<sub>q</sub>), 128.2 (**CH**), 79.3, 79.2, 73.1, 72.2, 23.9, 23.9, 23.6, 23.6, 18.9; **<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 22.31.

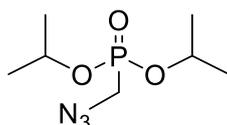
### (diisopropoxyphosphoryl)methyl 4-methylbenzenesulfonate (93)



The paraformaldehyde (1.1 eq., 0.5 g, 16.5 mmol) was added to a stirred mixture of diisopropyl phosphite (1 eq., 2.49 g, 2.49 mL, 15 mmol) and triethylamine (3 mL, 21.58 mmol). The mixture was refluxed for 2 hours. The solvent was removed under vacuo to afford **91** a colorless oil used in the next step without purification. To a solution of **91** (1 eq., 250 mg, 1.27 mmol) in pyridine (1 mL) was added *p*-toluenesulfonyl chloride (1.1 eq., 267.23 mg, 1.402 mmol) at 0 °C over 30 min. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred overnight. The mixture was quenched by HCl aq (1M, 6 mL) and extracted with ethyl acetate (3 x 3 mL). The collected organic layer was dried (MgSO<sub>4</sub>) and the solvent was evaporated. Chromatography (60% EtOAc in *n*-heptane) afforded **93** (192 mg, 0.55 mmol, **43%** over two steps).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.83 – 7.76 (m, 2H), 7.40 – 7.32 (m, 2H), 4.72 (d, J = 7.5, 6.2 Hz, 2H), 4.11 (d, J = 10.1 Hz, 2H), 2.45 (s, 3H), 1.30 (dd, J = 12.4, 6.2 Hz, 13H). **<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.08. **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 145.5, 132.0, 130.1, 128.4, 72.5 (d, J = 6.6 Hz), 63.0, 61.3, 24.1 (d, J = 4.0 Hz), 24.0 (d, J = 4.7 Hz), 21.8.

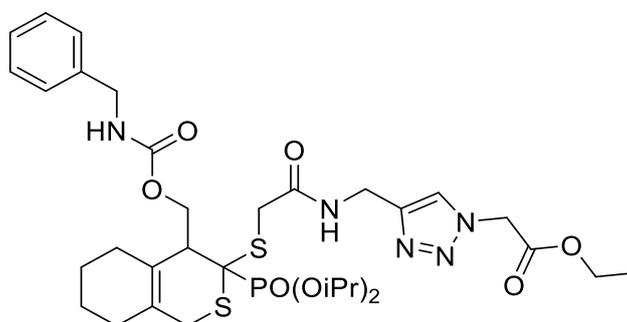
### Diisopropyl (azidomethyl)phosphonate (**94**)



To a solution of **93** (1 eq., 326 mg, 0.93 mmol) in MeCN (5 mL) was added tetrabutylammonium azide (1 eq., 326 mg, 0.93 mmol) and the mixture was refluxed for 16 hours. The solvent was removed under reduced pressure. The resulting oil was dissolved in Et<sub>2</sub>O and filtrated to afford **94** (134 mg, **65%**) without further purification.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.77 (m, 2H, H<sup>2,2'</sup>), 3.39 (d, J = 11.8 Hz, 2H, H<sup>4</sup>), 1.35 (dd, J = 6.2, 1.7 Hz, 12H, H<sup>1,1'</sup>-H<sup>3,3'</sup>). **<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 17.7.

### Ethyl 2-(4-((2-((4-(((benzylcarbamoyl)oxy)methyl)-3-(diisopropoxyphosphoryl)-3,4,5,6,7, 8-hexahydro-1H-isothiochromen-3-yl)thio)acetamido)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acetate (**96**)

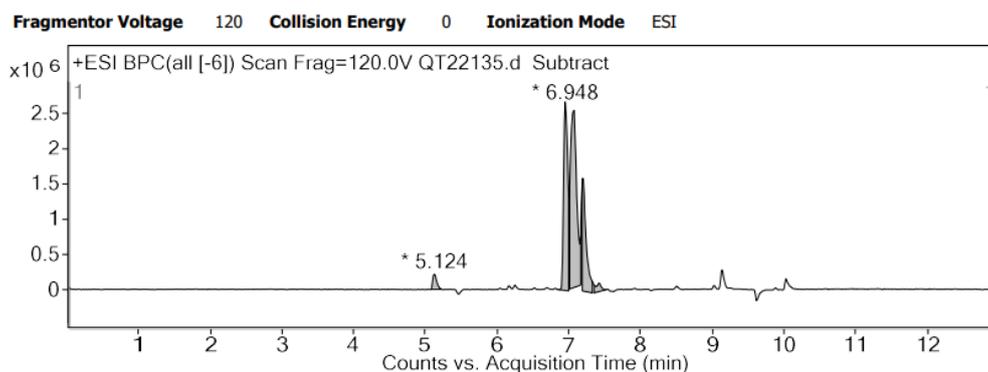


*and isomers*

**Protocol #2, [4+2] then [3+2] :** To a solution of dithioseter-alkyne **88** (1 eq., 30 mg, 89 μmol) in *t*PrOH (1.1 mL) and H<sub>2</sub>O (2.2 mL) was added diene **89** (1.2 eq., 29 mg,

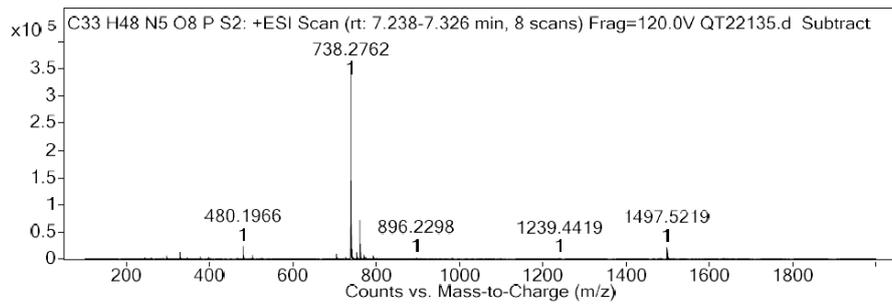
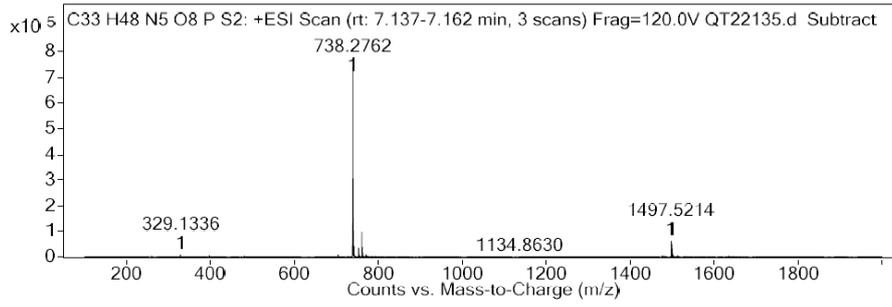
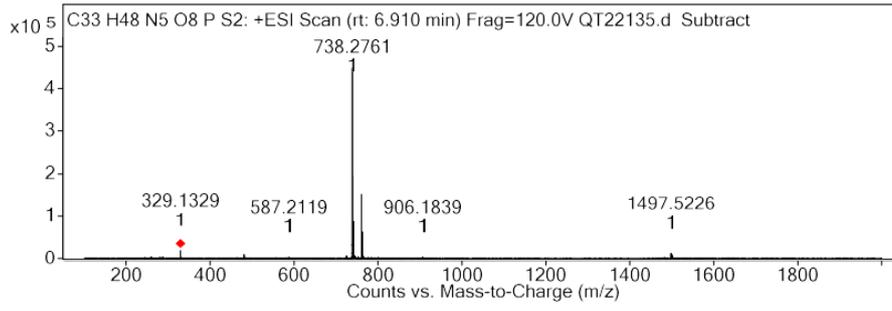
107  $\mu\text{mol}$ ) dissolved in *i*PrOH (1.1 mL). The reaction mixture was stirred for 1 hour at 37 °C and slowly lost its pink colour. The conversion was followed by TLC (5% MeOH in DCM). After that a solution of ethyl 2-azidoacetate (1.2 eq., 14 mg, 107  $\mu\text{mol}$ ) in isopropanol (0.25 mL) was added to the reaction mixture. To this solution was added a 1 M solution of  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1 eq., 89  $\mu\text{L}$ , 89  $\mu\text{mol}$ ) followed by a 1 M solution of sodium ascorbate (2 eq., 180  $\mu\text{L}$ , 180  $\mu\text{mol}$ ). The reaction mixture was stirred for an additional hour. Completion of this second step was checked by TLC (5% MeOH in DCM). The reaction mixture was then diluted with EtOAc (10 mL) and water (10 mL) and the phases were separated. The organic phase was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated in vacuo. The crude material was then purified by silica gel chromatography (6% MeOH in DCM) to afford the adducts **96** as a light yellow oil (44 mg, **67%**).

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  19.7 (17), 18.3 (14), 17.9 (29), 17.7 (40); HRMS (ESI-TOF): Calculated for  $\text{C}_{33}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_8\text{PS}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 738.2760, Found: 738.2761 & 738.2762 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 0.14$  ppm & 0.27 ppm);  $R_f = 0.46$  (7% MeOH in DCM).

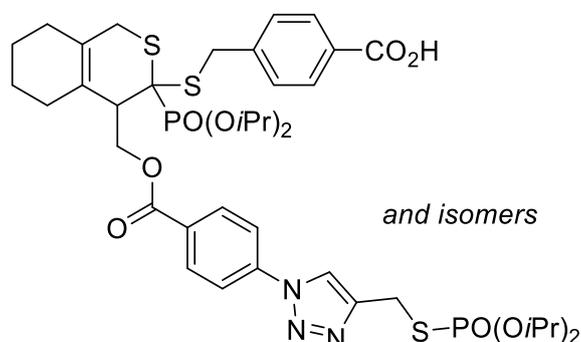


Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	5.086	5.124	5.225	218652.24	828826.13	5.44	2.5
2	6.834	6.948	6.999	2688145.32	10632991.27	69.78	32.01
3	7.011	7.074	7.162	2521449.69	15237136.48	100	45.88
4	7.188	7.2	7.326	1605903.26	5831852.7	38.27	17.56
5	7.351	7.427	7.541	117072.03	682782.13	4.48	2.06



**4-(((3-(diisopropoxyphosphoryl)-4-(((4-(4-(((diisopropoxyphosphoryl)thio)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)benzoyl)oxy)methyl)-3,4,5,6,7,8-hexahydro-1H-isothiochromen-3-yl)thio)methyl)benzoic acid (99)**



**Protocol #1, [3+2] then [4+2] :** To a solution of alkyne **91** (1.2 eq., 15 mg, 0.064 mmol) in *i*PrOH (1 mL) and water (1.2 mL) was added diene-azide **86** (1 eq., 15 mg, 0.053 mmol) dissolved in isopropanol (0.25 mL). To this solution was added a 1 M solution of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (1 eq., 0.053 mL, 0.053 mmol) followed by the addition of a 1 M solution of sodium ascorbate (2 eq., 0.106 mL, 0.106 mmol). The reaction mixture turned yellow and was stirred for 1 hour at 37 °C. The conversion was followed by TLC (2% EtOAc in *n*-heptane). After that a solution of phosphonodithioester **39b** (1.2 eq., 24 mg, 0.064 mmol) in *i*PrOH (0.1 mL) was added to the reaction mixture that was stirred for an additional hour. Completion of this second step was checked by TLC (100% EtOAc). The reaction mixture was then diluted with EtOAc (10 mL) and H<sub>2</sub>O (10 mL) and the phases were separated. The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The crude material was then purified by silica gel chromatography (70% to 90% EtOAc in *n*-heptane + 1% AcOH) to afford the adducts as a pale yellow oil. This oil was retaken in ACN/H<sub>2</sub>O and freeze-dried to afford the pure products **99** as an off-white amorphous solid (31 mg, **65%**).

Ratio for <sup>31</sup>P NMR: 19.2 (24), 18.0 (10), 17.5 (13), 16.6 (53)

**Protocol #2, [4+2] then [3+2] :** To a solution of diene-azide **86** (1 eq., 15 mg, 0.053 mmol) in isopropanol (1 mL) and water (1.25 mL) was added dithioester **39b** (1.2 eq., 23.91 mg, 0.064 mmol) dissolved in *i*PrOH (0.2 mL). The reaction mixture was stirred for 1 hour at 37 °C and slowly lost its pink colour. The conversion was followed by TLC

(10% EtOAc in *n*-heptane). After that a solution of alkyne **91** (1.2 eq., 15.01 mg, 0.064 mmol) in *i*PrOH (0.2 mL) was added to the reaction mixture. To this solution was added a 1M solution of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (1 eq., 0.053 mL, 0.053 mmol) followed by a 1M solution of sodium ascorbate (2 eq., 0.106 mL, 0.106 mmol). The reaction mixture was stirred for an additional hour. Completion of this second step was checked by TLC (100% EtOAc + 1% AcOH). The reaction mixture was then diluted with EtOAc (10 mL) and water (10 mL) and the phases were separated. The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The crude material was then purified by silica gel chromatography (70% to 90% EtOAc in *n*-heptane + 1% AcOH) to afford the adducts as a yellowish oil. This oil was retaken in ACN/H<sub>2</sub>O and freeze-dried to afford the pure products **99** as an off-white amorphous solid (30 mg, **63%**).

Ratio for <sup>31</sup>P NMR: 19.2 (25), 18.0 (9), 17.5 (11), 16.6 (55)

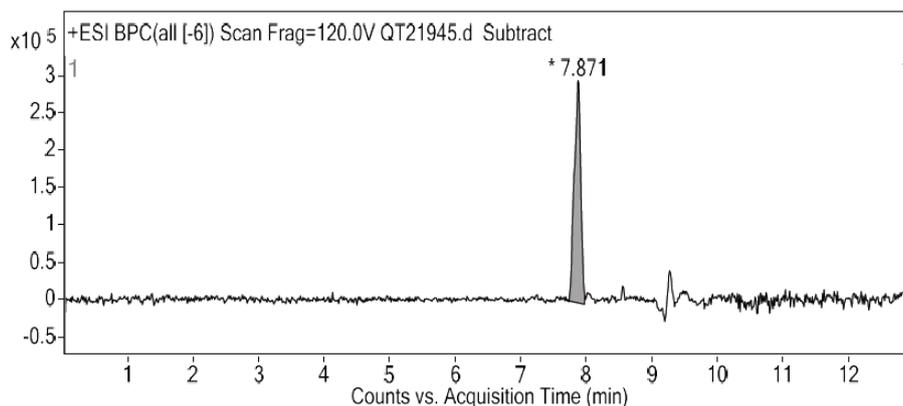
### **Protocol #3, Tricomponent reaction:**

To a solution of diene-azide **86** (1 eq., 30 mg, 0.106 mmol) in *i*PrOH (2 mL) and water (2.5 mL) was added alkyne **91** (1 eq., 25.017 mg, 0.106 mmol) dissolved in *i*PrOH (0.2 mL). Then a solution of dithioester **39b** (1 eq., 39.86 mg, 0.106 mmol) dissolved in *i*PrOH (0.5 mL) was added and directly followed by the addition of a 1 M solution of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (1 eq., 0.106 mL, 0.106 mmol) followed by a 1 M solution of sodium ascorbate (2 eq., 0.21 mL, 0.21 mmol). The reaction mixture was stirred for 1 hour at 37 °C. The conversion was followed by TLC (10% EtOAc in *n*-heptane for the diene-azide and 1% AcOH in EtOAc to see the formation of the desired compounds and intermediates). The reaction mixture was then diluted with EtOAc (10 mL) and H<sub>2</sub>O (10 mL) and the phases were separated. The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The crude material was then purified by silica gel chromatography (70% to 90% EtOAc in *n*-heptane + 1% AcOH) to afford the pure adducts as a yellowish oil. This oil was retaken in ACN/H<sub>2</sub>O and freeze-dried to afford the pure products **99** as an off-white amorphous solid (43 mg, 46%).

Ratio for <sup>31</sup>P NMR: 19.2 (23), 18.0 (10), 17.5 (13), 16.6 (54).

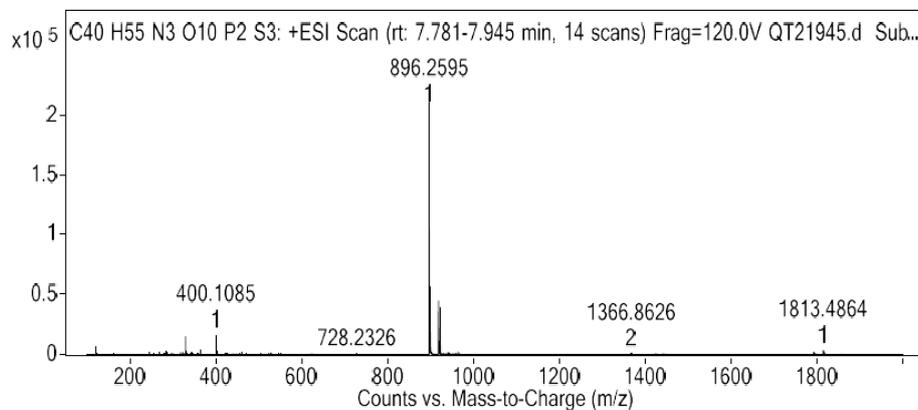
### General description for 99:

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.40 - 7.31 (m, 9H), 5.06 - 4.55 (m, 5H), 4.52 - 4.12 (m, 5H), 3.80 - 1.46 (m, 12H), 1.44 - 1.11 (m, 24H);  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  24.22 - 23.64 (m), 19.2, 18.0, 17.5, 16.6; HRMS (ESI-TOF): Calculated for  $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}_2\text{S}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 896.2604, Found: 896.2595 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 1.00$  ppm);  $R_f = 0.36$  (1% AcOH in EtOAc).

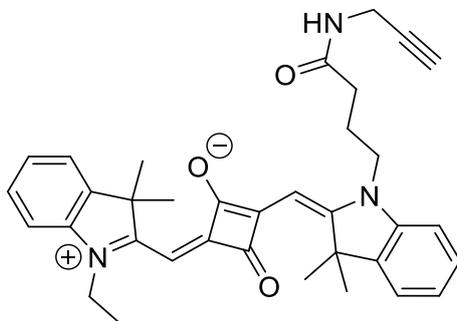


Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	7.694	7.871	7.971	298362.34	2038227.27	100	100



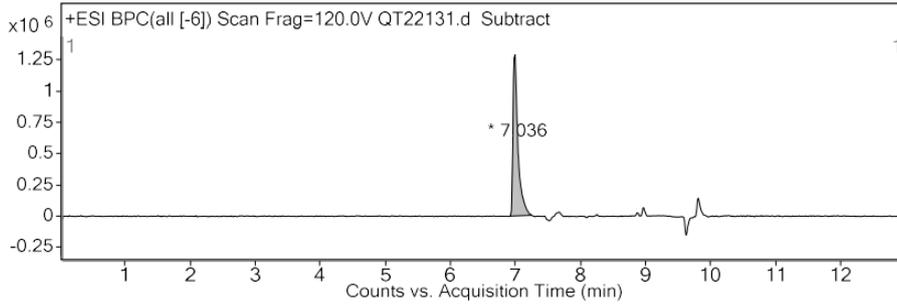
**(E)-2-(((E)-3,3-dimethyl-1-(4-oxo-4-(prop-2-yn-1-ylamino)butyl)indolin-2-ylidene)methyl)-4-((1-ethyl-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium-2-yl)methylene)-3-oxocyclobut-1-en-1-olate (102)**



To a stirred solution of **70** (1 eq., 21 mg, 0.041 mmol) and propargyl amine (1.99 eq., 4.52 mg, 5.25  $\mu$ L, 0.082 mmol) in dry DMF (1.2 mL), PyBOP (1.5 eq., 32.103 mg, 0.062 mmol) and DIEA (8 equiv., 54.38  $\mu$ L, 0.33 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was evaporated and purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5  $\mu$ m, 19  $\times$  150 mm) using a linear gradient (5% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL.min<sup>-1</sup>) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product **99** were freeze-dried to give the purified adduct as a blue amorphous foam (21 mg, **94%**).

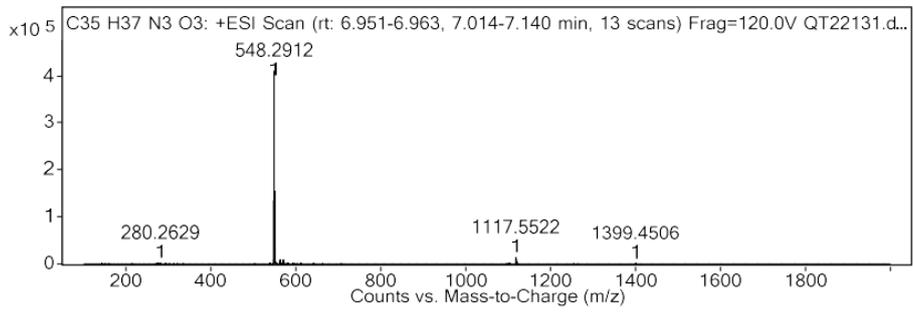
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.43 - 7.33 (m, 4H, **CH<sup>A</sup>r**), 7.24 (bs, 3H, **CH<sup>A</sup>r**), 7.10 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, **CH<sup>A</sup>r**), 6.09 (s, 1H), 5.94 (s, 1H), 4.23 - 4.01 (m, 6H), 2.56 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 2.22 (t,  $J$  = 2.5 Hz, 1H, **C $\equiv$ CH**), 2.15 (p,  $J$  = 7.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>**-CH<sub>2</sub>), 1.75 (s, 6H, C(**CH<sub>3</sub>**)<sub>2</sub>), 1.73 (s, 6H, C(**CH<sub>3</sub>**)<sub>2</sub>), 1.42 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>-**CH<sub>3</sub>**); **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  172.2, 171.7, 170.0, 160.4, 160.1, 142.4, 141.9, 141.5, 128.4, 128.1, 124.9, 124.8, 122.4, 122.2, 116.9, 114.6, 110.7, 109.8, 86.0, 79.3, 71.5, 53.4, 49.8, 49.7, 43.3, 38.9, 32.4, 29.3, 26.7, 26.5, 22.9, 12.0; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>35</sub>H<sub>38</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 548.2913, Found 548.2912 ( $\Delta$ <sub>HRMS</sub> = 0.18 ppm); **t<sub>R</sub>** = 5.64 min (Method C); **t<sub>R</sub>** = 4.97 min (Method D).

Fragmentor Voltage 120 Collision Energy 0 Ionization Mode ESI

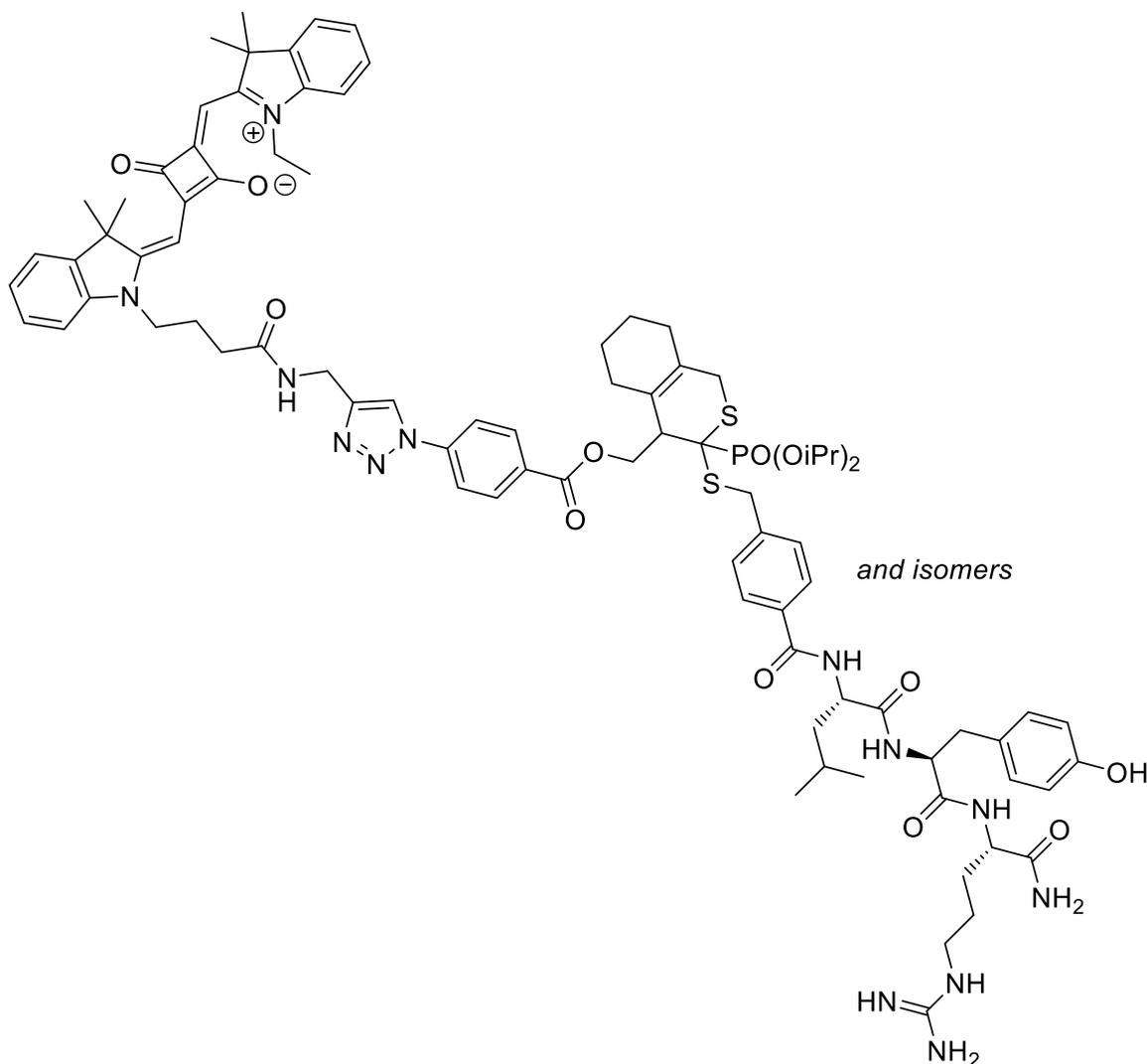


**Integration Peak List**

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	6.91	7.036	7.248	588778.82	6870535.59	100	100



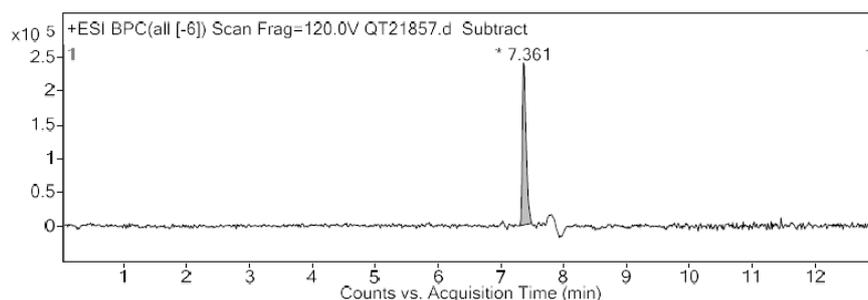
### Adducts-Squaraine-(3+2)-(4+2)-(Leu-Tyr-Arg)-NH<sub>2</sub> (103)



To a solution of diene-azide **86** (1 eq., 3.1 mg, 10.9  $\mu\text{mol}$ ) in *i*PrOH (560  $\mu\text{L}$ ) was added dithioester **41** (1.2 eq., 12 mg, 13  $\mu\text{mol}$ ) dissolved in H<sub>2</sub>O (560  $\mu\text{L}$ ). The reaction mixture was stirred for 1 hour at 37 °C and slowly lost its pink colour. The conversion was followed by TLC (10% EtOAc in *n*-heptane) and the intermediate (4+2) adducts can be spotted on HPLC ( $t_{\text{r}}$  = 5.32 – 5.33 min (Method C)). After that a solution of alkyne **102** (1.2 eq., 7 mg, 13  $\mu\text{mol}$ ) in *i*PrOH (100  $\mu\text{L}$ ) was added to the reaction mixture. To this solution was added a 1 M solution of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (1 eq., 11  $\mu\text{L}$ , 11  $\mu\text{mol}$ ) followed by a 1 M solution of sodium ascorbate (2 eq., 22  $\mu\text{L}$ , 22  $\mu\text{mol}$ ). The reaction mixture was stirred for an additional hour. Completion of this second step was checked by HPLC. The reaction mixture was evaporated and purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a

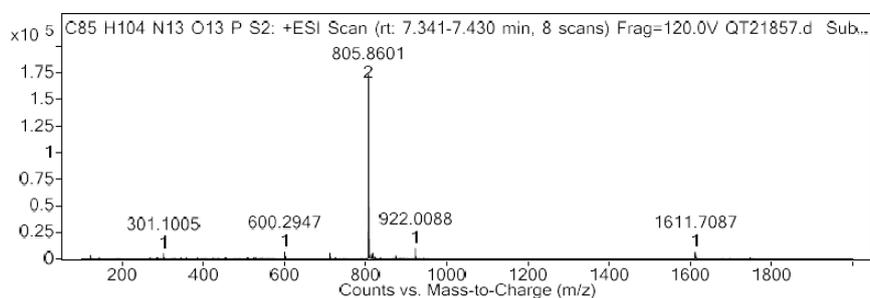
SunFire C18 column (5  $\mu\text{m}$ , 19  $\times$  150 mm) using a linear gradient (5% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL $\cdot$ min $^{-1}$ ) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H $_2$ O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to give the purified adduct as a blue amorphous foam (9.2 mg, 49%).

**HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C $_{85}$ H $_{106}$ N $_{13}$ O $_{13}$ PS $_2$  [M+2H] $^{2+}$ : 805.8605, Found: 805.8601 ( $\Delta_{\text{HRMS}}$  = 0.49 ppm);  $t_{\text{R}}$  = 5.86 min (Method C).

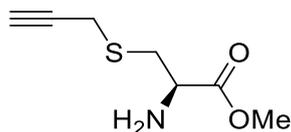


Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	7.296	7.361	7.492	240498.83	1012372.73	100	100



### S-(prop-2-yn-1-yl)-L-cysteine methyl ester (104)

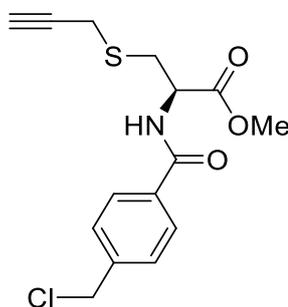


Et $_3$ N (2 eq., 2.43 mL, 17.48 mmol) was added dropwise to a solution of L-cysteine methyl ester hydrochloride (1 eq., 1.5 g, 8.74 mmol) and propargyl bromide (1.2 eq., 1.13 mL, 10.49 mmol) in anhydrous DCM (40 mL) at room temperature. The mixture was stirred for two days at room temperature. The mixture was washed with H $_2$ O (20

mL), dried on MgSO<sub>4</sub> and volatiles were evaporated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography (75% EtOAc in *n*-heptane) to afford **1** (799 mg, **53%**) as a yellow oil.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.76 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.76 – 3.72 (m, 1H, CH-NH<sub>2</sub>), 3.30 (dd, *J* = 2.6, 0.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 3.14 – 2.90 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 2.27 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 1.72 (s, 2H, NH<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 174.5, 79.7, 71.7, 54.2, 52.4, 36.6, 20.0. *R*<sub>f</sub> = 0.29 (100% EtOAc).

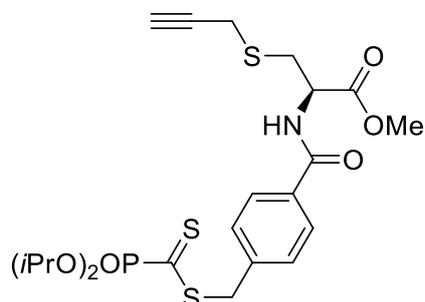
### ***N*-(4-(chloromethyl)benzoyl)-*S*-(prop-2-yn-1-yl)-*L*-cysteine methyl ester (**105**)**



To a solution of 4-(chloromethyl)benzoyl chloride (2 eq., 437 mg, 2.31 mmol) in DCM (4 mL) was added dropwisely at 0 °C a solution of **104** (1 eq., 200 mg, 1.15 mmol) and Et<sub>3</sub>N (3 eq., 0.48 mL, 3.46 mmol) in DCM (2 mL). The reaction mixture was stirred for 16 hours at room temperature. The reaction was then concentrated under reduced pressure and the crude was purified by column chromatography (35% EtOAc in *n*-heptane) to afford **105** (200 mg, **53 %**) as a white solid.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.87 – 7.79 (m, 2H, H<sup>A</sup>), 7.52 – 7.45 (m, 2H, H<sup>A</sup>), 6.95 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, NH), 5.08 (dt, *J* = 7.5, 5.1 Hz, 1H, CH-NH<sub>2</sub>), 4.62 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Cl), 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.39 – 3.21 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 2.26 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-C≡CH); **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.4, 166.6, 141.5, 133.8, 128.9, 127.8, 79.3, 72.3, 53.0, 52.2, 45.4, 33.8, 20.0; *R*<sub>f</sub> = 0.26 (35% EtOAc in *n*-heptane); **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>ClNO<sub>3</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 326.0618, Found: 326.0621 (Δ<sub>HRMS</sub> = -0.92 ppm).

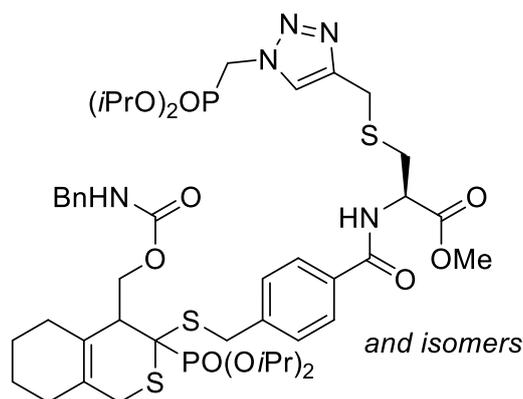
***N*-4-((((diisopropoxyphosphoryl)carbonothioyl)thio)methyl)benzoyl)-*S*-(prop-2-yn-1-yl)-*L*-cysteine methyl ester (**106**)**



To **38b** (1.4 eq., 1.22 g, 2.17 mmol) dissolved in anhydrous MeCN (10 mL) was added to a solution of **105** (1 eq., 506 mg, 1.55 mmol) in anhydrous MeCN (10 mL). The reaction media was stirred for two days at room temperature. The solvent was evaporated, the resulting oil was hydrolysed with NH<sub>4</sub>Cl (30 mL) and extracted with EtOAc (3 x 20 mL). The organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and solvent evaporated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography (50% to 60% EtOAc in *n*-heptane) to afford **106** (692 mg, **84%**) as a pink oil.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.82 – 7.73 (m, 2H, **H<sup>Ar</sup>**), 7.44 – 7.35 (m, 2H, **H<sup>Ar</sup>**), 6.94 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, **NH**), 5.06 (dt, *J* = 7.5, 5.1 Hz, 1H, **CH-NH<sub>2</sub>**), 4.85 (dp, *J* = 7.3, 6.2 Hz, 2H, **OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**), 4.51 (s, 2H, **CH<sub>2</sub>Cl**), 3.82 (s, 3H, **OCH<sub>3</sub>**), 3.38 – 3.20 (m, 4H, **CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-C≡CH**), 2.25 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-C≡CH**), 1.43 – 1.27 (m, 12H, **OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**); **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 229.8 (d, *J* = 176.3 Hz), 171.4, 166.6, 138.4, 133.3, 129.6, 127.8, 79.2, 74.0 (d, *J* = 7.3 Hz), 72.2, 53.0, 52.2, 40.0 (d, *J* = 2.9 Hz), 33.7, 24.2 (d, *J* = 3.8 Hz), 23.8 (d, *J* = 5.5 Hz), 20.0; **<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -4.2; **R<sub>f</sub>** = 0.3 (60% EtOAc in *n*-heptane); **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>6</sub>PS<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 532.1046, found: 532.1056 (Δ<sub>HRMS</sub> = -1.69 ppm).

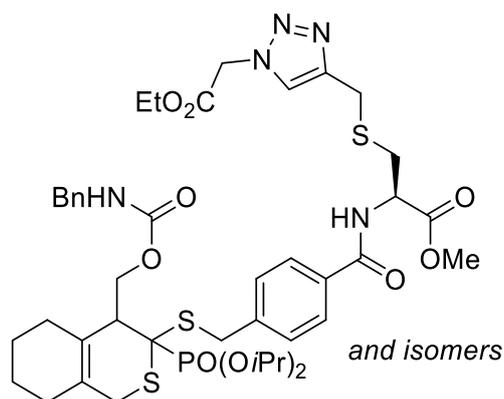
**Methyl *N*-4-(((4-(((benzylcarbamoyl)oxy)methyl)-3-(diisopropoxyphosphoryl)-3,4,5,6,7,8-hexahydro-1H-isothiochromen-3-yl)thio)methyl)benzoyl)-*S*-((1-((diisopropoxyphosphoryl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-*L*-cysteinate (**108**)**



To a solution of dithioester-alkyne **106** in *i*PrOH (1.8 mL) and H<sub>2</sub>O (3.6 mL) was added diene **89** (1.37 eq., 51 mg, 0.19 mmol) dissolved in *i*PrOH (1.8 mL). The reaction mixture was stirred for 1 hour at 37 °C and slowly lost its pink colour. The conversion was followed by TLC (40% *n*-heptane in EtOAc, R<sub>f</sub> = 0.3). After that a solution of azide **94** (1.35 eq., 41 mg, 0.19 mmol) in *i*PrOH (0.4 mL) was added to the reaction mixture. To this solution was added a 1 M aqueous solution of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (1 eq., 34.28 mg, 0.14 mmol) followed by a 1 M aqueous solution of sodium ascorbate (2 eq., 54.404 mg, 0.27 mmol). The reaction mixture was stirred for an additional hour. Completion of this second step was checked by <sup>31</sup>P NMR.

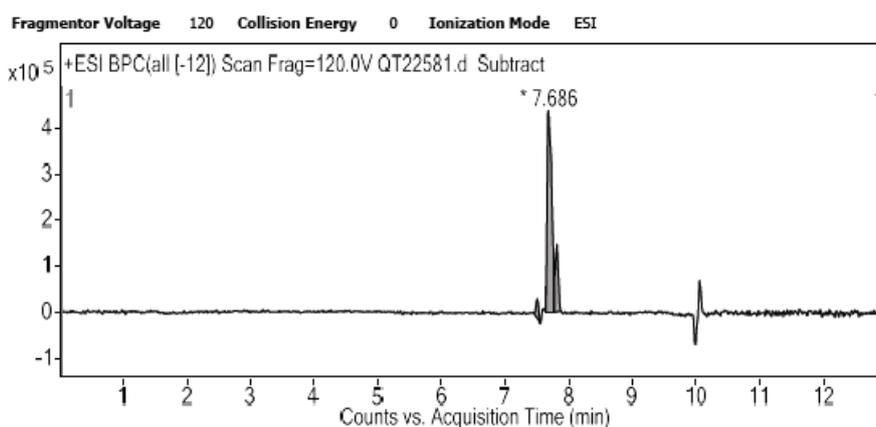
**<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 19.6 (S-C-**PO**(*Oi*Pr)<sub>2</sub>, 24), 18.2 (S-C-**PO**(*Oi*Pr)<sub>2</sub>, 15), 17.8 (S-CH<sub>2</sub>-**PO**(*Oi*Pr)<sub>2</sub>, 21), 16.8 (S-C-**PO**(*Oi*Pr)<sub>2</sub>, 40), 13.8 (N-CH<sub>2</sub>-**PO**(*Oi*Pr)<sub>2</sub>); **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>46</sub>H<sub>68</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>P<sub>2</sub>S<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 1024.3553, Found: 1024.3534 (Δ<sub>HRMS</sub> = -1.85 ppm).

**Methyl N-(4-(((4-(((benzylcarbamoyl)oxy)methyl)-3-(diisopropoxyphosphoryl)-3,4,5,6,7,8-hexahydro-1H-isothiochromen-3-yl)thio)methyl)benzoyl)-S-(((1-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-L-cysteinate (109)**



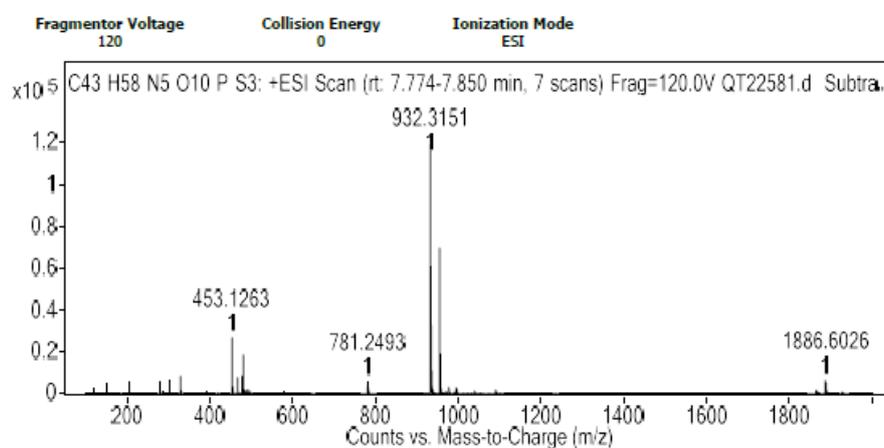
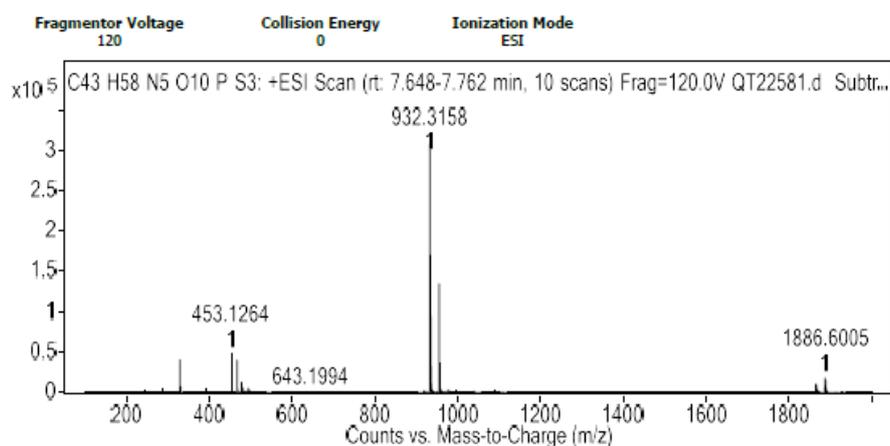
To a solution of dithioester-alkyne **106** (1 equiv., 60 mg, 0.11 mmol) in *i*PrOH (1.5 mL) and H<sub>2</sub>O (3 mL) was added diene **89** (1.2 eq., 37 mg, 0.14 mmol) dissolved in *i*PrOH (1.5 mL). The reaction mixture was stirred for 1 hour at 37 °C and slowly lost its pink colour. The conversion was followed by TLC (40% *n*-heptane in EtOAc, R<sub>f</sub> = 0.3). After that a solution of ethyl 2-azidoacetate (1.2 eq., 17 mg, 0.14 mmol) in *i*PrOH (0.4 mL) was added to the reaction mixture. To this solution was added a 1 M aqueous solution of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (1 eq., 110 μL, 0.11 mmol) followed by a 1 M aqueous solution of sodium ascorbate (2 eq., 220 μL mg, 0.22 mmol). The reaction mixture was stirred for an additional hour. Completion of this second step was checked by <sup>31</sup>P NMR.

**<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 19.6 (S-C-**PO**(*O**i*Pr)<sub>2</sub>, 24), 18.2 (S-C-**PO**(*O**i*Pr)<sub>2</sub>, 15), 17.8 (S-CH<sub>2</sub>-**PO**(*O**i*Pr)<sub>2</sub>, 21), 16.9 (S-C-**PO**(*O**i*Pr)<sub>2</sub>, 40); **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>43</sub>H<sub>59</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>PS<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 932.3161, found: 932.3158 (Δ<sub>HRMS</sub> = -0.32 ppm).

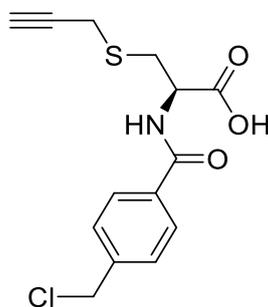


Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	7.446	7.51	7.56	41962.06	112592.29	5.47	4.23
2	7.648	7.686	7.762	438596.62	2058905.87	100	77.31
3	7.774	7.812	7.875	146218.76	491824.77	23.89	18.47



***N*-(4-(chloromethyl)benzoyl)-*S*-(prop-2-yn-1-yl)-*L*-cysteine (110)**



A solution of LiOH (1.5 eq., 8.6 mg, 0.36 mmol) in water (1.5 mL) was added to a mixture of **105** (1 eq., 78 mg, 0.24 mmol) in dioxane (1.5 mL). The reaction medium was stirred for 30 mins at room temperature. The crude was quenched with HCl (10

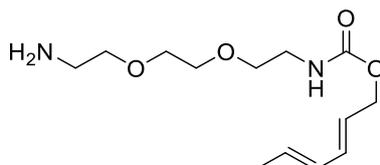
mL) and extracted with ethyl acetate (3 x 5 mL). The organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvent evaporated under reduced pressure. The crude material was then purified by silica gel chromatography (70% to 100% EtOAc in *n*-heptane + 1% AcOH) to afford **110** (53 mg, **71%**) as a white solid.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.74 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, **NH**), 7.91 – 7.84 (m, 2H, **H<sup>A</sup>**), 7.58 – 7.50 (m, 2H, **H<sup>A</sup>**), 4.82 (s, 2H, **CH<sub>2</sub>Cl**), 4.59 (ddd, *J* = 9.9, 7.9, 4.5 Hz, 1H, **CH-NH<sub>2</sub>**), 3.48 – 3.33 (m, 2H, **CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-C≡CH**), 3.23 (dd, *J* = 13.6, 4.5 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-C≡CH**), 3.19 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-C≡CH**), 3.01 (dd, *J* = 13.6, 9.9 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-C≡CH**); **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 171.9, 165.9, 140.9, 133.7, 128.7, 127.7, 80.2, 73.8, 52.1, 45.4, 32.3, 18.6; **R<sub>f</sub>** = 0.4 (100% EtOAc + 1% AcOH).

#### 2.2.4.2 Etude d'une stratégie « double click » par discrimination cinétique

Ces travaux ayant été réalisés dans le cadre d'une recherche exploratoire, certains des composés obtenus n'ont pas été caractérisés par HRMS dans la partie expérimentale.

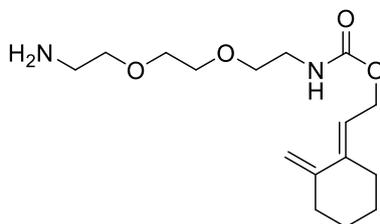
#### (2E,4E)-hexa-2,4-dien-1-yl (2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (**113**)



1,8-diamino-3,6-dioxaoctane (3 eq., 844.48 mg, 0.82 mL, 5.7 mmol) was dissolved in DCM (11.52 mL) in a two-necked RBF. **44** (1 eq., 500 mg, 1.9 mmol) was dissolved in DCM (11.5 mL) and poured in an addition funnel, the addition was performed dropwise over 30 min. The solution turned yellow over the addition and was stirred for an additional hour. The conversion was checked by TLC (5 % EtOAc in *n*-heptane) and the mixture was concentrated in vacuo. The residue was dissolved in DCM and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was added. The aqueous phase was extracted twice with DCM, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated to afford the product with small impurities. The product was purified by silica gel chromatography (10% MeOH in DCM to 20% MeOH in DCM + 1% NH<sub>4</sub>OH) which afforded the pure product **113** as a yellow oil (345 mg, **67%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.17 (dd, *J* = 15.3, 10.4 Hz, 1H), 6.04 – 5.90 (m, 1H), 5.67 (dq, *J* = 13.8, 6.7 Hz, 1H), 5.56 (dt, *J* = 15.2, 6.6 Hz, 1H), 5.40 (s, 1H), 4.49 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.55 (s, 4H), 3.48 (m, 4H), 3.31 (q, *J* = 5.4 Hz, 2H), 2.83 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 2.15 (bs, 3H), 1.69 (dd, *J* = 6.7, 1.6 Hz, 3H).; **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.5, 134.3, 130.9, 130.5, 124.5, 72.9, 70.3, 70.2, 70.1, 65.3, 41.5, 40.8, 18.1.; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>13</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 273.1814; Found 273.1822 (Δ<sub>HRMS</sub> = 2.93 ppm); **R<sub>f</sub>** ≈ 0.3 (20% MeOH in DCM with 1% NH<sub>4</sub>OH).

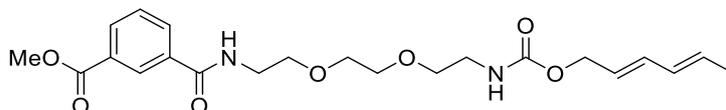
**(E)-2-(2-methylenecyclohexylidene)ethyl (2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (114)**



1,8-diamino-3,6-dioxaoctane (3 eq., 439.76 mg, 0.42 mL, 2.97 mmol) was dissolved in DCM (6 mL) in a two-necked RBF. **55** (1 eq., 300 mg, 0.99 mmol) was dissolved in DCM (6 mL) and poured in an addition funnel, the addition was performed dropwise over 30 min. The solution turned yellow over the addition and was stirred for an additional hour. The conversion was checked by TLC (5 % EtOAc in *n*-heptane) and the mixture was concentrated in vacuo. The product was purified by silica gel chromatography (10% MeOH in DCM to 20% MeOH in DCM + 1% NH<sub>4</sub>OH) but *p*-nitrophenol co-eluted with the product. The residue was dissolved in DCM and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was added. The aqueous phase was extracted twice with DCM, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated to afford the pure product **114** as a yellow oil (190 mg, **61%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.57 (tt, *J* = 7.0, 1.5 Hz, 1H), 5.43 (s, 1H), 4.86 (dd, *J* = 2.4, 1.2 Hz, 1H), 4.70 – 4.50 (m, 3H), 3.62 (s, 4H), 3.55 (dt, *J* = 10.0, 5.1 Hz, 4H), 3.38 (q, *J* = 5.4 Hz, 2H), 2.90 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 2.32 – 2.23 (m, 4H), 2.21 (s, 3H), 1.64 (tt, *J* = 5.6, 3.6 Hz, 4H).; **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.9, 150.4, 145.5, 117.3, 108.7, 73.0, 70.5, 70.3, 70.3, 61.3, 41.7, 41.0, 35.4, 29.1, 27.0, 26.3.; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 313.2127; Found 313.2137 (Δ<sub>HRMS</sub> = 3.93 ppm); **R<sub>f</sub>** = 0.15 (20% MeOH in DCM).

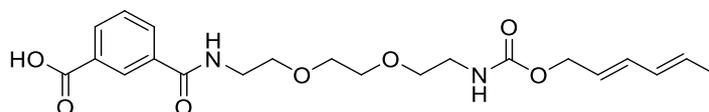
**Methyl 3-(((13E,15E)-10-oxo-3,6,11-trioxa-9-azaheptadeca-13,15-dien-1-yl)carbamoyl)benzoate (115)**



To a stirred solution of mono-methyl isophthalate (1 eq., 132.302 mg, 0.73 mmol) in dry ACN (6.88 mL) were added **114** (1 eq., 200 mg, 0.73 mmol), PyBOP (1 eq., 382.16 mg, 0.73 mmol) and DIEA (3.031 eq., 287.709 mg, 0.37 mL, 2.23 mmol). The resulting reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solution was concentrated under vacuo and purified by silica gel chromatography (100% EtOAc) to afford the product **115** as a clear oil (315 mg, **98%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, MeOD)  $\delta$  8.18 (dt,  $J = 7.8, 1.4$  Hz, 1H), 8.08 (ddd,  $J = 7.8, 1.9, 1.2$  Hz, 1H), 7.60 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 6.22 (dd,  $J = 15.3, 10.4$  Hz, 1H), 6.05 (dd,  $J = 15.2, 10.4$  Hz, 1H), 5.73 (dq,  $J = 13.9, 6.7$  Hz, 1H), 5.59 (dt,  $J = 14.1, 6.3$  Hz, 1H), 4.50 (d,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.73 – 3.58 (m, 8H), 3.55 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 3.28 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 1.84 – 1.68 (m, 3H).; **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, MeOD)  $\delta$  167.8, 166.4, 157.5, 134.8, 133.7, 131.9, 131.5, 130.5, 130.4, 130.1, 128.6, 128.0, 124.4, 69.9, 69.6, 69.1, 64.7, 51.5, 40.2, 39.6, 16.8.;  $R_f = 0.23$  (EA 100%).

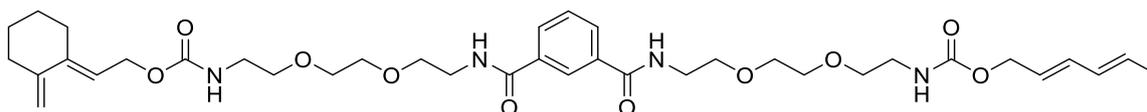
**3-(((13E,15E)-10-oxo-3,6,11-trioxa-9-azaheptadeca-13,15-dien-1-yl)carbamoyl)benzoic acid (116)**



To a stirred solution of methyl ester **115** in MeOH (11 mL) was added 1.0 M aq. LiOH (2.15 mL, 1 M). The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 20 h before it was concentrated in vacuo and diluted with DCM (20 mL) and 1 M aq. NaOH (20 mL). The aqueous layer was acidified with 1 M aq. HCl (30 mL) to pH = 1 and extracted with DCM (4  $\times$  20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo to afford the benzoic acid **116** as a white solid (128 mg, **62%**) directly used without purification.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO)  $\delta$  8.72 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H), 8.44 (t,  $J$  = 1.8 Hz, 1H), 8.08 (ddt,  $J$  = 7.9, 2.7, 1.5 Hz, 2H), 7.60 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 7.13 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 1H), 6.21 (dd,  $J$  = 15.3, 10.5 Hz, 1H), 6.15 – 5.94 (m, 1H), 5.72 (dq,  $J$  = 13.7, 6.7 Hz, 1H), 5.61 (dt,  $J$  = 15.2, 6.3 Hz, 1H), 4.45 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 2H), 3.60 – 3.47 (m, 6H), 3.47 – 3.34 (m, 4H), 3.11 (td,  $J$  = 6.0, 4.8 Hz, 2H), 1.72 (dd,  $J$  = 6.7, 1.6 Hz, 3H).; **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO)  $\delta$  167.3, 166.0, 165.9, 156.5, 156.5, 135.2, 135.2, 133.7, 132.2, 132.0, 131.3, 131.1, 130.6, 129.2, 128.5, 126.0, 70.0, 70.0, 69.6, 69.3, 69.3, 64.4, 18.3.;  $R_f$  = 0.44 (20% MeOH in DCM).

**(E)-2-(2-methylenecyclohexylidene)ethyl (2-(2-(2-(3-(((13E,15E)-10-oxo-3,6,11-trioxa-9-azaheptadeca-13,15-dien-1-yl)carbamoyl)benzamido)ethoxy)ethoxy)-ethyl)carbamate (117)**

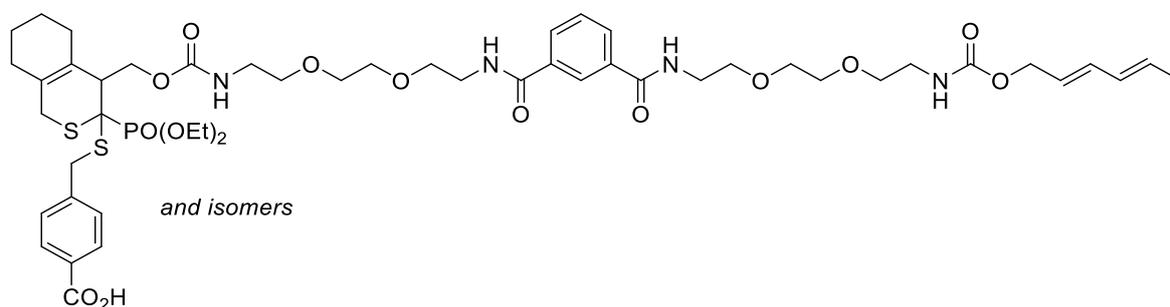


To a stirred solution of amino-diene **114** in dry ACN (2.7 mL) were added benzoic acid **116** (1 eq., 120 mg, 0.29 mmol), PyBOP (1 eq., 148.52 mg, 0.29 mmol) and DIEA (3.031 eq., 111.81 mg, 0.14 mL, 0.87 mmol). The resulting reaction mixture was then stirred at room temperature overnight. The solution was evaporated and purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5  $\mu$ m, 19 x 150 mm) using a linear gradient (5% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL.min<sup>-1</sup>) of solvent B (ACN) in solvent A (H<sub>2</sub>O). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product **117** were freeze-dried to give the purified adduct as a clear oil (150 mg, **74%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8.62 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 2H), 8.32 (t,  $J$  = 1.8 Hz, 1H), 7.97 (dd,  $J$  = 7.7, 1.8 Hz, 2H), 7.55 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 7.15 (q,  $J$  = 5.9 Hz, 2H), 6.22 (dd,  $J$  = 15.2, 10.5 Hz, 1H), 6.14 – 5.97 (m, 1H), 5.72 (dq,  $J$  = 13.7, 6.7 Hz, 1H), 5.62 (dt,  $J$  = 15.1, 6.3 Hz, 1H), 5.49 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 1H), 4.82 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H), 4.65 (dt,  $J$  = 2.7, 1.4 Hz, 1H), 4.51 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 4.47 (s, 2H), 4.10 (s, 1H), 3.54 (tdd,  $J$  = 7.9, 4.8, 2.2 Hz, 11H), 3.48 – 3.28 (m, 10H), 3.12 (q,  $J$  = 5.9 Hz, 4H), 2.23 (dt,  $J$  = 12.2, 5.9 Hz, 4H), 1.72 (dd,  $J$  = 6.8, 1.6 Hz, 3H), 1.65 – 1.51 (m, 4H).; **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, DMSO)  $\delta$  166.4, 156.7, 156.5, 150.1, 144.6, 135.1, 133.7, 131.1, 130.6, 130.1, 128.8, 126.7,

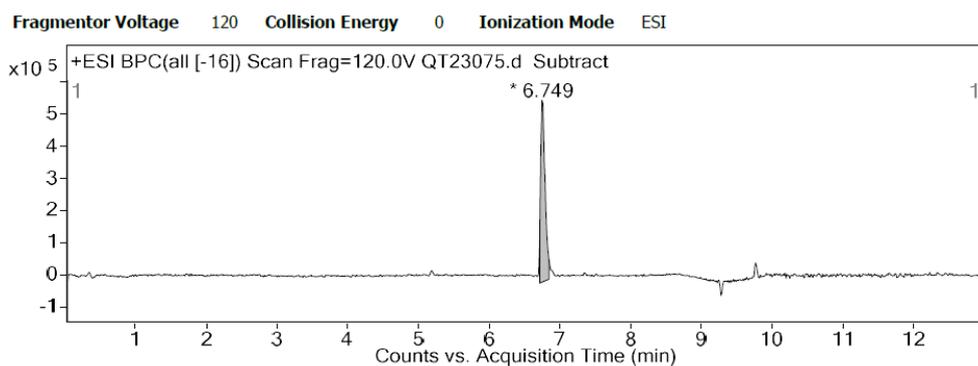
126.0, 118.4, 109.1, 70.0, 70.0, 69.6, 69.4, 64.4, 60.2, 49.1, 35.2, 28.7, 26.7, 26.0, 18.3.;  $R_f = 0.25$  (5% MeOH in DCM).

**4-(((3-(diethoxyphosphoryl)-4-(3,14-dioxo-14-(3-(((13E,15E)-10-oxo-3,6,11-trioxa-9-azaheptadeca-13,15-dien-1-yl)carbamoyl)phenyl)-2,7,10-trioxa-4,13-diazatetradecyl)-3,4,5,6,7,8-hexahydro-1H-isothiochromen-3-yl)thio)methyl)benzoic acid (118)**



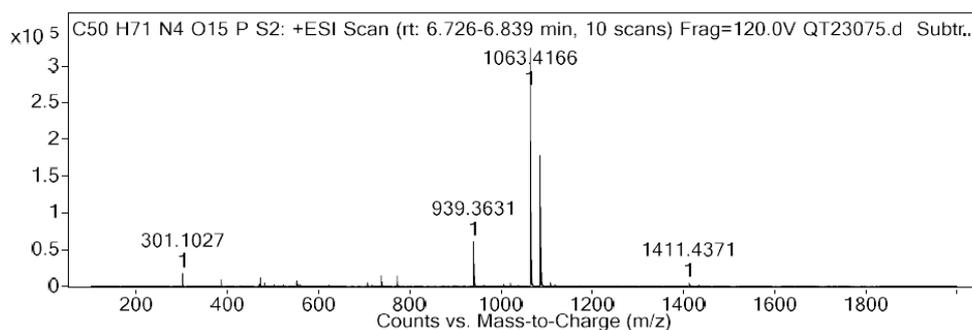
To a stirred solution of bis-diène **117** (1 eq., 20 mg, 0.028 mmol) in H<sub>2</sub>O (1.96 mL) and *i*PrOH (0.45 mL) was added dithioester **39a** (1 eq., 9.75 mg, 0.028 mmol) dissolved in *i*PrOH (0.45 mL). The solution was stirred at 60°C for 15 minutes. Then the product **118** was directly lyophilised to confirm the previous results by NMR and HPLC. No sign of double addition.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8.62 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 8.32 (t,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 7.97 (dd,  $J = 7.8, 1.8$  Hz, 2H), 7.89 (ddd,  $J = 8.2, 3.7, 1.9$  Hz, 2H), 7.55 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.51 – 7.39 (m, 2H), 7.33 – 6.95 (m, 2H), 6.22 (dd,  $J = 15.2, 10.5$  Hz, 1H), 6.06 (ddd,  $J = 14.8, 10.5, 1.9$  Hz, 1H), 5.72 (dq,  $J = 13.8, 6.7$  Hz, 1H), 5.61 (dt,  $J = 15.1, 6.3$  Hz, 1H), 4.56 – 4.40 (m, 2H), 4.40 – 3.86 (m, 8H), 3.58 – 3.48 (m, 12H), 3.48 – 3.37 (m, 8H), 3.12 (q,  $J = 5.9$  Hz, 4H), 2.32 – 1.82 (m, 4H), 1.72 (dd,  $J = 6.7, 1.6$  Hz, 3H), 1.56 (d,  $J = 8.4$  Hz, 4H), 1.34 – 1.21 (m, 6H); **<sup>31</sup>P NMR** (162 MHz, DMSO)  $\delta$  20.3, 19.7, 19.4, 18.9. **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>50</sub>H<sub>72</sub>N<sub>4</sub>O<sub>15</sub>PS<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 1063.4173 ; Found 1063.4166 ( $\Delta_{HRMS} = 0.66$  ppm).

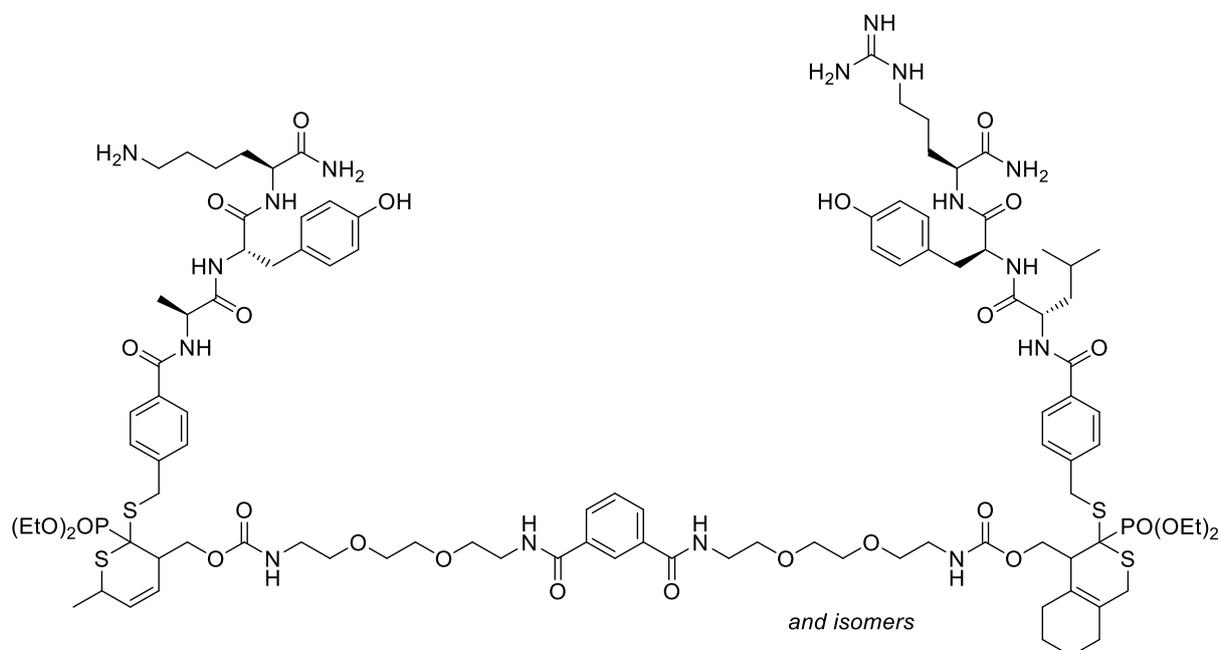


**Integration Peak List**

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	6.718	6.749	6.847	563911.45	2429646.01	100	100



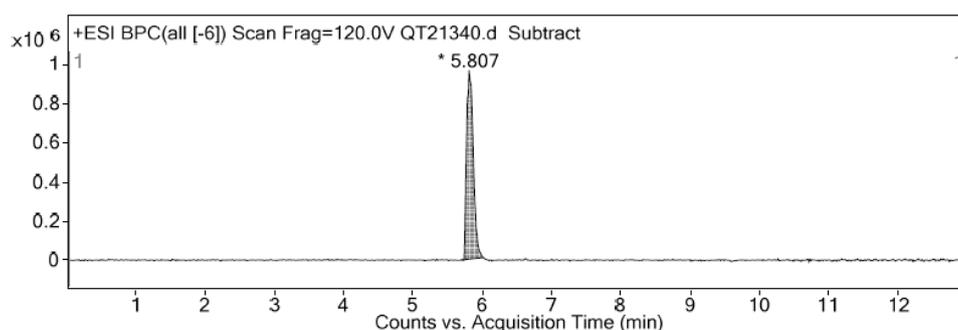
**Adducts-(Ala-Tyr-Lys)-(Leu-Tyr-Arg) (119)**



Bi-diene **117** (1 eq., 10 mg, 14  $\mu$ mol) was dissolved in H<sub>2</sub>O (1.2 mL) and *i*PrOH (0.25 mL) and heated to 60 °C. To this mixture was added a solution of

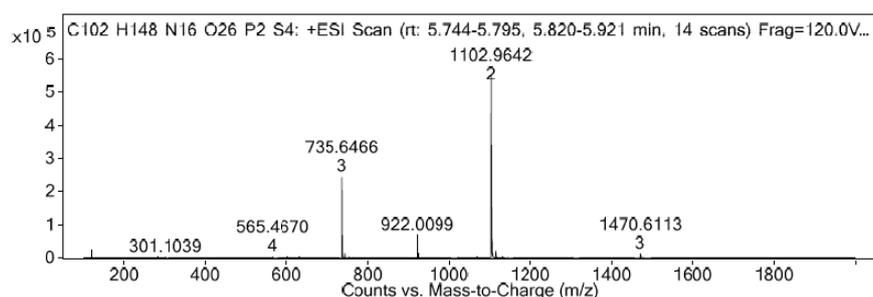
phosphonodithioester-LYR **41** (1 eq., 12.5 mg, 14  $\mu\text{mol}$ ) dissolved in *i*PrOH (0.25 mL). The reaction medium was stirred for 30 min at 60 °C and a solution of phosphonodithioester-AYK **40** (1.2 eq, 13.8 mg, 16.8  $\mu\text{mol}$ ) in H<sub>2</sub>O (0.25 mL) was added. The reaction was stirred at the same temperature overnight before being evaporated to dryness. The crude was purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5  $\mu\text{m}$ , 19  $\times$  150 mm) using a linear gradient (5% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL.min<sup>-1</sup>) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product **119** were freeze-dried to give the purified adduct **119** as a white foam (14.5 mg, **43%**).

**HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>102</sub>H<sub>150</sub>N<sub>16</sub>O<sub>26</sub>P<sub>2</sub>S<sub>4</sub> [M+2H]<sup>2+</sup>: 1102.4635; Found 1102.4633 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 0.18$  ppm).

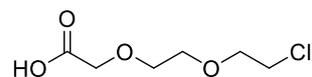


Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	5.693	5.807	6.014	965709.63	6492325.91	100	100



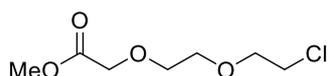
## 2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)acetic acid (**120**)



2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)ethan-1-ol (1 eq., 0.84 g, 0.72 mL, 5 mmol) was dissolved in ACN (12.5 mL) and H<sub>2</sub>O (12.5 mL). TEMPO (0.22 eq., 0.17 g, 1.1 mmol) was added followed by the portionwise addition of (diacetoxyiodo)benzene (2.2 eq., 3.54 g, 11 mmol). The orange mixture was stirred at room temperature for 16 h. It was neutralized by the addition of saturated NaHCO<sub>3</sub> solution (100 mL) and the aqueous layer was washed with EtOAc (2 × 100 mL). The aqueous phase was then acidified by the careful addition of 2N HCl solution until pH = 1. The mixture was then extracted with EtOAc (2 × 100 mL) and the combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The acid **120** was obtained as a pale yellow oil (555 mg, **78%**) and was used without purification.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.21 (s, 2H), 3.79 – 3.75 (m, 4H), 3.74 – 3.70 (m, 2H), 3.66 – 3.61 (m, 2H).

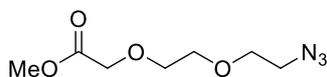
## Methyl 2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)acetate (**121**)



Carboxylic acid **121** (1 eq., 0.66 g, 3.61 mmol) was placed in a round-bottom flask and put under argon for 10 min. MeOH (25 mL) was added to the flask before being cooled in an ice bath to 0 °C. Oxalyl chloride (1.5 eq., 0.68 g, 0.46 mL, 5.38 mmol) was slowly added over the period of 30 min and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was evaporated and purified on silica gel chromatography (25% EtOAc in *n*-heptane) to yield **121** as a colourless oil (0.554 g, **78%**).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.17 (s, 2H), 3.78 – 3.69 (m, 9H), 3.63 (t, *J* = 5.9, 2H).

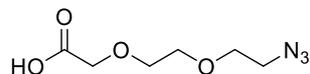
### Methyl 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)acetate (**122**)



To Chloride **122** (1 eq., 554 mg, 2.82 mmol) in DMF (5.6 mL) was added NaN<sub>3</sub> (1.5 eq., 275.47 mg, 0.15 mL, 4.24 mmol) and the resulting mixture was stirred at 100 °C for 3 h. After being cooled to room temperature, the crude mixture was diluted with a saturated NaCl solution (10 mL) and extracted with DCM (10 mL x 2). The combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo to give a **122** as colourless oil (500 mg, **81%**) which was used without further purification

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.16 (s, 2H), 3.79 – 3.63 (m, 9H), 3.38 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H).

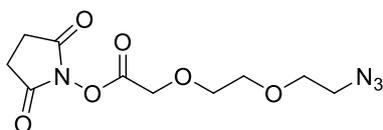
### 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)acetic acid (**123**)



Methyl ester **122** (1 eq., 500 mg, 2.46 mmol) was dissolved with a mixture of THF (14.3 mL), MeOH (4.8 mL). Then, NaOH (0.083 g, 2.07 mmol) was dissolved in H<sub>2</sub>O (4.8 mL) and added to the previous solution. Under argon protection, the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 hours. The solution pH was adjusted to 1 using HCl (3 M). The reaction mixture was poured into a separatory funnel, diluted with water, and extracted three times with DCM. The combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated in vacuo to give **123** as a colourless oil (386 mg, **83%**) which was used without further purification.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.20 (s, 2H), 3.81 – 3.75 (m, 2H), 3.73 – 3.66 (m, 4H), 3.41 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H).

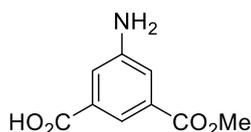
### 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)acetate (**124**)



To a solution of carboxylic acid **123** (386 mg, 2.04 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) were added EDCI.HCl (1.2 eq, 469 mg, 2.45 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (1.2 eq, 282 mg, 2.45 mmol). The resulting solution was stirred 2 h at room temperature. The organic medium was washed successively with water and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure leading to NHS ester **124** (433 mg, **74%**) obtained as a pale yellow oil.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.52 (s, 2H), 3.84 – 3.79 (m, 2H), 3.73 – 3.69 (m, 2H), 3.67 (dd, *J* = 5.6, 4.5 Hz, 2H), 3.40 (dd, *J* = 5.6, 4.6 Hz, 2H), 2.85 (s, 4H).

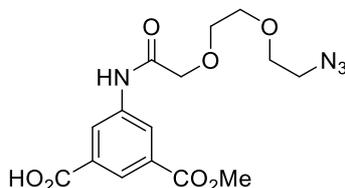
### 3-amino-5-(methoxycarbonyl)benzoic acid (**125**)



To a solution of methyl 5-nitroisophthalate (1 eq., 2 g, 8.88 mmol) in ethanol (60 mL) under argon was added Pd/C 10% w/w (203 mg). The reaction mixture was then stirred under H<sub>2</sub> atmosphere for 5 hours before being filtered on Celite. Evaporation of the volatiles gave the product **125** as a yellow solid (1.49 g, **86%**) which was used without further purification.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, MeOD) δ 7.90 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.53 (dd, *J* = 2.5, 1.5 Hz, 1H), 7.51 (dd, *J* = 2.5, 1.5 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H). **R<sub>f</sub>** = 0.5 (20% MeOH in DCM)

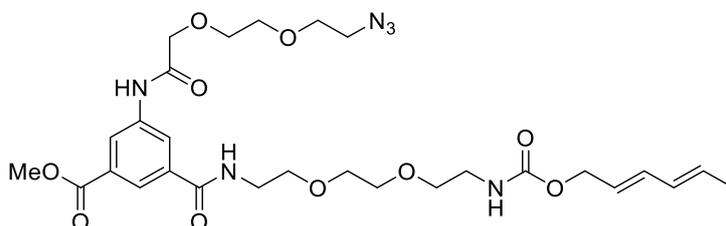
**3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)acetamido)-5-(methoxycarbonyl)benzoic acid (126)**



To a stirred solution of aniline **125** (1 eq., 237 mg, 1.2 mmol) in dry ACN (10 mL) were added NHS ester **124** (1.23 eq., 427.43 mg, 1.5 mmol) and DIEA (3.17 eq., 0.64 mL, 3.84 mmol). The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h before being concentrated in vacuo and diluted with EtOAc (20 mL). The organic layers were washed with 10% aq. citric acid (3 × 20 mL), dried (over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and concentrated in vacuo. The crude was purified by silica gel chromatography (9% MeOH in DCM) which afforded amide **126** as a colourless solid (267 mg, 60%).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.95 (s, 1H), 8.51 (ddd, *J* = 8.9, 4.7, 1.9 Hz, 3H), 4.18 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.84 – 3.74 (m, 6H), 3.52 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H); **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.0, 168.6, 165.8, 138.0, 131.6, 130.7, 127.1, 125.7, 125.5, 71.2, 70.4, 70.2, 70.2, 52.5, 50.5; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 367.1254; Found 367.1263 (Δ<sub>HRMS</sub> = 2.45 ppm); R<sub>f</sub> = 0.3 (9% MeOH in DCM).

**Methyl 3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)acetamido)-5-(((13E,15E)-10-oxo-3,6,11-trioxa-9-azaheptadeca-13,15-dien-1-yl)carbamoyl)benzoate (127)**

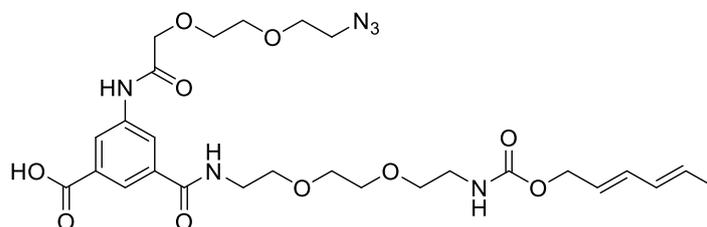


To a stirred solution of mono-benzoic acid **126** (1 eq., 102 mg, 0.28 mmol) in dry ACN (3 mL) were added diene-carbonate **113** (1 eq., 76 mg, 0.28 mmol), PyBOP (1 eq., 145 mg, 0.28 mmol) and DIEA (3 eq., 0.14 mL, 0.85 mmol). The resulting reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solution was concentrated under vacuo and retaken in EtOAc. The organic phase was washed with HCl 1 M, NaHCO<sub>3</sub> and

brine before being dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The crude was then purified by silica gel chromatography (5% MeOH in DCM) to afford the product **127** as a yellow pale oil (116 mg, **67%**).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.90 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.18 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.17 (dd, *J* = 15.3, 10.4 Hz, 1H), 6.10 – 5.91 (m, 1H), 5.68 (dq, *J* = 13.8, 6.7 Hz, 1H), 5.55 (dt, *J* = 14.4, 6.6 Hz, 1H), 5.42 (s, 1H), 4.50 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.13 (s, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.80 – 3.72 (m, 6H), 3.70 – 3.58 (m, 8H), 3.55 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.49 (dd, *J* = 5.6, 4.4 Hz, 2H), 3.33 (q, *J* = 5.4 Hz, 2H), 1.72 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168.5, 166.1, 166.0, 156.5, 138.0, 135.8, 134.4, 131.3, 131.0, 130.5, 124.4, 123.8, 123.3, 122.7, 71.2, 70.4, 70.3, 70.2, 70.2, 70.1, 69.7, 65.3, 53.4, 52.4, 50.5, 40.8, 40.0, 18.1; **HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>28</sub>H<sub>41</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 621.2884; Found: 621.2911 (Δ<sub>HRMS</sub> = 4.35 ppm).

### **3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)acetamido)-5-(((13E,15E)-10-oxo-3,6,11-trioxa-9-azaheptadeca-13,15-dien-1-yl)carbamoyl)benzoic acid (**128**)**

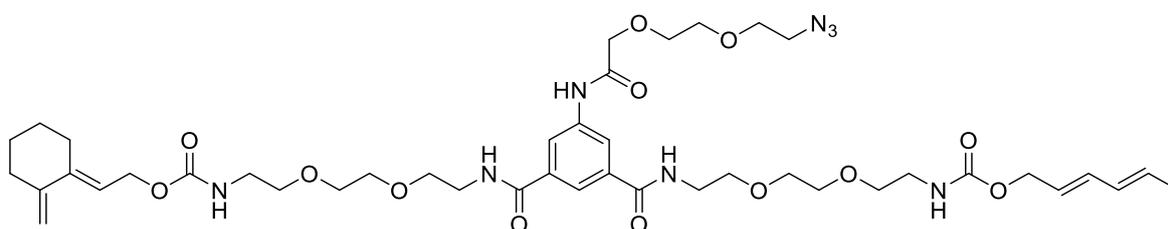


To a stirred solution of methyl ester **127** (90 mg, 0.15 mmol) in MeOH (3 mL) was added 1.0 M aq. LiOH (0.65 mL, 1 M). The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 20 h before it was concentrated in vacuo and diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) and 1 M aq. NaOH (20 mL). The aqueous layer was acidified with 1 M aq. HCl (30 mL) to pH = 1 and extracted with DCM (4 × 20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo to afford the benzoic acid **128** as a yellow oil (82 mg, **93%**) directly used without purification.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.94 (s, 1H), 8.56 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H), 8.44 (s, 1Hf), 8.27 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 6.17 (dd, *J* = 15.2, 10.4 Hz, 1H), 6.08 – 5.87 (m, 1H), 5.77 – 5.47 (m, 3H), 4.64 – 4.44 (m, 2H), 4.15 (s, 2H), 3.84 – 3.61 (m, 14H), 3.56 (t, *J* = 5.4 Hz,

2H), 3.51 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H), 3.36 (q,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 1.73 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  168.76, 168.37, 166.20, 156.77, 138.13, 135.61, 134.48, 131.07, 131.02, 130.64, 124.59, 124.38, 124.03, 123.94, 71.32, 70.61, 70.48, 70.38, 70.35, 70.32, 70.23, 70.10, 65.45, 50.66, 40.82, 40.00, 18.23.

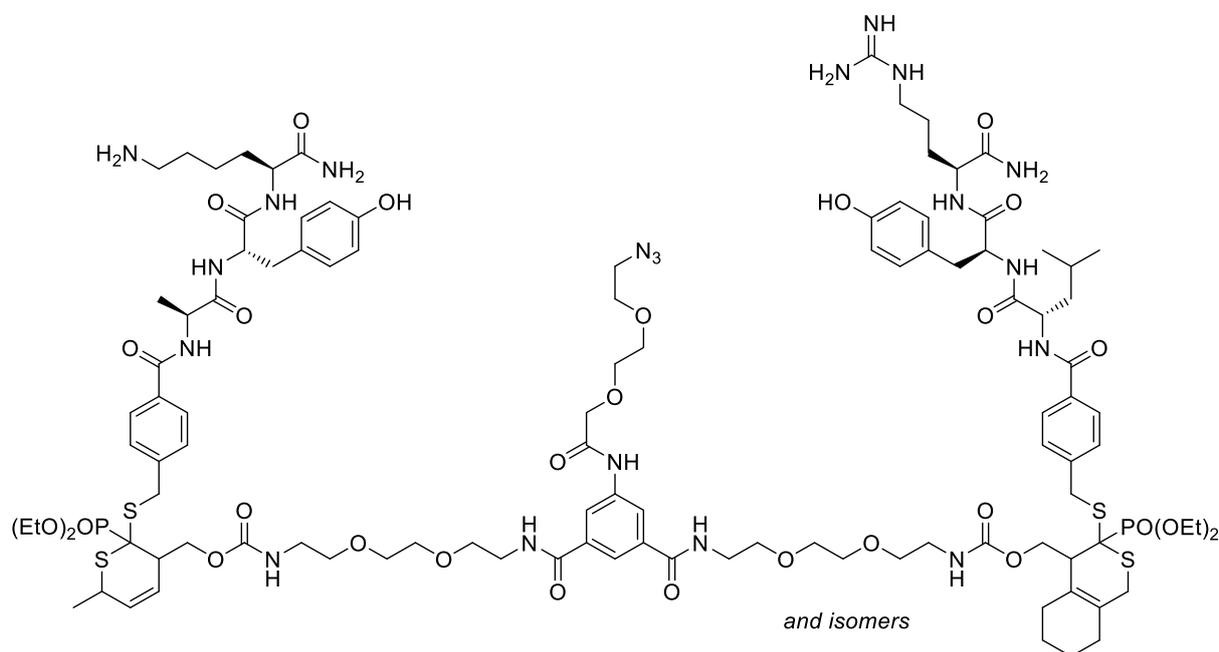
**(2E,4E)-hexa-2,4-dien-1-yl (2-(2-(2-(3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)acetamido)-5-(((E)-1-(2-methylenecyclohexylidene)-4-oxo-3,8,11-trioxa-5-azatridecane-13-yl)carbamoyl)benzamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (129)**



To a stirred solution of benzoic acid **128** (1 eq., 65 mg, 0.11 mmol) in dry ACN (1 mL) were added diene carbonate **114** (1 eq., 34 mg, 0.11 mmol), PyBOP (1 eq., 56 mg, 0.11 mmol) and DIEA (3 eq., 54  $\mu\text{L}$ , 0.32 mmol). The resulting reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The crude was evaporated and purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5  $\mu\text{m}$ , 19  $\times$  150 mm) using a linear gradient (5% to 95% in 40 min, flow-rate of 18  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) of solvent B (ACN) in solvent A ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to give the purified **129** as a clear oil (53 mg, 55%).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  8.52 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 8.22 (m, 2H), 7.99 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H), 7.12 (q,  $J = 6.2$  Hz, 1H), 6.25 – 6.17 (m, 1H), 6.06 (m, 1H), 5.76 – 5.67 (m, 1H), 5.61 (m,  $J = 15.2, 6.3$  Hz, 1H), 5.49 (t,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 4.81 (m, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.51 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 4.45 (d,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 4.13 (s, 2H), 3.74 – 3.64 (m, 6H), 3.59 – 3.47 (m, 13H), 3.48 – 3.36 (m, 11H), 3.12 (q,  $J = 5.9$  Hz, 4H), 2.22 (dt,  $J = 16.9, 6.4$  Hz, 4H), 1.72 (d,  $J = 6.5$ , 3H), 1.63 – 1.52 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO)  $\delta$  168.6, 168.5, 165.93, 165.85, 156.2, 156.1, 149.6, 144.1, 138.4, 138.3, 135.3, 135.2, 133.2, 130.7, 130.1, 125.5, 121.4, 121.3, 120.9, 117.9, 108.6, 70.4, 70.19, 70.17, 69.6, 69.5, 69.3, 69.2, 68.9, 63.9, 59.8, 50.0, 34.7, 28.2, 26.3, 25.5, 17.9.

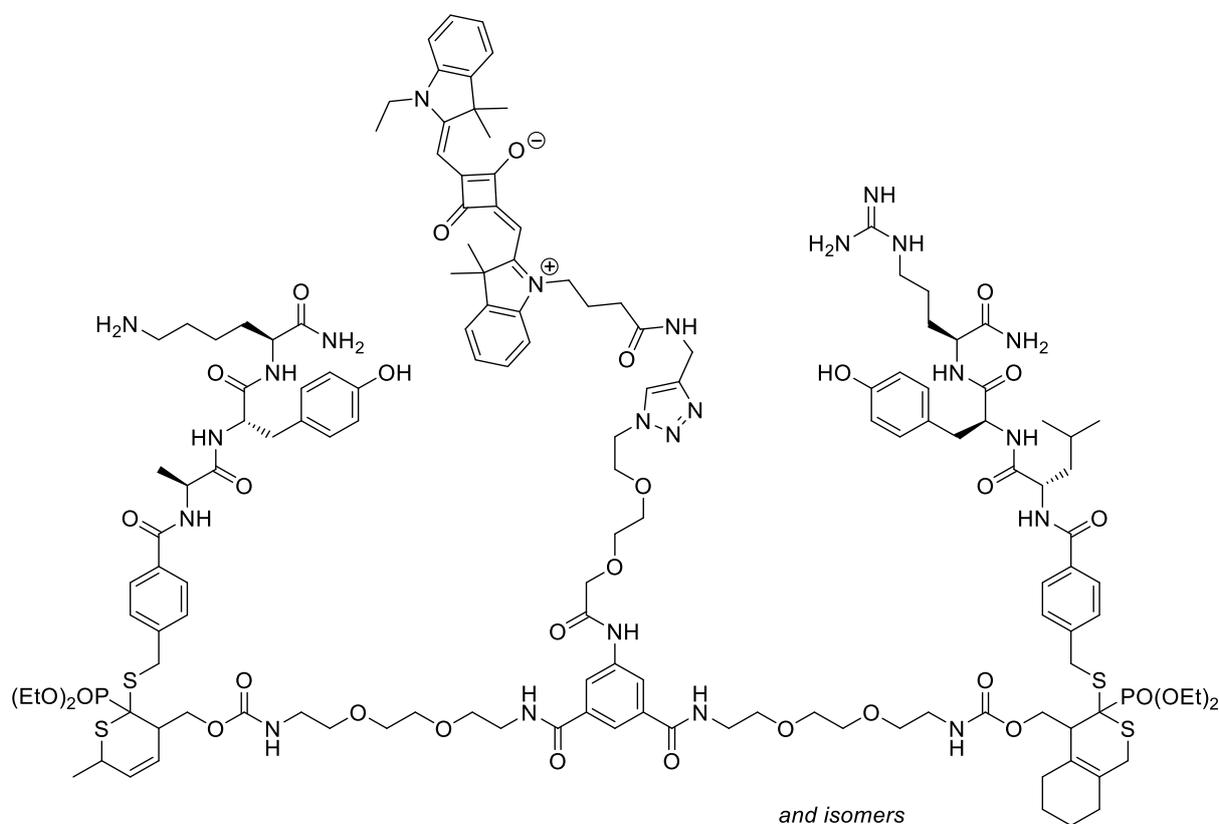
### Adducts-(Ala-Tyr-Lys)-(Leu-Tyr-Arg)-N<sub>3</sub> (130)



Bis-diene **129** (1 eq., 12.4 mg, 0.014 mmol) was dissolved in *i*PrOH (0.5 mL) and phosphonodithioester **41** (1 eq., 12.302 mg, 0.014 mmol) dissolved in H<sub>2</sub>O (1.16 mL) was added. The mixture was stirred at 37 °C for an hour before phosphonodithioester **40** (1.2 eq., 13.605 mg, 0.017 mmol) dissolved in H<sub>2</sub>O (0.24 mL) was added. The final solution was stirred overnight at the same temperature. Solvent was evaporated and purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5 μm, 19 × 150 mm) using a linear gradient (5% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL.min<sup>-1</sup>) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to give the purified **130** as a white fluffy solid (9.4 mg, **26%**)

**HRMS** (ESI-TOF): Calculated for [M+3H]<sup>3+</sup>: 797.3367; Found 797.3371 ( $\Delta_{\text{HRMS}} = 0.5$  ppm).

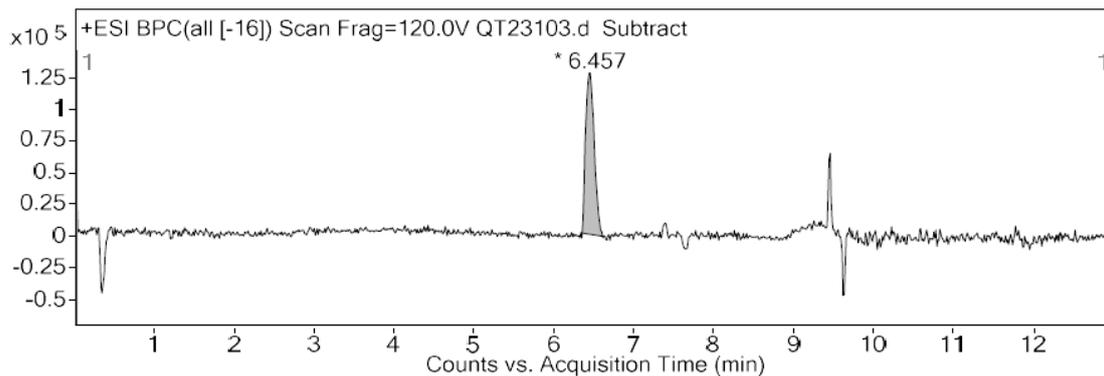
## Adducts-(Ala-Tyr-Lys)-(Leu-Tyr-Arg)-Squaraine (131)



Azide **130** (1 eq., 4.8 mg, 1.83 micromol) dissolved in H<sub>2</sub>O (0.1 mL) was added to a solution of alkyne **102** (1.2 eq., 1.205 mg, 2.2 micromol) in IPA (0.15 mL). Then an 1 M aqueous solution of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (1 eq., 0.018 mL, 1.83 μmol) was added followed by a 1 M aqueous solution of sodium ascorbate (2 eq., 0.037 mL, 3.67 μmol). The mixture was stirred at 37°C for 3 hours. Solvent was evaporated and purified by semi-preparative reversed-phase HPLC chromatography (Gilson PLC2020 system) on a SunFire C18 column (5 μm, 19 × 150 mm) using a linear gradient (5% to 95% in 40 min, flow-rate of 18 mL·min<sup>-1</sup>) of solvent B (0.1% TFA in ACN, v/v) in solvent A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, v/v). Detection was set at 220 and 254 nm. Fractions containing the desired product were freeze-dried to give the purified adduct **131** as a fluffy blue solid (2.2 mg, **38%**).

**HRMS** (ESI-TOF): Calculated for C<sub>143</sub>H<sub>198</sub>N<sub>23</sub>O<sub>32</sub>P<sub>2</sub>S<sub>4</sub> [M+3H]<sup>3+</sup>: 979.7644; Found 979.7641 (Δ<sub>HRMS</sub> = 0.29 ppm).

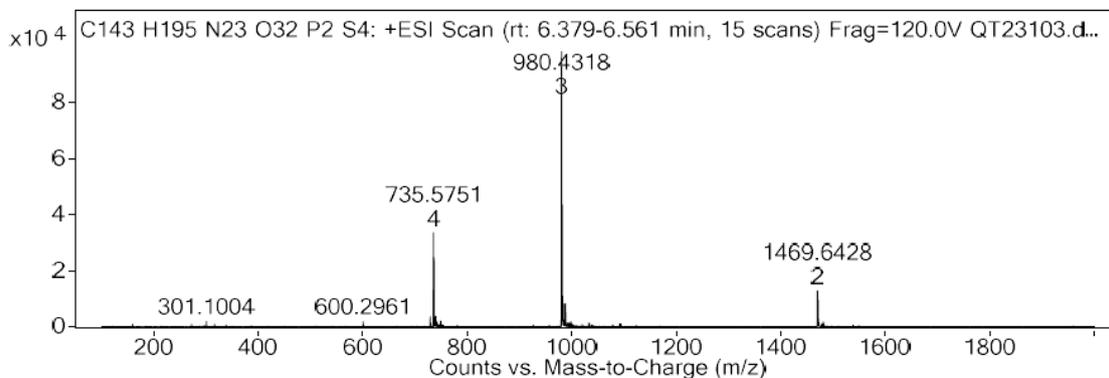
Fragmentor Voltage 120 Collision Energy 0 Ionization Mode ESI



**Integration Peak List**

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	6.34	6.457	6.626	127884.5	955063.21	100	100

Fragmentor Voltage 120 Collision Energy 0 Ionization Mode ESI



**Peak List**

m/z	z	Abund	Formula	Ion
735.0754	4	19385.87		
735.3254	4	32827.81		
735.5751	4	33634.73		
735.8247	4	24993.75		
979.7641	3	56416.47	C143 H198 N23 O32 P2 S4	M+3
980.0989	3	96904.71	C143 H198 N23 O32 P2 S4	M+3
980.4318	3	98322.6	C143 H198 N23 O32 P2 S4	M+3
980.7653	3	73000.5	C143 H198 N23 O32 P2 S4	M+3
981.0985	3	43596.12	C143 H198 N23 O32 P2 S4	M+3
981.432	3	23013.5	C143 H198 N23 O32 P2 S4	M+3



# Bibliographie

- 
- <sup>1</sup> Kinch, M. S.; Kraft, Z.; Schwartz, T. *Drug Discovery Today* **2020**, *25*(11), 1923-1929.
- <sup>2</sup> Walters, W. P.; Green, J.; Weiss, J. R.; Murcko, M. A. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6405-6416.
- <sup>3</sup> Lovering, F.; Bikker, J.; Humblet, C. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*(21), 6752-6756.
- <sup>4</sup> Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *23*, 3-25.
- <sup>5</sup> a) Doak, B. C.; Kihlberg, J. *Expert Opin. Drug Discovery* **2017**, *12*, 115-119. b) Doak, B. C.; Over, B.; Giordanetto, F.; Kihlberg, J. *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1115-1142.
- <sup>6</sup> Shultz, M. D. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*(4), 1701-1714.
- <sup>7</sup> a) Peuchmaur, M.; Wong, Y.-S. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2008**, *11*(8), 587-601. b) Ruijter, E.; Scheffelaar, R.; Orru, R. V. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*(28), 6234-6246. c)
- <sup>8</sup> Salmon, E.; Bernard Ir, C.; Hustinx, R. *Semin. Nucl. Med.* **2015**, *45*(6), 541-551.
- <sup>9</sup> SPIE (March 2015). "W.E. Moerner plenary presentation: Single-molecule spectroscopy, imaging, and photocontrol -- foundations for super-resolution microscopy". SPIE Newsroom. [doi:10.1117/2.3201503.17](https://doi.org/10.1117/2.3201503.17).
- <sup>10</sup> Siddig, S.; Aufmkolk, S.; Doose, S.; Jobin, M.-L.; Werner, C.; Sauer, M.; Calebiro, D. *Sci. Adv.* **2020**, *6*(16), eaay7193.
- <sup>11</sup> Das, P.; Delost, M. D.; Qureshi, M. H.; Smith, D. T.; Njardarson, J. T. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 4265-4311.
- <sup>12</sup> Vitaku, E.; Smith, D. T.; Njardarson, J. T. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10257-10274.
- <sup>13</sup> Delost, M. D.; Smith, D. T.; Anderson, B. J.; Njardarson, J. T. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 10996-11020.
- <sup>14</sup> Cornacchia, C.; Cacciatore, I.; Baldassarre, L.; Mollica, A.; Feliciani, F.; Pinnen, F. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2012**, *12*, 2-12.

- 
- <sup>15</sup> Wang, Y.; Wang, P.; Ma, H.; Zhu, W. *Expert Opin. Ther. Patents* **2013**, *23*, 1-19.
- <sup>16</sup> Borthwick, A. D. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3641–3716.
- <sup>17</sup> Jida, M.; Tourwé, D.; Ballet, S. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 38159-38163.
- <sup>18</sup> Colombo, R.; Mingozi, M.; Belvisi, L.; Arosio, D.; Piarulli, U.; Carenini, N.; Perego, P.; Zaffaroni, N.; De Cesare, M.; Castiglioni, V.; Scanziani, E.; Gennari, C. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10460–10474.
- <sup>19</sup> González, J. F.; Ortín, I.; de la Cuesta, E.; Menéndez, J. C. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 6902-6915.
- <sup>20</sup> Sammes, P. G. Naturally occurring 2,5-dioxopiperazines and related compounds. In *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*; Herz, W., Grisebach, H., Kirby, G. W., Eds.; Springer-Verlag: Vienna, 1975; pp 51-118.
- <sup>21</sup> McClelland, K.; Milne, P. J.; Lucieto, F. R.; Frost, C.; Brauns, S. C.; Van De Venter, M.; Du Plessis, J.; Dyason, K. *J. Pharm. Pharmacol.* **2004**, *56*, 1143-1153.
- <sup>22</sup> Martins, M. B.; Carvalho, I. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9923-9932.
- <sup>23</sup> Imamura, M.; Prasad, C. *Peptides* **2003**, *24*, 445–448.
- <sup>24</sup> Lopez-Rodriguez, M. L.; Morcillo, M. J.; Fernandez, E.; Porras, E.; Orensanz, L.; Beneytez, M. E.; Manzanares, J.; Fuentes, J. A. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 186–197.
- <sup>25</sup> a) Wyatt, P. G.; Allen, M. J.; Borthwick, A. D.; Davies, D. E.; Exall, A. M.; Hatley, R. J. D.; Irving, W. R.; Livermore, D. G.; Miller, N. D.; Nerozzi, F.; Sollis, S. L.; Szardenings, A. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2579–2582.
- <sup>26</sup> Liddle, J.; Allen, M. J.; Borthwick, A. D.; Brooks, D. P.; Davis, D. E.; Edwards, R. M.; Exall, A. M.; Hamlett, C.; Irving, W. R.; Mason, A. M.; McCafferty, G. P.; Nerozzi, F.; Peace, S.; Philp, J.; Pollard, D.; Pullen, M. A.; Shabbir, S. S.; Sollis, S. L.; Westfall, T. D.; Woolard, P. M.; Wu, C.; Hickey, D. M. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 90-94.
- <sup>27</sup> Borthwick, A. D.; Liddle J. *Med. Res. Rev.* **2011**, *31*, 576-604.
- <sup>28</sup> Patchett, A. A.; Nargund, R. P. *Annu. Rep. Med. Chem.* **2000**, *35*, 289–298.

- 
- <sup>29</sup> Welsch, M. E.; Snyder, S. A.; Stockwell, B. R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 347–361.
- <sup>30</sup> Pitt, W. R.; Parry, D. M.; Perry, B. G.; Groom, C. R. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2952-2963.
- <sup>31</sup> Didierjean, C.; Del Duca, V.; Benedettin E.; Aubry, A.; Zouikri, M.; Marraud, M.; Boussard, G. *J. Peptide Res.* **1997**, *50*, 451-457
- <sup>32</sup> Bouayad-Gervais, S.; Lubell, W. D. *Molecules* **2013**, *18*, 14739-14746
- <sup>33</sup> Regenass, P.; Bosc, D.; Riché, S.; Gizzi, P.; Hibert, M.; Karmazin, L.; Ganesan, A.; Bonnet, D. *J. Org. Chem.* **2017**, *6*, 3239-3244.
- <sup>34</sup> Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *23*, 3-25.
- <sup>35</sup> Schlögl, K., Korger, G. *Monatshefte für Chemie* **1951**, *82*, 799-814.
- <sup>36</sup> Winterfield, K.; Nair, G. *Arch. Pharmaz.* **1971**, *71*, 216-222.
- <sup>37</sup> Orme, M.; Sawyer, J. S.; Schultze, L. M. Fused heterocyclic derivatives as phosphodiesterase inhibitors. WO200210166A1, **2002**.
- <sup>38</sup> Robba, M.; Lancelot, J.-C.; Maume, D.; Rabaron, A. *J. Het. Chem.* **1978**, *7*, 1159-1163.
- <sup>39</sup> Maume, D.; Lancelot, J.-C.; Robba, M. *J. Het. Chem.* **1979**, *6*, 1217-1222.
- <sup>40</sup> Lancelot, J.-C.; Maume, D.; Robba, M. *J. Het. Chem.* **1981**, *18*, 743-746.
- <sup>41</sup> J. Catalán, J. L. G. de Paz and J. Elguero, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1996**, *1*, 57.
- <sup>42</sup> F. Pinnen, G. Luisi, A. Calcagni, G. Lucente, E. Gavuzza, and S. Cerrini, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, *12*, 1611.
- <sup>43</sup> Baudet, P.; Calin, M. *Helvetica Chem. Acta* **1969**, *1*, 282-291.
- <sup>44</sup> a) Baraldi, P. G.; Cacciari, B.; Romagnoli, R.; Spalluto, G. *Synthesis* **1999**, *3*, 453-458. b) Baraldi, P. G.; Cacciari, B.; Romagnoli, R.; Spalluto, G. *Arzneim. Forsch. Drug Res.* **1999**, *12*, 997-1000.
- <sup>45</sup> Ivanovitch, R. A.; Vincent-Rocan, J.-F.; Elkaeed, E. B.; Beauchemin, A. M. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4898–4901.
- <sup>46</sup> Hamuro, Y.; Marshall, W. J.; Scialdone, M. A. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 163-172.

- 
- <sup>47</sup> Schwan, T. *J. Heterocycl. Chem.* **1983**, *20*, 547-549.
- <sup>48</sup> a) Hoffman, R. V.; Nayyar, N. K.; Chen, W. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5992-5994. b) Hoffman, R. V.; Reddy, M. M.; Klumas, C. M.; Cervantes-Lee, F. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9128-9130.
- <sup>49</sup> Hoffman, R. V.; Nayyar, N. K.; Chen, W. *J. Org. Chem.* **1995**, *13*, 4121-4125.
- <sup>50</sup> Pinnen, F.; Luisi, G.; Lucente, G.; Gavuzza, E.; Cerrini, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, *7*, 819-824.
- <sup>51</sup> Bourguet, C. B.; Proulx, C.; Klocek, S.; Sabatino, D.; Lubell, W. D. *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 284-296.
- <sup>52</sup> Obreza, A.; Urleb, U. *Synth. Commun.* **2003**, *33*, 1011-1018.
- <sup>53</sup> Bonnet, D.; Margathe, J.-F.; Radford, S.; Pfimlin, E.; Riché, S.; Doman, P.; Hibert, M.; Ganesan, A. *ACS Comb. Sci.* **2012**, *14*, 323-334.
- <sup>54</sup> a) Regenass, P.; Margathe, J.-F.; Mann, A.; Suffert, J.; Hibert, M.; Girard, N.; Bonnet, D. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 9657-9660. b) Regenass, P. Doctoral thesis, Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Faculté de Pharmacie, **2015**.
- <sup>55</sup> Regenass, P.; Riché, S.; Péron, F.; Rognan, D.; Hibert, M.; Girard, N.; Bonnet, D. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 8859-8863.
- <sup>56</sup> Péron, F.; Riché, S.; Lesur, B.; Hibert, M.; Breton, P.; Fourquez, J.-M.; Girard, N.; Bonnet, D. *ACS Omega* **2018**, *3*, 15182-15192
- <sup>57</sup> Lovering F.; Bikker, J.; Humblet, C. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6752-6756.
- <sup>58</sup> Szczepanski, H.; Kristinsson, H.; Maienfisch, P.; Ehrenfreund, J. Pyridine derivatives as pesticides. WO 95/18123, **1995**.
- <sup>59</sup> Huang, Y.-Y.; Li, Z.; Cai, Y.-H.; Feng, L.-J.; Wu, Y.; Li, X.; Luo, H.-B. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *11*, 3044-3053.
- <sup>60</sup> Bolognese, A.; Correale, G.; Manfra, M.; Esposito, A.; Novellino, E.; Lavecchia, A. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 8148-8157.

- 
- <sup>61</sup> (a) Glushkov V. A.; Tolstikov, A. G. *Russ. Chem. Rev.* **2008**, *77*, 137-159. (b) Kouznetsov, V. V. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2721-2750. (c) S. Bello Forero, J.; Jones Junior, J.; da Silva, F. M. *Curr. Org. Synth.* **2016**, *13*, 157-175.
- <sup>62</sup> Sridharan, V.; Suryavanshi, P. A.; Menendez, J. C. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 7157-7259.
- <sup>63</sup> Ben Ameer, M. R.; Shaaban K. A.; Rebai I. K.; Smaoui S.; Bejar S.; Mellouli L. *Natural Product Research.* **2009**, *23*, 1095-1107.
- <sup>64</sup> Kumar, S. N.; Sukumari Nath, V.; Pratap Chandran, R.; Nambisan, B. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *30*, 439-449.
- <sup>65</sup> Jamie, H.; Kilian, G.; Milne, P. J. *Pharmazie.* **2002**, *57*, 638-642.
- <sup>66</sup> Jamie, H. Doctoral thesis, Faculty of Health Sciences, University Port Elizabeth, **2002**
- <sup>67</sup> Povarov, L. S. Doctoral Thesis, Institute of General and Inorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, **1966**.
- <sup>68</sup> Povarov, L. S.; Grigos, V. I.; Mikhailov, B. M. *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR, Division of chemical science*, **1963**, *12*, 1878-1880.
- <sup>69</sup> Forero, J. S. B.; Junior, J. J.; da Silva, F. M. *Current Organic Synthesis*, **2016**, *13*, 157-175.
- <sup>70</sup> Fochi, M.; Caruana, L.; Bernardi, L. *Synthesis* **2014**, *46*, 135-157.
- <sup>71</sup> Kouznetsov, V. V. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2721-2750.
- <sup>72</sup> Ghashghaei, O.; Masdeu, C.; Alonso, C.; Palacios, F.; Lavilla, R. *Drug Discov. Today* **2018**, *29*, 71-79.
- <sup>73</sup> Orozco, D.; Kouznetsov, V. V.; Bermúdez, A.; Vargas, Méndez, L. Y.; Mendoza Salgado, A. R.; Meléndez Gómez, C. M. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 4876-4898.
- <sup>74</sup> Hesse, K.-D. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1970**, *741*, 117-123.
- <sup>75</sup> Larsen, S. D.; Grieco, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 1768-1769.
- <sup>76</sup> Grieco, P. A.; Bahsas, A. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 5855-5858.

- 
- <sup>77</sup> Kobayashi, S.; Ishitani, H.; Nagayama, S. *Synthesis* **1995**, 1995, 1195-1202.
- <sup>78</sup> Dagousset, G.; Zhu, J.; Masson, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 14804-14813.
- <sup>79</sup> Liu, H.; Dagousset, G.; Masson, G.; Retailleau, P.; Zhu, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 4598-4599.
- <sup>80</sup> Dagousset, G. Doctoral thesis, Département de Synthèse Organique et Méthodes Catalytiques, Institut de Chimie des Substances Naturelles, **2011**.
- <sup>81</sup> Mikhailov, B. M.; Povarov, L. S.; Grigos, V. I.; Karakhannov, R. A. *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.* **1964**, 1963.
- <sup>82</sup> Kouznetsov, V. V.; Meléndez Gómez, C. M.; Rojas Ruíz, F. A.; del Olmo, E. *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 3115-3118.
- <sup>83</sup> Povarov, L. S.; Mikhailov, B. M. *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.* **1964**, 1910.
- <sup>84</sup> Lavilla, R.; Bernabeu, M. C.; Carranco, I. S.; Díaz, J. L. *Org. Lett.* **2003**, 5, 717-720.
- <sup>85</sup> Beifuss, U.; Ledderhose, S.; Ondrus, V. *ARKIVOC* **2005**, 147-173.
- <sup>86</sup> Nomura, Y.; Kimura, M.; Takeuchi, Y.; Tomoda, S. *Chem. Lett.* **1978**, 3, 268-270.
- <sup>87</sup> Smith, C. D.; Gavriluk, J. I.; Lough, A. J.; Batey, R. A. *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, 75, 702-715.
- <sup>88</sup> Llona-Minguez, S.; Throup, A.; Steiner, E.; Lightowler, M.; Van der Haegen, S.; Homan, E.; Eriksson, L.; Stenmark, P.; Jenmalm-Jensen, A.; Helleday, T. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15, 7758-7764.
- <sup>89</sup> Meyet, C. E.; Larsen, C. H. *The Journal of Organic Chemistry* **2014**, 79, 9835-9841.
- <sup>90</sup> Stevenson, P. J.; Graham, I. *Arkivoc* **2003**, 7, 139-144.
- <sup>91</sup> (a) Osborne, D.; Stevenson, P. J. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 5469-5470. (b) Stevenson, P. J.; Nieuwenhuyzen, M.; Osborne, D. *Chem. Commun.* **2002**, 444-445.
- <sup>92</sup> Hadden, M.; Nieuwenhuyzen, M. Potts, D.; Stevenson, P. J.; Thompson, N. *Tetrahedron* **2001**, 57, 5615-5624.
- <sup>93</sup> Batey, R. A.; Simoncic, D. L.; Smyj, R. P.; Lough, A. J. *Chem. Commun.* **1999**, 7, 651-652.

- 
- <sup>94</sup> Dagousset, G.; Retailleau, P.; Masson, G.; Zhu, J. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 5869-5873.
- <sup>95</sup> Kajino, M.; Hird, N. W.; Tarui, N.; Banno, H.; Kawano, Y.; Inatomi, N. Fused quinolines and used thereof. WO2005105802, **2005**.
- <sup>96</sup> Vicente-García, E.; Catti, F.; Ramón, R.; Lavilla, R. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 860-863. (b) Di Pietro, O.; Vicente-García, E.; Taylor, M. C.; Berenguer, D.; Viayna, E.; Lanzoni, A.; Sola, I.; Sayago, H.; Riera, C.; Fisa, R.; M. Clos, M. V.; Pérez, B.; Kelly, J. M.; Lavilla, R.; Munoz-Torrero, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *105*, 120-137.
- <sup>97</sup> Carden, J. L.; Gierlich, L. J.; Wass, D. F.; Browne, D. L.; Melen, R. L. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 318-321.
- <sup>98</sup> Kouznetsov, V. V.; Meléndez Gómez, C. M.; Urbina González, J. M.; Stashenko, E. E. *J. Heterocyclic Chem.* **2007**, *44*, 551-555.
- <sup>99</sup> B. J. Levandowski, D. Herath, N. M. Gallup, K. N. Houk, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 2611-2616.
- <sup>100</sup> Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215-241.
- <sup>101</sup> Pour une description récente de l'utilisation des descripteurs moléculaires HOMO/LUMO dans les reaction d'aza-Diels-Alder, voir : P. Vermeeren, T. A. Hamlin, I. Fernandez, F. M. Bickelhaupt, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 8105-8112.
- <sup>102</sup> a) L. R. Domingo, M. J. Aurell, J. A. Saez, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3576-3583; b) M. Rios-Gutierrez, H. Layeb, L. R. Domingo, *Tetrahedron* **2015**, *71*, 9339-9345; c) L. R. Domingo, M. J. Aurell, J. A. Saez, S. M. Mekelleche, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 25268-25278; d) L. R. Domingo, M. Rios-Gutierrez, S. Emamian, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 17064-17073.
- <sup>103</sup> S. N. S. Vasconcelos, V. H. Menezes da Silva, A. A. C. Braga, A. Shamim, F. B. Souza, D. C. Pimenta, H. A. Stefani, *Asian J. Org. Chem.* **2017**, *6*, 913-920.
- <sup>104</sup> F. Palacios, C. Alonso, A. Arrieta, F. P. Cossio, J. M. Ezpeleta, M. Fuertes, G. Rubiales, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 2091-2099.

- 
- <sup>105</sup> Redfield, C. Proteins studied by NMR. In Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry (Third edition); Elsevier; **2016**, pp 759-765.
- <sup>106</sup> Daugan, A.; Grondin, P.; Ruault, C.; Le Monnier de Gouville, A.-C.; Coste, H.; Linget, J. M.; Kirilovsky, J.; Hyafil, F.; Labaudiniere, R. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4533-4542.
- <sup>107</sup> Bischoff, E. *Int. J. Impot. Res.* **2004**, *16*, 11-14.
- <sup>108</sup> Coward, R. M.; Carson, C. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2008**, *4*, 1315-1330.
- <sup>109</sup> Ceyhan, O.; Birsoy, K.; Hoffman, C. S. *Chemistry & Biology* **2012**, *19*, 155-163.
- <sup>110</sup> Neumeyer, K.; Kirkpatrick, P. *Nature Reviews Drug Discovery* **2004**, *3*, 295-296.
- <sup>111</sup> a) Barnes, H; Brown, Z.; Burns, A.; Williams, T. Phosphodiesterase 5 inhibitors for pulmonary hypertension. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, CD012621, **2019**. b) Fan Chung, K. *European Journal of Pharmacology* **2006**, *533*, 110-117.
- <sup>112</sup> Andersson, K. E. *British Journal of Pharmacology* **2018**, *175*, 2554-2565.
- <sup>113</sup> a) Tzoumas, N.; Farrah, T. E.; Dhaun, N.; Webb, D. J. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, 1-22. b) Jeon, Y. H.; Heo, Y.-S.; Kim, C. M.; Hyun, Y.-L.; Lee, T. G.; Ro, S.; Cho, J. M. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 1198-1220.
- <sup>114</sup> a) Scicinski, J. J.; Congreve, M. S.; Ley, S. V. *J. Comb. Chem.* **2004** *6*, 375-384.
- <sup>115</sup> Estep, K. G.; Neipp, C. E.; Stephens Stramiello, L. M.; Adam, M. D.; Allen, M. P.; Robinson, S.; Roskamp, E. J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63(16)*, 5300-5301.
- <sup>116</sup> Glinsky-Olivier, N.; Yang, S.; Retailleau, P.; Gandon, V.; Guinchard, X. *Org. Lett.* **2019**, *21(23)*, 9446-9451.
- <sup>117</sup> Srinivasan, N.; Ganesan, A. *Chem. Commun.* **2003**, 916-917.
- <sup>118</sup> Daugan, A., C.-M. Tetracyclic derivatives; Process of preparation and use. US5859006, **1999**.
- <sup>119</sup> Ben Ameer, M. R.; Shaaban K. A.; Rebai I. K.; Smaoui S.; Bejar S.; Mellouli L. *Natural Product Research.* **2009**, *23*, 1095-1107.

- 
- <sup>120</sup> Ding, Y.; de Wet, J. R.; Cavalcoli, J.; Li, S.; Greshock, T. J.; Miller, K. A.; Finefield, J. M.; Sunderhaus, J. D.; McAfoos, T. J.; Tsukamoto, S.; Williams, R. M.; Sherman, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12733-12740.
- <sup>121</sup> Maiya, S.; Grundmann, A.; Li, S.-M.; Turner, G. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1062-1069.
- <sup>122</sup> Jamie, H.; Kilian, G.; Dyason, K.; Milne, P. *J. Pharm. Pharmacol.* **2002**, *54*, 1659-1665.
- <sup>123</sup> Jamie, H.; Kilian, G.; Milne, P. *J. Pharmazie.* **2002**, *57*, 638-642.
- <sup>124</sup> Jamie, H. Doctoral thesis, Faculty of Health Sciences, University Port Elizabeth, **2002**
- <sup>125</sup> Kumar, S. N.; Sukumari Nath, V.; Pratap Chandran, R.; Nambisan, B. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *30*, 439-449.
- <sup>126</sup> Huang, P.; Xie, F.; Ren, B.; Wang, Q.; Wang, J.; Wang, Q.; Abdel-Mageed, W. M.; Liu, M.; Han, J.; Oyeleye, A.; Shen, J.; Song, F.; Dai, H.; Liu, X.; Zhang, L. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 7437-7447.
- <sup>127</sup> El-Gendy, B. E.-D. M.; Rateb, M. E. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2015**, *25*, 3125-3128.
- <sup>128</sup> a) Site de l'institut Pasteur. <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/cryptococcose> (5 Mai 2020). b) Park, B. J.; Wannemuehler, K. A.; Marston, B. J.; Govender, N.; Pappas, P. G.; Chiller, T. M. *AIDS* **2009**, *23*, 525-530.
- <sup>129</sup> Gao, Y.-Y.; Liu, Q.; Liu, B.; Xie, C.; Cao, M.; Yang, X.; Liu, G. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 10749-10756.
- <sup>130</sup> Ashnagar, A.; Bailey, P.; Cochrane, P. J.; Mills, T. J.; Price, R. A. *ARKIVOC* **2007**, *11*, 161-171.
- <sup>131</sup> Fukumoto, K.; Asari, T.; Harada, T. *Japanese Patent P409188749*, September 4, **1996**.
- <sup>132</sup> Kanoh, K.; Kohno, S.; Asari, T.; Harada, T.; Katada, J.; Muramatsu, M.; Kawashima, H.; Sekiya, H.; Uno, I. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **1997**, *7* (22), 2847-2852.
- <sup>133</sup> Kanoh, K.; Kohno, S.; Katada, J.; Takahashi, J.; Uno, I.; Hayashi, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1451-1457.

- 
- <sup>134</sup> Kanzaki, H.; Yanagisawa, S.; Kanoh, K.; Nitoda, T. *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 1042–1047.
- <sup>135</sup> Yamazaki, Y.; Tanaka, K.; Nicholson, B.; Deyanat-Yazdi, G.; Potts, B.; Yoshida, T.; Oda, A.; Kitagawa, T.; Orikasa, S.; Kiso, Y.; Yasui, H.; Akamatsu, M.; Chinen, T.; Usui, T.; Shinozaki, Y.; Yakushiji, F.; Miller, B. R.; Neuteboom, S.; Palladino, M.; Kanoh, K.; Lloyd, G. K.; Hayashi, Y. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1056-1071.
- <sup>136</sup> Nicholson, B.; Lloyd, G. K.; Miller, B. R.; Palladino, M. A.; Kiso, Y.; Hayashi, Y.; Neulteboom, S. T. *C. Anticancer Drugs* **2006**, *17*, 25–31.
- <sup>137</sup> Plinabulin, ClinicalTrials.gov. Available online : <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=plinabulin&cntry=&state=&city=&dist=> (accessed on April 25<sup>th</sup>, 2022)
- <sup>138</sup> Yakushiji, F.; Tanaka, H.; Muguruma, K.; Iwahashi, T.; Yamazaki, Y.; Hayashi, Y. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 12587 - 12590.
- <sup>139</sup> Couladouros, E. A.; Magos, A. D. *Mol. Divers.* **2005**, *9*, 111-121.
- <sup>140</sup> Schmidt, U.; Lieberknecht, A.; Wild, J. *Synthesis* **1984**, *4*, 53-60.
- <sup>141</sup> Spyropoulos, C.; Kokotos, C. G. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (10), 4477-4483.
- <sup>142</sup> Clemente, G. S.; van Waarde, A.; Antunes, I. F.; Dömling, A.; Elsinga, P. H. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*(15), 5291-5325.
- <sup>143</sup> Schermelleh, L.; Heintzmann, R.; Leonhardt, H. *J Cell Biol* **2010**, *190*(2), 165–175.
- <sup>144</sup> Jiang, W.; Chalich, Y.; Deen, M. J. *Sensors* **2019**, *19*(22), 5019.
- <sup>145</sup> Rangger, C.; Haubner, R. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 22-61.
- <sup>146</sup> a) Becaud, J.; Mu, L.; Karramkam, M.; Schubiger, P. A.; Ametamey, S. M.; Graham, K.; Stellfeld, T.; Lehmann, L.; Borkowski, S.; Berndorff, D.; Dinkelborg, L.; Srinivasan, A.; Smits, R.; Kokschi, B. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 2254-2261. b) Perrin, D. M. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 1333-1343 c) McBride, W. J.; D'Souza, C. A.; Sharkey, R. M.; Karacay, H.; Rossi, E. A.; Chang, C. H.; Goldenberg,

- 
- D. M. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 1331-1340. c) Rickmeier, J.; Ritter, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 14207-14211. d) Yuan, Z.; Nodwell, M. B.; Yang, H.; Malik, N.; Merkens, H.; Bénard, F.; Martin, R. E.; Schaffer, P.; Britton, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 12733-12736. e)
- <sup>147</sup> Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third edition; Springer, 2006.
- <sup>148</sup> Schweizer, T.; Kubach, H.; Koch, T. *Automotive and Engine Technology* **2021**, *6*, 275-287.
- <sup>149</sup> Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y. *Chem. Rev.* **2010**, *110*(5), 2620-2640.
- <sup>150</sup> Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- <sup>151</sup> Guunoo, S. B.; Madder, A. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 8002-8013.
- <sup>152</sup> Walsh, S. J.; Bargh, J. D.; Dannheim, F. M.; Hanby, A. R.; Seki, H.; Counsell, A. J.; Ou, X.; Fowler, E.; Ashman, N.; Takada, Y.; Isidro-Llobet, A.; Parker, J. S.; Carroll, J. S.; Spring, D. R. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 1305.
- <sup>153</sup> a) Liu, Z.; Liu, J.; Wang, X.; Mi, F.; Wang, D.; Wu, C. *Bioconjugate Chem.* **2020**, *31*(8), 1857-1872. b) Wolfbeis, O. S. *Methods Appl. Fluoresc.* **2021**, *9*, 042001. c) Foubert, A.; Beloglazova, N. V.; Rajkovic, A.; Sas, B.; Madder, A.; Goryacheva, I. Y.; De Saeger, S. *Trends Analyt. Chem.* **2016**, *83*, 31-48.
- <sup>154</sup> a) Fay, R.; Holland, J. P. *J. Nucl. Med.* **2019**, *60*(5), 587-591. b) Cardinale, J.; Giammei, C.; Jouini, N.; Mindt, T. L. *Radiopharmaceutical Chemistry* **2019**, 449-466.
- <sup>155</sup> Wang, L.; Amphlett, G.; Blätter, W. A.; Lambert, J. M.; Zhang, W. *Protein Sci.* **2005**, *14*, 2436-2446.
- <sup>156</sup> Patil, N. A.; Quek, J.-P.; Schroeder, B.; Morewood, R.; Rademann, J.; Luo, D.; Nitsche, C. *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, *12*, 732-737.
- <sup>157</sup> a) Hang, H. C.; Yu, C.; Kato, D. L.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 14846-14851. b) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 6974-6998.
- <sup>158</sup> Kurmayer, R.; Entfellner, E.; Weisse, T.; Offterdinger, M.; Rentmeister A.; Deng, L. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 2781.

- 
- <sup>159</sup> Pour les ligations à l'aide d'oxime : Bindman, N. A.; van der Donk, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 28, 10362–10371. Pour les ligations entre un maléimide et un thiol : a) Gamage, R. S.; Li, D.-H.; Schreiber, C. L.; Smith, B. D. *ACS Omega* **2021**, *6*, 44, 30130–30139. b) Wu, D.; Cheung, S.; Devocelle, M.; Zhang, L.-J.; Chen, Z.-L.; O'Shea, D. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 16667-16670. Pour les ligations à l'aide d'hydrazones : Xu, Y.; Wang, Y.; Liu, P.; Chu, G.-C.; Xu, H.; Li, Y.-M.; Wang, J.; Shi, J. *Org. Biomol. Chem.*, **2018**, *16*, 7036-7040.
- <sup>160</sup> Porte, K.; Riomet, M.; Figliola, C.; Audisio, D.; Taran, F. *Chem. Rev.* **2021**, *121*(12), 6718-6743.
- <sup>161</sup> Huisgen, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565–598.
- <sup>162</sup> Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- <sup>163</sup> Tornøe, C.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- <sup>164</sup> Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. *Science* **2013**, *340*, 457-460
- <sup>165</sup> a) Agrahari, A.; Bose, P.; Jaiswal, M. K.; Rajkhowa, S.; Singh, A. S.; Hotha, S.; Mishra, N.; Tiwari, V. *Chem. Rev.* **2021**, *121*(13), 7638-7956. b) Ibrahim-Ouali, M.; Dumur, F. *Arkivoc* **2021**, 130-149. c) He, X.-P.; Zeng, Y.-L.; Zang, Y.; Li, J.; Field, R. A.; Chen, G.-R. *Carbohydr. Res.* **2016**, *429*, 1-22.
- <sup>166</sup> Pour des revues d'application de la CuAAC sur peptides : a) Testa, C.; Papini, A. M.; Chorev, M.; Rovero, P. *Curr. Top Med. Chem.* **2018**, *18*(7), 591-610. b) Ahmad Fuaad, A. A. H.; Azmi, F.; Skwarczynski, M.; Toth, I. *Molecules* **2013**, *18*, 13148-13174. c) Hoogstede, F. A. B. M.; Rutjes, F. P. J. T. Applications of the Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC) in Peptides. In *Click Reactions in Organic Synthesis*; Chandrasekaran, S.; Wiley, 2016, 141-159. d) En radiochimie : Kettenbach, K.; Schieferstein, H.; Ross, T. L. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*.
- <sup>167</sup> Böhmer, V. I.; Szyanski, W.; van der Berg, K.-O.; Mulder, C.; Kobauri, P.; Helbert, H.; van der Brom, D.; Reeßing, F.; Huizing, A.; Klopstra, M.; Samplonius, D. F.; Antunes, I. F.; Sijbesma, J. W. A.;

- 
- Luurtsema, G.; Helfrich, W.; Visser, T. J.; Feringa, B. L.; Elsinga, P. H. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 10871-10881.
- <sup>168</sup> Esteouille, L.; Daubeuf, F.; Collot, M.; Riché, S.; Durroux, T.; Brasse, D.; Marchand, P.; Karpenko, J.; Klymchenko, A. S.; Bonnet, D. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 6824-6829.
- <sup>169</sup> Pickens, C. J.; Johnson, S. N.; Pressnall, M. M.; Leon, M. A.; Berkland, C. J. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 686-701.
- <sup>170</sup> Glaser, M.; Solbakken, M.; Turton, D. R.; Pettitt, R.; Barnett, J.; Arukwe, J.; Karlsen, H.; Cuthbertson, A.; Luthra, S. K.; Årstad, E. *Amino acids* **2009**, *37*, 717-724.
- <sup>171</sup> a) Li, S.; Cai, H.; He, J.; Chen, H.; Lam, S.; Tao, C.; Zhu, Z.; Bark, S. J.; Cai, C. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 2315-2322. b) Uchida, K.; Kawakishi, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *138*(2), 659-665.
- <sup>172</sup> a) Brewer, G. J. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *23*, 319-326. b) Kennedy, D. C.; McKay, C. S.; Legault, M. C. B.; Danielson, D. C.; Blake, J. A.; Pegoraro, A. F.; Stolow, A.; Mester, Z.; Pezacki, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17993-18001.
- <sup>173</sup> Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- <sup>174</sup> Wittig, G.; Krebs, A. *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260-3275.
- <sup>175</sup> Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Dommerholt, J.; Dirks, A. T. J.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*(9), 805-815.
- <sup>176</sup> McNitt, C. D.; Popik, V. V. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 8200-8202.
- <sup>177</sup> Campbell-Verduyn, L. S.; Mirfeizi, L.; Schoonen, A. K.; Dierckx, R. A.; Elsinga, P. H.; Feringa, B. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11117 -11120.
- <sup>178</sup> a) Ananias, H. J. K.; de Jong, I. J.; Dierckx, R. A.; van deWiele, C.; Helfrich, W.; Elsinga, P. H. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 3033-3047; b) Smith, C. J.; Volkert, W. A.; Hoffman, T. J. *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30*, 861- 868.

- 
- <sup>179</sup> a) Reile, H.; Armatis, P. E.; Schally, A. V. *Prostate* **1994**, *25*(1), 29-38. b) Staley, J.; Coy, D. H.; Jensen, R. T.; Moody, T. W. *J. Mol. Neurosci.* **1993**, *4*, 29-40.
- <sup>180</sup> Arumugam, S.; Chin, J.; Schirmacher, R.; Popik, V. V.; Kostikov, A. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6987-6991
- <sup>181</sup> Boudjemeline, M.; McNitt, C. D.; Singleton, T. A.; Popik, V. V.; Kostikov, A. P. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 363-366.
- <sup>182</sup> Sachin, K.; Jadhav, V. H.; Kim, E.-M.; Kim, H. L.; Lee, S. B.; Jeong, H.-J.; Lim, S. T.; Sohn, M.-H.; Kim, D. W. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 1680-1686.
- <sup>183</sup> Kim, H. L.; Sachin, K.; Jeong, H.-J.; Choi, W.; Lee, H. S.; Kim, D. W. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 402-407.
- <sup>184</sup> Hausner, S. H.; DiCara, D.; Marik, J.; Marshall, J. F.; Sutcliffe, J. L. *Cancer Res* (2007) *67* (16): 7833-7840
- <sup>185</sup> Murrell, E.; Kovacs, M. S.; Luyt, L. G. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 1625 - 1628.
- <sup>186</sup> Demeter, O.; Fodor, E. A.; Kállay, M.; Mező, G.; Németh, K.; Szabó, P. T.; Kele, P. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 6382 - 6388.
- <sup>187</sup> Gential, G. P. P.; Ho, N. I.; Chiodo, F.; Meeuwenoord, N.; Ossendorp, F.; Overkleeft, H.; van der Marel, G. A.; Filippov, D. V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 3641-3645.
- <sup>188</sup> LeValley, P. J.; Ovadia, E. M.; Bresette, C. A.; Sawicki, L. A.; Maverakis, E.; Bai, S.; Kloxin, A. M. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 6923-6926.
- <sup>189</sup> Narayanam, M. K.; Lai, B. T.; Loredó, J. M.; Wilson, J. A.; Eliassen, A. M.; LaBerge, N. A.; Nason, M.; Cantu, A. L.; Luton, B. K.; Xu, S.; Agnew, H. D.; Murphy, J. M. *Bioconjug. Chem.* **2021**, *32*, 2073-2082.
- <sup>190</sup> Yao, Z.; Wu, X.; Zhang, X.; Xiong, Q.; Jiang, S.; Yu, Z. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 6777-6781.
- <sup>191</sup> Chen, D.; Su, S.-J.; Cao, Y. *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2*, 9565-9578.
- <sup>192</sup> Ravasco, J. M. J. M.; Monteiro, C. M.; Trindade, A. F. *Org. Chem. Front.* **2017**, *4*, 1167-1198.

- 
- <sup>193</sup> Brachet, E.; Belmont, P. *Current Organic Chemistry* **2016**, *20*, 2136-2160.
- <sup>194</sup> a) Pour des revues générales : Oliveira, B. L.; Guo, Z.; Bernardes, G. J. L. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4895-4950. b) Li, Y.; Fu, H. *ChemistryOpen* **2020**, *9*, 835-853. c) Handula, M.; Chen, K.-T.; Seimbille, Y. *Molecules* **2021**, *26*, 4640-4658.
- <sup>195</sup> a) Pour des revues IEDDA en radiochimie : Reiner, T.; Zeglis, B. M. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2014**, *57*, 285-290. b) Mushtaq, S.; Yun, S.-J., Jeon, J. *Molecules* **2019**, *24*, 3567-3596. c) Litau, S.; Seibold, U.; Wängler, B.; Schirmacher, R.; Wängler, C. *ACS Omega* **2018**, *3(10)*, 14039-14053.
- <sup>196</sup> Pagel, M. *J. Pep. Sci.* **2019**, *25*, 3141-3150.
- <sup>197</sup> Li, Z.; Cai, H.; Hassink, M.; Blackman, M. L.; Brown, R. C. D.; Conti, P. S.; J. M. Fox *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8043-8045.
- <sup>198</sup> Selvaraj, R.; Liu, S.; Hassink, M.; Huang, C.-W.; Yap, L.-P.; Park, R.; Fox, J. M.; Li, Z.; Conti, P. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5011-5014.
- <sup>199</sup> Keliher, E. J.; Reiner, T.; Thurber, G. M.; Upadhyay, R.; Weissleder, R. *ChemistryOpen* **2012**, *1*, 177-183.
- <sup>200</sup> Wu, Z.; Liu, S.; Hassink, M.; Nair, I.; Park, R.; Li, L.; Todorov, I.; Fox, J. M.; Li, Z.; Shively, J. E.; Conti, P. S.; Kandeel, F. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54(2)*, 244-251.
- <sup>201</sup> Qiu, L.; Mao, W.; Yin, H.; Tan, H.; Cheng, D.; Shi, H. *Contrast Media Mol. Imaging* **2019**, *2019*, e9182476.
- <sup>202</sup> Liu, S.; Hassink, M.; Selvaraj, R.; Yap, L.-P.; Park, R.; Wang, H.; Chen, X.; Fox, J. M.; Li, Z.; Conti P. S. *Mol. Imaging* **2013**, *12*, 121-128.
- <sup>203</sup> Selvaraj, R.; Giglio, B.; Liu, S.; Wang, H.; Wang, M.; Yuan, H.; Chintala, S. R.; Yap, L.-P.; Conti, P. S.; Fox, J. M.; Li, Z. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 435-442.
- <sup>204</sup> Darko, A.; Wallace S.; Dmitrenko O.; Machovina M. M.; Mehl R. A.; Chin J. W.; Fox, J. M. *Chem Sci.* **2014**, *5*, 3770-3776.

- 
- <sup>205</sup> Wang, M.; Svatunek, D.; Rohlfing, K.; Liu, Y.; Wang, H.; Giglio, B.; Yuan, H.; Wu, Z.; Li, Z.; Fox, J. M. *Theranostics* **2016**, *6*(6), 887-895.
- <sup>206</sup> Knight, J. C.; Richter, S.; Wuest, M.; Way, J. D.; Wuest, F. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 3817-3825
- <sup>207</sup> Brown, S. P.; Smith, A. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 4034-4037.
- <sup>208</sup> Wieczorek, A.; Werther, P.; Euchner, J.; Wombacher, R. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 1506-1510.
- <sup>209</sup> Knorr, G.; Kozma, E.; Schaart, J. M.; Németh, K.; Török, G.; Kele, P. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 1312-1318.
- <sup>210</sup> Egyed, A.; Kormos, A.; Söveges, B.; Németh, K.; Kele, P. *Bioorg. & Med. Chem.* **2020**, *28*, 115218-115223.
- <sup>211</sup> Yip, A. M.-H.; Lai, C. K.-H.; Yiu, K. S.-M.; Lo, K. K.-W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202116078
- <sup>212</sup> Fitzgerald, S.; O'Shea, D. F. *Chem. Eur. J.* **2022**, *28*, e2021041.
- <sup>213</sup> a) Renault, K.; Fredy, J. W.; Renard, P.-Y.; Sabot, C. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 2497-2513. b) Tang, W.; Becker, M. L. *Chem. Soc. Rev.*, 2014, *43*, 7013-7039.
- <sup>214</sup> a) Tang, S.-Y.; Shi, J.; Guo, Q.-X. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 2673-2682. b) Lossouarn, A.; Renault, K.; Bailly, L.; Frisby, A.; Le Nahenec-Martel, P.; Renard, P.-Y.; Sabot, C. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 3874-3887.
- <sup>215</sup> Willems, L. I.; Verdoes, M.; Florea, B. I.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1769 - 1781.
- <sup>216</sup> Jouanno, L.-A.; Chevalier, A.; Sekkat, N.; Perzo, N.; Castel, H.; Romieu, A.; Lange, N.; Sabot, C.; Renard, P.-Y. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 10353-10366.
- <sup>217</sup> Renault, K.; Jouanno, L.-A.; Lizzul-Jurse, A.; Renard, P.-Y.; Sabot, C. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 18522-18531.
- <sup>218</sup> Chu, J. C. H.; Fong, W.-F.; Wong, C. T. T.; Ng, D. K. P. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 2064-2076.

- 
- <sup>219</sup> a) Rideout, D. C.; Breslow, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7816-7817. b) Otto, S.; Engberts, J. B. F. N. *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 1365-1372. c) Moulay, S.; Touati, A. *C. R. Chimie* **2010**, *13*, 1474–1511.
- <sup>220</sup> St. Amant, A. H.; Lemen, D.; Florinas, S.; Mao, S.; Fazenbaker, C.; Zhong, H.; Wu, H.; Gao, C.; Christie, R. J.; Read de Alaniz, J. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 2406–2414.
- <sup>221</sup> a) Blond, G.; Gulea, M.; Mamane, V. *Curr. Org. Chem.* **2016**, *20*, 2161-2210. b) Metzner, P. Thiocarbonyl compounds as specific tools for organic synthesis. In *Organosulfur chemistry I*; Springer, 1999, 127-181. c) Murai, T. *Top. Curr. Chem.* **2018**, *376*.
- <sup>222</sup> Abrunhosa, I.; Gulea, M.; Masson, S. *Synthesis* **2004**, *6*, 928-934.
- <sup>223</sup> Dentel, H.; Chataigner, I.; Lohier, J.-F.; Gulea, M. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 2326-2335.
- <sup>224</sup> Fox, D. L.; Whitely, N. R.; Cohen, R. J.; Salvatore, R. N. *Synlett* **2003**, *13*, 2037-2041.
- <sup>225</sup> Ramesha, A. B.; Sandhya, N. C.; Kumar, C. S. P.; Hiremath, M.; Mantelingu, K.; Rangappa, K. S. *New J. Chem.* **2016**, *40*, 7637-7642.
- <sup>226</sup> Babadzhanova, L. A.; Kirij, N. V.; Yagupolskii J. *Fluor. Chem.* **2004**, *125*, 1095-1098.
- <sup>227</sup> Xu, J.; He, J.; Fan, D.; Tang, W.; Yang, Y. *Macromolecules* **2006**, *39*(11), 3753-3759.
- <sup>228</sup> a) Vyas, D. M.; Hay, G. W. *J. Chem. Soc. D*, **1971**, *21*, 1411-1412. b) Friedrich, J. D. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*(12), 2442-2446. c) Al-Masoudi, N. A.; Al-Soud, Y. A. *J. Carbohydr. Chem.* **2004**, *23*, 111-122.
- <sup>229</sup> a) Laduron, F.; Nyns, C.; Janousek, Z.; Viehe, H. G. *J. Prakt. Chem. Chem. Ztg.* **1997**, *339*(8), 697-707. b) Timoshenko, V. M.; Siry, S. A.; Rozhenko, A. B.; Shermolovich, Y. G. *J. Fluor. Chem.* **2010**, *131*(2), 172-183. c) Siry, S. A.; Shermolovich, Y. G.; Kinzhybalov, V. V.; Bednarchuk, T. J.; Timoshenko, V. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *40*, 5570-5584.
- <sup>230</sup> a) Dentel, H.; Chataigner, I.; Le Cavelier, F.; Gulea, M. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*(46), 6014-6017. b) Dentel, H.; Chataigner, I.; Lohier, J.-C.; Gulea, M. *Tetrahedron* **2012**, *68*(10), 2325-2335.

- 
- <sup>231</sup> Jiang, H.; Cruz, D. C.; Li, Y.; Lauridsen, V. H.; Jørgensen, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5200–5207.
- <sup>232</sup> a) Bastin, R.; Albadri, H.; Gaumont, A.-C.; Gulea, M. *Org. Lett.* **2006**, *8(6)*, 1033-1036. b) Castanheiro, T.; Schoenfelder, A.; Donnard, M.; Chataigner, I.; Gulea, M. *J. Org. Chem.* **2018**, *83(8)*, 4505-4515.
- <sup>233</sup> Pahnke, K.; Haworth, N.; Brandt, J.; Paulmann, Richter, C.; Schimdt, F. G.; Lederer, A.; Coote, M. L.; Barner-Kowollik, C. *Polym. Chem.* **2016**, *7*, 3244-3250.
- <sup>234</sup> a) Sinnwell, S.; Synatschke, C. V.; Junkers, T.; Stenzel, M. H.; Barner-Kowollik, C. *Macromolecules* **2008**, *41(21)*, 7904-7912. b) Wang, Z.; Ma, Z.; Zhang, Z.; Wu, F.; Jiang, H.; Jia, X. *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 6893-6897. c) Preuss, C. M.; Zieger, M. M.; Rodriguez-Emmenegger, C.; Zydzia, N.; Trouillet, V.; Goldmann, A. S.; Barner-Kowollik, C. *ACS Macro Lett.* **2014**, *3*, 1169-1173.
- <sup>235</sup> Oehlenschlaeger, K. K.; Mueller, J. O.; Brandt, J.; Hilf, S.; Lederer, A.; Wilhelm, M.; Graf, R.; Coote, M. L.; Schmidt, F. G.; Barner-Kowollik, C. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 3561-3566.
- <sup>236</sup> Collaboration Bonnet/Gulea ; travaux de effectués en 2018 par Patrick Wagner (PSO).
- <sup>237</sup> Snider, B. B. Methyl Cyanodithioformate. In *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*; Wiley 2001.
- <sup>238</sup> Grisley, D. W., Jr. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 2544.
- <sup>239</sup> Heuzé, B.; Gasparova, R.; Heras, M.; Masson, S. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7327-7331.
- <sup>240</sup> Heras, M.; Gulea, M.; Masson, S. *Chem. Commun.* **2001**, 611-612.
- <sup>241</sup> Heras, M.; Gulea, M.; Masson, S.; Philouze, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 160-172.
- <sup>242</sup> a) Vedejs, E.; Arnost, M. J.; Dolphin, J. M.; Eustache, J. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 2601-2604. b) Vyas, D. M.; Hay, G. W. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1975**, 180-186.
- <sup>243</sup> Sinnwell, S.; Inglis, A. J.; Davis, T. P.; Stenzel, M. H.; Barner-Kowollik, C. *Chem. Commun.* **2008**, 2052-2054.

- 
- <sup>244</sup> Laus, M.; Papa, R.; Sparnacci, K.; Alberti, A.; Benaglia M.; Macciantelli, D. *Macromolecules* **2001**, *34*, 7269–7275.
- <sup>245</sup> Inglis, A. J.; Sinnwell, S.; Stenzel, M. H.; Barner-Kowollik, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2411-2414.
- <sup>246</sup> Oehlenschlaeger, K. K.; Mueller, J. O.; Brandt, J.; Hilf, S.; Lederer, A.; Wilhelm, M.; Graf, R.; Coote, M. L.; Schmidt, F. G.; Barner-Kowollik, C. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 3561-3566.
- <sup>247</sup> Glassner, M.; Delaittre, G.; Kaupp, M.; Blinco, J. P.; Barner-Kowollik, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7274–7277.
- <sup>248</sup> Tischer, T.; Claus, T. K.; Oehlenschlaeger, K. K.; Trouillet, V.; Bruns, M.; Welle, A.; Linkert, K.; Goldmann, A. S.; Börner, H. G.; Barner-Kowollik, C. *Macromol. Rapid Commun.* **2014**, *35*, 1121–1127.
- <sup>249</sup> Beloqui, A.; Mane, S. R.; Langer, M.; Glassner, M.; Bauer, D. M.; Fruk, L.; Barner-Kowollik, C.; Delaittre, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 19951-19955.
- <sup>250</sup> Bulpin, A.; Masson, S. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4507-4512.
- <sup>251</sup> Bulpin, A.; Le Roy-Gourvenec, S.; Masson, S. *Phosphorus, Sulfur, Silicon Relat. Elem.* **1994**, *89*, 119-132.
- <sup>252</sup> Tischer, T.; Goldmann, A. S.; Linkert, K.; Trouillet, V.; Börner, H. G.; Barner-Kowollik, C. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 3853-3864.
- <sup>253</sup> Lebouc, F.; Dez, I.; Gulea, M.; Madec, P.-J.; Jaffrès, P.-A. *Phosphorus, Sulfur, Silicon Relat. Elem.* **2009**, *184(4)*, 872-889.
- <sup>254</sup> Gulea, M., Masson, S. *Top. Curr. Chem.* **2003**, *229*, 161–198.
- <sup>255</sup> Khalil, M.; Jeanne Dit Fouque, D.; Berchel, M.; Fraix, A.; Dupont, A.; Sortino, S.; Memboeuf, A.; Jaffrès, P.-A. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 6392-6396.
- <sup>256</sup> Craig, D.; Lansdell, M. I.; Lewis, S. E. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48(44)*, 7861-7864.

- 
- <sup>257</sup> Huisgen, R.; Grashey, R.; Sauer, J. Cycloaddition reactions of alkenes. In *The Chemistry of alkenes*; Saul Patai; John Wiley & Sons, 2010, pp 741-953.
- <sup>258</sup> Panda, T. K.; Gamer, M. T.; Roesky, P. W. *Organometallics* **2003**, *22*, 877-878.
- <sup>259</sup> a) Jones, W.; Griffiths, K.; Barata, P. C.; Paller, C. J. *Cancers* **2020**, *12*, 1367-1381. b) Ng, T. S. C.; Gao, X.; Salari, K.; Zlatev, D. V.; Heidari, P.; Kamran, S. C. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, e722277. c) Woo, S.; Ghafoor, S.; Becker, A. S.; Han, S.; Wibmer, A. G.; Hedvig, H.; Burger, I. A.; Schöder, H.; Vargas, H. A. *Eur. J. Hybrid Imaging* **2020**, *4*(16).
- <sup>260</sup> Zhou, J.; Neale, J. H.; Pomper, M. G.; Kozikowski, A. P. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2005**, *4*, 1015-1026.
- <sup>261</sup> Hennrich, U.; Eder, M. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*(8), 713-724.
- <sup>262</sup> Pan, K.-H.; Wang, J.-F.; Wang, C.-Y.; Nikzad, A. A.; Kong, F. Q.; Jian, L.; Zhang, Y.-Q.; Lu, X.-M.; Xu, B.; Wang, Y.-L.; Chen, M. *Front. Oncol.* **2021**, *10*, e597422.
- <sup>263</sup> Sartor, O.; de Bono, J.; Chi, K. N.; Fizazi, K.; Herrmann, K.; Rahbar, K.; Tagawa, S. T.; Nordquist, L. T.; Vaishampayan, N.; El-Haddad, G.; Park, C. H.; Beer, T. M.; Armour, A.; Pérez-Contreras, W. J.; DeSilvio, M.; Kpamegan, E.; Gericke, G.; Messmann, R. A.; Morris, M. J.; Krause, B. J. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 1091-1103.
- <sup>264</sup> Kratochwil, C.; Giesel, F. L.; Stefanova, M.; Benesova, M.; Bronzel, M.; Afshar-Oromieh, A.; Mier, W.; Eder, M.; Kopka, K.; Haberkorn, U. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57*, 1170-1176.
- <sup>265</sup> Jackson, P. F.; Cole, D. C.; Slusher, B. S.; Stetz, S. L.; Ross, L. E.; Donzanti, B. A.; Trainor, D. A. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 619-622.
- <sup>266</sup> Brelje, T. C.; Wessendorf, M. W.; Sorenson, R. L. *Methods Cell Biol.* **2002**, *20*, 165-244.
- <sup>267</sup> Smith, S. N.; Steer, R. P. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2001**, *139*, 151-156.
- <sup>268</sup> Karpenko, I. A.; Klymchenko, A. S.; Gioria, S.; Kreder, R.; Shulov, I.; Villa, P.; Mély, Y.; Hibert, M.; Bonnet, D. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 2960-2963.

- 
- <sup>269</sup> Pour la fluorescéine, voir : a) Breen, C. J.; Raverdeau, M.; Voorheis, P. H. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25769.  
b) Hedhli, J.; Czerwinski, A.; Schuelke, M.; Płoska, A.; Sowinski, P.; La Hood, L.; Mamer, S. B.; Cole, J. A.; Czaplewska, P.; Banach, M.; Dobrucki, I. T.; Kalinowski L.; Imoukhuede, P.; Dobrucki, L. W. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 3185. Pour la lissamine Rhodamine B, voir : a) Wang, W.; Zhang, Y.; Zhao, H.; Zhuang, X.; Wang, H.; He, K.; Xu, W.; Kang, Y.; Chen, S.; Zeng, S.; Qian, L. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 13477-13482;  
b) Loison, S.; Cottet, M.; Orcel, H.; Adihou, H.; Rahmeh, R.; Lamarque, L.; Trinquet, E.; Kellenberger, E.; Hibert, M.; Durroux, T.; Mouillac, B.; Bonnet, D. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8588–8602.
- <sup>270</sup> Hemmer, E.; Benayas, A.; Légaré, F.; Vetrone, F. *Nanoscale Horiz.* **2016**, *1*, 168-184.
- <sup>271</sup> O'Dowd, B. F.; Heiber, M.; Chan, A.; Heng, H. H. Q.; Tsui, L.-C.; Kennedy, J. L.; Shi, X.; Petronis, A.; George, S. R.; Nguyen, T. *Gene* **1993**, *136(1–2)*, 355–360.
- <sup>272</sup> Tatemoto, K.; Hosoya, M.; Habata, Y.; Fujii, R.; Kakegawa, T.; Zou, M.-X.; Kawamata, Y.; Fukusumi, S.; Hinuma, S.; Kitada, C.; Kurokawa, T.; Onda, H.; Fujino, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *251(2)*, 471–476.
- <sup>273</sup> Iturrioz X.; Alvear-Perez R.; De Mota N.; Franchet C.; Guillier F.; Leroux V.; Dabire H.; Le Jouan M.; Chabane H; Gerbier R.; Bonnet D.; Berdeaux A.; Maignret B.; Galzi J.; Hibert M.; Llorens-Cortes C. *FASEB J.* **2010**, *24*, 1506–1517.
- <sup>274</sup> Japp, A. G.; Cruden, N. L.; Amer, D. A.; Li, V. K.; Goudie, E. B.; Johnston, N. R.; Sharma, S.; Neilson, I.; Webb, D. J.; Megson, I. L.; Flapan, A. D.; Newby, D. E. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2008**, *52*,908-913.
- <sup>275</sup> a) Brailoiu, G. C.; Dun, S. L.; Yang, J.; Ohsawa, M.; Chang, J. K.; Dun, N. J. *Neurosci. Lett.* **2002**, *327(3)*, 193-197. b) De Nota, N.; Lenkei, Z.; Llorens-Cortès, C. *Neuroendocrinology* **2000**, *72*, 400-407.
- <sup>276</sup> Lv, S.-Y.; Cui, B.; Chen, W.-D.; Wang, Y.-D. *Oncotarget* **2017**, *8*, 112145-112151.
- <sup>277</sup> Huang, Z.; Wu, L.; Chen, L. *J. Cell. Physiol.* **2017**, *233(5)*, 3892-3900.
- <sup>278</sup> Azizi, M.; Iturrioz, X.; Blanchard, A.; Peyrard, S.; De Mota, N.; Chartrel, N.; Vaudry, H.; Corvol, P.; Llorens-Cortès, C. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2008**, *19*, 1015-1024.

- 
- <sup>279</sup> Ashley, E. A.; Powers, J.; Chen, M.; Kundu, R.; Finsterbach, T.; Caffarelli, A.; Deng, A.; Eichhorn, J.; Mahajan, R.; Agrawal, R.; Greve, J.; Robbins, R.; Patterson, A. J.; Bernstein, D.; Quertermous, T. *Cardiovasc. Res.* **2005**, *65*, 73-82.
- <sup>280</sup> Hu, H.; He, L.; Li, L.; Chen, L. *Mol. Genet. Metab.* **2016**, *119*(1-2), 20-27.
- <sup>281</sup> Wang, L.-Y.; Zhang, D.-L.; Zheng, J.-F.; Zhang, Y.; Zhang, Q.-D.; Liu, W.-H. *Peptides* **2011**, *32*, 2436–2443.
- <sup>282</sup> Margathe, J.-F.; Iturrioz, X.; Regenass, P.; Karpenko, I. A.; Humbert, N.; de Rocquigny, H.; Hibert, M.; Llorens-Cortes, C.; Bonnet, D. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 1399-1405.
- <sup>283</sup> Demas, J. N.; Crosby, G. A. *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 991-1024.
- <sup>284</sup> Valencia, C.; Dujet, C.; Margathe, J.-F.; Iturrioz, X.; Roux, T.; Trinquet, E.; Villa, P.; Hibert, M.; Dupuis, E.; Llorens-Cortes, Bonnet, D. *ChemMedChem* **2017**, *12*(12), 925-931.
- <sup>285</sup> Beal, D. M.; Jones, L. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2–9.
- <sup>286</sup> Knall, A.-C.; Hollauf, M.; Saf, R.; Slugovc, C. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 10576-10580.
- <sup>287</sup> Yokoi, T.; Ueda, T.; Tanimoto, H.; Morimoto, T.; Kakiuchi, K. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 1891-1894.
- <sup>288</sup> Knall, A.-C.; Slugovc, C. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5131-5142.
- <sup>289</sup> Kumar, R. A.; Pattanayak, M. R.; Yen-Pon, E.; Elyian, J.; Porte, K.; Bernard, S.; Riomet, M.; Thuéry, P.; Audisio, D.; Taran, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*(41), 14544-14548.
- <sup>290</sup> Pantin, M.; Caillé, J.; Boeda, F.; Fontaine, L.; Pearson-Long, M. S. M.; Bertus, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, *44*, 7359-7366.
- <sup>291</sup> Viault, G.; Dautrey, S.; Maindron, N.; Hardouin, J.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2693-2705.
- <sup>292</sup> Fujiki, K.; Yano, S.; Ito, T.; Kumagai, Y.; Murakami, Y.; Kamigaito, O.; Haba, H.; Tanaka, K. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1912.

- 
- <sup>293</sup> Ogura, A.; Tahara, T.; Nozaki, S.; Morimoto, K.; Kizuka, Y.; Kitazume, S.; Hara, M.; Kojima, S.; Onoe, H.; Kurbangalieva, A.; Taniguchi, N.; Watanabe, Y.; Tanaka, K. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21797.
- <sup>294</sup> Yamazaki, C. M.; Yamaguchi, A.; Anami, Y.; Xiong, W.; Otani, Y.; Lee, J.; Ueno, N. T.; Zhang, N.; An, Z.; Tsuchikama, K. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3528.
- <sup>295</sup> Neves, A. A.; Stöckmann, H.; Wainman, Y. A.; Kuo, J. C-H.; Fawcett, S.; Leeper, F. J.; Brindle, K. M. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 934–941.
- <sup>296</sup> Fernández de la Pradilla, R.; Tortosa, M.; Castellanos, E.; Baile, R. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*(5), 1517-1533.
- <sup>297</sup> a) Heidel, K. M.; Dowd, C. S. *Future Med. Chem.* **2019**, *11*, 1625-1643. b) Sevrain, C. M.; Berchel, M.; Couthon, H.; Jaffrès, P.-A. *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 2186–2213.
- <sup>298</sup> a) Gulea, M. Progress in the Chemistry of Phosphorotioates. In *Advances in Organic Synthesis; Bentham Science*; 2018, pp 117-150.; Jones, D. J.; O’Leary, E. M.; O’Sullivan, T. P. *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362*, 2801–2846
- <sup>299</sup> Nicolaou, K. C.; Estrada, A. A.; Zak, M.; Lee, S. H.; Safina, B. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1378 –1382.
- <sup>300</sup> Steinebach, C.; Dora Ng, Y. L.; Sosič, I.; Lee, C.-S.; Chen, S.; Lindner, S.; Vu, L. P.; Bricelj, A.; Haschemi, R.; Monschke, M.; Steinwarz, E.; Wagner, K. G.; Bendas, G.; Luo, J.; Gütschow, M.; Krönke, J. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 3474-3486.
- <sup>301</sup> Paulen, A.; Gasser, V.; Hoegy, F.; Perraud, Q.; Pesset, B.; Schalk, I. J.; Mislin, G. L. A. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 11567-11579.
- <sup>302</sup> Maujean, T.; Chataigner, I.; Girard, N.; Gulea, M.; Bonnet, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, *47*, 7385-7395.
- <sup>303</sup> Gaussian 09, Revision D.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Men- nucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K.

---

Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

<sup>304</sup> Modified procedure from: D. L. Fox, N. R. Whately, R. J. Cohen, R. N. Salvatore, *Synlett* 2003, **13**, 2037-2041.

<sup>305</sup> Modified procedure from: D. L. Fox, N. R. Whately, R. J. Cohen, R. N. Salvatore, *Synlett* 2003, **13**, 2037-2041.

<sup>306</sup> Gillard, R. M.; Fernando, J. E. M.; Lupton, D. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 4712-4716.

<sup>307</sup> Texier, I.; Goutayer, M.; Da Silva, A.; Guyon, L.; Djaker, N.; Josserand, V.; Neumann, E.; Bibette, J.; Vinet, F. Cyanine-Loaded Lipid Nanoparticles for Improved in Vivo Fluorescence Imaging. *J. Biomed. Opt.* **2009**, *14*, 054005.

<sup>308</sup> Cheng, Y.; Prusoff, W. H. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108.



## Développement et applications de réactions d'hétérocycloaddition pour la diversification structurale et le marquage de molécules à visée thérapeutique

### Résumé

Lors de cette thèse, nous avons conçu et développé de nouvelles approches basées sur des réactions d'hétérocycloaddition pour la diversification structurale et le marquage de molécules à visées thérapeutique et diagnostique. Nous avons d'abord appliqué la réaction de Povarov à la diversification du squelette aza-dicétopipérazine, une famille de *N*-hétérocycles sous-représentés dans la littérature. Une vingtaine de structures tétracycliques originales ont été obtenues sous la forme de paires séparables de diastéréoisomères. Par la suite, des aza-dicétopipérazines analogues de dicétopipérazines bioactives ont également été synthétisées dans le but d'identifier des activités biologiques au sein de cette nouvelle famille d'hétérocycles. Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à l'utilisation d'une réaction de thia-Diels-Alder impliquant un phosphonodithioester et un diène exocyclique hautement réactif pour le marquage chimiosélectif de peptides. Cette cycloaddition s'est montrée rapide et efficace nous permettant de l'utiliser avec succès sur différents peptides pour des applications en imagerie nucléaire (Tomographie par Emission de Positons,  $^{18}\text{F}$ ) et en imagerie optique (fluorophores). Enfin, différentes stratégies « double click » impliquant cette réaction de thia-Diels-Alder ont été étudiées et ont montré des résultats encourageants.

### Résumé en anglais

During this thesis, we designed and developed new strategies based on heterocycloaddition reactions for the structural diversification and the labelling of molecules with therapeutic and diagnostic applications. We first applied the Povarov reaction to the diversification of the aza-diketopiperazine scaffold, a family of *N*-heterocycles scarcely represented in the literature. Around twenty original tetracyclic structures were obtained as pairs of separable diastereomers. We then aimed to discover biological activities amongst these *N*-heterocycles by synthesising aza-diketopiperazine-analogues of bioactive diketopiperazines. In a second part, we focused on the application of a thia-Diels-Alder reaction involving a phosphonodithioester and a highly reactive exocyclic diene to the chemoselective labelling of peptides. This reaction was fast and efficient which led to its successful use on several peptides with fluorine-18 for *in vivo* Positron Emission Tomography (PET) or fluorophores for *in cellulo* optical imaging. Finally, a couple a “double click” strategies involving our thia-Diels-Alder reaction were studied and showed promising preliminary results.