UNIVERSITE PAUL VERLAINE - METZ

THESE

Soutenue
Le 3 septembre 2008

en vue de l'obtention du

Grade de DOCTEUR
De l'Université Paul Verlaine - Metz

Mention : Chimie Organique

Par
Elodie-Denise CHENOT

Développement de nouvelles sondes photoactivables pour la caractérisation des cibles cellulaires du glutathion

MEMBRES DU JURY

Rapporteurs

M. Goeldner : Professeur à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg

B. Rousseau : Directeur de Recherche au CEA de Gif sur Yvette

Examinateurs

R. Schneider : Professeur à l'Université Henri Poincaré de Nancy

S. Gérard : Maître de conférences à l'Université de Reims Champagne-Ardenne

E. Battaglia : Maître de conférences à l'Université Paul Verlaine de Metz

C. Lecomte : Professeur à l'Université Henri Poincaré de Nancy (Membre invité)

G. Kirsch : Professeur à l'Université Paul Verlaine de Metz (Membre invité)

A. Comel : Maître de conférences à l'Université Paul Veraline de Metz (Directeur de Thèse)



AVERTISSEMENT

Cette thèse est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et disponible à l'ensemble de la communauté universitaire élargie.
Elle est soumise à la propriété intellectuelle de l'auteur au même titre que sa version papier. Ceci implique une obligation de citation, de référencement dans la rédaction de tous vos documents.
D'autre part, toutes contrefaçons, plagiats, reproductions illicites entraînent une poursuite pénale.
Enfin, l'autorisaton de diffusion a été accordée jusqu' à nouvel ordre.

- Contact SCD Metz : daniel.michel@scd.univ-metz.fr

Ecrire au doctorant:

Code de la Proriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Proriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique
LIMBP

UNIVERSITE PAUL VERLAINE - METZ

paul verlaine université - metz
ufr sciences fondamentales et appliquées

THESE

Soutenue
Le 3 septembre 2008

en vue de l'obtention du

Grade de DOCTEUR
De l'Université Paul Verlaine - Metz

Mention : Chimie Organique

Par
Elodie-Denise CHENOT

Développement de nouvelles sondes photoactivables pour la caractérisation des cibles cellulaires du glutathion

---

MEMBRES DU JURY

Rapporteurs

M. Goeldner : Professeur à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg
B. Rousseau : Directeur de Recherche au CEA de Gif sur Yvette

Examinateurs

R. Schneider : Professeur à l'Université Henri Poincaré de Nancy
S. Gérard : Maître de conférences à l'Université de Reims Champagne-Ardenne
E. Battaglia : Maître de conférences à l'Université Paul Verlaine de Metz
C. Lecomte : Professeur à l'Université Henri Poincaré de Nancy (Membre invité)
G. Kirsch : Professeur à l'Université Paul Verlaine de Metz (Membre invité)
A. Comel : Maître de conférences à l'Université Paul Veraline de Metz (Directeur de Thèse)

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique de l'Université Paul Verlaine de Metz sous la direction du Docteur Alain Comel.

Je tiens à exprimer ma gratitude au Professeur Gilbert Kirsch pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, m'avoir soutenue, aidée et conseillée dans mes démarches.

Je tiens également à exprimer ma gratitude au Docteur Alain Comel ainsi qu'au Docteur Eric Battaglia pour m'avoir guidée tout au long de mes recherches.

Je remercie Messieurs Maurice Goeldner, Professeur à l'Université Louis Pateur de Strasbourg, et Bernard Rousseau, Directeur de Recherche au CEA de Gif sur Yvette, pour avoir accepté de juger ce travail et m'honorer de leur présence.

Je remercie également Messieurs Raphaël Schneider, Professeur à l'Université Henri Poincaré de Nancy et Stéphane Gérard, Maître de conférences à l'Université de Reims Champagne-Ardenne pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant de faire partie de ce jury.

Je remercie Messieurs Claude Lecomte, Professeur à l'Université Henri Poincaré de Nancy et Gilbert Kirsch, Professeur de l'Université Paul Verlaine de Metz, pour avoir soutenu ce projet et pour avoir accepté d'être membre de ce jury.

Merci à Veronique Poddig, Benoit Maunit et Paul Hannewald, trois spécialistes des analyses, sans qui ce travail n'aurait pu se faire.

Un merci tout particulier à mes camarades de route, et souvent de cœur, le Matelot et Aïcha (à qui je souhaite beaucoup de bonheur), Stéph E., Geoffroy, mais aussi Stéphanie H., Pergaud, Tom, Agathe, Fabien, Juan, David, Eric, Cyril, Stéph R., Julie, mais aussi à l'équipe de biologistes qui m'a toujours bien accueilli.

Je tiens également à remercier sincèrement Pierre Seck, Professeur à l'Université de Luxembourg, pour avoir toujours été présent même- et surtout- dans l'urgence.

Un immense merci à tous mes proches pour avoir toujours cru en moi et avoir été à mes côtés dans mes déceptions et mes joies. A travers ce manuscrit, je tiens également à les féliciter de m'avoir supporté tout au long de cette thèse, de l'avoir toujours fait et de continuer à le faire.

Sommaire

Remerciements i

Sommaire iii

Liste des Schémas vii

Liste des Tableaux vii

Liste des Figures viii

Liste des Annexes viii

Liste des Abréviations ix

Introduction 3

Chapitre I : Le Glutathion 9

1. Qu'est ce que le glutathion ? 9
2. Métabolisme du glutathion 11
3. Principaux rôles du glutathion 13
   3.1. Agent antioxydant 13
   3.2. Agent de détoxication 15
4. Glutathion et apoptose 17
5. Glutathion et lutte contre le cancer 19

Chapitre II : Le marquage par photoaffinité 23

1. Principe et utilisation de la technique de marquage par photoaffinité 23
2. Les principaux groupements photoactivables 26
   2.1. Azotures/Azotures aromatiques 27
   2.2. Diazirines 28
   2.3. Benzophénones 29
3. Les principales ligations pour la détection des protéines 31
4. Structure trifonctionnelle 34
   4.1. Fixation du glutathion sur la sonde 34
   4.2. Choix du groupement photoactivable 35
   4.3. Groupement pour la détection 36
   4.4. Construction de notre première sonde 37
5. Stratégie et étapes du projet 37

Chapitre III : Synthèse de la molécule trifonctionnelle possédant le motif benzophénone 41

1. Rétrosynthèse de la structure trifonctionnelle A 41
2. Tests de résistance du groupement pour la détection 42
   2.1. Synthèse d'une molécule bifonctionnelle 42
      2.1.1. Formation du motif benzophénone 43
      2.1.2. Introduction d'un halogène 44
      2.1.3. Substitution nucléophile 45
   2.2. Test de résistance aux irradiations de l'azoture aliphatique 46

3. Synthèse du monoester méthylique de l'acide téréphtalique 47
3.1. Bibliographie 47
3.2. Différentes voies de synthèse envisagées 48
3.3. Généralisation de la méthode 51

4. Synthèse de la structure trifonctionnelle A 53
4.1. Voie directe 53
4.1.1. Formation du motif photoactivable 53
4.1.2. Formation de l'ester activé pour le couplage au glutathion 53
4.1.3. Formation de l'azoture de méthylène pour la détection 55
4.1.3.1. Bromation radicalaire 55
4.1.3.2. Substitution nucléophile 55
4.2. Essais de séparation 56
4.3. Nouvelle voie de synthèse 61
4.4. Schéma récapitulatif de la synthèse de la molécule cible **A** 64

Partie expérimentale ***65***

Chapitre IV : Étude du remplacement d'un (ou deux) groupement(s) phényle du motif benzophénone par un (ou deux) groupement(s) thiényle ***91***

1. Élaboration de nouvelles structures trifonctionnelles 93

2. Molécules bifonctionnelles 95
2.1. Synthèse des molécules bifonctionnelles 95
2.1.1. Formation du motif photoactivable 95
2.1.2. Introduction d'un halogène 96
2.1.3. Substitution nucléophile 96
2.2. Évaluation des structures bifonctionnelles 97
2.2.1. Analyses photophysiques 97
2.2.1.1. Spectres UV 97
2.2.1.2. Tests d'irradiation UV 98
2.2.2. Analyses biologiques 101
2.2.2.1. Les GST 101
2.2.2.2. Tests d'inhibition 103
2.2.2.3. Essais de photomarquage 105
2.2.2.3.1. Essais de photomarquage avec la GST purifiée de foie de rat 105
2.2.2.3.2. Essais de photomarquage avec la $GSTP_{1-1}$ recombinante humaine purifiée 107
2.2.2.4. Étude complémentaire 109

3. Rétrosynthèse des nouvelles structures trifonctionnelles 110

4. Synthèse de l'acide 5-(méthoxycarbonyl)-2-thiophène carboxylique 111
4.1. Bibliographie 111
4.2. Synthèse de l'acide 5-(méthoxycarbonyl)thiophène-2-carboxylique 113
4.2.1. Première voie de synthèse 113
4.2.1.1. Synthèse du 2,5-dibromothiophène 113
4.2.1.2. Synthèse de l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique 114
4.2.2. Seconde voie de synthèse 114
4.2.2.1. Synthèse de l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique 114
4.2.2.2. Synthèse du diester méthylique de l'acide 2,5-thiophènedicarboxylique 114
4.2.3. Troisième voie de synthèse 115
4.3. Synthèse de diesters et monoesters de l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique 116

5. Synthèses des structures trifonctionnelles B, C et D 118
5.1. Préparation des analogues de la benzophénone 118

5.2. Bromation radicalaire 119
5.3. Formation de l'éther 119
5.4. Saponification 119
5.5. Formation des composés bromés (purs) 119
5.6. Introduction de la fonction azoture 120
5.7. Estérification 120

Partie expérimentale ***123***

Chapitre V : Couplage au glutathion ***157***

1. Couplage sur le glutathion réduit 158
2. Couplage sur le glutathion oxydé 159
3. Couplage sur le glutathion S-modifié 160
4. Synthèse des dérivés photoactivables du glutathion 161
4.1. Synthèse du glutathion S-trityle 161
4.2. Couplages sur l'amine libre 162
4.2.1. Essais de conditions 162
4.2.2. Essais de clivage du groupement protecteur de la fonction thiol 165
4.3. Réalisation des couplages sur les molécules cibles **A**-**D** 167
4.3.1. Couplage sur l'amine libre 167
4.3.2. Déprotection 168
5. Tests biologiques sur les molécules obtenues 168

Partie expérimentale ***171***

Chapitre VI : Méthode de détection ***189***

1. Détection par Chimiluminescence 191
1.1. Qu'est ce que la chimiluminescence ? 191
1.2. Utilisation de l'affinité biotine-streptavidine 193
1.3. Ligation de Staudinger 194
1.3.1. Qu'est ce que la ligation de Staudinger ? 194
1.3.1.1. Historique 194
1.3.1.2. Principe et mécanisme 195
1.3.1.3. Évolution de la réaction 196
1.3.1.4. Applications 198
1.3.2. Mise en œuvre de la ligation de Staudinger : synthèse du dérivé phosphoré 199
1.3.2.1. Utilisation de phosphinothiol 200
1.3.2.2. Synthèse de l'*o*-diphénylphosphinebenzènethiol 201
1.3.2.3. Synthèse de l'*o*-diphénylphosphinephénol 202
1.3.3. Couplage à la biotine 204
1.3.4. Essais avec une molécule test 204
1.4. Réaction de "Click Chemistry" 205
1.4.1. Qu'est ce que la "Click Chemistry" ? 205
1.4.1.1. Historique 205
1.4.1.2. Principe 206
1.4.1.3. Mécanisme 209
1.4.1.4. Limitations 210
1.4.1.5. Applications 211
1.4.2. Synthèse de la biotine modifiée 212
1.4.3. Essais avec les molécules bifonctionnelles 213

2. Détection par Fluorescence 215
2.1. Qu'est ce que la fluorescence ? 215
2.1.1. Principe de la fluorescence 215
2.1.2. Choix du fluorophore 216
2.2. Synthèse des chromophores fluorescents 217
2.2.1. Les coumarines 217
2.2.1.1. Le choix des coumarines 217
2.2.1.2. Synthèse des dérivés de coumarines 218
2.2.1.3. Couplage par Click Chemistry - Essais préliminaires 220
2.2.1.3.1. Essais avec les structures bifonctionnelles 220
2.2.1.3.2. Essais avec une structure trifonctionnlle 222
2.2.1.4. Propriétés fluorescentes 222
2.2.2. La fluorescéine 223
2.2.2.1. Synthèse des dérivés de fluorescéine 223
2.2.2.2. Couplage par Click Chemistry 225
2.2.2.3. Essais préliminaires de photomarquage et de détection 225

Partie expérimentale ***229***

Conclusions et Perspectives ***261***

Bibliographie ***263***

ANNEXES ***271***

Liste des Schémas

Schéma 1 : Cycle rédox du glutathion 12
Schéma 2 : Espèces réactives de l'oxygène 14
Schéma 3 : Détoxication par le glutathion des xénobiotiques par conjugaison et formation d'un dérivé de l'acide mercapturique 16
Schéma 4 : a. Affinité entre deux espèces b. Marquage par photoaffinité c. Les trois niveaux d'analyse 24
Schéma 5 : Espèces formées lors de l'irradiation d'azoture aromatiques 27
Schéma 6 : Espèces formées lors de l'irradiation des diazirines 28
Schéma 7 :Réaction d'une diazirine en présence d'une amine 29
Schéma 8 : Formation et réactivité des radicaux formés par irradiation UV 29
Schéma 9 : Réactivité du motif benzophénone selon Dorman et Prestwich 30
Schéma 10 : Différents types de ligations : A)Principe de la Native Chemical Ligation (NCL); 33
Schéma 11 : Schéma rétrosynthétique de la molécule A 41
Schéma 12: Schéma synthétique de la molécule test (3) 42
Schéma 13 : Mécanisme réactionnel d'une acylation de type Friedel-Crafts 44
Schéma 14 : Formation de di- et mono-esters de l'acide téréphtalique 51
Schéma 15 : Nouvelle voie de synthèse envisagée pour la synthèse de A 61
Schéma 16 : Séparation rendue possible par le passage par un éther 62
Schéma 17 : Voie de synthèse de la molécule cible A 64
Schéma 18 : Voie de synthèse générale des molécules tests 95
Schéma 19 : Rétrosynthèse générale des molécules cibles 110
Schéma 20 : Méthode de caractérisation utilisée par Birkinshaw et Chaplen pour identifier le produit naturel volatil issu d'un champignon du genévrier en décomposition 112
Schéma 21 : Voie de synthèse pour former l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique 112
Schéma 22 : Généralisation de la méthode de synthèse de diesters et monoesters de l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique 116
Schéma 23 : Voie de synthèse des molécules A, B, C et D 118
Schéma 24 : Résultats obtenus par D. Bernardi en utilisant la synthèse de Karwatsky 158
Schéma 25 : Déprotection du groupement trityle 160
Schéma 26 : Schéma simplifiée de la séparation et la détection sélective des protéines 190
Schéma 27 : Réaction du luminol en présence de peroxyde d'hydrogène 192
Schéma 28 : Méthodes envisagées pour l'introduction de la biotine 193
Schéma 29 : Mécanisme de la réaction de Staudinger entre une phosphine tertiaire et un azoture 195
Schéma 30 : Mécanisme de la ligation de Staudinger utilisant le dérivé phosphoré 196
Schéma 31 : Voie de synthèse des dérivés phosphorés pour la ligation de Staudinger 196
Schéma 32 : Mécanisme de la ligation de Staudinger "traceless" 197
Schéma 33 : Ligation peptidique par la réaction de Staudinger 200
Schéma 34 : Formation du motif 1,2,3-triazole 206
Schéma 35 : Formation du 1,2,3-triazole 1,4- ou 1,5-disubstitué 207
Schéma 36 : Formation "one-pot" de l'azoture puis du 1,2,3-triazole 208
Schéma 37 : Mécanisme réactionnel de Click Chemistry catalysée par le cuivre 209
Schéma 38 : Synthèse du dérivé de fluorescéine selon Chen et al[186]. 223

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Diestérification de l'acide téréphtalique 51
Tableau 2 : Monosaponification de diester de l'acide téréphtalique 52
Tableau 3 : Mesures d'absorbtion des structures bifonctionnelles 97
Tableau 4 : Diestérification de l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique 116
Tableau 5 : Monosaponification de diester de l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique 116
Tableau 6 : Résultats du couplage des structures trifonctionnelles sur le S-trityl glutathion 167
Tableau 7 : Formation des coumarines de départ 219
Tableau 8 : Rendements obtenus lors des essais de réaction de Click Chemitry 220

Liste des Figures

Figure 1 : Structure du glutathion réduit (GSH) et du dimère, le glutathion oxydé (GSSG) *10*
Figure 2 : Cycle de la biosynthèse et de la dégradation du glutathion au niveau cellulaire *11*
Figure 3 : Mécanisme moléculaire simplifié de l'apoptose *18*
Figure 4 : Chronologie reportant la date de première utilisation de différents groupements *26*
Figure 5 : Représentation schématique de notre sonde *34*
Figure 6 : Formation de la liaison covalente sous irradiation UV *35*
Figure 7 : Représentation simplifiée de la migration sur gel d'électrophorèse *36*
Figure 8 : Structure trifonctionnelle *37*
Figure 9 : Acide 4-(méthoxycarbonyl)benzoique *47*
Figure 10 : Téréphtalate de dibenzyle *49*
Figure 11 : Mécanisme réactionnel d'estérification en présence de DCC *54*
Figure 12 : Différents motifs photosensibles décrits dans la littérature *91*
Figure 13 : Structures des analogues de l'acide thioprofènique, du suprofène et du tométin *92*
Figure 14 : Spectre de la benzophénone dans le cyclohexane et dans l'éthanol[86] *92*
Figure 15 : Spectre expérimental de la benzophénone dans le chloroforme *92*
Figure 16 : Nouvelles structures trifonctionnelles *94*
Figure 17 : Structure bifonctionnelles (molécules tests) *94*
Figure 18 : Exemple de chromatogramme obtenu pour la molécule 1a *99*
Figure 19 : Taux de conversion des composés 1 après irradiation laser à 365nm pendant 1min *99*
Figure 20 : Taux de conversion des composés 3a et 3d après irradiation laser à 365nm pendant 1min *100*
Figure 21 : Acide éthacrinique (EA) *102*
Figure 22 : Structure de l'inhibiteur TLK199 ..... *102*
Figure 23 : Inhibition de l'activité enzymatique de la $GSTP_{1-1}$ recombinante humaine purifiée par 3a-d *104*
Figure 24 : Photomarquage les molécules 3a-d avec la GST purifiée de foie de rat *106*
Figure 25 : Interprétations des résultats de photomarquage pour 3d *106*
Figure 26 : Inhibition irréversible de l'activité enzymatique de la $GSTP_{1-1}$ *107*
Figure 27 : Mise en évidence de l'absence d'influence de l'irradiation UV et du DMSO sur l'inhibition *108*
Figure 28 : Inhibition irréversible sur la $GSTP_{1-1}$ recombinante humaine purifiée de 3d à 0,2mM et 0,5mM pendant 30min *108*
Figure 29 : Cinétique d'inhibition de la $GSTP_{1-1}$ recombinante humaine purifiée par 3d *109*
Figure 30 : Acide 5-(méthoxycarbonyl)-2-thiophènique *111*
Figure 31 : Structure des esters pour les essais de couplage au glutathion *163*
Figure 32 : Les différents phénomènes de luminescence *191*
Figure 33 : Structures des phosphines utilisées pour la ligation "traceless" *198*
Figure 34 : Rétrosynthèse du couplage de la biotine sur les structures trifonctionnelles *200*
Figure 35 : RMN ^{31}P du composé obtenu (a) après simple évaporation du solvant, (b) pendant le lavage basique (c) après traitement total *203*
Figure 36 : Structure de la TBTA et de la bathophenanthroline sulfanatée *210*
Figure 37 : Structure générale des tris(2-benzimidazolylmethyl)amines *211*
Figure 38 : Diagramme simplifié de Jablonski *215*
Figure 39 : Préparation des hydroxycoumarines *218*
Figure 40 : Réaction de Click Chemistry entre les structures *221*
Figure 41 : Détection par fluorescence du gel d'électrophorèse après photomarquage de l'ASB et de la GST Pi par le composé 52a *226*

Liste des Annexes

Annexe 1 : Données pour les Parties expérimentales *273*
Annexe 2 :Tests de révélation des groupements fonctionnels *277*
Annexe 3 : Mode opératoire pour réaliser les tests d'inhibition - Essais de marquage par photoaffinité de l'albumine (ASB) et de la $hGSTP_{1-1}$ avec le composé 52a *281*
Annexe 4 : Autres dérivés photoactivables du S-trityl glutathion *285*
Annexe 5 : Publications *295*

Liste des Abréviations

A

ADP : adénosine diphosphate
AIBN : α,α'-azodiisobutyronitrile
ATP : adénosine triphosphate

B

Boc : *tert*-butoxycarbonyl
BP : benzophénone
BtH : 1,2,3-benzotriazole
Bu : butyl
Bz : benzoyl

C

calc. : calculé
cat.: catalytique
CCM : chromatographie sur couche mince
CDI : *N,N'*-carbonyldiimidazole
CDNB : 1-chloro-2,4-dinitrobenzène
CLHP : chromatographie liquide haute performance
CuAAC : Cu-catalysed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition
Cys : cystéine

D

d : doublet
Da : dalton
DCC : *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide
DCM : dichlorométhane
DCU : *N,N'*-dicyclohexylurée
déc. : décomposition
DIPEA : *N,N*-diisopropyléthylamine
DMAP : *N,N*-diméthylaminopyridine
DMF : diméthylformamide
DMSO : diméthylsulfoxide
DTT : dithiothréitol

E

EA : acide éthacrinique
éq. : équivalent
ESI : electrospray ionisation
Et : éthyl
exp. : expérimental

F

Fmoc : *N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)

G

GC-MS : chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse
Glu : acide glutamique
Gly : glycine
GP : glutathion peroxydase
GR : glutathion réductase
GS : glutathion synthétase
GSH : glutathion réduit
GSSG : glutathion oxydé (avec pont disulfure)
GST : glutathion S-transférase
GSTrt : glutathion S-trityl

H

HBTU : *o*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium
HMTA : hexaméthylènetétramine
HRMS : high resonnance mass spectrometry
Hz : hertz

I

*i*Pr : *iso*-propyl
IR : infrarouge

J

J : constante de couplage

K

K_i : constante d'inhibition

L

lit. : littérature

M

m : multiplet
MALDI : matrix assisted laser desorption ionisation
MC : molécule cible
Me : méthyl
Met : méthionine
Ms : mésyl

MT : molécule test
MW : micro-ondes

N

NADPH : nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate réduit
NBS : *N*-bromosuccinimide
NCL : native chemical ligation
NHS : *N*-hydroxysuccinimide

P

PAL : photoaffinity labeling
Pf : point de fusion
Pi : phosphate inorganique
ppm : partie par million
Pr : propyl

Q

q : quadruplet
quant. : quantitatif

R

Rdt : rendement (%)
RMN : résonnance magnétique nucléaire
ROS : reactive oxygen species

S

s : singulet
sep : septuplet
Suc : succinimidyl lié par l'atome d'azote

T

t : triplet
TA : température ambiante
TBTA : tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl]amine
TFA : acide trifluoroacétique
THF : tétrahydrofurane
TMEDA : *N,N,N',N'*-tétraméthylènediamine
Tos : tosyl
Tr : temps de rétention
Trt : trityl

U

UV : ultraviolet

Symboles

Δ : reflux
δ : déplacement chimique

Introduction

Introduction

Avec plus de 10 millions de nouveaux cas diagnostiqués chaque année dans le monde, le cancer est devenu l'une des maladies les plus dévastatrices. En France, les cancers représentent la première cause de mortalité chez l'homme et la deuxième chez la femme. Mais qu'est ce que le cancer ?

C'est une maladie grave qui se traduit par la perturbation de la communication cellulaire. Chez une personne saine, les cellules se régénèrent, c'est-à-dire qu'elles se développent puis meurent pour laisser la place à de nouvelles cellules. Ce phénomène est appelé apoptose ou mort cellulaire programmée. Dans le cas du cancer, ces cellules ne meurent plus et continuent à se développer puis perdent leur spécificité fonctionnelle et l'apoptose ne se fait plus. Ceci engendre le développement d'un amas de cellules cancéreuses. En se multipliant de façon anarchique, elles donnent naissance à des tumeurs de plus en plus grosses. Ces tumeurs, en se développant, peuvent également envahir et détruire les zones qui les entourent comme par exemple les cellules saines avoisinantes. Les cellules cancéreuses peuvent également "circuler" puis infecter un organe plus distant de la tumeur en formant des métastases.

En détruisant son environnement, le cancer devient un réel danger pour la survie de l'être vivant.

La chimiothérapie est une technique très utilisée dans la lutte contre ce dérèglement mais de nombreuses cellules saines sont détruites en même temps que les cellules cancéreuses, ce qui rend cette technique peu sélective. De nos jours, la recherche s'intéresse plus particulièrement au développement de médicaments ciblés, c'est-à-dire à l'élaboration de molécules qui agissent sélectivement sur les cellules cancéreuses, directement ou indirectement.

"Traiter un cancer, ce n'est plus seulement s'attaquer à la prolifération cellulaire en détruisant les cellules, c'est comprendre comment une cellule devient cancéreuse, autrement dit comment elle échappe à un phénomène normal de régulation, comment elle crée un environnement propice à son développement : comment, le cas échéant, elle organise sa dissémination. Toutes ces questions ouvrent des voies de recherche qui sont déjà prometteuses."

Extrait de "Les nouveaux médicaments" disponible sur le site de La Ligue contre le Cancer

C’est dans ces voies de recherche variées que se situe l’intérêt de l’étude du système du glutathion.

Le glutathion (GSH) est un tripeptide naturel qui protège les cellules, les tissus et les organes contre différentes pathologies. En effet, la faible concentration de glutathion dans les cellules est associée à de nombreuses maladies dégénératives incluant la maladie de Parkinson, d’Alzheimer et le SIDA, pour ne citer que les plus connues, mais aussi au vieillissement en général. La modulation du taux de glutathion des cellules saines et cancéreuses pourrait de même être liée à l’apparition de cancer et au phénomène de résistance des cellules cancéreuses.

Le glutathion intervient dans l’organisme à différents niveaux : c’est un agent antioxydant, mais aussi un agent de détoxication. Il joue donc un rôle essentiel, c’est pourquoi le nombre d’études dont il fait l’objet se multiplie.

Les scientifiques ont déjà découvert de nombreux systèmes (protéines, enzymes,…) intervenant dans le phénomène d’apoptose. Le glutathion intervient lui aussi au cours de cette apoptose, déficiente dans les cas de cancers. L’une des thématiques de notre laboratoire est de déterminer et d’identifier les protéines qui interagissent avec lui. On appelle ces protéines des protéines d’intérêt ou protéines possédant une affinité pour le glutathion. Leur identification permettrait de disposer à terme de nouvelles cibles thérapeutiques dans le cadre de la lutte contre le cancer.

On parle de "connaître pour mieux combattre" et plus on aura d’informations sur ces protéines, plus on pourra comprendre le phénomène afin de tenter d’y remédier.

Un article intitulé "Cancéropôle : des perspectives très prometteuses pour le diagnostic et la thérapie des cancers" retranscrit les paroles du Pr. Pierre Oudet, coordinateur du Cancéropôle du Grand-Est : "Ces protéines (*mutées ou nouvelles à ce jour*) représentent autant de cibles potentielles […] à visée diagnostique et thérapeutique préfigurant le développement de traitements susceptibles d’être appliqués à d’autres cancers que les tumeurs colorectales".

Les moyens mis en œuvre pour mener à bien ce travail de recherche fondamentale n’ont été que confirmés avec le temps. Cet extrait d’article nous montre bien l’importance de ce sujet de recherche à l’heure actuelle.

Mon sujet de thèse comporte deux thématiques :

- développer de nouveaux marqueurs photoactivables
- préparer des outils moléculaires pour identifier les cibles cellulaires du glutathion.

Mon premier objectif a donc été de modifier chimiquement le groupement photoactivable, en réalisant des analogues de la benzophénone, pour modifier ses caractéristiques physiques et le second de mettre au point des dérivés photoactivables du glutathion pour identifier les protéines d'intérêt.

Nous définissons dans le premier chapitre ce qu'est le glutathion et les rôles essentiels qu'il joue dans les cellules. Ceci nous permettra de mieux comprendre l'intérêt grandissant engendré par cette petite molécule naturelle.
Dans le second chapitre sont définis le principe et l'utilisation du marquage par photoaffinité, ainsi que la structure de la sonde mise au point pour permettre l'identification des protéines d'intérêt.
Le troisième chapitre nous mène à la synthèse d'une molécule "simple", bifonctionnelle, que l'on appellera aussi "molécule test" qui a pour but de confirmer les choix faits pour les groupements fonctionnels nécessaires à notre molécule trifonctionnelle. De plus, la synthèse de monoesters de l'acide téréphtalique est décrite dans ce chapitre. Le monoester méthylique est le produit de départ pour la synthèse de la première molécule trifonctionnelle.
Le chapitre suivant correspond à l'un de nos objectifs qui est de synthétiser de nouveaux marqueurs, c'est-à-dire de nouvelles sondes potentielles pour le marquage par photoaffinité. Pour cela, la synthèse de nouvelles structures bifonctionnelles ainsi que la synthèse des nouvelles structures trifonctionnelles correspondantes également appelées "molécules cibles" sont détaillées.
Afin d'identifier les cibles cellulaires du glutathion, nous devons coupler sur ce dernier les sondes photoactivables préalablement préparées. Le cinquième chapitre nous permet de voir les différentes voies de couplage envisagées.
Une fois ce couplage effectué, l'étape de détection s'impose. Le chapitre six expose les différentes méthodes que nous avons retenues.
Le dernier chapitre est une recherche effectuée parallèlement au projet principal. Il a pour objectif la synthèse de dérivés du glutathion.

Chapitre I :

Le glutathion

Chapitre I : Le Glutathion

1. Qu'est ce que le glutathion ?

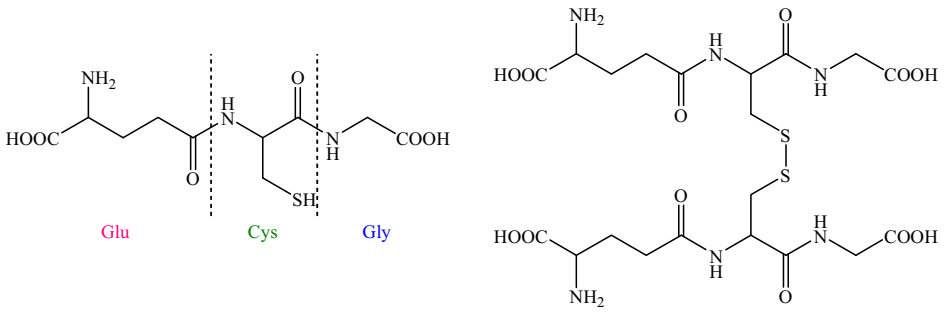
Le glutathion a été découvert par De-Rey-Pailhade[1] en 1888 dans un extrait de levure de boulanger, et a été nommé "philothion" (philo- : amour, et -thion : sulfure en grec). En 1921 Hopkins[2] expose sa structure moléculaire comme étant la glutamylcystéine (acide glutamique et cystéine), d'où son nouveau nom "**glutathio**n" qui signifie acide **gluta**mique uni à un corps porteur du groupement **thio**l. C'est un an plus tard[3] qu'il attribue les noms de "glutathion réduit" au glutathion qui possède la fonction -SH de la cystéine libre et de "glutathion oxydé" lorsque cette même fonction est oxydée sous forme disulfure -S-S-. Quelques années plus tard, Hunter et Eagles, publient un article[4] dans lequel ils affirment que la composition du glutathion est plus complexe et émettent la possibilité d'un tripeptide. Hopkins, après avoir reçu cet article avant sa publication, affirmera[5] que leur produit n'est pas pur. C'est en 1929[6] qu'il reconnaît l'exactitude des propos, et affirme que le glutathion est constitué de 3 acides aminés qui sont l'acide glutamique (Glu), la cystéine (Cys) et la glycine (Gly), sans toutefois connaître la séquence peptidique. De nombreuses investigations[7] suivront cette découverte et permettront de déterminer sa structure exacte : la L-cystéine et la glycine sont liées par une liaison peptidique et la seconde liaison est formée entre la fonction acide en position γ de la chaîne latérale de l'acide L-glutamique et la fonction amine de la L-cystéine, d'où son nom de *N-(N-L-γ-glutamyl-L-cystéinyl)glycine*.

Le glutathion est un tripeptide produit naturellement par l'organisme. On le trouve surtout dans les cellules de mammifères mais plus généralement dans les organismes aérobies tels que les plantes ou les micro-organismes.

[1] De Rey Pailhade, J. *Compt. Rend. Acad. Sci.* **1888**, *106*, 1683-1694.
[2] Hopkins, F.G. *Biochem. J.* **1921**, *15*, 286-305.
[3] Hopkins, F.G.; Dixon, M. *J. Biol. Chem.* **1922**, *54*, 527-563.
[4] Hunter, G.; Eagles, B.A. *J. Biol. Chem.* **1927**, *72*, 147-166.
[5] Hopkins, F.G. *J. Biol. Chem.* **1927**, 72, 185-187.
[6] Hopkins, F.G. *J. Biol. Chem.* **1929**, *84*, 269-320.
[7] (a) Nicolet, B.H. *J. Biol. Chem.* **1930**, *87*, 389-393. (b) Kendall, E.C.; Mason, H.L.; McKenzie, B.F. *J. Biol. Chem.* **1929**, *84*, 657-674. (c) Kendall, E.C.; Mason, H.L.; McKenzie, B.F. *J. Biol. Chem.* **1930**, *87*, 55-79. (d) Kendall, E.C.; Mason, H.L.; McKenzie, B.F. *J. Biol. Chem.* **1930**, *87*, 409-423.

Il est le plus abondant des thiols non protéiques dans la cellule et joue un grand nombre de rôles physiologiques. La littérature[8] nous donne de nombreuses informations sur le glutathion, son métabolisme, sa synthèse et ses propriétés.

Il existe sous deux formes : sa forme réduite, plus communément appelée glutathion réduit ou GSH et sa forme oxydée également appelée glutathion disulfure ou GSSG (figure 1). La proportion dans les cellules est de l'ordre de 100 sous forme réduite pour 1 sous forme oxydée.[9]



GSH **GSSG**

Figure 1 : Structure du glutathion réduit (GSH) et du dimère, le glutathion oxydé (GSSG)

Le glutathion est toujours très sollicité par l'organisme et se trouve rapidement consommé lorsque nous subissons toutes sortes d'agressions : contact avec des composés toxiques, maladie, stress, fatigue et même exercice physique.

Chaque cellule de l'organisme génère son propre glutathion et doit avoir à sa disposition le matériel nécessaire à sa fabrication.

[8] (a) Kosower, E.M. *Glutathione. Metabolism and Function.* Ed. Arias, M.A.; Jakoby, W.B. Raven Press NY **1976**, p1-15. (b) Meister, A. *Glutathione. Metabolism and Function.* Ed. Arias, M.A.; Jakoby, W.B. Raven Press NY **1976**, p35-43. (c) Meister, A.; Anderson, M.E. *Ann. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 711-760. (d) Meister, A. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 17205-17208. (e) Deneke, S.M.; Fanburg, B.L. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **1989**, *257*, L163-L173. (f) Sies, H. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27*, 916-921. (g) Valencia, E.; Marin, A.; Hardy, G. *Nutrition* **2001**, *17*, 428-429. (h) Valencia, E.; Marin, A.; Hardy, G. *Nutrition* **2001**, *17*, 485-486. (i) Pompella, A.; Visvikis, A.; Paolicchi, A.; DeTata, V.; Cassini, A.F. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 1499-1503. (j) Li, Y.; Wei, G.; Chen, J. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **2004**, *66*, 233-242.

[9] Hwang, C.; Sinskey, A.J.; Lodish. H.F. *Science* **1992**, *257*, 1496-1502.

2. Métabolisme du glutathion

Le GSH est synthétisé de façon intracellulaire dans le cytosol, à partir des 3 acides aminés (acide glutamique, cystéine, glycine) *via* deux étapes faisant intervenir l'ATP (adénosine triphosphate). Ces deux étapes sont catalysées successivement par deux enzymes : la γ-glutamylcystéine synthétase (γ-GCS) qui est l'étape limitante dans la synthèse du glutathion et la glutathion synthétase (GS).

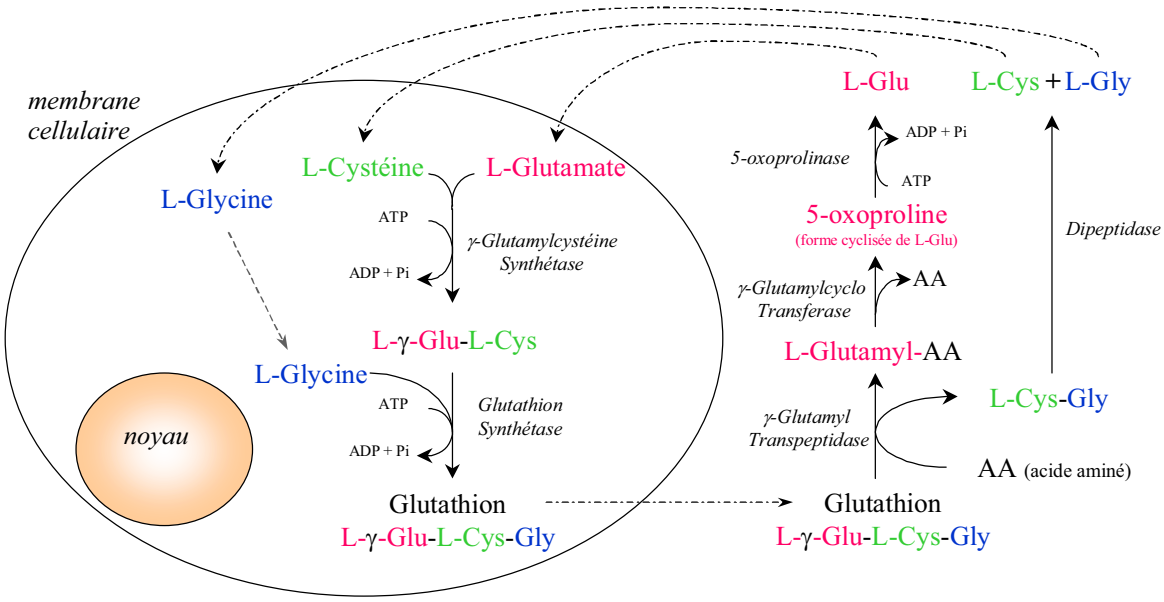


Figure 2 : Cycle de la biosynthèse et de la dégradation du glutathion au niveau cellulaire

Lors de la première étape qui est la réaction catalysée par la γ-glutamylcystéine synthétase, le groupement carboxylique en γ du glutamate réagit avec le groupement amino de la cystéine pour former une liaison γ-peptidique. Cette liaison protège le glutathion des hydrolyses provoquées par les peptidases intracellulaires.[10] L'étape suivante permet *via* la glutathion synthétase et la présence de cystéine de réaliser la seconde liaison peptidique pour former le glutathion.

Le glutathion est d'ailleurs considéré comme un moyen de stockage de la cystéine, car en milieu extracellulaire la cystéine est extrêmement instable et s'oxyde facilement en cystine.

[10] (a) Anderson, M.E. *Chem.-Biol. Inter*. **1998**, *111–112*, 1–14. (b) Wu, G.; Fang, Y-Z.; Yang,S. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 489–492.

Les γ-glutamyl transpeptidases (présentes à la surface des cellules), les γ-glutamyl transférases, les γ-glutamylcyclotransferases et la 5-oxoprolinase sont des enzymes qui catalysent la dégradation extracellulaire du glutathion en ses acides aminés constituants. Les γ-glutamyl transpeptidases permettent de catalyser la coupure de la liaison γ entre le glutamate (acide glutamique) et la cystéine. L'inhibition de la γ-glutamyl transpeptidase entraînerait une augmentation de la concentration du glutathion dans le plasma à l'inverse de ce qu'entraînerait l'inhibition de la γ-glutamylcystéine synthétase.

Le transport du glutathion est un aspect important du métabolisme. La concentration de GSH intracellulaire varie de 1 à 10 mM, cependant elle n'est que de quelques µM dans le sang plasmatique. L'aptitude qu'ont certaines cellules à transporter le glutathion dans les compartiments extracellulaires aide au transport de la cystéine, qui est l'acide aminé limitant lors de la synthèse du glutathion. Ce dernier ne peut pas directement entrer dans la cellule, c'est pourquoi il doit donc être hydrolysé en acides aminés.

Dans l'organisme, la majorité du glutathion se trouve sous la forme réduite. L'oxydation du GSH pour former le GSSG se fait par interaction directe avec des radicaux libres ou lors de réactions enzymatiques.

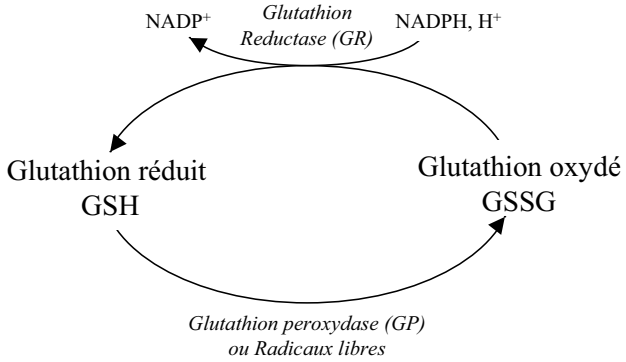


Schéma 1 : Cycle rédox du glutathion

Le glutathion oxydé formé est réduit grâce à la glutathion réductase (GR), dépendante du NADPH (nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate réduit), qui est une molécule "transporteuse" d'électrons.

Ceci permet le maintien de la concentration intracellulaire en glutathion.

3. Principaux rôles du glutathion

Le glutathion joue d'importants rôles physiologiques.[11] Les deux principaux sont les suivants :

- agent antioxydant,
- agent de détoxication.

3.1. Agent antioxydant

Le glutathion réduit et le glutathion oxydé constituent un couple d'oxydoréduction dont l'un des objectifs est de protéger les cellules contre l'oxydation.[12] Par cette propriété d'oxydoréduction, le glutathion sert de coenzyme transporteur d'hydrogène destiné principalement à maintenir les protéines dans leur état réduit. Dans le cas des globules rouges, il empêche l'hémoglobine d'être oxydée en méthémoglobine, laquelle est incapable de transporter l'oxygène. Or l'oxygène est un élément indispensable à la vie mais peut dans certains cas devenir un réel danger. Pour illustrer ceci, on peut citer l'exemple de la formation de substances toxiques qui se forment constamment en petites quantités à partir de l'oxygène. On parle d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS (Reactive Oxygen Species).[13] Des intermédiaires très réactifs sont formés tels les radicaux libres. Ces derniers sont très instables et donc très réactifs. Il y a notamment la formation du radical anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ et du radical hydroxyle $^{\bullet}OH$ comme le montre le schéma suivant.[14]
Ces espèces sont des sous-produits générés par tous les organismes aérobies.

Remarque :
Sur le schéma 2 ne figure pas la formation de l'oxygène singulet qui est une espèce réactive non radicalaire, générée à partir de l'oxygène moléculaire dans son état fondamental triplet.

[11] (a) www.glutathion.com. (b) Kidd, P.M. *Alt. Med. Rev.* **1997**, *2*, 155-176.
[12] Arteel, G.E.; Sies, H. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2001***, 10*, 153-158.
[13] (a) Dringer, R.; Gutterer, J.M.; Hirrlingen, J. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 4912-4916. (b) Dringer, R. *Prog. Neurobiol.* **2000**, *62*, 649-671.
[14] Koolman, J.; Röhm, K-H. *Atlas de poche de Biochimie*, 3ème Ed., Flammarion, **2004**, p284.

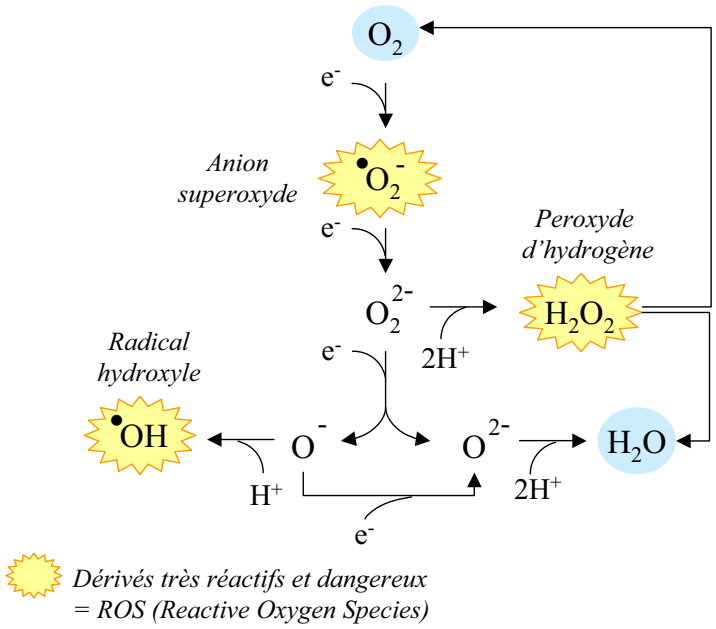


Schéma 2 : Espèces réactives de l'oxygène

Ces espèces peuvent conduire à des dommages voire à la destruction cellulaire. En effet, l'anion superoxyde peut entraîner une peroxydation lipidique, c'est-à-dire une attaque d'acides gras polyinsaturés conduisant à une perte de perméabilité de la membrane des cellules. Le radical hydroxyle quant à lui peut entraîner l'oxydation de l'ADN et des protéines. D'autre part, le peroxyde d'hydrogène qui se forme peut réagir avec les catalases et ainsi former H_2O et O_2 ou peut réagir avec les glutathion peroxydases (GP) pour former de l'eau (comme l'indique le schéma ci-dessus).

Pour se défendre contre ces ROS, les cellules utilisent des antioxydants comme la vitamine C (acide ascorbique), la provitamine A (β-carotène), la vitamine E (α-tocophérol) ou la vitamine Q (coenzyme Q-10 ou ubiquinone) sans oublier naturellement le glutathion.

En effet, le glutathion intervient en tant qu'agent antioxydant à l'intérieur de la cellule. Il permet également de la protéger contre le stress oxydant en servant de substrat aux enzymes antioxydantes, comme par exemple la glutathion peroxydase (GP) qui convertit le GSH en GSSG mais surtout les hydroperoxydes (ROOH) en acides gras (ROH) et en eau (H_2O).

Le GSH peut également réagir directement avec les radicaux libres, sans passer par la voie enzymatique, comme le montrent les équations (1) et (2).

$$2GSH + 2R^{\bullet} \longrightarrow 2RH + 2GS^{\bullet} \quad (1)$$

$$GS^{\bullet} + GS^{\bullet} \longrightarrow GSSG \quad (2)$$

Le glutathion intervient également dans l'échange thiol/disulfure. (cf. équations (3) et (4))

$$RSSR' + GSH \longrightarrow RSSG + R'SH \quad (3)$$

$$RSSG + GSH \longrightarrow RSH + GSSG \quad (4)$$

Cette réaction d'échange est catalysée par les thiol-transférases. Sans ce processus de réduction, les composés possédant un résidu cystéinyle (comme la plupart des enzymes) peuvent être oxydés, entraînant ainsi un changement de l'activité catalytique pouvant conduire à des disfonctionnements.

Les cellules sont très sensibles à un changement de leur environnement. Le rapport GSH/GSSG est un très bon indicateur de l'environnement rédox de la cellule.[15]

Ainsi, le glutathion joue un rôle essentiel en tant qu'antioxydant.

3.2. Agent de détoxication

Les cellules sont en permanence exposées à des substances chimiques naturelles ou synthétiques provoquant des dommages. On peut citer comme exemple les toxines, la fumée de cigarette,[16] les métaux lourds ou d'autres composés chimiques tels que les médicaments, les pesticides, les conservateurs, etc.

Il existe de nombreux mécanismes de détoxication comme la réduction ou la conjugaison. Ce n'est que dans les années 1970 que le glutathion a été reconnu comme agent de détoxication car il se conjugue à ces substances, appelées généralement xénobiotiques, rendant plus facile leur élimination par l'organisme.

Ces xénobiotiques sont des composés qui ne sont pas normalement présents dans l'organisme.

Le glutathion est un des meilleurs ligands pour les métaux. Il joue un rôle important dans leur transport, leur stockage et leur métabolisme. Le cadmium (Cd), par exemple, est bien connu pour sa toxicité sur les organismes vivants. Le glutathion peut agir directement sur lui, par complexation, ou sur les radicaux libres (ROS) générés suite à un stress oxydant produit par le Cd. Ces différentes actions du glutathion permettent de protéger la cellule contre la toxicité de ce métal.[17] D'autres métaux peuvent également se complexer avec le glutathion comme le plomb, le zinc ou le cuivre.[18]

---

[15] Schafer, F.Q.; Buttner, G.R. *Free Radical Biol. Med.* **2001**, *30*, 1191–1212.
[16] Rahman, I.; MacNee, W. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **1999**, *277*, 1067-1088.
[17] (a) Singhal, R.K.; Anderson, M.E.; Meister, A. *FASEB J.* **1987**, *1*, 220-223. (b) Nzengue, Y.; Steiman, R.; Garrel, C. *Toxicology* **2008**, *243*, 193–206.
[18] Freedman, J.H.; Ciriolo, M.R.; Peisach, J. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 5598-5605.

Chez l'homme, le principal organe de détoxication est le foie. Il est le réservoir de la plus grande concentration en glutathion dans le corps. Contrairement aux autres organes, il peut synthétiser la L-cystéine ou la puiser directement dans l'alimentation.

Des études montrent que de bas niveaux de GSH mènent à une diminution de l'activité du foie, amenant ainsi de plus en plus de toxines à circuler dans le corps et provoquant ainsi des dommages aux cellules et aux organes.

Les glutathion S-transférases (GST) font partie des enzymes de détoxication car elles catalysent la conjugaison du GSH avec les substances électrophiles pour former des conjugués du glutathion (GS-X).[19] Ces derniers sont ainsi moins nocifs et plus hydrosolubles. Cependant, il peut arriver que le complexe formé soit plus réactif que le composé d'origine. L'élimination de ces composés se fait grâce aux "pompes pour l'export des dérivés S-modifiés" (pompes GS-X), c'est à dire par transport hors de la cellule et par dégradation.

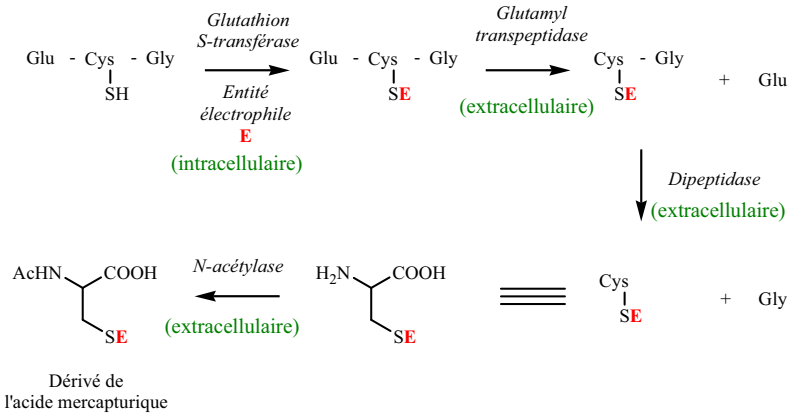


Schéma 3 : Détoxication par le glutathion des xénobiotiques par conjugaison et formation d'un dérivé de l'acide mercapturique

Le processus de dégradation, représenté sur le schéma ci-dessus, est le même que lors de la dégradation du glutathion. Une fois le GSH-conjugué formé, la γ-glutamyl transpeptidase va couper le motif γ-glutamyl de ce complexe pour ne laisser que le motif cysteinglycine S-substitué. Le dipeptide sera ensuite coupé par la dipeptidase pour donner la glycine et la cystéine S-substituée. Cet acide aminé S-substitué sera N-acétylé par l'intervention de la N-acétylase (présente dans les reins) pour donner un acide mercapturique. Ces acides sont stockés dans les reins pour être ensuite éliminés dans les urines.[20] Cependant, cette

[19] Wang, W.; Ballatori, N. *Pharmacol. Rev*. **1998**, *50*, 335-352.
[20] (a) Chasseaud, L.F. *Glutathione. Metabolism and Function.* Ed. Arias M.A.; Jakoby, W.B. Raven Press, New York, **1976**, p77-114. (b) Griffith, O.W. *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *27*, 922-935.

élimination des xénobiotiques entraîne la perte irréversible du résidu L-cystéine du GSH. Ceci a un côté néfaste car comme nous l'avons vu, c'est l'acide aminé limitant dans la synthèse du glutathion.

4. Glutathion et apoptose

Il a été montré que le GSH intracellulaire intervient notamment dans la synthèse et la réparation de l'ADN[21] dans la prolifération cellulaire et la différenciation des cellules. Le glutathion joue également un rôle dans l'apoptose qui est la mort programmée des cellules. En effet ce processus consiste à éliminer les cellules anciennes ou endommagées. Le corps humain remplace environ un million de cellules par seconde. Cependant, des dérèglements peuvent survenir lors de ce processus.

Deux cas sont envisagés :

- *apoptose inhibée* : les cellules ne sont plus éliminées ce qui peut entraîner :

→ des cancers (lymphomes, mélanomes)

→ des désordres immunitaires (maladies auto-immunes).

- *apoptose suractivée* : trop de cellules sont éliminées ce qui peut entraîner :

→ des maladies neuro-dégénératives (Alzheimer,[22] Parkinson[23])

→ des désordres immunitaires (SIDA, diabète)

→ autres (vieillissement).

L'apoptose se déroule en trois étapes : l'initiation, la décision et la dégradation, représentées sur la Figure 3.

[21] Meister, A. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 1969S-1975S.
[22] Butterfield, D.A.; Pocernich, C.B.; Drake, J. *Drug Dev. Res*. **2002**, *56*, 428-437.
[23] Zeevalk, G.D.; Razmpour, R.; Bernard, L.P. *Biomedicine&Pharmacotherapy* **2008** *in press*.

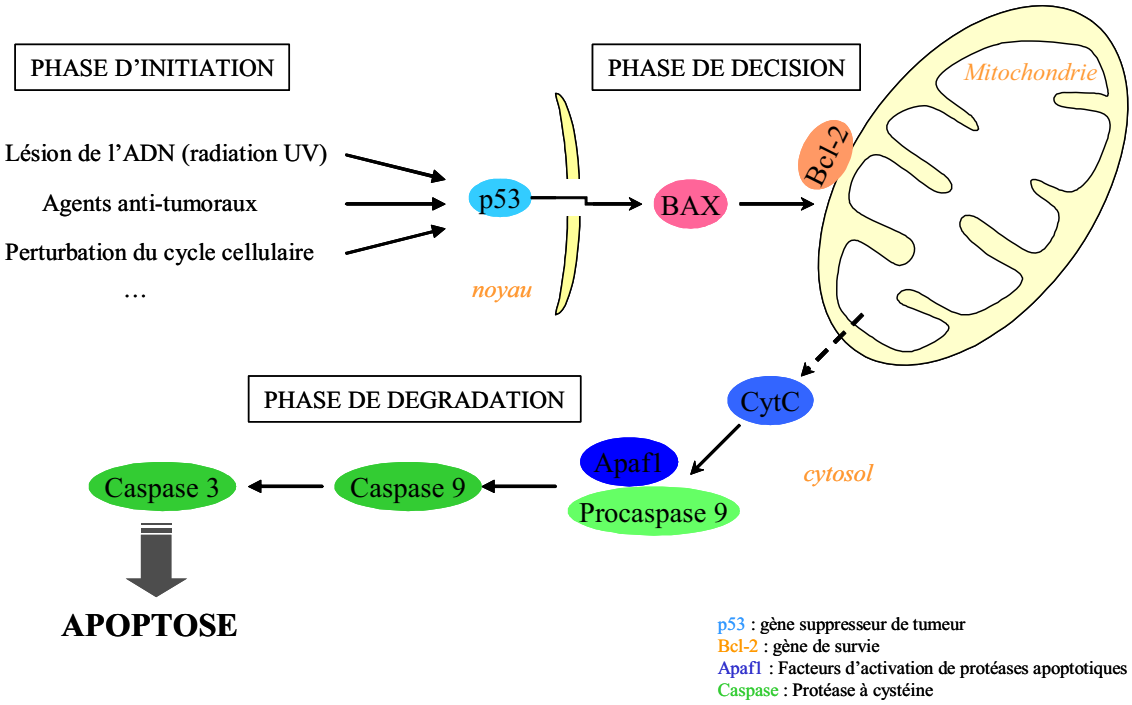


Figure 3 : Mécanisme moléculaire simplifié de l'apoptose

Suite à un signal apoptotique (lésion, perturbation,…), le gène p53 est activé donnant ainsi l'ordre à la protéine BAX de migrer vers la mitochondrie. Cette migration entraîne généralement l'expulsion de cytochrome C (CytC). Cependant, la présence de Bcl-2 à la surface de la mitochondrie module la perméabilité de cette dernière. Cette protéine a pour effet de contrôler la libération de CytC.

A ce stade, les protéines de la famille des Bcl-2 peuvent être :

anti apoptotiques = protéines de survie (Bcl-2)

pro apoptotiques = protéines de mort (BAX)

A cette étape de décision, deux cas qui dépendent du rapport **anti (Bcl-2)/pro (BAX)**, sont possibles : si ce rapport est supérieur à 1, il y a survie des cellules et si ce rapport est inférieur à 1, il y a mort des cellules c'est-à-dire apoptose.

Dans le cas de l'apoptose (second cas), le CytC est expulsé dans le cytosol et va former un complexe avec Apaf1 et la Procaspase 9 qui activera la Caspase 9. Cette dernière, étant une caspase initiatrice, va permettre l'activation de la Caspase 3 (caspase effectrice) qui va déclencher l'apoptose. Le glutathion présent dans le cytosol permet aux caspases de garder leur activité catalytique en les empêchant de s'oxyder (propriétés antioxydantes du glutathion).

L'apoptose peut également être régulée par un état rédox de la cellule ou par la présence directe des espèces intermédiaires oxygénées réactives (ROS).[24] Or, nous avons vu que le glutathion est le composé principal qui détermine le potentiel redox intracellulaire et qui permet l'élimination des ROS.

Ces dernières années, de nombreuses recherches ont montré que la concentration de glutathion intracellulaire intervient dans le phénomène d'apoptose.[25] En effet, comme cela a été montré, une trop faible concentration en glutathion est associée à de nombreuses maladies liées à l'apoptose (Alzheimer, hépatite C, diabète (typeII), cataractes,…).[26]

5. Glutathion et lutte contre le cancer[27]

De nombreux facteurs interviennent dans la formation et le développement d'un cancer notamment des facteurs génétiques, alimentaires ou environnementaux. Le glutathion joue un rôle d'agent de détoxication notamment par l'action des GST et des pompes GS-X qui permettent à terme l'élimination des substances toxiques. Cependant ces différentes conjugaisons avec le glutathion peuvent également avoir un aspect néfaste pour l'organisme car elles peuvent entraîner une augmentation de la résistance aux médicaments utilisés pour lutter contre le cancer[28] comme par exemple lors de chimiothérapie.

Il a été montré que la surexpression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 lors du processus d'apoptose est associée à la résistance à la chimiothérapie en tendant à augmenter la concentration du glutathion dans le noyau de la cellule, interdisant ainsi le processus apoptotique. A noter qu'une trop faible concentration en glutathion empêche également le processus apoptotique.

Une méthode pour éviter la résistance aux médicaments lors de traitements serait une inhibition de certaines enzymes du métabolisme des xénobiotiques comme par exemple les GST (glutathion S-transférases).[29]

---

[24] Hall, A.G. *Eur. J. Clin. Invest.* **1999**, *29*, 238-245.
[25] Celli, A.; Que, F.G.; Gores, G.J.; LaRusso, N.F. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. **1998**, *275*, 749-757.
[26] Sen, C.K. *Nutr. Biochem.* **1997**, *8*, 660-672.
[27] Balendiran, G.K.; Dabur, R.; Fraser, D. *Cell Biochem. Funct.* **2004**, *22*, 343-352.
[28] McLellan, L.I.; Wolf, C.R. *Drug Resistance Updates* **1999**, *2*, 153-164.
[29] Schultz, M.; Dutta, S.; Tew, K.D. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *26*, 91-104.

Le glutathion est un tripeptide naturel constitué de 3 acides aminés : l'acide glutamique, la cystéine et la glycine. Il est essentiel à la vie de la cellule et existe sous deux formes : le GSH (glutathion réduit) et le GSSG (glutathion oxydé). Il permet une protection des cellules en jouant le rôle d'antioxydant (évitant ainsi le stress oxydant) et celui d'agent de détoxication. Le glutathion ainsi que les enzymes dont il est co-facteur, interviennent dans de nombreux phénomènes tels que l'apoptose. De plus le glutathion rend possible, de par sa capacité à se conjuguer avec des électrophiles, l'élimination de nombreux composés toxiques pour l'organisme.

Le glutathion joue un rôle essentiel dans le développement et le maintien de l'organisme en bonne santé.

Comprendre comment le glutathion joue un rôle si important est une étape significative dans la prévention de certaines maladies telles que le cancer.

Chapitre II :

Le marquage par photoaffinité

Chapitre II : Le marquage par photoaffinité

Ce chapitre décrit le principe du marquage par photoaffinité, ainsi que son utilisation. Nous présentons également les différents groupements photoactivables ainsi que les ligations rendant possible la détection et l'identification des protéines. La dernière partie expose les molécules synthétisées pour mener à bien notre projet.

1. Principe et utilisation de la technique de marquage par photoaffinité

La technique de marquage par photoaffinité (Photo Affinity Labeling, PAL) a été utilisée pour la première fois dans les années 60 par Westheimer *et al.*[30] C'est une méthode efficace et couramment utilisée en biochimie pour étudier les interactions entre un composé de nature biologique et ses cibles macromoléculaires.[31]
Cette méthode a suscité un regain d'intérêt ces dernières années avec le développement de la protéomique grâce notamment à l'apparition, d'une part, de méthodes très sensibles en spectrométrie de masse qui permettent l'identification de protéines même lorsque celles-ci sont en très faibles quantités et, d'autre part, grâce au développement de nouveaux photophores.

Le principe de ce photomarquage est de former, par irradiation UV, une liaison covalente entre une espèce A, dont on veut déterminer la nature, et une espèce B, qui permet son identification. En effet, sans irradiation, ces deux espèces se lient de façon non covalente (Schéma 4a). Cette liaison étant réversible, elle ne permet pas une identification future.
La molécule photoactivable (espèce B), appelée couramment sonde, est une molécule qui va subir des modifications chimiques lors de l'activation par irradiation UV. Elle se lie ainsi de façon covalente avec l'espèce A. (Schéma 4b)
Cette technique nous permet d'accéder à un grand nombre d'informations structurales définies par Dorman et Prestwich[32] comme étant les trois niveaux d'analyse (Schéma 4c).
Le premier niveau est l'identification des protéines possédant une affinité pour l'espèce A. Le second niveau, obtenu par séquençage des protéines, permet d'identifier les peptides impliqués dans la liaison. Le dernier niveau a pour but de localiser et d'identifier le site de

[30] Singh, A.; Thornton, E.R.; Westheimer, F.H. *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, PC3006-PC3008.
[31] Kotozyba-Hilbert, F.; Kapfer, I.; Goeldner, M *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 1294-1312.
[32] Dorman, G.; Prestwich, G.D. *Trends Biotech.* **2000**, *18*, 64-77.

liaison ligand-récepteur. Pour cela, diverses techniques sont utilisées comme la spectrométrie de masse couplée soit à un détecteur soit à une chromatographie en phase liquide.

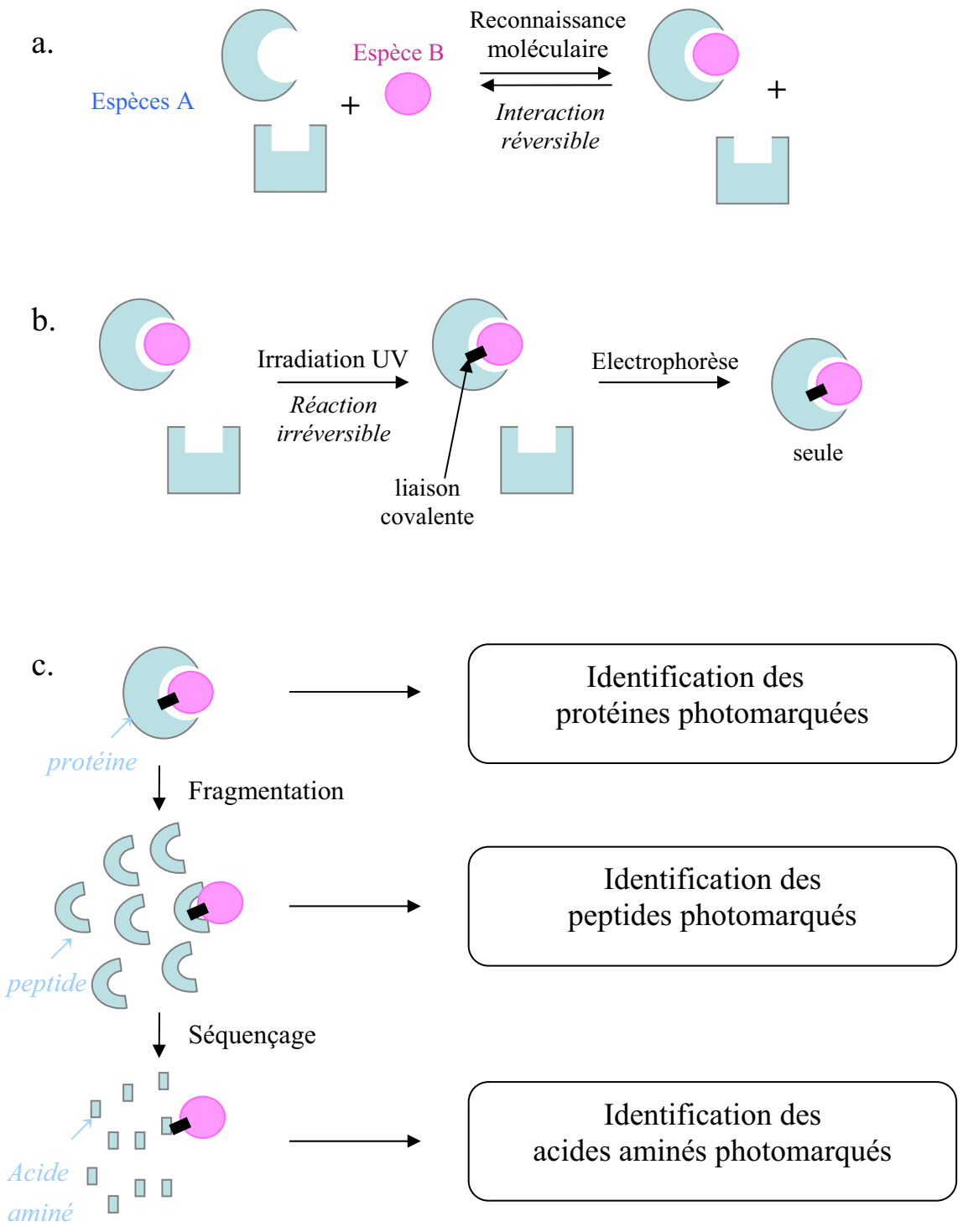


Schéma 4 : a. Affinité entre deux espèces b. Marquage par photoaffinité c. Les trois niveaux d'analyse

Cette technique est largement utilisée avec des systèmes biologiques[33] car elle permet de vérifier la proximité spatiale de la molécule cible avec les protéines. Ainsi, par exemple, Wang *et al*.[34] ont pu localiser grâce à cette méthode le site de fixation du marqueur glutathionyl S-[4-(succinimyidyl)-benzophénone] au milieu du site actif d'une glutathion S-transférase de foie de rat. De plus, cette technique peut être utilisée pour comprendre et développer de nouveaux traitements par identification des cibles biologiques d'un produit[35] ou par détermination de l'interaction médicament-cible.[36] L'identification du site de liaison de la cible est une étape fondamentale pour déterminer et comprendre son action sur l'organisme.

D'une manière générale, lors du marquage par photoaffinité, on utilise soit un analogue photoactivable de la molécule bioactive que l'on étudie, soit on fixe sur cette molécule un groupement photoactivable. Que le groupement photoactivable (espèce B) fasse partie intégrante de la molécule ou que ce soit un groupement additionnel, il doit satisfaire à plusieurs critères :

- être stable, c'est-à-dire inerte chimiquement dans les conditions d'utilisation (couplage, électrophorèse,…) mais également à la lumière ambiante
- se lier spécifiquement de façon non covalente avec les protéines d'intérêt (espèce A)
- être activable à une longueur d'onde supérieure à 300nm, pour éviter la dégradation des protéines
- former, sous irradiation UV, une liaison covalente avec les protéines d'intérêt
- lors de l'excitation UV, avoir un état excité intermédiaire dont la durée de vie est courte pour éviter la dissociation du complexe ligand-récepteur
- posséder un groupement permettant la détection et l'identification des protéines ainsi que leur site d'ancrage
- ne pas changer considérablement l'activité biologique de la molécule bioactive étudiée.

Il n'y a pas de groupement photoactivable "idéal" et chacun possède des avantages et des inconvénients. Nous allons voir différents groupements qui répondent à un certain nombre de ces critères.

[33] Vodovozova, E.L. *Biochemistry (Moscow)* **2007**, *72*, 1-20.
[34] Wang, J.; Bauman, S.; Colman, R.F. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 5493-5503.
[35] Chaudhary, A.; Prestwich, G. *Bioconjugate Chem*. **1997**, *8*, 680-685.
[36] Hatanaka, Y.; Sadakane, Y. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 271-288.

2. Les principaux groupements photoactivables

Il existe plusieurs groupements fonctionnels pouvant être utilisés pour réaliser un marquage par photoaffinité comme nous le montre la chronologie suivante :

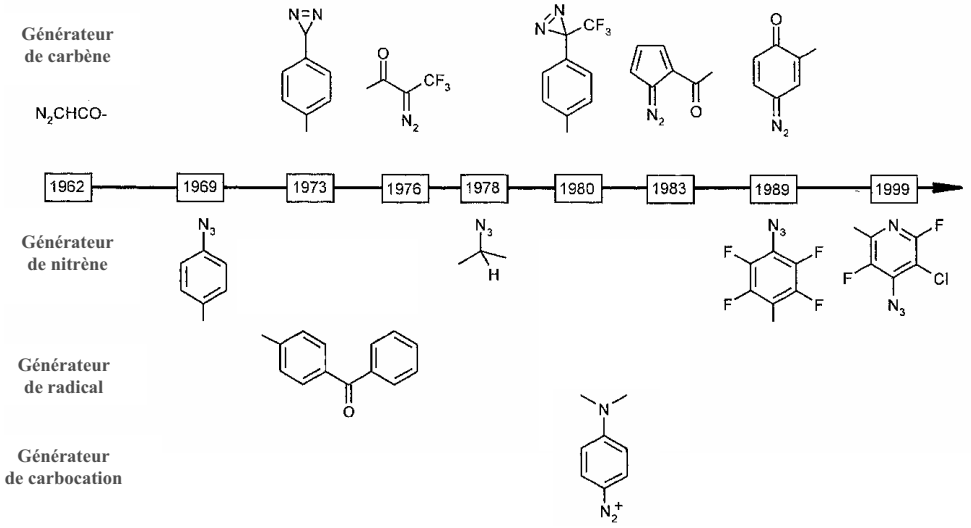


Figure 4 : Chronologie reportant la date de première utilisation de différents groupements pour le marquage par photoaffinité[33]

Comme nous l'avons vu dans le premier paragraphe, la sonde (espèce B) est soit un analogue d'un substrat soit le substrat lui-même qui a subi des modifications chimiques. Dans certains cas, cette sonde est marquée de façon radioactive pour permettre par la suite une détection du site de liaison. Cependant, le fait d'introduire un matériel radioactif nécessite des infrastructures et des méthodes de détection particulières. De même, la synthèse de ces composés radioactifs peut s'avérer plus complexe qu'une synthèse de dérivés non radioactifs. C'est pour ces différentes raisons que le radiomarquage n'a pas été retenu et que d'autres éléments qui permettent également une identification du site d'ancrage sont introduits.

Lors de l'irradiation, la sonde doit former un intermédiaire réactif permettant d'établir une liaison avec le récepteur (espèce A). Pour parler d'un "bon" état intermédiaire, il faut s'intéresser au temps de vie de cette espèce ainsi qu'à sa réactivité. Différentes espèces intermédiaires ont été recensées,[37] les nitrènes, les carbènes, les radicaux libres étant les plus courantes. Chacune de ces trois familles sera illustrée par un exemple : les azotures aromatiques pour les *nitrènes*, les diazirines pour les *carbènes* et les benzophénones pour les *radicaux*.

[37] Fleming, S.A. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12479-12520.

2.1. Azotures/Azotures aromatiques

Les azotures aromatiques (ArN_3) décrits par Bayley et Knowles[38] en 1977 passent par un nitrène intermédiaire très réactif lors de l'irradiation UV.

Ce sont des groupements très utilisés mais ils ne sont pas de très bons marqueurs car les rendements obtenus après irradiation sont très faibles. Fleming[37] s'appuie sur divers travaux pour trouver différentes raisons pouvant expliquer ces mauvais rendements.

La première explication est liée aux espèces formées après l'irradiation de l'azoture aromatique. En effet, la photolyse des azotures aromatiques provoque la perte d'azote et forme un nitrène singulet (Schéma 5a). Cependant ce nitrène se cyclise très rapidement (~1ns dans les solvants organiques) pour former une benzazirine (Schéma 5b) qui peut directement s'ouvrir et former le 1,2,4,6-azacycloheptatétraène (une céténimine cyclique) (Schéma 5c).[39]

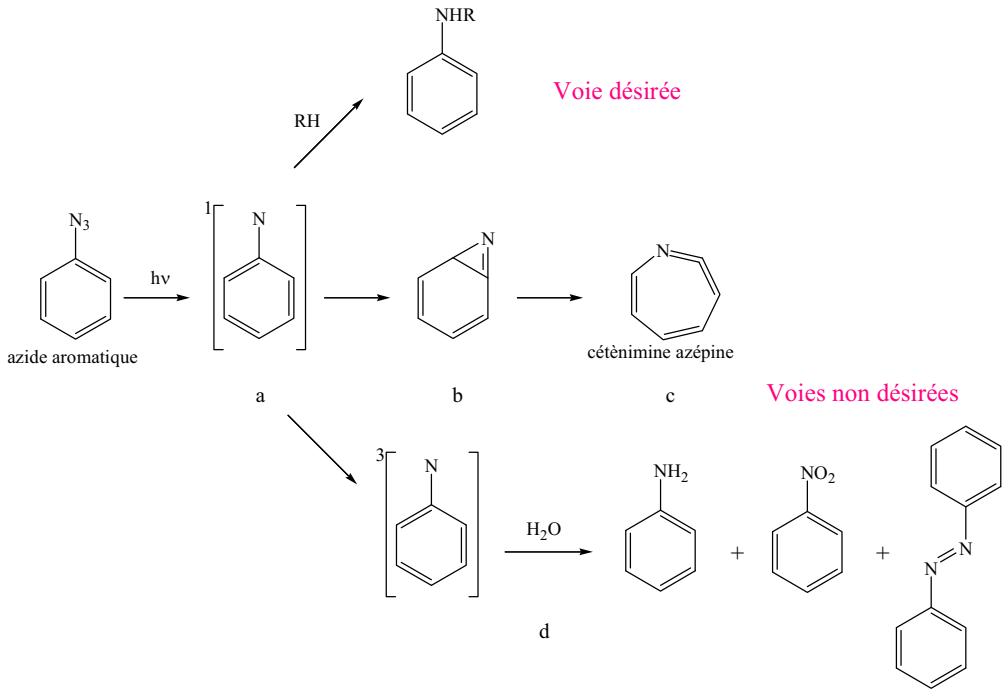


Schéma 5 : Espèces formées lors de l'irradiation d'azoture aromatiques

De plus, lors de l'irradiation, l'état singulet peut également conduire à un état triplet. Cet état fondamental des nitrènes est totalement inutile pour le marquage par photoaffinité car il peut réagir en présence d'eau (Schéma 5d).

[38] Bayley, H.; Knowles, J.R. *Methods Enzymol.* **1977**, *46*, 69-114.
[39] Rizk, M.S.; Shi, X.; Platz, M.S. *Biochem.* **2006**, *45*, 543-551.

Une seconde raison, et non des moindres, serait la longueur d'onde utilisée pour activer ce groupement. En effet, l'irradiation se fait à 254nm et à cette longueur d'onde, il y a dégradation des systèmes biologiques (protéines) et donc perte de l'information.
Une dernière hypothèse expliquant ces faibles rendements obtenus serait la stabilité du groupement azoture aromatiques à différents produits pouvant être utilisés lors de traitements biologiques comme par exemple le dithiothréitol (DTT). La conséquence de l'action de ces produits sur l'azoture est une perte de la photoréactivité car il y a réduction de l'azoture en amine.

Des recherches ont été menées sur la synthèse et les effets de l'ajout d'un ou de plusieurs groupements sur le cycle aromatique dans le but d'améliorer la réactivité des azotures aromatiques.

2.2. Diazirines

C'est en 1975 que Smith et Knowles[40] ont proposé les diazirines comme groupements potentiels pour le photomarquage.

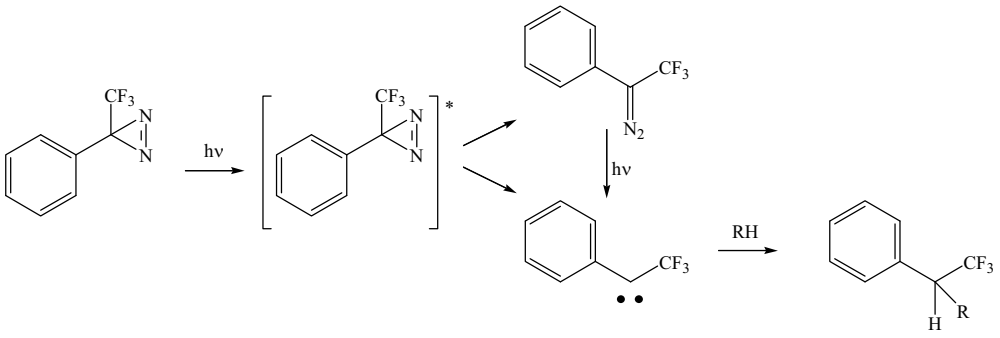


Schéma 6 : Espèces formées lors de l'irradiation des diazirines

Le fait d'irradier la diazirine conduit à la formation d'un composé diazo puis du carbène correspondant au départ d'azote moléculaire. C'est un petit groupement, peu volumineux (modification minimale du ligand) et lipophile. Un composé largement utilisé dans cette famille est le trifluoroéthyldiazirinephényle. Ce groupement fut introduit par Brunner *et al.*[41] en 1980 (cf. Schéma 6) mais reste difficile d'accès. De nombreuses étapes de synthèse sont nécessaires pour sa préparation.

[40] Smith, R.A.G.; Knowles, J.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 5072-5073.
[41] Brunner, J.; Senn, H.; Richards, F.M. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3313-3318.

De plus certains problèmes de réactivité peuvent survenir comme par exemple :

- le carbène dans l'état triplet peut réagir avec une molécule d'oxygène pour donner la cétone correspondante

- dans certains cas, les photoadduits sont instables. Par exemple, une amine peut réagir avec le carbène intermédiaire. Le produit une fois formé va perdre très rapidement une molécule d'acide fluorhydrique (HF) pour ainsi former une énamine. Cette dernière va conduire, après hydrolyse, à la formation de la cétone correspondante.[42] (Schéma 7)

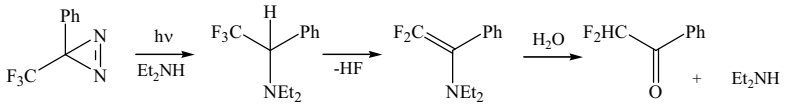


Schéma 7 :Réaction d'une diazirine en présence d'une amine

- les diazirines sont sensibles à la lumière ambiante

Certes il n'y a pas que des inconvénients dans l'utilisation des diazirines. En effet :

- la longueur d'onde utilisée pour l'irradiation, qui est supérieure à 300nm, évite tout dommage du système biologique

- ce sont des molécules stables (même vis-à-vis des agents réducteurs tel que le DTT)

- le motif trifluoroéthyldiazirinyl est stable dans les conditions acide et basique

- le carbène possède une haute réactivité avec tous les acides aminés.

2.3. Benzophénones

En général, les radicaux intermédiaires sont convenables pour le marquage par photoaffinité. Ils sont connus pour arracher un atome d'hydrogène à un site accessible.

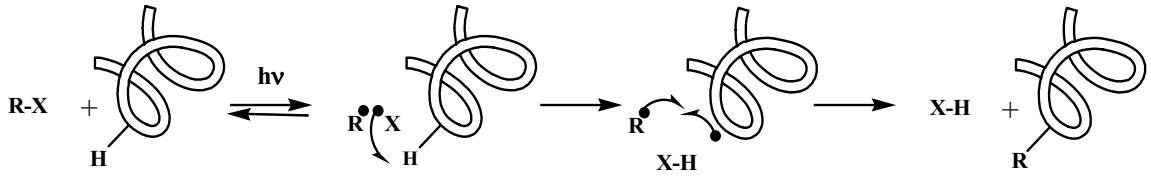


Schéma 8 : Formation et réactivité des radicaux formés par irradiation UV

Ils sont plus réactifs vis-à-vis des liaisons CH que les nitrènes et sont moins propices à des réarrangements intramoléculaires que les carbènes.

[42] Platz, M.; Admasu, A.S.; Kwiatkowski, S.; Cracker, P.J.; Imai, N.; Watt, D.S. *Bioconjugate Chem*. **1991**, *2*, 337-341.

Dorman et Prestwich[43] ont étudié l'utilité de ce groupement ainsi que la réactivité de l'état excité à capter le proton de différents groupements. (Schéma 9, molécule **a**)

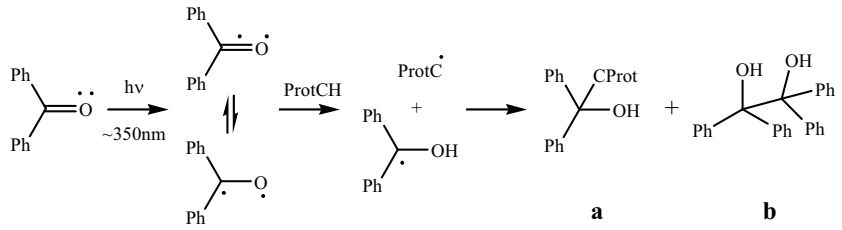


Schéma 9 : Réactivité du motif benzophénone selon Dorman et Prestwich

Cependant, dans les réactions faisant intervenir des radicaux libres, des réactions secondaires peuvent intervenir comme la capture d'hydrogène de façon intramoléculaire ou le fait que le radical formé réagisse sur lui-même. (Schéma 9, molécule **b**)
Un avantage des radicaux libres est une faible réactivité vis-à-vis de l'eau ou d'autres solvants courants.

Contrairement aux deux premiers groupements (azoture aromatique et diazirine) où l'irradiation provoque une "destruction" irréversible du groupement (perte de N_2), l'état intermédiaire de la benzophénone est un état réversible. Si la benzophénone dans son état triplet ne rencontre pas de proton accessible, elle revient à son état fondamental. Le temps de vie de l'état excité en absence de proton accessible est de 300ns, ce qui évite des réactions secondaires. La benzophénone peut ainsi subir plusieurs cycles excitation-relaxation sans perdre ses propriétés photoactivables jusqu'à obtenir une géométrie favorable.[32] Ceci fait de la benzophénone un groupement photoactivable de choix.
Le motif benzophénone possède plusieurs avantages :
- il est stable dans les conditions classiques de synthèse peptidique
- il posséde une grande efficacité et sélectivité dans la formation de la liaison covalente
- il peut être utilisé en milieu aqueux car l'état excité triplet est quasiment inerte dans ces conditions[44]
- il posséde un état excité réversible.

[43] Dorman, G.; Prestwich, G.D. *Biochemistry* **1994**, *33*, 5661-5673.
[44] Galardy, R.E.; Craig, L.C.; Jamieson, J.D.; Printz, M.P. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 3510-3518.

De nombreuses équipes de chercheurs ont travaillé avec ce groupement pour une identification de matériels ou de sites biologiques.[45] Il a notamment permis au groupe de Horwitz[46] de caractériser le site d'interaction du taxol (un anti-tumoral) avec ses cibles cellulaires.

Un bon groupement photoactivable est un groupement qui:
- est stable dans les conditions d'utilisation
- peut être activé à une longueur d'onde supérieure à 300nm pour ne pas endommager le système biologique
- permet de former une liaison covalente (temps de vie de l'intermédiaire ni trop court ni trop long)
- possède une grande efficacité et spécificité du site de la liaison
- ne subit pas d'autres modifications chimiques sous irradiation pour ne pas altérer l'information

3. Les principales ligations pour la détection des protéines

Les ligations en biochimie et biologie sont largement et couramment exploitées. Ce que l'on nomme "ligation" est en fait une liaison chimiosélective. En général, le premier groupement se situe sur la molécule d'intérêt et l'autre sur la sonde qui est la molécule permettant l'identification, la caractérisation et l'analyse de la première. On parle également d'orthogonalité chimique. Ce type de réaction permet d'introduire différents groupements ou fonctions (amino acides, sondes possédant des propriétés physiques et biologiques, marqueurs fluorescents) sur des peptides ou des protéines. Du fait de l'incorporation sélective de ces entités, on peut ainsi obtenir des informations sur la structure, la fonction des protéines, voire même sur les interactions protéine-protéine.

[45] Quelques exemples : (a) Steiner, G.; Kuechler, E.; Barta, A. *EMBO J.* **1988**, *7*, 3949-3955. (b) Suva, L.J.; Flannery, M.S.; Caulfield, M.P.; Findlay, D.M.; Jüppner, H.; Goldring, S.R.; Rosenblatt, M.; Chorev, M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *283*, 876-884. (c) Zhang, C.X.; Chang, P.V.; Lippard, S.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6536-6537. (d) Dorman, G.; Olszewski, J.D.; Prestwich, G.D. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2292-2297.
[46] (a) Rao, S; He, L.; Chakravarty, S.; Ojima, I., Orr, G.A.; Horwitz, S.B. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37990-37994. (b) Xia, S.; Kenesky, C.S.; Rucker, P.V.; Smith, A.B.; Orr, G.A.; Horwitz, S.B. *Biochemistry* **2006,** *45,* 11762-11775.

Il existe différents types de ligations.[47] La plus courante est la "Native Chemical Ligation" (NCL). Cette technique de ligation a débuté par la découverte de Wieland,[48] qui constate la formation d'une liaison peptidique sélective entre thioesters (acide aminé et peptide) semi-protégés et l'atome d'azote d'un résidu de cystéine terminal en milieu aqueux neutre. Ce n'est que dans les années 1990 que cette ligation fut nommée "Native Chemical Ligation" par l'équipe de Kent.[49]

Cette ligation s'effectue en deux étapes : la première est une transthioestérification et la seconde, un réarrangement spontané permettant de conduire à une amide très stable. (Schéma 10A)

Cependant cette technique possède deux inconvénients majeurs :

- le système doit posséder une cystéine
- cette même cystéine doit être en position terminale (fonctions -NH_2 et -SH libres).

C'est pourquoi d'autres ligations ont été développées comme par exemple la ligation de Staudinger. (Schéma 10B)

Cette dernière permet la formation d'une liaison amide en faisant réagir un dérivé phosphoré et un azoture. Il existe une variante de cette ligation qui fait intervenir le même type de composé mais la phosphine utilisée est éliminée par la suite. (Schéma 10C)

Depuis peu, un nouveau type de réaction permet également de réaliser ce type de ligation. Il s'agit de la "Click Chemistry".[50] Cette réaction se fait en présence d'un catalyseur au cuivre et permet de lier deux composés en formant un cycle triazole. (Schéma 10D)

[47] (a) Rademann, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4554-4556. (b) David, R.; Richter, M.P.O.; Beck-Sickinger, A.G. *Eur. J. Biochem*. **2004**, *271*, 663-667.
[48] Wieland, T.; Bokelmann, E.; Bauer, L.; Lang, H.U.; Lau, H. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *586*, 129-139.
[49] Dawson, P.E.; Muir, T.W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S.B.H. *Science* **1994**, *266*, 776-779.
[50] Kolb, H.C.; Finn, M.G.; Sharples, K.B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.

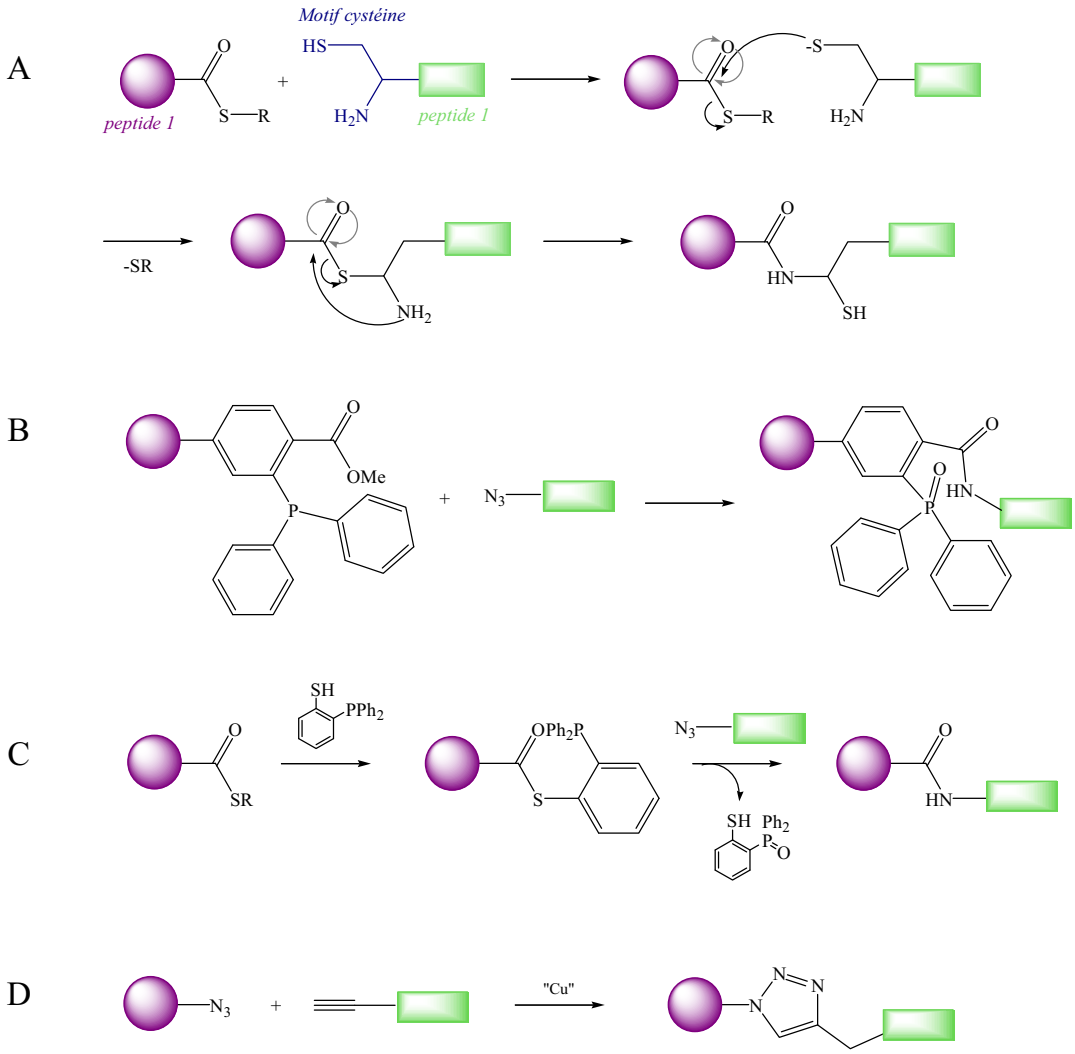


Schéma 10 : Différents types de ligations : A)Principe de la Native Chemical Ligation (NCL); B)Principe de la ligation de Staudinger; C)Principe de la ligation de Staudinger modifiée; D)Principe de la réaction de Click Chemistry.

Remarque :

La ligation de Staudinger (modifiée ou non) ainsi que la réaction de Click Chemistry sont décrites plus en détail dans le chapitre VI de ce manuscrit.

Dans notre cas, ces ligations sont utilisées pour fixer sur notre sonde un composé permettant une détection des protéines.

Nous allons voir dans le paragraphe suivant, la stratégie que nous avons mise en place pour mener à bien notre étude.

4. Structure trifonctionnelle

Nous avons vu lors des précédents paragraphes que le principe du marquage par photoaffinité est de former, par irradiation UV, une liaison covalente entre une espèce A, dont on veut déterminer la nature, et une espèce B, qui permettra son identification.

Dans notre cas, nous appellons protéines d'intérêt celles qui possédent une affinité pour le glutathion. Ce sont celles-ci que nous cherchons à détecter et à identifier. Pour ce faire, nous allons utiliser une sonde (espèce B) possédant différentes caractéristiques.

Notre objectif étant d'identifier les protéines ayant une affinité pour le glutathion, il est donc nécessaire de fixer celui-ci sur notre molécule, et il nous faut donc **un groupement qui rend cette fixation possible**.

De plus, notre molécule doit pouvoir se fixer de façon irréversible (formation d'une liaison covalente) avec les protéines d'intérêt; elle doit donc posséder **un groupement photoactivable**.

Une fois ces protéines liées, il faut pouvoir les identifier. Le dernier groupement que notre molécule doit donc posséder est **un groupement permettant la détection et l'identification des protéines**.

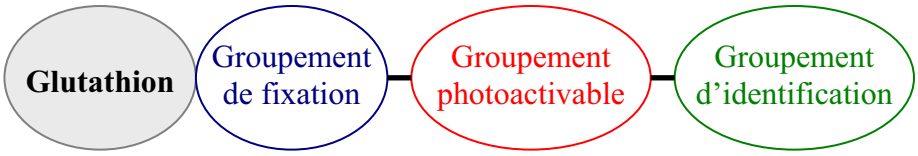


Figure 5 : Représentation schématique de notre sonde

4.1. Fixation du glutathion sur la sonde

Notre objectif est d'identifier les protéines ayant une affinité pour le glutathion. Ce dernier doit pouvoir être fixé facilement à notre molécule.

D'après la littérature, les esters *N*-succinimidyle[51] (ou *N*-pyrrolidine-2,5-dione) sont utilisés lors des couplages peptidiques, réagissant sur une amine primaire pour obtenir un amide. Or nous souhaitons fixer le glutathion sur notre molécule grâce à sa fonction amine. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser cette voie.

[51] Green, T.W.; Wuts, P.G.M. *Protective groups in Organic Synthesis* 2nd Ed., Wiley, New York, **1991**.

Ces esters sont obtenus facilement par réaction entre un acide carboxylique et la *N*-hydroxysuccinimide en présence de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide. De plus, ces esters ont l'avantage d'être stables en milieu aqueux, ce qui n'est pas le cas des chlorures d'acides qui sont peu utilisés pour réaliser des couplages.

4.2. Choix du groupement photoactivable

Nous avons vu, dans le second paragraphe de ce chapitre, qu'un bon groupement se définit par divers critères. D'après la littérature, la benzophénone est le groupement le plus adapté pour réaliser des liaisons avec les protéines, ainsi que le plus stable. De plus, il est assez facilement accessible en synthèse organique. Le fait que l'état excité de la benzophénone soit réversible représente un avantage par rapport aux autres groupements.

Nous avons donc décidé d'utiliser la benzophénone comme groupement photoactivable.

Il est important de préciser que le fait de fixer un groupement en position *ortho* ou *méta* de la benzophénone, augmente la probabilité d'interactions intramoléculaires et diminue l'efficacité lors de la photoactivation.[43] Nous avons choisi de positionner les autres groupements nécessaires à notre étude en position *para* évitant ainsi les problèmes éventuels d'encombrement stérique.

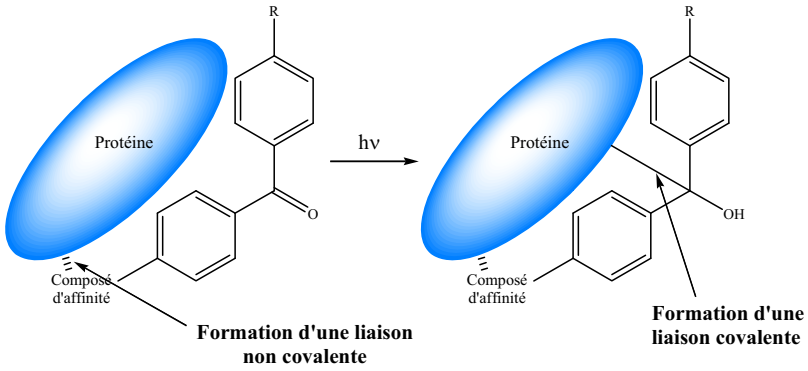


Figure 6 : Formation de la liaison covalente sous irradiation UV

4.3. Groupement pour la détection

Pour identifier les protéines d'intérêt, le groupement de détection est essentiel.

Après avoir mis notre sonde en présence de protéines et avoir procédé à l'activation par irradiation UV pour fixer de façon irréversible les protéines d'intérêt à notre sonde, le mélange obtenu est placé sur un gel d'électrophorèse de polyacrylamide. Cette technique permet de séparer toutes les protéines suivant leur poids moléculaire et leur polarité. (Figure 7)

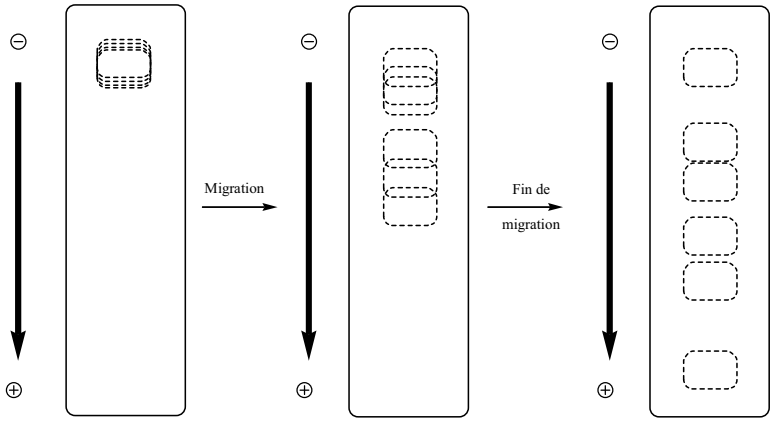


Figure 7 : Représentation simplifiée de la migration sur gel d'électrophorèse

Une fois la migration effectuée sur ce gel intervient le groupement pour la détection.

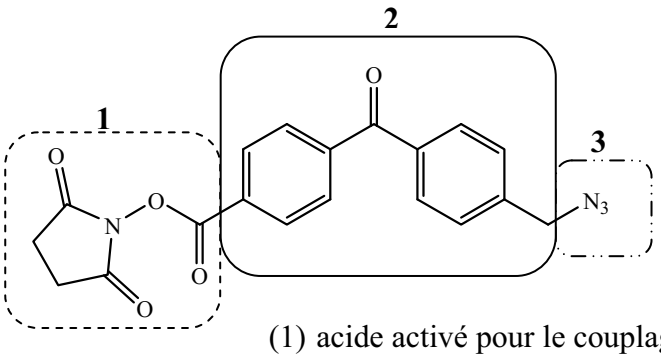
Nous avons vu dans le paragraphe trois de ce chapitre qu'il existe différentes ligations. La "Native Chemical Ligation" n'a pas été retenue dans notre cas car celle-ci nécessite obligatoirement un motif cystéine terminal qui de plus est couramment rencontré dans les protéines. Les autres possibilités sont la ligation de Staudinger ainsi que la Click Chemistry. Dans un cas comme dans l'autre, le présence d'un groupement azoture est indispensable.

Les azotures organiques sont très souvent utilisés comme intermédiaires en synthèse organique[52] et peuvent être obtenus facilement notamment à partir d'halogénures. De plus, ce sont des groupements absents des protéines ce qui évite toute réaction non désirée et permet donc une détection spécifique et sélective. Cependant, rappelons qu'un groupement azoture fixé directement à un système aromatique (groupement phényle de la benzophénone dans notre cas) est très sensible à l'irradiation UV. C'est pour cette raison qu'un groupement azoture de méthylène $-CH_2N_3$ a été choisi, étant le plus simple azoture aliphatique à obtenir.

[52] (a) Bräse, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5188-5240. (b) L'Abbé, G. *Chem. Rev.* **1969**, *69*, 345-363.

4.4. Construction de notre première sonde

En nous basant sur les différents éléments évoqués dans les paragraphes précédents, voici la structure proposée pour mener à bien notre étude.



(1) acide activé pour le couplage avec le GSH

(2) groupement photoactivable (benzophénone)

(3) azoture de méthylène pour la détection

Figure 8 : Structure trifonctionnelle

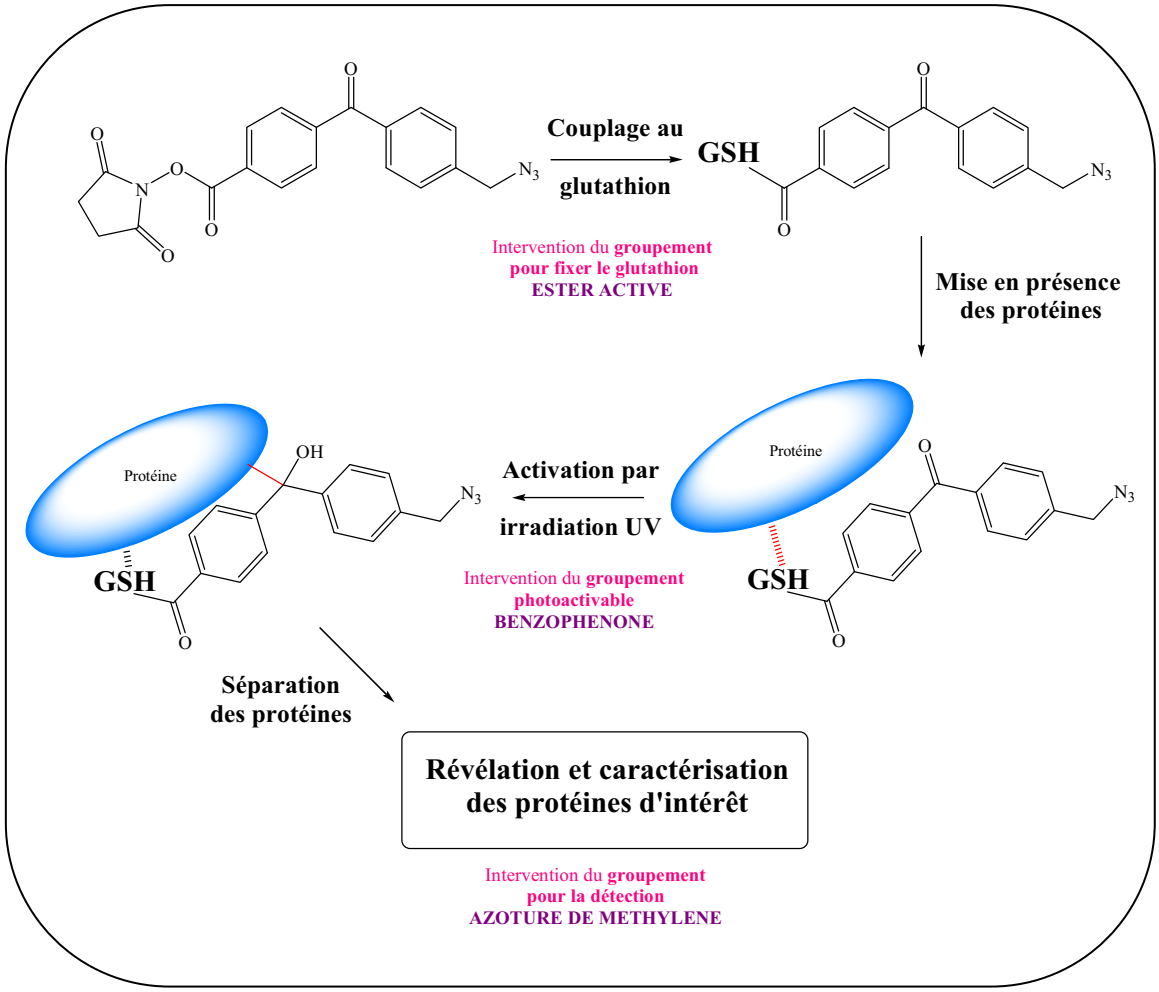
Cette structure trifonctionnelle appelée **sonde**, nous sert de base tout au long de ce travail.

5. Stratégie et étapes du projet

La stratégie que nous avons mise en place est résumée sur le schéma suivant. Ce dernier montre bien l'importance du choix des différents groupements présent sur notre sonde ainsi que leur rôle à chaque étape de notre recherche.

Remarque :

Il est important que chaque fonction de cette structure reste "active" et non dénaturée lors de ces nombreuses étapes (synthèse de la structure elle-même et identification). C'est pourquoi différents tests ont été effectués et sont exposés dans notre étude.



Le chapitre suivant expose la synthèse de cette structure trifonctionnelle, ce qui représente la première étape de notre projet.

Chapitre III :

Synthèse de la molécule trifonctionnelle possédant le motif benzophénone

Chapitre III : Synthèse de la molécule trifonctionnelle possédant le motif benzophénone

Comme nous venons de le voir, une structure trifonctionnelle nous semble tout à fait appropriée pour notre étude. C'est pourquoi dans ce chapitre sont décrites les méthodes mises en œuvre pour synthétiser une telle molécule.

1. Rétrosynthèse de la structure trifonctionnelle A

Notre objectif est de réaliser la molécule photoactivable **A**. La rétrosynthèse envisagée pour obtenir cette molécule est représentée sur le schéma suivant :

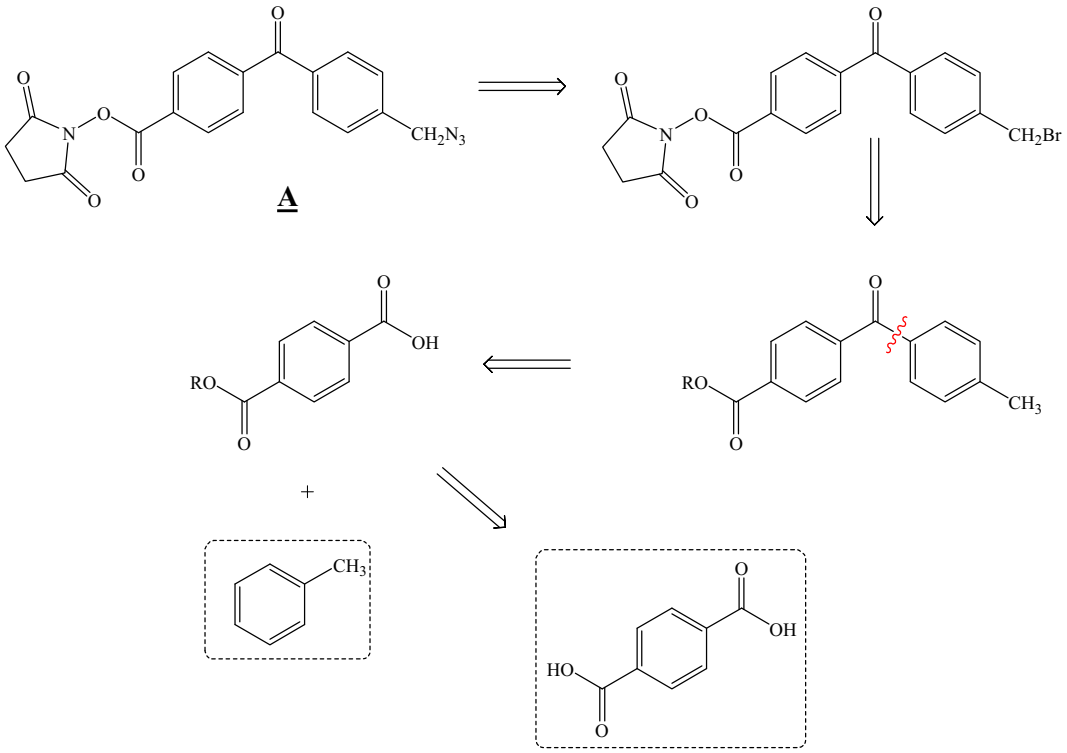


Schéma 11 : Schéma rétrosynthétique de la molécule A

Cette synthèse consisterait à réaliser une substitution nucléophile pour introduire la fonction azoture. Le composé bromé serait obtenu par une réaction de bromation radicalaire d'un groupement méthyle. L'ester activé serait quant à lui obtenu par estérification d'un acide, lui-même résultant d'une saponification d'un ester. Finalement, ce motif benzophénone serait formé *via* une réaction de type Friedel-Crafts. Peu d'étapes seraient donc nécessaires à la réalisation de cette molécule. Cependant, diverses difficultés et questions surgissent avant même la synthèse proprement dîte.

En effet, il faut tout d'abord savoir si le groupement -CH_2N_3 fixé sur notre molécule pour permettre la détection de la protéine d'intérêt résiste lors d'irradiations par UV. Nous avons vu dans le second chapitre que les azotures aromatiques sont utilisés en tant que groupements photoactivables et donc subissent des modifications chimiques lors de l'activation. Dans notre cas, nous sommes en présence d'un azoture aliphatique mais il est préférable de vérifier sa stabilité.

Une seconde difficulté est l'accessibilité des produits de départ nécessaires à cette synthèse. Comme on peut le voir sur le Schéma 11, les produits de départ sont le toluène, composé facilement accessible dans le commerce et le monoester méthylique de l'acide téréphtalique. Ce dernier est également commercial mais reste relativement coûteux.

Les paragraphes suivants montrent comment franchir ces deux principaux obstacles.

2. Tests de résistance du groupement pour la détection

Pour tester la résistance de notre azoture aliphatique lors de l'activation par irradiation UV, nous avons réalisé la synthèse d'une molécule simple, désigné par le symbole MT1 pour "molécule test 1". Cette molécule possède uniquement le motif benzophénone et le groupement azoture de méthylène qui nous intéresse.

2.1. Synthèse d'une molécule bifonctionnelle

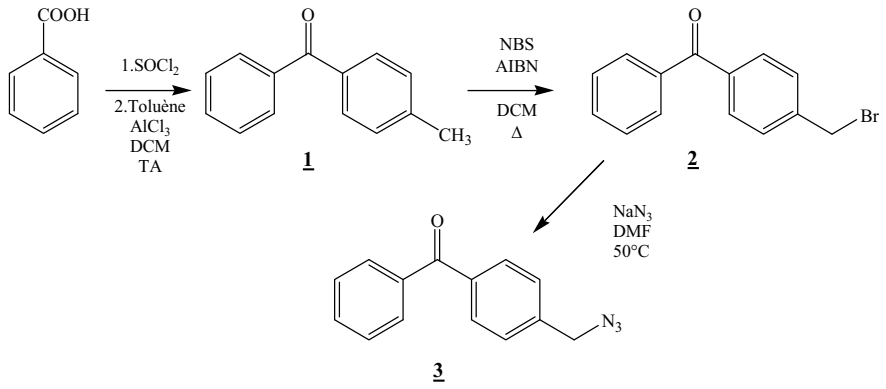


Schéma 12: Schéma synthétique de la molécule test (3)

Comme le montre le schéma ci-dessus, la synthèse de cette molécule se fait en trois étapes.

2.1.1. Formation du motif benzophénone

Dans ce manuscrit, nous employons le terme général de "benzophénone" à la place de "diphényl méthanone".

La préparation de la 4-méthylbenzophénone est largement décrite dans la littérature. Ce composé, pour ne citer que quelques exemples, peut être synthétisé par réaction faisant intervenir un organométallique,[53] une réaction de couplage catalysée,[54] le plus souvent par le palladium,[55] soit par acylation de type Friedel-Crafts.[56]
Ces réactions d'acylation entre des composés aromatiques et des halogénures permettent de former une liaison C-C et ainsi de préparer des cétones aromatiques. Ces composés sont souvent utilisés comme intermédiaire dans la synthèse de composés biologiquement actifs à visée thérapeutique, comme par exemple des anti-inflammatoires.[57]

Pour notre étude, nous avons choisi d'utiliser la méthode standard d'acylation[58] (en présence d'un acide de Lewis) car les réactifs nécessaires sont accessibles dans le commerce et les conditions opératoires aisées à mettre en œuvre.
La formation de la 4-méthylbenzophénone se fera donc *via* une réaction de Friedel-Crafts en présence de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) entre le toluène et le chlorure de benzoyle, préalablement formé avec l'acide benzoïque et le chlorure de thionyle ($SOCl_2$).

[53] (a) Paul, S.; Nanda, P.; Gupta, R.; Loupy, A. *Synthesis* **2003**, 2877-2881. (b) Sarvari, M.H.; Sharghi, H. *J. Org. Chem*. **2004**, *69*, 6953-6956. (c) Kangani, C.O.; Kelley, D.E.; Day, B.W. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6289-6292.
[54] (a) Xing, D.; Guan, B.; Cai, G.; Fang, Z.; Yang, L.; Shi, Z. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 693-696. (b) Ueura, K.; Miyamura, S.; Satoh, T.; Miura, M. *J. Organomet. Chem.* **2006**, *691*, 2821-2826.
[55] (a) Gooβen, L.J.; Winkel, L.; Döhring, A.; Ghosh, K.; Paetzold, J. *Synlett* **2002**, 1237-1240. (b) Urawa, Y.; Ogura, K. *Tetrahedron Lett*. **2003**, *44*, 271-273. (c) Wang, D.; Zhang, Z. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4645-4648. (d) Zhou, C.; Larock, R.C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2302-2303. (e) Bandgar, B.P.; Patil, A.V. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7627-7630. (f) Xin, B.; Zhang, Y.; Cheng, K. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5725-5731.
[56] (a) Olah, G.A. *Friedel-Crafts Chemistry* Ed. John Wiley & Sons NY, **1973**. (b) Matsushita, Y.; Sugamoto, K.; Matsui, T. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4723-4727. (c) Gopalkrishnan, M.; Sureshkumar, P.; Kanagarajan, V.; Thanusu, J. *Catalysis Commun.* **2005**, *6*, 753-756.
[57] (a) Janssen, P.A.J.; Van Daele, G.H.P. DE Patent 2,353,357 **1974**; *Chem. Abst* **1974**, *81*, 49433. (b) Janssen, P.A.J.; Van Daele, G.H.P.; Boey, J.M. US Patent 4 035 376 **1977**; *Chem. Abst*. **1977**, *87*, 167738.
[58] Suhana, H.; Srinivasan, P. *Synthetic Commun.* **2003**, *33*, 3097-3102.

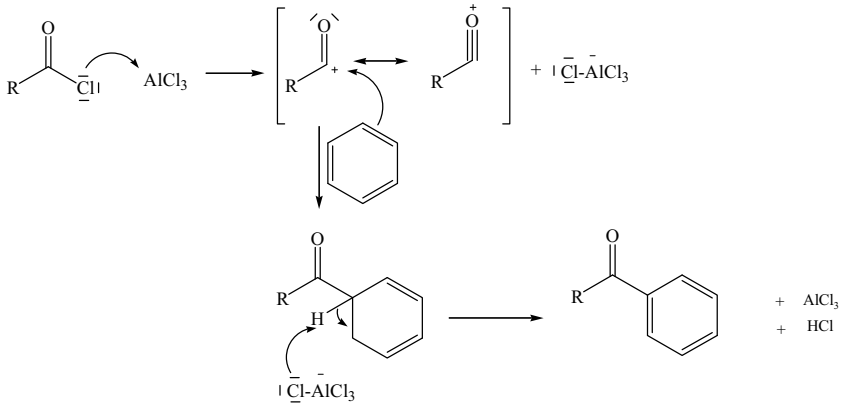


Schéma 13 : Mécanisme réactionnel d'une acylation de type Friedel-Crafts

Le composé **1** (Schéma 12) est obtenu avec 72% de rendement. Cette réaction a également été réalisée à température ambiante avec 3 équivalents d'$AlCl_3$ et/ou à reflux à la place de 1,5 équivalents. Les rendements obtenus lors de ces essais n'ont pas excédé 45%.

2.1.2. Introduction d'un halogène

L'introduction de l'halogène se fait par une bromation radicalaire. Pour cela, différents solvants peuvent être utilisés. Le plus souvent, cette réaction se fait dans le tétrachlorure de carbone (CCl_4) car la succinimide formée au cours de la réaction n'est pas soluble dans ce solvant et peut donc être éliminée par simple filtration. Les premiers essais ont été réalisés dans ce solvant et ont permis d'obtenir 75% de rendement. Cependant, ce solvant est à éviter de par sa toxicité.

Nous avons donc réalisé cette réaction dans le dichlorométhane. Certes, la succinimide formée ne peut plus être éliminée par filtration, mais plusieurs lavages à l'eau lors des traitements de la réaction permettent de contourner le problème. Dans ce cas, des rendements comparables voire supérieurs ont été obtenus (83%).

Le composé **2** (Schéma 12) a donc été préparé dans le dichlorométhane en présence de *N*-bromosuccinimide (NBS) et d'une quantité catalytique d'α,α'-azodiisobutyronitrile (AIBN). Pour initier la réaction, le milieu réactionnel a été porté à reflux à l'aide d'une lampe halogène de 500W.

Remarque :

Des tests ont été réalisés et montrent que lorsque la N-bromosuccinimide est ajoutée en une seule fois, le rendement obtenu est de l'ordre de 48% (résultat déduit des spectres RMN ^1H).

D'autre part, lorsque le reflux est assuré par simple chauffage, le rendement n'est que de 33%. C'est pourquoi nous avons réalisé cette étape sous lampe halogène et en ajoutant la NBS par petites quantités (de 0,4éq. en 0,4éq.).

2.1.3. Substitution nucléophile

La dernière étape est une substitution nucléophile de l'atome de brome. Cette réaction aboutit à la formation du composé **3** (Schéma 12) qui correspond à notre molécule test MT1.

Remarques :

*• Lors de la réalisation de cette synthèse, une purification à chaque étape ne s'est pas avérée nécessaire. La bromation n'étant pas totale, nous avons obtenu un mélange du composé **2** et du composé **1** de départ. L'étape suivante n'agit de façon quantitative que sur le composé bromé; la présence de la 4-méthylbenzophénone n'est pas gênante. De plus, la séparation des composés **1** et **3** par chromatographie sur gel de silice s'est révélée plus accessible que la séparation des composés **1** et **2**.*

• Le suivi des différentes étapes s'effectue grâce à l'exploitation des spectres RMN ^{1}H, dont on déduit les rendements lors de la bromation. Les protons du groupement méthyle correspondent à un singulet à 2,43 ppm, alors que ceux du groupement -$C\underline{H_2}Br$ correspondent à un singulet à 4,54 ppm et ceux du groupement -$C\underline{H_2}N_3$ correspondent à un singulet à 4,45 ppm.

Pour confirmer la présence du groupement azoture sur notre molécule, deux analyses ont été réalisées :

- une analyse par spectrométrie infrarouge qui montre la présence d'une bande fine vers 2100 cm^{-1}, caractéristique des azotures
- un test selon Punna[59] (cf. annexe 2) qui est fondé sur une réaction de Staudinger : réduction de l'azoture en amine primaire. Cette dernière est ensuite révélée à la ninhydrine et forme une tâche rose (test positif) en chromatographie sur couche mince (CCM).

[59] Punna, S.; Finn, M.G. *Synlett* **2004**, *1*, 99-100.

2.2. Test de résistance aux irradiations de l'azoture aliphatique

Ce groupement est, d'après Hosoya *et al*.,[60] "relativement photostable". Nous avons effectué des tests d'irradiation UV à des longueurs d'onde supérieures à 300nm. A des longueurs d'ondes plus courtes, comme par exemple 254nm, les protéines se dégradent et leur identification n'est plus possible sans perte d'information.
Des irradiations à 365nm sous une lampe UV standard ont été réalisées à des temps courts (de 0 à 15min). Un suivi RMN ^{1}H montre qu'il n'y a pas de modification (perte de l'azoture) durant ce laps de temps. Nous avons donc décidé d'augmenter le temps d'irradiation.
D'après les analyses RMN ^{1}H, réalisées en parallèle avec les analyses spectromètriques, on constate que pour une irradiation d'une heure, sous lampe UV standard à 365nm, il reste environ 70%[&] de composé possédant encore le groupement -CH_2N_3. Pour une irradiation de 2 heures, ce pourcentage diminue à 62% et au bout de 3 heures, il atteint 48%.

Le temps d'irradiation communément utilisé pour effectuer les irradiations est d'une heure sous 365nm, or nos résultats montrent que dans ce laps de temps notre azoture de méthylène aromatique est suffisamment stable.

C'est pour ces différentes raisons que nous travaillerons à des temps d'irradiation très courts (inférieur à 1h) mais suffisants pour permettre une photoincorporation, ainsi qu'à de faibles concentrations, diminuant ainsi le risque de dégradation du groupement azoture de méthylène.

Dans le paragraphe suivant, nous allons voir la synthèse du monoester méthylique de l'acide téréphtalique, produit de départ nécessaire pour la réalisation de notre première molécule trifonctionnelle **A**.

[60] Hosoya, T.; Hiramatsu, T.; Ikemoto, T.; Nakanishi, M.; Aoyama, H.; Hosoya, A.; Iwata, T.; Maruyama, K.; Endo, M.; Suzuki, M. *Org. Biomol. Chem*. **2004**, *2*, 637-641.
[&] Ces résultats ont été déduits des spectres RMN ^{1}H, ayant pris pour référence les protons aromatiques.

3. Synthèse du monoester méthylique de l'acide téréphtalique

Le monoester méthylique de l'acide téréphtalique est un réactif commercial, cependant il reste relativement coûteux. Nous avons donc décidé de nous attarder sur sa synthèse.

3.1. Bibliographie

Dans la littérature, on peut trouver quelques di ou monoesters aliphatiques de l'acide téréphtalique qui sont utilisés comme intermédiaires dans des synthèses d'intérêt industriel ou brevetées. Par exemple, Hotten[61] a utilisé le monoester méthylique de l'acide téréphtalique (Figure 9) pour faire des téréphtalamates métalliques. Il a montré que ces composés ont d'importantes propriétés (physiques et cristallographiques) en tant que gels utiles dans les savons. Vingt ans après, pour la formation d'amides aromatiques, Rondestvedt[62] a également utilisé ces monoesters.

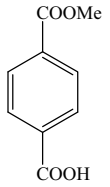


Figure 9 : Acide 4-(méthoxy carbonyl)benzoique

De nombreuses publications décrivent des voies d'accès au monoester méthylique de l'acide téréphtalique, aussi bien pour tester une nouvelle stratégie que pour synthétiser de nouvelles molécules.

Une méthode est de convertir l'acide 4-formylbenzoïque en ester puis par une oxydation de Swern,[63] ou à l'aide de réactifs sur support solide,[64] de former le monoester souhaité. D'autres chercheurs ont débuté leur synthèse avec le 4-formylbenzoate de méthyle pour l'oxyder avec divers réactifs[65] ou par voie électrochimique.[66] Des dérivés halogénés comme produit de départ ont également été utilisés comme le 4-chloro ou le 4-iodo benzoate de méthyle,[67] entre autres.[68]

---

[61] Hotten, B.W. *Ind. Eng. Chem.* **1957**, *49*, 1691-1694.
[62] Rondestvedt, C.S. Jr. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3118-3123.
[63] Sharma, S.K.; Tandon, M.; Lown, J.W. *Eur. J. Org. Chem*. **2000**, 2095-2103.
[64] Takemoto, T.; Yasuda, K.; Ley, S.V. *Synlett* **2001**, 1555-1556.
[65] (a) Webb, K.S.; Ruszkay, S.J. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 401-410. (b) Travis, B.R.; Sivakumar, M.; Hollist, G.O.; Borhan, B. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1031-1034. (c) Scholz, D. *Monatsh. Chem.* **1979**, *110*, 1471-1473.
[66] Tam, S.; Jimenez, L.; Diederich, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1503-1505.
[67] (a) Dufaud, V.; Thivolle-Cazat, J.; Basset, J-M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 426-427. (b) Ebert, G.W.; Juda, W.L.; Kosakowski, R.H.; Ma, B.; Dong, L.; Cummings, K.E.; Phelps, M.V.B.; Mostafa, A.E.; Luo, J. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4314-4317.
[68] (a) Ho, T-L. *Synth. Commun.* **1978**, *8*, 15-17. (b) Delgado, A.; Clardy, J. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2789-2790. (c) Giurg, M.; Said, S.B.; Syper, L.; Mlochowski, J. *Synth. Commun.* **2001**, *31*, 3151-3159.

Peu d'équipes débutent leur synthèse de ce monoester méthylique par l'acide téréphtalique. Bogert *et al.*[69] ont synthétisé cet ester, utilisé en tant qu'intermédiaire, à partir de l'acide téréphtalique dans le méthanol en présence d'acide chlorhydrique gaz. Dans les années 1980, Chihara[70] et Ogawa[71] ont étudié la formation du monoester méthylique de l'acide téréphtalique par chimisorption de l'acide téréphtalique sur alumine ou sur silice, en utilisant le sulfate de méthyle ou le diazométhane. Ceci fut pour nous une première base pour former ce monoester méthylique de l'acide téréphtalique.

3.2. Différentes voies de synthèse envisagées

Pour la synthèse de notre composé, nous avons décidé d'utiliser comme produit de départ l'acide téréphtalique. Cependant, réaliser des monoesters à partir d'un diacide carboxylique symétrique n'est pas aisé. Comme nous venons de le voir, la littérature ne rapporte que très peu de méthodes partant de l'acide téréphtalique. Nous avons donc suivi la méthode décrite par Ogawa et Chihara,[71] par chimisorption sur alumine en utilisant le sulfate de méthyle comme agent alkylant. La première étape de cette méthode consiste à fixer l'échantillon sur le support. Pour ce faire, 1 g d'alumine est ajouté à 10 ml de solution d'acide téréphtalique à 1% dans la DMF. Le mélange est agité pendant 8 heures puis l'alumine est filtrée et séchée. La seconde étape consiste à placer dans un ballon 6,4 ml de cyclohexane et 0,5 g d'échantillon fixé sur alumine (réalisée lors de la 1ère étape). A température ambiante et sous forte agitation, 1,5 éq. de sulfate de diméthyle sont ajoutés au milieu. Après 2 heures à reflux, l'alumine est filtrée puis éluée grâce à de l'acétate d'éthyle. Les auteurs ont obtenu des rendements qui varient en fonction du solvant utilisé lors de la seconde étape. Par exemple, ils obtiennent 72% de monoester et 12% de diester lors de la réaction faite dans le cyclohexane et des rendements inférieurs à 7% de monoester quand celle-ci est faite dans le dioxane ou le formamide.

Cependant, tous les essais que nous avons réalisés, en reproduisant les conditions indiquées puis en modifiant certains paramètres, nous ont permis d'obtenir au maximum des rendements de l'ordre de 5 % en monoester méthylique.

[69] Bogert, M.T.; Harris, C.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1919**, *41*, 1676-1690.
[70] Chihara, T. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1980**, *24*, 1215-1216.
[71] (a) Ogawa, H.; Chihara, T.; Taya, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 1365-1369. (b) Ogawa, H.; Ichimura, Y.; Chihara, T.; Teratani, S.; Taya, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1986**, *59*, 2481-2483.

Après de nombreuses tentatives peu fructueuses, nous avons testé d'autres méthodes, plus courantes, pour réaliser une monoestérification (notre produit de départ étant toujours l'acide téréphtalique) :

1. DCC (1,1 éq.*) /MeOH (1,1 éq.*) / THF/ 5°C/ 20 h

   Observations : Seul le diester (en faible quantité) a été obtenu

2. K_2CO_3 (3 éq.*)/ MeI (3 éq.*)/ DMF/ reflux[72]

   Observations : Le monoester n'a pas été obtenu cependant nous avons obtenu 36% de diester.

Essais avec le chlorure de thionyle :

3. i.$SOCl_2$/ reflux 5 h ii.MeOH/ reflux

   Observations : 5% de diester, le reste étant de l'acide de départ

4. MeOH/ reflux/ $SOCl_2$ (1 éq.* goutte à goutte)

   Observations : 11% de diester

Ayant quelques difficultés à obtenir directement le monoester méthylique, nous avons mené en parallèle différents essais pour obtenir un ester benzylique à partir de l'acide téréphtalique. L'ester benzylique a été choisi car l'alcool benzylique nécessaire à sa réalisation est relativement stable en milieu acide. De plus, cet ester benzylique peut facilement être retransformé en acide par hydrogénolyse.

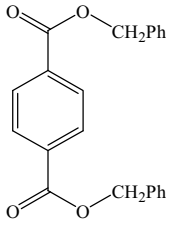
5. $SOCl_2$ (1 éq.*)/ alcool benzylique/ DCM/ reflux

   Observations : produit de départ

6. i.$SOCl_2$/ reflux ii.alcool benzylique (2 éq.*)/ DCM

   Observations : Formation de diester (80% avec des traces d'acide téréphtalique)

Ayant obtenu le diester benzylique (composé **4**) avec un bon rendement, nous avons tenté sur ce dernier de réaliser la monosaponification dans l'éthanol absolu et 1éq. d'hydroxyde de potassium, à reflux. Bien qu'un monoester de l'acide téréphtalique ait été obtenu avec un rendement de 95%, ce ne fut pas celui attendu, c'est-à-dire le monoester benzylique. En effet les analyses effectuées sur le produit obtenu nous ont montré que nous étions en présence du monoester éthylique.



4

Figure 10 :
Téréphtalate de dibenzyle

* Les équivalents sont donnés par rapport à la quantité d'acide téréphtalique utilisée.

[72] Zhu, J.; Wang, X-Z.; Chen, Y-Q.; Jiang, X-K.; Chen, X-Z.; Li, Z-T. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6221-6227.

A la vue de ces résultats, nous avons réalisé d'autres essais mais en utilisant non plus l'éthanol mais le méthanol en tant que solvant lors de la monosaponification; ces essais ayant pour but de confirmer notre hypothèse qui est le remplacement des groupements alkoxyles. Le monoester méthylique a bien été obtenu avec des rendements de l'ordre de 80%, mais avec des traces d'acide téréphtalique. Ce même phénomène de remplacement a été observé par Reimer *et al*.[73] en 1921, et par Williams *et al*.[74] en 1960.

Ce phénomène de remplacement, ou transestérification, nous a permis d'obtenir notre monométhylester de l'acide téréphtalique. Cependant, nous avons tenté de nous affranchir de l'utilisation de l'alcool benzylique, qui reste difficile à éliminer en fin de réaction. Pour cela nous avons exploité la voie de synthèse qui utilise le chlorure de thionyle.
Après optimisation, quantité et/ou moment d'addition du chlorure de thionyle, un protocole nous a permis d'obtenir le monoester voulu en 2 étapes avec de bons rendements. Pour ce faire, nous avons utilisé l'acide téréphtalique dans le méthanol que nous avons mis à reflux pendant 30 min, puis 10 éq. de $SOCl_2$ ont été ajoutés goutte à goutte. Après l'ajout, le reflux est maintenu pendant 4 h, puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit obtenu (correspondant au diester) est remis directement en réaction pour l'étape suivante qui consiste à faire une monosaponification. Le diester est donc mis en suspension dans le méthanol. Au bout de 15 min à reflux, 1 éq. de potasse est ajouté au milieu réactionnel. Après 3 heures et demi de reflux, le méthanol est évaporé. Le résidu obtenu est dissous dans l'eau et extrait au dichlorométhane. La phase aqueuse est acidifiée avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré. Le précipité obtenu est filtré sur Büchner puis séché.
Grâce à cette méthode, facile à mettre en œuvre et peu onéreuse, le monoester méthylique de l'acide téréphtalique a été obtenu avec un rendement global de 76%. Nous avons donc pu débuter la synthèse de notre molécule cible **A**.

En parallèle, nous avons tenté d'appliquer cette voie de synthèse pour synthétiser d'autres diesters et monoesters de l'acide téréphtalique.

[73] Reimer, M.; Downes, H.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1921**, *43*, 945-951.
[74] Williams, J.L.R.; Laakso, T.M.; Dunham, K.R.; Borden, D.G.; VanDerBerghe, J.; VanAllan, J.A.; Reynolds, D.D. *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 817-820.

3.3. Généralisation de la méthode

Dans la littérature, nous avions également trouvé une méthode pour réaliser une monohydrolyse sélective de diesters symétriques mais non aromatiques.[75]

Nous avons donc décidé d'appliquer notre méthode à d'autres alcools afin de la valider en milieu aromatique (Schéma 14).

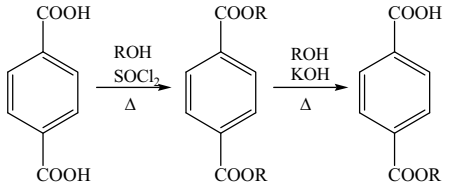


Schéma 14 : Formation de di- et mono-esters de l'acide téréphtalique
Généralisation de la méthode

Dans les expériences suivantes, l'éthanol,[a]le propanol,[b]l'*iso*-propanol[c]et le *n*-butanol ont été utilisés pour obtenir les diesters de l'acide téréphtalique correspondant.

			Pf (°C)	
R	Produit	Rendement (%)[a]	Trouvé	Littérature[b]
Me	**5a**	99%	140-141	141-142
Et	**5b**	89%	46-47	44
Pr	**5c**	99%	29-31,5	31
i-Pr	**5d**	39%	57-59	55-56
Bu	**5e**	95%	huile[c]	6

Tableau 1 : Diestérification de l'acide téréphtalique

De bons rendements ont été obtenus pour les alcools primaires (Tableau 1). Cependant pour l'*iso*propanol (alcool secondaire), le rendement n'est que de 39%. Ceci peut s'expliquer par un effet d'encombrement stérique.

[75] Niwayama, S. *J. Org. Chem*. **2000**, *65*, 5834-5836.
[a] Rendements obtenus par RMN ^{1}H
[b] Pollock, J.R.A.; Stevens, R. *Dictionary of Organic compounds* Fourth Ed. Eyre&Spottiswoode **1965-1978** Vol 5,p 2949.
[c] A température ambiante

			Pf (°C)	
R	Produit	Rendement (%)	Trouvé	Littérature[b]
Me	**6a**	76%	219-220	230
Et	**6b**	72%	168-169	171
Pr	**6c**	72%	130	127-129
i-Pr	**6d**	62%	164	166
Bu	**6e**	13%	123-125	122-124

Tableau 2 : Monosaponification de diester de l'acide téréphtalique

Suite à une monosaponification des diesters, les monoesters correspondants ont été obtenus avec des rendements allant de 62 à 72%, à l'exception du monoester butylique (13%) (Tableau 2). Cette chute de rendement s'explique par la faible solubilité de la potasse dans le *n*-butanol.

Nous avons utilisé, lors de ces essais, les alcools correspondants comme solvants et réactifs évitant ainsi toute transestérification (que nous avions observée précédemment). Il faut noter que les alcools utilisés doivent être secs car toute présence d'eau dans le milieu augmente la formation d'acide téréphtalique et donc la pollution du monoester obtenu lors de la saponification. Cependant, ces traces d'acide peuvent être éliminées en solubilisant le produit obtenu dans la solution d'hydroxyde de potassium et en le filtrant rapidement pour éliminer les suspensions. Le rendement en monoesters diminue mais les produits obtenus sont purs.

Nous avons donc mis au point une méthode qui permet, à partir de l'acide téréphtalique, d'accéder facilement à divers diesters et surtout monoesters de ce dernier.[76]

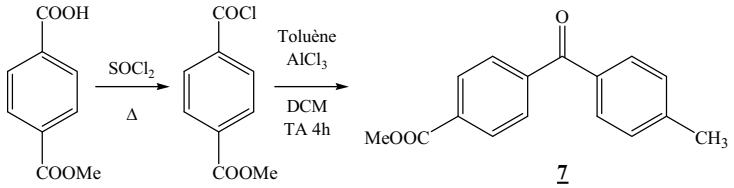
[76] Chenot, E-D.; Bernardi, D.; Comel, A.; Kirsch, G. *Synth. Commun.* **2007**, *37*, 483-490.

4. Synthèse de la structure trifonctionnelle A

Un de nos objectifs est d'atteindre la structure trifonctionnelle **A**, également appelée "molécule cible **A**" et dont nous avons vu le schéma rétrosynthétique précédemment (Schéma 11). Nous allons décrire dans le paragraphe suivant la voie de synthèse suggérée par ce même schéma, que nous appellerons la voie directe.

4.1. Voie directe

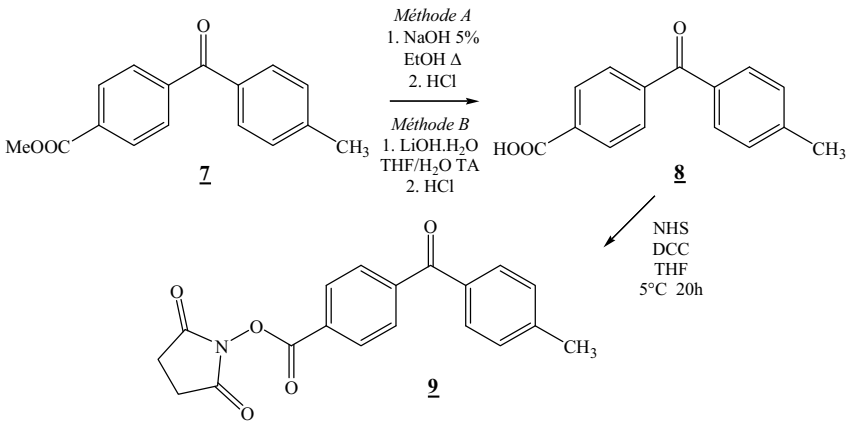
4.1.1. Formation du motif photoactivable



Cette préparation s'effectue en deux étapes, avec tout d'abord la formation du chlorure d'acide puis une réaction de type Friedel-Crafts.

Le monoester méthylique de l'acide téréphtalique est mis en suspension dans le chlorure de thionyle (ici utilisé comme réactif et comme solvant). Après 4h à reflux, l'excès de chlorure de thionyle est éliminé. Le chlorure d'acide ainsi formé est remis en présence de toluène et de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) dans le dichlorométhane à température ambiante. La benzophénone **7** est obtenue avec un rendement de 87%.

4.1.2. Formation de l'ester activé pour le couplage au glutathion



Ce composé **7** va tout d'abord être saponifié. Pour cela, deux méthodes ont été testées. La première se fait à reflux pendant 3h en présence de soude et la seconde se fait à température ambiante pendant 30 minutes. Toutes deux permettent d'obtenir le produit désiré, cependant les rendements obtenus sont de 65% et 96% respectivement. La seconde méthode sera donc privilégiée de par son temps de réaction et ses hauts rendements.

Après saponification, le composé **8** est estérifié en présence de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) ainsi que de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (Figure 11). L'ester activé **9** est obtenu avec un rendement de 70% après filtration sur coton pour éliminer la dicyclohexylurée (DCU) formée et évaporation du solvant sous pression réduite.

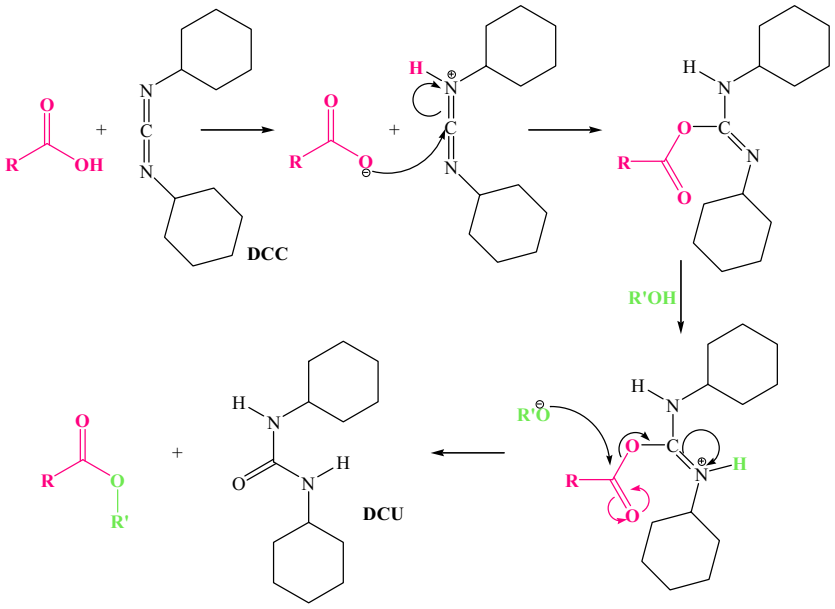


Figure 11 : Mécanisme réactionnel d'estérification en présence de DCC

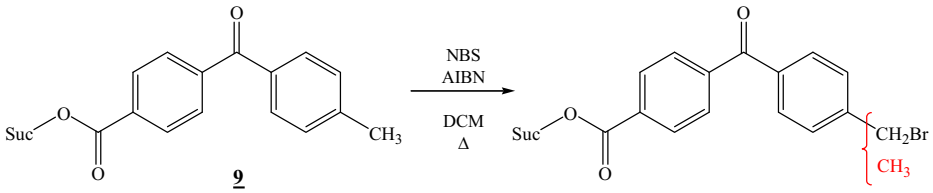
Le composé **8** possède le groupement photoactivable (motif benzophénone) et l'ester activé (motif succinimique).

Les étapes suivantes vont donc consister à introduire le groupement permettant la détection, c'est-à-dire l'azoture.

4.1.3. Formation de l'azoture de méthylène pour la détection

Cette formation a lieu en deux étapes : une bromation radicalaire suivie d'une substitution nucléophile.

4.1.3.1. Bromation radicalaire



9

Cette étape se fait en présence de *N*-bromosuccinimide et d'α,α'-azodiisobutyronitrile dans le dichlorométhane sous lampe halogène.

Nous avons obtenu 89% de composé bromé (pourcentage déduit des spectres RMN ^{1}H par rapport aux intégrations des aromatiques). Cependant, les produits de départ et monohalogéné n'ont pas pu être séparés par chromatographie, que ce soit sur silice ou sur alumine, et ce avec divers éluants. Des essais d'optimisation de la réaction nous ont conduit à la formation du composé dibromé, qui ne permet pas de résoudre le problème rencontré.

N'ayant pas réussi à séparer les deux composés (produit de départ et produit monobromé), nous avons continué la voie de synthèse avec ce mélange.

4.1.3.2. Substitution nucléophile

Le résultat que l'on peut attendre de cette réaction de substitution nucléophile est un mélange de trois produits (-CH_3, -CH_2Br, -CH_2N_3) qui reste difficile à séparer, ou un mélange de deux produits (-CH_3 et -CH_2N_3) si la réaction est quantitative. Nous avons fait l'essai et nous nous sommes trouvés dans le second cas, car la réaction de substitution nucléophile du brome par l'azoture est quantitative (d'après les spectres RMN ^{1}H). Malgré la différence de polarité de ces deux composés, nous n'avons pas pu séparer le composé final (**A**) de la méthyl benzophénone **9** de départ.

Il est important de noter que le composé **A** doit être impérativement pur car il est destiné à des tests biologiques. La moindre impureté peut entraîner des résultats erronés lors de ces derniers (marquage par photoaffinité ou inhibition enzymatique).

C'est pourquoi différentes techniques de séparation ont été testées pour obtenir le composé **A**.

4.2. Essais de séparation

* Première proposition :

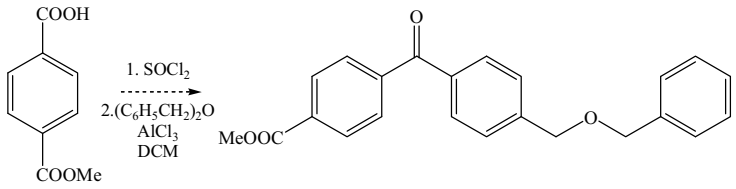
Éviter l'étape de bromation et débuter la synthèse de la molécule **A** avec d'autres réactifs.

- Réaction de Friedel-Crafts avec le chlorure ou le bromure de benzyle

Par cette réaction, du fait de la présence directe de la fonction $-CH_2Cl$ sur le phényl, le problème de séparation et de réaction de bromation non totale ne se pose plus. Nous avons fait réagir le monoester méthylique de l'acide téréphtalique, après avoir fait le chlorure d'acide correspondant, sur le chlorure (ou le bromure) de benzyle. Les mêmes conditions expérimentales que lors de la synthèse du composé **7** ont été utilisées. Cependant, comme on pouvait le présager, des sous-produits ainsi que les produits de départ ont été obtenus. Ceci peut s'expliquer par le fait de la grande réactivité des halogénures benzyliques.

- Réaction de Friedel-Crafts avec l'éther benzylique

La réaction de Friedel-Crafts a été réalisée entre le chlorure d'acide du monoester méthylique de l'acide téréphtalique et de l'éther benzylique. Le motif benzophénone serait obtenu ainsi que la fonction éther benzylique qui est un groupement protecteur des alcools. Un passage par un composé bromé ne serait donc plus nécessaire.



On pouvait s'attendre à de faibles rendements, mais seuls les produits de départ ont été obtenus. Ce résultat peut s'expliquer par la fait que les cycles aromatiques de l'éther benzylique sont pauvres en électrons (caractère électroattracteur de l'oxygène).

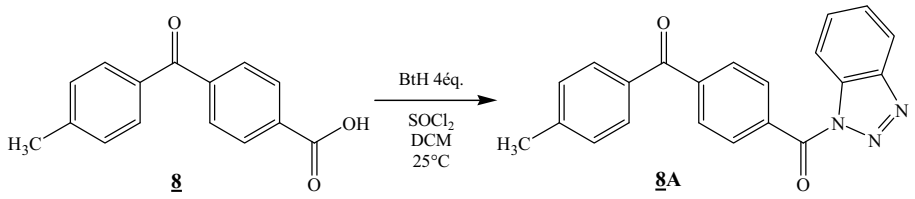
Ces différents essais n'ont pas permis de palier le problème de séparation. Nous nous sommes donc orientés vers une seconde proposition.

* Seconde proposition :

Le problème de séparation des composés peut être causé par le fait de la polarité du groupement *N*-succinimide. Cette hypothèse peut être appuyée par le fait que la séparation de MT1 (**3**), qui ne possède pas la fonction ester, est certes peu aisée mais est possible. Nous avons donc tenté de remplacer cet acide activé afin de procéder à une séparation, puis de le réintroduire une fois la séparation réalisée.

- Remplacement du groupement activant l'acide

Pour notre premier essai, nous avons utilisé le mode opératoire décrit par Katritzky,[77] pour introduire un groupement benzotriazole. Ce dernier a été choisi car c'est un bon groupement partant, rendant ainsi possible la réintroduction, par la suite, du groupement *N*-succinimide. L'acide 4-(4'-méthylbenzoyl)benzoique (**8**) a été notre produit de départ pour cette réaction.



Pour cela un équivalent d'acide a été ajouté à un mélange de 1*H*-1,2,3-benzotriazole et de chlorure de thionyle dans le dichlorométhane. Après traitement du milieu réactionnel et purification sur colonne, le composé **8A** est obtenu avec 56% de rendement.

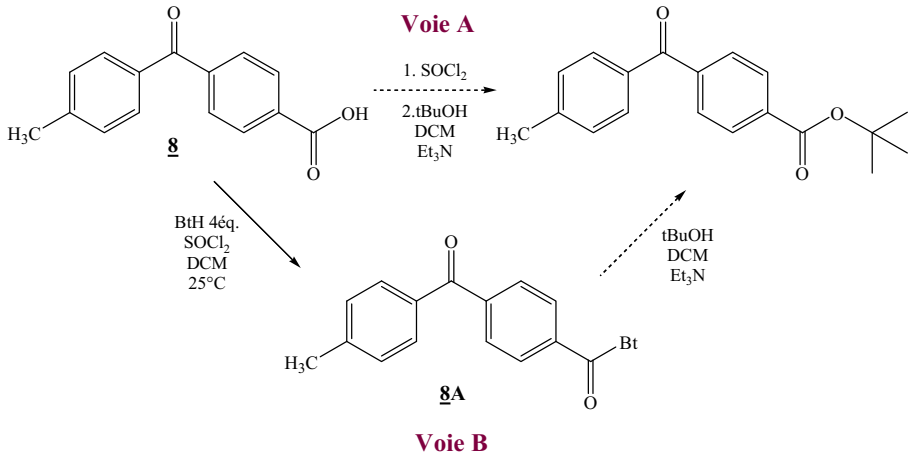
Ce composé est ensuite bromé en présence de NBS (*N*-bromosuccinimide) et d'AIBN (α,α'-azodiisobutyronitrile). Le composé bromé s'est bien formé (apparition d'un pic en RMN ^{1}H à 4,56ppm). Cependant la réaction n'est pas totale, posant ainsi le même problème de séparation que lors de la voie dîte directe.

Un second essai a été réalisé dans le but d'introduire un groupement *tert*-butylique sur l'acide. Ce groupement est couramment utilisé comme groupement protecteur des acides carboxyliques.

[77] (a) Katritzky, A.R.; Zhang, Y.; Singh, S.K. *Synthesis* **2003**, 2795-2798. (b) Katritzky, A.R.; Shestepalov, A.A.; Suzuki, K. *Synthesis* **2004**, 1806-1813.

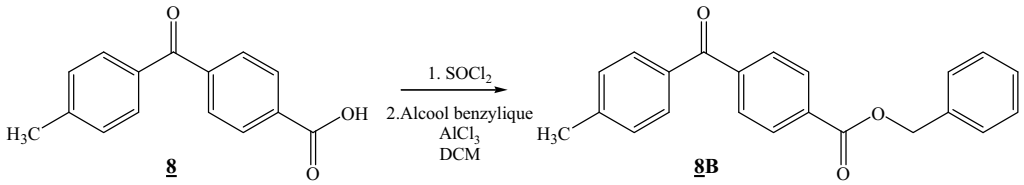
Pour cela, deux voies de synthèse ont été utilisées :

1. la formation d'un chlorure d'acide que l'on fait réagir sur le *tert*-butanol (voie A)
2. le passage par le dérivé benzotriazole (voir essai précédent) pour le faire ensuite réagir sur le tert-butanol (voie B).



Cependant, aucune de ces voies n'a permis d'obtenir le *tert*-butyl 4-(4-méthylbenzoyl)benzoate.

Une dernière tentative a consisté à protéger l'acide avec un groupement benzyle, en faisant réagir le chlorure d'acide sur l'alcool benzylique.



L'ester a été obtenu avec un faible rendement (3%). Nous avons réalisé une bromation sur ce composé. Seul 30% de composé a été bromé, posant ainsi le même problème de séparation.
Suite à ces différents essais, on peut déduire que le fait de modifier la nature de l'acide activé ne modifie pas ou trop faiblement la polarité entre les composés méthyle et bromométhylène.

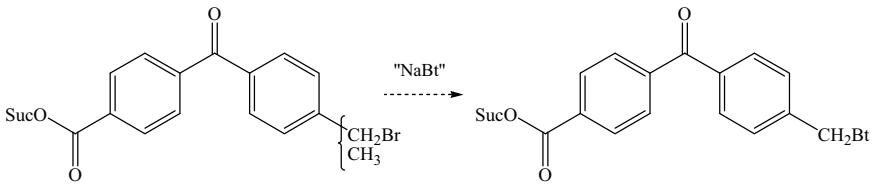
* Troisième proposition

Nous nous sommes intéressés au dernier des trois groupements présents sur notre sonde qui est le groupement aliphatique.

- Substitution de l'atome de brome

Pour réaliser ces essais, nous sommes partis du mélange obtenu lors de la bromation du composé **9**. Le but est de faire réagir uniquement le composé bromé pour une séparation future.

~ Pour la première expérience, nous avons utilisé le benzotriazole. De par sa propriété de bon groupement partant, il permettrait de réaliser une substitution pour fixer l'azoture nécessaire pour notre molécule finale. De plus étant polaire, il permettrait d'obtenir une différence de polarité avec le composé méthyle n'ayant pas réagi. Une séparation deviendrait à ce stade possible.



Pour introduire le groupement benzotriazole, diverses méthodes sont possibles.[78] Dans notre cas, de par la présence d'un halogénure aliphatique sur notre molécule, son introduction peut se fait par substitution. Pour cela, une méthode traditionnelle est d'employer une base afin de former "BtNa".

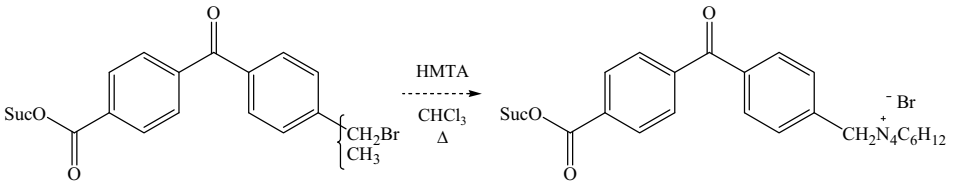
Deux conditions ont donc été testées pour réaliser cette expérience. Dans un premier temps, le 1*H*-1,2,3-benzotriazole (BtH) a été mis en présence de soude dans l'acétonitrile à température ambiante puis a été ajouté goutte à goutte à notre mélange (-CH_3/-CH_2Br).

La seconde expérience a été réalisée dans l'éther avec le 1*H*-1,2,3-benzotriazole en présence d'hydrure de sodium.

Aucune de ces deux conditions ne nous a permis d'obtenir le produit désiré.

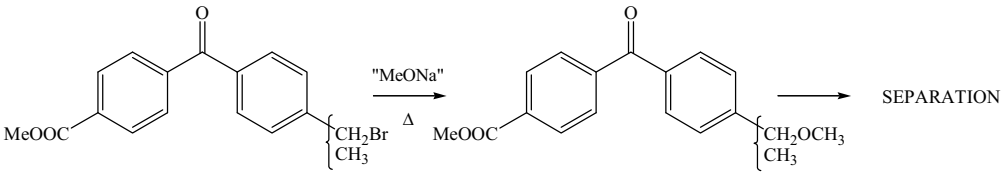
[78] Katritzky, A.R.; Lan, X.; Yang, J.Z.; Denisko, O.V. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 409-548.

~ Une seconde expérience a consisté à passer par un sel. Le passage par un sel quaternaire peut s'avérer intéressant. En effet, la séparation peut s'effectuer par simple filtration, le sel n'étant pas soluble dans les solvants organiques.



En nous inspirant de la réaction de Sommelet,[79] nous avons tenté de former le sel, état intermédiaire de la réaction, à l'aide de l'hexaméthylènetétramine (HMTA), mais celui-ci ne s'est pas formé.

~ La formation d'un éther à partir du composé bromé peut également être envisagée. Pour cela, nous avons fait réagir le méthanolate de sodium avec le mélange (composé monobromé et composé méthylé). Cette réaction de substitution est sélective et quantitative. En effet, tout le produit bromé a été transformé. Un mélange de produit de départ (-CH_3) et de produit possédant la fonction éther a donc été obtenu.



Ce passage par un éther permet, du fait d'une différence de polarité, une séparation des composés après la bromation radicalaire.

Suite à ces résultats, nous avons envisagé une nouvelle voie de synthèse pour former notre première molécule cible **A**.

[79] Angyal, S.J.; Tetaz, J.R.; Wilson, J.G. *Org. Synth.* **1963**, *5*, 690. (b) Campaigne, E.; Bourgeois, R.C.; McCarthy, W.C. *Org. Synth.* **1963**, *4*, 918.

4.3. Nouvelle voie de synthèse

Après les essais de séparation, nous avons opté pour le passage par un éther.
Le Schéma 15 représente cette nouvelle voie de synthèse envisagée.

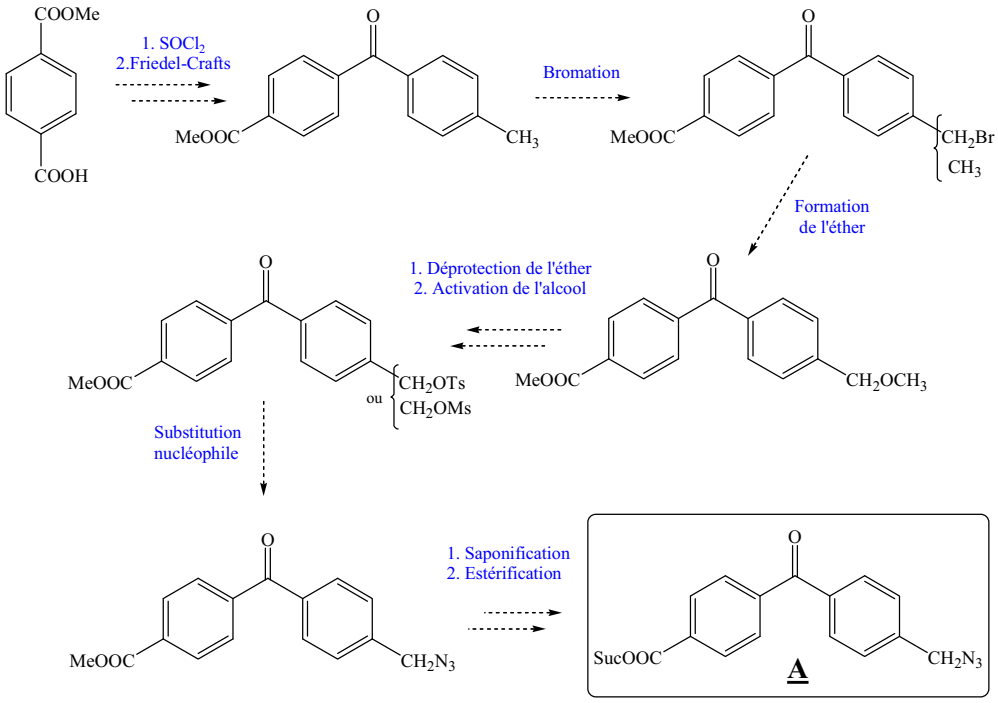


Schéma 15 : Nouvelle voie de synthèse envisagée pour la synthèse de A

La première étape est une acylation qui fut réalisée lors de la synthèse par voie directe. A la place d'effectuer directement la saponification, nous avons choisi de réaliser la bromation. Dans cette voie de synthèse, le fait d'obtenir un mélange de composé méthyle et monobromomé ne pose pas de problème comme nous l'avons montré lors des essais de séparation. Ce mélange va donc être mis en présence de méthanolate de sodium afin d'obtenir un éther méthylique. Après purification, ce composé est remis en réaction en présence de tribromure de bore pour obtenir l'alcool correspondant. Ce dernier est ensuite tosylé ou mésylé[80] pour permettre l'introduction de l'azoture. Les deux étapes correspondant à la formation de l'ester activé consisteront à la saponification de l'ester méthylique puis à l'estérification de l'acide obtenu en ester *N*-succinimide. La molécule **A** pourra ainsi être obtenue.

[80] Kan, T.; Tminari, Y.; Morohashi, Y.; Natsugari, H.; Tomita, T.; Iwatsubo, T.; Fukuyama, T. *Chem. Commun.* **2003**, 2244-2245.

Lors de la réalisation de cette voie de synthèse, plus exactement lors du passage de l'éther méthylique à l'alcool, nous avons obtenu un produit mais ne correspondant pas à l'alcool attendu. L'analyse de ce composé a permis de déterminer qu'il s'agissait du composé bromé.
En effet, le tribromure de bore est un acide de Lewis souvent utilisé pour la déprotection des alcools ou des amines. Il se coordine avec l'oxygène des fonctions éthers ou esters et favorise ainsi le clivage des liaisons C-O. Ce clivage conduit à la formation de bromures d'alkyles et des alcoxyboranes ou alcoxycarbonylboranes. Généralement ces derniers sont hydrolysés au cours du traitement de la réaction pour former des alcools ou acides correspondants dans le cas de groupement methoxy aromatiques.[81] Dans notre cas le tribromure de bore nous a permis d'obtenir le composé bromé.
Arrivé à cette étape, on peut penser que c'est un "retour en arrière" car on obtient à nouveau le composé bromé obtenu lors de la bromation radicalaire. Mais en réalité, cette étape nous a permis d'obtenir ce composé de façon pure. Car comme le montre le schéma suivant, nous sommes partis d'un mélange que nous n'arrivions pas à séparer ($-CH_3$ et $-CH_2Br$), puis nous avons formé l'éther de façon sélective et quantitative, ce qui a rendu possible une séparation des deux composés sur gel de silice.

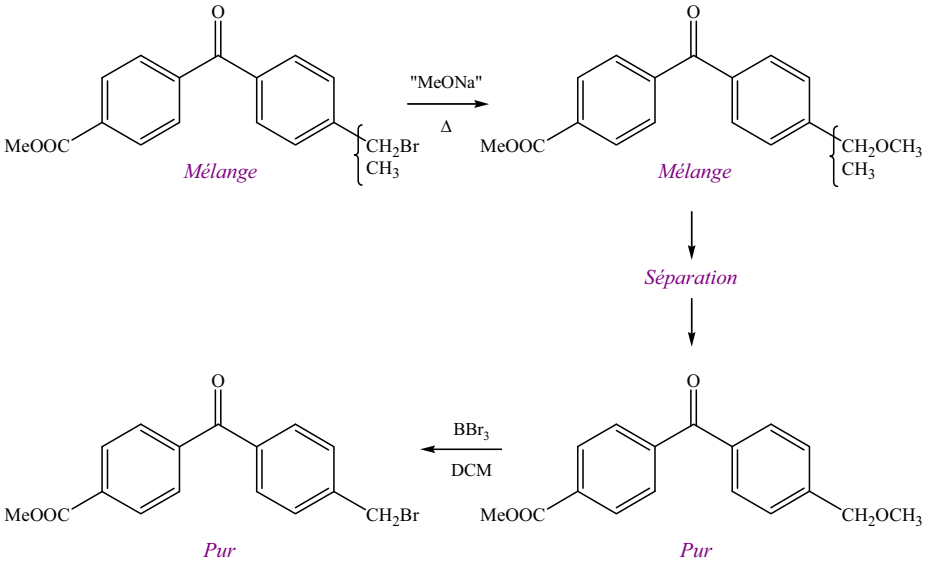


Schéma 16 : Séparation rendue possible par le passage par un éther

Finalement, nous avons fait réagir le tribromure de bore (BBr_3) sur l'éther purifié, ce qui nous a conduit au composé bromé pur car cette réaction est quantitative.

[81] McOmie, J.F.W.; Watts, M.L.; West, D.E. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 2289-2292.

Un avantage de cette réaction est le fait que l'étape d'activation de l'alcool par un groupement tosyle n'est plus nécessaire.

Cette étape nous a donc permis d'obtenir un produit bromé pur pouvant être utilisé pour effectuer la substitution nucléophile du brome par l'azoture. Une fois la fonction azoture fixée sur notre benzophénone, il ne nous manque plus que l'ester activé permettant la fixation au glutathion. Pour cela, nous avons envisagé une saponification suivie d'une estérification pour fixer le groupement *N*-succinimide. Cependant la saponification ne s'est pas faite.

Nous avons donc décidé de faire l'étape de saponification directement après la formation de l'éther et dans ce cas de bons rendements ont été obtenus (88%). Le composé **11** ainsi obtenu a ensuite été mis en réaction en présence de BBr_3 pour former le composé bromé correspondant. Les deux dernières étapes, à savoir la formation de l'azoture méthylène et l'estérification, nous a conduit au composé **A** voulu avec un rendement de 72%.

4.4. Schéma récapitulatif de la synthèse de la molécule cible **A**

Le schéma suivant représente la voie de synthèse finalement utilisée pour obtenir notre première molécule cible **A**.

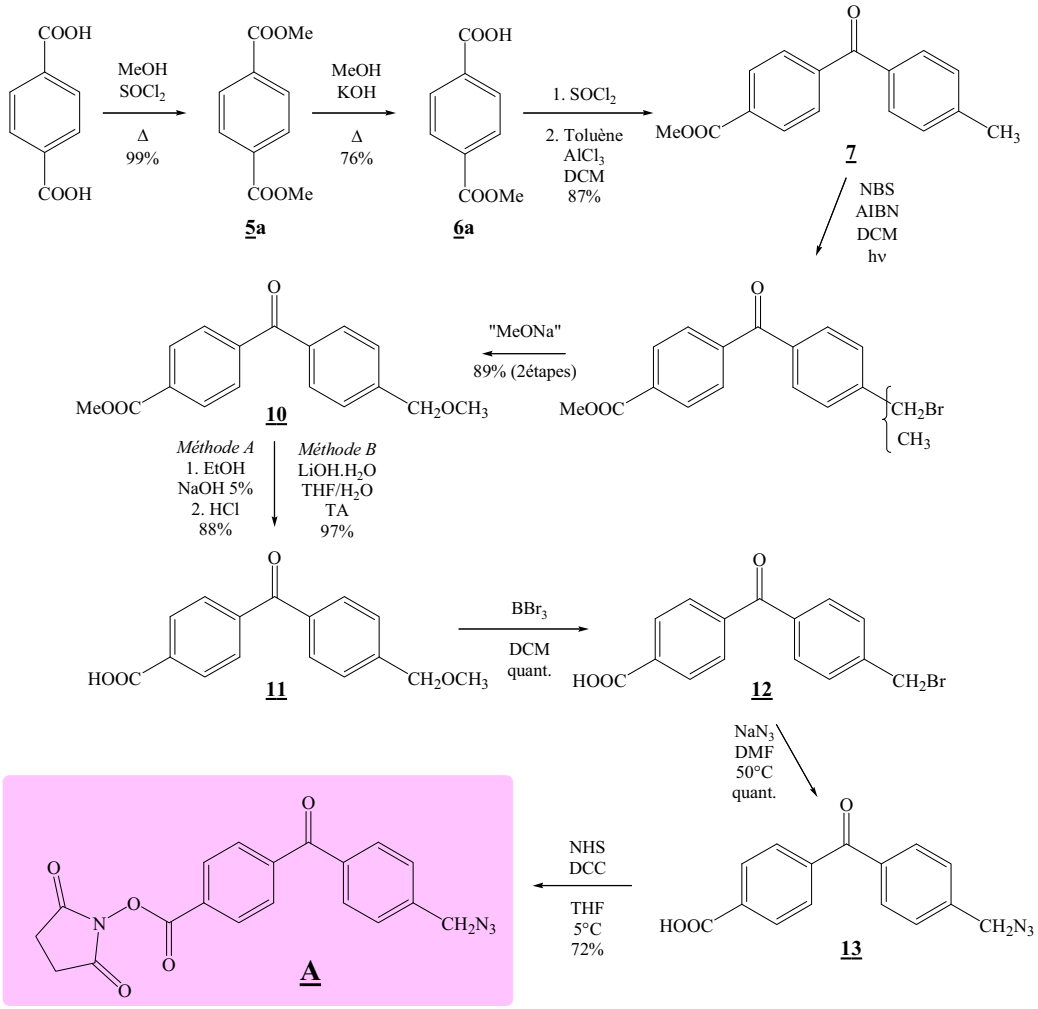


Schéma 17 : Voie de synthèse de la molécule cible A

Partie expérimentale

Synthèse de la molécule test 3 ***67***

Formation du motif benzophénone 67
(4-Méthylphényl)(phényl)méthanone *ou 4-méthylbenzophénone* (1) 67

Introduction d'un halogène / Bromation radicalaire 68

Introduction de l'azoture / Substitution nucléophile 68
[4-(Azidométhyl)phényl](phényl)méthanone (3) 68

Formation du diester benzylique de l'acide téréphtalique ***70***
Téréphtalate de dibenzyle (4) 70

Synthèse du monoester méthylique de l'acide téréphtalique ***71***

Diestérification 71
Téréphtalate de diméthyle (5a) 71

Monosaponification 72
Acide 4-(Méthoxycarbonyl)benzoïque (6a) 72

Généralistaion de la méthode ***73***

Diestérification 73
Téréphtalate de diéthyle (5b) 73
Téréphtalate de dipropyle (5c) 74
Téréphtalate de di*iso*propyle (5d) 74
Téréphtalate de dibutyle (5e) 75

Monosaponification 76
Acide 4-(éthoxycarbonyl)benzoïque(6b) 76
Acide 4-(propoxycarbonyl)benzoïque(6c) 76
Acide 4-(isopropoxycarbonyl)benzoïque (6d) 77
Acide 4-(butoxycarbonyl)benzoïque(6e) 77

Synthèse de la structure trifonctionnelle (molécule cible) A ***78***

Voie directe 78
4-(4-Méthylbenzoyl)benzoate de méthyle (7) 78
Acide 4-(4-Méthylbenzoyl)benzoïque (8) 79
1-{[4-(4-Méthylbenzoyl)benzoyl]-*N*-oxy}pyrrolidine-2,5-dione (9) 80

Essais de séparation 81
[4-(1*H*-1,2,3-Benzotriazol-1-ylcarbonyl)phényl](4-méthylphényl)méthanone (8A) 81
Benzyl 4-(4-méthylbenzoyl)benzoate (8B) 82

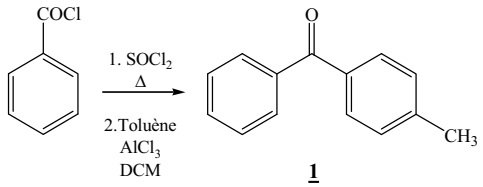
Synthèse de la structure trifonctionnelle (molécule cible) **A** : passage par un éther 83
Méthyl 4-[4-(méthoxyméthyl)benzoyl]benzoate (10) 83
Acide 4-[4-(Méthoxyméthyl)benzoyl]benzoïque (11) 84
Acide 4-[4-(bromométhyl)benzoyl]benzoïque (12) 85
Acide 4-[4-(azidométhyl)benzoyl]benzoïque(13) 86
1-({4-[4-(Azidométhyl)benzoyl]benzoyl}-*N*-oxy)pyrrolidine-2,5-dione (A) 87

Synthèse de la molécule test 3

Formation du motif benzophénone

(4-Méthylphényl)(phényl)méthanone *ou 4-méthylbenzophénone* (1)

$C_{14}H_{12}O$ $MW= 196,24 g.mol^{-1}$



1

A 0,69ml (1éq., 6mmol) de chlorure de benzoyle sont ajoutés 15ml de chlorure de thionyle (utilisé comme réactif et comme solvant). Après 4h à reflux, le chlorure de thionyle est évaporé sous pression réduite. Le chlorure d'acide ainsi obtenu est remis directement en réaction. Dans un bain de glace, 1,28ml (2éq., 12mmol) de toluène sont ajoutés sur le chlorure d'acide, ainsi que 30ml de dichlorométhane distillé. Sous forte agitation, 1,20g (1,5éq., 9mmol) de chlorure d'aluminium réduit en poudre sont ajoutés par petites quantités. Après 4h d'agitation à température ambiante, le milieu est hydrolysé sur 100ml d'un mélange eau/glace acidifié avec 4ml d'acide chlorhydrique concentré puis extrait au dichlorométhane (2x30ml). La phase organique est lavée à l'eau (2x20ml), séchée sur sulfate de magnésium, puis évaporée sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur gel de silice (dichlorométhane).

Aspect : solide jaune

Rdt : 72%

Pf : 57°C (lit.[82] 56,5-57°C)

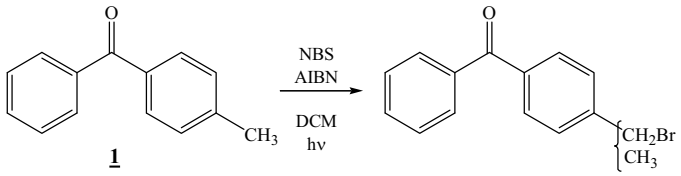
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,83-7,77 (m, 2H); 7,75 (d, 2H, J=7,9Hz); 7,62-7,56 (m, 1H); 7,51-7,44 (m, 2H); 7,29 (d, 2H, J=7,9Hz); 2,45 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 196,5 (C=O); 143,2; 138,0; 134,9; 132,1; 130,3 (2C); 129,9 (2C); 129,0 (2C); 128,2 (2C); 21,6 (CH_3).

GC/MS m/z (%) : 196 (71, M^+); 181 (21); 119 (100); 105(27); 91(39).

[82] Aldrich Handbook **2007-2008**

Introduction d'un halogène / Bromation radicalaire



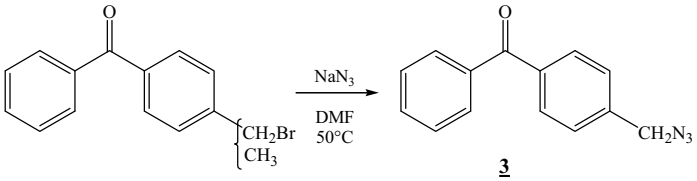
1

A 0,98g (1éq., 5mmol) du composé **1** sont ajoutés 15ml de dichlorométhane distillé, ainsi qu'une pointe de spatule de α,α'-azodiisobutyronitrile (AIBN). Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 30min grâce à une lampe halogène de 500W. Trois ajouts de 356mg (0,4éq., 2mmol) de *N*-bromosuccinimide sont effectués. Avant chaque ajout, la lampe est enlevée; l'ajout suivant ne s'effectue que lorsque la coloration orange (présence de dibrome) n'est plus persistante. Une fois tous les ajouts effectués et après être revenu à température ambiante, le milieu réactionnel est lavé plusieurs fois à l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, puis évaporée sous pression réduite. Le mélange obtenu est mis en réaction sans purification supplémentaire.

Introduction de l'azoture / Substitution nucléophile

[4-(Azidométhyl)phényl](phényl)méthanone (3)

$C_{14}H_{11}N_3O$ MW=237,26g.mol^{-1}



3

On suppose une réaction totale (5mmol) lors de l'étape suivante.

Le mélange obtenu lors de la bromation est dissout dans 20ml de diméthylformamide, puis 326mg (1éq., 5mmol) d'azoture de sodium sont ajoutés. Le milieu réactionnel est chauffé à 50°C pendant 3h. Une fois revenu à température ambiante, 50ml d'eau sont additionnés. Après une nuit d'agitation à température ambiante, le milieu est extrait à l'éther (25ml). La phase organique est lavée l'eau (2x30ml) puis séchée sur sulfate de magnésium et concentrée sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur gel de silice (dichlorométhane).

Aspect : huile jaune

Rdt : 83% (2 étapes)

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,85-7,79 (m, 4H); 7,64-7,58 (m, 1H); 7,53-7,43 (m, 4H); 4,46 (s, 2H, CH_2N_3).

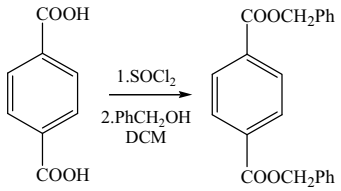
RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 196,1 (C=O); 140,0; 137,4; 132,6; 130,6 (2C); 130,0 (2C); 128,4 (2C); 127,9 (2C); 54,3 (CH_2N_3).

IR (KBr) : 2100 (N_3); 1658 (C=O); 1605 ($C=C_{Ar}$); 1446 (CH_2); 1310 (C-O).

Formation du diester benzylique de l'acide téréphtalique

Téréphtalate de dibenzyle (4)

$C_{22}H_{18}O_4$ $MW=346,37g.mol^{-1}$



4

A 2,5g (1éq., 15mmol) d'acide téréphtalique sont ajoutés 10ml de chlorure de thionyle. Après 4h à reflux, le solvant est évaporé. Dans un bain de glace, 3,11ml (2éq., 30mmol) d'alcool benzylique et 25ml de dichlorométhane distillé sont ajoutés au produit obtenu. Après 2h à température ambiante, de la glace est introduite. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse, séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur silice (cyclohexane/acétate d'éthyle 80:20)

Aspect : solide incolore

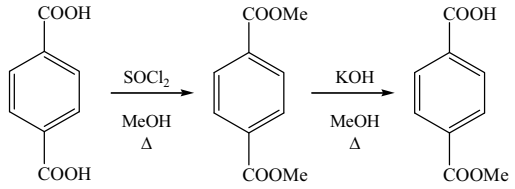
Rdt : 87%

Pf : 89-92°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 8,15 (s, 4H); 7,48-7,36 (m, 10H); 5,38 (s, 4H, $CH_2C_6H_5$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 165,6 (2C=O); 135,6 (2C); 134,0 (2C); 129,7 (4C); 128,7 (4C); 128,4 (2C); 128,3 (4C); 67,1 ($2CH_2$).

Synthèse du monoester méthylique de l'acide téréphtalique



5a **6a**

Diestérification

Téréphtalate de diméthyle (5a)

$C_{10}H_{10}O_4$ $MW=194,18g.mol^{-1}$

A 1g (1éq., 6mmol) d'acide téréphtalique sont ajoutés 30ml de méthanol. Après 30min de reflux, 8,7ml (20éq., 120mmol) de chlorure de thionyle sont ajoutés goutte à goutte. La solution est agitée et maintenue à reflux pendant 3,5 heures. Après être revenu à température ambiante, le solvant est éliminé par évaporation sous pression réduite. Le résidu obtenu est extrait à l'éther (2x20ml) puis lavé avec une solution aqueuse de potasse 0,1N. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium, puis évaporées sous pression réduite. Le produit obtenu est remis directement en réaction pour la synthèse du monoester méthylique de l'acide téréphtalique.

Aspect : solide incolore

Rdt : 99%.

Pf : 140-141°C (lit.[83] 141-142°C).

RMN ^1H ($CDCl_3$) δ : 8,10 (s, 4H); 3,95 (s, 6H, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 166,2 (2C=O); 133,9 (2C); 129,5 (4C); 52,4 ($2CH_3$).

CG-SM : m/z (%) : 194 (25, M^+); 179 (4); 163 (100); 135 (24); 120 (9); 103 (15); 92 (4);76 (17).

[83] Pollock, J. R. A.; Stevens, R. *Dictionary of Organic Compounds.* 4th Ed.; Eyre & Spottiswoode Publishers Ltd: London, **1965**; Vol. 5, p. 2949.

Monosaponification

Acide 4-(Méthoxycarbonyl)benzoïque (6a)

$C_9H_8O_4$ *MW=180,16g.mol^{-1}*

A 0,97g (1éq., 5mmol) de téréphtalate de diméthyle sont ajoutés 30ml de méthanol. Après 15min à reflux, 0,28g (1éq., 5mmol) de potasse sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation et à reflux pendant 3,5h. Une fois revenu à température ambiante, le méthanol est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est dissous dans l'eau et extrait au dichlorométhane (2x10ml). La phase aqueuse est récupérée puis acidifiée à l'aide de quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré. Le précipité est filtré sur Büchner.

Si des traces d'acide téréphtalique sont encore présentes, le solide obtenu après filtration est alors extrait à l'éther. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous pression réduite.

Aspect : solide incolore

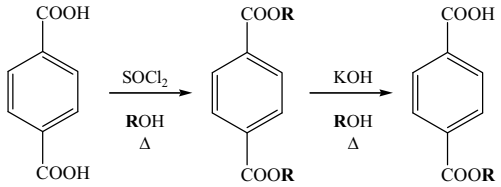
Rdt : 76%.

Pf : 219-220°C (lit.[83] 230°C).

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 13,3 (s large, 1H, COO*H*); 8.03-8.04 (m, 4H); 3,87 (s, 3H, C*H*$_3$).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 166,5 (C=O); 165,5 (C=O); 134,7; 133,1; 129,4 (2C); 129,3 (2C); 52,4 (CH_3).

Généralistaion de la méthode



5b-e **6b-e**

R : Me, Et, Pr, *i*Pr ou Bu

Diestérification

Mode opératoire général

A 1g (1éq., 6mmol) d'acide téréphtalique sont ajoutés 50ml d'alcool approprié (éthanol, propanol, *iso*propanol ou butanol). Après 30min de reflux, 8,7ml (20éq., 120mmol) de chlorure de thionyle sont ajoutés goutte à goutte. La solution est agitée et maintenue à reflux pendant 3,5h. Après retour à température ambiante, le chlorure de thionyle est éliminé par évaporation sous pression réduite. Le résidu ainsi obtenu est extrait à l'éther (2x20ml) puis lavé avec une solution aqueuse de potasse 0,1N. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium, puis évaporées sous pression réduite. Le diester obtenu est remis directement en réaction pour la synthèse du monoester correspondant de l'acide téréphtalique.

Lorsque l'*iso*-propanol ou le butanol est utilisé, 10h de reflux sont nécessaires.

Téréphtalate de diéthyle (5b)

$C_{12}H_{14}O_4$ $MW=222,24 g.mol^{-1}$

Alcool utilisé : éthanol (R=Et)

Aspect : solide incolore

Rdt : 89%.

Pf : 46-47°C (lit.[83] 44°C).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 8,10 (s, 4H); 4,41 (q, 4H, J=7,1Hz, CH_2CH_3); 1,41 (t, 6H, J=7,1Hz, CH_2CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 165,6 (2C=O); 133,9 (2C); 129,2 (4C); 61,2 ($2CH_2$); 14,1 ($2CH_3$).

CG-SM : m/z (%) : 222 (13, M^+); 194 (21); 177 (100); 149 (62); 121 (13); 104 (18); 76 (20).

Téréphtalate de dipropyle (5c)

$C_{14}H_{18}O_4$ $MW=250,29g.mol^{-1}$

Alcool utilisé : propanol (R=Pr)

Aspect : solide jaunâtre

Rdt : 99%

Pf : 29-31°C (lit.[83] 31°C).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 8,10 (s, 4H); 4,31 (t, 4H, J=6,7Hz, C*H*$_2$CH$_2$CH$_3$); 1,81 (m, 4H, CH$_2$C*H*$_2$CH$_3$); 1,04 (t, 6H, J=7,3Hz, CH$_2$CH$_2$C*H*$_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 165,8 (2C=O); 134,1 (2C); 129,4 (4C); 66,9 (2OCH$_2$); 22,0 (2CH$_2$); 10,4 (2CH$_3$).

CG-SM : m/z (%) : 250 (4, M^+); 191 (100); 167 (94); 149 (85); 104 (34); 41 (24).

Téréphtalate de di*iso*propyle (5d)

$C_{14}H_{18}O_4$ $MW=250,29g.mol^{-1}$

Alcool utilisé : iso-propanol (R=iPr)

Aspect : solide jaunâtre

Rdt : 39%.

Pf : 57-59°C (lit.[83] 55-56°C).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 8,08 (s, 4H); 5,27 (sep, 2H, J=6,7Hz, C*H*(CH$_3$)$_2$); 1,39 (d, 12H, J=6,7Hz, CH(C*H*$_3$)$_2$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 165,4 (2C=O); 134,5 (2C); 129,4 (4C); 69,0 (2CH); 21,9 (4CH$_3$).

CG-SM : m/z (%) : 250 (6, M^+); 209 (23); 197 (56); 167 (34); 149 (100); 121 (17); 104 (24); 76 (28); 59 (45); 43 (42).

Téréphtalate de dibutyle (5e)

$C_{16}H_{22}O_4$ $MW=278,34g.mol^{-1}$

Alcool utilisé : butanol (R=Bu)

Aspect : huile brun clair

Rdt: 95%.

Pf : huile* (lit.[83] 6°C).

RMN ^1H ($CDCl_3$) δ : 8,10 (s, 4H); 4,35 (t, 4H, J=6,4Hz, $CH_2CH_2CH_2CH_3$), 1,83-1,72 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_3$); 1,56-1,41 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_3$); 0,99 (t, 6H, J=7,3Hz, $CH_2CH_2CH_2CH_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 165,7 (2C=O); 134,0 (2C); 129,3 (4C); 65,1 ($2OCH_2$); 30,6 ($2CH_2$); 19,1 ($2CH_2$); 13,6 ($2CH_3$).

CG-SM : m/z (%) : 278 (2, M^+); 235 (2); 223 (77); 205 (100); 177 (2); 167 (79); 149 (72); 132 (2); 121 (24); 104 (19).

* A température ambiante

Monosaponification

Mode opératoire général

A 10mmol de diester de l'acide téréphtalique sont ajoutés 30ml de l'alcool approprié. Après 15min à reflux, 0,56g (1éq., 10mmol) de potasse sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation et à reflux pendant 3,5h. Une fois revenu à température ambiante, l'alcool de départ est évaporé sous pression réduite. Le résidu ainsi obtenu est dissous dans l'eau et extrait au dichlorométhane (15ml). La phase aqueuse est récupérée puis acidifiée à l'aide de quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré. Le précipité est filtré sur Büchner. Si des traces d'acide téréphtalique sont encore présentes, le solide obtenu après filtration est alors extrait à l'éther (10ml). La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous pression réduite.

Acide 4-(éthoxycarbonyl)benzoïque(6b)

$C_{10}H_{10}O_4$ $MW=194,18g.mol^{-1}$

Alcool utilisé : Ethanol (R=Et)

Aspect : solide incolore

Rdt : 72%.

Pf : 168-169°C (lit.[83] 171°C).

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 13,32 (s large, 1H, COO*H*); 8,03-8,01 (m, 4H); 4,32 (q, 2H, J=7,1Hz, C*H*$_2$CH$_3$); 1,32 (t, 3H, J=7,1Hz, CH$_2$C*H*$_3$).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 166,5 (C=O); 165,0 (C=O); 134,7; 133,4; 129,5 (2C); 129,2 (2C); 61,1 (CH$_2$); 14,0 (CH$_3$).

Acide 4-(propoxycarbonyl)benzoïque(6c)

$C_{11}H_{12}O_4$ $MW=208,21g.mol^{-1}$

Alcool utilisé : Propanol (R=Pr)

Aspect : solide incolore

Rdt : 72%.

Pf : 130°C (lit.[83] 127-129°C).

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 13,34 (s large, 1H, COO*H*); 8,03-8,01 (m, 4H); 4,24 (t, 2H, J=6,6Hz, C*H*$_2$CH$_2$CH$_3$); 1,79-1,65 (m, 2H, CH$_2$C*H*$_2$CH$_3$); 0,96 (t, 3H, J=7,4Hz, CH$_2$CH$_2$C*H*$_3$).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 166,6 (C=O); 165,1 (C=O); 134,7; 133,4; 129,5 (2C); 129,2 (2C); 66,5 (OCH$_2$); 21,5 (CH$_2$); 10,3 (CH$_3$).

Acide 4-(isopropoxycarbonyl)benzoïque (6d)

$C_{11}H_{12}O_4$ MW=208,21g.mol^{-1}

Alcool utilisé : iso-Propanol (R=iPr)

Aspect : solide incolore

Rdt : 62%.

Pf : 164°C (lit.[83] 166°C).

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 13,33 (s large, 1H, COO*H*); 8,04-8,02 (m, 4H); 5,14 (sep, 1H, J=6,2Hz, C*H*(CH$_3$)$_2$); 1,32 (d, 6H, J=6,4Hz, CH(C*H*$_3$)$_2$).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 166,6 (C=O); 164,5 (C=O); 134,6; 133,7; 129,5 (2C); 129,2 (2C); 68,6 (CH); 21,5 (2CH$_3$)

Acide 4-(butoxycarbonyl)benzoïque(6e)

$C_{12}H_{14}O_4$ MW=222,24g.mol^{-1}

Alcool utilisé : Butanol (R=Bu)

Aspect : solide incolore

Rdt : 13%.

Pf : 123-125°C (lit.[83] 122-124°C).

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 13,33 (s large, 1H, COO*H*), 8,08-8,05 (m, 4H); 4,28 (t, 2H, J=6,5Hz, C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_3$); 1,72-1,63 (m, 2H, CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_3$); 1,46-1,35 (m, 2H, CH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_3$); 0,91 (t, 3H, J=7,2Hz, CH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H*$_3$).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 166,5 (C=O); 165,1 (C=O); 134,8; 133,3; 129,5 (2C); 129,2 (2C); 64,7 (OCH$_2$); 30,1 (CH$_2$); 18,7 (CH$_2$); 13,5 (CH$_3$).

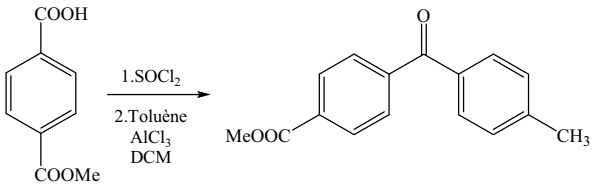
Synthèse de la structure trifonctionnelle (molécule cible) A

Voie directe

Formation du motif photoactivable

4-(4-Méthylbenzoyl)benzoate de méthyle (7)

$C_{16}H_{14}O_3$ $MW=254,28 g.mol^{-1}$



6a **7**

A 1,8g (1éq., 10mmol) de monoester méthylique de l'acide téréphtalique sont ajoutés 10ml de chlorure de thionyle. Après 4 heures à reflux, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le chlorure d'acide ainsi obtenu est remis directement en réaction. 2,13ml (2éq., 20mmol) de toluène sont versés sur le chlorure d'acide, ainsi que 30ml de dichlorométhane distillé. Le milieu réactionnel est placé dans un bain de glace et 4g (3éq., 30mmol) de chlorure d'aluminium réduit en poudre sont ajoutés par petites quantités. Après 4 heures sous forte agitation, à température ambiante, le milieu est hydrolysé sur 100ml d'un mélange eau/glace acidifié avec 4ml d'acide chlorhydrique concentré puis extrait au dichlorométhane (10ml). La phase organique est lavée à l'eau (2x20ml), séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur gel de silice (dichlorométhane).

Aspect : solide incolore

Rdt : 87%

Pf : 127-128°C

RMN ^1H ($CDCl_3$) δ : 8,12 (d, 2H, J=7,9Hz); 7,80 (d, 2H, J=7,9Hz); 7,71 (d, 2H, J=7,9Hz); 7,28 (d, 2H, J=7,9Hz); 3,95 (s, 3H, $COOCH_3$); 2,43 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 195,7 (C=O); 166,3 (C=O); 143,9; 141,1; 134,3; 133,0; 130,3 (2C); 129,6 (2C); 129,4 (2C); 129,1 (2C); 52,4 (OCH_3); 21,7 (CH_3).

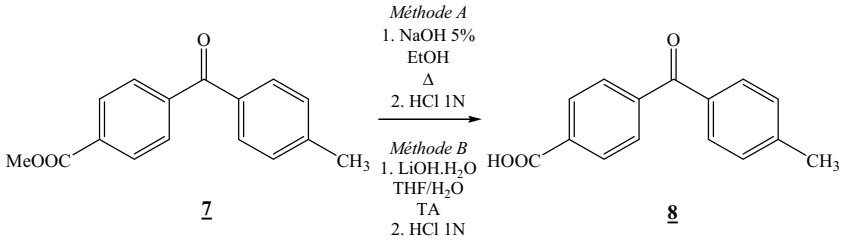
CG-SM : m/z (%) : 254 (27, M^+); 223 (5); 195 (5); 163 (15); 119 (100); 91 (27).

Formation de l'ester activé pour le couplage au glutathion

Saponification

Acide 4-(4-Méthylbenzoyl)benzoïque (8)

$C_{15}H_{12}O_3$ $MW=240,25g.mol^{-1}$



Méthode A

2,03g (1éq., 8mmol) de composé **7** sont dissous dans 25ml d'éthanol à 96%, puis 12,8ml (2éq., 16mmol) d'une solution de soude à 1,25M y sont ajoutés. Le milieu réactionnel est porté à reflux durant 3h. Après être revenu à température ambiante, le milieu est extrait à l'éther (2x10ml). La phase aqueuse est acidifiée jusqu'à pH=1 avec une solution d'acide chlorhydrique 1N puis placée au frigo toute une nuit. Le précipité obtenu est filtré sur Büchner. Rdt : 65%.

Méthode B

A une solution de 0,5g (1éq., 1,97mmol) de composé **7** dissous dans 46ml de tétrahydrofurane est ajoutée une solution de 248mg (3éq., 5,90mmol) d'hydroxyde de lithium monohydraté dissous dans 23ml d'eau distillée. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 30min puis 7ml d'acide chlorhydrique 1N sont ajoutés. Le tétrahydrofurane ainsi qu'une grande partie de l'eau sont évaporés, sous pression réduite. Le précipité formé est filtré sur Büchner. Rdt : 96%.

Aspect : solide incolore

Pf : 223°C

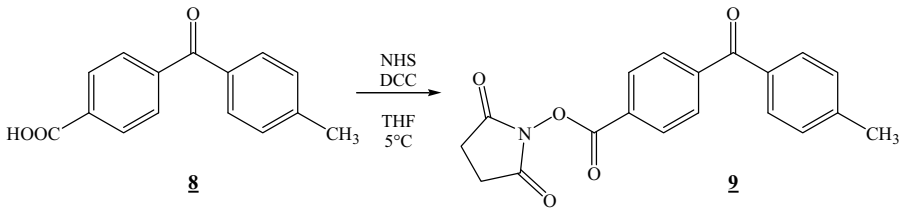
RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 8,07 (d, 2H, J=8,1Hz); 7,77 (d, 2H, J=8,1Hz); 7,65 (d, 2H, J=8,1Hz); 7,36 (d, 2H, J=8,1Hz); 2,39 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 195,4 (C=O); 167,1 (C=O); 144,4; 144,1; 134,2; 134,3; 130,4 (2C); 129,9 (2C); 129,8 (2C); 129,7 (2C); 21,6 (CH_3).

Estérification

1-{[4-(4-Méthylbenzoyl)benzoyl]-*N*-oxy}pyrrolidine-2,5-dione (9)

$C_{19}H_{15}NO_5$ MW=337,33g.mol^{-1}



8 **9**

A 4mmol (1éq., 960mg) de composé **7** dissous dans 50ml de tétrahydrofurane sont ajoutés 1,1éq. (4,4mmol, 908mg) de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide. Le milieu réactionnel est placé dans un bain de glace et agité pendant 30min. 506mg (1,1éq., 4,4mmol) de *N*-hydroxysuccinimide sont ensuite ajoutés. La réaction est maintenue à 5°C pendant 20h puis filtrée sur coton. Le filtrat est concentré sous pression réduite. Le produit obtenu est extrait au dichlorométhane (2x20ml) et lavé à l'eau (2x30ml). La phase organique est lavée avec une solution de soude 0,1N, une solution saturée de chlorure de sodium puis séchée sur sulfate de magnésium et concentrée sous pression réduite. Le produit est purifié par recristallisation dans l'éther.

Aspect : solide rose clair

Rdt : 70%

Pf : 186-187°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 8,24 (d, 2H, J=8,2Hz); 7,87 (d, 2H, J=8,2Hz); 7,71 (d, 2H, J=8,1Hz); 7,31 (d, 2H, J=8,1Hz); 2,94 (s, 4H, CH_{2suc}); 2,46 (s, 3H, CH_3).

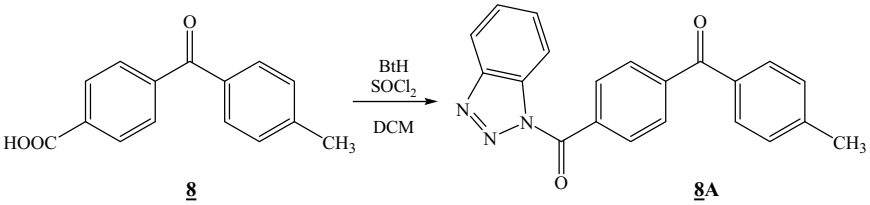
RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 195,2 (C=O); 169,0 (2C=O); 161,3 (C=O); 144,2; 143,5; 133,9; 130,4; 130,3 (2C); 129,8 (2C); 129,3 (2C); 127,8 (2C); 25,7 ($2CH_2$); 21,7 (CH_3).

Essais de séparation

Remplacement du groupement activant de l'acide

[4-(1*H*-1,2,3-Benzotriazol-1-ylcarbonyl)phényl](4-méthylphényl)méthanone (8A)

$C_{21}H_{15}N_3O_2$ MW=341,36g.mol^{-1}



8 **8A**

A 1,98g (4éq., 16,6mmol) de benzotriazole sont ajoutés 20ml de dichlorométhane distillé ainsi que 304µL (1éq., 4,15mmol) de chlorure de thionyle, goutte à goutte. Après 30min d'agitation à température ambiante, 1g (1éq., 4,15mmol) d'acide 4-(4-méthylbenzoyl)benzoïque **(**composé **7**) est ajouté en une fois. Le milieu réactionnel est agité pendant 2h à température ambiante puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est extrait au dichlorométhane (30ml), lavé deux fois avec une solution de soude 2N puis avec une solution saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur gel de silice.

Aspect : solide beige

Rdt : 56%

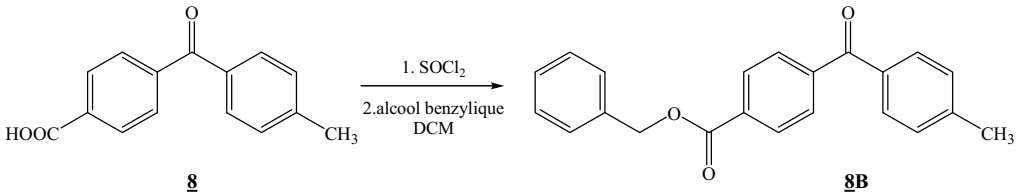
Pf : 160-165°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 8,37 (d, 1H, J=8,2Hz); 8,28 (d, 2H, J=8,3Hz); 8,14 (d, 1H, J=8,2Hz); 7,91 (d, 2H, J=8,3Hz); 7,75 (d, 2H, J=7,8Hz); 7,68 (t, 1H, J=7,8Hz); 7,54 (t, 1H, J=7,8Hz); 7,28 (d, 2H, J=8,2Hz); 2,43 (s, 3H, C*H*$_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 195,5 (C=O); 166,1 (C=O); 145,8; 144,2; 142,1; 134,3; 134,1; 132,2; 131,6 (2C); 130,7; 130,5 (2C); 129,6 (2C); 129,3 (2C); 126,7; 120,3; 114,8; 21,8.

Benzyl 4-(4-méthylbenzoyl)benzoate (8B)

$C_{22}H_{18}O_3$ MW=330,38g.mol^{-1}



8 **8B**

A 500mg (1éq., 2,08mmol) d'acide 4-(4-méthylbenzoyl)benzoique sont ajoutés 10ml de chlorure de thionyle, utilisé comme réactif et comme solvant. Après 4h à reflux, le chlorure de thionyle est évaporé sous pression réduite. Le chlorure d'acide est remis directement en réaction. Dans un bain de glace, 2,15ml (10éq., 20,8mmol) d'alcool benzylique sont additionnés ainsi que 100ml de dichlorométhane. Le milieu réactionnel est agité pendant 4h à température ambiante. Le solvant est ensuite éliminé sous pression réduite. Quelques gouttes de cyclohexane sont ajoutées à froid. Les cristaux formés sont filtrés sur Büchner.

Aspect : solide beige

Rdt : 3%

Pf : 116-117°C

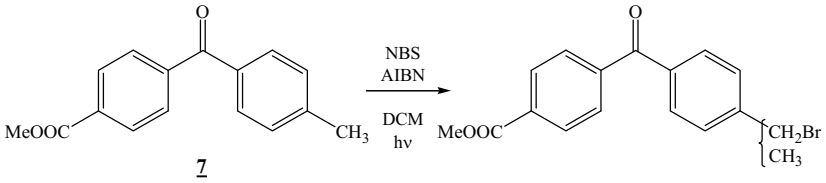
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 8,17 (d, 2H, J=8,1Hz); 7,81 (d, 2H, J=8,1Hz); 7,71 (d, 2H, J=8,1Hz); 7,49-7,38 (m, 5H); 7,29 (d, 2H, J=7,9Hz); 5,41 (s, 2H, OCH_2); 2,45 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 195,7 (C=O); 167,0 (C=O); 156,6 (C=O); 137,3; 135,7; 130,3 (2C); 129,6 (2C); 129,5 (2C) 129,1 (2C); 128,7 (2C); 128,4; 128,3 (4C); 67,1 (OCH_2); 21,7 (CH_3).

GC/MS m/z (%) : 330 (18, M^+); 223 (75); 119 (41); 91 (100).

*Synthèse de la structure trifonctionnelle (molécule cible) **A** : passage par un éther*

Bromation radicalaire



7

A 2,29g (1éq., 9mmol) du composé **7** de la réaction de Friedel-Crafts sont ajoutés 40ml de dichlorométhane distillé, ainsi qu'une pointe de spatule de α,α'-azodiisobutyronitrile. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 30min grâce à une lampe halogène de 500W. Trois ajouts de 640mg (0,4éq., 3,6mmol) de *N*-bromosuccinimide sont effectués. Avant chaque ajout, la lampe est éteinte; l'ajout suivant ne s'effectue que lorsque la coloration orange (présence de brome) n'est plus persistante.

Une fois les ajouts effectués et après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est lavé à l'eau (2x30ml). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite.

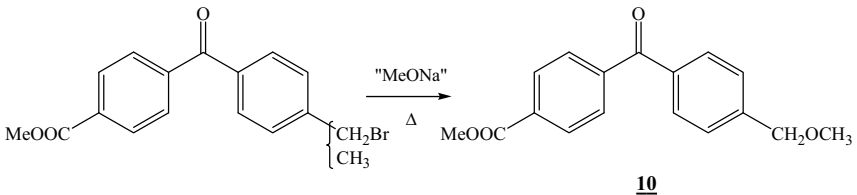
Le mélange obtenu est mis en réaction sans purification supplémentaire.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : singulet caractéristique du -CH_2Br à 4,54 ppm.

Formation de l'éther

Méthyl 4-[4-(méthoxyméthyl)benzoyl]benzoate (10)

$C_{17}H_{16}O_4$ MW=284,31g.mol^{-1}



10

La réaction précédente (9mmol) est considérée comme totale.

A 0°C et sous argon, 207mg (1éq., 9mmol) de sodium sont placés dans 20ml de méthanol anhydre. Le mélange obtenu lors de la réaction de bromation radicalaire est ajouté au milieu réactionnel. Après 3h à reflux, le milieu est agité pendant 1h à température ambiante. Le

méthanol est alors évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est extrait au dichlorométhane (2x20ml) et lavé à l'eau (20ml) acidifiée par 4ml d'acide chlorhydrique 1N. Les phases organiques sont regroupées, lavées à l'eau (2x30ml), séchées sur sulfate de magnésium, puis évaporées sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur gel de silice (dichlorométhane).

Aspect : solide jaune

Rdt : 89% (2étapes)

Pf : 103-105°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 8,12 (d, 2H, J=8,5Hz); 7,81 (d, 2H, J=8,5Hz); 7,78 (d, 2H, J=8,5Hz); 7,45 (d, 2H, J=8,5Hz); 4,53 (s, 2H, CH_2OCH_3); 3,94 (s, 3H, CH_3); 3,43 (s, 3H, CH_2OCH_3).

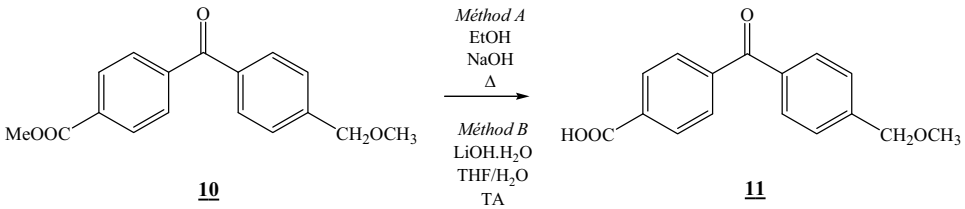
RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 195,5 (C=O); 166,2 (C=O); 143,6; 141,3; 136,0; 133,1; 130,2 (2C) 129,6 (2C); 129,4 (2C); 127,1 (2C); 73,9 (CH_2O-); 58,4 (-OCH_3); 52,3 (OCH_3).

GC/MS m/z (%) : 284 (24, M^+); 269 (7); 253 (21); 224 (67); 209 (7); 165 (51); 163 (29); 149 (100); 121 (62); 105 (12); 89 (51); 77 (20); 45 (10).

Saponification

Acide 4-[4-(Méthoxyméthyl)benzoyl]benzoïque (<u>11</u>)

$C_{16}H_{14}O_4$ MW=270,28g.mol^{-1}



<u>10</u> **<u>11</u>**

Méthode A

A 1,42g (1éq., 5mmol) de composé **<u>10</u>** dissous dans 70ml d'éthanol 96% auxquels sont ajoutés 125ml (2éq., 10mmol) de solution de soude à 1,25M. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 2h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est extrait au dichlorométhane (2x20ml) puis lavé avec une solution de potasse 0,1N. La phase aqueuse est acidifiée jusqu'à pH=1 avec de l'acide chlorhydrique 1N, puis placée au frigo toute une nuit. Le précipité est lavé à l'éther, séché sur sulfate de magnésium et concentré sous pression réduite. Rdt : 88%.

Méthode B

A une solution de 0,6g (1éq., 2,11mmol) de composé **10** dissous dans 55ml de tétrahydrofurane est ajoutée une solution de 266mg (3éq., 6,33mmol) d'hydroxyde de lithium monohydraté dissous dans 28ml d'eau distillée. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 30min puis 8ml d'acide chlorhydrique 1N sont ajoutés. Le tétrahydrofurane ainsi qu'une grande partie de l'eau sont évaporés, sous pression réduite. Le précipité formé est filtré sur Büchner. Rdt : 97%.

Aspect : solide jaune

Pf : 195-197°C

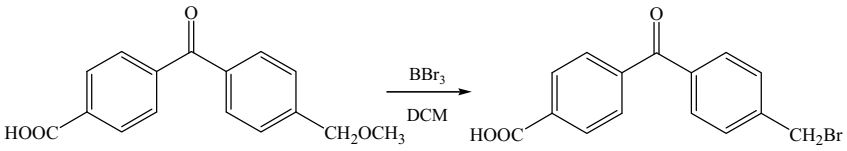
RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 8,16 (d, 2H, J=8,1Hz); 7,83 (d, 2H, J=8,3Hz); 7,79 (d, 2H, J=8,3Hz); 7,51 (d, 2H, J=8,1Hz); 4,56 (s, 2H, CH_2OCH$_3$); 3,43 (s, 3H, CH$_2$OCH_3).

RMN ^{13}C (MeOD-d_4) δ : 197,4 (C=O); 168,9 (C=O); 145,4; 142,6; 137,5; 131,4; 131,3 (2C); 130,9 (2C); 130,7 (2C); 128,5 (2C); 74,8 (CH$_2$O-); 58,7 (-OCH$_3$).

Formation du composé halogéné

Acide 4-[4-(bromométhyl)benzoyl]benzoïque (12)

$C_{15}H_{11}BrO_3$ MW=319,15g.mol^{-1}



11 **12**

Dans un bain de glace, 0,57ml (3éq., 6mmol) de tribromure de bore sont ajoutés à 540mg (1éq., 2mmol) de composé **11** en suspension dans 25ml de dichlorométhane. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 16h avant d'être traité avec 50ml d'eau. Le dichlorométhane est évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (40ml). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous pression réduite. La réaction est quantitative. Aucune purification supplémentaire n'est nécessaire.

Aspect : solide jaune pâle

Pf : 213°C

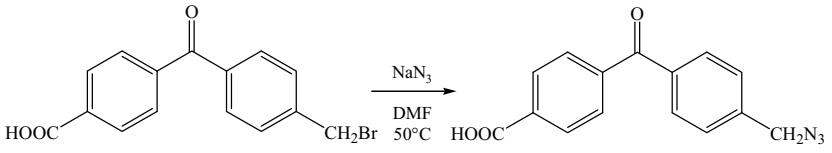
RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 8,07 (d, 2H, J=8,4Hz); 7,74 (d, 2H, J=8,4Hz); 7,68 (d, 2H, J=8,4Hz); 7,49 (d, 2H, J=8,4Hz); 4,55 (s, 2H, CH_2Br).

RMN ^{13}C (MeOD-d_4) δ : 197,0 (C=O); 168,7 (C=O); 144,9; 142,4; 138,0; 135,4; 131,5 (2C); 130,8 (4C); 130,4 (2C); 32,7 (CH_2Br).

Formation de l'azoture de méthylène

Acide 4-[4-(azidométhyl)benzoyl]benzoïque(<u>13</u>)

$C_{15}H_{11}BrO_3$ MW=319,15g.mol^{-1}



<u>12</u> **<u>13</u>**

319mg (1éq., 1mmol) de composé **<u>12</u>** est dissous dans 6ml de diméthylformamide. 65mg (1éq., 1mmol) d'azoture de sodium sont ajoutés au milieu. Après 6h à 50°C, 20ml d'eau sont ajoutés pour stopper la réaction. Après une nuit d'agitation à température ambiante, le produit est extrait à l'éther (3x15ml). Les phases organiques sont regroupées, lavées à l'eau, séchées sur sulfate de magnésium puis concentrées sous pression réduite. La réaction est quantitative. Aucune purification supplémentaire n'est nécessaire.

Aspect : solide beige

Pf : 201-203°C

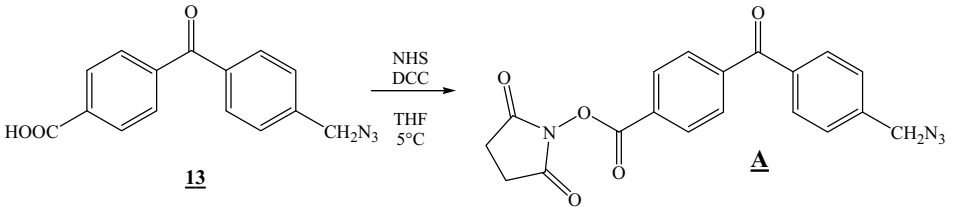
RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 8,17 (d, 2H, J=8,6Hz); 7,85 (d, 2H, J=8,6Hz); 7,84 (d, 2H, J=8,6Hz); 7,54 (d, 2H, J=8,6Hz); 4,52 (s, 2H, CH_2N_3).

RMN ^{13}C (MeOD-d_4) δ : 196,9 (C=O); 168,9 (C=O); 142,7; 142,5; 138,0; 135,5; 131,6 (2C); 130,7 (4C); 129,3 (2C); 54,9 (CH_2N_3).

Estérification

1-({4-[4-(Azidométhyl)benzoyl]benzoyl}-*N*-oxy)pyrrolidine-2,5-dione (A)

$C_{19}H_{14}N_4O_5$ MW=378,34g.mol^{-1}



13 **A**

A 141mg (1éq., 0,5mmol) de composé **13** dissous dans 9ml de tétrahydrofurane anhydre sont ajoutés 113mg (1,1éq., 0,55mmol) de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide. Le milieu réactionnel est placé dans un bain de glace et agité pendant 30min. 63mg (1,1éq., 0,55mmol) de *N*-hydroxysuccinimide sont ajoutés. La réaction est maintenue à 5°C pendant 20h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est extrait au dichlorméthane (3x15ml) et lavé à l'eau, à la soude 0,1N, puis avec une solution saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée sous pression réduite. Le produit est purifié sur gel de silice (dichlorométhane/acétate d'éthyle 96:4).

Aspect : solide incolore

Rdt : 72%

Pf : 145°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 8,27 (d, 2H, J=8,5Hz); 7,89 (d, 2H, J=8,5Hz); 7,83 (d, 2H, J=8,5Hz); 7,47 (d, 2H, J=8,5Hz); 4,48 (s, 2H, CH_2N_3); 2,94 (s, 4H, CH_{2suc}).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 194,4 (C=O); 168,5 (2C=O); 160,7 (C=O); 142,3; 140,4; 135,9; 130,2 (2C); 130,1 (2C); 129,4 (2C); 127,7; 127,6 (2C); 53,7 (CH_2N_3); 25,2 ($2CH_2$).

IR (KBr) : 2101 (N_3); 1738 (C=O); 1650 (C=O); 1431 (CH_2); 1283; 1233; 1197 (C-C); 1067; 996 (C-O).

Chapitre IV :

Étude du remplacement d'un (ou deux) groupement(s) phényle du motif benzophénone par un (ou deux) groupement(s) thiényle

Chapitre IV : Étude du remplacement d'un (ou deux) groupement(s) phényle du motif benzophénone par un (ou deux) groupement(s) thiényle

Le motif benzophénone, que nous avons vu dans la première partie de notre travail, est très utilisé pour le marquage par photoaffinité. Cependant la littérature nous a orienté sur une autre piste de groupements photoactivables.

En effet d'après les travaux de Perez-Prietro *et al.*[84] le groupement benzoylthiophène serait également un groupement qui réagit à la photoactivation. (Figure 12)

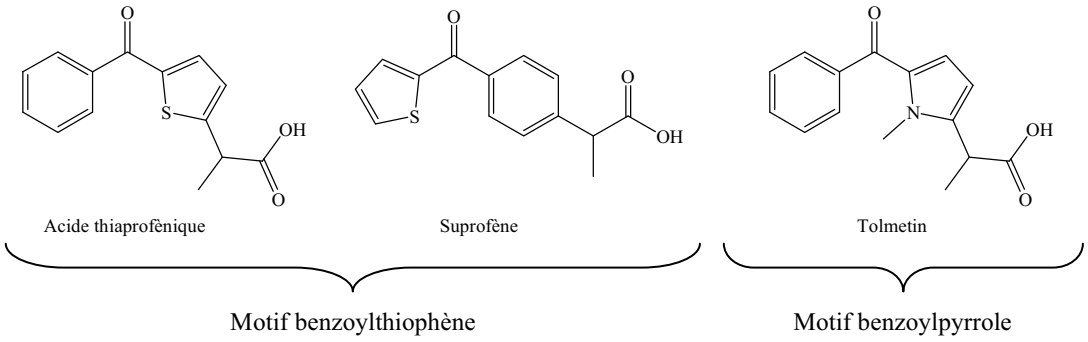


Figure 12 : Différents motifs photosensibles décrits dans la littérature

Les propriétés photosensibles de ces groupements sont un point essentiel pour notre étude. En effet, un de nos objectifs est de modifier chimiquement le groupement photoactivable, en réalisant des analogues de la benzophénone, pour améliorer ses propriétés. Nous avons vu que l'activation par irradiation UV se fait à 365nm pour ne pas endommager les protéines. Il est donc essentiel de se rapprocher de cette longueur d'onde pour permettre une activation plus sélective et plus efficace. Une seconde caractéristique, tout aussi importante, est la diminution du temps nécessaire à l'activation. Diminuer ce temps permet de diminuer le risque de dommages aux protéines. L'un ou l'autre de ces deux points représenteraient une amélioration de la technique de marquage par photoaffinité.

[84] Castell, J.V.; Hernández, D.; Gómez-Lechón, M.J.; Lahoz, A.; Miranda, M.A.; Morera, I.M.; Pérez-Prieto, J.; Sarabia, Z. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 660-665.

Dan Bernardi, au cours de sa thèse effectuée au sein de notre laboratoire,[85] a synthétisé des analogues de l'acide thioprofènique, du suprofène et du tolmétin. (Figure 13) Ces analogues comportent ces deux motifs (benzoylthiophène et benzoylpyrole).

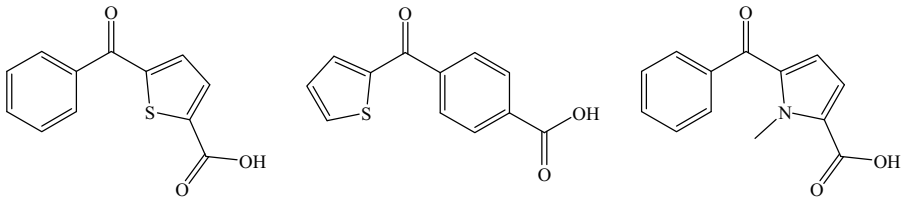


Figure 13 : Structures des analogues de l'acide thioprofènique, du suprofène et du tométin

Après avoir réalisé les spectres UV de ces composés, il a constaté que les longueurs d'ondes des maxima d'absorption étaient déplacées vers les basses énergies. Ce déplacement représente une donnée intéressante, car les longueurs d'ondes utilisées pour l'irradiation UV doivent être supérieures à 300nm pour éviter d'endommager les protéines. Plus on se rapproche du visible plus l'irradiation est efficace et sélective. Cependant il est important de faire la distinction, dans les spectres UV, entre la bande ($\pi \rightarrow \pi^*$) qui correspond à l'excitation des systèmes aromatiques (phényle, thiophène) et la bande ($n \rightarrow \pi^*$) qui correspond à l'excitation de la liaison C=O. C'est cette dernière bande qui intervient lors de l'irradiation des sondes[86] (Figure 14). L'observation de cette bande ne peut se faire qu'à hautes concentrations. (Figure 15)

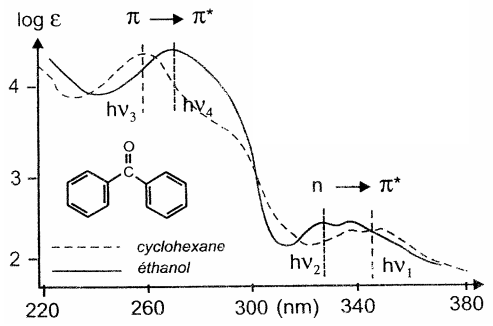


Figure 14 : Spectre de la benzophénone dans le cyclohexane et dans l'éthanol[86]

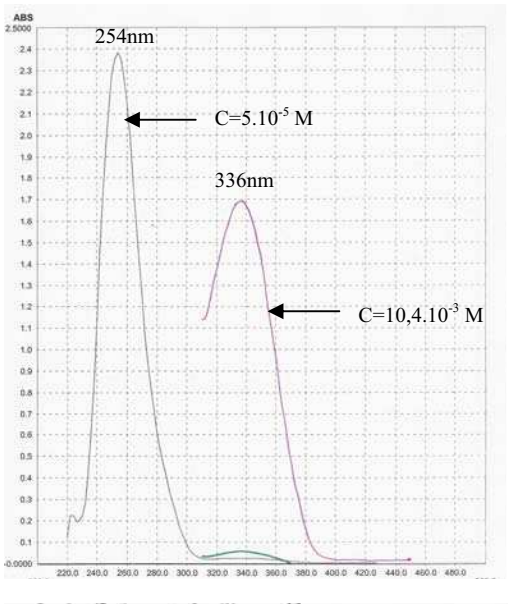


Figure 15 : Spectre expérimental de la benzophénone dans le chloroforme

[85] Bernardi, D. *Synthèse d'analogues photoactivables du glutathion pour l'étude du système cellulaire du glutathion.* Thèse soutenue le 19 octobre **2005**. Université Paul Verlaine-Metz.
[86] Rouessac, F.; Rouessac, A.; Cruché, D. *Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales modernes*. 6ème Ed., Dunod, Paris, **2004**, p148.

Ces analogues, où un cycle benzènique est remplacé par un thiophéne ou un pyrrole, semblent être de bons candidats pour la synthèse de nouvelles sondes pour le marquage par photoaffinité car la longueur d'onde se rapproche des longueurs d'onde nécessaires à nos irradiations.

Nous avons donc décidé d'approfondir et de développer cette approche qu'est le remplacement d'un groupement phényle voir des deux groupements phényle du motif benzophénone par un, ou deux, groupement(s) thiényle.

Dans ce chapitre nous allons donc voir les différentes molécules cibles que nous avons élaborées pour atteindre ce nouvel objectif.

1. Élaboration de nouvelles structures trifonctionnelles

Nous avons vu lors des précédents chapitres que notre sonde doit comporter trois groupements différents :

- un acide activé pour le couplage au glutathion
- un groupement photoactivable
- un groupement pour la détection.

Dans le chapitre III, nous avons exposé la synthèse de la première molécule cible portant le motif benzophénone. Dans cette partie de notre étude, ce motif sera remplacé par un motif benzoylthiophène mais également par un motif thénoylthiophène comme le montre le schéma suivant.

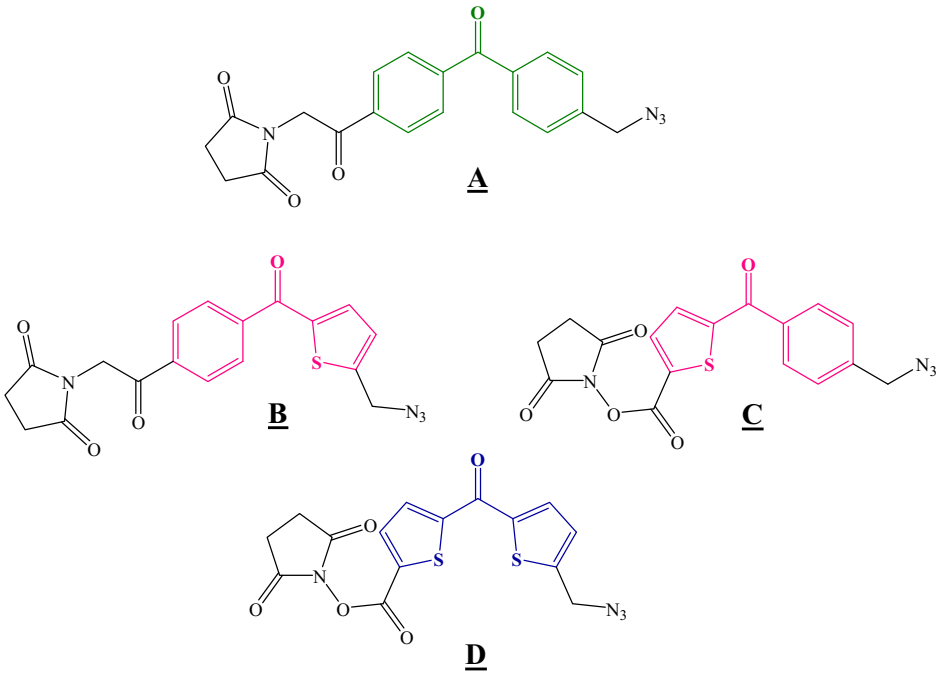


Figure 16 : Nouvelles structures trifonctionnelles

Avant de réaliser la synthèse totale de ces nouvelles sondes, qui nécessite de nombreuses étapes, nous avons choisi de synthétiser des molécules plus accessibles (3 étapes) possédant uniquement le motif photoactivable, ou potentiellement photoactivable, et le groupement azoture de méthylène. Notre but est de rester tout de même relativement proche de nos structures finales. Ces molécules ont pour but de réaliser une étude préliminaire sur les effets photophysiques et biologiques que l'on peut observer lors du remplacement d'un (ou deux) groupement(s) phényle par un (ou deux) groupement(s) thiényle.

Notre objectif est l'amélioration des caractéristiques physiques du groupement photoactivable. Pour cela, l'absorption du groupement photoactivable doit être proche de la longueur d'onde d'irradiation et/ou le temps d'irradiation nécessaire au photomarquage doit être court.

Nous allons voir, dans le paragraphe suivant, la synthèse de ces structures bifonctionnnelles que nous appellerons molécules tests MT2, MT3 et MT4.

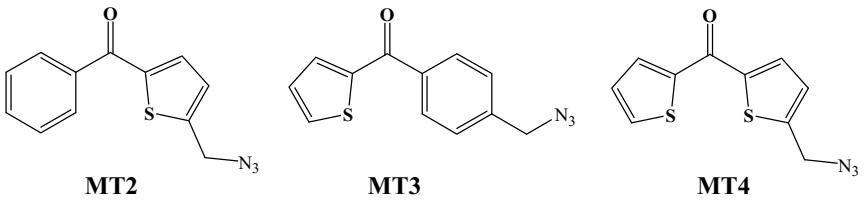


Figure 17 : Structure bifonctionnelles (molécules tests)

Remarque :

On rappelle que MT1 correspond à la molécule test qui possède le motif benzophénone, dont la synthèse est décrite dans le troisième chapitre

2. Molécules bifonctionnelles

2.1. Synthèse des molécules bifonctionnelles

Pour réaliser ces molécules nous avons appliqué la voie de synthèse développée pour réaliser MT1.*

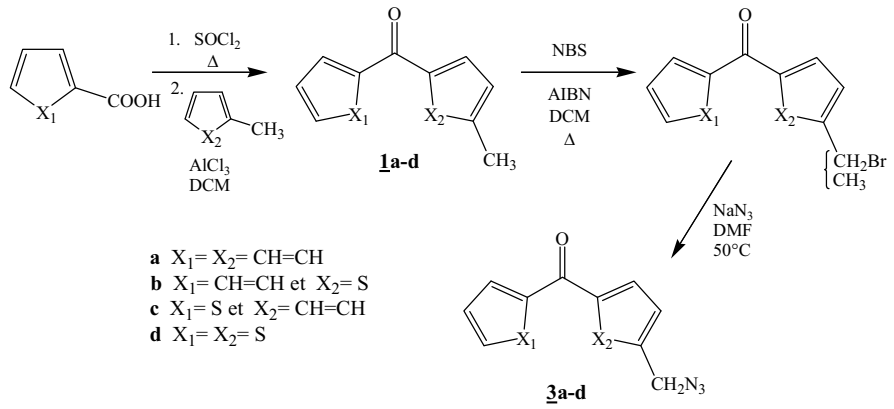


Schéma 18 : Voie de synthèse générale des molécules tests

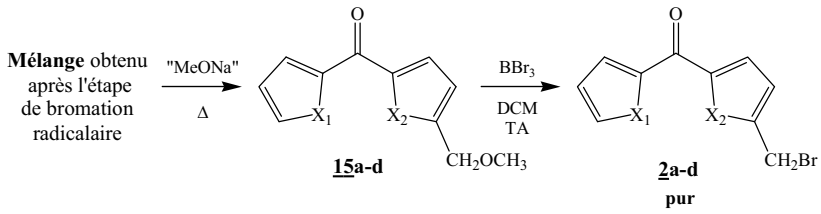
2.1.1. Formation du motif photoactivable

La première étape consiste à former les chlorures d'acide correspondant pour pouvoir réaliser une réaction de type Friedel-Crafts. Pour cela le chlorure d'acide de l'acide benzoïque (pour le composé **1b**) ou de l'acide 2-thiophènique (pour les composés **1c** et **1d**) est formé grâce au chlorure de thionyle qui est utilisé en phase pure. Le chlorure d'acide correspondant est obtenu après 4h à reflux après évaporation du solvant. L'étape suivante est une acylation qui se fait dans le dichlorométhane en présence de 1,5 équivalent de chlorure d'aluminium après avoir ajouté 2 équivalents de toluène ou 2 équivalents de 2-méthylthiophène, suivant

* cf. Ch. III.2.1.

l'analogue voulu. Le composé **1b** a été obtenu avec un rendement de 89%. Pour les composés **1c** et **1d**, des rendements plus faibles ont été obtenus (48% pour les deux réactions).

Remarque :
*Pour uniquement permettre une caractérisation précise des composés bromés (**2a-d**), nous avons appliqué la méthode mise au point pour résoudre le problème de séparation de **A**, c'est-à-dire le passage par un éther.*



2.1.2. Introduction d'un halogène

Une fois le motif formé, il faut introduire le groupement azoture. Pour cela les composés **1b-d** obtenus sont tout d'abord bromés par bromation radicalaire. En pratique, 1,2 équivalents de N-bromosuccinimide et une quantité catalytique d'α,α'-azodiisobutyronitrile sont ajoutés à un équivalent de composé **1** dissout dans le dichlorométhane. Ce mélange est porté à reflux à l'aide d'une lampe halogène de 500W. Comme pour le cas de MT1, des mélanges ont été obtenus. Ces mélanges ont été utilisés pour l'étape suivante sans autre purification.

2.1.3. Substitution nucléophile

Nous avons réalisé pour la première étape une substitution nucléophile de l'atome de brome par l'azoture. Les composés **3b**, **3c** et **3d** (MT2, MT3 et MT4 respectivement) ont été obtenus avec de bons rendements (56-85%) après purification sur gel de silice.

2.2. Évaluation des structures bifonctionnelles

2.2.1. Analyses photophysiques

2.2.1.1. Spectres UV

Une fois la synthèse de ces composés effectuée, nous les avons analysés par spectrométrie UV en utilisant le chloroforme pour des raisons de solubilité. (Tableau 3)

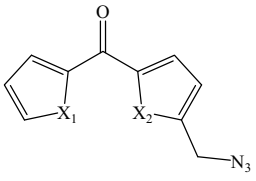
	Composé	λ_{max} (nm) $\pi \rightarrow \pi^*$	ε (L.mol^{-1}.cm^{-1})	λ_{max} (nm) $n \rightarrow \pi^*$	ε (L.mol^{-1}.cm^{-1})
	MT1(**3a**)	258	54459	330	228
	MT2(**3b**)	268 296	30612 25463	331	282
	MT3(**3c**)	264 290	149013 138975	337	292
	MT4(**3d**)	274 314	15437 25749	347	29

Tableau 3 : Mesures d'absorbtion des structures bifonctionnelles

Ces résultats nous montrent bien un déplacement des valeurs maximales d'absorption vers les grandes longueurs d'onde (effet bathochrome). Ceci nous conforte dans l'idée de réaliser la synthèse des trois nouvelles sondes (**B**, **C** et **D**) car notre but est d'avoir un maximum d'absorption proche de 365nm qui est la longueur d'onde utilisée lors des irradiations évitant ainsi toute altération des protéines.

Cependant ces résultats, certes prometteurs, ne signifient pas pour autant que ces molécules sont photoactivables. Notre prochaine étape est donc de vérifier que ces motifs sont effectivement photoactivables et de tester ce caractère sur le thénoylthiophène, absent de la littérature.

2.2.1.2. Tests d'irradiation UV

Notre objectif est de savoir si le fait de remplacer un ou les deux cycles aromatiques de la benzophénone par un ou deux thiophènes modifie le comportement du groupement photoactivable sous irradiation UV et si tel est le cas d'en évaluer les effets.
La modification peut se traduire par la variation de la longueur d'onde d'absorption des différents motifs (chose que nous avons vérifiée dans le paragraphe précédent), mais aussi par la variation du temps d'irradiation nécessaire au couplage des sondes sur les protéines d'intérêt. Pour vérifier cette seconde hypothèse, des tests d'irradiation ont été réalisés.

Les essais de marquage par photoaffinité des sondes possédant le motif benzophénone en présence de protéines se font en général à l'aide d'une lampe UV standard. En effet, l'échantillon est placé sous une lampe UV à 365nm dont le filtre a été enlevé (la position et la distance de la lampe par rapport aux échantillons ne sont en général pas communiquées), ce qui engendre un domaine spectral d'irradiation plus large. De plus, de par la proximité de la lampe UV, l'échantillon doit être placé dans un bain de glace afin d'éviter tout échauffement de l'échantillon. Ces conditions opératoires sont généralement utilisées en biochimie. Cependant, l'utilisation d'un laser à 355nm, c'est-à-dire une longueur d'onde proche de celle utilisée habituellement, a été utilisé dans notre cas. Ce type d'appareil permet de fournir une source d'irradiation monochromatique. De plus le temps ainsi que la puissance d'irradiation peuvent être contrôlés et sont de ce fait reproductibles.
Pour réaliser les tests d'irradiation sur les molécules tests (en $-CH_3$ ou $-CH_2N_3$), nous avons choisi d'utiliser la méthionine. Cet acide aminé permet, selon Ourisson *et al.*,[87] d'obtenir des photoproduits stables. Cependant lors de ses essais, cette équipe de recherche emploie une méthionine dont les fonctions amine et acide sont protégées. De plus, de fortes concentrations sont utilisées car les produits sont analysés par RMN. Dans notre cas, de faibles concentrations ont été utilisées pour être plus proche des conditions expérimentales lors de tests biologiques et la méthionine utilisée ne possède aucun groupement protecteur.

Les premiers essais ont été réalisés sur les composés **1a-d** (composés issus de la réaction de type Friedel-Crafts, possédant le groupement méthyle). Nous avons donc procédé à l'irradiation d'une solution équimolaire (100µM) de 4-méthyl benzophénone **1a** ou ses analogues **1b, 1c** ou **1d**, et de méthionine dans un mélange eau/acétonitrile (1:1). L'irradiation

[87] Deseke, E.; Nakatani, Y.; Ourisson, G. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 243-251.

se fait sous agitation magnétique permanente de la solution. Le taux de conversion de la benzophénone ou de ses analogues est suivi par CLHP. La solution est tout d'abord irradiée avec le faisceau laser à 5mJ pendant 1min puis elle est analysée en CLHP sur une colonne C-18 couplée à un détecteur UV à 260nm. La phase mobile utilisée pour ces analyses a été un mélange eau/acétonitrile (1:1), un milieu identique à celui utilisé lors des irradiations UV.

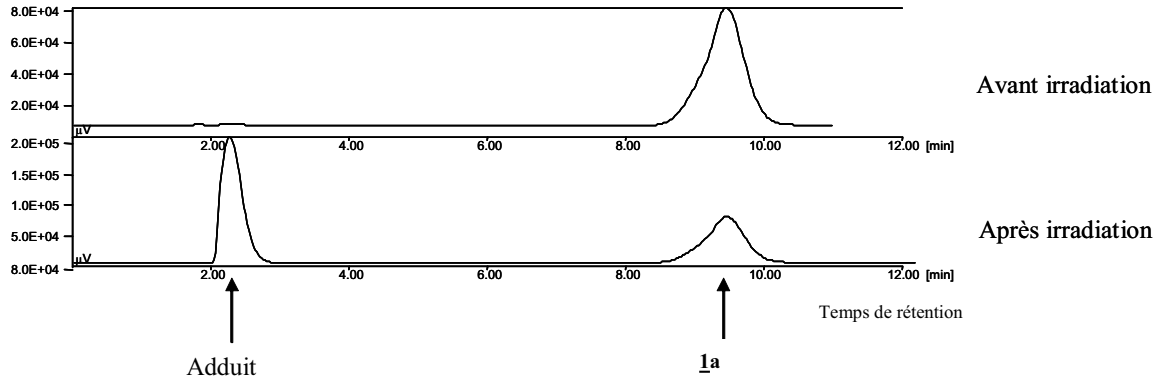


Figure 18 : Exemple de chromatogramme obtenu pour la molécule 1a

Le premier chromatogramme représente le mélange **1a**/méthionine avant irradiation. Un seul pic est observé car la méthionine n'absorbe pas à 260nm et n'est donc pas observée. A cette longueur d'onde, les cycles aromatiques du motif benzophénone sont à l'origine du signal observé. Le second chromatogramme montre ce même mélange après avoir été irradié. Dans ce cas on observe deux pics, un correspondant au composé **1a** n'ayant pas réagi et le second à un nouveau produit que l'on appellera "adduit".

Pour chaque composé (**1a-d**), les expériences ont été réalisées 5 fois. La figure suivante regroupe les résultats obtenus.

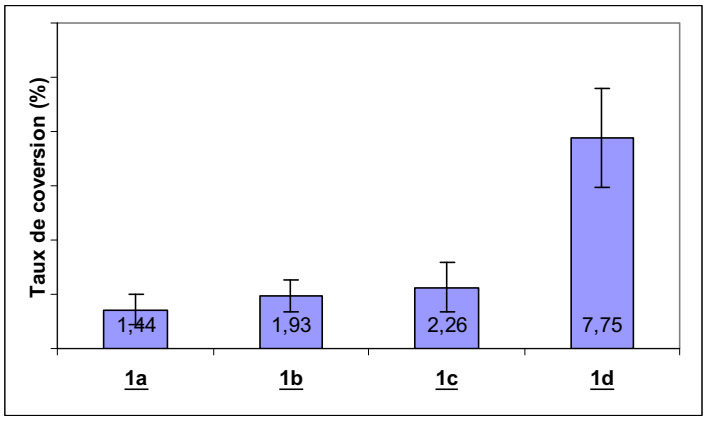


Figure 19 : Taux de conversion des composés 1 après irradiation laser à 365nm pendant 1min

Remarque :

*Les taux de conversion ont été calculés par rapport aux intégrations des pics de **1a-d** présents avant et après irradiation.*

On peut observer que pour un même temps d'irradiation, le taux de conversion des composés **1a-c** ne varient que faiblement. Cependant pour le composé **1d**, on constate un taux de conversion 5 fois plus élevé que pour le composé **1a**. Afin de confirmer ces résultats 10 autres expériences, identiques aux 5 premières, ont été réalisées pour les composés **1a** et **1d**, confirmant les résultats obtenus.

Suite à ces expériences, nous avons appliqué cette méthode aux molécules possédant la fonction azoture **3a** et **3d**. Ces deux molécules ont été choisies pour leur grande différence de photoréactivité observée dans le cas des composés méthyliques.

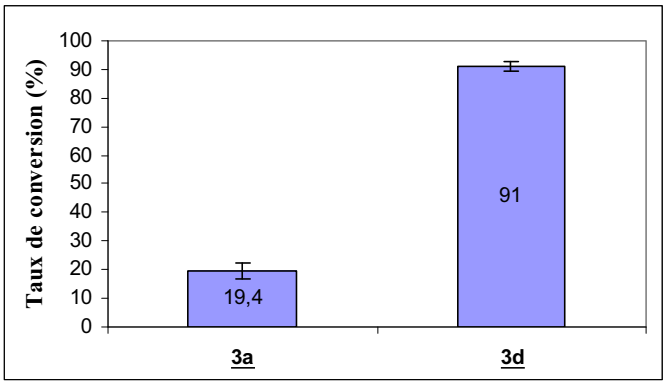


Figure 20 : Taux de conversion des composés 3a et 3d après irradiation laser à 365nm pendant 1min

On constate que les taux de conversion dans le cas des composés possédant la fonction azoture sont meilleurs que ceux des composés méthyliques. En effet, après 1 minute d'irradiation, le taux de conversion pour **1a** est de 1,44%±0,54% alors que pour **3a** il est de 19,4%±2,8%. La même observation peut être faite pour **3d** dont le taux de conversion est de 91,0%±1,6% alors qu'il n'est que de 7,75%±1,83% pour son précurseur méthylique. Cependant, l'ordre de grandeur de ce taux de conversion entre le composé avec le motif benzophénone et celui avec le motif thénoylthiophène reste quasiment le même (5 pour les composés méthyliques et 4,8 pour les composés possèdant l'azoture).

Suite à ces divers résultats, on peut conclure que lorsque l'on remplace les deux phényles du motif benzophénone par deux thiophènes, le caractère photoactivable est nettement amélioré.

On peut en déduire que ce motif thénoylthiophène, ainsi que les trois autres, sont bien des groupements photosensibles. Le caractère photoactivable de ces motifs peut être démontré par des tests de photoactivation sur des protéines modèles ou/et par spectrométrie de masse. Le motif thénoylthiophène possède une seconde propriété très importante qui est, comparativement à la benzophénone, la nécessité d'un temps court pour former un adduit.

2.2.2. Analyses biologiques

Après avoir réalisé les premiers essais de photoactivation avec la méthionine, des essais de fixation des molécules tests sur des protéines modèles (les GST), ont été réalisés par notre équipe de biologistes.

2.2.2.1. Les GST

Nombreux sont les facteurs (la génétique, l'environnement, l'alimentation,…) qui interviennent dans l'initiation et le développement des cancers. Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, les GST (glutathion S-transférases) sont des enzymes impliquées dans la détoxication car elles catalysent la conjugaison du glutathion à de nombreux composés électrophiles. Ces enzymes, actives sous forme de dimère, sont réparties en deux familles qui sont les GST microsomales et les GST cytosoliques. Ces dernières sont subdivisées en 8 classes : α, μ, π, θ, κ, τ, ω et ζ. Les GST sont capables de protéger les cellules vis-à-vis de carcinogènes, limitant ainsi le risque de cancer. Cependant la surexpression dans les cellules tumorales de certaines classes comme la GST π est liée à une résistance aux traitements anticancéreux.[88] Cette surexpression est observée dans de nombreux cas de cancer (poumon, colon, rein, sein, ovaire et estomac).

La connaissance des mécanismes de résistance a permis de développer diverses stratégies visant à sensibiliser les cellules tumorales aux agents cytotoxiques. En effet, des inhibiteurs

[88] Hayes, P.C.; May, L.; Hayes, J.D.; Harrison, D.J.; *Gut* **1991**, *32*, 1546-1549.

des GST et des protéines associées à la résistance multiple ont été synthétisés dans l'objectif de minimiser l'inactivation du médicament.

De nombreux inhibiteurs des GST sont capables de sensibiliser les cellules tumorales aux agents cytotoxiques. Parmi eux, l'inhibiteur le mieux caractérisé est l'acide éthacrinique (EA) (Figure 21). Des études ont montré qu'un traitement par l'EA sensibilisait les cellules cancéreuses vis-à-vis des effets cytotoxiques d'agents alkylants.

Cependant les essais cliniques de phase I révèlent des effets indésirables importants comme des disfonctionnements du métabolisme. Le développement de l'EA pour les traitements anticancéreux a donc été abandonné.

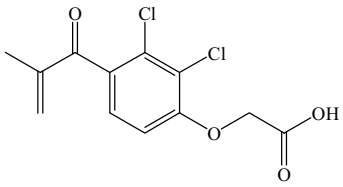


Figure 21 : Acide éthacrinique (EA)

En 2002, Burg *et al.*[89] ont montré que des analogues du glutathion pouvaient également être des inhibiteurs des GST *in vitro*. Le TLK199, qui est un analogue du glutathion (Figure 22), inhibe de façon sélective la GST π avec un K_i (constante d'inhibition) inférieur à 1µM.

De plus, les GST ont la particularité de posséder un site ligandine, c'est-à-dire un site de liaison capable de fixer une grande variété de molécules. Une fixation covalente dans ce site ligandine conduit à une inhibition de l'activité enzymatique permettant ainsi une sensibilisation des cellules cancéreuses aux agents anticancéreux. Le kétoprofène, qui possède un motif benzophénone, est un inhibiteur de ces enzymes. Nous avons donc voulu tester, dans un premier temps, le pouvoir inhibiteur de la molécule bifonctionnelle possédant le motif benzophénone (MT1) sur les GST. Puis nous avons élargi nos tests sur les trois analogues de la benzophénone (MT2-4) afin d'observer l'influence de la modification du motif sur l'inhibition des GST.

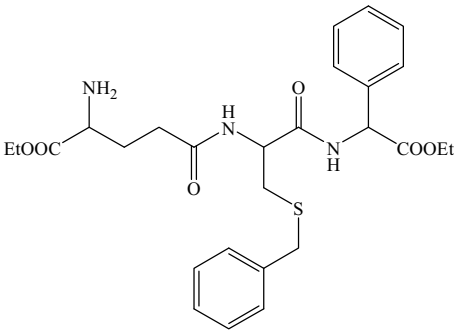


Figure 22 : Structure de l'inhibiteur TLK199

Des essais de photomarquage de nos quatre structures bifonctionnelles sur la GST ont également été réalisés afin d'obtenir des informations supplémentaires sur le caractère photoactivable de ces molécules.

[89] (a) Burg, D.; Filippov, D.V.; Hermanns, R.; Van der Marel, G.A.; Van Boom, J.H.; Mulder, G.J. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 195-205. (b) Burg, D.; Hameetman, L.; Filippov, D.V.; Van der Marel, G.A.; Mulder, G.J. *Bioorg. Med. Chem*. **2002**, *12*, 1579-1582.

2.2.2.2. Tests d'inhibition

Les tests d'inhibition ont été réalisés sur la GST P_{1-1} recombinante humaine purifiée. Nous avons vu précédemment que les GST permettent de catalyser la conjugaison du glutathion à de nombreux électrophiles. Pour réaliser nos tests, nous avons utilisé comme électrophile le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) qui permet de former le conjugué GS-DNB. Ce conjugué a l'avantage de posséder une absorbance caractéristique à 340nm, ce qui rend sa détection spécifique possible en UV. [90]

La réaction enzymatique se déroule à 30°C dans un tampon KH_2PO_4/K_2HPO_4 (0,1M) à pH=6,5 qui contient le glutathion (3mM) et le CDNB (4mM). La cinétique enzymatique est effectuée sur 4 minutes avec un essai témoin, en absence d'enzyme, utilisé comme référence et des essais en présence d'enzyme, qui sont réalisés en triplicata (voir annexe 3). Ces premiers essais représentent le "témoin solvant", ce qui correspond à la réaction enzymatique totale en présence du solvant pour solubiliser les inhibiteurs (2%v/v), c'est-à-dire aucune inhibition. Les essais suivants sont réalisés en présence d'une concentration variable d'inhibiteur. Dans notre cas, l'inhibiteur correspond à nos molécules **3a-d** (MT1-4).
Les résultats obtenus sont représentés Figure 23.

[90] Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Jakoby, W.B. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 7130-7139.

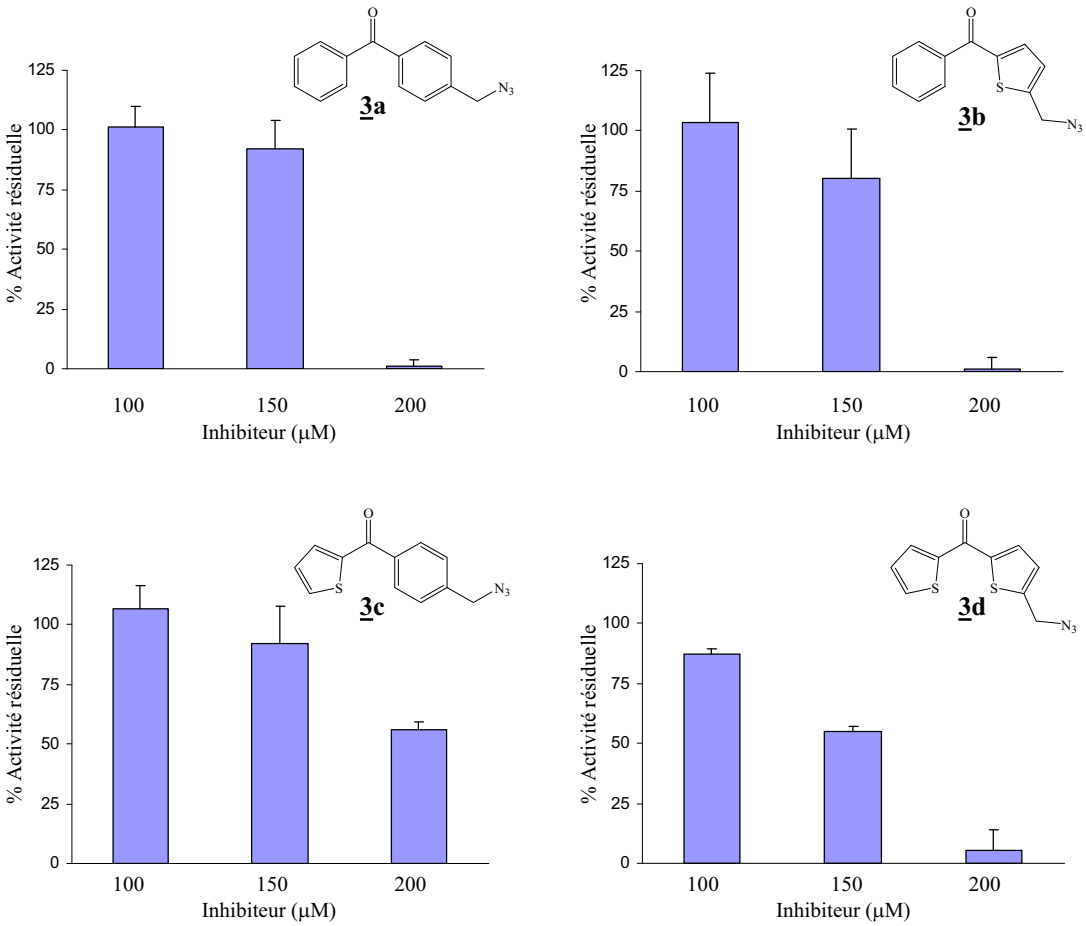


Figure 23 : Inhibition de l'activité enzymatique de la GSTP$_{1-1}$ recombinante humaine purifiée par 3a-d
(100% d'activité résiduelle correspond à l'activité obtenue en absence d'inhibiteur)

Ces diagrammes représentent la concentration en inhibiteur en fonction du pourcentage d'activité résiduelle de la GSTP$_{1-1}$. On constate que pour une concentration en inhibiteur de 100µM, seul **3d** inhibe légèrement l'enzyme. Par contre, pour une concentration de 200µM, **3a**, **3b** et **3d** possède un pouvoir inhibiteur. A cette concentration, **3c** inhibe également l'enzyme mais de façon moins significative. On peut donc en conclure que la molécule possédant le motif benzophénone (**3a**) ainsi que deux de ses analogues (**3b** et **3d**) sont des inhibiteurs de la GSTP$_{1-1}$, en absence d'irradiation UV.

2.2.2.3. Essais de photomarquage

Les tests d'inhibition mettent en évidence les liaisons non covalentes qui se forment entre l'inhibiteur et l'enzyme, on parle d'inhibition réversible. Dans ce paragraphe, nous avons testé la capacité de nos molécules à inhiber différentes enzymes mais de façon irréversible, c'est-à-dire la capacité à former des liaisons covalentes. Pour cela la $GSTP_{1\text{-}1}$ recombinante humaine purifiée ainsi que la GST de foie de rat ont été utilisées.

2.2.2.3.1. Essais de photomarquage avec la GST purifiée de foie de rat

Pour réaliser ces essais, le même mode opératoire que lors des inhibitions réversibles a été utilisé. Mais dans ce cas, la détection UV du conjugué GS-DNB est précédée d'une étape d'irradiation UV à 365nm.

L'irradiation des solutions se fait sous agitation dans des microtubes de 1,5ml préalablement placés dans un bain de glace. Après 30 minutes d'irradiation, les solutions sont diluées 10 fois avec la même solution tampon déjà utilisée précédemment. Une fois cette dilution effectuée, l'activité de conjugaison du CDNB au glutathion est mesurée.

Le fait de diluer la solution permet d'écarter l'intervention de l'inhibition réversible. En effet, plus la solution est diluée, moins des liaisons non covalentes sont possibles. Seules les liaisons covalentes résistent à cette dilution.

La Figure 24 présente les résultats obtenus lors des essais d'inhibition irréversibles dans les molécules **3a-d** sur la GST purifiée de foie de rat.

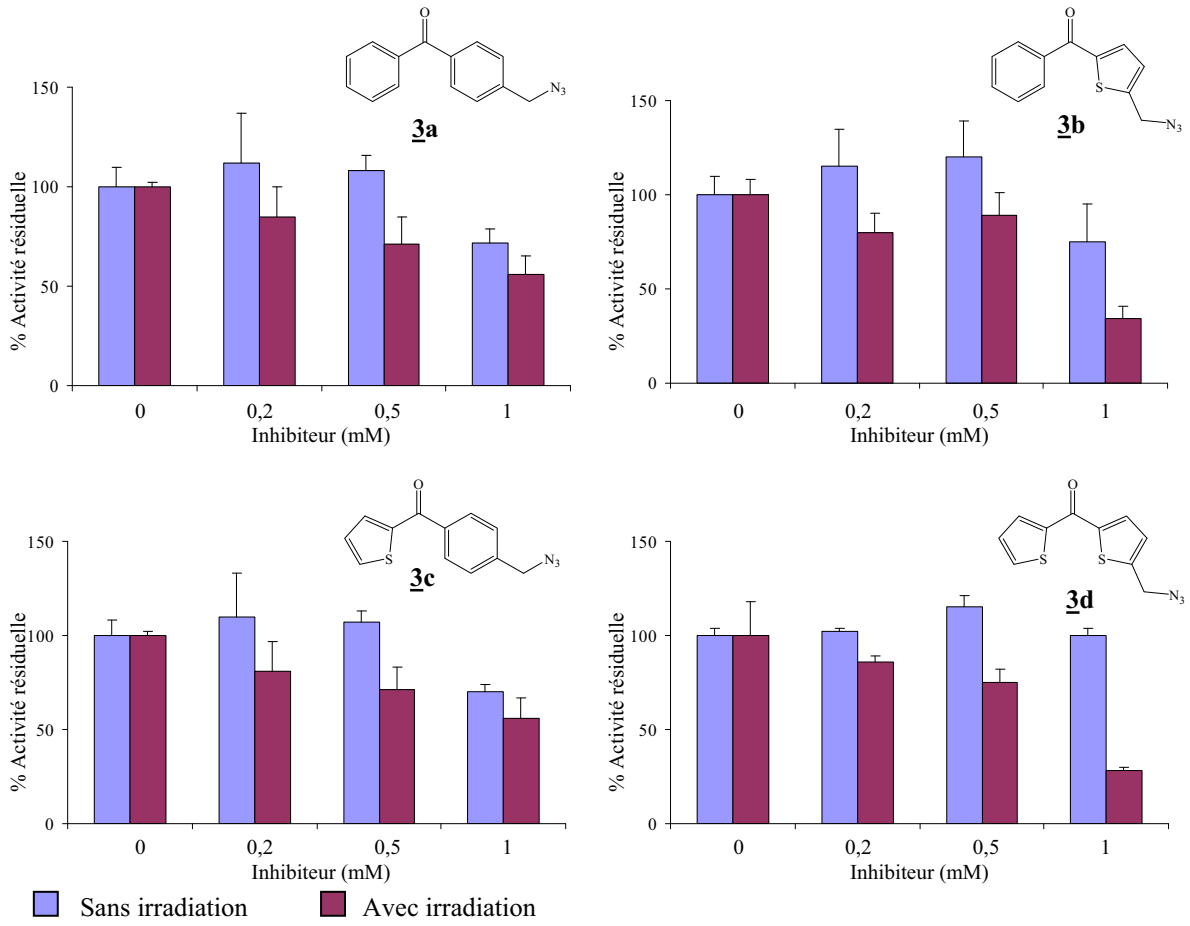


Figure 24 : Photomarquage les molécules 3a-d avec la GST purifiée de foie de rat

On constate qu'en présence d'irradiation UV, il y a diminution de l'activité enzymatique et ceci est vérifié dans tous les cas.

Pour affirmer qu'une molécule est photoactivable, il faut pouvoir montrer que la diminution de l'activité est liée à la concentration en inhibiteur mais également et surtout à la présence d'irradiation UV.

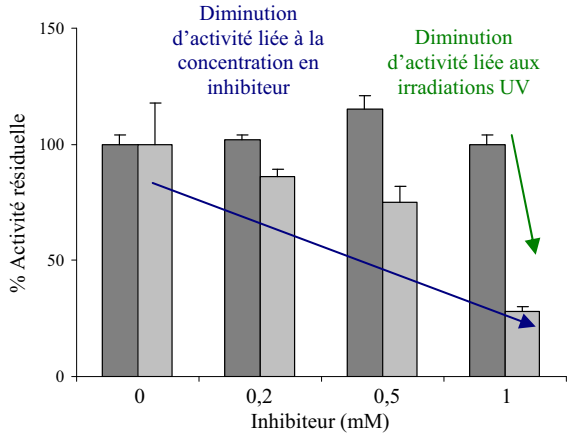


Figure 25 : Interprétations des résultats de photomarquage pour 3d

Remarque :

Lors de certains essais en absence d'irradiation UV, on constate une variation de l'activité enzymatique. La diminution de l'activité, dans ce cas, s'explique par le fait que la molécule peut inhiber l'enzyme sans irradiation (inhibition réversible vue précédemment). Cela témoigne d'une trop faible dilution du milieu avant de procéder aux mesures. Pour des raisons d'homogénéité des résultats, toutes les dilutions ont été faites de la même façon (solution diluée 10 fois).

Suite à ces expériences de photomarquage, on peut dire que les molécules bifonctionnelles sont effectivement des molécules photoactivables.

Les mêmes expériences ont été réalisées sur la $GSTP_{1\text{-}1}$ recombinante humaine purifiée.

2.2.2.3.2. Essais de photomarquage avec la $GSTP_{1\text{-}1}$ recombinante humaine purifiée

Dans ce cas, la concentration d'inhibiteur est fixée à 1mM. Le seul paramètre qui varie est la présence ou non d'irradiation UV pendant 30min.

Les mêmes conditions que lors des essais de photomarquage avec la GST purifiée de foie de rat ont été réalisées.

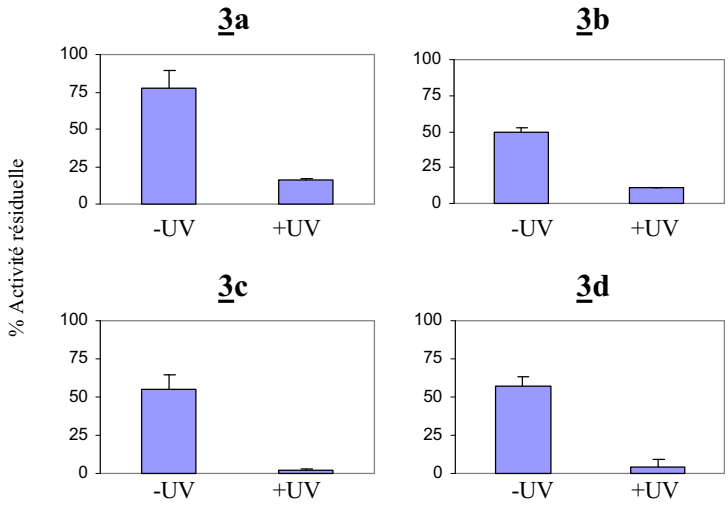


Figure 26 : Inhibition irréversible de l'activité enzymatique de la $GSTP_{1\text{-}1}$ recombinante humaine purifiée par les molécules 3 (1mM)
(100% d'activité résiduelle correspond à l'activité obtenue en absence d'inhibiteur)

La Figure 26 montre bien que dans tous les cas, il y a eu formation d'une liaison covalente en présence d'irradiation UV. Ceci est visible par la chute du pourcentage d'activité résiduelle même après dilution.

Ces diagrammes nous permettent donc de dire que les molécules bifonctionnelles **3a-d** sont effectivement des sondes photoactivables, car l'inhibition de la $GSTP_{1-1}$ recombinante humaine purifiée est liée à la présence de la molécule ainsi qu'à l'activation par irradiation UV.

Cependant, on constate sur ces diagrammes que dans le cas où il n'y a pas eu d'irradiation l'activité résiduelle n'est pas de 100%, mais varie de 75 à 50%.

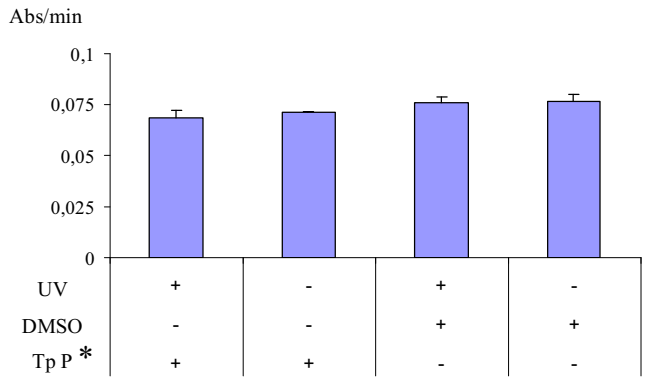


Figure 27 : Mise en évidence de l'absence d'influence de l'irradiation UV et du DMSO sur l'inhibition

La Figure 27 permet de montrer que le diméthylsulfoxyde utilisé lors des tests ainsi que les UV n'ont pas d'effet sur l'activité enzymatique. Cette différence d'activité observée peut être expliquée dans ce cas par la forte concentration en inhibiteur qui peut, de ce fait, entraîner une inhibition.

Ceci est confirmé par une expérience réalisée sur **3d**, en faisant varier la concentration d'inhibiteur lors d'essais d'inhibition irréversible.[*]

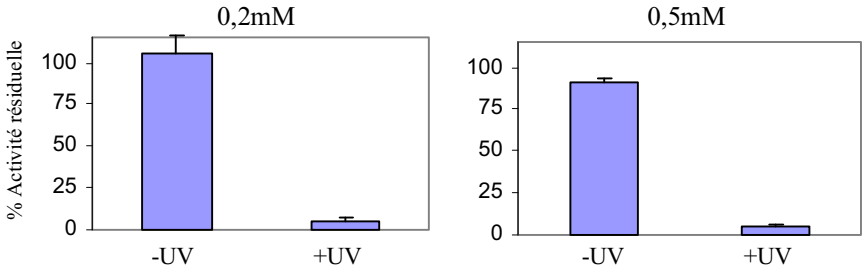


Figure 28 : Inhibition irréversible sur la $GSTP_{1-1}$ recombinante humaine purifiée de 3d à 0,2mM et 0,5mM pendant 30min

A 0,2mM d'inhibiteur et en absence d'irradiation UV, l'activité résiduelle de l'enzyme est de 100%. Par contre, dès que la concentration d'inhibiteur augmente, ce pourcentage diminue.

[*] Tp P : tampon phosphate

2.2.2.4. Étude complémentaire

Du fait des résultats intéressants obtenus lors des analyses photophysiques et biologiques, une étude cinétique a été réalisée sur **3d**. Pour cela, les mêmes essais d'inhibitions irréversibles sur la $GSTP_{1\text{-}1}$ ont été menés mais sur des concentrations variables d'inhibiteur ainsi que sur des temps d'irradiations allant de 0 à 30 secondes.

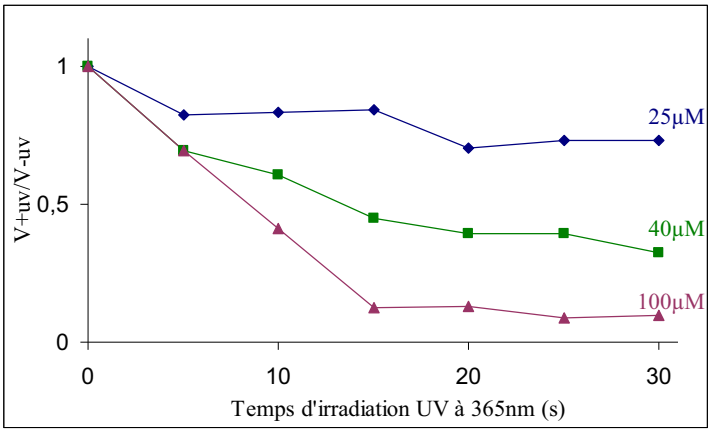


Figure 29 : Cinétique d'inhibition de la $GSTP_{1\text{-}1}$ recombinante humaine purifiée par 3d.

Cette cinétique montre qu'un temps très court (15s) est nécessaire au composé **3d**, à une concentration de 100µM, pour inhiber quasi totalement la $GSTP_{1\text{-}1}$.

Des résultats obtenus, on peut déduire que les motifs que nous avons synthétisés (motif benzophénone et analogues thiophèniques) sont des groupements photoactivables. De plus, ce sont des inhibiteurs de la $GSTP_{1\text{-}1}$ recombinante humaine purifiée ainsi que de la GST purifiée de foie de rat. D'autre part, il a été montré que le motif thiénylthiophène semble très prometteur pour la réalisation de marquage par photoaffinité. Ce motif possède des propriétés intéressantes comme par exemple le fait de posséder une bande $n \rightarrow \pi^*$ proche de la longueur d'onde utilisée pour réaliser les irradiations UV (365nm), ou encore le temps plus court, comparé au motif benzophénone, pour l'activation par irradiation UV. Ces deux points sont d'ailleurs vraisemblablement liés. Plus la longueur d'onde utilisée lors du photomarquage est proche de 365nm et plus le temps nécessaire à l'activation est court, plus on diminue le risque d'endommager les protéines d'intérêt rendant ainsi leur détection et identification complète, c'est-à-dire sans perte d'informations.

3. Rétrosynthèse des nouvelles structures trifonctionnelles

Suite aux données obtenues avec les tests photophysiques et biologiques, nous avons débuté la synthèse des molécules cibles **B**, **C** et **D**.

Bien que les données obtenues lors des tests montrent nettement l'importance de la molécule possédant le motif thénoylthiophène, correspondant à la molécule **D**, les autres structures trifonctionnelles (**B** et **C**) ont également été synthétisées. En effet les synthèses ont été réalisées parallèlement à la caractérisation des molécules tests et ont le mérite de vérifier le caractère général de la méthode.

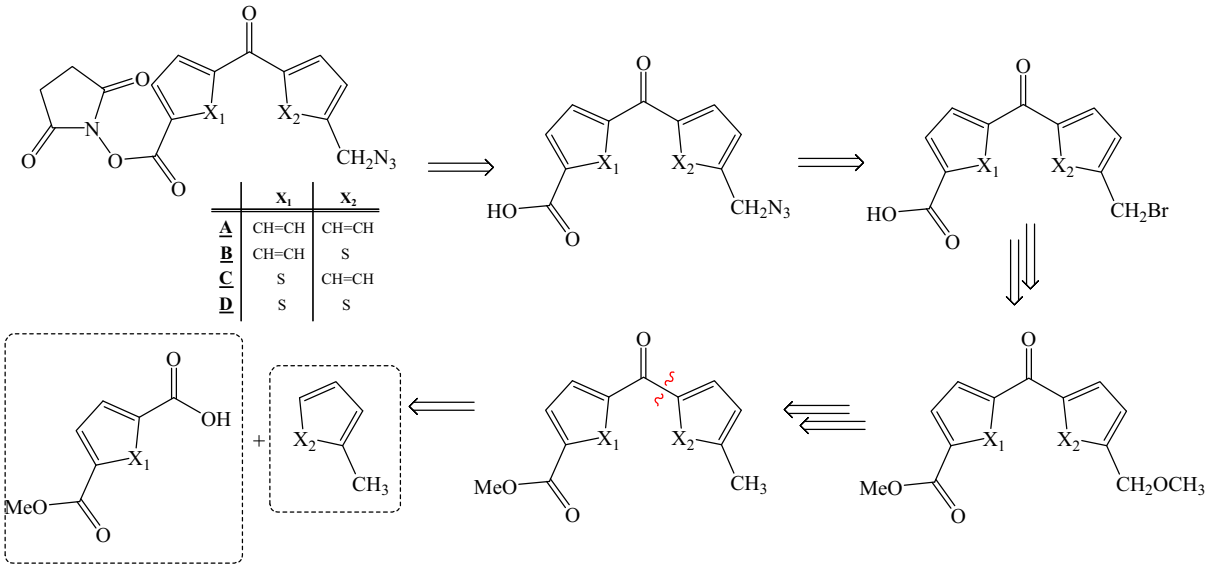


Schéma 19 : Rétrosynthèse générale des molécules cibles

Pour cela, la voie de synthèse utilisée pour la réalisation de **A**, la première structure, a été appliquée.*

Nous avons vu lors de la synthèse de la sonde **A**, que les produits de départ nécessaires étaient le toluène mais également le monoester méthylique de l'acide téréphtalique, que nous avons synthétisé à partir de l'acide téréphtalique. Un des composés de départ pour réaliser la synthèse du composé **B**, est également ce monoester. Dans ce cas, il est utilisé avec le 2-méthylthiophène qui est un produit commercial.

Cependant, le problème du produit de départ se pose pour les deux composés **C** et **D**. En effet, dans ce cas le toluène et le 2-méthylthiophène respectivement sont nécessaires ainsi que l'acide 5-(méthoxycarbonyl)-2-thiophènique (Figure 30).

* Cf. Chap. III.§4.3

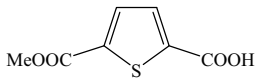


Figure 30 : Acide 5-(méthoxycarbonyl)-2-thiophènique

Ce monoester n'est pas commercial, il est donc nécessaire de le synthétiser. Nous allons voir dans le paragraphe suivant les différentes voies de synthèse envisagées pour obtenir ce composé.

4. Synthèse de l'acide 5-(méthoxycarbonyl)-2-thiophène carboxylique

4.1. Bibliographie

L'acide 5-(méthoxycarbonyl)-2-thiophène carboxylique est un composé qui est utilisé pour synthétiser, des activateurs de récepteurs[91] ou des inhibiteurs enzymatiques,[92] etc.[93] Cependant, peu d'articles décrivent la synthèse de l'acide 5-méthoxycarbonyl-2-thiophènique. Une des premières publications à ce sujet fut un brevet déposé par Du Pont de Nemour & Company en 1955.[94] Ils l'utilisent comme intermédiaire pour former une nouvelle classe de composés qui permettent d'obtenir un rendu supérieur de l'image lors du développement des photographies en couleur. Pour cela, ils partent du diester méthylique de l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique (dont la synthèse n'est pas précisée) qu'ils font réagir avec une solution de soude dans un mélange méthanol/dioxane (4:3). Le produit désiré a été obtenu avec 32% de rendement.

Une seconde publication fait état de la synthèse de notre composé de départ. Birkinshaw et Chaplen ont en 1955 synthétisé le monométhylester de l'acide 2,5-thiophenedicarboxylique

[91] Miyaji, K.; Ishiwata, N.; Nakamura, T. WO2004033433 **2004**; *Chem. Abs. 140*, 357335.
[92] Labrecque, D.; Attardo, G.; Bubenik, M.; Chan, L.; Charron, S.; Denis, R.; Falardeau, G.; Lamothe, S.; Preville, P.; Zacharie, B.; Rej, R. WO200075129; *Chem. Abs. 134*, 42055.
[93] (a) Fertig, G.; Herting, F.; Koerner, M.; Kubbies, M.; Limberg, A.; Reiff, U.; Tibies, U. WO2005121119, **2005**; *Chem. Abs. 144*, 51438. (b) Fertig, G.; Herting, F.; Koerner, M.; Kubbies, M.; Limberg, A.; Reiff, U.; Tibies, U. WO2005121120, **2005**; *Chem. Abs. 144*, 69719. (c) Fertig, G.; Herting, F.; Koerner, M.; Kubbies, M.; Limberg, A.; Reiff, U.; Tibies, U. WO2005121134; *Chem. Abs. 144*, 69718.
[94] Martin, E.L. GB Patent 705,950 **1954**; *Chem. Abst. 49*, 11219.

en tant qu'intermédiaire de réaction mais à titre de référence pour identifier le junipal, produit naturel issu de la décomposition du genévrier par un champignon.[95] (Schéma 20)

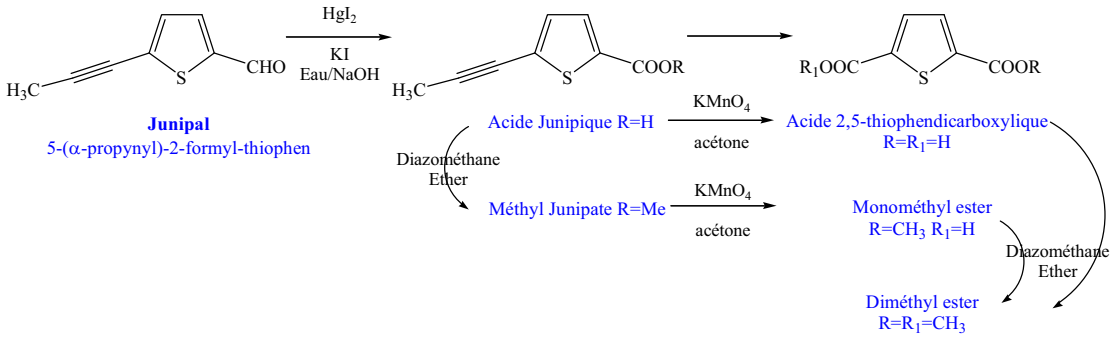


Schéma 20 : Méthode de caractérisation utilisée par Birkinshaw et Chaplen pour identifier le produit naturel volatil issu d'un champignon du genévrier en décomposition

Pour confirmer les différentes structures ainsi formées, ils ont réalisé la synthèse de l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique, du diester ainsi que du monoester méthylique de ce dernier, en suivant la méthode décrite par Griffing et Salisbury.[96]

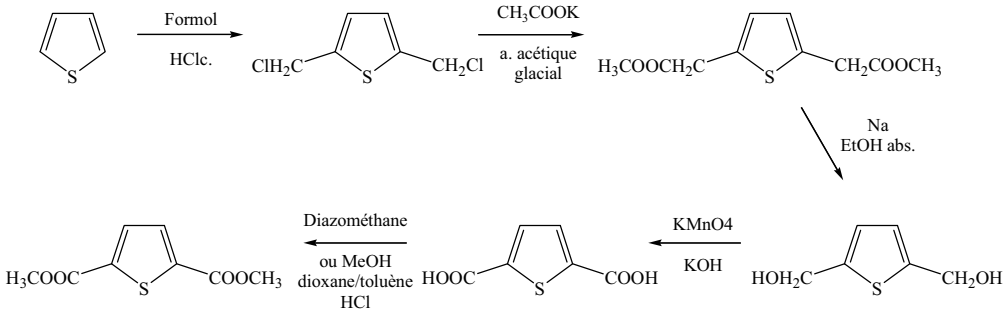
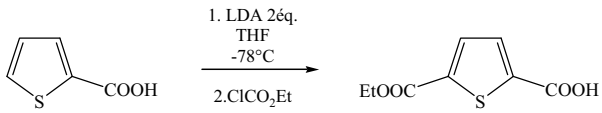


Schéma 21 : Voie de synthèse pour former l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique

Une autre méthode décrite pour la synthèse du monoéthyle ester consiste à former le lithien de l'acide 2-thiophènecarboxylique puis de le faire réagir avec du chloroformate d'éthyle.[97]



[95] Birkinshaw, J.H.; Chaplen, P. *Biochem. J.* **1955**, *60*, 255-259.
[96] Griffing, J.M.; Salisbury, L.F. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 3416-3419.
[97] Dawson, M.I.; Jong, L. Hobbs, P.D.; Cameron, J.F.; Chao, W.; Pfahl, M.; Lee, M-O.; Shroot, B.; Pfahl, M. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3368-3383.

Remarque :

Ce monoester, bien que n'étant pas le monoester méthylique, peut également être utilisé comme réactif de départ pour la synthèse de nos molécules trifonctionnelles.

Toutes les expériences qui vont suivre ont été menées en parallèle et sont directement inspirées de la littérature.

4.2. Synthèse de l'acide 5-(méthoxycarbonyl)thiophène-2-carboxylique

4.2.1. Première voie de synthèse

La première voie de synthèse que nous avons prospectée consiste à former le lithien du 2,5-dibromothiophène pour le faire ensuite réagir avec de la carboglace (CO_2 sec). Une fois ce diacide formé, il sera converti en diester puis une monosaponification devrait permettre l'obtention du monoester méthylique voulu.

4.2.1.1. Synthèse du 2,5-dibromothiophène

Le 2,5-dibromothiophène est un composé commercial mais coûteux. C'est pour cette raison que nous avons décidé de le synthétiser en partant du thiophène, composé commercial et moins onéreux. Pour ce faire, nous avons suivi la méthode exposée par Bäuerle[98] pour bromer le thiophène. Nous avons donc travaillé en absence de lumière, en présence de 2 équivalents de N-bromosuccinimide et d'un équivalent de thiophène dans le diméthylformamide. Cette réaction est laissée sous agitation pendant une journée à température ambiante, après quoi elle est stoppée en la versant sur de la glace. Après extraction, le produit bromé (**16**) est obtenu avec 41% de rendement.

[98] Bäuerle, P.; Würthner, F.; Götz, G.; Effenberger, F. *Synthesis* **1993**, 1099-1103.

4.2.1.2. Synthèse de l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique

L'étape suivante décrite par Van Pharm[99] est la formation du dilithien qu'il fait réagir sur de la carboglace. Pour cela, il utilise le *n*-butylithium dans le tétrahydrofurane à -55°C. Le lithien formé est alors versé sur la carboglace.
Cette expérience a été réalisée sans grand succès (8% de diacide et 15% de monoacide (**17**)).
Nous avons donc tenté de ne pas passer par le diacide et de former directement le diester méthylique en faisant réagir en vain le lithien avec le carbonate de diméthyle.

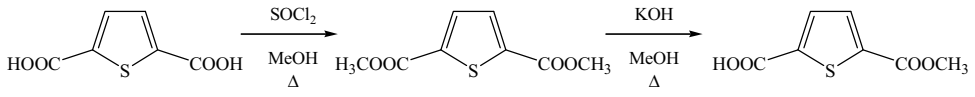
4.2.2. Seconde voie de synthèse

4.2.2.1. Synthèse de l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique

Une seconde voie de synthèse a été testée, non pas avec le dibromothiophène mais directement avec le thiophène, tout en gardant le concept décrit dans le paragraphe précédent c'est-à-dire faire réagir un lithien sur de la carboglace, afin d'obtenir le diacide.
Dans ce cas, le lithien a été formé grâce au diisopropylamidure de lithium (LDA) formé *in situ*, et nous a permis d'obtenir le diacide attendu (**18**) avec un rendement de 35%.

4.2.2.2. Synthèse du diester méthylique de l'acide 2,5-thiophènedicarboxylique

Van Pharm fait réagir ce diacide avec le diazométhane pour obtenir le diester méthylique. Pour éviter l'utilisation de ce composé et rendre plus aisée la synthèse de ce dernier, nous avons décidé d'appliquer la méthode que nous avons développée lors de la réalisation de monoester méthylique de l'acide téréphtalique.*



18 **19a** **20a**

Après avoir formé le diester méthylique (**19a**) avec un rendement de 90%, nous avons réalisé la monosaponification qui nous a conduit à la formation du monoester désiré (**20a**) avec un rendement de 56%.

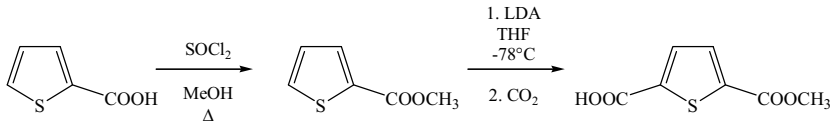
[99] Van Pham, C.; Macomber, R.S.; Mark, H.B.Jr.; Zimmer, H. *J. Org. Chem*. **1984**, *49*, 5250-5253.
* cf. Chap. III § 3.3

La méthode que nous avons développée pour réaliser la synthèse de di-et monoester de l'acide téréphtalique peut donc également s'appliquer à la synthèse de di- et monoester méthylique d'un hétérocycle tel que l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique. Le paragraphe 4.3 de ce chapitre nous permettra de voir si cette méthode peut être généralisée pour la synthèse d'autres di- et monoester de ce même acide.

Bien qu'ayant obtenu notre composé, nous avions mené en parallèle une troisième voie de synthèse qui fut tout aussi fructueuse que la seconde.

4.2.3. Troisième voie de synthèse

Cette fois, nous avons utilisé l'acide 2-thiophènique, produit commercial, comme produit de départ. A la place de former directement le lithien sur cet acide et de le faire réagir avec le chloroformiate d'éthyle,[97] nous l'avons tout d'abord estérifié. Ce n'est qu'une fois l'ester obtenu que le lithien a été formé puis converti en acide.



21 **20a**

L'acide 5-(méthoxycarbonyl)-2-thiophènique (**20a**) a été obtenu avec un rendement global de 66%.

Ces différentes voies de synthèse nous ont donc permis d'obtenir le monoester méthylique de l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique, qui est notre produit de départ pour la synthèse de nos molécules **C** et **D**.

Cependant nous avons tout de même appliqué la seconde voie de synthèse utilisée précédemment afin de voir si cette méthode de formation de diester et monoester pouvait également être généralisée sur ce nouveau système que représente l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique.

4.3. Synthèse de diesters et monoesters de l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique

Suite aux résultats obtenus lors de la seconde voie de synthèse pour former le monoester méthylique, nous l'avons appliqué à d'autres alcools (Schéma 22).

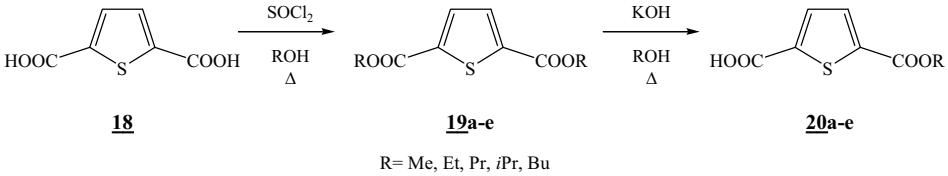


Schéma 22 : Généralisation de la méthode de synthèse de diesters et monoesters de l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique

Nous avons utilisé l'éthanol, le propanol, l'*iso*propanol ainsi que le butanol, qui sont les alcools utilisés dans le cas de l'acide téréphtalique, pour obtenir les diesters correspondants.

			Pf (°C)
R	Produit	Rendement (%)	Trouvé
Me	**19a**	90%	146
Et	**19b**	95%	53-54
Pr	**19c**	86%	huile[a]
i-Pr	**19d**	36%	huile[a]
Bu	**19e**	80%	huile[a]

Tableau 4 : Diestérification de l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique

De bons rendements (Tableau 4) ont été obtenus pour les alcools primaires. Cependant pour le cas de l'*iso*propanol (alcool secondaire) le rendement n'est que de 36%. Ce faible rendement peut s'expliquer par un effet d'encombrement stérique. Le même phénomène a été observé lors de la formation de diesters de l'acide téréphtalique (cf. Chap III).[a]

			Pf (°C)
R	Produit	Rendement (%)	Trouvé
Me	**20a**	56%	192-193
Et	**20b**	54%	137-140
Pr	**20c**	70%	106-107
i-Pr	**20d**	68%	146-147
Bu	**20e**	53%	101-102

Tableau 5 : Monosaponification de diester de l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique

[a] A température ambiante

Suite[a] à une monosaponification des diesters, les monoesters correspondants ont été obtenus (Tableau 5) avec des rendements allant de 53 à 70%. La chute de rendement, observée lors de l'utilisation du *n*-butanol pour la synthèse du monoester butylique de l'acide téréphtalique, n'a pas été observée dans ce cas.

Lors de ces expériences, nous avons utilisé les alcools correspondants comme solvants et comme réactifs. De plus, aucune trace d'acide de départ n'a été observée après monosaponification des diesters.

Nous avons donc mis au point deux méthodes qui permettent de synthétiser le monoester méthylique de l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique. L'une des méthodes est celle que nous avons mise au point pour la synthèse du monoester méthylique de l'acide téréphtalique. Cette même méthode a été appliquée après avoir formé l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique à partir du thiophène. De plus, cette méthode nous a également permis, comme ce fut le cas pour l'acide téréphtalique, d'obtenir divers di et monoester de l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique. La seconde méthode, quant à elle, utilise l'acide thiophène-2-carboxylique comme produit de départ et ne nécessite que deux étapes.

Ces deux méthodes ont permis d'accéder au monoester méthylique de l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique, nécessaire à la synthèse de deux de nos structures trifonctionnelles.

[a] Pollock, J.R.A.; Stevens, R. *Dictionary of Organic compounds* Fourth Ed. Eyre&Spottiswoode **1965-1978** Vol 5,p 2949.

5. Synthèses des structures trifonctionnelles B, C et D

Pour la synthèse de ces trois molécules, la même voie que pour atteindre la molécule **A** a été développée, en passant par un éther méthylique.

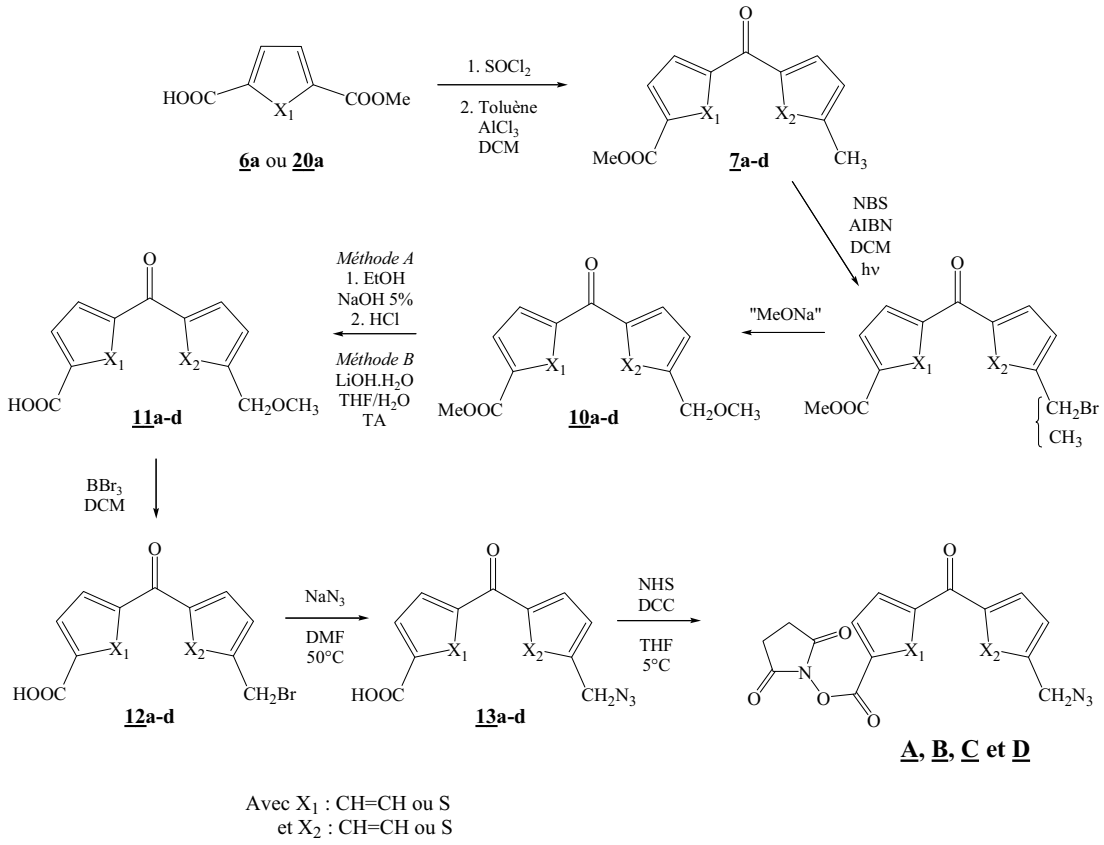


Schéma 23 : Voie de synthèse des molécules A, B, C et D

5.1. Préparation des analogues de la benzophénone

L'acide, que ce soit le monoester méthylique de l'acide téréphtalique ou l'acide 5-(méthoxycarbonyl)-2-thiophènique, est dissout dans le chlorure de thionyle, qui joue le rôle de solvant mais aussi de réactif. Après 4h à reflux, l'excès de solvant est évaporé. Sur le chlorure d'acide obtenu sont coulés à froid 2 équivalents de toluène ou de 2-méthylthiophène ainsi que le dichlorométhane, suivi de 3 équivalents de chlorure d'aluminium. Après traitement et purification, les composés **7b-d** ont été obtenus avec de bons rendements (65-86%).

5.2. Bromation radicalaire

Las analogues de la benzophénone obtenus après la réaction de type Friedel-Crafts (**7b-c**) sont dissous dans du dichlorométhane. Après avoir ajouté une quantité catalytique de α,α'-azodiisobutyronitrile, le milieu est éclairé à l'aide d'une lampe halogène de 500W. 1,2 équivalents de *N*-bromosuccinimide sont ajoutés au milieu par petites portions.
La réaction n'étant pas totale, des mélanges (produit de départ (R-CH_3)/produit bromé(R-CH_2Br)) ont été obtenus. Comme pour **A**, une séparation de ces composés n'a pas été possible. Le mélange a été directement remis en réaction.

5.3. Formation de l'éther

Le mélange R-CH_3/R-CH_2Br est mis à reflux 3h en présence de méthanolate de sodium préalablement préparé. Les éthers sont purifiés sur gel de silice et obtenus purs (**10b-d**).
Cette étape de synthèse peut être considérée comme une purification.

5.4. Saponification

L'éther (**11b-d**) est dissous dans un mélange éthanol/soude aqueuse à 1,25M. Après 3h de reflux, l'acide correspondant est filtré sur Büchner après avoir acidifié la phase aqueuse. Aucune purification supplémentaire n'est nécessaire.

5.5. Formation des composés bromés (purs)

L'acide **11b-d** est mis en suspension dans du dichlorométhane. Après avoir placé le milieu réactionnel dans un bain de glace, 3 équivalents de tribromure de bore sont ajoutés. Les composés bromés (**12b-d**) sont obtenus après lavage à l'eau puis évaporation du solvant sous pression réduite.

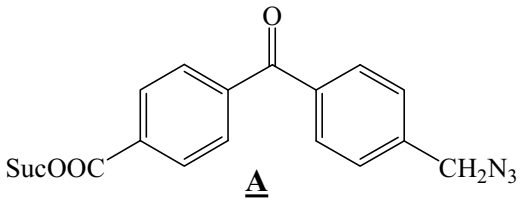
5.6. Introduction de la fonction azoture

Cette étape permet d'introduire par substitution nucléophile le groupement azoture nécessaire lors de l'étape de détection. Pour cela, le composé bromé est mis en présence d'azoture de sodium. Cette réaction est quantitative pour les trois composés (**13b-d**).

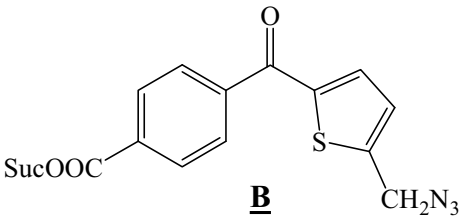
5.7. Estérification

Cette dernière étape est une estérification classique qui permet la formation de l'ester activé. Elle se fait en présence de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide et de N-hydroxysuccinimide dans le tétrahydrofurane à 5°C. Les esters **B**, **C** et **D** sont ainsi obtenus.

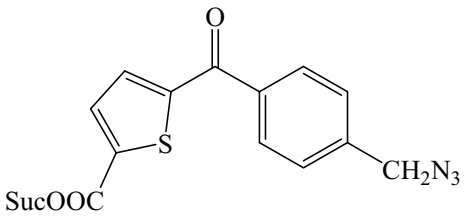
Des analyses photophysiques ainsi que biologiques sur les molécules bifonctionnelles que nous avons préalablement synthétisées ont montrés que ces motifs (analogues thiophèniques de la benzophénone) sont de bons groupements photoactivables.
Nous avons donc synthétisé trois nouvelles structures trifonctionnelles **B**, **C** et **D** représentées ci-dessous.



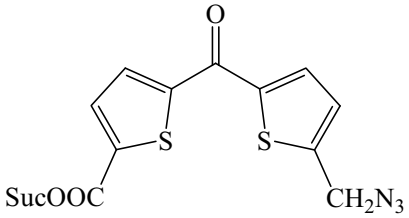
A



B



C



D

Avec la synthèse de ces nouvelles sondes photoactivables, le premier objectif défini par ce travail de thèse est atteint. Notre prochaine étape est donc de fixer ces molécules sur le glutathion afin d'obtenir des dérivés photoactivables du glutathion pour pouvoir caractériser les cibles cellulaires de ce dernier. C'est ce que nous allons développer dans le prochain chapitre.

Partie expérimentale

Synthèse des molécules tests bifonctionnelles ***125***

Formation du motif photoactivable ... 125
(5-Méthyl-2-thiényl)(phényl)méthanone (1b) ... 125
(4-Méthylphényl)(2-thiényl)méthanone (1c) ... 125
(5-Méthyl-2-thiényl)(2-thiényl)méthanone (1d) ... 126

Formation de l'azoture ... 127
[5-(Azidométhyl)-2-thiényl](phényl)méthanone (3b) ... 128
[4-(Azidométhyl)phényl](2-thiényl)méthanone (3c) ... 128
[5-(Azidométhyl)-2-thiényl](2-thiényl)méthanone (3d) ... 129

Remarque : Passage par un éther et composé bromé caractérisé ... 130
[4-(Méthoxyméthyl)phényl](phényl)méthanone (15a) ... 130
[5-(Méthoxyméthyl)-2-thiényl](phényl)méthanone (15b) ... 130
[4-(Méthoxyméthyl)phényl](2-thiényl)méthanone (15c) ... 131
[5-(Méthoxyméthyl)-2-thiényl](2-thiényl)méthanone (15d) ... 131
[4-(Bromométhyl)phényl](phényl)méthanone (2a) ... 132
[5-(Bromométhyl)-2-thiényl](phényl)méthanone (2b) ... 132
[4-(Bromométhyl)phényl](2-thiényl)méthanone (2c) ... 133
[5-(Bromométhyl)-2-thiényl](2-thiényl)méthanone (2d) ... 133

Synthèse du 2,5-thiophènedicarboxylate de méthyle et de l'acide 5-(méthoxycarbonyl)-2-thiophènecarboxylique ***134***
2,5-Dibromothiophène (16) ... 134
Acide 5-bromothiophène-2-carboxylique (17) ... 135
Acide thiophène-2,5-dicarboxylique (18) ... 135
2,5-Thiophènecarboxylate de méthyle (19a) ... 136
2-Thiophènecarboxylate de méthyle (21) ... 137
Acide 5-(méthoxycarbonyl)-2-thiophènecarboxylique (20a) ... 137

Généralisation de la méthode ***139***

Diestérification ... 139
2,5-Thiophènecarboxylate d'éthyle (19b) ... 139
2,5-Thiophènedicarboxylate de propyle (19c) ... 140
2,5-Thiophènedicarboxylate d'isopropyle (19d) ... 140
2,5-Thiophènedicarboxylate de butyle (19e) ... 140

Monosaponification ... 141
Acide 5-(éthoxycarbonyl)-2-thiophènecarboxylique (20b) ... 141
Acide 5-(propoxycarbonyl)-2-thiophènecarboxylique (20c) ... 141
Acide 5-(isopropoxycarbonyl)-2-thiophènecarboxylique (20d) ... 142
Acide 5-(butoxycarbonyl)-2-thiophènecarboxylique (20e) ... 142

Synthèse des structures trifonctionnelles B, C et D ***143***

Préparation des analogues de la benzophénone ... 143
4-[(5-Méthyl-2-thiényl)carbonyl]benzoate de méthyle (7b) ... 143
5-(4-Méthylbenzoyl)-2-thiophènecarboxylate de méthyle (7c) ... 144
5-[(5-Méthyl-2-thiényl)carbonyl]-2-thiophènecarboxylate de méthyle (7d) ... 144

Bromation radicalaire ... 145

Formation de l'éther 146
4-{[5-(Méthoxyméthyl)-2-thiényl]carbonyl}benzoate de méthyle(10b) 146
5-[4-(Méthoxyméthyl)benzoyl]-2-thiophènecarboxylate de méthyle (10c) 147
5-{[5-(Méthoxyméthyl)-2-thiényl]carbonyl}-2-thiophènecarboxylate de méthyle (10d) 147

Saponification 148
Acide 4-{[5-(méthoxyméthyl)-2-thiényl]carbonyl}benzoique (11b) 148
Acide 5-[4-(méthoxyméthyl)benzoyl]-2-thiophènecarboxylique (11c) 149
Acide 5-{[5-(méthoxyméthyl)-2-thiényl]carbonyl}-2-thiophènecarboxylique (11d) 149

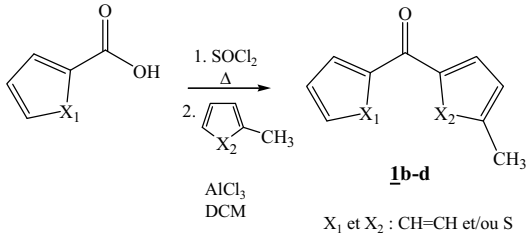
Formation du composé bromé 150
Acide 4-{[5-(bromométhyl)-2-thiényl]carbonyl}benzoique (12b) 150
Acide 5-[4-(bromométhyl)benzoyl]-2-thiophènecarboxylique (12c) 150
Acide 5-{[5-(bromométhyl)-2-thiényl]carbonyl}-2-thiophènecarboxylique (12d) 151

Formation de l'azoture 151
Acide 4-{[5-(azidométhyl)-2-thiényl]carbonyl}benzoique (13b) 152
Acide 5-[4-(azidométhyl)benzoyl]-2-thiophènecarboxylique (13c) 152
Acide 5-{[5-(azidométhyl)-2-thiényl]carbonyl}-2-thiophènecarboxylique (13d) 152

Estérification 153
1-[(4-{[5-(Azidométhyl)-2-thiényl]carbonyl}benzoyl)-*N*-oxy]pyrrolidine-2,5-dione (B) 153
1-[({5-[4-(Azidométhyl)benzoyl]-2-thiényl}carbonyl)-*N*-oxy]pyrrolidine-2,5-dione (C) 154
1-{[(5-{[5-(Azidométhyl)-2-thiényl]carbonyl}-2-thiényl)carbonyl]-*N*-oxy}pyrrolidine-2,5-dione (D) 154

Synthèse des molécules tests bifonctionnelles

Formation du motif photoactivable



Mode opératoire général

A 1,22g (1éq., 10mmol) d'acide benzoïque ou 1,28g (1éq., 10mmol) d'acide 2-thiophène carboxylique sont ajoutés 10ml de chlorure de thionyle (utilisé comme réactif et comme solvant). Après 4 heures à reflux, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le chlorure d'acide ainsi obtenu est remis directement en réaction. Dans un bain de glace, 2,13ml (2éq., 20mmol) de toluène ou 1,94ml (2éq., 20mmol) de 2-méthylthiophène sont coulés sur le chlorure d'acide, ainsi que 20ml de dichlorométhane distillé. Sous forte agitation 2g (1,5éq., 15mmol) de chlorure d'aluminium réduits en poudre sont ajoutés par petites quantités. Après 4 heures d'agitation à température ambiante, le milieu est hydrolysé sur 100ml d'un mélange eau/glace acidifié avec 4ml d'acide chlorhydrique concentré puis extrait au dichlorométhane (10ml). La phase organique est lavée à l'eau (2x30ml), séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur gel de silice (dichlorométhane).

(5-Méthyl-2-thiényl)(phényl)méthanone (1b)

$C_{12}H_{10}OS$ MW=202,27g.mol^{-1}

Produits de départ : acide benzoïque (X_1 : CH=CH) et 2-méthylthiophène (X_2 : S)

Aspect : huile brune

Rdt : 89%

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,83 (d, 2H, J=7,5Hz); 7,60-7,53 (m, 1H); 7,51-7,45 (m, 3H); 6,83 (d, 1H, J=3,6Hz); 2,58 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 188,1 (C=O); 150,4; 141,6; 138,3; 135,7; 132,0; 129,0(2C); 128,3(2C); 126,7, 16,1 (CH_3).

GC/MS m/z (%) : 202 (98, M^+); 187 (11); 125 (100); 105 (16); 97 (10).

(4-Méthylphényl)(2-thiényl)méthanone (1c)

$C_{12}H_{10}OS$ MW=202,27g.mol^{-1}

Produits de départ : acide thiophène-2-carboxylique (X_1 : S) et toluène (X_2 : CH=CH)

Aspect : solide brun-rose

Rdt : 48%

Pf : 72-75°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,79 (d, 2H, J=8,1Hz); 7,70 (d, 1H, J=4,7Hz); 7,65 (d, 1H, J=3,6Hz); 7,30 (d, 2H, J=8,1Hz); 7,16 (dd, 1H, J=3,6Hz et J=4,7Hz); 2,45 (s, 3H, C*H*$_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 187,7 (C=O); 143,9; 143,0; 135,4; 134,4; 133,8; 129,4 (2C); 129,1 (2C); 127,8; 21,6 (CH_3).

GC/MS m/z (%) : 202 (100, M^+); 187 (43); 119 (87); 111 (67); 91 (43).

(5-Méthyl-2-thiényl)(2-thiényl)méthanone (1d)

$C_{10}H_8OS_2$ MW=208,30g.mol^{-1}

Produits de départ : acide thiophène-2-carboxylique (X_1 : S) et 2-méthylthiophène (X_2 : S)

Aspect : solide brun

Rdt : 48%

Pf : 50-52°C

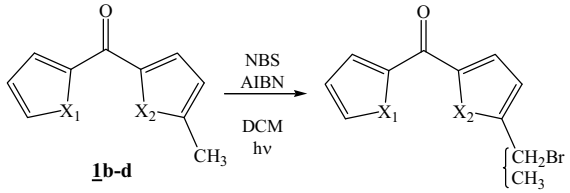
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,84 (d, 1H, J=3,6Hz); 7,72 (d, 1H, J=3,6Hz); 7,66 (d, 1H, J=4,9Hz); 7,17 (dd, 1H, J=3,6Hz et J=4,9Hz); 6,85 (d, 1H, J=3,6Hz); 2,57 (s, 3H, C*H*$_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 178,4 (C=O); 149,7; 143,0; 140,7; 133,9; 133,0; 132,7; 127,8; 126,7; 15,9 (CH_3).

GC/MS m/z (%) : 208 (M^+,100); 125 (69); 11 (31); 97 (8).

Formation de l'azoture

Bromation radicalaire



A 1,01g (1éq., 5mmol) des composés **1b-c** ou 1,04g (1éq., 5mmol) de composé **1d** sont ajoutés 15ml de dichlorométhane distillé ainsi qu'une pointe de spatule de α,α'-azodiisobutyronitrile. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 30min grâce à une lampe halogène de 500W. Trois ajouts de 356mg (0.4éq., 2mmol) de *N*-bromosuccinimide sont effectués. Avant chaque ajout, la lampe est enlevée; l'ajout suivant ne s'effectue que lorsque la coloration orange (présence de dibrome) n'est plus persistante. Une fois tous les ajouts effectués et après être revenu à température ambiante, le milieu réactionnel est lavé à l'eau (2x20ml). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le mélange obtenu est remis en réaction sans autre purification.

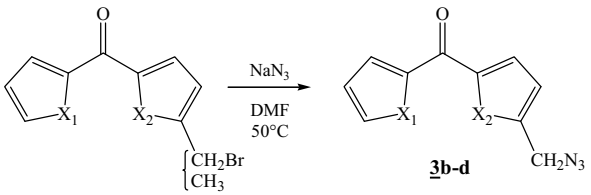
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) des composés bromés :

Issu du composé **1b** singulet caractéristique du –C*H*$_2$Br à 4,71 ppm.

Issu du composé **1c** singulet caractéristique du –C*H*$_2$Br à 4,54 ppm.

Issu du composé **1d** singulet caractéristique du –C*H*$_2$Br à 4,72 ppm.

Introduction de l'azoture



On suppose une réaction totale (5mmol) lors de l'étape suivante.

Le mélange obtenu lors de la bromation est dissous dans 20ml de diméthylformamide puis 326mg (1éq., 5mmol) d'azoture de sodium sont ajoutés. Le milieu réactionnel est chauffé à

50°C pendant 3h. Après retour à température ambiante, 50ml d'eau sont ajoutés. Le milieu est extrait à l'éther (25ml) après une nuit d'agitation à température ambiante. La phase organique est lavée à l'eau (2x15ml) puis séchée sur sulfate de magnésium et concentrée sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur gel de silice (dichlorométhane).

[5-(Azidométhyl)-2-thiényl](phényl)méthanone (3b)

$C_{12}H_9N_3OS$ $MW=243,29g.mol^{-1}$

Produit de départ : X_1 : CH=CH et X_2 : S

Aspect : solide jaune-orange

Rdt : 56% (2étapes)

Pf : 33°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,85 (d, 2H, J=7,3Hz); 7,64-7,48 (m, 4H); 7,09 (d, 1H, J=3,7Hz); 4,56 (s, 2H, CH_2N_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 187,9 (C=O); 146,6; 143,9; 137,7; 134,8; 132,4; 129,1 (2C); 128,6 (2C); 127,4; 49,3 (CH_2N_3).

IR (KBr) : 2080 (N_3); 1627 (C=O); 1452 (CH_2); 1294; 1215 (C-C); 1047 (C-O).

[4-(Azidométhyl)phényl](2-thiényl)méthanone (3c)

$C_{12}H_9N_3OS$ $MW=243,29g.mol^{-1}$

Produit de départ : X_1 : S et X_2 : CH=CH

Aspect : solide jaune

Rdt : 85% (2étapes)

Pf : 42°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,88 (d, 2H, J=7,9Hz); 7,73 (d, 1H, J=4,9Hz); 7,64 (d, 1H, J=3,7Hz); 7,45 (d, 2H, J=7,9Hz); 7,17 (dd, 1H, J=3,7Hz et J=4,9Hz); 4,45 (s, 2H, CH_2N_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 187,5 (C=O); 143,4; 139,8; 138,0; 134,8; 134,4; 129,7 (2C); 128,0 (2C); 54,3 (CH_2N_3).

IR (KBr) : 2096 (N_3); 1625 (C=O); 1413 (CH_2); 1290; 1244 (C-C); 1055 (C-O).

[5-(Azidométhyl)-2-thiényl](2-thiényl)méthanone (3d)

$C_{10}H_7N_3OS_2$ MW=249,31g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1=X_2 : S

Aspect : huile jaune

Rdt : 78% (2étapes)

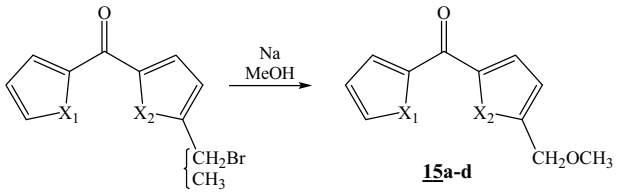
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,90 (d, 1H, J=3,6Hz); 7,80 (d, 1H, J=3,6Hz); 7,72 (d, 1H, J=4,9Hz); 7,20 (dd, 1H, J=4,9Hz et J=3,8Hz); 7,12 (d, 1H, J=3,8Hz); 4,57 (s, 2H, C$H_2$$N_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 178,4 (C=O); 145,9; 143,2; 142,5; 133,7; 133,2; 128,4; 128,0; 127,4; 49,3 (CH_2N_3).

IR (KBr) : 2100 (N_3); 1611 (C=O); 1452 (CH_2); 1293 (C-C); 1049 (C-O).

Remarque : Passage par un éther et composé bromé caractérisé

Formation de l'éther



15a-d

X_1 et X_2 : CH=CH et/ou S

On suppose une réaction totale lors de l'étape de bromation.

A une solution de méthanolate de sodium préparée avec 115mg (1éq., 5mmol) de sodium dans 10ml de méthanol distillé, est ajouté le mélange obtenu lors de l'étape de bromation. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 3h puis laissé sous agitation à température ambiante pendant 1h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit obtenu est extrait au dichlorométhane (15ml). La phase organique est lavée avec une solution aqueuse (20ml) acidifiée avec 4ml d'acide chlorhydrique 0,1N, séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous pression réduite. Le mélange obtenu est séparé sur gel de silice (dichlorométhane).

[4-(Méthoxyméthyl)phényl](phényl)méthanone (15a)

$C_{15}H_{14}O_2$ MW=226,27g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1=X_2 : CH=CH

Aspect : huile jaune

Rdt : 81% (2étapes)

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,81-7,78 (m, 4H); 7,63-7,56 (m, 1H); 7,51-7,44 (m, 4H); 4,55 (s, 2H, C*H*$_2$OCH$_3$); 3,45 (s, 3H, CH$_2$OC*H*$_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 196,4 (C=O); 143,0; 137,7; 136,8; 132,3; 130,2 (2C); 130,0 (2C); 128,2 (2C); 127,1 (2C); 74,1 (CH_2O-); 58,4 (-OCH_3).

[5-(Méthoxyméthyl)-2-thiényl](phényl)méthanone (15b)

$C_{13}H_{12}O_2S$ MW=232,30g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1 : CH=CH et X_2 : S

Aspect : huile jaune

Rdt : 78% (2étapes)

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,85 (d, 2H, J=7,6Hz); 7,62-7,47 (m, 4H); 7,05 (d, 1H, J=3,6Hz); 4,67 (s, 2H, C*H*$_2$OCH$_3$); 3,45 (s, 3H, CH$_2$OC*H*$_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 188,1 (C=O); 150,7; 138,0; 134,8; 132,2; 129,1; 128,4 (4C); 126,4; 69,2 (CH_2O-); 58,4 (-OCH_3).

[4-(Méthoxyméthyl)phényl](2-thiényl)méthanone (15c)

$C_{13}H_{12}O_2S$ MW=232,30g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1 : S et X_2 : CH=CH

Aspect : huile orange

Rdt : 84% (2étapes)

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,84 (d, 2H, J=7,9Hz); 7,69 (d, 1H, J=4,9Hz); 7,61 (d, 1H, J=3,7Hz); 7,44 (d, 2H, J=7,9Hz); 7,13 (dd, 1H, J=4,9Hz et J=3,7Hz); 4,52 (s, 2H, C*H*$_2$OCH$_3$); 3,41 (s, 3H, CH$_2$OC*H*$_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 187,7 (C=O); 143,4; 142,8; 137,1; 134,6; 134,1; 129,2 (2C); 127,9; 127,1 (2C); 73,8 (CH_2O-); 58,3 (-OCH_3).

[5-(Méthoxyméthyl)-2-thiényl](2-thiényl)méthanone (15d)

$C_{11}H_{10}O_2S_2$ MW=238,33g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1=X_2 : S

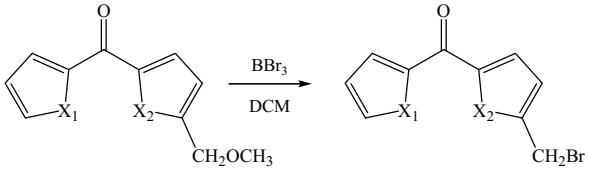
Aspect : huile jaune-orange

Rdt : 77% (2 étapes)

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,82 (dd, 1H, J=3,8Hz et J=1,1Hz); 7,72 (d, 1H, J=3,8Hz); 7,62 (dd, 1H, J=4,9Hz et J=1,1Hz); 7,18 (dd, 1H, J=4,9Hz et J=3,8Hz); 7,07 (d, 1H, J=3,8Hz); 4,67 (s, 2H, C*H*$_2$OCH$_3$); 3,45 (s, 3H, CH$_2$OC*H*$_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 178,6 (C=O); 149,9; 142,9; 142,4; 133,4; 133,1; 133,0; 127,9; 126,4; 69,2 (CH_2O-); 61,2 (-OCH_3).

Formation du composé halogéné



15a-d **2a-d**

X_1 et X_2 : CH=CH et/ou S

Dans un bain de glace, 0,91ml (3éq., 9.6mmol) de tribromure de bore sont ajoutés à une suspension de 724mg (1éq., 3,2mmol) de composé **15a** ou 743mg (1éq., 3,2mmol) de composé **15b-c** ou 763mg (1éq., 3,2mmol) de composé **15d** dissous dans 25ml de dichlorométhane distillé. Le milieu réactionnel est agité pendant 16h à température ambiante. La réaction est ensuite stoppée avec 40ml d'eau puis agitée pendant 1h. Le milieu est concentré sous pression réduite puis extrait à l'acétate d'éthyle (25ml) et lavé à l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous pression réduite. La réaction étant quantitative, aucune purification n'a été nécessaire.

[4-(Bromométhyl)phényl](phényl)méthanone (2a)

$C_{14}H_{11}BrO$ MW=275,14g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1=X_2 : CH=CH

Aspect : solide orange foncé

Pf : 111-114°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,82-7,78 (m, 4H); 7,64-7,58 (m, 1H); 7,52-7,46 (m, 4H); 4,54 (s, 2H, C*H*$_2$Br).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 195,8 (C=O); 141,9; 137,3; 137,2; 132,4; 130,4 (2C); 129,8 (2C); 128,8 (2C); 128,2 (2C); 32,1 (CH_2Br).

[5-(Bromométhyl)-2-thiényl](phényl)méthanone (2b)

$C_{12}H_9BrOS$ MW=281,17g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1 : CH=CH et X_2 : S

Aspect : solide brun foncé

Pf : 73°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,85 (d, 2H, J=6,7Hz); 7,64-7,58 (m, 1H); 7,53-7,47 (m, 3H); 7,16 (d, 1H, J=4,2Hz); 4,71 (s, 2H, CH_2Br).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 187,5 (C=O); 148,7; 143,6; 137,2; 134,2; 131,9; 128,6; 128,1 (2C); 128,0 (2C); 24,9 (CH_2Br).

[4-(Bromométhyl)phényl](2-thiényl)méthanone (2c)

$C_{12}H_9BrOS$ MW=281,17g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1 : S et X_2 : CH=CH

Aspect : solide brun clair

Pf : 84-85°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,84 (d, 2H, J=7,9Hz); 7,73 (d, 1H, J=4,9Hz); 7,64 (d, 1H, J=3,7Hz); 7,51 (d, 2H, J=7,9Hz); 7,17 (dd, 1H, J=4,9Hz et J=3,7Hz); 4,54 (s, 2H, CH_2Br).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 187,4 (C=O); 143,3; 141,9; 137,9; 134,9; 134,4; 129,5 (2C); 129,1 (2C); 128,0; 32,1 (CH_2Br).

[5-(Bromométhyl)-2-thiényl](2-thiényl)méthanone (2d)

$C_{10}H_7BrOS_2$ MW=287,20g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1=X_2 : S

Aspect : solide brun

Pf : 70-71°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,88 (dd, 1H, J=3,8Hz et J=1,1Hz); 7,74 (d, 1H, J=3,8Hz); 7,71 (dd, 1H, J=4,9Hz et J=1,1Hz); 7,20 (d, 1H, J=4,9Hz); 7,18 (d, 1H, J=4,9Hz); 4,72 (s, 2H, CH_2Br).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 178,4 (C=O); 148,5; 143,5; 142,5; 133,5; 133,2; 128,6 128,1; 127,3; 25,4 (CH_2Br).

Synthèse du 2,5-thiophènedicarboxylate de méthyle et de l'acide 5-(méthoxycarbonyl)-2-thiophènecarboxylique

2,5-Dibromothiophène (<u>16</u>)

C_4H_2BrS *MW= 241,94g.mol^{-1}*



<u>16</u>

Cette réaction se fait à l'abri de la lumière. A 10mmol (1 éq., 8ml) de thiophène dissous dans 14ml de diméthylformamide sont ajoutés, par petites quantités et à température ambiante, 2 éq. (20mmol, 3,55g) de N-bromosuccinimide. Après 4h sous agitation, le milieu est décomposé sur de la glace puis extrait à l'éther (30ml). La phase organique est ensuite lavée à l'eau (20ml), séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur gel de silice (cyclohexane).

Aspect : huile beige

Rdt : 41%

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 6,85 (s, 2H).

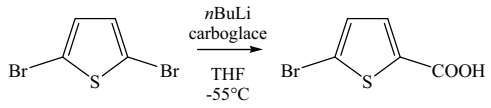
RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 130,4 (2C); 111,5 (2C).

GC/MS m/z (%) : 242 (100, M^+); 163 (22); 138 (3); 119 (19); 82 (57).

Autres molécules synthétisées

Acide 5-bromothiophène-2-carboxylique (<u>17</u>)

$C_5H_3BrO_2S$ MW=207,05 g.mol^{-1}



<u>16</u> **<u>17</u>**

A une solution de 113µl (1éq., 1mmol) de 2,5-dibromothiophène (**<u>16</u>**) dans 4,4ml de tétrahydrofurane anhydre sont ajoutés goutte à goutte, à -55°C, 0,9ml (2,25éq., 2.25mmol) de n-butyllithium (2,5M dans l'hexane). Après 5h d'agitation, la solution jaune clair obtenue est versée sur la carboglace. Une fois la solution revenue à température ambiante, elle est acidifiée à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 1N puis extraite à l'éther (2x10ml). La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le produit visqueux obtenu est repris à l'eau puis filtré sur Büchner. Le solide obtenu est rincé à l'eau puis séché.

Aspect : solide incolore

Rdt : 15%

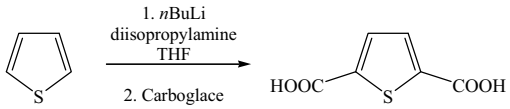
Pf : 141-142°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 8,82 (s large, 1H, COO*H*); 7,62 (d, 1H, J=3,6Hz); 7,11 (d, 1H, J=3,6Hz).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 166,0 (C=O); 135,1; 134,0; 131,2; 122,0.

Acide thiophène-2,5-dicarboxylique (<u>18</u>)

$C_6H_4O_4S$ MW=172,16 g.mol^{-1}



<u>18</u>

A 4,2ml (3 éq., 30mmol) de diisopropylamine dissous dans 15ml de tétrahydrofurane anhydre sont ajoutés, à 0°C et sous argon, 10ml (2,5éq., 2,5M dans l'hexane) de n-butyllithium. Après 30min d'agitation à 0°C, la solution est refroidie à -78°C. Une solution de 0,8ml (1éq., 10mmol) de thiophène dissous dans 6ml de tétrahydrofurane anhydre est ensuite ajoutée goutte à goutte au milieu. Après 1h, le bain à -78°C est enlevé afin de permettre un retour à

température ambiante. Dans cet intervalle de temps, des morceaux de carboglace sont introduits dans le mélange réactionnel. A température ambiante, 20ml d'eau et d'acide chlorhydrique 1N sont ajoutés puis le milieu est agité pendant 12h. Le tétrahydrofurane ainsi qu'une partie de l'eau sont évaporés sous pression réduite. La solution obtenue après évaporation est extraite au dichlorométhane (15ml) et lavée avec une solution de soude 0,1N. La phase aqueuse est récupérée, acidifiée avec de l'acide chlorhydrique 1N jusqu'à pH=1 puis laissée au frigo toute une nuit. Le précipité obtenu est filtré sur Büchner.

Aspect : solide incolore

Rdt : 35%

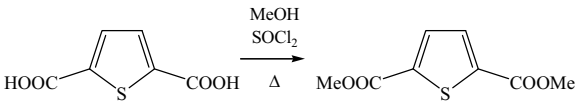
Pf : > 300°C

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 7,69 (s, 2H).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 162,4 (2C=O); 139,8 (2C); 133,1 (2C).

2,5-Thiophènecarboxylate de méthyle (<u>19</u>a)

$C_8H_8O_4S$ *MW=200,21 g.mol^{-1}*



<u>18</u> **<u>19</u>a**

A 200mg (1éq., 11,6mmol) d'acide thiophène-2,5-dicarboxylique (composé **<u>18</u>**) sont ajoutés 10ml de méthanol anhydre. Après 30 minutes de reflux, 1,7ml (20 éq., 232mmol) de chlorure de thionyle sont additionnés goutte à goutte. La solution est agitée et maintenue à reflux pendant 4h. Après retour à température ambiante, le solvant est éliminé par évaporation sous pression réduite. Le résidu ainsi obtenu est extrait au dichlorométhane (2 x 20ml), puis lavé avec une solution aqueuse de potasse 0,1N. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium, puis évaporées sous pression réduite. Le diester obtenu est remis directement en réaction pour la synthèse de l'acide 5-(méthoxycarbonyl)-2-thiophènecarboxylique.

Aspect : solide incolore

Rdt : 90%

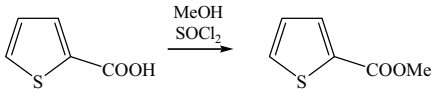
Pf : 146°C (lit.[99] 146-147°C)

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,74 (s, 2H); 3,93 (s, 6H, COOC*H*$_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 162,0 (2C=O); 138,8 (2C); 133,0 (2C); 52,5 (OCH_3).

2-Thiophènecarboxylate de méthyle (<u>21</u>)

$C_6H_6O_2S$ MW=142,18 g.mol^{-1}



<u>21</u>

500mg (1éq., 3,9mmol) d'acide thiophène-2-carboxylique sont dissous dans 25ml de méthanol distillé. Après 30 minutes de reflux, 2,85ml (10 éq., 39mmol) de chlorure de thionyle sont ajoutés goutte à goutte. La solution est agitée et maintenue à reflux pendant 1h. Après retour à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu ainsi obtenu est repris à l'eau et extrait au dichlorométhane (2x15ml). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium puis évaporées sous pression réduite.

Aspect : huile incolore

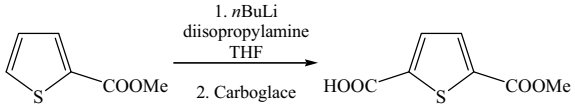
Rdt : 73%

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,80 (d, 1H, J=3,7Hz); 7,55 (d, 1H, J=4,2Hz); 7,10 (dd, 1H, J=3,7Hz et J=4,2Hz); 3,89 (s, 3H, COOC*H*$_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 162,6 (C=O); 133,5; 133,4; 133,0; 127,8; 52,1 (OCH_3).

Acide 5-(méthoxycarbonyl)-2-thiophènecarboxylique (<u>20</u>a)

$C_7H_6O_4S$ MW=186,19 g.mol^{-1}

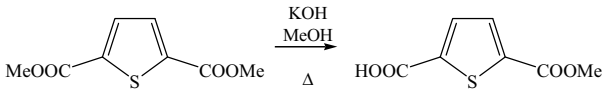


<u>21</u> **<u>20</u>a**

Méthode A

A 0.82ml (1,5 éq., 5,85mmol) de diisopropylamine dissous dans 6ml de tétrahydrofurane anhydre est ajouté, à 0°C et sous argon, 1,7ml (1,1 éq., 2,5M dans l'hexane) de nbutyllithium. Après 30min d'agitation à 0°C, la solution est refroidie à -78°C. Une solution de 402mg (1éq., 3,9mmol) de 2-méthylthiophènecarboxylate (composé **<u>21</u>**) dissous dans 2ml de tétra-hydrofurane anhydre est ensuite ajoutée goutte à goutte au milieu. Après 1h, le bain à -78°C est enlevé pour permettre au milieu de revenir à température ambiante. Dans cet intervalle de temps, des morceaux de carboglace sont introduits dans le milieu. Après être revenu à température ambiante, le milieu est agité pendant 12h après ajout de 20ml d'eau et d'acide

chlorhydrique 1N pour atteindre un pH neutre. Le tétrahydrofurane ainsi qu'une partie de l'eau sont évaporés sous pression réduite. La solution obtenue après évaporation est extraite à l'éther (20ml) et lavée avec une solution de potasse 0,1N. La phase aqueuse est alors acidifiée avec de l'acide chlorhydrique 1N, laissée au frigo toute une nuit puis filtrée sur Büchner. Rdt : 91%



19a **20a**

Méthode B

180mg (1éq., 0,9mmol) de 2,5-thiophènecarboxylate de méthyle (**19a**) sont dissous dans 10ml de méthanol anhydre. Après 15 minutes à reflux, 50,5mg (1éq., 0,9mmol) de potasse sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation et à reflux pendant 3,5h. Une fois revenu à température ambiante, le méthanol est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dissous dans l'eau et la phase aqueuse ainsi obtenue est extraite au dichlorométhane (15ml), récupérée puis acidifiée à l'aide d'acide chlorhydrique concentré pour obtenir un pH=1 et finalement placée au frigo toute une nuit puis filtrée sur Büchner. Rdt : 56%

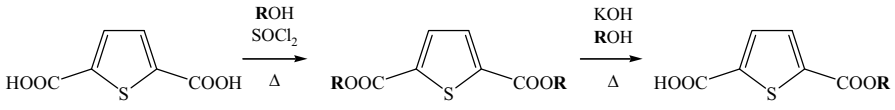
Aspect : solide beige clair

Pf : 192-193°C (lit.[94] 187-190°C)

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 7,66 (d, 1H, J=4,0Hz); 7,63 (d, 1H, J=4,0Hz); 3,79 (s, 3H, COOCH_3).

RMN ^{13}C (MeOD-d_4) δ : 164,3 (C=O); 163,4 (C=O); 141,5; 139,8; 134,4; 134,2; 53,0 (OCH_3).

Généralisation de la méthode



18 **19b-e** **20b-e**

R : Et, Pr, *i*Pr ou Bu

Diestérification

Mode opératoire général

A 100mg (1éq., 0,58mmol) d'acide thiophène-2,5-dicarboxylique (**18**) sont ajoutés 5ml d'alcool approprié. Après 30min de reflux, 847µl (20éq., 11,6mmol) de chlorure de thionyle sont additionnés goutte à goutte. La solution est agitée et maintenue à reflux pendant 3,5h. Après être revenue à température ambiante, le solvant est éliminé par évaporation sous pression réduite. Le résidu ainsi obtenu est extrait à l'éther (2x50ml) puis lavé avec une solution aqueuse de potasse 0,1N. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium, puis évaporées sous pression réduite. Le diester obtenu est remis directement en réaction pour la synthèse du monoester correspondant de l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique.

2,5-Thiophènecarboxylate d'éthyle (19b)

$C_{10}H_{12}O_4S$ MW=228,27 g.mol^{-1}

Alcool utilisé : éthanol (R=Et)

Aspect : solide beige

Rdt : 95%

Pf : 53-54°C (lit.[100] 53°C)

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,72 (s, 2H); 4,37 (q, 4H, J=7,0Hz, C*H*$_2$CH$_3$); 1,39 (t, 6H, J=7,0Hz, CH$_2$C*H*$_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 161,7 (2C=O); 139,2 (2C); 133,0 (2C); 61,8 (2CH$_2$); 14,3 (2CH$_3$).

[100] Decroix, B.; Morel, J.; Pastour, P. *J. Chem. Res. Miniprint* **1978**, 1848-1870.

2,5-Thiophènedicarboxylate de propyle (19c)

$C_{12}H_{16}O_4S$ MW=256,32 g.mol^{-1}

Alcool utilisé : propanol (R=Pr)

Aspect : huile brune

Rdt : 86%

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,72 (s, 2H); 4,27 (t, 4H, J=6,7Hz, C*H*$_2$CH$_2$CH$_3$); 1,85-1,71 (m, 4H, CH$_2$C*H*$_2$CH$_3$); 1,02 (t, 6H, J=7,4Hz, CH$_2$CH$_2$C*H*$_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 161,7 (2C=O); 139,1 (2C); 132,8 (2C); 67,2 (2OCH$_2$); 22,0 (2CH$_2$); 10,4 (2CH$_3$).

2,5-Thiophènedicarboxylate d'isopropyle (19d)

$C_{12}H_{16}O_4S$ MW=256,32 g.mol^{-1}

Alcool utilisé : *iso*-propanol (R=iPr)

Aspect : huile brune

Rdt : 36%

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7.71 (s, 2H); 5,22 (sep, 2H, J=6,2Hz, C*H*(CH$_3$)$_2$); 1,36 (d, 12H, J=6,2Hz, CH(C*H*$_3$)$_2$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 161,2 (2C=O); 139,5 (2C); 132,7 (2C); 69,5 (2CH); 21,8 (4CH$_3$).

2,5-Thiophènedicarboxylate de butyle (19e)

$C_{14}H_{20}O_4S$ MW=284,37 g.mol^{-1}

Alcool utilisé : butanol (R=Bu)

Aspect : huile brune

Rdt : 80%

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,73 (s, 2H); 4,32 (t, 4H, J=6,6Hz, C*H*$_2$(CH$_2$)$_2$CH$_3$); 1,80-1,69 (m, 4H, CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_3$); 1,54-1,39 (m, 4H, (CH$_2$)$_2$C*H*$_2$CH$_3$); 0,98 (t, 6H, J=7,3Hz, (CH$_2$)$_3$C*H*$_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 166,0 (2C=O); 139,1 (2C); 132,8 (2C); 65,5 (2OCH$_2$); 30,6 (2CH$_2$); 19,1 (2CH$_2$); 13,7 (2CH$_3$).

Monosaponification

Mode opératoire général

A 0,2mmol de diester de l'acide 2,5-thiophènedicarboxylique (**19b-e**) est ajouté 6ml de l'alcool approprié. Après 15min à reflux, 11,2mg (1éq., 0,2mmol) de potasse sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation et à reflux pendant 3,5h. Une fois revenu à température ambiante, l'alcool de départ est évaporé sous pression réduite. Le résidu ainsi obtenu est dissous dans l'eau et extrait au dichlorométhane (10ml). La phase aqueuse est récupérée puis acidifiée à l'aide de quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré. Le précipité est filtré sur Büchner. Si des traces d'acide thiophène-2,5-dicarboxylique sont encore présentes, le solide obtenu après filtration est alors extrait à l'éther (15ml). La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous pression réduite.

Acide 5-(éthoxycarbonyl)-2-thiophènecarboxylique (20b)

$C_8H_8O_4S$ MW=200,21 g.mol^{-1}

Alcool utilisé : éthanol (R=Et)

Aspect : solide beige

Rdt : 54%

Pf : 137-140°C

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 7,77 (d, 1H, J=3,9Hz); 7,71 (d, 1H, J=3,9Hz); 4,30 (q, 2H, J=7,1Hz, C*H*$_2$CH$_3$); 1,29 (t, 3H, J=7,1Hz, CH$_2$C*H*$_3$).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 162,2 (C=O); 160,9 (C=O); 140,2; 137,9; 133,6; 133,1; 61,5 (CH_2); 14,0 (CH_3).

Acide 5-(propoxycarbonyl)-2-thiophènecarboxylique (20c)

$C_9H_{10}O_4S$ MW=214,24 g.mol^{-1}

Alcool utilisé : propanol (R=Pr)

Aspect : solide incolore

Rdt : 70%

Pf : 106-107°C

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 7,78 (d, 1H, J=3,9Hz); 7,72 (d, 1H, J=3,9Hz); 4,22 (t, 2H, J=6,5Hz, C*H*$_2$CH$_2$CH$_3$); 1,73-1,64 (m, 2H, CH$_2$C*H*$_2$CH$_3$); 0,94 (t, 3H, J=6,5Hz, CH$_2$CH$_2$C*H*$_3$).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 162,2 (C=O); 160,9 (C=O); 140,3; 137,8; 133,6; 133,2; 66,8 (OCH$_2$); 21,5 (CH$_2$); 10,2 (CH$_3$).

Acide 5-(isopropoxycarbonyl)-2-thiophènecarboxylique (20d)

$C_9H_{10}O_4S$ MW=214,24 g.mol^{-1}

Alcool utilisé : iso-propanol (R=iPr)

Aspect : solide incolore

Rdt : 68%

Pf : 146-147°C

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 7,74 (d, 1H, J=3,9Hz); 7,70 (d, 1H, J=3,9Hz); 5,10 (sep, 1H, J=6,2Hz, C*H*(CH$_3$)$_2$); 1,29 (d, 6H, J=6,2Hz, CH(C*H*$_3$)$_2$).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 162,2 (C=O); 160,4 (C=O); 140,1; 138,2; 133,4; 133,1; 69,3 (CH); 21,5 (2CH$_3$).

Acide 5-(butoxycarbonyl)-2-thiophènecarboxylique (20e)

$C_{10}H_{12}O_4S$ MW=228,27 g.mol^{-1}

Alcool utilisé : butanol (R=Bu)

Aspect : solide incolore

Rdt : 53%

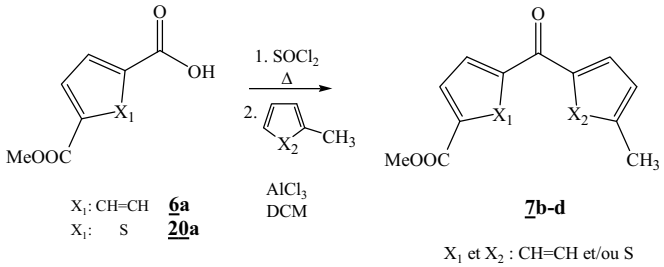
Pf : 106-107°C

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 7,77 (d, 1H, J=3,9Hz); 7,71 (d, 1H, J=3,9Hz); 4,26 (t, 2H, J=6,5Hz, C*H*$_2$(CH$_2$)$_2$CH$_3$); 1,69-1,62 (m, 2H, CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_3$); 1,43-1,33 (m, 2H, (CH$_2$)$_2$C*H*$_2$ CH$_3$); 0,91 (t, 3H, J=7,3Hz, (CH$_2$)$_3$C*H*$_3$).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 162,2 (C=O); 160,9 (C=O); 140,2; 137,8; 133,6; 133,2; 65,1 (OCH$_2$); 30,0 (CH$_2$); 18,6 (CH$_2$); 13,5 (CH$_3$).

Synthèse des structures trifonctionnelles B, C et D

Préparation des analogues de la benzophénone



Mode opératoire général

1,80g (1éq., 10mmol) de monoester méthylique de l'acide téréphtalique (**6a**) ou 1,86g (1éq., 10mmol) de monoester méthylique de l'acide 2,5-thiophènedicarboxylique (**20a**), sont mis en suspension dans 10ml de chlorure de thionyle. Après 4 heures à reflux, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le chlorure d'acide ainsi obtenu est remis directement en réaction. 2,13ml (2éq., 20mmol) de toluène ou 1,94ml (2éq., 20mmol) de 2-méthylthiophène, sont additionnés au chlorure d'acide dans 30ml de dichlorométhane distillé. Le milieu réactionnel est placé dans un bain de glace et 4g (3éq., 30mmol) de chlorure d'aluminium réduit en poudre sont ajoutés par petites quantités. Après 4 heures sous forte agitation à température ambiante le milieu est hydrolysé sur 100ml d'un mélange eau/glace acidifié avec 4ml d'acide chlorhydrique concentré puis extrait au dichlorométhane (20ml). La phase organique est lavée à l'eau (2x20ml), séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur gel de silice (dichlorométhane).

4-[(5-Méthyl-2-thiényl)carbonyl]benzoate de méthyle (7b)

$C_{14}H_{12}O_3S$ MW=260,31g.mol^{-1}

Produits de départ : monoester méthylique de l'acide téréphtalique (X_1 : CH=CH) et 2-méthylthiophène (X_2 : S)

Aspect : solide orangé

Rdt : 65%

Pf : 108-109°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 8,15 (d, 2H, J=8,5Hz); 7,86 (d, 2H, J=8,5Hz); 7,43 (d, 1H, J=3,8Hz); 6,85 (d, 1H, J=3,8Hz); 3,97 (s, 3H, COOCH_3); 2,59 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 187,1 (C=O); 166,2 (C=O); 151,3; 141,9; 140,9; 136,0; 132,8; 129,5 (2C); 128,8 (2C); 126,9; 52,4 (OCH_3); 16,0 (CH_3).

GC/MS m/z (%) : 260 (M+, 62); 229 (10); 201 (11); 163 (7); 125 (100); 104 (16); 76 (15); 53 (11).

5-(4-Méthylbenzoyl)-2-thiophènecarboxylate de méthyle (7c)

$C_{14}H_{12}O_3S$ MW=260,31g.mol^{-1}

Produits de départ : monoester méthylique de l'acide 2,5-thiophènedicarboxylique (X_1 : S) et toluène (X_2 : CH=CH)

Aspect : solide jaune

Rdt : 75%

Pf : 92-93°C

RMN ^1H ($CDCl_3$) δ : 7,80 (d, 1H, J=3,7Hz); 7,80 (d, 2H, J=7,8Hz); 7,60 (d, 1H, J=3,7Hz); 7,32 (d, 2H, J=7,8Hz); 3,94 (s, 3H, COOCH_3); 2,46 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 188,0 (C=O); 162,0 (C=O); 148,4; 143,8; 139,7; 135,0; 133,5; 133,1; 129,5 (2C); 129,3 (2C); 52,6 (OCH_3); 21,7 (CH_3).

5-[(5-Méthyl-2-thiényl)carbonyl]-2-thiophènecarboxylate de méthyle (7d)

$C_{12}H_{10}O_3S_2$ MW=266,34g.mol^{-1}

Produits de départ : monoester méthylique de l'acide 2,5-thiophènedicarboxylique (X_1 : S) et 2-méthylthiophène (X_2 : S)

Aspect : solide orange

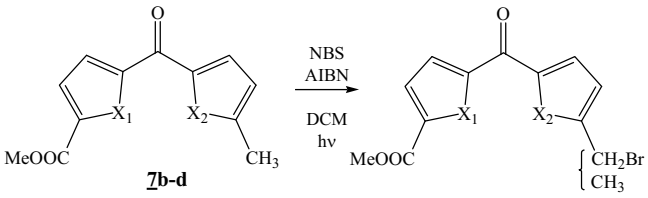
Rdt : 86%

Pf : 87-89°C

RMN ^1H ($CDCl_3$) δ : 7,80 (d, 1H, J=3,9Hz); 7,78 (d, 1H, J=3,9Hz); 7,74 (d, 1H, J=3,8Hz); 6,88 (d, 1H, J=3,8Hz); 3,93 (s, 3H, COOCH_3); 2,59 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 178,1 (C=O); 162,1 (C=O); 151,0; 147,5; 140,2; 138,8; 134,7; 133,1; 132,0; 127,1; 52,6 (OCH_3); 16,1 (CH_3).

Bromation radicalaire



2,34g (1éq., 9mmol) de composés **7b-c** ou 2,40g (1éq., 9mmol) de composé **7d** ainsi qu'une pointe de spatule d'α,α'-azodiisobutyronitrile sont dissous dans 40ml de dichlorométhane distillé. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 30 min grâce à une lampe halogène de 500W. Trois ajouts de 640mg (0,4éq., 3,6mmol) de *N*-bromosuccinimide sont effectués. Avant chaque ajout, la lampe est éteinte; l'ajout suivant ne s'effectue que lorsque la coloration orange (présence de dibrome) n'est plus persistante.

Une fois les ajouts effectués et après être revenu à température ambiante, le milieu réactionnel est lavé à l'eau (2x20ml). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite.

Le mélange obtenu est mis en réaction sans purification supplémentaire.

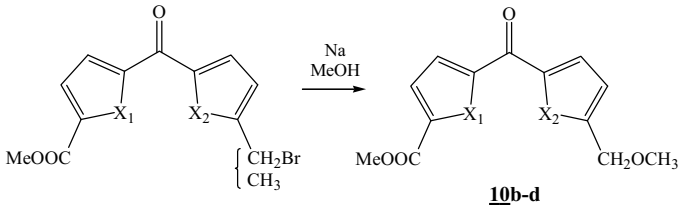
Des mélanges ont été obtenus, il est donc difficile de caractériser les composés. La formation du composé halogéné est observée en RMN ^{1}H ($CDCl_3$) par l'apparition de plusieurs pics, dont un caractéristique du -C$\underline{H}_2$Br.

Issu du composé **7b** RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : singulet caractéristique du –CH_2Br à 4,71 ppm.

Issu du composé **7c** RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : singulet caractéristique du –CH_2Br à 4,54 ppm.

Issu du composé **7d** RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : singulet caractéristique du –CH_2Br à 4,71 ppm.

Formation de l'éther



10b-d

X_1 et X_2 : CH=CH et/ou S

La réaction précédente (9mmol) est considérée comme totale.

A 0°C et sous argon, 207mg (1éq., 9mmol) de sodium sont placés dans 20ml de méthanol anhydre. Le mélange obtenu lors de la réaction de bromation radicalaire est ajouté au milieu réactionnel. Après 3h à reflux, le milieu est agité pendant 1h à température ambiante. Le méthanol est alors évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est extrait au dichlorométhane (2x20ml) et lavé par 20ml d'eau acidifiée avec 5ml d'acide chlorhydrique 1N. Les phases organiques sont regroupées, lavées à l'eau, séchées sur sulfate de magnésium puis évaporées sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur gel de silice (dichlorométhane).

4-{[5-(Méthoxyméthyl)-2-thiényl]carbonyl}benzoate de méthyle(10b)

$C_{15}H_{14}O_4S$ MW=290,33g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1 : CH=CH et X_2 : S

Aspect : solide jaune

Rdt : 72% (2 étapes)

Pf : 108-110°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 8,09 (d, 2H, J=8,5Hz); 7,82 (d, 2H, J=8,5Hz); 7,44 (d, 1H, J=3,8Hz); 6,98 (d, 1H, J=3,8Hz); 4,60 (s, 2H, C*H*$_2$OCH$_3$); 3,90 (s, 3H, COOC*H*$_3$); 3,41 (s, 3H, CH$_2$OC*H*$_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 187,4 (C=O); 166,3 (C=O); 151,6; 142,6; 141,7; 135,2; 133,1; 129,6 (2C); 128,9 (2C); 126,5; 69,3 (CH_2O-); 58,4 (-OCH_3); 52,4 (OCH_3).

GC/MS m/z (%) : 290 (M^+, 13); 259 (13); 231 (6); 207 (3); 163 (16); 155 (6); 127 (100); 114 (5); 104 (7); 76 (13).

5-[4-(Méthoxyméthyl)benzoyl]-2-thiophènecarboxylate de méthyle (<u>10</u>c)

$C_{15}H_{14}O_4S$ MW=290,34g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1 : S et X_2 : CH=CH

Aspect : solide jaune-orange

Rdt : 68% (2 étapes)

Pf : 104-105°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,85 (d, 2H, J=8,0Hz); 7,76 (d, 1H, J=4,0Hz); 7,57 (d, 1H, J=4,0Hz); 7,45 (d, 2H, J=8,0Hz); 4,53 (s, 2H, C*H*$_2$OCH$_3$); 3,91 (s, 3H, COOC*H*$_3$); 3,42 (s, 3H, CH$_2$OC*H*$_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 187,7 (C=O); 162,1 (C=O); 148,0; 143,7; 139,8; 136,7; 133,8; 133,2; 129,5 (2C); 127,4 (2C); 74,0 (CH$_2$O-); 58,6 (-OCH$_3$); 52,7 (OCH$_3$).

5-{[5-(Méthoxyméthyl)-2-thiényl]carbonyl}-2-thiophènecarboxylate de méthyle (<u>10</u>d)

$C_{13}H_{12}O_4S_2$ MW=296,36g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1=X_2 : S

Aspect : solide orange

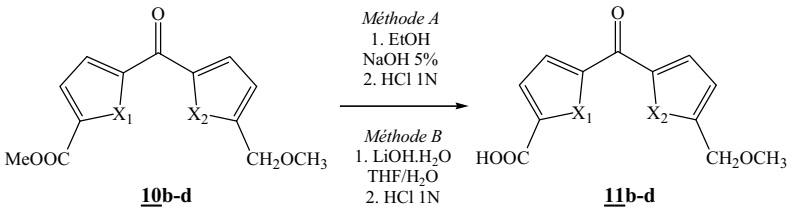
Rdt : 79% (2 étapes)

Pf : 109-110°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,79-7,77 (m, 3H); 7,05 (d, 1H, J=4,0Hz); 4,65 (s, 2H, C*H*$_2$OCH$_3$); 3,91 (s, 3H, COOC*H*$_3$); 3,43 (s, 3H, CH$_2$OC*H*$_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 178,3 (C=O); 162,0 (C=O); 151,3; 147,2; 141,6; 139,1; 133,9; 133,1; 132,3; 126,5; 69,2 (CH$_2$O-); 58,4 (-OCH$_3$); 52,6 (OCH$_3$).

Saponification



10b-d **11b-d**

X_1 et X_2 : CH=CH et/ou S

Méthode A

A une solution de 2,03g (1éq., 7mmol) de composés **10b-c** ou 2,07g (1éq., 7mmol) de composé **10d** dissous dans 25ml d'éthanol à 96% sont ajoutés 11,2ml (2éq., 14mmol) d'une solution de soude à 1,25M. Le milieu réactionnel est porté à reflux durant 3h. Après être revenu à température ambiante, le milieu est extrait à l'éther (2x15ml). La phase aqueuse est acidifiée jusqu'à pH=1 avec une solution d'acide chlorhydrique 1N puis placée au frigo toute une nuit. Le précipité obtenu est filtré sur Büchner.

Méthode B

A une solution de 0,5g (1éq., 1,72mmol) de composés **10b-c** ou 0,51g (1éq., 1,72mmol) de composé **10d** dissous dans 46ml de tétrahydrofurane est ajoutée une solution de 248mg (3éq., 5,90mmol) d'hydroxyde de lithium monohydraté dissous dans 23ml d'eau distillée. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 30min puis 7ml d'acide chlorhydrique 1N sont ajoutés. Le tétrahydrofurane ainsi qu'une grande partie de l'eau sont évaporés, sous pression réduite. Le précipité formé est filtré sur Büchner.

Les rendements indiqués ont été obtenus avec la méthode B, méthode privilégiée.

Acide 4-{[5-(méthoxyméthyl)-2-thiényl]carbonyl}benzoique (11b)

$C_{14}H_{12}O_4S$ MW=276,31g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1 : CH=CH et X_2 : S

Aspect : solide jaune

Rdt : 98%

Pf : 167-168°C

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 13,35 (s large, 1H, COO*H*); 8,08 (d, 2H, J=8,4Hz); 7,89 (d, 2H, J=8,4Hz); 7,62 (d, 1H, J=3,8Hz); 7,19 (d, 1H, J=3,8Hz); 4,67 (s, 2H, C*H*$_2$OCH$_3$); 3,32 (s, 3H, CH$_2$OC*H*$_3$).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 186,7 (C=O); 166,6 (C=O); 152,1; 144,6; 140,8; 136,0; 133,8; 129,4 (2C); 128,9 (2C); 127,2; 68,4 (CH$_2$O-); 57,8 (-OCH$_3$).

Acide 5-[4-(méthoxyméthyl)benzoyl]-2-thiophènecarboxylique (<u>11</u>c)

$C_{14}H_{12}O_4S$ MW=276,31g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1 : S et X_2 : CH=CH

Aspect : solide beige

Rdt : 73%

Pf : 167°C

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 7,73 (d, 2H, J=7,9Hz); 7,62 (d, 1H, J=3,9Hz); 7,46 (d, 1H, J=3,9Hz); 7,35 (d, 2H, J=7,9Hz); 4,42 (s, 2H, C*H*$_2$OCH$_3$); 3,31 (s, 3H, CH$_2$OC*H*$_3$).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 187,5 (C=O); 163,0 (C=O); 147,1; 143,2; 141,3; 136,1; 133,7; 132,5; 129,1 (2C); 127,0 (2C); 73,5 (CH$_2$O-); 58,1 (-OCH$_3$).

Acide 5-{[5-(méthoxyméthyl)-2-thiényl]carbonyl}-2-thiophènecarboxylique (<u>11</u>d)

$C_{12}H_{10}O_4S_2$ MW=282,34g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1=X_2 : S

Aspect : solide jaune clair

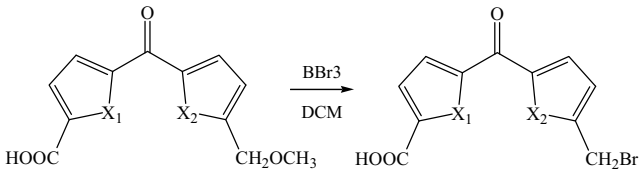
Rdt : 97%

Pf : 201°C (déc)

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 7,92 (d, 1H, J=3,8Hz); 7,90 (d, 1H, J=3,8Hz); 7,81 (d, 1H, J=3,9Hz); 7,17 (d, 1H, J=3,9Hz); 4,69 (s, 2H, C*H*$_2$OCH$_3$); 3,41 (s, 3H, CH$_2$OC*H*$_3$).

RMN ^{13}C (MeOD-d_4) δ : 180,1 (C=O); 164,2 (C=O); 153,3 (2C); 148,2; 142,8; 135,6; 134,4; 134,1; 128,1; 70,1 (CH$_2$O-); 58,6 (-OCH$_3$).

Formation du composé bromé



11b-d **12b-d**

X_1 et X_2 : CH=CH et/ou S

Dans un bain de glace, 0,57ml (3éq., 6mmol) de tribromure de bore sont ajoutés à une suspension de 0,55g (1éq., 2mmol) de composés **11b-c** ou 0,56g (1éq., 2mmol) de composé **11d** dans 25ml de dichlorométhane. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 16h avant d'être traité avec 50ml d'eau. Le dichlorométhane est évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (40ml). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous pression réduite. Aucune purification supplémentaire n'a été nécessaire.

Acide 4-{[5-(bromométhyl)-2-thiényl]carbonyl}benzoique (12b)

$C_{13}H_9BrO_3S$ MW=325,18g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1 : CH=CH et X_2 : S

Aspect : solide brun clair

Rdt : 91%

Pf : 224-226°C

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 8,08 (d, 2H, J=8,6Hz); 7,91 (d, 2H, J=8,6Hz); 7,59 (d, 1H, J=3,9Hz); 7,36 (d, 1H, J=3,9Hz); 5,06 (s, 2H, C*H*$_2$Br).

RMN ^{13}C (MeOD-d_4) δ : 186,8 (C=O); 166,5 (C=O); 150,6; 142,8; 140,5; 135,9; 134,0; 130,0; 129,5 (2C); 128,9 (2C); 26,8 (CH_2Br).

Acide 5-[4-(bromométhyl)benzoyl]-2-thiophènecarboxylique (12c)

$C_{13}H_9BrO_3S$ MW=325,18g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1 : S et X_2 : CH=CH

Aspect : solide beige

Rdt : 97%

Pf : 201-203°C

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 7,87 (d, 2H, J=8,4Hz); 7,80 (d, 1H, J=4,0Hz); 7,68 (d, 1H, J=4,0Hz); 7,62 (d, 2H, J=8,4Hz); 4,66 (s, 2H, CH_2Br).

RMN ^{13}C (MeOD-d_4) δ : 188,9 (C=O); 164,1 (C=O); 148,9; 145,0; 142,8; 138,4; 135,8; 134,4; 130,8 (2C); 130,5 (2C); 32,6 (CH_2Br).

Acide 5-{[5-(bromométhyl)-2-thiényl]carbonyl}-2-thiophènecarboxylique (12d)

$C_{11}H_7BrO_3S_2$ MW=331.21g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1=X_2 : S

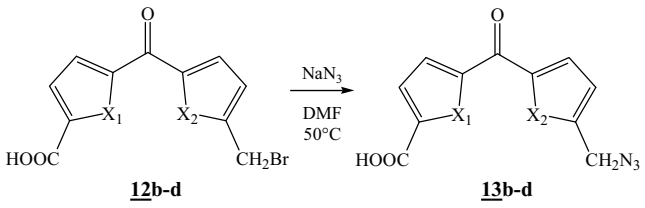
Aspect : solide brun clair

Rdt : 86%

Pf : 199-205°C (déc)

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 8,01 (d, 1H, J=4,0Hz); 7,96 (d, 1H, J=4,0Hz); 7,79 (d, 1H, J=4,0Hz); 7,39 (d, 1H, J=4,0Hz); 5, 07 (s, 2H, CH_2Br).

Formation de l'azoture



12b-d **13b-d**

X_1 et X_2 : CH=CH et/ou S

488mg (1éq., 1,5mmol) de composés **12b-c** ou 496mg (1éq., 1,5mmol) de composé **12d** sont dissous dans 9ml de diméthylformamide. 97,5mg (1éq., 1,5mmol) d'azoture de sodium sont ajouté au milieu. Après 6h à 50°C, 30ml d'eau sont ajoutés pour stopper la réaction. Après une nuit d'agitation à température ambiante, le produit est extrait à l'éther (3x15ml). Les phases organiques sont regroupées, lavées à l'eau, séchées sur sulfate de magnésium puis concentrées sous pression réduite. Les rendements obtenus sont quantitatifs.

Acide 4-{[5-(azidométhyl)-2-thiényl]carbonyl}benzoique (13b)

$C_{13}H_9N_3O_3S$ MW=287,29g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1 : CH=CH et X_2 : S

Aspect : solide jaune

Pf : 197-199°C

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 8,18 (d, 2H, J=8,3Hz); 7,92 (d, 2H, J=8,3Hz); 7,63 (d, 1H, J=3,8Hz); 7,22 (d, 1H, J=3,8Hz); 4,68 (s, 2H, CH_2N$_3$).

RMN ^{13}C (MeOD-d_4) δ : 189,2 (C=O); 168,6 (C=O); 150,1; 144,4; 142,7; 137,1 (2C); 130,9 (2C); 130,0 (2C); 129,2; 48,7 (CH_2N_3).

Acide 5-[4-(azidométhyl)benzoyl]-2-thiophènecarboxylique (13c)

$C_{13}H_9N_3O_3S$ MW=287,29g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1 : S et X_2 : CH=CH

Aspect : solide beige

Pf : 165-166°C

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 7,90 (d, 2H, J=8,4Hz); 7,79 (d, 1H, J=4,0Hz); 7,67 (d, 1H, J=4,0Hz); 7,55 (d, 2H, J=8,4Hz); 4,52 (s, 2H, CH_2N$_3$).

RMN ^{13}C (MeOD-d_4) δ : 189,2 (C=O); 164,4 (C=O); 148,7; 142,6 (2C); 138,2; 135,8; 134,3; 130,8 (2C); 129,4 (2C); 55,0 (CH_2N_3).

Acide 5-{[5-(azidométhyl)-2-thiényl]carbonyl}-2-thiophènecarboxylique (13d)

$C_{11}H_7N_3O_3S_2$ MW=293,32g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1=X_2 : S

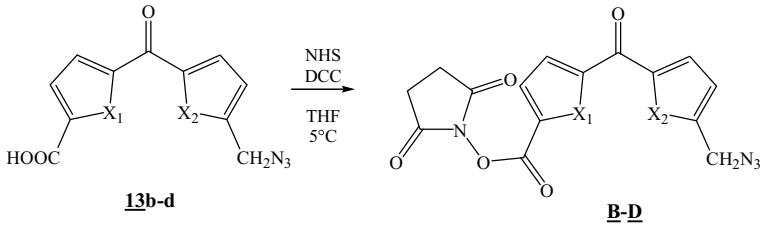
Aspect : solide jaune

Pf : 200-205°C (déc.)

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 7,94 (2d, 2H, J=3,9Hz); 7,81 (d, 1H, J=3,9Hz); 7,25 (d, 1H, J=3,9Hz); 4,68 (s, 2H, CH_2N$_3$).

RMN ^{13}C (MeOD-d_4) δ : 180,0 (C=O); 167,9 (C=O); 149,7; 147,9; 143,5; 135,7; 134,9; 134,4; 134,3; 129,2; 50,3 (CH_2N_3).

Estérification



13b-d **B-D**

X_1 et X_2 : CH=CH et/ou S

A 287mg (1éq., 1mmol) de composés **13b-c** ou 293mg (1éq., 1mmol) de composé **13d** dissous dans 18ml de tétrahydrofurane anhydre sont ajoutés 226mg (1,1éq., 1,1mmol) de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide. Le milieu réactionnel est placé dans un bain de glace et agité pendant 30min puis 126mg (1,1éq., 1,1mmol) de *N*-hydroxysuccinimide sont ajoutés. La réaction est maintenue à 5°C pendant 20h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est extrait au dichlorométhane (2x20ml) et lavé à l'eau, avec de la soude 0,1N, puis une solution saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous pression réduite. Le produit est purifié sur gel de silice (dichlorométhane).

1-[(4-{[5-(Azidométhyl)-2-thiényl]carbonyl}benzoyl)-*N*-oxy]pyrrolidine-2,5-dione (B)

$C_{17}H_{12}N_4O_5S$ *MW=384,37g.mol^{-1}*

Produit de départ : X_1 : CH=CH et X_2 : S

Aspect : solide jaune

Rdt : 59%

Pf : 148°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 8,28 (d, 2H, J=8,5Hz); 7,95 (d, 2H, J=8,5Hz); 7,51 (d, 1H, J=3,6Hz); 7,12 (d, 1H, J=3,6Hz); 4,59 (s, 2H, C*H*$_2$N$_3$); 2,94 (s, 4H, C*H*$_{2suc}$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 186,7 (C=O); 168,9 (2C=O); 161,1 (C=O); 148,1; 143,1 (2C); 135,4; 130,7 (2C); 129,2 (2C); 128,2; 127,6; 49,3 (CH_2N_3); 25,7 ($2CH_2$).

IR (KBr) : 2103 (N_3); 1767; 1738; 1630 (C=O); 1435 (CH_2); 1070; 996 (C-O).

1-[({5-[4-(Azidométhyl)benzoyl]-2-thiényl}carbonyl)-*N*-oxy]pyrrolidine-2,5-dione (C)

$C_{17}H_{12}N_4O_5S$ *MW=384,37g.mol^{-1}*

Produit de départ : X_1 : S et X_2 : CH=CH

Aspect : solide jaune

Rdt : 46%

Pf : 153-154°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 8,02 (d, 1H, J=4,0Hz); 8,00 (d, 2H, J=8,5Hz); 7,67 (d, 1H, J=4,0Hz); 7,49 (d, 2H, J=8,5Hz); 4,48 (s, 2H, CH_2N_3); 2,92 (s, 4H, CH_{2suc}).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 186,8 (C=O); 168,7 (2C=O); 157,0 (C=O); 150,3; 141,0; 136,6; 136,0; 133,5; 132,9; 129,9 (2C); 128,2 (2C); 54,2 (CH_2N_3); 25,6 ($2CH_2$).

IR (KBr) : 2112 (N_3); 1765; 1737; 1636 (C=O); 1432 (CH_2); 1073; 952 (C-O).

1-{[(5-{[5-(Azidométhyl)-2-thiényl]carbonyl}-2-thiényl)carbonyl]-*N*-oxy}pyrrolidine-2,5-dione (D)

$C_{15}H_{10}N_4O_5S_2$ *MW=390,40g.mol^{-1}*

Produit de départ : X_1=X_2 : S

Aspect : solide jaune

Rdt : 34%

Pf : 124-125°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,96 (d, 1H, J=4,1Hz); 7,80 (d, 1H, J=4,1Hz); 7,75 (d, 1H, J=3,9Hz); 7,07 (d, 1H, J=3,9Hz); 4,52 (s, 2H, CH_2N_3); 2,87 (s, 4H, CH_{2suc}).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 177,7 (C=O); 168,8 (2C=O); 157,0 (C=O); 149,5; 148,0 (2C); 142,1; 136,1; 134,3; 132,3; 127,7; 49,3 (CH_2N_3); 25,6 ($2CH_2$).

IR (KBr) : 2100 (N_3); 1764; 1738; 1620 (C=O); 1427 (CH_2); 1069; 980 (C-O).

Chapitre V :

Couplage au glutathion

Chapitre V : Couplage au glutathion

Comme nous l'avons vu dans le chapitre II, notre but est de réaliser des dérivés photoactivables du glutathion. La synthèse des molécules cibles étant réalisée, la prochaine étape est le couplage de ces sondes sur le glutathion.

Très peu d'exemples de dérivés d'analogues N-modifié du GSH sont décrits dans la littérature.[101] Les exemples existants sont plus généralement orientés vers le glutathion S-modifié ou simultanément N- et S-modifiés et bien qu'ils aient l'air d'une apparente simplicité, ils sont rarement décrits dans la littérature en partant du glutathion GSH. Ces dérivés sont généralement réalisés grâce à une synthèse peptidique à partir des acides aminés adéquatement protégés.
Il est important de noter que l'exemple du glutathion N-modifié décrit par Karwatsky *et al.* en 2003 est en réalité un glutathion S-modifié. Ceci a été démontré par Dan Bernardi[102] en réalisant la synthèse de dérivés du GSH N-modifié rendant ainsi possible la comparaison et l'identification des dérivés obtenus par Karwatsky. Par la suite, Dan Bernardi, lors de son travail de thèse,[85] a synthétisé des dérivés photoactivables ainsi que des analogues du glutathion. Nous nous sommes inspirés de ses travaux pour effectuer nos couplages.

Le fait de laisser la fonction thiol (-SH) du glutathion libre est très important. Nous avons vu que le glutathion peut passer de la forme réduite à la forme oxydée et vice versa. Si la fonction -SH n'est plus disponible, cette transformation, qui confère la propriété oxydo-réductrice au glutathion, ne peut plus se faire. Il est donc important que cette fonction reste libre.
Trois voies de synthèse peuvent être envisagées pour atteindre les dérivés N-modifié, du glutathion :

- ⟶ Couplage sur le glutathion réduit
- ⟶ Couplage sur le glutathion oxydé
- ⟶ Couplage sur un glutathion protégé

[101] Karwatsky, J.; Daoud, R.; Cai, J.; Gros, P.; Georges, E. *Biochemistry* **2003**, *42*, 3286-3294.
[102] Bernardi, D.; Battaglia, E.; Kirsch, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2006**, *16*, 1601-1604.

Ces couplages pourront être réalisés sur l'amine libre du glutathion (GSH, GSSG ou GSR) grâce à l'ester activé par la N-hydroxysuccinimide introduit sur notre sonde photoactivable.*

Nous allons voir les différentes possibilités que nous offrent ces trois méthodes pour atteindre les dérivés voulus.

1. Couplage sur le glutathion réduit

Seuls les travaux de Karwatsky décrivent la synthèse de dérivés photoactivables du glutathion N-modifié en utilisant directement le glutathion sous sa forme réduite, aucune protection n'étant nécessaire.

Cette voie de synthèse paraît très attractive. En règle générale, la synthèse de peptides contenant un résidu cystéine ou histidine n'est pas aisée car elle nécessite l'utilisation de groupements protecteurs de la fonction thiol. Cette dernière est en effet plus nucléophile que la fonction amine.[103] Cette règle s'applique également au cas du glutathion comme l'a montré Dan Bernardi.[102]

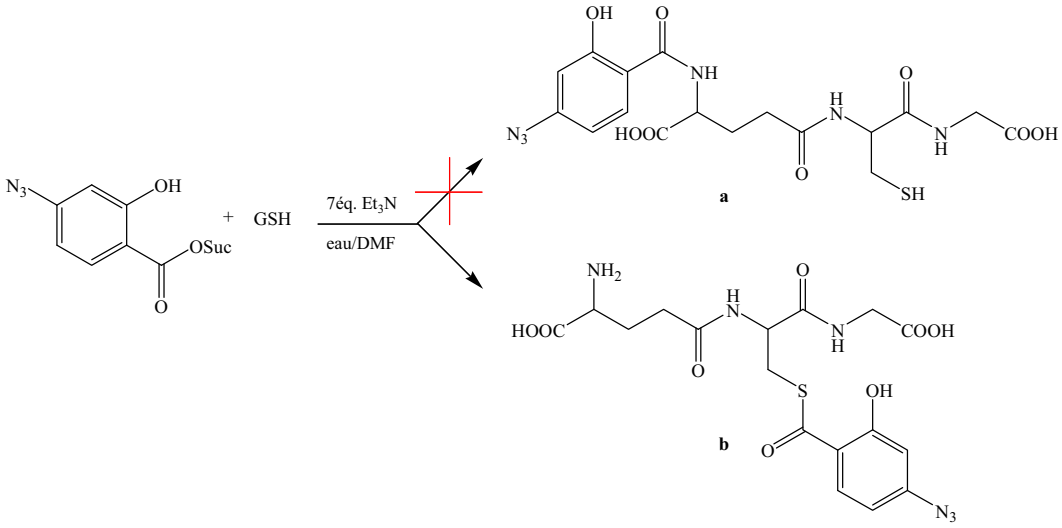


Schéma 24 : Résultats obtenus par D. Bernardi en utilisant la synthèse de Karwatsky

En utilisant la méthode décrite par Karwatski, il a synthétisé le composé **b** et non le **a**. Un test à la ninhydrine, ainsi qu'un test d'Ellman (cf. annexe 2) ont permis de mettre en évidence respectivement la présence de l'amine libre et l'absence du groupement thiol libre.

---

* Cf. Chap. III

[103] Cavelier, F.; Daunis, J.; Jaquier, R. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1990**, *2*, 210-225.

Il a été montré que les thioesters du glutathion ne sont pas stables en milieu aqueux car ils s'hydrolysent rapidement,[104] ce ne sont donc pas des composés pouvant être exploités lors de notre étude car l'étape d'irradiation entre les sondes couplées au glutathion et les protéines d'intérêt ne pourra se faire qu'en milieu physiologique, c'est-à-dire aqueux.
L'utilisation du glutathion réduit pour former des dérivés N-modifiés n'est donc pas envisageable.

2. Couplage sur le glutathion oxydé

Une solution pour accéder au couplage serait d'utiliser le glutathion oxydé (GSSG). La fonction thiol étant engagée dans un pont disulfure, le couplage peptidique ne pourra se faire que sur la fonction amine du glutathion. La démarche à suivre serait la suivante :

- la première étape consisterait à réaliser le couplage entre l'ester activé et la fonction amine du GSSG,
- la seconde étape serait une réduction du pont disulfure par le dithiotréitol (DTT).

Cette méthode donnerait accès rapidement à des dérivés du glutathion réduit. Cependant D'Silva *et al*.[105] précisent que le groupement amine est peu réactif et que son acylation n'est pas systématique.
Bien que cette première étape soit déjà validée avec la synthèse de dérivés N-substitués du glutathion[106] et puisse effectivement être appliquée dans notre cas, la seconde étape, quant à elle, ne peut l'être. Cette étape consiste à couper le pont disulfure (-S-S-) par l'utilisation d'un agent réducteur, comme par exemple le DTT. Or, notre sonde possède le groupement azoture de méthylène pour effectuer la détection et la plupart des agents réducteurs réduisent les azotures en amine,[107] rendant ainsi la détection grâce à notre groupement $-CH_2N_3$ impossible.
Nous avons donc étudié la troisième méthode qui est le passage par un couplage sur le glutathion S-modifié.

[104] Sidenius, U.; Skonberg, C.; Olsen, J.; Hansen, S.H. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 75-81.
[105] D'Silva, C.; Al-Timari, A.; Douglas, K.T. *Biochem. J.* **1982**, *207*, 329-332.
[106] Bernardi, D.; Dicko, A.; Kirsch, G. *Synthesis* **2006**, 509-513.
[107] Larock, R.C. Comprehensive Organic Transformation. A guid to functional Group Preparation. VCH Publishers, Inc. **1989**, 409.

Remarque :

Une publication récente[108] montre la résistance du groupement azoture lors de l'utilisation du tétrahydridoborate de sodium ($NaBH_4$). Or ce composé peut servir à couper le pont disulfure. Cette voie serait donc à éxploiter.

3. Couplage sur le glutathion S-modifié

Gelinsky *et al.*[109] ont utilisé le glutathion S-trityle. Après l'avoir estérifié, ils ont fixé par couplage sur l'amine (seule fonction libre) un acide aminé (cystéine ou histidine), leur permettant ainsi d'obtenir un tétrapeptide. Une seconde méthode leur a permis d'obtenir des pentapeptides. Pour cela, ils ont protégé l'amine du glutathion S-trityle puis, par estérification, ont fixé un acide aminé (cystéine ou histidine).

Dans ces deux cas, la déprotection du groupement trityle par le mercaptoéthanol représente la dernière étape. Or de par sa difficulté d'utilisation et son caractère nucléophile puissant, pouvant toucher le groupement azoture, le mercaptoéthanol n'a pas été utilisé sur nos composés. Cependant, la démarche reste très intéressante, notamment le fait de partir du glutathion S-protégé mais reste le problème du clivage.

Il existe de nombreuses méthodes de déprotection de ce groupement,[110] cependant elles ne sont pas toutes compatibles avec la présence d'un azoture sur notre sonde.

L'une des méthodes consiste à faire réagir le composé tritylique en solution dans un mélange acide trifluoroacétique/dichlorométhane en présence de triéthylsilane à température ambiante pendant 1h.

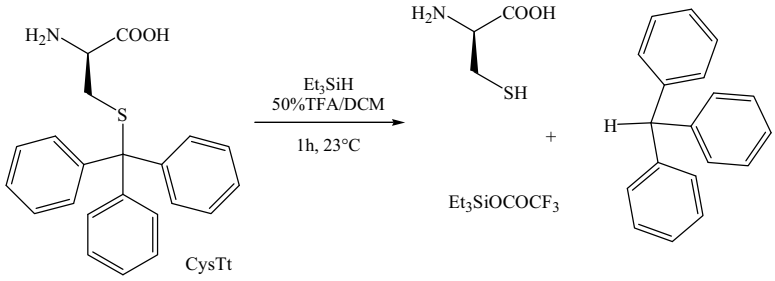


Schéma 25 : Déprotection du groupement trityle

[108] Ryu, HC.; Jin, M-K.; Kim, S.Y.; Choi, H-K.; Kang, S-U.; Kang, D.W.; Lee, J.; Pearce, L.V.; Pavlyukovets, V.A.; Morgan, M.A.; Tran, R.; Toth, A.; Lundberg, D.J.; Blumberg, P.M. *J. Med. Chem.* **2008**, *51,* 57-67.

[109] Gelinsky, M.; Volger, R.; Vahrenkamp, H. *Inorg. Chim. Acta* **2003**, *244*, 230-238.

[110] (a) Kawakami, T.; Akaji, K.; Aimoto, S. *Org. Lett*. **2001**, *3*, 1403-1405. (b) Lee, H.B.; Pattarawarapan, M.; Roy, S.; Burgess, K. *Chem. Commun*. **2003**, 1674-1675. (c) Grieco, P.; Campiglia, P.; Gomez-Monterrey, I.; Lama, T.; Novellino, E. *Synlett* **2003**, 2216-2218.

Cette méthode, proposée par Pearson *et al.* en 1989,[111] est actuellement la plus utilisée et présente de nombreux avantages :

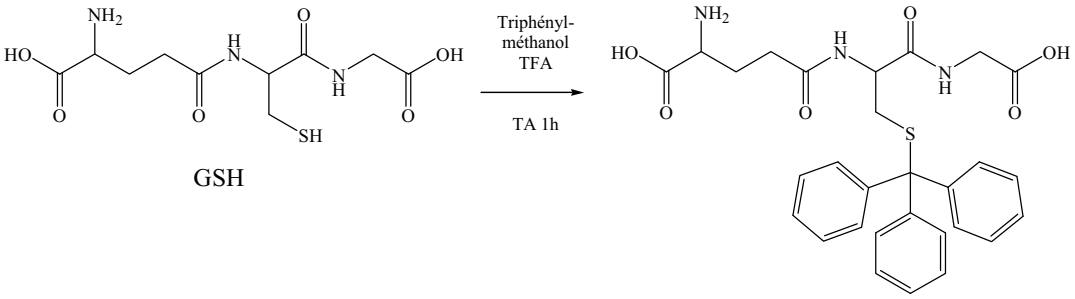
- ne réduit pas les azotures
- les trialkyles silanes et les sous-produits générés sont assez volatils et donc peuvent être éliminés par évaporation sous pression réduite.
- les sous-produits silylés résiduels sont très peu polaires et peuvent être éliminés lors de la purification.

Après avoir vu les difficultés et avantages que représentent ces trois possibilités de couplage, nous avons décidé de partir du glutathion S-trityle pour réaliser nos couplages et ainsi obtenir les dérivés photoactivables N-substitués du glutathion.

4. Synthèse des dérivés photoactivables du glutathion

4.1. Synthèse du glutathion S-trityle

La synthèse du glutathion S-trityle, que nous noterons GSTrt (**22**), est décrite dans la littérature. Une première voie serait de reproduire la méthode décrite par Diaz *et al.*[112] qui consiste à faire réagir le glutathion réduit avec un équivalent de triphénylméthanol dans l'acide trifluoroacétique à température ambiante.



GSH

22

Après 1h d'agitation, la réaction est stoppée par ajout d'éther. Le précipité blanc formé est filtré.

[111] Pearson, D.A.; Blanchette, M.; Baker, M.L.; Guindon, C.A. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739-2742.
[112] Díaz, S.; González, A.; González de Riancho. S.; Rodríguez, A. *J. Organomet. Chem*. **2000**, *610*, 25-30.

L'avantage de cette première méthode est qu'elle ne nécessite pas de purification, une simple filtration et un lavage à l'éther sont suffisants. De plus le temps de réaction est très court.

Par la suite, Dan Bernardi a décrit une seconde voie pour la synthèse de ce composé.[113] La méthode consiste à mettre le glutathion réduit en suspension dans l'acide acétique glacial et d'y ajouter le triphénylméthanol ainsi que de l'acide trifluoroacétique. Le milieu est chauffé à 50°C pendant 24h. Le produit après évaporation du solvant est purifié par colonne chromatographique. Cette voie de synthèse constitue une seconde méthode pour obtenir le produit voulu.

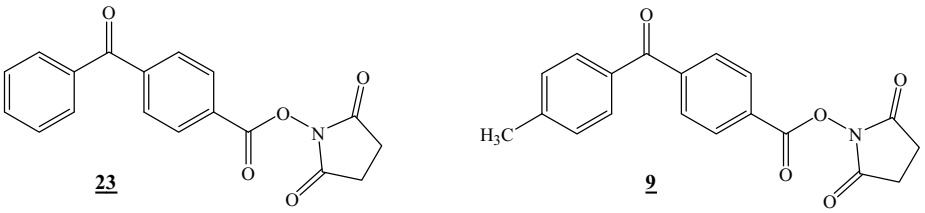
Ces deux méthodes ont été réalisées et ont toutes deux permis d'obtenir le composé voulu. Cependant le meilleur rendement obtenu (83%) l'a été dans le cas de l'utilisation de la méthode décrite par Diaz.

4.2. Couplages sur l'amine libre

4.2.1. Essais de conditions

Comme nous l'avons vu, la réalisation de ces composés s'effectuera par le couplage des sondes sur le glutathion S-trityle (GSTrt) dont nous venons de voir la synthèse. Mais avant d'initier la synthèse de dérivés N-modifiés avec les molécules cibles, c'est-à-dire les structures trifonctionnelles, obtenues après 9 étapes de synthèse, nous avons préféré valider la méthode en utilisant des esters activés (Figure 31) plus faciles d'accès mais dont la structure reste cependant proche de nos sondes.

[113] Bernardi, D.; Ba, L.A.; Kirsch, G. *Synthesis* **2007**, 140-144.

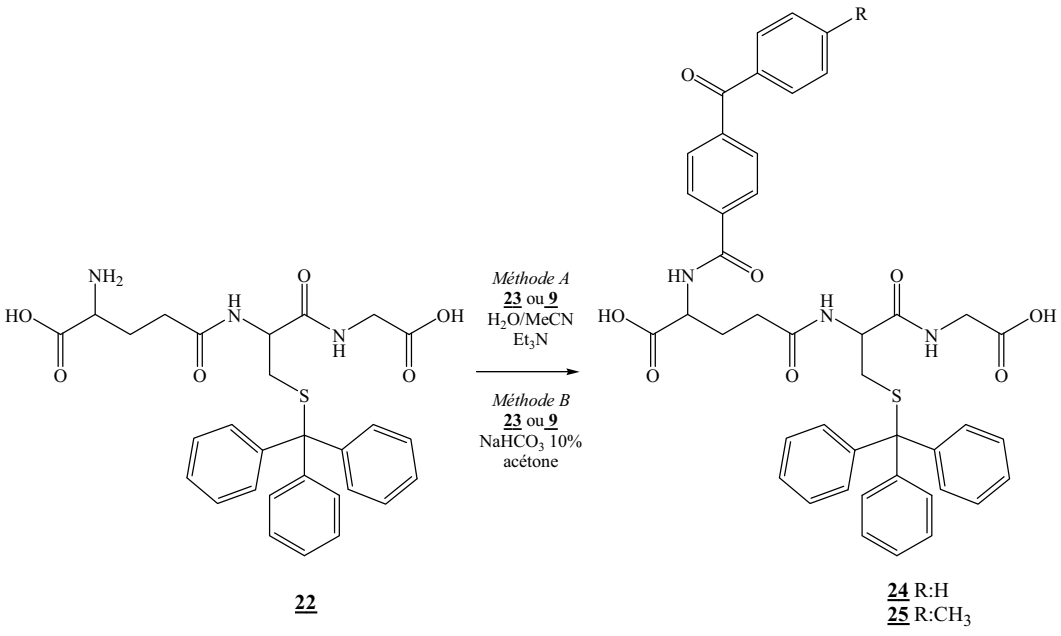


23 **9**

Figure 31 : Structure des esters pour les essais de couplage au glutathion

Le premier ester (**23**) est réalisé à partir de l'acide 4-benzoylbenzoïque, qui est un produit commercial, en présence de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) et de *N,N'*-dicyclohexyl-carbodiimide (DCC) dans le tétrahydrofurane. Le second ester (**9**) a été obtenu lors de la réalisation de la méthode directe de la molécule cible **A** (**14**).

Le couplage du composé **23** sur le glutathion S-modifié est décrit par Dan Bernardi. Pour le synthétiser un équivalent de glutathion S-trityle (GSTrt) a été placé dans un mélange eau/acétonitrile (3:7) en présence de 3éq. de triéthylamine. Une fois l'ester activé ajouté (1,1 équivalent), le milieu réactionnel est agité pendant 24h à température ambiante. Le produit obtenu est purifié sur gel de silice avec un rendement de 65%. (*Méthode A*)



22 **24** R:H **25** R:CH_3

Une seconde méthode est cependant possible. En effet, le composé **24** peut être réalisé en introduisant 1éq. de GSTrt dissous dans une solution d'hydrogénocarbonate de sodium à 10%. Après 1h d'agitation à température ambiante, une suspension de 1,05 équivalents d'ester activé dans l'acétone est ajouté goutte à goutte. Après 12h d'agitation, l'acétone est évaporée

et le milieu est acidifié jusqu'à pH=5 avec une solution molaire d'acide chlorhydrique. Après une extraction à l'acétate d'éthyle, le produit est recristallisé dans l'éther à chaud. Dans ce cas, le produit de couplage a été obtenu avec un rendement de 54%. (*Méthode B*)
Le rendement obtenu lors de cette seconde méthode est plus faible que celui obtenu précédemment. Cependant nous avons décidé d'appliquer ces deux méthodes sur l'ester suivant (**9**), sa structure étant plus proche de nos molécules cibles.

Pour le second couplage, les mêmes conditions que pour le composé **23** ont été mises en oeuvre. Cependant la méthode A a légèrement été modifiée car le composé obtenu n'a pas été purifié sur gel de silice. Après évaporation du milieu, celui-ci a été repris dans un minimum d'eau puis acidifié jusqu'à pH=5 avec une solution molaire d'acide chlorhydrique. Une fois ce pH atteint, le milieu a été extrait à l'acétate d'éthyle, évaporé puis repris dans l'éther à chaud. Le produit a été obtenu avec 78% de rendement. La méthode B a été réalisée suivant le mode opératoire utilisé lors du couplage précédent et nous a permis d'obtenir le produit désiré avec 70% de rendement.

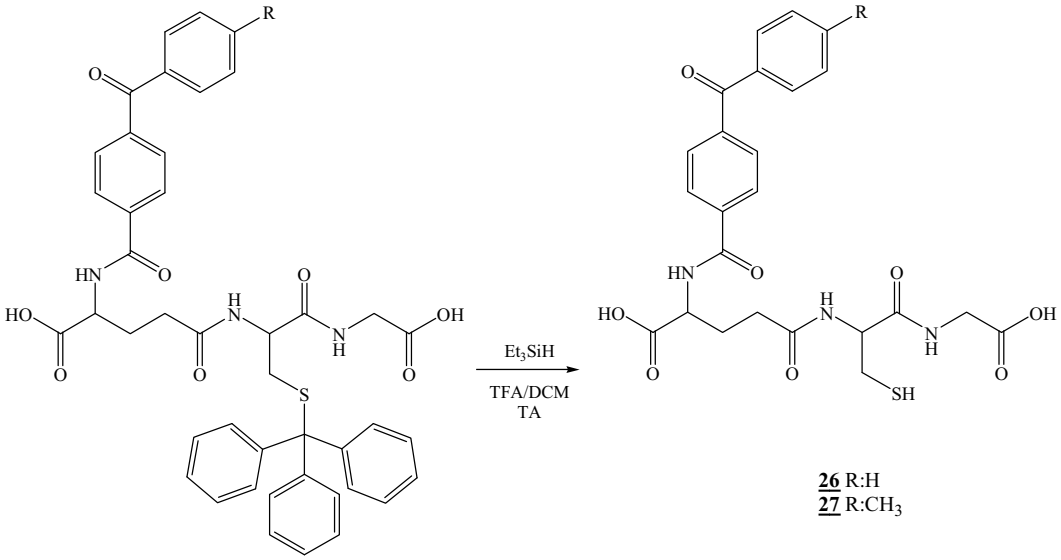
Ces deux méthodes ont permis de synthétiser les produits de couplage (**24** et **25**) avec de bons rendements. Cependant la méthode A modifiée, de par ses meilleurs résultats, a été choisie pour effectuer les couplages sur les molécules cibles **A**-**D**.

Remarque :
*Lors des réactions de couplage, nous avons observé une différence de comportement du glutathion S-trityle préparé avec l'acide acétique glacial et purifié sur gel de silice, et celui préparé avec l'acide trifluoroacétique pur et purifié par simple filtration. En effet lorsque la réaction de couplage a été réalisée sur le composé **9** avec la méthode A et le glutathion préparé dans l'acide acétique, le rendement n'est que de 15% alors qu'il est de 78% lors que le glutathion est préparé dans l'acide trifluoroacétique. C'est pourquoi lors de tous nos couplages, nous utiliserons le glutathion S-trityle préparé dans l'acide trifluoroacétique.*

4.2.2. Essais de clivage du groupement protecteur de la fonction thiol

Après le couplage de nos deux esters (**23** et **9**) sur l'amine du GSTrt, il faut déprotéger la fonction thiol suivant le protocole décrit par Sakowski *et al.*,[114] pour ne pas perdre la propriété oxydo-réductrice du glutathion.

Pour cela, nous avons dissous notre produit de couplage (**24** ou **25**) dans un mélange dichlorométhane/acide trifluoroacétique (2:1) auquel ont été ajoutés 2 équivalents de triéthylsilane. Après 1h45 d'agitation à température ambiante et après purification, les glutathion N-modifiés **26** et **27** ont été obtenus avec 83% et 68% de rendement respectivement.



24 R:H
25 R:CH_3

26 R:H
27 R:CH_3

Cette méthode est dans notre cas une méthode de choix car elle donne de bons rendements et surtout elle n'affecte pas les groupements azotures.

Remarque :

*Lors des essais de conditions opératoires, le composé **9** a été utilisé. La synthèse des analogues thiophèniques de ce composé ont également été synthétisés dans le but de faire de nouveaux N-dérivés photoactivables du S-trityl glutathion. Pour cela, nous avons utilisé la même technique que nous venons de voir. L'annexe 4 expose la synthèse de ces esters ainsi que les dérivés du S-trityl glutathion correspondants.*

[114] Sakowski, J.; Böhn, M.; Sattler, I.; Dahse, H-M.; Schiltzer, M. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2886-2899.

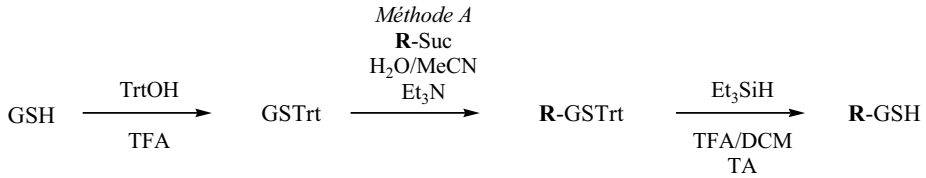
Un couplage direct sur le GSH entraîne la formation de thioesters peu stables, privant de plus le glutathion de l'une de ses principales propriétés (potentiel oxydo-réducteur). Une méthode utilisant le GSSG est à éviter dans notre cas de par l'utilisation d'agents réducteurs pour couper le pont disulfure. Ces agents réduisent les azotures en amines, privant ainsi notre sonde de son groupement de détection. Une dernière solution est donc de réaliser le couplage sur la fonction amine du glutathion dont le –SH est protégé par un groupement ne nécessitant pas d'agent réducteur pour sa déprotection.

Pour cela une voie de synthèse en 3 étapes peut être appliquée :

1ère étape : formation du glutathion S-trityle

2nde étape : couplage sur l'amine libre

3ème étape : déprotection de la fonction thiol.



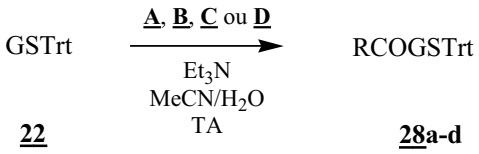
R: groupement photoactivable avec ou sans le groupement de détection

Les différentes conditions opératoires qui ont été menés sur des molécules faciles d'accès nous ont permis de valider cette voie de synthèse.

4.3. Réalisation des couplages sur les molécules cibles **A**-**D**

Pour réaliser ces couplages nous avons procédé de la même façon que lors des essais de conditions opératoires, c'est-à-dire une synthèse en 3 étapes (protection de la fonction thiol - couplage sur l'amine libre - déprotection de la fonction thiol).

4.3.1. Couplage sur l'amine libre



Les structures trifonctionnelles ont été couplées au S-trityl glutathion suivant le procédé utilisé lors des essais de conditions opératoires. La réaction se fait dans un mélange acétonitrile/eau (3:1) en présence de 3 équivalents de triéthylamine. Après 24h sous agitation à température ambiante, les composés **28a-d** ont été obtenus avec de bons rendements.(Tableau 6)

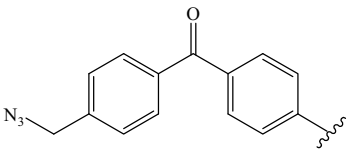
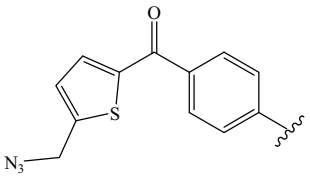
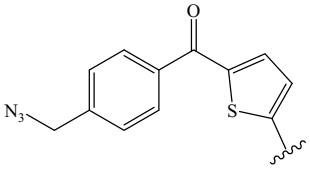
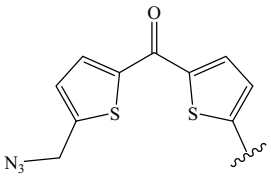
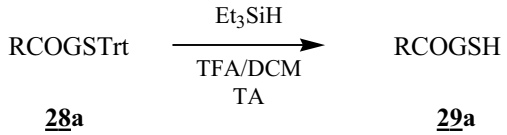
	R	Rdt (%)		R	Rdt (%)
28a		74	**28c**		83
28b		69	**28d**		56

Tableau 6 : Résultats du couplage des structures trifonctionnelles sur le S-trityl glutathion

4.3.2. Déprotection

Après le couplage réalisé, il faut déprotéger la fonction thiol grâce au triéthylsilane dans un mélange eau/diméthylformamide, à température ambiante.
Cependant une fois la fonction thiol libre, le composé peut s'oxyder facilement, il est donc nécessaire de le conserver sous argon et au frigo ou de réaliser cette déprotection peu de temps avant l'utilisation des produits déprotégés. Pour ces raisons et dans le but de valider la méthode, seul le composé **28a** a été déprotégé.



Cette étape nous a conduit à la formation du composé **29a** avec un rendement de 91%.
Les composés **28b-d** peuvent être donc déprotégés, en suivant ce même mode opératoire, peu de temps avant leur utilisation biologique afin d'éviter toute dégradation.

5. Tests biologiques sur les molécules obtenues

La coadministration d'inhibiteurs efficaces et sélectifs des GST et d'un agent anticancéreux représente une stratégie pour sensibiliser les cellules aux agents cytotoxiques. D'après la littérature, les analogues du GSH ou les conjugués de GSH représentent de bons inhibiteurs des GST vu leur grande affinité.[89]
Or malgré leurs potentiels pharmacothérapeutiques, les dérivés S-modifiés de glutathion décrits dans la littérature manquent de stabilité (hydrolyse et clivage par la γ-glutamytransférase). Leur manque de sélectivité pose aussi problème pour leur utilisation.[115]
Cependant le GSTrt a été identifié comme inhibiteur de la GST_{3-3} de rat[116] avec un K_i=1,37±0,20.10^{-7}M sans qu'aucune spécification supplémentaire n'ait été effectuée. Au sein de notre laboratoire, une caractérisation plus spécifique de ses effets a été réalisée.

[115] Burg, D.; Riepsaane, J.; Pont, C.; Mulder, G.; Van de Water, B. *Biochem. Pharmacol* **2006**, *71*, 268-277.
[116] Cooke, R.J.; Björnestedt, R.; Douglas, K.T.; McKie, J.H.; King, M.D.; Coles, B.; Ketterer, B.; Mannervik, B. *Biochem. J*. **1994**, *302*, 383-390.

Au cours de ses travaux de master, Hélène Albert a montré que le S-trityle glutathion est un inhibiteur puissant de la $GSTP_{1-1}$ humaine purifiée.[117] En effet, il inhibe cette enzyme avec un $K_i=3,1\pm0,02.10^{-7}M$, ce qui en fait un inhibiteur aussi puissant que l'inhibiteur de référence de la $GSTP_{1-1}$, le TLK199, que nous avons vu précédemment et dont le K_i est de $4.10^{-7}M$.

Suite à ces résultats, des tests d'inhibition seront réalisés sur les dérivés N-modifié S-trityle du glutathion que nous avons synthétisés ainsi que sur les dérivés N-modifié du glutathion. Des tests de photomarquage de ces molécules sur des protéines modèles (albumine, GST) seront également effectués.

[117] Albert, H. *Triphényl S-glutathion : Evaluation in vitro et effet sur la résistance de cellules cancéreuses d'un puissant inhibiteur de la glutathion S-transférase π humaine* Master soutenu le 26 juin **2007**. Université Henri Poincaré de Nancy 1

Partie expérimentale

Identification des protons du glutathion 173

Couplage sur le glutathion S-modifié 173

Synthèse du glutathion S-Trityle 173

Trifluoroacétate de glutathion S-trityle (Trifluoroacétate de 1-carboxy-4-({2-[(carboxyméthyl)amino]-2-oxo-1[(tritylsulfanyl)méthyl]éthyl}amino)-4-oxo-1-butanaminium) (22) 173

Essais de condition opératoire 174

1-[(4-Benzoylbenzoyl)-*N*-oxy]pyrrolidine-2,5-dione (23) 174

N^2-(4-Benzoylbenzoyl)-N^5-{2-[(carboxyméthyl)amino]-2-oxo-1-[(tritylsulfanyl) méthyl]éthyl}glutamine (24) 176

N^5-{2-[(Carboxyméthyl)amino]-2-oxo-1-[(tritylsulfanyl)méthyl]éthyl}-N^2-[4-(4-méthylbenzoyl)benzoyl]glutamine (25) 178

N^2-(4-Benzoylbenzoyl)-N^5-[2-[(carboxyméthyl)amino]-2-oxo-1-(sulfanylméthyl)éthyl]glutamine (26) 180

N^5-[2-[(Carboxyméthyl)amino]-2-oxo-1-(sulfanylméthyl)éthyl]-N^2-[4-(4-méthylbenzoyl)benzoyl]glutamine (27) 181

Réalisation du couplage avec les molécules cibles (A-D) 182

Couplage sur l'amine libre du glutation S-trytile 182

N^2-{4-[4-Azidométhyl)benzoyl]benzoyl}-N^5-{2-[(carboxyméthyl)amino]-2-oxo-1-[(tritylsulfanyl)méthyl]éthyl}glutamine (28a) 183

N^2-(4-{[5-(Azidomethyl)-2-thiényl]carbonyl}benzoyl)-N^5-{2-[(carboxyméthyl) mino]-2-oxo-1-[(tritylsulfanyl)méthyl]éthyl}glutamine (28b) 183

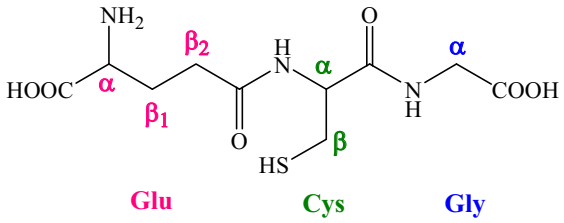
N^2-({5-[4-(Azidométhyl)benzoyl]-2-thiényl}carbonyl)-N^5-{2-[(carboxyméthyl)amino]-2-oxo-1-[(tritylsulfanyl)méthyl]éthyl}glutamine (28c) 184

N^2-[(5-{[5-(Azidométhyl)-2-thiényl]carbonyl}-2-thiényl)carbonyl]-N^5-{2-[(carboxyméthyl)amino]-2-oxo-1-[(tritylsulfanyl)méthyl]éthyl}glutamine (28d) 184

Déprotection de la fonction thiol 185

N^2-{4-[4-(azidomethyl)benzoyl]benzoyl}-N^5-[2-[(carboxymethyl)amino]-2-oxo-1-(sulfanylmethyl)ethyl]glutamine (29a) 185

Identification des protons du glutathion

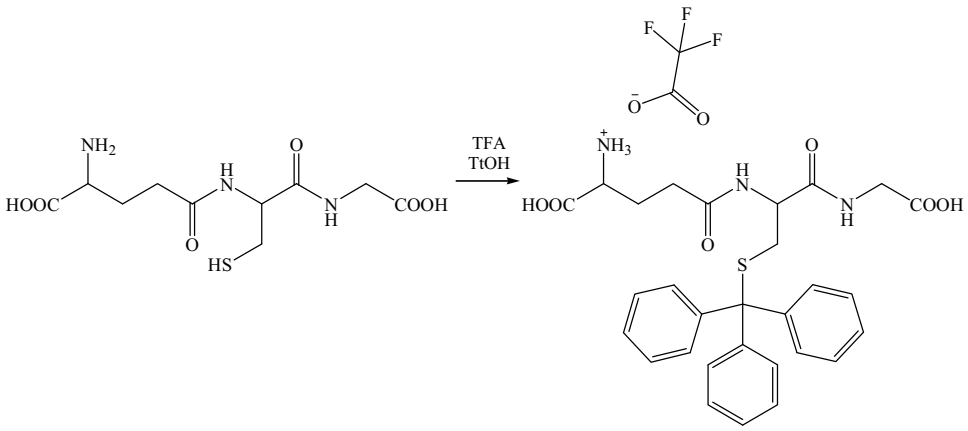


Couplage sur le glutathion S-modifié

Synthèse du glutathion S-Trityle

Trifluoroacétate de glutathion S-trityle (Trifluoroacétate de 1-carboxy-4-({2-[(carboxyméthyl)amino]-2-oxo-1[(tritylsulfanyl)méthyl]éthyl}amino)-4-oxo-1-butanaminium) (<u>22</u>)

$C_{31}H_{32}F_3N_3O_8S$ *MW=663,66g.mol^{-1}*



<u>22</u>

Méthode A[113]

A 1.54g (1éq., 5mmol) de glutathion réduit en suspension dans 30ml d'acide acétique glacial sont ajoutés 1.37g (1,05éq., 5,25mmol) de triphénylméthanol et 1ml d'acide trifluoroacétique. Le mélange réactionnel est chauffé à 50°C pendant 24h. L'acide acétique est évaporé sous pression réduite et le résidu purifié sur gel de silice (acétonitrile/eau 4:1). Rdt : 60%

Méthode B[112]

A 1g (1éq., 3,26mmol) de glutathion réduit, dissout dans 6ml d'acide trifluoroacétique, est ajouté 860mg (1éq., 3,26mmol) de triphénylméthanol. Le milieu réactionnel devient rouge foncé. Après 2h d'agitation à température ambiante, 50ml d'éther sont ajoutés. Le précipité blanc formé est filtré sur Büchner puis lavé à l'éther (3 x 20ml). Rdt : 83%

Aspect : solide incolore

Pf : 105°C (déc.)

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 8,33-8.25 (m, 2H, NH_{Cys} + NH_{Gly}); 7,35-7,20 (m, 15H); 4,40-4,32 (m, 1H, $H_{\alpha Cys}$); 3,76 (t, 1H, J=6,2Hz, $H_{\alpha Glu}$); 3,66 (d, 2H, J=5,7Hz, $H_{\alpha Gly}$); 2,39-2,28 (m, 4H, $H_{\beta Cys}$+ $H_{\beta 2Glu}$); 2,05-1,91 (m, 2H, $H_{\beta 1Glu}$).

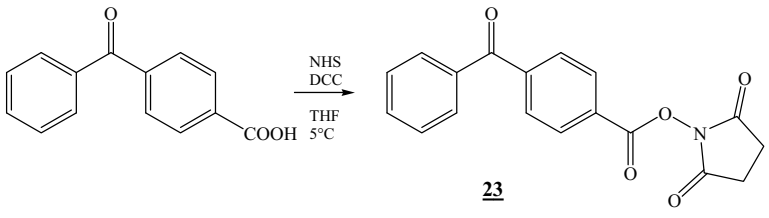
RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 170,3 (C=O); 170,7 (2C=O); 170,0 (C=O); 158.9 (*C*OCF_3); 158,4 (*C*OCF_3); 157,9 (*C*OCF_3); 157,4 (*C*OCF_3); 144,2 (3C); 129,0 (6C); 127,7 (6C); 126,7 (3C); 124,3 (CF_3); 119,5 (CF_3); 114,8 (CF_3); 65,8 (CPh_3); 51,8 ($C_{\alpha Cys}$); 51,4 ($C_{\alpha Glu}$); 40,7 ($C_{\alpha Gly}$); 33,8 ($C_{\beta cys}$); 30,6 ($C_{\beta 2Glu}$); 26,0 ($C_{\beta 1Glu}$).

Essais de condition opératoire

Formation des esters activés

1-[(4-Benzoylbenzoyl)-*N*-oxy]pyrrolidine-2,5-dione (<u>23</u>)

$C_{18}H_{13}NO_5$ *MW=323,30g.mol^{-1}*



<u>23</u>

A 226mg (1éq., 1mmol) d'acide 4-méthylbenzoique dissous dans 2ml de tétrahydrofurane sont ajoutés 115mg (1éq., 1mmol) de *N*-hydroxysuccinimide. Le milieu réactionnel est placé dans un bain de glace et agité pendant 30min. 217mg (1,05éq., 1,05mmol) de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide sont ensuite ajoutés. La réaction est maintenue à 5°C pendant 20h

puis filtré sur coton. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur gel de silice (dichlorométhane).

Aspect : solide incolore

Rdt : 70%

Pf : 208-210°C (lit.[118] 207°C)

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 8,20 (d, 2H, J=8,6Hz); 7,82 (d, 2H, J=8,6 Hz); 7,73 (d, 2H, J=7,1Hz); 7,57 (dd, 1H, J=7,1Hz et J=1,4Hz); 7,44 (dd, 2H, J=7,1Hz et J=1,4Hz); 2,87 (s, 4H, CH_{2suc}).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ: 195,5 (C=O); 169,0 (2C=O); 161,2 (C=O); 144,7; 136,5; 133,2; 130,5; 130,1; 130,0; 128,6; 128,1; 25,7 (CH_2).

Remarque :

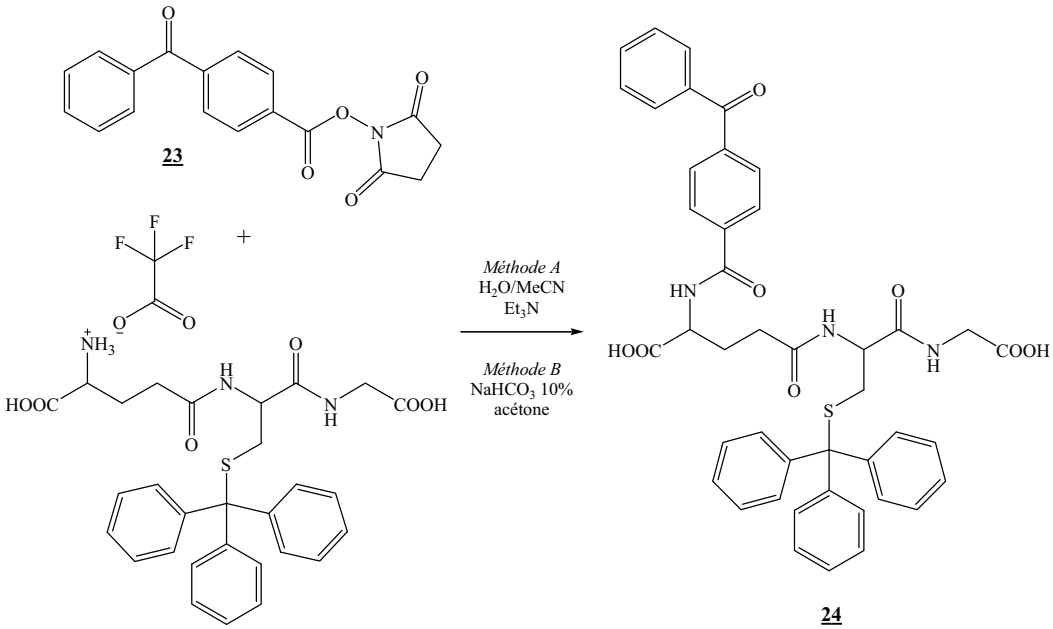
*Le composé (**9**) (1-{[4-(4-Méhylbenzoyl)benzoyl]-N-oxy}pyrrolidine-2,5-dione) a été synthétisé précédemment (cf. Chap.III Partie expérimentale)*

[118] Thiele, C.; Fahrenholz, F. *Biochemistry* **1993**, *32*, 2741-2746.

Couplage sur l'amine libre du glutathion S-trityle

N^2-(4-Benzoylbenzoyl)-N^5-{2-[(carboxyméthyl)amino]-2-oxo-1-[(tritylsulfanyl) méthyl]éthyl}glutamine (<u>24</u>)

$C_{43}H_{39}N_3O_8S$ $MW=757,85g.mol^{-1}$



Méthode A

66,3mg (1éq., 0,1mmol) de glutathion S-trityle (composé **<u>22</u>**) sont dissous dans 210µl d'eau distillée ainsi que 70µl (5éq., 0,5mmol) de triéthylamine. Après 10 minutes sous agitation, 38,8mg (1,2 éq., 0,12mmol) de composé **<u>23</u>** ainsi que 280µl d'acétonitrile sont ajoutés. Après 24h à température ambiante, le milieu est concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris deux fois à l'éther à chaud. Après élimination de l'éther, le produit est dissout dans un minimum d'eau qui est ensuite acidifiée avec HCl 1N jusqu'à l'obtention d'un pH acide. Le précipité formé est extrait à l'acétate d'éthyle (15ml). La phase organique est alors séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous pression réduite. Le produit est repris dans l'éther à chaud. Rdt : 88%

Méthode B

A 81mg (1éq., 0,12mmol) de glutathion S-trityle (composé **<u>22</u>**) dissous dans 2ml d'une solution d'hydrogénocarbonate à 10% sont ajoutés, après 1h d'agitation à température ambiante, 41,4mg (1,2éq., 0,144mmol) de 1-[(4-benzoylbenzoyl)oxy]-2,5-pyrrolidinedione (composé **<u>23</u>**) et 2ml d'acétone. Le milieu réactionnel est agité pendant 12h à température

ambiante. L'acétone est évaporée sous pression réduite. La phase aqueuse est acidifiée avec de l'acide chlorhydrique 1N jusqu'à l'obtention d'un pH=5 puis extraite à l'acétate d'éthyle (15ml). Après un lavage avec une solution saturée de chlorure de sodium, la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris dans l'éther à chaud puis filtré sur Büchner. Rdt : 54 %

Aspect : solide incolore

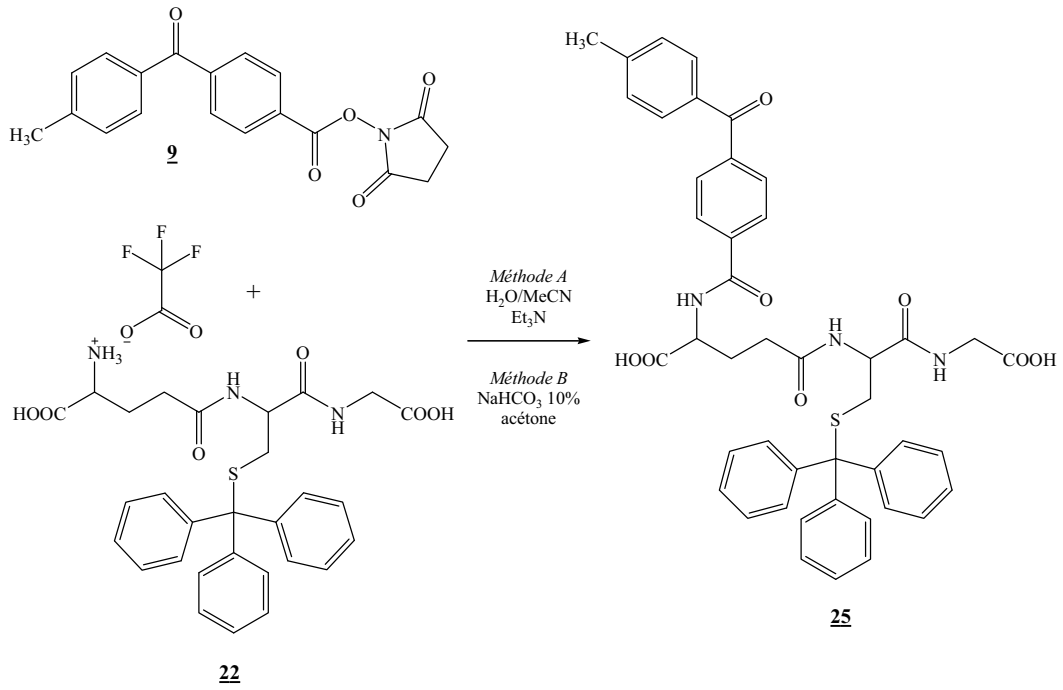
Pf : 156-159°C

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 8,00 (d, 2H, J=8,1Hz); 7,83-7,76 (m, 4H); 7,67-7,64 (m, 1H); 7,53 (t, 2H, J=7,8Hz); 7,41-7,36 (m, 6H); 7,29-7,16 (m, 9H); 4,66-4,61 (m, 1H, $H_{\alpha Cys}$); 4,29-4,24 (m, 1H, $H_{\alpha Glu}$); 3,81 (d, 2H, J=2,2Hz, $H_{\alpha Gly}$); 2,67-2,56 (m, 2H, $H_{\beta Cys}$); 2,54-2,43 (m, 2H, $H_{\beta 2Glu}$); 2,43-2,26 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$); 2,26-2,00 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$).

RMN ^{13}C (MeOD-d_4) δ : 197,7 (C=O); 174,9 (C=O); 174,8 (2C=O); 172,7 (C=O); 172,5 (C=O); 169,1 (C=O); 145,9 (3C); 141,5; 138,7; 138,4; 134,1; 131,0 (2C); 130,9 (2C); 130,7 (6C); 129,6 (3C); 129,0 (6C); 128,7 (2C); 127,9 (2C); 68,0 (CPh_3); 53,9 ($C_{\alpha cys}$); 53,6 ($C_{\alpha Glu}$); 41,8 ($C_{\alpha Gly}$); 34,7 ($C_{\beta cys}$); 33,1 ($C_{\beta 2Glu}$); 27,9 ($C_{\beta 1Glu}$).

N^5-{2-[(Carboxyméthyl)amino]-2-oxo-1-[(tritylsulfanyl)méthyl]éthyl}-N^2-[4-(4-méthylbenzoyl)benzoyl]glutamine (<u>25</u>)

$C_{44}H_{41}N_3O_8S$ *MW=771,88g.mol^{-1}*



Méthode A

A 49,4mg (1éq., 0,09mmol) de glutathion S-trityle (composé **<u>22</u>**) dissous dans un mélange eau distillée (550µl)/acétonitrile (1,5ml) sont ajouté 37,6µl (3éq., 0,27mmol) de triéthylamine et 32mg (1,1éq., 0,099mmol) de 1-[(4-benzoylbenzoyl)oxy]-2,5-pyrrolidinedione (composé **<u>9</u>**). Le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris dans un minimum d'eau. La phase aqueuse est ensuite acidifiée avec de l'acide chlorhydrique 1N jusqu'à pH 7. Une fois ce pH atteint, la phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (2x10ml). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium puis concentrées sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris dans l'éther à chaud puis filtré sur Büchner. Rdt : 78%

Méthode B

A 81mg (1éq., 0,12mmol) de glutathion S-trityle (composé **<u>22</u>**) dissous dans 2ml d'une solution d'hydrogénocarbonate à 10% sont ajoutés, après 1h d'agitation à température ambiante, 48,6mg (1,2éq., 0,144mmol) de 1-{[4-(4-méhylbenzoyl)benzoyl]oxy}-2,5-pyrrolidinedione (composé **<u>9</u>**) et 2ml d'acétone. Le milieu réactionnel est agité pendant 12h à

température ambiante. L'acétone est évaporée sous pression réduite. La phase aqueuse est acidifiée avec de l'acide chlorhydrique 1N jusqu'à l'obtention d'un pH=7 puis extraite à l'acétate d'éthyle (15ml). Après un lavage avec une solution saturée de chlorure de sodium, la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris dans l'éther à chaud puis filtré sur Büchner. Rdt : 70 %

Aspect : solide beige

Pf : 124-126°C

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 7,88 (d, 2H, J=8,4Hz); 7,68 (d, 2H, J=8,4Hz); 7,58 (d, 2H, J=8,2Hz); 7,30-7,23 (m, 8H); 7,20-7,05 (m, 9H); 4,53 (m, 1H, $H_{\alpha Cys}$); 4,15 (m, 1H, $H_{\alpha Glu}$); 3,71 (d, 2H, J=2,2Hz, $H_{\alpha Gly}$); 2,57-2,44 (m, 2H, $H_{\beta Cys}$); 2,39-2,33 (m, 5H, $H_{\beta 2Glu}$+ C*H*$_3$); 2,30-2,20 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$); 2,10-1,95 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$).

RMN ^{13}C (MeOD-d_4) δ : 197,7 (C=O); 174,9 (C=O); 174,8 (C=O); 172,9 (C=O); 172,5 (C=O); 169,4 (C=O); 145,9 (3C); 145,6; 141,9; 138,5; 135,7; 131,3 (2C); 130,8 (2C); 130,7 (6C); 130,3 (3C); 129,0 (6C); 128,6 (2C); 127,9 (2C); 68,0 (CPh_3); 54,1 ($C_{\alpha Cys}$); 53,7 ($C_{\alpha Glu}$); 41,8 ($C_{\alpha Gly}$); 34,7 ($C_{\beta cys}$); 33,0 ($C_{\beta 2Glu}$); 27,9 ($C_{\beta 1Glu}$); 21,7 (CH_3).

MALDI : *Mode positif* 794,135 $[M+Na]^+$; 810,109 $[M+K]^+$; *Mode négatif* 770,270 $[M-H]^-$.

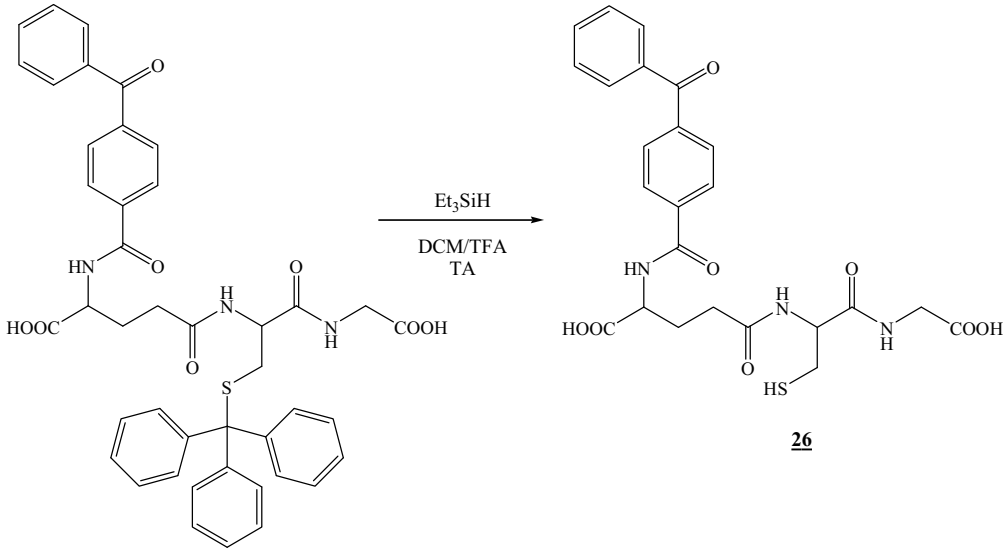
Déprotection de la fonction thiol

Mode opératoire général

A 15mg (1éq., 0,02mmol) de composé **24** ou 15,4mg (1éq., 0,02mmol) de composé **25** dissous dans 1,5ml d'un mélange dichlorométhane/acide trifluoroacétique (2:1) sont ajoutés 6,4µl (2éq., 0,04mmol) de triéthylsilane. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 1h45 puis concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris dans l'éther à chaud.

N^2-(4-Benzoylbenzoyl)-N^5-[2-[(carboxyméthyl)amino]-2-oxo-1-(sulfanylméthyl)éthyl]glutamine (26)

$C_{24}H_{25}N_3O_8S$ *MW=515,54g.mol^{-1}*



24 **26**

Aspect : solide beige

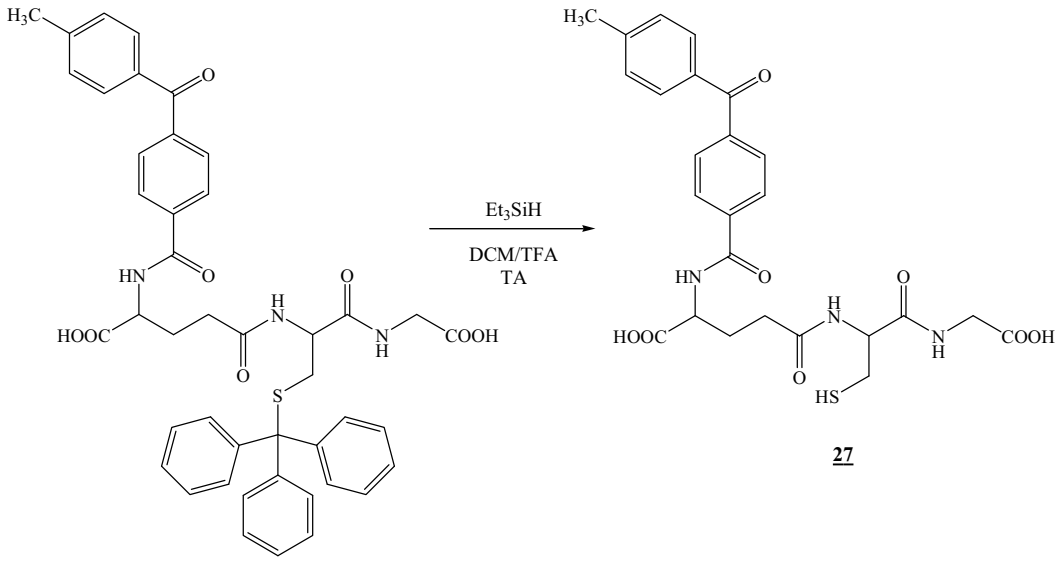
Rdt : 83%

Pf : 116°C (déc.)

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 8,02 (d, 2H, J=8,2Hz); 7,84 (d, 2H, J=8,2Hz); 7,79 (d, 2H, J=8,2Hz); 7,71-7,64 (m, 1H); 7,58-7,52 (m, 2H); 4,67-4,62 (m, 1H, $H_{\alpha Cys}$); 4,60-4,54 (m, 1H, $H_{\alpha Glu}$); 3,89 (d, 2H, J=3,3Hz, $H_{\alpha Gly}$); 2,86 (t, 2H, J=6,8Hz, $H_{\beta Cys}$); 2,53 (t, 2H, J=6,8Hz, $H_{\beta 2Glu}$); 2,45-2,24 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$); 2,22-2,05 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$).

N^5-[2-[(Carboxyméthyl)amino]-2-oxo-1-(sulfanylméthyl)éthyl]-N^2-[4-(4-méthylbenzoyl)benzoyl]glutamine (<u>27</u>)

$C_{25}H_{27}N_3O_8S$ *MW=529,56g.mol^{-1}*



<u>25</u> <u>27</u>

Aspect : solide incolore

Rdt : 68%

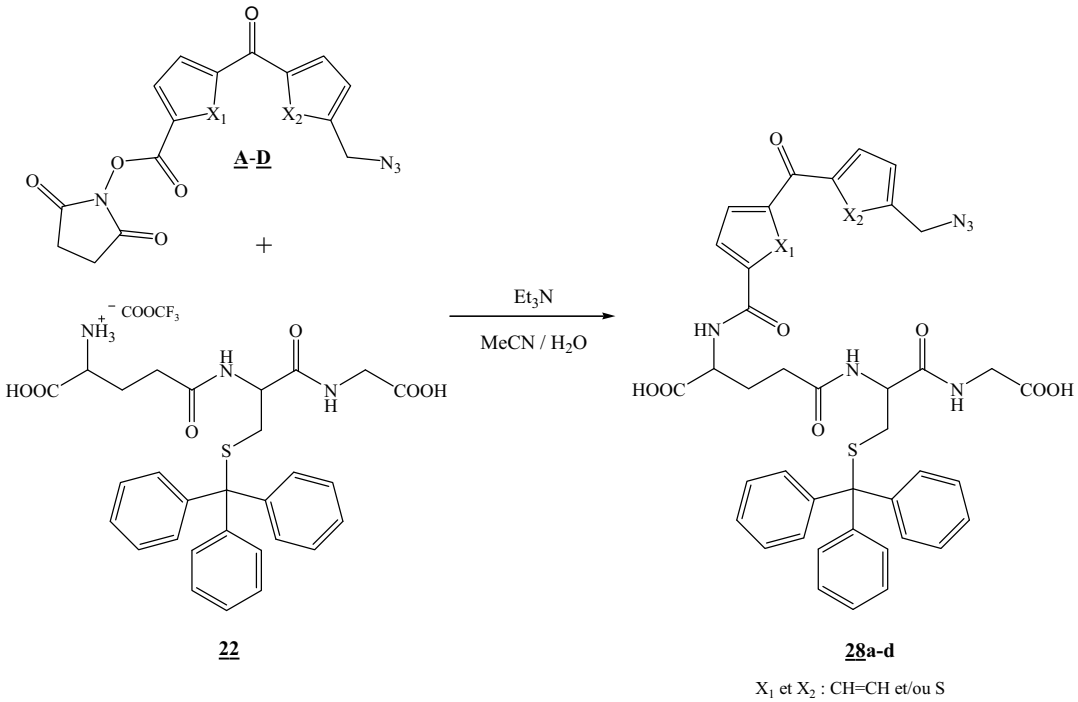
Pf : 156°C (début décarboxylation)

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ: 8,02 (d, 2H, J=8,2Hz); 7,82 (d, 2H, J=8,2Hz); 7,71 (d, 2H, J=8,2Hz); 7,37 (d, 2H, J=8,2Hz); 4,67-4,56 (m, 2H, $H_{\alpha Cys}$ + $H_{\alpha Glu}$); 3,90-3,88 (m, 2H, $H_{\alpha Gly}$); 2,90-2,84 (m, 2H, $H_{\beta Cys}$); 2,55-2,50 (m, 2H, $H_{\beta 2Glu}$), 2,45 (s, 3H, CH_3); 2,40-2,28 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$); 2,22-2,10 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$).

RMN ^{13}C (MeOD-d_4) δ: 197,5 (C=O); 175,2 (C=O); 174,9 (C=O); 172,9 (C=O); 172,7 (C=O); 169,4 (C=O); 145,5; 141,9; 138,5; 135,6; 131,3 (2C); 130,8 (2C); 130,3 (2C); 128,6 (2C); 56,9 ($C_{\alpha Cys}$); 54,0 ($C_{\alpha Glu}$); 41,8 ($C_{\alpha Gly}$); 33,1 ($C_{\beta 2Glu}$); 27,9 ($C_{\beta 1Glu}$); 27,0 ($C_{\beta cys}$); 21,6 (CH_3).

Réalisation du couplage avec les molécules cibles (A-D)

Couplage sur l'amine libre du glutation S-trytile



Mode opératoire général

A 1éq. de glutathion S-trityle (composé **22** obtenu avec la méthode B) dissous dans un mélange eau distillée / acétonitrile (1:3) sont ajoutés 3éq. de triéthylamine et 1,1éq. d'ester activé (composés **A-D**). Le mélange réactionnel est agité pendant 24h à température ambiante puis concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris à l'éther à chaud puis dissous dans un minimum d'eau. La phase aqueuse est alors acidifiée avec HCl 1N jusqu'à précipitation. Le produit est extrait à l'acétate d'éthyle (2x15ml). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium puis concentrées sous pression réduite. Le produit obtenu est repris dans l'éther à chaud.

N^2-{4-[4-Azidométhyl)benzoyl]benzoyl}-N^5-{2-[(carboxyméthyl)amino]-2-oxo-1-[(tritylsulfanyl)méthyl]éthyl}glutamine (28a)

$C_{44}H_{40}N_6O_8S$ *MW=812,89g.mol^{-1}*

Produit de départ : X_1=X_2 : CH=CH

Aspect : solide jaune clair

Rdt : 74%

Pf : 112°C (déc.)

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 8,07 (d, 2H, J=8,4Hz); 7,71 (d, 2H, J=8,4Hz); 7,70 (d, 2H, J=8,2Hz); 7,43(d, 2H, J=8,2Hz); 7,31-7,27 (m, 6H); 7,21-7,09 (m, 9H); 4,56-4,50 (m, 1H, $H_{\alpha Cys}$); 4,42 (s, 2H, CH_2N_3); 4,19-4,14 (m, 1H, $H_{\alpha Glu}$); 3,71 (d, 2H, J=2,4Hz, $H_{\alpha Gly}$); 2,57-2,44 (m, 2H, $H_{\beta Cys}$); 2,41-2,33 (m, 2H, $H_{\beta 2Glu}$); 2,28-2,12 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$); 2,10-1,95 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$).

RMN ^{13}C (MeOD-d_4) δ : 197,1 (C=O); 174,9 (2C=O); 172,6 (2C=O); 169,2 (C=O); 146,0 (3C); 145,3; 142,6; 141,4; 138,7; 138,0; 131,5 (2C); 130,9 (2C); 130,7 (6C); 129,3 (2C); 129,0 (6C); 128,7; 127,9 (3C); 68,0 (CPh_3); 55,0 ($C_{\alpha cys}$); 53,8 (CH_2N_3); 41,8 ($C_{\alpha Glu}$); 34,7 ($C_{\alpha Gly}$); 33,1 ($C_{\beta cys}$); 33,0 ($C_{\beta 2Glu}$); 27,9 ($C_{\beta 1Glu}$).

N^2-(4-{[5-(Azidomethyl)-2-thiényl]carbonyl}benzoyl)-N^5-{2-[(carboxyméthyl) amino]-2-oxo-1-[(tritylsulfanyl)méthyl]éthyl}glutamine (28b)

$C_{42}H_{38}N_6O_8S_2$ *MW=818,92g.mol^{-1}*

Produit de départ : X_1 : CH=CH et X_2 : S

Aspect : solide jaune

Rdt : 69%

Pf : 125-129°C (déc.)

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 8,01 (d, 2H, J=8,0Hz); 7,88 (d, 2H, J=8,0Hz); 7,58 (d, 1H, J=3,2Hz); 7,40-7,37 (m, 6H); 7,30-7,16 (m, 10H); 4,67 (s, 2H, CH_2N_3); 4,67-4,62 (m, 1H, $H_{\alpha Cys}$); 4,29-4,24 (m, 1H, $H_{\alpha Glu}$); 3,81 (d, 2H, J=3,0Hz, $H_{\alpha Gly}$); 2,62-2,54 (m, 2H, $H_{\beta Cys}$); 2,51-2,49 (m, 2H, $H_{\beta 2Glu}$); 2,46-2,30 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$); 2,21-2,08 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$).

RMN ^{13}C (MeOD-d_4) δ : 189,2 (C=O); 175,2 (2C=O); 172,7 (2C=O); 169,4 (C=O); 150,1; 145,9 (3C); 144,6; 141,7; 138,8; 137,2; 130,7 (6C); 130,2 (2C); 129,1; 129,0 (6C); 128,9

(2C); 127,9 (3C); 68,2 (CPh_3); 54,0 (CH_2N_3+ $C_{\alpha cys}$); 42,1 ($C_{\alpha Glu}$); 34,9 ($C_{\alpha Gly}$); 33,3 ($C_{\beta cys}$); 28,1 ($C_{\beta 2Glu}$); 24,4 ($C_{\beta 1Glu}$).

N^2-({5-[4-(Azidométhyl)benzoyl]-2-thiényl}carbonyl)-N^5-{2-[(carboxyméthyl)amino]-2-oxo-1-[(tritylsulfanyl)méthyl]éthyl}glutamine (<u>28</u>c)

$C_{42}H_{38}N_6O_8S_2$ *MW=818,92g.mol^{-1}*

Produit de départ : X_1 : S et X_2 : CH=CH

Aspect : solide jaune pâle

Rdt : 83%

Pf : 101°C (déc.)

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 7,87 (d, 2H, J=8,2Hz); 7,80 (d, 1H, J=4,0Hz); 7,64 (d, 1H, J=4,0Hz); 7,53 (d, 2H, J=8,2Hz); 7,40-7,37 (m, 6H); 7,31-7,16 (m, 9H); 4,60-4,55 (m, 1H, $H_{\alpha Cys}$); 4,52 (s, 2H, C*H_2*N_3); 4,29-4,24 (m, 1H, $H_{\alpha Glu}$); 3,82 (d, 2H, J=2,1Hz, $H_{\alpha Gly}$); 2,64-2,56 (m, 2H, $H_{\beta Cys}$); 2,51-2,44 (m, 2H, $H_{\beta 2Glu}$); 2,42-2,27 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$); 2,20-2,03 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$).

RMN ^{13}C (Acétone-d_6) δ : 188,1 (C=O); 173,6 (C=O); 173,1 (C=O); 171,0 (C=O); 170,9 (C=O); 161,8 (C=O); 147,4; 146,8; 145,6 (3C); 141,9; 138,1; 135,7; 130,5 (2C); 130,4 (6C); 129,3; 129,2 (2C); 128,8 (6C); 127,6 (3C); 67,3 (CPh_3); 54,5 ($CH_2N_{3+}C_{\alpha cys}$); 41,4 ($C_{\alpha Glu}$); 34,5 ($C_{\alpha Gly}$); 32,7 ($C_{\beta cys}$); 27,4 ($C_{\beta 2Glu}$); 26,1 ($C_{\beta 1Glu}$).

N^2-[(5-{[5-(Azidométhyl)-2-thiényl]carbonyl}-2-thiényl)carbonyl]-N^5-{2-[(carboxyméthyl)amino]-2-oxo-1-[(tritylsulfanyl)méthyl]éthyl}glutamine (<u>28</u>d)

$C_{40}H_{36}N_6O_8S_3$ *MW=824,95g.mol^{-1}*

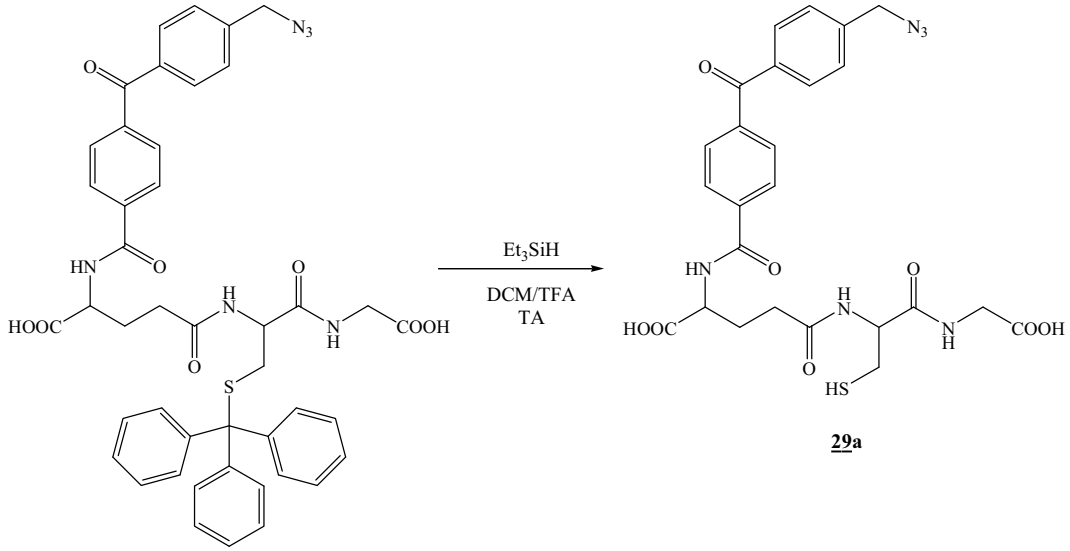
Produit de départ : X_1=X_2 : S

Aspect : solide jaune

Rdt : 56%

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 7,93 (d, 1H, J=3,9Hz); 7,83 (d, 1H, J=3,9Hz); 7,43-7,34 (m, 7H); 7,32-7,15 (m, 10H); 4,68 (s, 2H, C*H_2*N_3); 4,51-4,40 (m, 1H, $H_{\alpha Cys}$); 4,29-4,17 (m, 1H, $H_{\alpha Glu}$); 3,71-3,58 (m, 2H, $H_{\alpha Gly}$); 2,68-2,54 (m, 2H, $H_{\beta Cys}$); 2,44-2,36 (m, 2H, $H_{\beta 2Glu}$); 2,35-2,20 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$); 2,19-2,04 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$).

Déprotection de la fonction thiol



28a **29a**

Mode opératoire général

A 1éq. de glutathion N-acyle S-trityle (composé **28a-d**) dissous dans 3ml d'un mélange dichlorométhane / acide trifluoroacétique (2:1) sont ajoutés 2éq. de triéthylsilane. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 1h45 puis concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris dans l'éther à chaud.

N^2-{4-[4-(azidomethyl)benzoyl]benzoyl}-N^5-[2-[(carboxymethyl)amino]-2-oxo-1-(sulfanylmethyl)ethyl]glutamine (29a)

$C_{25}H_{26}N_6O_8S$ *MW=570,58g.mol^{-1}*

Aspect : solide beige

Rdt : 91%

Pf : 97-103°C (déc.)

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 8,02 (d, 2H, J=8,2Hz); 7,88-7,81 (m, 4H); 7,53 (d, 2H, J=8,2Hz); 4,67-4,62 (m, 1H, $H_{\alpha Cys}$); 4,59-4,55 (m, 1H, $H_{\alpha Glu}$); 4,52 (s, 2H, CH_2N_3); 3,89 (d, 2H, J=3,3Hz, $H_{\alpha Gly}$); 2,89-2,84 (m, 2H, $H_{\beta Cys}$); 2,56-2,50 (m, 2H, $H_{\beta 2Glu}$); 2,38-2,33 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$); 2,21-2,13 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$).

RMN ^{13}C (MeOD-d_4) δ : 197,1 (C=O); 175,1 (2C=O); 172,9 (2C=O); 169,3 (C=O); 142,6; 141,4; 138,0; 131,6 (2C); 131,0; 130,9 (2C); 130,5; 129,3; 129,2 (2C); 128,7 (2C); 127,3; 56,9 ($C_{\alpha cys}$); 55,0 ($C_{\alpha Glu}$); 54,0 (CH_2N_3); 41,8 ($C_{\alpha Gly}$); 33,1 ($C_{\beta 2Glu}$); 28,0 ($C_{\beta 1Glu}$); 27,0 ($C_{\beta cys}$).

Chapitre VI :

Méthode de détection

Chapitre VI : Méthode de détection

Comme nous l'avons vu dans le chapitre II, la fonction azoture introduite sur nos molécules cibles a pour but de permettre la détection et l'identification des protéines d'intérêt (protéines possédant une affinité pour le glutathion). Depuis de nombreuses années, l'utilisation des azotures s'est limitée, le plus souvent, à l'introduction d'un groupement amino sur une molécule organique. Ce n'est que très récemment que les azotures ont été exploités autrement. Le groupe de Bertozzi est l'un des premiers à utiliser les propriétés bioorthogonales des azotures et à les introduire sur des molécules à des fins biologiques : on parlera des ligations de Staudinger. Dans la même période, Sharpless *et al.* introduisent la notion de "Click Chemistry". Cette technique permet de synthétiser des composés variés en formant une liaison carbone-azote *via* un 1,2,3-triazole, lors d'une cyclisation 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne terminal.

Après photomarquage des protéines par irradiations UV, ces dernières doivent pouvoir être identifiables. Cependant, toutes les protéines ne possèdent pas forcément une affinité pour le glutathion et donc ne se fixent pas systématiquement à notre sonde. Dans le but de séparer les différentes protéines puis par la suite de les identifier, une électrophorèse est réalisée. Son principe est décrit sur le Schéma 26.

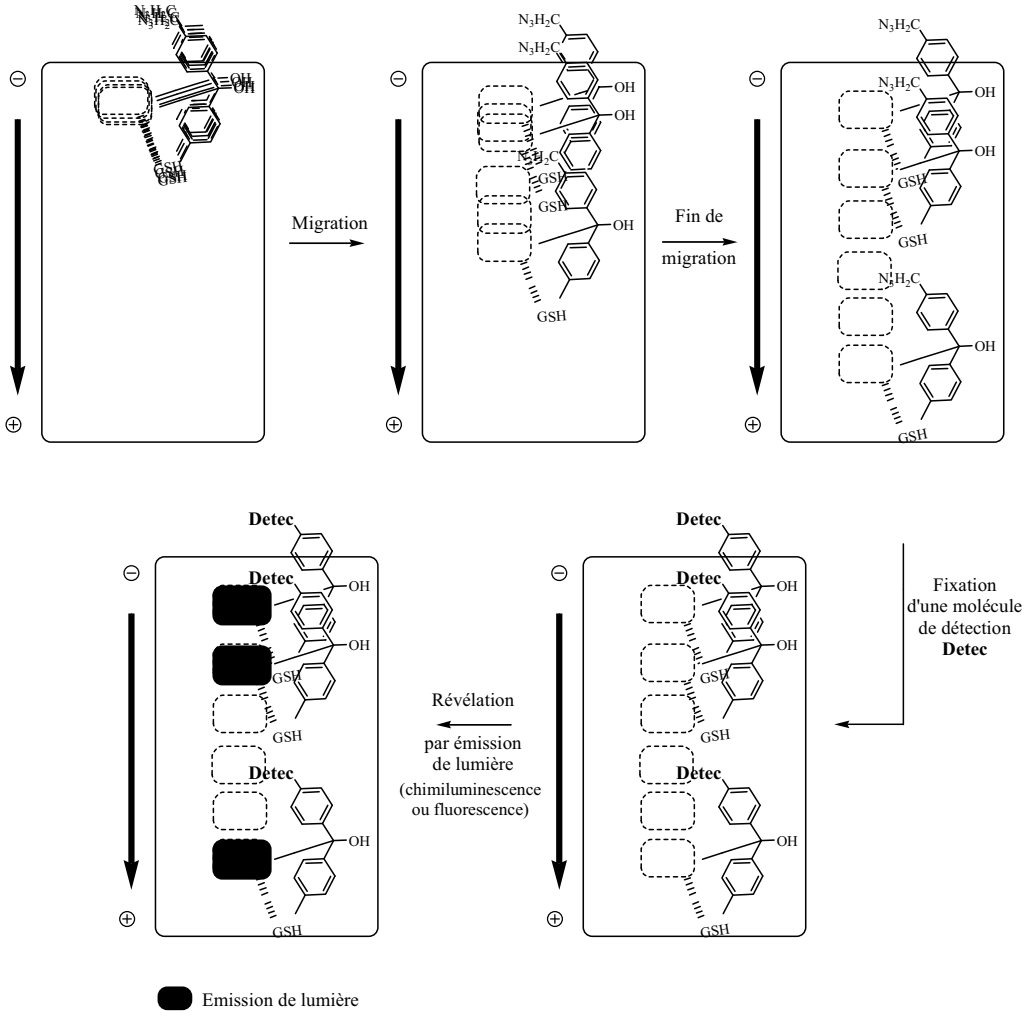


Schéma 26 : Schéma simplifiée de la séparation et la détection sélective des protéines

Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide est effectuée pour séparer les protéines. Après avoir déposé le mélange de protéines photomarquées sur le gel, on applique un courant électrique. Les protéines chargées négativement, grâce à la présence du dodécyle sulfate de sodium, vont migrer différemment sur le gel suivant leur charge mais également suivant leur poids moléculaire. Une fois la migration terminée, il y a introduction d'une molécule de détection (que l'on notera ici **Détec**) qui va réagir de façon sélective avec notre fonction azoture présente sur la sonde. Seules les protéines marquées possèdent cette fonction, elles vont donc pouvoir réagir et être détectées par émission de lumière.

Dans ce chapitre, nous aborderons deux phénomènes physiques qui font partie des phénomènes de luminescence : l'émission de lumière ultraviolette, visible ou infrarouge. La luminescence est un phénomène par lequel certaines molécules portées à un état excité

retournent à l'état fondamental en restituant une partie de l'énergie sous forme de lumière. Il existe différents types de luminescence.

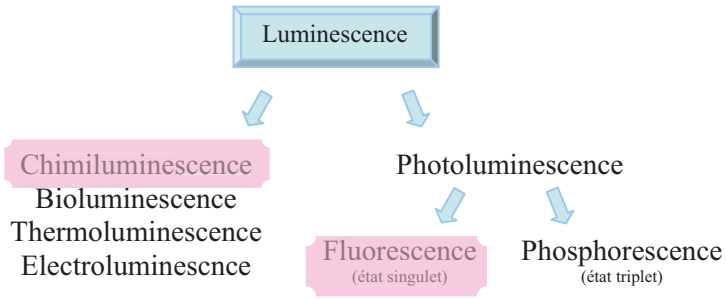


Figure 1 : Les différents phénomènes de luminescence

Selon la source d'énergie impliquée dans le processus d'excitation, le type de phénomène de luminescence change. Dans les paragraphes suivants, nous verrons le cas de la **chimiluminescence**, où l'émission de lumière est due à une réaction chimique et celui de la **fluorescence**, où l'émission est due à une excitation par irradiation UV, visible ou proche infrarouge.

1. Détection par Chimiluminescence

1.1. Qu'est ce que la chimiluminescence ?

Le passage d'une molécule de son état fondamental à un état excité nécessite de l'énergie. Cette énergie fournie est restituée en partie sous forme d'émission de lumière lorsque cette molécule excitée retourne à son état fondamental. Lorsque l'énergie qui permet à cette molécule d'atteindre un état excité provient d'une réaction chimique, on parle de chimiluminescence. C'est ce qui se produit lorsque le luminol est mis en présence d'un peroxyde (peroxyde d'hydrogène).

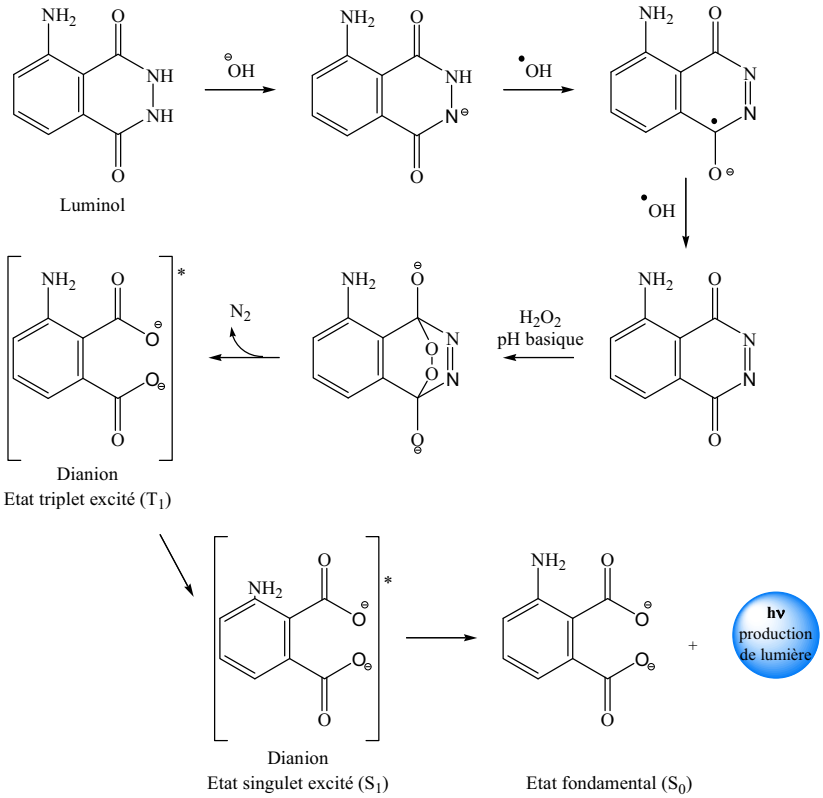


Schéma 27 : Réaction du luminol en présence de peroxyde d'hydrogène

En milieu alcalin, l'oxydation du 5-amino-2,3-dihydrophtalazine-1,4-dione (luminol)[119] conduit à une émission de lumière.[120] L'agent oxydant le plus utilisé est le peroxyde d'hydrogène. Cette réaction peut être catalysée par la peroxydase de raifort. Ainsi toute molécule marquée par une peroxydase pourra être détectée grâce à cette réaction de chimiluminescence.

La peroxydase est donc utilisée pour catalyser l'oxydation d'une molécule (le luminol dans ce cas) en présence de péroxyde. La molécule oxydée passe d'un état excité à un état plus stable en émettant des photons qui peuvent être détectés soit par radiographie soit à l'aide d'un luminomètre.

[119] Albrecht, H.O. *Z. Phys. Chem.* **1928**, *135*, 321-330.
[120] White, E.H.; Zafiriou, O.; Kägi, H.H.; Hill, J.H.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 940-941.

1.2. Utilisation de l'affinité biotine-streptavidine

La biotine possède une affinité élevée pour la streptavidine, une glycoprotéine tétramérique dont le poids moléculaire est de 60 000Da. La streptavidine est capable de fixer quatre molécules de biotine de manière spécifique. De plus, un complexe streptavidine-peroxydase est commercial. Or, nous venons de voir que la peroxydase servait de catalyseur lors de la réaction avec le luminol. La lumière ainsi produite rend possible la détection des protéines photomarquées suivant la position de la tache sur le gel d'électrophorèse. (cf. Schéma 26)

Il serait donc très intéressant de pouvoir introduire la biotine sur nos sondes.
Pour cela, deux réactions que nous avons évoquées dans l'introduction de ce chapitre peuvent être envisagées. En effet, la présence de la fonction azoture permet d'introduire la biotine par ligation de Staudinger ou en utilisant la Click Chemistry.

Nous avons donc envisagé et étudié ces deux méthodes.

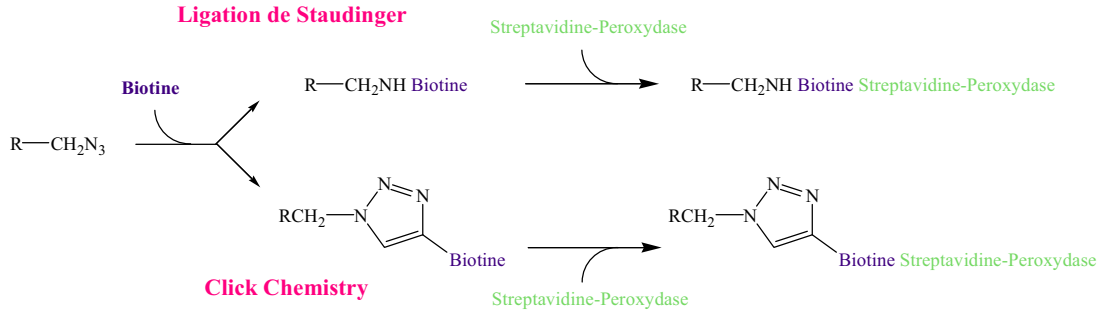


Schéma 28 : Méthodes envisagées pour l'introduction de la biotine

Les deux prochains paragraphes exposent le principe de la ligation de Staudinger ainsi que celui de la réaction de Click Chemistry. Leur mise en œuvre y est également détaillée.

1.3. Ligation de Staudinger

Depuis ces dernières années, le nombre de travaux utilisant ou modifiant la réaction de Staudinger se multiplie. Elle est utilisée dans de nombreux domaines mais avant de voir ceci en détail, une récente publication de Mülhaupt[121] nécessite une petite parenthèse historique.

1.3.1. Qu'est ce que la ligation de Staudinger ?

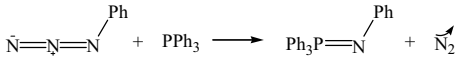
1.3.1.1. Historique

A travers son article, Mülhaupt nous entraîne dans la vie de Hermann Staudinger. La ligation appelée "Ligation de Staudinger" porte le nom du chercheur qui l'a découverte en 1919.
Hermann Staudinger est né en 1881 à Worms en Allemagne. Il étudie la botanique puis est attiré par la chimie dans le laboratoire de Volhard. En 1903, il obtient son PhD et devient assistant avec J. Thiele à l'Université de Strasbourg. Deux ans plus tard, il découvre les cétènes comme étant une nouvelle catégorie de composés organiques. Ses recherches sur les petites molécules en chimie organique lui valent une renommée internationale. Il succèdera à Richard Willstätter à Zurich en 1912, où il découvrira de nouveaux composés dont les phosphazènes, issus d'une réaction entre des phosphines tertiaires et des composés diazo, mais également des azotures. Cette dernière réaction est connue sous le nom de réaction de Staudinger. Il fera bien d'autres découvertes, comme par exemple le poivre de synthèse pendant la première guerre mondiale, ainsi que l'arôme artificiel de café.[122] Dans les années 1920, Staudinger oriente et concentre ses recherches sur les composés macromoléculaires et les polymères. Il fonde quelques années plus tard le premier journal sur les macromolécules, le "Journal für Makromolekular Chemie". Douze ans avant sa mort, en 1965, il recevra à Stockholm le prix Nobel de Chimie pour ses recherches sur les macromolécules. Bon nombre de ses travaux ont conduit à des brevets.

[121] Mülhaupt, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1054-1063.
[122] Ringsdorf, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1064-1076.

1.3.1.2. Principe et mécanisme

Comme nous l'avons vu, cette réaction de Staudinger a été découverte en 1919.[123] Cette réaction consiste à faire réagir un azoture et une triarylphosphine pour former un iminophosphorane.



Le mécanisme est élucidé quelques années plus tard.

Cette réaction se fait en trois étapes. La première est une attaque nucléophile du phosphore sur l'azoture pour former un phosphazoture. Ce sont des composés stables dans les solvants organiques entre 0 et 20°C mais qui dégagent de l'azote lorsqu'on les chauffe entre 50 et 150°C. Après cette perte d'azote, il y a formation d'un aza-ylure intermédiaire. En présence d'eau, cet intermédiaire s'hydrolyse spontanément pour donner l'amine primaire correspondante et l'oxyde de phosphine.

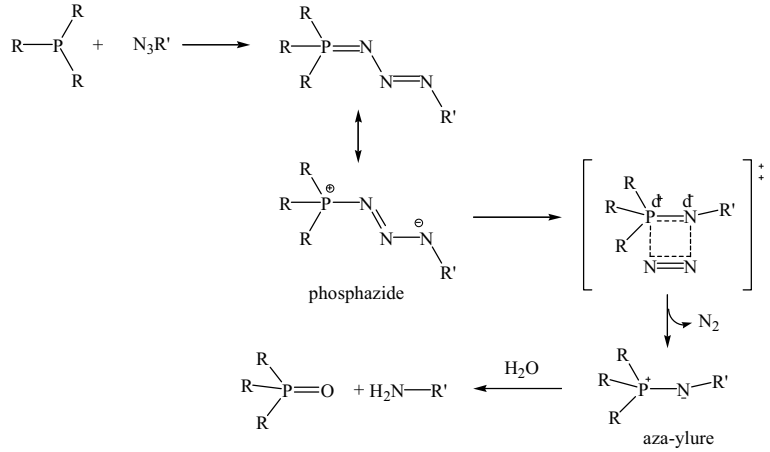


Schéma 29 : Mécanisme de la réaction de Staudinger entre une phosphine tertiaire et un azoture

De nombreux phosphazotures intermédiaires ont pu être isolés et caractérisés par rayons X. La chaîne PN_3C est presque plane et a une configuration E.[124]

La vitesse de formation du phosphazoture est contrôlée par les propriétés électroniques des groupements attachés à l'atome de phosphore et à l'azoture. Un groupement accepteur sur l'azoture facilite la réaction. De plus, cette réaction est limitée par la sensibilité de la phosphine à s'oxyder.

[123] Staudinger, H.; Meyer, J. *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635-646.
[124] Gololobov, Y.G.; Kasukhin, L.F. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1353-1406.

1.3.1.3. Évolution de la réaction

De nombreuses publications sur cette réaction ont suivi dont les principales sont celles de Köhn et de Gololobov.[125]

En 2000, Bertozzi *et al*. apportent les premières modifications : un des groupements phényles possède un ester méthylique en *ortho* de l'atome de phosphore. Ce dernier sert de piège électronique pour capter l'aza-ylure intermédiaire et former un cycle intramoléculaire comme le montre le schéma suivant. L'atome d'azote de l'aza-ylure réagit préférentiellement sur le carbonyle de l'ester.[126]

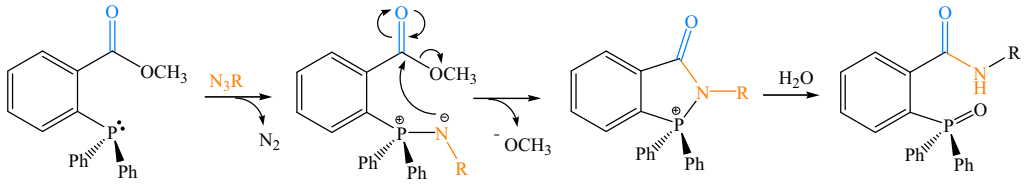


Schéma 30 : Mécanisme de la ligation de Staudinger utilisant le dérivé phosphoré que propose Bertozzi et al.

Des études sur le mécanisme[127] de cette réaction ont montré qu'elle s'effectue plus rapidement dans des solvants polaires protiques et que les propriétés électroniques de l'ester n'ont pas d'impact significatif sur la vitesse de réaction mais par contre en ont sur le rendement.

Ce type de phosphine a été synthétisé en 3 étapes :

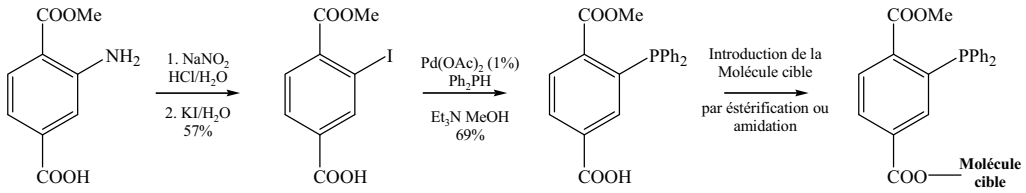


Schéma 31 : Voie de synthèse des dérivés phosphorés pour la ligation de Staudinger

[125] (a) Gololobov, Y.G.; Zhmurovo, I.N.; Kasukhin, L.F. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 437-472. (b) Köhn, M.; Breinbauer, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3106-3116.
[126] Saxon, E.; Bertozzi, C.R. *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
[127] Lin, F.L.; Hoyt, H.M.; van Halbeck, H.; Bergman, R.G.; Bertozzi, C.R. *J. Am. Chem. Soc*. **2005**, *127*, 2686-2695.

La première étape consiste à faire une diazotation de l'acide 4-(méthoxycarbonyl)-3-méthylbenzoique. Cette étape est suivie de l'introduction d'un atome d'iode puis de la fonction phosphine par couplage au palladium. L'acide libre présent sur cette molécule permet de fixer facilement une molécule d'intérêt par simple estérification ou amidation.
Grâce à une réaction de Staudinger, on peut fixer sur cette molécule différents types de motifs pour la détection (notamment un marqueur fluorescent ou un dérivé de biotine[128]).

L'élaboration de cette nouvelle phosphine a permis à Bertozzi de réaliser cette ligation en milieu cellulaire, car nous venons de le voir, l'aza-ylure formé s'hydrolyse spontanément en milieu aqueux.
Bertozzi, peu de temps après, va développer de nouvelles générations de phosphines. Ces dernières permettent d'éliminer l'oxyde de phosphine qui, dans le cas précédent, restait fixé à la molécule. On parlera de ligation "traceless".

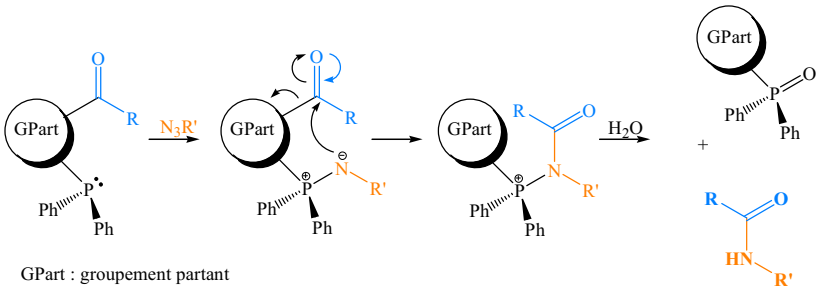


Schéma 32 Mécanisme de la ligation de Staudinger "traceless"

Comme pour la ligation standard, il y a formation d'une liaison amide, cependant la partie phosphorée n'est plus accrochée au composé. Le but de cette "nouvelle génération" de phosphine est d'éliminer l'oxyde de phosphine pendant l'étape d'hydrolyse. La phosphine est incorporée sur groupement partant et non plus sur le groupement acyle.
Les équipes de Raines *et al.*[129] et Bertozzi *et al.*[130] vont travailler indépendamment et de façon simultanée sur ce type de réaction "traceless" et vont développer de nouvelles phosphines.

[128] (a) Hashimoto, M.; Hatanaka, Y. *Chem. Pharm. Bull*. **2005**, *53*, 1510-1512. (b) Kho, Y.; Kim, S.C.; Jiang, C.; Barma, D.; Kwon, S.W.; Cheng, J.; Jaunbergs, J.; Weinbaum, C.; Tamanoi, F.; Falck, J.; Zhao,Y. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **2004**, *101*, 12479-12484.
[129] (a) Nilsson, B.L.; Kiesling, L.L.; Raines, R.T. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939-1941. (b) Nilsson, B.L.; Kiesling, L.L.; Raines, R.T. *Org. Lett*. **2001**, *3*, 9-12. (c) Soellner, M.B.; Nilsson, B.L.; Raines, R.T. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4993-4996.
[130] Saxon, E.;Armstrong, J.I.; Bertozzi, C.R. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141-2143.

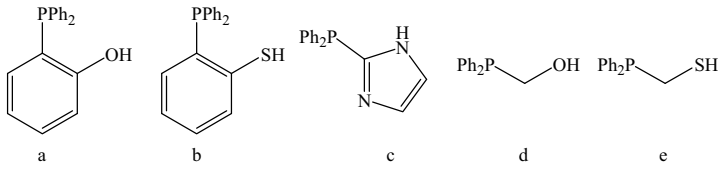


Figure 33 : Structures des phosphines utilisées pour la ligation "traceless"

Cependant il existe des limitations à cette méthode :

- il peut y avoir hydrolyse compétitive de l'iminophosphorane intermédiaire (cas de b et d)
- le composé c a besoin d'un long temps de réaction d'après Grandjean.[131] Bertozzi avait émis l'hypothèse qu'accroître la réaction du thioester envers l'attaque nucléophile pouvait rendre le composé b plus intéressant que le composé a. Les premiers résultats ne furent pas concluants, cependant l'utilisation de ce composé fut décrite par Raines *et al*. pour la synthèse peptidique.
- le composé e possède d'après Raines *et al*.[132] le meilleur profil pour la réactivité. Cependant ce composé doit être préparé juste avant d'être utilisé car il possède une stabilité limitée.

1.3.1.4. Applications

Cette ligation de Staudinger est une réaction compatible avec un grand nombre de groupements fonctionnels. C'est pour cette raison qu'elle a des applications variées en synthèse organique ainsi qu'en biochimie. Voici quelques applications courantes de cette réaction :

- préparation de composés glyco-conjugués[133]
- immobilisation de substrats sur des surfaces[134]

[131] Grandjean, C.; Boutonnier, A.; Guerreiro, C.; Fournier, J-M.; Mulard, L.A. *J. Org. Chem*. **2005**, *70*, 7123-7132.
[132] Soellner, M.B.; Nillson, B.L.; Raines, R.T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8820-8828.
[133] (a) Saxon, E.; Luchansky, S.J.; Hang, H.C.; Yu, C.; Lee, S.C.; Bertozzi, C.R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14893-14902. (b) Bianchi, A.; Bernardi, A. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2231-2234. (c) Bianchi, A.; Russo, A.; Bernardi, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 381-386. (d) Liu, L.; Hong, Z-Y.; Wong, C-H. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 429-432.
[134] (a) Köhn, M.; Wacker, R.; Peters, C.; Schröder, H.; Soulère, L.; Breinbauer, R.; Niemeyer, C.M.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5830-5834. (b) Soellner, M.B.; Dickson, K.A.; Nilsson, B.L.; Raines, R.T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11790-11791. (c) Watzke, A.; Köhn, M.; Gutierrez-Rodriguez, M.; Wacker, R.; Schröder, H.; Breinbauer, R.; Kuhnlmann, J.; Alexandrov, K.; Niemeyer, C.M.; Goody, R.S.; Waldmann, H.

- déclenchement sélectif de la libération d'un médicament[135]
- ligation peptidique[8a-b,136]
- marquage biologique[137] et visualisation de cibles biologiques[138]
- modification de protéines[139]

La ligation de Staudinger permet, *via* un dérivé phosphoré, de procéder à un couplage entre un composé possédant un groupement azoture et un second qui lui est fixé sur la phosphine, formant ainsi spécifiquement une liaison amide.

Nous avons donc mis en œuvre cette méthode pour coupler la biotine à notre sonde.

1.3.2. Mise en œuvre de la ligation de Staudinger : synthèse du dérivé phosphoré

Raines *et al*[132]. ont proposé une ligation qui permet de coupler un peptide avec un C-terminal comportant un phosphinothioester et un peptide avec un N-terminal possédant un groupement azoture. Pour cela, ils utilisent des phosphines thioesters comme le phosphinothiol ou l'*o*-phosphinobenzenethiol. Ce dernier leur a semblé être un bon choix, car il permet de former un cycle à 6 lors du transfert de l'acyle.

De plus, l'*o*-phosphinobenzenethiol permet de réaliser une ligation de Staudinger "traceless"; sa synthèse a donc été entreprise.

Angew. Chem. Int. Ed. **2006**, *45*, 1408-1412. (d) Kim, H.; Cho, J.K.; Aimoto, S.; Lee, Y-S. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1149-1151.

[135] Azoulay, M.; Tuffin, G.; Sallem, W.; Florent, J.C. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2006**, *16*, 3147-3149.

[136] (a) Merkx, R.; Rijkers, D.T.S.; Kemmink, J.; Liskamp, R.M.J. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4515-4518. (b) Nilsson, B.L.; Hondal, R.J.; Soellner, M.B.; Raines, R.T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5268-5269.

[137] (a) Wang, C.C-Y.; Seo, T.S.; Li. Z.; Ruparel, H.; Ju, J. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 697-701. (b) Lemieux, G.A.; de Graffenried, C.L.; Bertozzi, C.R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4708-4709. (c) Hang, H.C.; Yu, C.; Pratt, M.R.; Bertozzi, C.R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6-7. (d) Van Switen, P.F.; Leeuwenburgh, M.A.; Kessler, B.M. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 20-27.

[138] (a) Kiick, K.L.; Saxon, E.; Tirrell, D.A.; Bertozzi, C.R. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **2002**, *99*, 19-24. (b) Ovaa, H.; van Swieten, P.F.; Kessler, B.M.; Leeuwenburgli, M.A.; Fiebiger, E.; van den Nieuwendjk, A.M.C.H.; Galardy, P.J.; van der Marel, G.A.; Ploegh, H.L.; Overkleef, H.S. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2**003**, *42*, 3626-3629. (c) Volcadlo, D.J.; Hang, H.C.; Kim, E-J.; Hanover, J.A.; Bertozzi, C.R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 9116-9121.

[139] Tsao, M-L.; Jian, F.; Schultz, P.G. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2147-2149.

1.3.2.1. Utilisation de phosphinothiol

Le schéma ci-dessous représente le mécanisme proposé par Nilsson[129a] de la réaction de Staudinger pour réaliser un couplage peptidique.

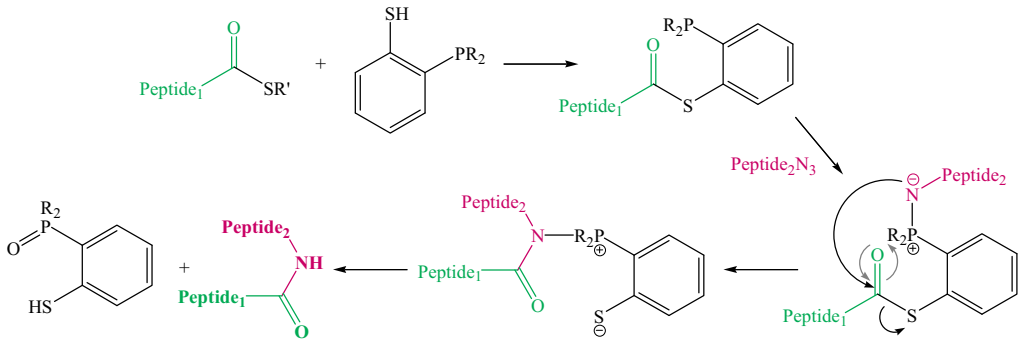


Schéma 33 : Ligation peptidique par la réaction de Staudinger

La première étape consiste en une transthioestérification avec un phosphinothiol. L'étape suivante est le couplage entre le phosphinoester et un peptide possédant une fonction azoture pour obtenir un iminophosphorane très réactif. L'azote de cet intermédiaire va réagir sur le carbonyle du thioester pour générer un sel d'aminophosphonium qui, après hydrolyse, conduit à l'amide voulu et à l'oxyde de la phosphine de départ.
Bertozzi *et al.* proposent une méthode de synthèse du dérivé diphénylphosphinethiophénol à partir du thiophénol.

Cette méthode peut être envisagée pour coupler nos molécules (structure bifonctionnelle, structure trifonctionnelle, structure trifonctionnelle couplée au glutathion) à la biotine permettant ainsi une détection par chimiluminescence.

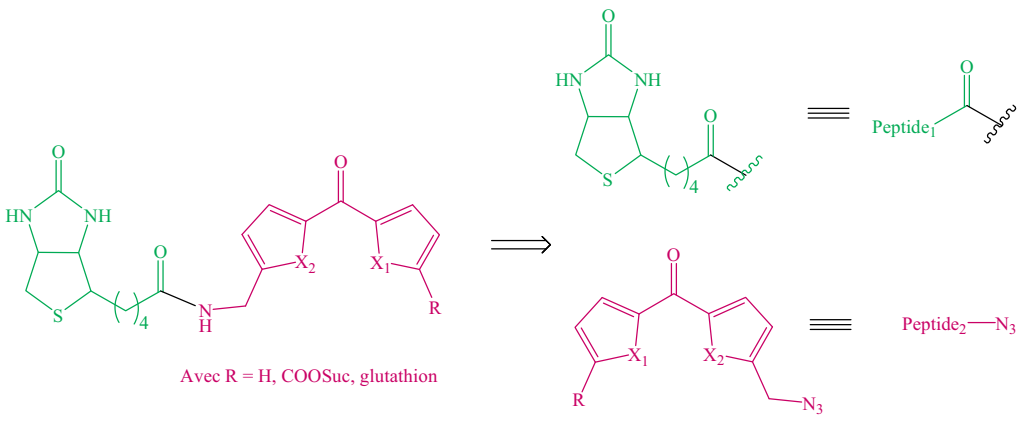
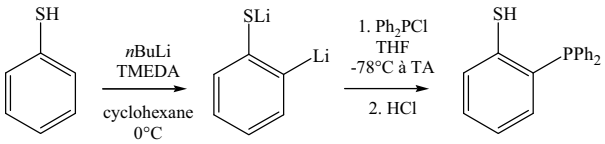


Figure 34 : Rétrosynthèse du couplage de la biotine sur les structures trifonctionnelles

1.3.2.2. Synthèse de l'o-diphénylphosphinebenzènethiol

La synthèse de ce composé a été décrite par Figuly[140] et Block[141] en 1989.



Après formation du lithien (le 2-lithiobenzenethiolate) par réaction du butyllithium et de *N,N,N',N'*-tétraméthyléthylènediamine sur le thiophénol, il y a introduction de la fonction phosphine sur la molécule par addition de chlorodiphénylphosphine. Un rendement de 65% a été obtenu par les auteurs.

Nous avons reproduit les conditions expérimentales décrites. Pour réaliser cette expérience, tous les solvants utilisés ont été dégazés et saturés à l'argon, évitant ainsi toute présence d'oxygène pouvant oxyder la phosphine désirée. Le 2-lithiobenzenethiolate de lithium a été formé à 0°C en présence de thiophénol, de *N,N,N',N'*-tétraméthylènediamine et de *n*-butyllithium, comme décrit dans la littérature. Une fois le solide formé, le solvant est éliminé puis lavé à l'heptane. Ce solvant est à son tour éliminé et le lithien est dissous dans du tétrahydrofurane préalablement refroidi à -78°C. A cette même température est ajoutée goutte à goutte, sur une durée de 20minutes, la chlorodiphénylphosphine. Après que le milieu soit revenu à température ambiante, la solution est acidifiée avec de l'acide sulfurique dilué et froid. Le solvant est alors évaporé et le résidu obtenu est lavé à l'eau et extrait à l'éther. D'après la littérature, la phosphine désirée est obtenue avec un rendement de 46%. Dans notre cas, différents produits ont été obtenus mais pas la phosphine attendue (RMN ^{31}P δ_p : -13,1ppm d'après la littérature). Dans un premier temps nous avons obtenu deux pics en RMN du phosphore, un pic à +31,1ppm qui correspond à l'oxyde de la phosphine attendue et un second à +41,3ppm qui correspond à l'oxyde de la chlorodiphénylphosphine.

Suite à ces résultats, différentes conditions opératoires ont été testées. Pour cela, nous avons fait varier l'ordre d'addition des réactifs, nous avons changé le solvant, le temps, nous avons fait varier l'ordre d'addition des réactifs ainsi que le temps d'addition de la chlorodiphénylphosphine. Toutes ces tentatives sont restées infructueuses. Cependant, dans

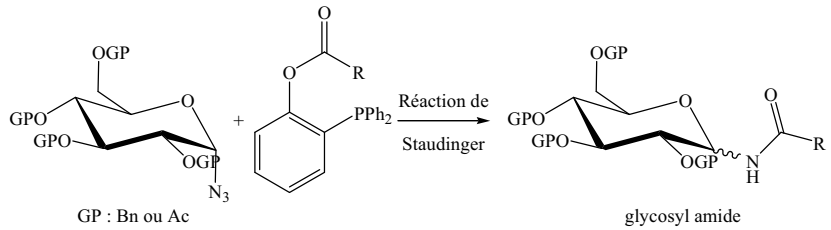
[140] Figuly, G.D.; Loop, C.K.; Martin, J.C. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 654-658.
[141] (a) Block, E.; Eswarakrishnan, V.; Gernon, M.; Ofori-Okai, G.; Saha, C.; Tang, K.; Zubieta, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 658-665. (b) Block, E.; Ofori-Okai, G.; Zubieta, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2327-2329.

tous les cas le pic à -31,1ppm est présent. Ceci peut s'expliquer par le fait que les dérivés phosphino-thiol sont souvent très instables à l'air.[142]

Ayant rencontré des difficultés pour la synthèse de l'*o*-diphénylphosphinebenzènethiol, nous nous sommes orientés vers la synthèse d'une autre phosphine : l'*o*-diphénylphosphinephénol (cf. composé a Figure 33) qui peut également être utilisé pour réaliser une ligation de Staudinger "traceless". Nous avons donc tenté de la synthétiser.

1.3.2.3. Synthèse de l'o-diphénylphosphinephénol

Dans ce cas, la fonction thiol de la molécule précédente est remplacée par une fonction phénol, rendant ainsi la manipulation des réactifs plus aisée. Herd en 1998[143] fait réagir la diphénylphosphine sur l'*o*-iodophénol. Grâce à une réaction de couplage au palladium P-C, il obtient l'hydroxyphénylphosphine avec un rendement de 71%. Une seconde méthode décrite par Rauchfuss[144] permet également d'obtenir ce composé. Il réalise le lithien du méthoxyméthylphényléther qu'il fait réagir avec la chlorodiphénylphosphine. Après une étape de déprotection de l'alcool, il obtient le composé voulu. Cette seconde méthode a été récemment utilisé par Bianchi et Bernardi[145] pour réaliser des ligations de Staudinger "Traceless" afin d'obtenir des glycosyl amides.

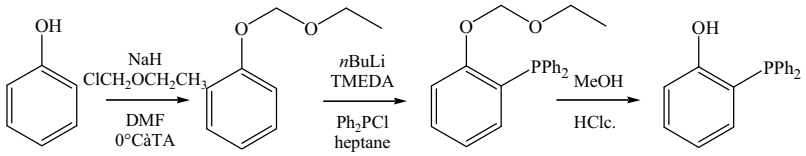


Pour notre étude, nous avons utilisé cette seconde méthode mais en y apportant quelques modifications.

[142] Dilworth, J.R.; Wheatley, N. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *199*, 89-158.
[143] Herd, O.; Heβler, A.; Hingst, M.; Machnitzki, P.; Teppler, M.; Stelzer, O. *Cataylis Today* **1998**, *42*, 413-420.
[144] Rauchfuss, T.B. *Inorg. Chem.* **1977**, *16*, 2966-2968.
[145] (a) Bianchi, A.; Bernardi, A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4565-4577. (b) Bianchi, A.; Russo, A.; Bernardi, A. *Tetrahedron: Asymetry* **2005**, *16*, 381-386.

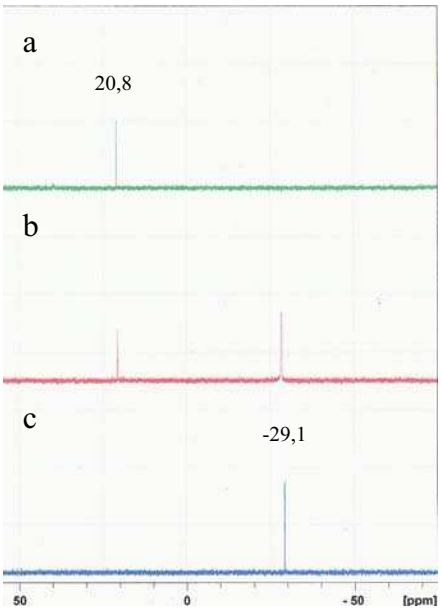
Pour la première étape, nous avons opté pour une protection de la fonction alcool par un groupement méthyléthyléther et non pas par le méthyméthyléther,[146] pour des raisons d'accessibilité et de toxicité du produit.

La présence d'un groupement protecteur de phénol rend possible la réaction de lithiation pour l'introduction de la fonction phosphine.



30 **31** **32**

L'étape suivante est une déprotection de l'alcool qui permet d'obtenir après évaporation du solvant le sel de phosphonium.[147] En effet, Luo *et al.*[148] affirment que le traitement de phénol protégé, porteur d'un groupement phosphine, avec de l'acide chlorhydrique conduit à un sel. Ceci est du à la basicité de la partie phosphine. Il est donc nécessaire de reprendre ce produit dans un solvant organique, comme le chloroforme, et de laver cette phase avec une solution de soude 0,1N pour obtenir la phosphine désirée.



Nous avons donc procédé à un lavage basique du produit obtenu. Ce traitement est suivi par RMN ^{31}P ($CDCl_3$). (Figure 35)

On peut observer un pic à +20,8ppm avant le traitement et un pic à -29,1ppm après le traitement.

Ceci confirme la théorie avancée par Luo et son équipe.

A noter, que le composé **32** une fois isolé s'oxyde rapidement (RMN ^{31}P δ :+39,5ppm).

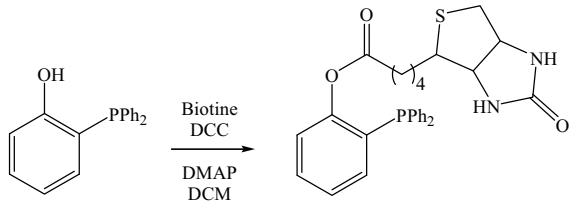
Figure 35 : RMN ^{31}P du composé obtenu
(a) après simple évaporation du solvant,
(b) pendant le lavage basique,
(c) après traitement total

[146] (a) Yardley, J.P.; Fletcher, H. *Synthesis* **1976**, 244-244. (b) Dardoize, F.; Gaudemar, M.; Goasdoue, N. *Synthesis* **1977**, 567-568. (c) Amato, J.S.; Karady, S.; Sletzinger, M.; Weinstock, L.M. *Synthesis* **1979**, 970-971. (d) Jeganathan, S.; Tsukamoto, M.; Schlosser, M; *Synthesis* **1990**, 109-111.
[147] Grotjahn, D.B.; Joubran, C.; Combs, D. *J. Organomet. Chem*. **1999**, *589*, 115-121.
[148] Luo, H.; Setyawati, I.; Rettig, S.J.; Ovig, C. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 2287-2299.

1.3.3. Couplage à la biotine

Le dérivé de la phosphine a été synthétisé dans le but de réaliser une ligation de Staudinger pour former une liaison amide entre la biotine et notre sonde présentant un groupement azoture.

Pour fixer la biotine au dérivé phosphoré, nous avons procédé à une estérification de ce dernier.



32 **33**

La réaction d'estérification s'effectue sous argon pour éviter l'oxydation de la phosphine. Le composé **32** ainsi que la biotine sont dissous dans le dichlorométhane en présence de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) en quantité catalytique. A ce mélange est ajouté 1,4 équivalent de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dissous dans du dichlorométhane distillé.

Lors de nos essais, nous avons bien observé, suite à l'apparition d'un pic à -16,3ppm, la formation du composé **33**. Rappelons que le produit de départ phosphoré **32** apparaît à -29,1ppm en RMN ^{31}P. Une fois ce composé isolé, il est difficile de le conserver car il s'oxyde rapidement (apparition d'un pic à +39,4ppm) et une fois oxydée, cette molécule ne peut plus être utilisée pour réaliser la ligation de Staudinger. Il est donc préférable et essentiel de former l'ester de la biotine peu de temps avant de procéder à la ligation.

1.3.4. Essais avec une molécule test

Les essais de ligation ont été réalisés sur **3a**. Cette molécule a été utilisée pour tester les conditions opératoires de cette réaction. Pour cela, les deux composés **33** et **3a** ont été solubilisés dans le diméthylformamide. Après 4h de chauffage à 70°C, de l'eau est ajoutée au milieu et l'agitation ainsi que la température sont maintenues pendant 18h. Cet ajout d'eau permet l'hydrolyse de l'aza-ylure qui s'est formé.

Les résultats que nous avons obtenus pour cette étape ne sont pas concluants. Les conditions opératoires de l'estérification de la biotine afin d'obtenir le dérivé phosphoré sont donc à

optimiser avant de procéder à la ligation de Staudinger, dont les conditions sont encore à déterminer.

En parallèle à la ligation de Staudinger, nous avons étudié la réaction de Click Chemistry pour introduire la biotine sur notre molécule afin de procéder par la suite à une révélation des protéines d'intérêt par chimilumescence.

1.4. Réaction de "Click Chemistry"

Depuis ces dernières années, le nombre de publication sur la "Click Chemistry" ainsi que ses applications se sont multipliées. Après en avoir décrit le principe ainsi que ses applications, nous verrons la synthèse des composés nécessaires au bon déroulement de ce concept dans le cadre de notre recherche.

1.4.1. Qu'est ce que la "Click Chemistry" ?

1.4.1.1. Historique

Le terme de "click" désigne une réaction chimique sélective, efficace, et facile à mettre en œuvre.
Lorsque l'on parle de réaction de type "click", on peut faire référence à diverses réactions :

- cycloaddition (dipôle 1,3)
- substitution nucléophile (ouverture de cycle)
- addition oxydative sur une liaison C=C.

Mais de plus en plus ce terme fait référence à la réaction de cycloaddition.

D'un point de vue historique, le concept de "click" réaction a été introduit par Huisgen en 1984.[149] Quelques années plus tard, en 2001, Sharpless *et al.*[50] introduisent la notion de "Click Chemistry". Ce ne fut qu'un an après, avec la découverte de la catalyse au cuivre par Meldal[150] pour ce type de réaction, qu'elle est devenue la réaction de click la plus utilisée

[149] Huisgen, R. *1,3-Dipolar cycloaddition chemistry*, Ed. A. Pawda, Wiley, New York, **1984**, 1-176.
[150] Tornøe, C.W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.

depuis. On parle le plus souvent de la réaction CuAAC (**Cu**-catalyzed **A**zide-**A**lkyne 1,3-dipolar **C**ycloaddition).

1.4.1.2. Principe

Ce concept de "Click Chemistry" permet d'étendre, de compléter et de faciliter les méthodes de synthèse existantes. Comme le dit Lutz,[151] c'est "une philosophie de synthèse inspirée par la simplicité et l'efficacité de la chimie qui se fait dans la nature". Son but est de générer de nouvelles structures pour diverses applications que nous verrons par la suite.
Cette réaction, d'un point de vue chimique, met en jeu un azoture ainsi qu'un alcyne terminal afin d'obtenir un motif 1,2,3-triazole (Schéma 34). Les azotures et les alcynes sont pratiquement absents des cellules et donc la réaction est très sélective. Cependant, le ratio entre le triazole 1,4 et le 1,5-disubstitué peut varier suivant les réactifs utilisés ou les conditions expérimentales (Schéma 35).

La grande stabilité cinétique des azotures et des alcynes est à l'origine de leur lente cycloaddition, ce qui nécessite des températures élevées et des longs temps de réaction.

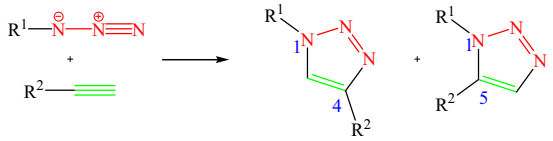
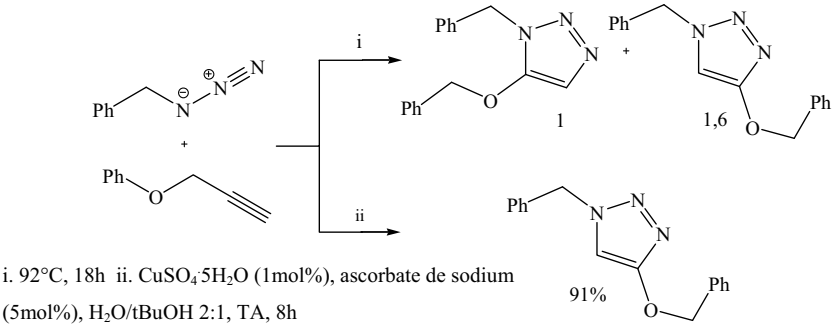


Schéma 34 : Formation du motif 1,2,3-triazole

De nombreuses méthodes pour maîtriser la régiosélectivité ont été mises en œuvre mais sans succès. Ce n'est qu'avec la catalyse au cuivre (I) qu'une régiosélectivité a été observée, avec exclusivement une disubstitution du triazole en 1,4.

[151] Lutz, J.F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1018-1025.

Un comparatif entre une réaction non catalysée et une catalysée par le cuivre (I) a été réalisée par Rostovtsev *et al*.[152]



i. 92°C, 18h ii. $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ (1mol%), ascorbate de sodium (5mol%), H_2O/tBuOH 2:1, TA, 8h

Schéma 35 : Formation du 1,2,3-triazole 1,4- ou 1,5-disubstitué

Cette réaction catalysée par le cuivre (I) devient donc une réaction de choix de par ces nombreux avantages :

- réaction facile à mettre en œuvre
- régiosélective
- produits de départ facilement accessibles
- donne de bons rendements
- insensible à l'oxygène ou à l'eau
- isolation simple des produits (recristallisation ou distillation)
- utilise une liaison C-hétéroatome très stable comme connexion
- ne nécessite pas de protection pour la plupart des groupements fonctionnels (ester, acide, alcène, alcools, amines)
- pas affectée de façon significative par les propriétés stériques et électroniques des groupements attachés aux centres azotures ou alcynes réactifs[153]
- 10^7 fois plus rapide que la même réaction non catalysée
- des azotures primaires, secondaires, tertiaires aussi bien que des azotures aromatiques peuvent être utilisés.

Toutefois, il faut faire attention car les molécules de faible poids moléculaire possédant un groupement azoture peuvent être instables et donc difficiles à manipuler. C'est pour cette raison que des procédures "one-pot" appliquées à la CuAAC se développent de plus en plus en synthèse organique.[154]

[152] Rostovsev V.V.; Green, L.G.; Fokin, V.V.; Sharpless, K.B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
[153] Wu, P.; Fokin, V.V. *Aldrichimica Acta* **2007**, *40*, 7-17.
[154] (a) Wang, Z-X.; Zhao, Z-G. *J. Heterocyclic Chem.* **2007**, *44*, 89-92. (b) Beckmann, H.S.G.; Wittmann, V. *Org. Lett*. **2007**, *9*, 1-4.

En effet, l'azoture peut être généré *in situ* pour ensuite réagir directement et générer le 1,2,3-triazole voulu.

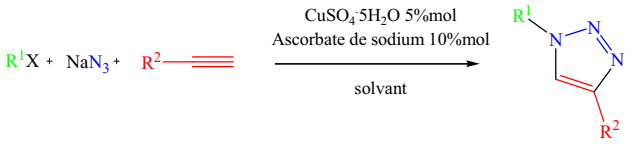


Schéma 36 : Formation "one-pot" de l'azoture puis du 1,2,3-triazole

De plus cette réaction peut être accompagnée d'irradiations micro-ondes (MW) qui ont pour effet de diminuer le temps de réaction.[155]

Cette réaction de Click Chemistry se fait généralement en présence d'eau car c'est une réaction exothermique et l'eau est un bon "piège à chaleur". De meilleurs rendements et vitesse de réaction ont été observés lorsque les produits sont en suspension dans l'eau. De plus, la dissolution dans le milieu des réactifs et du catalyseur n'est pas forcément requise.
Lors de la réaction, il y a formation de triazole. Ce dernier possède également de nombreuses propriétés[156] :

- possède un caractère aromatique
- ne peut pas être coupé par hydrolyse (à l'inverse de l'amide)
- presque impossible à oxyder ou à réduire, même à haute température
- peut participer de façon active à une liaison hydrogène[157] ou à une interaction dipolaire qui peut favoriser les liaisons avec les sondes biomoléculaires et améliorer la solubilité (point très important dans notre cas).

Cette réaction possède donc de nombreux avantages mais nous verrons par la suite une de ses limitations.

[155] Appukkutta, P.; Dehaen, W.; Fokin, V.V.; Van der Eycken, E. *Org. Lett*. **2004**, *6*, 4223-4225.
[156] Kolb, H.C.; Sharpless, K.B. *DDT* **2003**, *8*, 1128-1137.
[157] Whiting, M.; Muldoon, J.; Lin, Y-C.; Silverman, S.M.; Lindostrom, W.; Olson, A.J.; Kolb, H.C.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B.; Elder, J.H.; Fokin, V.V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1435-1439.

1.4.1.3. Mécanisme

Nous venons de voir que pour avoir une réaction régiosélective, la réaction doit être catalysée par le cuivre (I), générant ainsi un acétylure de Cu(I) (**A**) comme le montre le schéma suivant[158] :

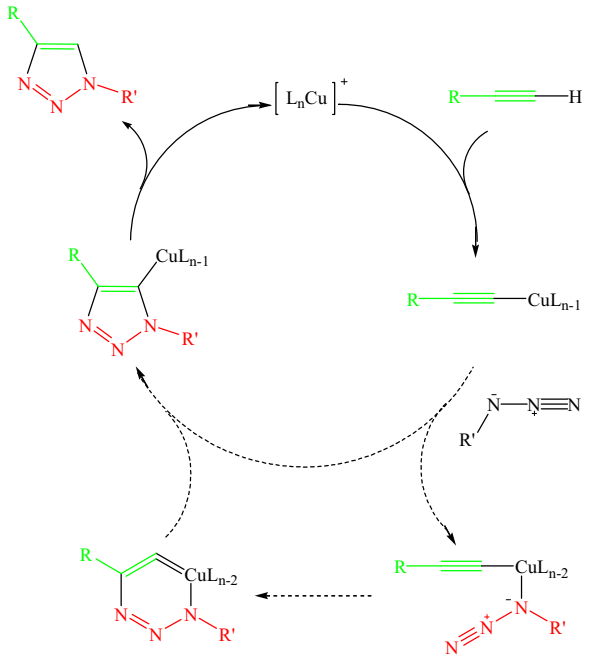


Schéma 37 : Mécanisme réactionnel de Click Chemistry catalysée par le cuivre

Différentes sources de cuivre (I) existent et peuvent être utilisées pour cette réaction :

- Sels de cuivre (I) : CuI, CuBr

Ces sels nécessitent généralement de l'acétonitrile en cosolvant ainsi qu'une base azotée telle que le DIPEA (*N,N*-diisopropyléthylamine) ou la 2,6-lutidine, et de temps en temps génèrent des diacétylènes et des sous produits (bis triazoles) non désirables.

- Complexes : $[Cu(CH_3CN)_4]PF_6$, $(EtO)_3P{\cdot}CuI$, $[Cu(PPh_3)_3]Br$

Ces complexes sont particulièrement efficaces en solvant organique quand les sels de cuivre sont limités en solubilité.

Ces deux types de sources de Cu(I) peuvent être utilisées directement comme catalyseur seul ou avec un ligand. Cependant, des conditions sans oxygène sont conseillées. Cu(I) est thermodynamiquement instable et peut s'oxyder facilement en Cu(II) qui est une entité inactive dans cette réaction.

[158] Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V.V.; Noodleman, L.; Sharpless, K.B.; Fokin, V.V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210-216.

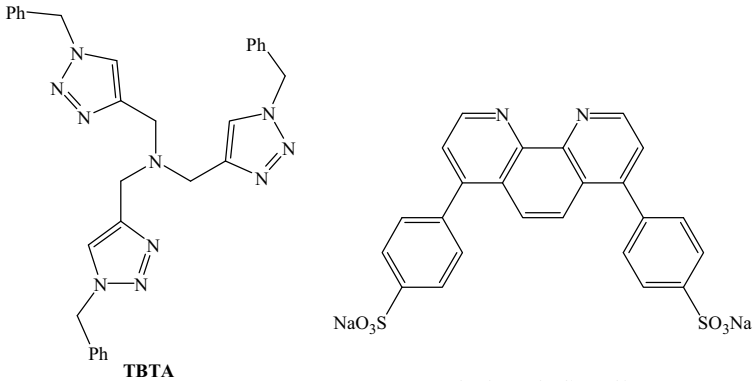
Une alternative qui ne nécessite aucune précaution et qui peut se réaliser à l'air ambiant est de former le Cu(I) *in situ*. Cette méthode consiste à utiliser un agent réducteur, comme par exemple l'ascorbate de sodium, avec un sel de cuivre (II) (sulfate de cuivre (II) pentahydraté ou l'acétate de cuivre (I)). L'association de ces deux composés est une méthode facile à mettre en œuvre, nécessitant des composés qui sont accessibles dans le commerce et peu coûteux.

Le cuivre (I) peut également être généré par l'introduction de cuivre (0) dans le milieu.[159] Certains tentent de développer l'utilisation d'autres catalyseurs comme par exemple l'acétate de Cu(II) sans réducteur[160] dans les conditions ambiantes, cependant le mécanisme n'est pas précisé.

1.4.1.4. Limitations

Une limitation de la réaction de "click chemistry" est la présence d'ions cuivre libres dans le milieu. En effet, ces ions sont cytotoxiques et peuvent affecter la structure des protéines. Finn *et al.* ont montré qu'il y avait modification de la surface d'un virus, le *cowpea mosaic*, et décomposition de ce virus en présence de cuivre (II).[161]

Ce n'est que récemment que ce problème a été résolu grâce à l'utilisation de ligands tel que le TBTA[162] ou la bathophenanthroline sulfanatée.



TBTA
Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine

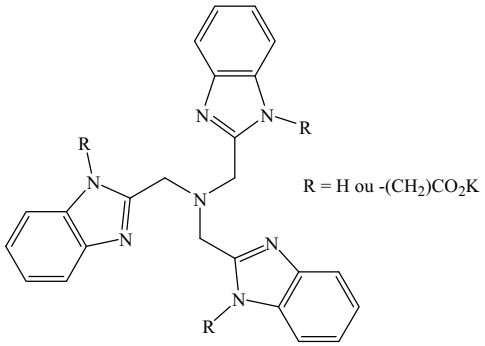
Bathophenanthroline sulfanatée

Figure 36 : Structure de la TBTA et de la bathophenanthroline sulfanatée

[159] Orgueira, H.A.; Fokas, D.; Isome, Y.; Chan, P.C-M.; Baldino, C.M. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2911-2914.
[160] Reddy, K.R.; Rajgopal, K.; Kantam, M.L. *Synlett* **2006**, 957-959.
[161] Wang, Q.; Chan, T.R.; Hilgraf, R.; Fokin, V.V.; Sharpless, K.B.; Finn, M.G. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192-3193.
[162] Chan, T.R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K.B.; Fokin, V.V. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855.

Ces ligands permettent d'accélérer la réaction de CuAAC et de stabiliser l'état d'oxydation +I du cuivre utilisé comme catalyseur. De plus, ils permettent de fixer les ions cuivreux et donc d'éviter tout dommage des systèmes biologiques.

La bathophenanthroline sulfanatée est décrite comme étant une alternative au TBTA, de par sa solubilité dans l'eau et son accessibilité dans le commerce.



Plus récemment, Finn *et al.* ont montré que les tris(2-benzimidazolylmethyl)amines (Figure 37) sont de meilleurs ligands pour accélérer la réaction de CuAAC et donnent de meilleurs rendements par rapport à ceux obtenus avec les ligands classiques.[163]

Figure 37 : Structure générale des tris(2-benzimidazolylmethyl)amines

Cependant le point négatif de ces ligands est l'augmentation de la sensibilité du cuivre à s'oxyder et donc la nécessité d'éliminer toute trace d'oxygène dans le milieu en travaillant en milieu inerte.

La recherche de nouveaux ligands reste un réel défi stratégique (accessibilité, coût, sensibilité).

1.4.1.5. Applications

Le nombre de molécules synthétisées grâce à la "Click Chemistry" ne fait qu'augmenter, rendant ainsi son domaine d'application de plus en plus vaste. Cette réaction est appliquée en :

- Biochimie : modification de surfaces ou fonctions des biomolécules,[164] formation d'analogues de molécules biologiques
- Bioconjugaison : combinaison de molécules d'origine naturelle et synthétique[165]
- Chimie combinatoire : formation et utilisation de librairies, construction de blocks "clickable"

[163] Rodionov, V.O.; Presolski, S.I.; Gardinier, S.; Lim, Y-H.; Finn, M.G. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12696-12704.
[164] (a) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.***2004***, 126,* 15046-15047. (b) Hsu, T-L.; Hanson, S.R.; Kishikawa, K.; Wang, S-K.; Sawa, M.; Wong, C-H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 2614-2619.
[165] Arosio, D.; Bertoli, M.; Manzonib, L.; Scolasticoa, C. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 3697-3700.

- Biomatériaux : - modification et fonctionnalisation de phases stationnaires pour colonnes d'affinités[166]

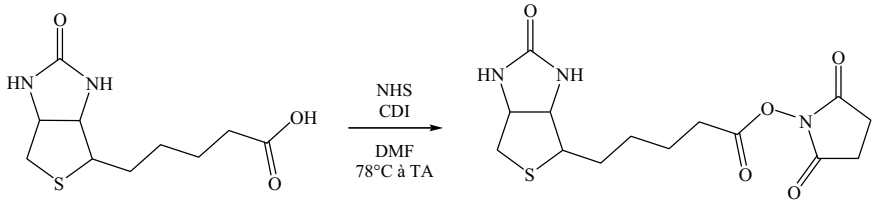
  - formation de polymères.

Cette liste n'est pas exhaustive, il existe de nombreuses autres applications.[167]

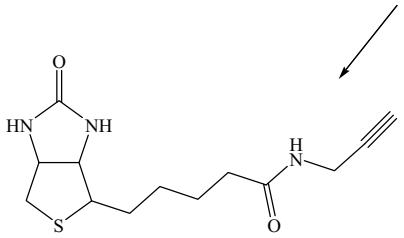
1.4.2. Synthèse de la biotine modifiée

Comme nous venons de le voir, la réaction de Click Chemistry met en jeu un azoture et un alcyne. Il est donc nécessaire de former une biotine possédant ce groupement alcyne, notre structure bi- ou trifonctionnelle possédant le groupement azoture.

Une voie de synthèse pour former ce dérivé nous est proposée par Lin *et al.*[168] En effet, ils passent par la formation d'une biotine estérifiée qui par réaction avec la propargylamine ainsi que de triéthylamine conduit au composé voulu. Nous avons donc procédé à l'estérification de la biotine mais pour cela nous avons utilisé la *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI) à la place de l'hydrochlorure de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide (EDC).



34



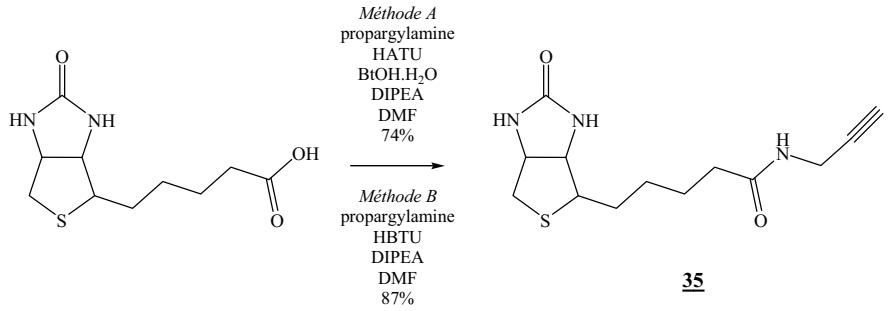
35

[166] Guo, Z.; Lei, A.; Liang, X.; Xu, Q. *Chem. Commun.* **2006**, 4512-4514.
[167] (a) Kolb, H.C.; Walsh, J.C.; Chen, K. **2006**, XO2006116629, *Chem. Abst.145*, 455222. (b) Sirion, U.; Kim, H.J.; Lee, J.H.; Seo, J.W.; Lee, B.S.; Lee, S.J.; Oh, S.J.; Chi, D.Y. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3953-3957. (c) Lutz, J-F.; Zarafshani, Z. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 958-970.
[168] Lin, P-C.; Ueng, S-H.; Yu, S-C.; Jan, M-D.; Adak, A.K.; Yu, C-C.; Lin, C-C. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2131-2134.

Après traitement et purification, le composé **34** a été obtenu avec 47% de rendement. La seconde étape consiste à faire réagir la propargylamine sur cet ester ainsi formé. Le composé **35** a ainsi pu être obtenu avec un rendement de 65%.

Cette méthode a permis d'obtenir le produit désiré mais avec de faibles rendements. Nous avons donc tenter de former le composé **35** par une voie directe en une seule étape.

Peu de publications décrivent la formation du composé **35**. Cependant, deux équipes synthétisent ce composé en une seule étape en partant de la biotine.



35

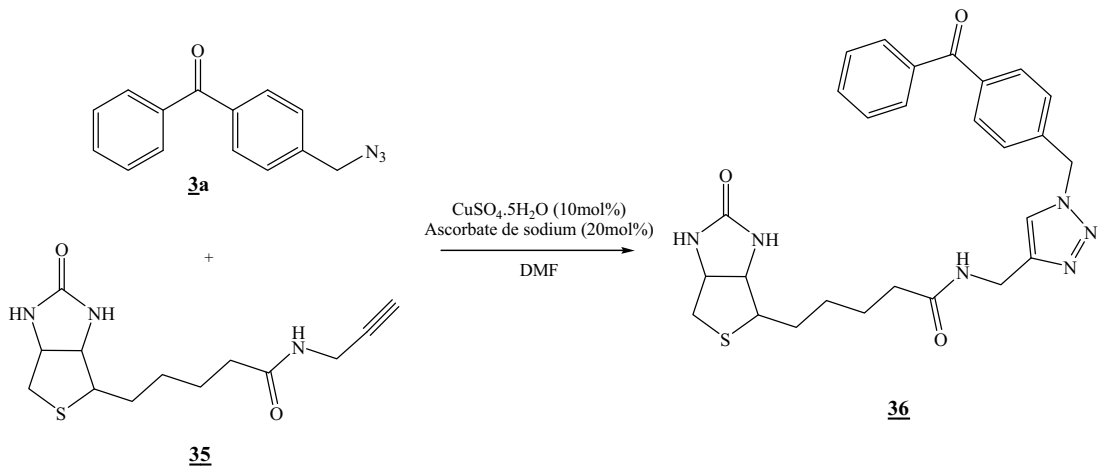
La méthode A, décrite par Meier *et al.*,[169] nécessite l'utilisation de l'*o*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluroniumhexafluorophosphate (HATU) ainsi que d'hydroxy-benzotriazole monohydraté. La seconde méthode, décrite par Wong *et al.,*[170] quant à elle, nécessite uniquement l'*o*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluroniumhexafluoro phosphate (HBTU), de plus un meilleur rendement a été obtenu. Nous avons donc privilégié cette voie de synthèse, qui nous a permi d'obtenir le composé **35** avec un rendement de 60%.

Ces deux voies de synthèse, directe ou en passant par la formation d'un ester de la biotine, nous ont permis d'obtenir le composé **35**.

1.4.3. Essais avec les molécules bifonctionnelles

Le composé **35** a donc été utilisé pour effectuer la réaction de Click Chemistry. Pour cela, les conditions standard, c'est-à-dire sulfate de cuivre et ascorbate de sodium, ont été utilisées.

[169] Meier, J.L.; Mercer, A.C.; Rivera, H.Jr.; Burkart, M.D. *J. Am. Chem. Soc*. **2006**, *128*, 12174-12184.
[170] Sawa, M.; Hsu, T-L.; Itoh, T.; Sugiyama, M.; Hanson, S.R.; Vogt, P.K.; Wong, C-H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 12371-12376.



Après 24h à température ambiante et addition d'eau, le précipité formé est filtré puis séché. Le composé **36** a été obtenu mais avec un faible rendement (32%).

Une optimisation des conditions opératoires est donc nécessaire avant de réaliser cette réaction sur les dérivés du glutathion.

Afin de pouvoir détecter par chimiluminescence les protéines d'intérêt (protéines ayant une affinité pour le glutathion), nous avons mis en œuvre la synthèse de dérivés de la biotine. Chaque technique, ligation de Staudinger ou réaction de Click Chemistry, nécessite la synthèse d'un dérivé spécifique. La ligation de Staudinger nécessite la formation d'un dérivé phosphoré, que nous avons synthétisé. Cependant ce dernier s'oxyde facilement et nécessite une détermination des conditions opératoires pour réaliser la ligation entre notre composé phosphoré et un composé possédant l'azoture. Pour ce qui est de la réction de Click Chemistry, une biotine possédant un groupement alcyne est nécessaire. Deux méthodes, directe et en passant par un ester, ont été appliquées pour obtenir le composé voulu. Des essais utilisant les conditions les plus courantes (sulfate de cuivre (II) et ascorbate de sodium) ont été utilisées. Le triazole issu de cette réaction a bien été obtenu, cependant une optimisation des conditions opératoires (solvant, source de cuivre) permettrait d'obtenir de meilleurs rendements.

2. Détection par Fluorescence

Dans ce paragraphe, nous rappelons le principe de la fluorescence puis nous verrons les molécules que nous avons choisies pour notre étude.

2.1. Qu'est ce que la fluorescence ?

2.1.1. Principe de la fluorescence

Comme nous l'avons vu, la fluorescence est un cas particulier de la luminescence ou plus exactement de photoluminescence.[171] Ce phénomène se produit suite à l'absorption de photons par une molécule que l'on appelle fluorophore qui va passer de son état fondamental à un état excité suite à une irradiation UV, visible ou proche infrarouge. La molécule, une fois dans son état excité, retourne à son état fondamental par émission de luminescence. On parlera de désactivation radiative. Il existe également des désexcitations non radiatives où la désexcitation se fait sans émission de lumière. Le diagramme simplifié de Jablonski (Figure 38) représente ces deux phénomènes.

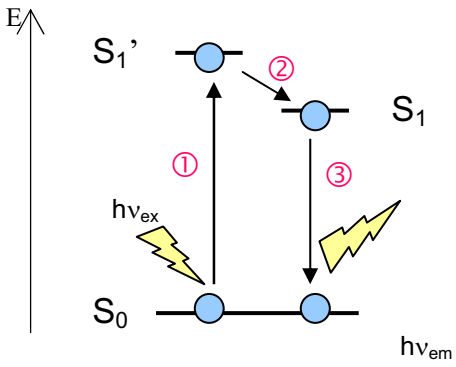


Figure 38 : Diagramme simplifié de Jablonski

Le phénomène de fluorescence se fait donc en trois étapes :

<u>Étape 1</u> : Excitation

Suite à l'absorption d'une énergie lumineuse ($h\nu_{ex}$) produite par une lampe à incandescence ou un laser. Le fluorophore va passer de son état fondamental stable S_o à un état singulet excité S_1'.

[171] Hayland, R. *The Handbook : A guide to fluorescent probes and labeling technologies.* 10th Ed. Molecular Probes Invitrogen **2005**. site internet www.probes.invitrogen.com

<u>Étape 2</u> : Dissipation de l'énergie

Le temps de vie de l'état excité varie de 1 à 10ns. Durant ce temps, le fluorophore subit des changements conformationnels et des interactions avec son environnement. L'énergie de l'état excité S_1' est partiellement dissipée, conduisant à un état singulet excité métastable S_1 (qui est le niveau de vibration le plus bas de l'état excité).

<u>Étape 3</u> : Émission de fluorescence

Le fluorophore dans l'état excité S_1 retourne à l'état fondamental S_0 avec une émission d'énergie lumineuse ($h\nu_{em}$). Du fait de la dissipation d'énergie (étape 2), l'énergie émise est plus faible que l'énergie d'excitation. De ce fait, la longueur d'onde d'émission ($h\nu_{em}$) est plus élevée que la longueur d'onde d'excitation ($h\nu_{ex}$). Cette différence de longueur d'onde ($h\nu_{ex}$-$h\nu_{em}$) est appelée le déplacement de Stokes. Si ce déplacement est faible, il sera difficile de séparer les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission au moyen de filtres. Pour pouvoir avoir une bonne séparation, ce déplacement doit être supérieure à 20nm.

2.1.2. Choix du fluorophore

Chaque molécule peut être caractérisée par un spectre d'absorption et d'émission qui lui sont propres. Ils sont caractéristiques de la structure énergétique de cette molécule dans un environnement donné.

Il existe un grand choix de fluorophores, chacun avec ses propres caractéristiques (longueurs d'ondes d'excitation et d'émission, coefficient d'extinction ε ou rendement quantique ϕ).

La fluorescence peut être utilisée pour visualiser une protéine ou suivre sa dynamique. Pour cela, il faut fixer un fluorophore, qui peut être d'origine biologique ou d'origine chimique, sur cette protéine.

Les composés luminescents peuvent être des composés inorganiques, des composés organométalliques ou des composés organiques. Ce dernier type de composés est le plus utilisé. Il regroupe notamment les dérivés de fluorescéine, les coumarines ou la rhodamine.

Ces composés sont utilisés essentiellement dans le domaine biologique (immunologie, biologie moléculaire, protéomique, neurosciences, etc.). Nous allons voir dans le paragraphe suivant, deux types de fluorophores souvent utilisés : les coumarines et les dérivés de la fluorescéine.

2.2. Synthèse des chromophores fluorescents

2.2.1. Les coumarines

2.2.1.1. Le choix des coumarines

Les coumarines ont de nombreuses propriétés et utilisations. Une de leurs propriétés la plus connue est leur activité biologique. En effet, certains dérivés de coumarines sont des anticancéreux,[172] des agents anti-HIV,[173] des antimicrobiens,[174] des anticoagulants,[175] des vasodilatateurs,[176] des anti-inflammatoires[177] ou des antioxydants[178] entre autres.[179]
Cependant, ces composés possèdent également d'autres propriétés également utilisées en biologie : la fluorescence. Cette propriété permet de visualiser un matériel biologique tel que les protéines ou les acides nucléiques.[180]

Afin de pouvoir visualiser par fluorescence nos protéines d'intérêt, nous avons décidé de fixer sur nos sondes, une fois attachée aux protéines, une coumarine. Cette fixation est possible grâce à la présence de notre groupement de détection ($-CH_2N_3$).

---

[172] Natala, S. R., Muralidhar, R. M., Stephen, C.; Kiranmai G.; Stanley C. B.; Premkumar, R.; Ramana, M. V. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4093-4097.
[173] (a) Yang, Z.-Y.; Xia, Y.; Xia, P.; Cosentino, L. M.; Lee, K.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1483-1484. (b) Spino, C.; Dodier, M.; Sotheeswaran, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3475-3478. (c) Bedoya, L. M.; Beltrán, M.; Sancho, R.; Olmedo, D. A.; Sánchez-Palomino, S.; del Olmo, E.; López-Pérez, J. L.; Muñoz, E.; San Feliciano, A.; Alcamí, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4447-4450.
[174] (a) Bonsignore, L.; Cottiglia, F.; Elkhaili, H.; Jehl, F.; Lavagna, S. M.; Loy, G.; Manna, F.; Monteil, H.; Pompei, D.; Secci, D. *Farmaco* **1998**, *53*, 425-430. (b) Khan, I. A.; Kulkarni, M. V.; Sun, C.-M. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 1168-1172.
[175] (a) Manolov, I.; Danchev, N. *Eur. J. Med. Chem*. **1995**, *30*, 531-535. (b) Manolov, I.; Maichle-Moessmer, C.; Danchev, N. *Eur. J. Med. Chem*. **2006**, *41,* 882-890.
[176] Bariana, D. S. *J. Med. Chem.* **1970**, *13,* 544-546.
[177] (a) Ghate, M.; Manohar, D.; Kulkarni, V.; Shobha, R.; Kattimani, S. Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 297-302. (b) Ghate, M.; Kusanur, R. A.; Kulkarni, M. V. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 882-887. (c) Kontogiorgis, C. A.; Hadjipavlou-Litina, D. J. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6400-6408.
[178] (a) Tyagi, Y. K.; Kumar, A.; Raj, H. G.; Vohra, P.; Gupta, G.; Kumari, R.; Kumar, P.; Gupta, R. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 413-420. (b) Beillerot, A.; Rodríguez Domínguez, J. C.; Kirsch, G.; Bagrel, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2008**, *18*, 1102-1105.
[179] (a) Peng, F.-C.; Cheng, J.-S. *Mycopathologia* **1997**, *137*, 125-128. (b) Onderwater, R. C. A.; Venhorst, J.; Commandeur, J. N. M.; Vermeulen, N. P. E. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12*, 555-559. (c) Laurin, P.; Ferroud, D.; Klich, M.; Dupuis-Hamelin, C.; Mauvais, P.; Lassaigne, P.; Bonnefoy, A.; Musicki, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **1999**, *9*, 2079-2084. (d) Cravotto, G.; Balliano, G.; Robaldo, B.; Oliaro-Bosso, S.; Chimichib, S.; Boccalini, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2004**, *14*, 1931-1934. (e) Garino, C.; Pietrancosta, N.; Laras, Y.; Moret, V.; Rolland, A.; Quéléver, G.; Kraus, J.-L. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2006**, *16*, 1995-1999.
[180] (a) Kosiova, I.; Kovackova, S.; Kois, P. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 312-320. (b) Nonaka, H.; Tsukiji, S.; Ojida, A.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc*. **2007**, *129*, 15777-15779. (c) Seela, F.; Sirivolu, V. R.; Chittepu, P. *Bioconjugate Chem.* **2008,** *19,* 211-224.

2.2.1.2. Synthèse des dérivés de coumarines

Au sein de notre laboratoire, Juan Carlos Rodríguez-Domínguez a développé une méthode "verte" pour synthétiser diverses hydroxycoumarines.[181]

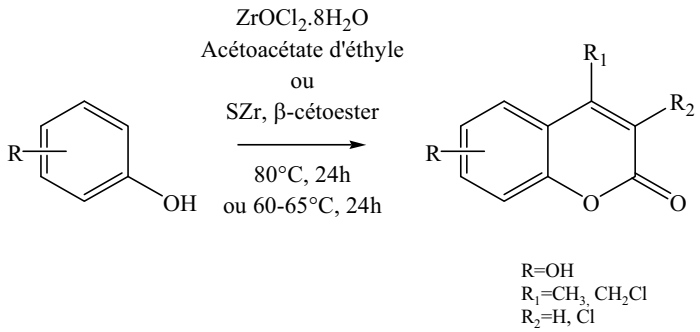


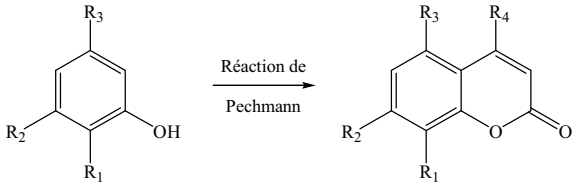
Figure 39 : Préparation des hydroxycoumarines

Grâce à cette technique, de nombreuses coumarines ont pu être synthétisées.
Pour notre étude, nous avons décidé d'utiliser la 7-hydroxy-4-méthoxycoumarine qui est souvent utilisée comme standard pour la détermination par fluorescence de diverses activités enzymatiques.[182] Nous avons également choisi de synthétiser une coumarine possédant un cycle aromatique accolé au motif coumarine afin de modifier soit l'intensité de la fluorescence, soit la longueur d'onde du maximum d'émission.

Deux autres coumarines ont également été utilisées à des fins expérimentales pour étudier l'influence de la position des substituants présents sur la coumarine lors de la réaction de Click Chemistry.

Ces quatre molécules (**37**-**40**) ont été synthétisées par Juan-Carlos Rodríguez-Domínguez par une réaction de Pechmann catalysée par du sulfure de zirconium (SZr), du chlorure de zirconium ($ZrOCl_2.8H_2O$) ou par méthode classique de Pechmann en présence d'acide sulfurique.[181]

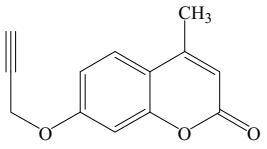
[181] (a) Rodríguez-Domínguez, J. C.; Kirsch, G. *Synthesis* **2006**, 1895-1897. (b) Rodríguez-Domínguez, J. C.; Kirsch, G. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 3279-3281.
[182] Takagaki, K.; Kon, A; Kawasaki, H.; Nakamura, T.; Endo, M. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1989**, *19*, 207-214.



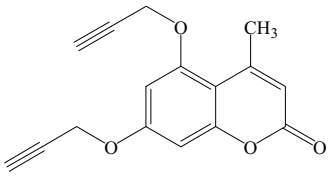
Composé	R_1	R_2	R_3	R_4	Rdt (%)
37	H	OH	H	CH_3	91 [i ou ii]
38	OH	OH	H	CH_3	51[i]/64[ii]
39	H	OH	OH	CH_3	92[i]/48[ii]
40	CH=CH-CH=CH		H	CH_2COOH	36[iii]

Tableau 7 : Formation des coumarines de départ
Conditions de réaction : i. SZr, β-cétoester, 80 °C, 24h ou 60-65 °C, 24h;
ii. $ZrOCl_2$•$8H_2O$, β-cétoester, 80 °C, 24h ou 60-65 °C, 24h;
iii. Acide 1,3-acétonedicarboxylique, acide sulfurique

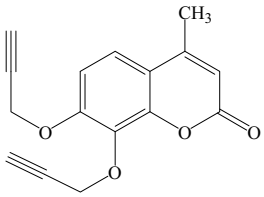
Après avoir synthétisé ces coumarines de départ, l'introduction d'une fonction alcyne est nécessaire afin de fixer ces dérivés sur le groupement azoture. Ce groupement propargylique a donc été introduit soit en formant un éther soit un amide.



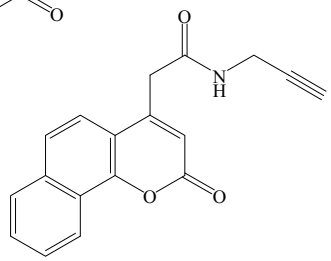
41



43



42



44

Les composés **41**-**43**, ont été obtenus avec de bons rendement (80%, 91% et 90% respectivement) en faisant réagir du bromure de propargyle sur les coumarines **37**-**39**, en présence d'une base (K_2CO_3) dans l'acétone, à chaud. Pour le composé **41**, seul un équivalent de bromure a été ajouté alors que pour les composés **42** et **43**, 2 équivalents sont nécessaires de par la présence de deux fonctions hydroxyles. Pour ce qui est du composé **44**, l'introduction du groupement propargyle a été différente. Nous avons procédé à une réaction "one-pot". Nous avons tout d'abord formé un ester activé avec la *N*-hydroxysuccinimide (NHS) et de la *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Cet ester est formé *in situ* et n'est pas isolé. La propargylamine est directement ajoutée au milieu permettant ainsi, après filtration, d'obtenir le composé voulu.

Suite à ces réactions, nous avons à notre disposition quatre dérivés de coumarines possédant un groupement alcyne. Mais avant de réaliser la réaction de Click Chemistry sur nos sondes, nous avons essayé cette réaction sur les molécules tests (**3a-d**).

2.2.1.3. Couplage par Click Chemistry - Essais préliminaires

Pour réaliser ces essais, nous avons employé les conditions classiques, c'est-à-dire le sulfate de cuivre (II) et l'ascorbate de sodium. Toutes les expériences ont été réalisées dans le diméthylformamide afin d'augmenter la solubilté des coumarines. De plus, grâce à ce solvant, les produits finaux peuvent être obtenus et isolés par simple filtration après ajout d'eau dans le milieu réactionnel.

2.2.1.3.1. Essais avec les structures bifonctionnelles[183]

Pour l'ensemble de ces essais (Figure 40), 10mol% de sulfate de cuivre (II) pentahydraté et 20mol% d'ascorbate de sodium ont été utilisés.
Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 8.

Composé		Rdt (%)	Composé		Rdt (%)
45	a	98	**47**	a	74
	b	97		b	74
	c	56		c	89
	d	94		d	86
46	a	92	**48**	a	92
	b	53		b	96
	c	89		c	97
	d	95		d	65

Tableau 8 : Rendements obtenus lors des essais de réaction de Click Chemitry

[183] Chenot, E-D.; Rodríguez-Domínguez, J-C.; Hannewald, P.; Comel, A.; Kirsch, G. *J. Heterocyclic Chem.* **2008**, *45*, 1429-1435.

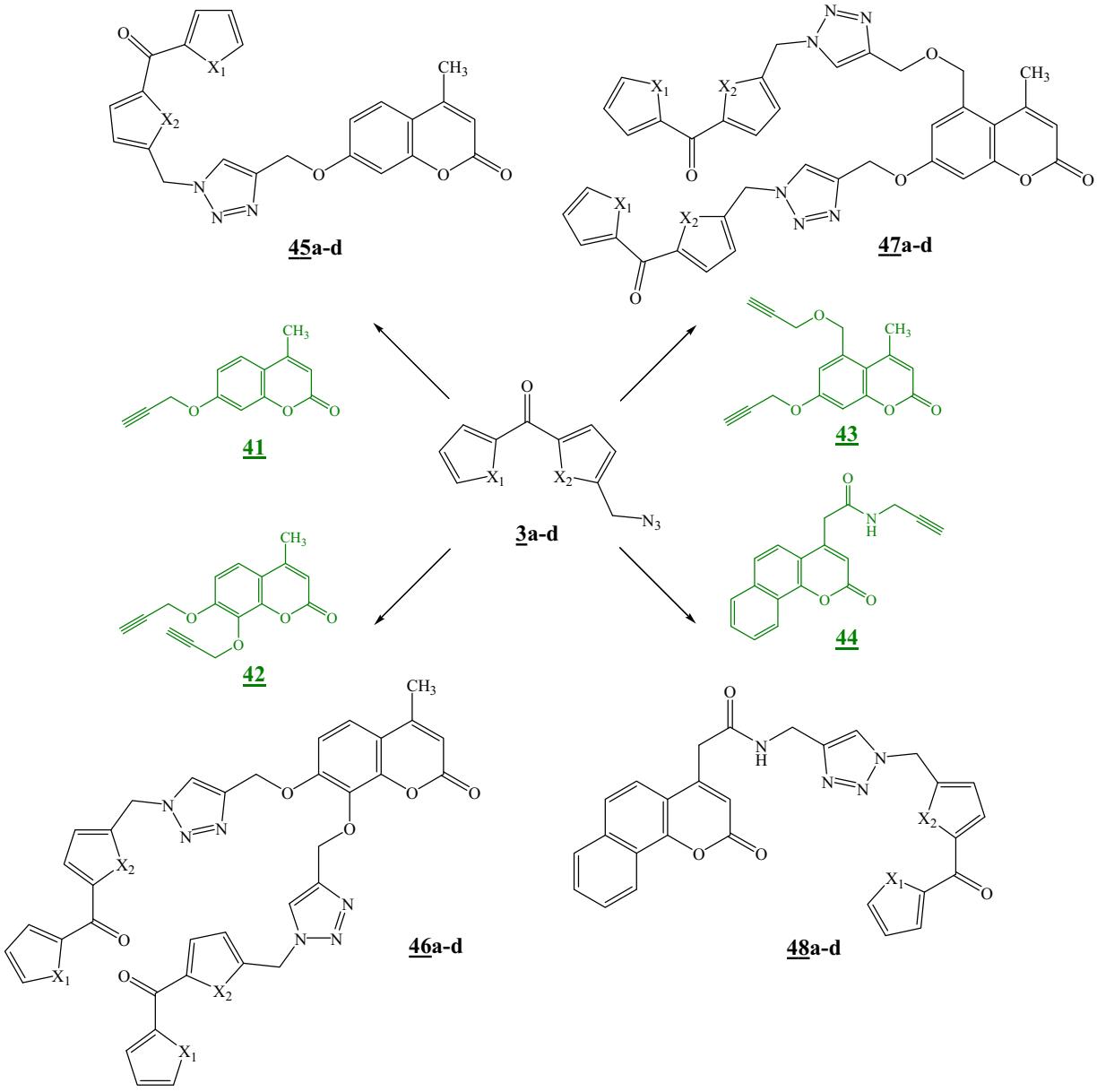
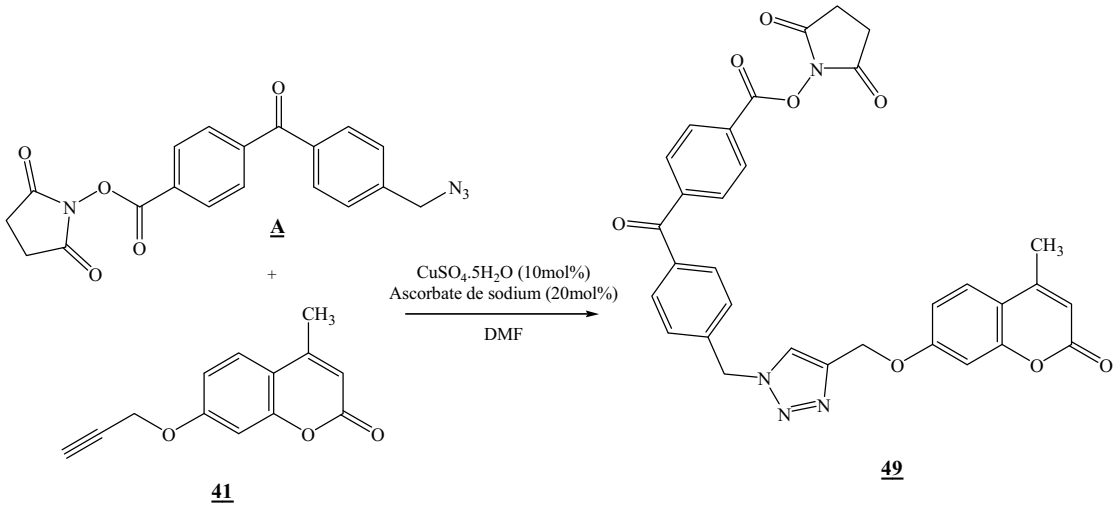


Figure 40 : Réaction de Click Chemistry entre les structures bifonctionnelles et les dérivés de coumarines

Lorsque l'on compare les résultats obtenus entre les composés **45** et les composés **46** ou **47**, on constate une légère diminution des rendements. Cependant, les rendements obtenus pour les composés **46** et **47** montrent que la gêne stérique liée aux groupements fixés sur la coumarine n'affecte pratiquement pas, voir pas du tout, la réaction.

2.2.1.3.2. Essais avec une structure trifonctionnlle

Vu les bons rendements obtenus lors des essais sur les molécules tests, nous avons voulu valider la méthode en utilisant une structure trifonctionnnelle. Dans ce cas, les mêmes conditions opératoires que précédemment ont été utilisées.



Un rendement de 84% a été obtenu pour la formation du composé **49**.

Suite à ces résultats on peut déduire que cette méthode peut être appliquée à nos sondes photoactivables.

2.2.1.4. Propriétés fluorescentes

Nous avons synthétisé ces composés dans le but de pouvoir détecter les protéines d'intérêt *via* les propriétés fluorescentes des coumarines. Afin de voir si nos composés sont bien fluorescents, nous avons réalisé leurs spectres d'émission.

D'après les spectres d'absorption et d'émission de cette série de coumarines (réaction sur les molécules tests), on constate que la conjugaison (passage d'un groupement hydroxy à une fonction éther puis à un triazole) ne modifie ni le maximum d'absorption, ni celui de l'émission. Cependant, on observe une diminution de l'intensité suivant le degré de conjugaison de la coumarine. Ces différentes observations ont également été constatées par Kois *et al.*[184] De plus, dans notre cas, l'intensité de fluorescence varie en fonction des

[184] Kosiova, I; Kois, P. *Synthesis of novel coumarin based fluorescent probes* 10th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry. (www.usc.es/congresos/ecsoc/10/ECSOC10.htm).

groupements photoactivables (benzophénone ou analogues) que l'on fixe, l'intensité la plus élevée étant obtenue avec le motif benzophénone. Les mêmes observations ont été faites pour les composés **48**.

De plus la longueur d'onde d'émission des composés **45a-d** est à 380nm, ce qui est du domaine de l'ultraviolet. Les composés **45a-d,** quant à eux, ont une longueur d'onde d'émission dans le domaine du visible (421nm) ce qui permet une visualisation plus aisée.

Des essais de détection de ces derniers composés pourront donc être réalisés.

2.2.2. La fluorescéine

Nous avons également utilisé un autre fluorophore pour pouvoir détecter nos protéines d'intérêt. Pour cela, nous avons utilisé un dérivé de la fluorescéine. Les dérivés de cette dernière sont très utilisés pour visualiser des matériels biologiques.

2.2.2.1. Synthèse des dérivés de fluorescéine

Différents dérivés de la fluorescéine sont utilisés pour la visualisation par fluorescence. Nous nous sommes orientés vers la formation du composé **51** utilisé par Hocquemiller et son équipe.[185] Chen *et al*.[186] en décrivent la synthèse (Schéma 38).

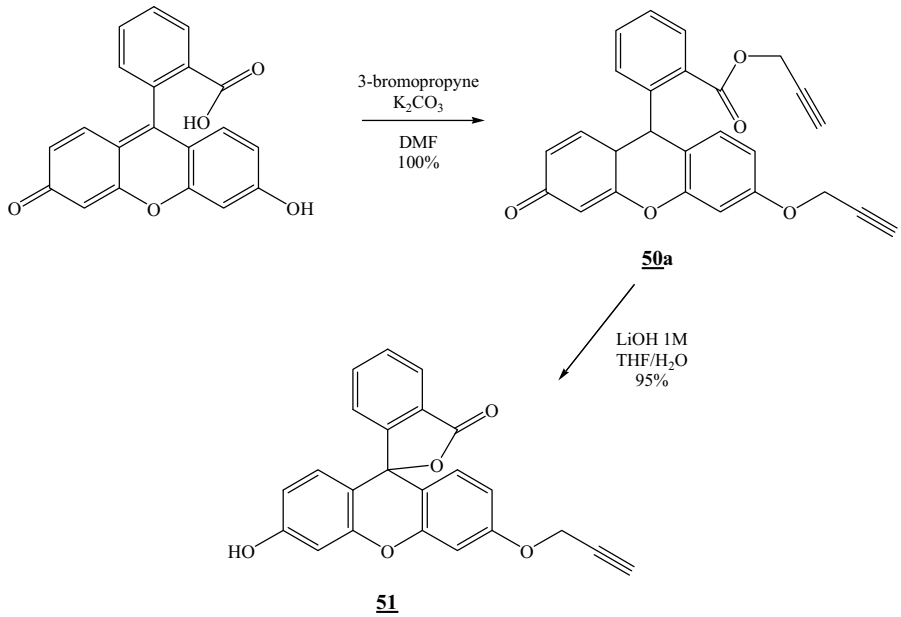
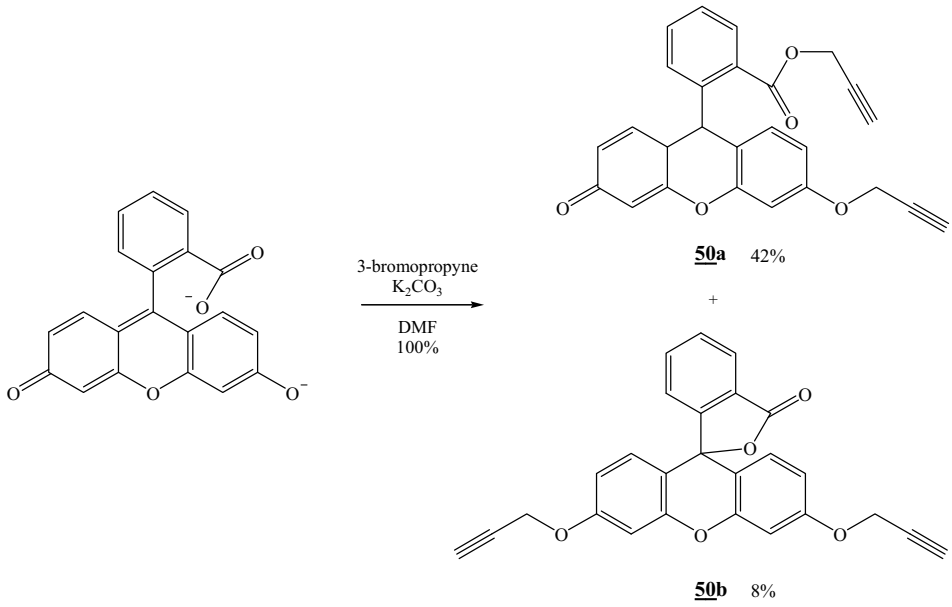


Schéma 38 : Synthèse du dérivé de fluorescéine selon Chen et al[186].

[185] Derbré, S.; Roué, E.; Poupon, E.; Susin, S.A.; Hocquemiller, R. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 979-982.
[186] Chen, L.; Hu, T-S.; Zhu, J.; Wu, H.; Yao, Z-J. *Synlett* **2006**, 1225-1229.

Nous avons donc suivi cette même voie de synthèse afin d'obtenir le composé **51**. Cependant le mode opératoire n'est pas détaillé, nous avons donc suivi celui décrit par Berscheid *et al*.[187] Notre produit de départ est le sel de sodium de la fluorescéine qui est commercial. Ce sel est mis en suspension dans le diméthylformamide en présence de 2,8 équivalents de carbonate de potassium, puis de 4 équivalents de bromure de propargyle. Après 2h à 60°C et addition d'eau, le précipité est filtré.

On pouvait s'attendre à obtenir uniquement le composé **50a** comme l'avait indiqué Chen. Cependant deux composés ont été obtenus. En effet, Berscheid a montré qu'il y avait également formation du composé **50b**.



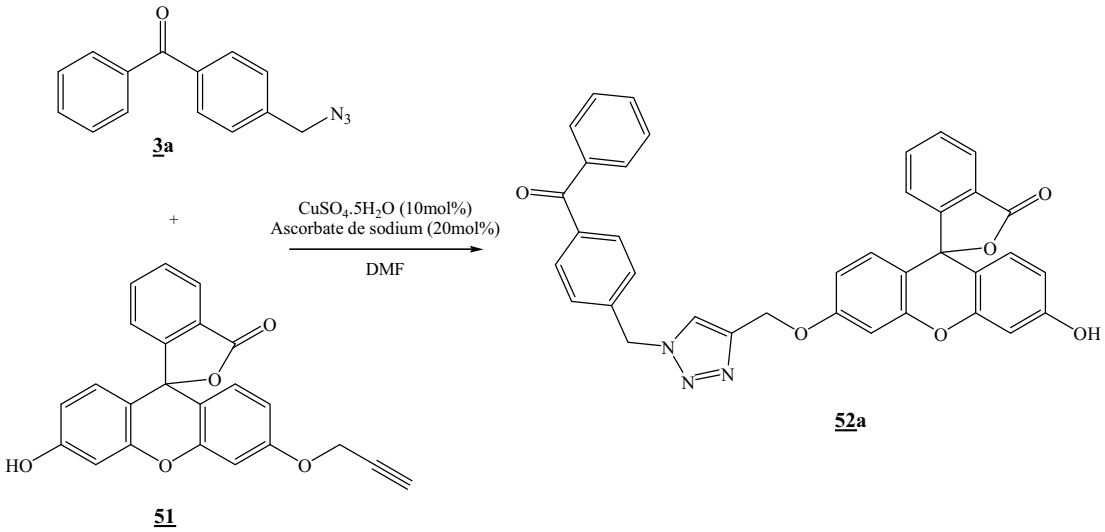
Or dans notre cas, seul le composé **50a** peut être utilisé pour la suite de notre synthèse. La présence d'un second groupement propargyle pose un problème de sélectivité, de réaction non désirée et surtout de perte d'information lors de la réaction de Click Chemistry qui permet la détection. Il est donc nécessaire de purifier ce produit. Afin d'obtenir le composé **50a**, nous avons repris plusieurs fois le mélange obtenu (**50a** et **50b**) dans de l'éther à chaud. Le précipité obtenu lors de cette recristallisation est à chaque fois filtré avant d'ête repris dans l'éther à nouveau. Cette méthode de purification est facile à mettre en œuvre et surtout moins contraignante que celle décrite. Cette méthode est sélective car elle nous a permis de séparer le composé **50a** (produit désiré), qui n'est pas soluble dans l'éther à chaud, du composé **50b**, qui lui est soluble.

[187] Berscheid, R.; Nieger, M.; Vögtle, F. *Chem. Ber*. **1992**, *125*, 2539-2552.

La seconde étape consiste en une saponification suivie d'une cyclisation. Après avoir fait réagir l'hydroxyde de lithium sur le composé **50a**, il y a formation du dérivé spiro **51** par cyclisation intramoléculaire. Ce dernier a été obtenu avec 77% de rendement.
Notre composé ainsi formé peut être utilisé afin de réaliser la réaction de Click Chemistry.

2.2.2.2. Couplage par Click Chemistry

Pour réaliser cette réaction, les conditions classiques (sulfate de cuivre (II) et ascorbate de sodium) ont été utilisées.
Un premier essai a été fait sur la molécule **3a** afin d'obtenir le composé **52a**. Ce dernier a été obtenu avec un rendement de 24%.



2.2.2.3. Essais préliminaires de photomarquage et de détection

Bien que l'optimisation de cette réaction reste encore à faire, afin de pouvoir réaliser cette réaction sur le glutathion marqué, des essais de photomarquage de ce composé **52a** ont été réalisés. Ces premiers essais ont été faits sur des protéines modèles que sont l'albumine (ASB) et la GST Pi.

Ce marquage par photoaffinité consiste à mettre le composé **52a** à différentes concentrations en présence de protéines modèles. Nous rappelons que l'irradiation UV va permettre la formation d'une liaison covalente entre notre composé, de par la présence du motif benzophénone, et notre protéine.

Après une irradiation d'une heure, le mélange est placé sur un gel d'électrophorèse. Les protéines, marquées ou non, migrent sur ce gel suivant leur poids moléculaire. Une fois la migration terminée, la seconde partie de notre molécule (motif fluorescéine) va rendre possible la détection par fluorescence. La Figure 41 représente les résultats obtenus.

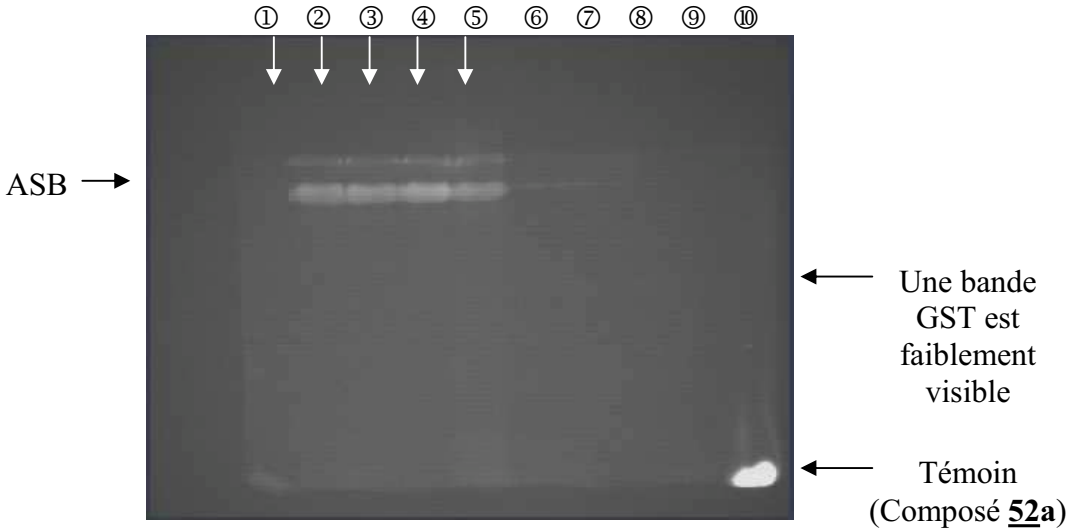


Figure 41 : Détection par fluorescence du gel d'électrophorèse après photomarquage de l'ASB et de la GST Pi par le composé 52a

Légende de la Figure 41 :

Photomarquage entre l'albumine (ASB) et le composé **52a**
-① 10 µL ASB (2 mg/mL) (20 µg) + 14 µL tampon P + 1 µL DMSO (0 µM finale)
-② 10 µL ASB (2 mg/mL) + 14 µL tampon P + 1 µL **52a** (1,25 mM) (50 µM finale)
-③ 10 µL ASB (2 mg/mL) + 14 µL tampon P + 1 µL **52a** (2,5 mM) (100 µM finale)
-④ 10 µL ASB (2 mg/mL) + 14 µL tampon P + 1 µL **52a** (3,125 mM) (250 µM finale)
-⑤ 10 µL ASB (2 mg/mL) + 14 µL tampon P + 1 µL **52a** (12,5 mM) (500 µM finale)
Photomarquage entre la GST Pi et le composé **52a**
-⑥ 24 µL GST Pi (3,5 µg)+ 1 µL DMSO (0 µM finale)
-⑦ 24 µL GST Pi + 1 µL **52a** (1,25 mM) (50 µM finale)
-⑧ 24 µL GST Pi + 1 µL **52a** (2,5 mM) (100 µM finale)
-⑨ 24 µL GST Pi + 1 µL **52a** (3,125 mM) (250 µM finale)
-⑩ 24 µL GST Pi + 1 µL **52a** (12,5 mM) (500 µM finale)
Tampon P : tampon phosphate pH=7,4.

Les cinq premiers essais représentent le photomarquage réalisé en présence d'albumine (ASB). Lors de l'essai ① on constate une absence de fluorescence, ce qui s'explique par le fait que c'est un essai témoin. Cet essai a été réalisé en absence de composé **52a**, et donc absence

du motif fluorescéine ce qui ne permet de visualisation par fluorescence. Lors des essais ② à ⑤, il y une fluorescence visible qui correspond à la bande de l'albumine.
Les cinq essais suivants représentent le photomarquage réalisé en présence de GST Pi. Comme ce fut le cas pour l'essai ①, l'essai ⑥ représente l'essai témoin (absence de composé **52a**). Cependant pour les essais ⑦ à ⑩, on observe qu'une très faible bande fluorescente. Ceci peut s'expliquer par le fait de la trop faible concentration en GST Pi.

Remarque :
Chaque protéine migre différemment et correspond donc à une bande caractéristique sur le gel d'électrophorèse. Afin de pouvoir les identifier de façon précise, des marqueurs protéiques de poids moléculaire connus sont généralement placés sur le bord du gel avant la migration. Ainsi par effet de comparaison on peut déterminer le poids moléculaire des protéines.

Ces résultats permettent de dire qu'il y a bien fixation covalente du composé **52a** sur les protéines modèles et que de ce fait ces protéines peuvent être identifiées par fluorescence. Ils permettent donc de valider notre méthode de détection.
Afin de confirmer et d'affiner notre démarche, d'autres essais de photomarquage seront réalisés, notamment avec l'évaluation de l'influence du temps d'irradiation.
L'étape suivante de notre démarche est la réalisation d'essais de photoaffinité entre les structures trifonctionnelles couplées au glutathion et des protéines modèles (GST).

Afin de pouvoir identifier et caractériser les protéines d'intérêt, nous avons mis en œuvre diverses techniques de détection comme la chimiluminescence ou la fluorescence. Pour cela, la ligation de Staudinger ainsi que la Click Chemistry s'avère être des méthodes de choix. Ces différentes méthodes nécessitent encore des améliorations ainsi que des recherches de conditions opératoires. Cependant les différents essais déjà réalisés ont permis de valider et de confirmer notre démarche.

Partie expérimentale

Ligation de Staudinger ***231***

Synthèse de l'o-diphénylphosphinophénol 231
Ethoxyméthoxybenzène (30) 231
[2-(Ethoxyméthoxy)phényl](diphényl)phosphine (31) 232
2-(Diphénylphosphino)phénol (32) 233

Couplage à la biotine 234
2-(Diphénylphosphino)phényl5-(2-oxohexahydro-1*H*-thiéno[3,4-*d*]imidazol-4-yl) pentanoate (33) 234

Click Chemistry ***235***

Synthèse de la biotine modifiée 235
1-{[5-(2-Oxohexahydro-1*H*-thiéno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanoyl]oxy}-2,5-pyrrolidinedione (34) 235
5-(2-Oxohexahydro-1*H*-thiéno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-*N*-(2-propynyl)pentanamide (35) 236

Essais avec une molécule test 237
N-{[1-(4-Benzoylbenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl]méthyl}-5-(2-oxohexahydro-1*H*-thiéno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamide (36) 237

Détection par fluorescence avec des dérivés de coumarines ***238***

Synthèse des alcynes 238
4-Méthyl-7-(2-propynyloxy)-2*H*-chromen-2-one (41) 238
4-Méthyl-7,8-bis(2-propynyloxy)-2*H*-chromen-2-one (42) 239
4-Méthyl-5,7-bis(2-propynyloxy)-2*H*-chromen-2-one (43) 240
2-(2-Oxo-2*H*-benzo[*h*]chromen-4-yl)-*N*-(2-propynyl)acétamide (44) 240

Réaction de Click Chemistry sur les molécules bifonctionnelles 241
7-{[1-(4-Benzoylbenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl]méthoxy}-4-méthyl-2*H*-chromen-2-one (45a) 242
7-({1-[(5-Benzoyl-2-thienyl)méthyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}méthoxy)-4-méthyl-2H-chromen-2-one (45b) 242
4-Méthyl-7-({1-[4-(2-thiénylcarbonyl)benzyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}méthoxy)-2H-chromen-2-one (45c) 243
4-Méthyl-7-[(1-{[5-(2-thiénylcarbonyl)-2-thienyl]méthyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthoxy]-2H-chromen-2-one (45d) 243
7,8-Bis{[1-(4-benzoylbenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]méthoxy}-4-méthyl-2H-chromen-2-one (46a) 244
7,8-Bis({1-[(5-benzoyl-2-thiényl)méthyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}méthoxy)-4-méthyl-2H-chromen-2-one (46b) 245
4-Méthyl-7,8-bis({1-[4-(2-thiénylcarbonyl)benzyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}méthoxy)-2H-chromen-2-one (46c) 245
4-Méthyl-7,8-bis[(1-{[5-(2-thiénylcarbonyl)-2-thiényl]méthyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthoxy]-2H-chromen-2-one (46d) 246
5,7-Bis{[1-(4-benzoylbenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]méthoxy}-4-méthyl-2H-chromen-2-one (47a) 247
5,7-Bis({1-[(5-benzoyl-2-thiényl)méthyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}méthoxy)-4-méthyl-2H-chromen-2-one (47b) 248

4-Méthyl-5,7-bis({1-[4-(2-thiénylcarbonyl)benzyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}méthoxy)-2H-chromen-2-one (47c) 248
4-Méthyl-5,7-bis[(1-{[5-(2-thiénylcarbonyl)-2-thiényl]méthyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthoxy]-2H-chromen-2-one (47d) 249
N-{[1-(4-Benzoylbenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]méthyl}-2-(2-oxo-2H-benzo[h]chromen-4-yl)acétamide (48a) 250
N-({1-[(5-Benzoyl-2-thiényl)méthyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}méthyl)-2-(2-oxo-2H-benzo[h]chromen-4-yl)acétamide (48b) 251
2-(2-Oxo-2H-benzo[h]chromen-4-yl)-N-({1-[4-(2-thiénylcarbonyl)benzyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}méthyl)acétamide (48c) 251
2-(2-Oxo-2H-benzo[h]chromen-4-yl)-N-[(1-{[5-(2-thiénylcarbonyl)-2-thiényl]méthyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl]acétamide (48d) 252

Essais avec une structure trifonctionnelle 253
1-[(4-{4-[(4-{[(4-Méthyl-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy]méthyl}-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)méthyl]benzoyl}benzoyl)oxy]-2,5-pyrrolidinedione (49) 253

Détection par fluorescence avec des dérivés de la fluorescéine 254

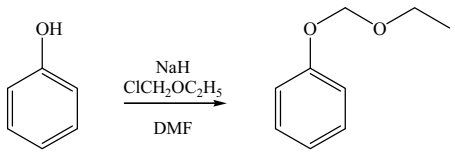
Formation du dérivé alcyne de la fluorescéine 254
2-Propynyl 2-[3-oxo-6-(2-propynyloxy)-3*H*-xanthen-9-yl]benzoate (50a) 254
3',6'-Bis(2-propinyloxy)spiro[phtalid-3,9'-xanthen](50b) 255
(3'-(2-propinyloxy)-6'-hydroxy)spiro[phtalid-3,9'-xanthen](51) 255
2-(3-{[1-(4-benzoylbenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl]methoxy}-6-hydroxy)spiro[phtalid-3,9-xanthen] (52a) 256

Ligation de Staudinger

Synthèse de l'o-diphénylphosphinophénol

Ethoxyméthoxybenzène (<u>30</u>)

$C_9H_{12}O_2$ *MW=152,19g.mol^{-1}*



<u>30</u>

A un mélange de 400mg (1éq., 10mmol) d'hydrure de sodium (60% dans l'huile) dans 5ml de diméthylformamide sec, à 0°C et sous agitation, sont ajoutés 941mg (1éq., 10mmol) de phénol. Après 30min sont ajoutés 1,39ml (1,5éq., 15mmol) de chlorométhyléthyléther. Une fois revenu à température ambiante, le milieu réactionnel est agité pendant 30min puis 20ml d'eau sont ajoutés. Le produit obtenu est extrait à l'heptane (3x10ml) puis lavé deux fois avec une solution de soude à 0,1N. Les phases organiques sont regroupées puis séchées sur sulfate de magnésium et évaporées sous pression réduite. Le produit obtenu a directement été remis en réaction.

Aspect : huile incolore

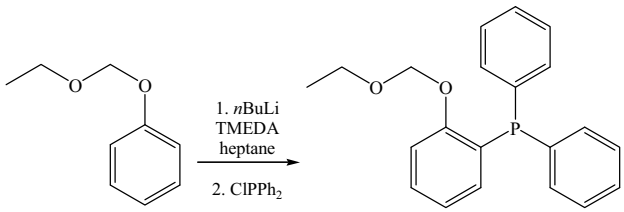
Rdt: 55%

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,33-7,26 (m, 2H); 7,07-6,97 (m, 3H); 5,24 (s, 2H, OC*H*$_2$O); 3,75 (q, 2H, J=7,3Hz, OC*H*$_2$CH$_3$); 1,24 (t, 3H, J=7,3Hz, OCH$_2$C*H*$_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 157,4; 129,6 (2C); 121,7; 115,3 (2C); 93,1 (OCH$_2$O-); 64,2 (-OCH$_2$); 15,1 (CH$_3$).

[2-(Ethoxyméthoxy)phényl](diphényl)phosphine (<u>31</u>)

$C_{21}H_{21}O_2P$ *MW=336,36g.mol^{-1}*



<u>30</u> **<u>31</u>**

Sous argon et à 0°C, à 1,38ml d'une solution 2,5M dans l'hexane de *n*-BuLi (2,5éq., 3,45mmol) et de 0,48ml (2,3éq., 3,17mmol) de *N,N,N',N'*-tétraméthyléthylènediamine dans 1ml d'heptane, sont ajoutés 210mg (1éq., 1,38mmol) de méthoxyéthylphényléther (composé **<u>30</u>**) dissous dans 1,5ml d'heptane. Une fois l'ajout effectué, le milieu est agité à température ambiante. La solution devient jaune et un précipité se forme au bout de 30min. Après 2h, le milieu est refroidi dans un bain de glace pour ajouter goutte à goutte 248µl (1éq., 1,38mmol) de chlorodiphénylphosphine. Le milieu réactionnel est agité pendant 16h à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite et le résidu obtenu est repris dans un minimum de méthanol puis placé au frigo. Après 1h, des cristaux se forment. Ils sont alors filtrés sur Büchner et lavés avec du méthanol froid. Le produit ainsi obtenu est pur.

Aspect : cristaux incolores

Rdt: 93%

Pf : 84-86°C

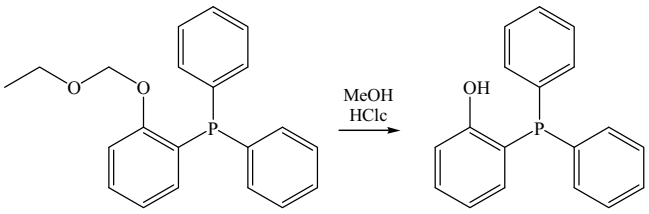
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,35-7,29 (m, 11H); 7,14 (dd, 1H, J=7,3Hz et J=3,7Hz); 6,91 (t, 1H, J=7,3Hz); 6,72-6,67 (m, 1H); 5,13 (s, 2H, $OCH_2OC_2H_5$); 3,39 (q, 2H, J=7,1Hz, OCH_2CH_3); 1,07 (t, 3H, J=7,1Hz, OCH_2CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 158,8 (C=O); 136,7; 134,2; 133,9 (4C); 133,5; 130,3 (2C); 128,7; 128,4 (4C); 126,6; 122,0; 113,5; 92,7 (OCH_2O-); 64,1 (-OCH_2); 15,0 (CH_3).

RMN ^{31}P ($CDCl_3$) δ : -16,2.

2-(Diphénylphosphino)phénol (<u>32</u>)

$C_{18}H_{15}OP$ *MW=278,28g.mol^{-1}*



<u>31</u> **<u>32</u>**

A un mélange de 0,5ml d'acide chlorhydrique concentré et 2ml de méthanol dégazé à l'argon sont ajoutés sous argon 101mg (1éq., 0,3mmol) de [2-(éthoxyméthoxy)phényl](diphényl) phosphine (composé **<u>31</u>**). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 1h puis évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est extrait au chloroforme (2x10ml) et lavé avec une solution de soude à 0,1N. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous pression réduite.

Aspect : cristaux gris

Rdt: 44-97%

Pf : 144-147°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,34-7,26 (m, 11H); 6,97-6,88 (m, 3H).

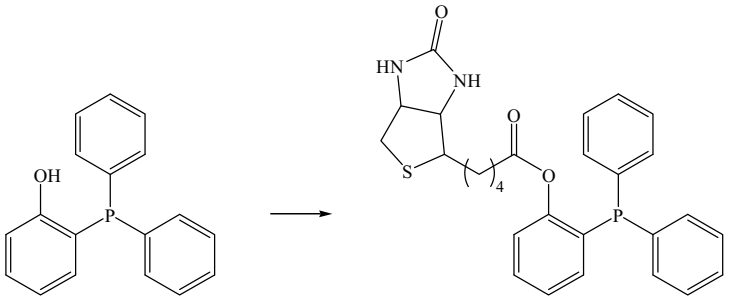
RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 159,1 (C=O); 135,0 (2C); 134,7 (2C); 133,4 (4C); 131,5; 128,8 (4C); 128,6 (2C); 121,1; 115,6.

RMN ^{31}P ($CDCl_3$) δ : -29,1 (avant lavage à la soude δ= +20,8ppm).

Couplage à la biotine

2-(Diphénylphosphino)phényl-5-(2-oxohexahydro-1*H*-thiéno[3,4-*d*]imidazol-4-yl) pentanoate (33)

$C_{28}H_{29}N_2O_3PS$ $MW=504,58 g.mol^{-1}$



32 **33**

La réaction est réalisée sous argon et le dichlorométhane distillé.

A un mélange de 56mg (1éq., 0,20mmol) de composé **32**, 58,6mg (1,2éq., 0,24mmol) de biotine, 2,44mg (0,1éq., 0,02mmol) de *N,N*-diméthylaminopyridine (DMAP) et 0,6ml de dichlorométhane sont ajoutés goutte à goutte 57,8mg (1,4éq., 0,28mmol) de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dissous dans 0,6ml de dichlorométhane. Après une nuit sous agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré sur coton, lavé au dichlorométhane. La phase organique est alors lavée avec une solution de soude 0,1N, séchée sous pression réduite puis concentrée sous pression réduite.

Aspect : solide beige

Rdt: 57% (avec présence de DCU)

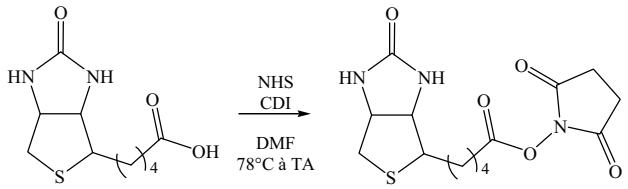
RMN ^{31}P ($CDCl_3$) δ : -16,3 (composé oxydé +39,4ppm)

Click Chemistry

Synthèse de la biotine modifiée

1-{[5-(2-Oxohexahydro-1*H*-thiéno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanoyl]oxy}-2,5-pyrrolidinedione (<u>34</u>) [188]

$C_{14}H_{19}N_3O_5S$ *MW=341,38g.mol^{-1}*



<u>34</u>

La biotine et la *N*-hydroxysuccinimide sont séchées au dessiccateur toute une nuit avant utilisation. La réaction se fait sous argon.

Une solution de 253mg (1éq., 1,03mmol) de biotine dissous dans 5ml de diméthylformamide anhydre est chauffée à 78°C. Après parfaite dissolution, 173mg (1éq., 1,03mmol) de *N,N*-carbonyldiimidazole sont ajoutés. Le milieu réactionnel, chauffé jusqu'à totale élimination du dioxyde de carbone, est ensuite agité à température ambiante pendant 1h30. Durant ce temps, il y a formation d'un précipité blanc qui disparaît après l'ajout de 119mg (1éq., 1,03mmol) de *N*-hydroxysuccinimide dissous dans 5ml de diméthylformamide anhydre. Le mélange est agité pendant toute une nuit. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu obtenu est recristallisé dans le 2-propanol.

Aspect : solide rose pâle

Rdt : 47%

Pf : 194°C (lit.[188] 209-211°C)

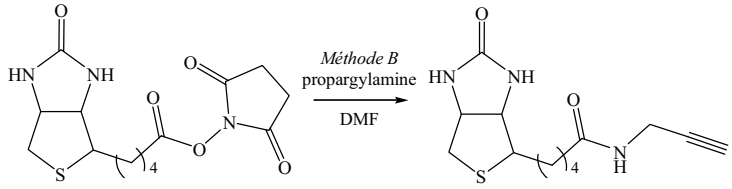
RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 6,41 (s, 1H, N*H*); 6,35 (s, 1H, N*H*); 4,32-4,27 (m, 1H); 4,16-4,10 (m, 1H); 3,13-3,05 (s, 1H); 2,85-2,79 (m, 1H); 2,79 (s, 4H, CH_{2suc}); 2,66 (t, 2H, J=7,0Hz); 2,59-2,54 (m, 1H); 1,67-1,31 (m, 6H).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 170,7 (2C=O); 169,4 (C=O); 163,1 (C=O); 61,4; 59,6; 55,7; 30,4; 28,5; 28,3; 25,9 (2CH_{2suc}); 25,7; 24,7.

[188] Chaturvedi, D.N.; Knittel, J.J.; Hruby, J.V.J.;L. Castrucci, M.L.; Hadleyt, M.C. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1406-1410.

5-(2-Oxohexahydro-1*H*-thiéno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-*N*-(2-propynyl)pentanamide (<u>35</u>)

$C_{13}H_{19}N_3O_2S$ *MW=281,37g.mol^{-1}*

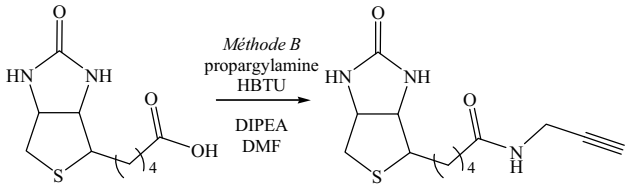


<u>34</u> <u>35</u>

Méthode A[189] *:*

A une solution de 78mg (1éq., 0,23mmol) de composé <u>**34**</u> dans 1ml de diméthylformamide sont ajoutés 31µl (2éq., 0,46mmol) de propargylamine. Le milieu réactionnel est agité pendant 24h à température ambiante puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié sur gel de silice (chloroforme/méthanol 10:1).

Rdt : 65%



<u>35</u>

Méthode B[190] *:*

100mg (1éq., 0,41mmol) de D-(+)-biotine, 45mg (2éq., 0,82mmol) de propargylamine, 311mg (2éq., 0,82mmol) de *o*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium (HBTU) et 106mg (2éq., 0,82mmol) de *N,N*-diisopropyléthylamine sont dissous dans 5ml de diméthylformamide et agité à température ambiante pendant 2h. Le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite puis purifié sur gel de silice (chloroforme/méthanol 10:1).

Rdt : 60%

Aspect : solide incolore

Pf : 163-164°C

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ :8,24-8,20 (m, 1H, N*H*); 6,42 (s, 1H, N*H*); 6,35 (s, 1H, N*H*); 4,31-4,26 (m, 1H); 4,13-4,09 (m, 1H); 3,83-3,80 (dd, 2H, J=2,5Hz et J=5,4Hz); 3,09-3,05 (m,

[189] Zhao, X.Z.; Semenova, E.A.; Liao, C.; Nicklaus, M.; Pommier, Y.; Burke, T.R.Jr. *Bioorg. Med. Chem*. **2006**, *14*, 7816-7825.

[190] Sawa, M.; Hsu, T-L.; Itoh, T.; Sugiyama, M.; Hanson, S.R.; Vogt, P.K.; Wong, C-H. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **2006**, *103*, 1271-12376.

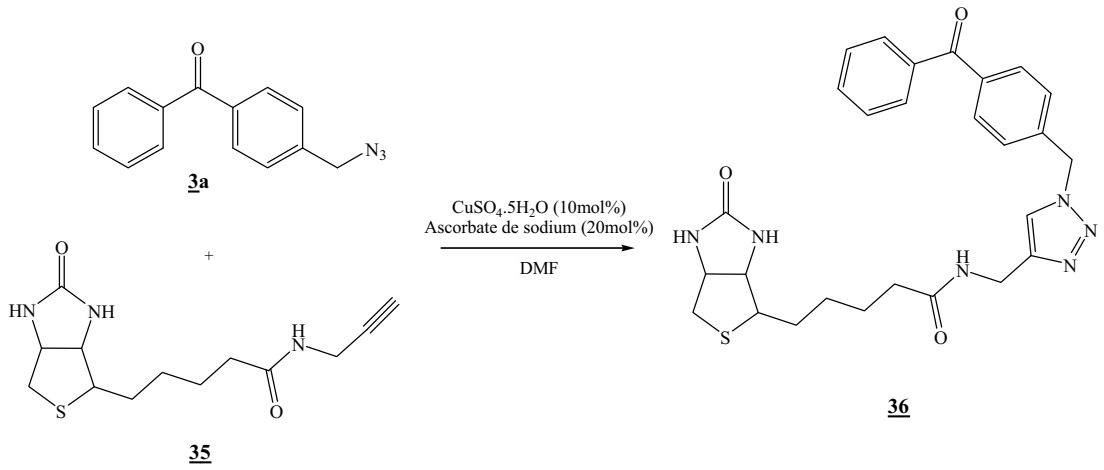
2H); 2,80 (dd, 1H, J=5,4Hz et J=11,4Hz); 2,56 (d, 1H, J=11,4Hz); 2,06 (t, 2H, J=7,2Hz); 1,61-1,25 (m, 6H).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 172,3 (C=O); 163,3 (C=O); 81,9; 73,4; 61,5; 59,7; 55,9; 53,4; 28,7; 28,5; 28,2; 28,1; 25,6.

Essais avec une molécule test

_N_-{[1-(4-Benzoylbenzyl)-1_H_-1,2,3-triazol-4-yl]méthyl}-5-(2-oxohexahydro-1_H_-thiéno[3,4-_d_]imidazol-4-yl)pentanamide (<u>36</u>)

$C_{27}H_{30}N_6O_3S$ *MW=518,63g.mol^{-1}*



A 3,7mg (0.1éq., 0,015mmol) de sulfate de cuivre pentahydraté dissous dans 0,5ml de diméthylformamide sont ajoutés 5,9mg (0,2éq., 0,03mmol) d'ascorbate de sodium. Après quelques minutes d'agitation, 50mg (1,2éq., 0,18mmol) de composé **<u>35</u>** sont ajoutés au milieu ainsi que 0,5ml de diméthylformamide. Après changement de coloration du milieu, une solution de 35,2mg (1éq., 0,15mmol) de composé **<u>3a</u>** dissous dans 0,5ml de diméthylformamide est additionnée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité pendant 36h à température ambiante à l'abri de la lumière. La réaction est stoppée par l'ajout de 10ml d'eau. Le précipité obtenu est filtré sur Büchner et lavé à l'eau.

Aspect : solide incolore

Rdt : 32%

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 7,79-7,76 (m, 4H); 7,67 (t, 1H, J=7,2Hz); 7,54 (d, 2H, J=7,2Hz); 7,45 (d, 2H, J=7,2Hz); 5,70 (s, 2H); 4,53-4,46 (m, 1H); 4,45-4,38 (m, 3H); 4,30-4,21 (m, 1H); 3,24-3,11 (m,1H); 2,88 (dd, 1H, J=5,1Hz et J=11,2Hz); 2,68 (d, 1H, J=11,2Hz); 2,18 (t, 2H, J=7,0Hz, 1H);1,78-1,50 (m, 4H); 1,47-1,30 (m, 2H).

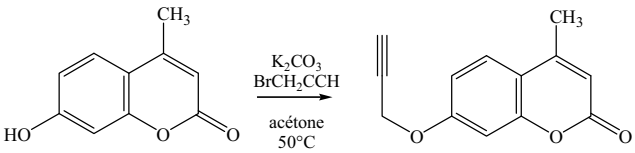
Détection par fluorescence avec des dérivés de coumarines

Les composés **37**-**40** ont été synthétisés par Juan Carlos Rodríguez-Domínguez et sont décris dans la littérature.[181]

Synthèse des alcynes

4-Méthyl-7-(2-propynyloxy)-2*H*-chromen-2-one (41)

$C_{13}H_{10}O_3$ $MW=214,22g.mol^{-1}$



37 **41**

A 2,64g (1éq., 15mmol) de 7-Hydroxy-4-méthylcoumarin (ou 4-méthylumbelliferone) sont ajoutés 40ml d'acétone sec puis 2,07g (1éq., 15mmol) de carbonate de potassium anhydre. Après 10min d'agitation, 1,67ml (1éq., 15mmol) de bromure propargylique en solution dans le toluène sont ajoutés au milieu. Après 18h à 50°C, le solvant est évaporé. Le résidu est extrait à l'acétate d'éthyle (30ml) puis avec une solution de soude 0,1N pour obtenir un pH=9, puis deux fois à l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur gel de silice (chloroforme).

Aspect : solide beige clair

Rdt: 90%

Pf : 135-136°C (lit[191]. 134°C)

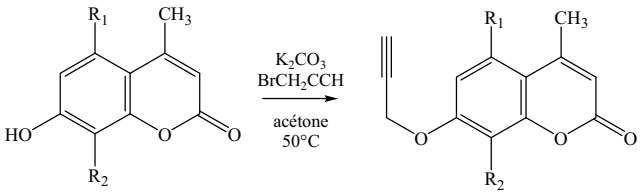
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,55-7,51 (m, 1H); 6,95-6,91 (m, 2H); 6,17 (s, 1H); 4,74 (d, 2H, J=2,3Hz); 2,57 (t, 1H, J=2,3Hz); 2,41 (d, 3H, J=1,2Hz, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 161,1 (C=O); 160,3; 155,0; 152,4; 125,6; 114,2; 112,7; 112,4; 102,1; 77,4 (C≡); 76,5 (≡CH); 56,2; 18,7 (CH_3).

HRMS-MALDI : *m/z* $[M+H]^+$ calc. : 215,07027, exp. : 215,07023.

[191] Rodighiero, P.; Manzini, P.; Pastorini, G.; Bordin, F.; Guiotto, A. *J. Heterocycl. Chem.* **1987**, *24*, 485-488.

Mode opératoire général pour les coumarines possédant deux groupements hydroxy



38 R_1=H, R_2=OH
39 R_1=H, R_2=OH

42 R_1=H, R_2=OH
43 R_1=H, R_2=OH

A 2,88g (1éq., 15mmol) de 5,7-dihydroxy-4-méthyl-2*H*-chromen-2-one (R_1=OH et R_2=H) ou de 7,8-dihydroxy-4-méthyl-2*H*-chromen-2-one (R_1=H et R_2=OH) dissous dans 40ml d'acétone sec, sont ajoutés 4,15g (2éq., 30mmol) de carbonate de potassium anhydre. Après une agitation de 15min, 3,34ml (2éq., 30mmol) de bromure de propargyle sont ajoutés à la solution. Le milieu réactionnel est chauffé à 50°C pendant 18h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est extrait à l'acétate d'éthyle (30ml) et lavé avec une solution de soude 0,1N puis à l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur gel de silice (chloroforme/acétone 10:1).

4-Méthyl-7,8-bis(2-propynyloxy)-2*H*-chromen-2-one (42)

$C_{16}H_{12}O_4$ *MW=268,26g.mol^{-1}*

Coumarine de départ : 7,8-dihydroxy-4-méthyl-2*H*-chromen-2-one (R_1=H et R_2=OH) (**38**)

Aspect : solide jaune pâle

Rdt: 80%

Pf : 135-137°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,35 (d, 1H, J=9,0Hz); 7,05 (d, 1H, J=9,0Hz); 6,18 (d, 1H, J=1,2Hz); 4,90 (d, 2H, J=2,4Hz); 4,87 (d, 2H, J=2,4Hz); 2,55 (t, 1H, J=2,4Hz); 2,44 (t, 1H, J=2,4Hz); 2,41 (d, 3H, J=1,2Hz, C*H*$_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 160,2 (C=O); 153,5; 152,4; 148,2; 134,2; 120,0; 115,5; 112,9; 110,2; 78,5 (C≡); 77,7 (C≡); 77,2 (≡CH); 75,9 (≡CH); 60,6 (OCH_2); 57,0 (OCH_2); 18,8 (CH_3).

HRMS-MALDI : *m/z* $[M+H]^+$ calc. : 269,08084, exp. : 269,08087.

4-Méthyl-5,7-bis(2-propynyloxy)-2*H*-chromen-2-one (<u>43</u>)

$C_{16}H_{12}O_4$ *MW=268,26g.mol^{-1}*

Coumarine de départ : 5,7-dihydroxy-4-méthyl-2*H*-chromen-2-one (R_1=OH et R_2=H) (**<u>39</u>**)

Aspect : solide beige

Rdt: 91%

Pf : 186-188°C

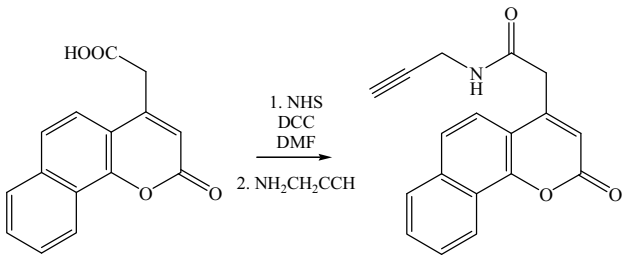
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 6,59 (d, 1H, J=2,5Hz), 6,47 (d, 1H, J=2,5Hz), 6,00 (d, 1H, J=1,2Hz), 4,75 (d, 2H, J=2,5Hz), 4,74 (d, 2H, J=2,5Hz), 2,60-2,49 (m, 5H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 160,7 (C=O); 160,2; 156,9; 156,7; 154,0; 112,3; 105,8; 97,3; 95,4; 77,2 (2C≡); 76,6 (2≡CH); 56,5 (OCH_2); 56,2 (OCH_2); 24,3 (CH_3).

HRMS-MALDI : *m/z* $[M+H]^+$ calc. : 269,08084, exp. : 269,08083.

2-(2-Oxo-2*H*-benzo[*h*]chromen-4-yl)-*N*-(2-propynyl)acétamide (<u>44</u>)

$C_{18}H_{13}NO_3$ *MW=291,30g.mol^{-1}*



<u>40</u> **<u>41</u>**

A 1g (1éq., 3,93mmol) d'acide (2-oxo-2*H*-benzo[*h*]chromen-4-yl)acétique dissous dans 5ml de diméthylformamide sont ajoutés 476mg (1,05éq., 4,13mmol) de *N*-hydroxysuccinimide. Sont ensuite ajoutés 1,7g (2,1éq., 8,28mmol) de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide ainsi que 5ml de diméthylformamide. Après 24h d'agitation à température ambiante, 276µl (1,02éq., 4,02mmol) de propargylamine sont additionnés. Après une nuit sous agitation, le milieu est filtré sur coton et le filtrat est récupéré dans une fiole à vide contenant 30ml d'eau. Le précipité obtenu est filtré sur Büchner et lavé à l'eau.

Aspect : solide beige foncé

Rdt: 57%

Pf : 245-246°C

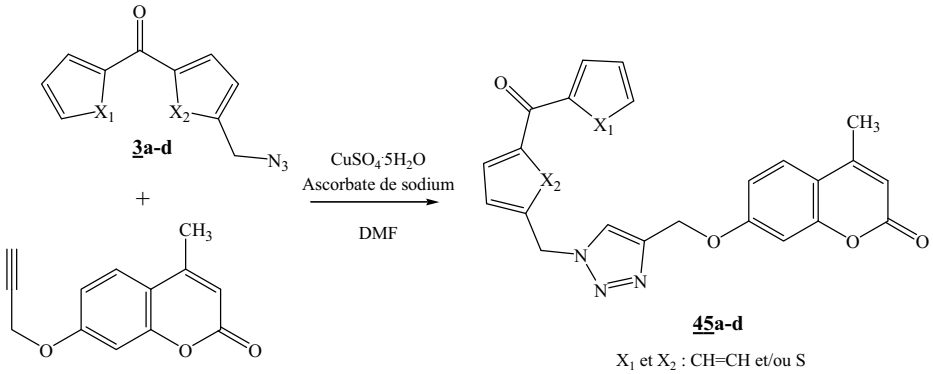
RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 8,71 (t, 1H, J=5,3Hz, N*H*); 8,38-8,34 (m, 1H); 8,05-8,00 (m, 1H); 7,84 (d, 1H, J=8,7Hz); 7,74-7,69 (m, 3H); 6,55 (s, 1H); 3,93-3,88 (m, 4H); 3,17 (t, 1H, J=2,5Hz).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 167,5 (C=O); 159,5 (C=O); 151,4; 149,9; 134,2; 128,7; 127,9; 127,4; 123,9: 122,2; 121,5; 121,2; 115,6; 114,6; 80,7 (C≡); 73,2 (≡CH); 39,7 (CH_2); 28,2 ($NHCH_2$).

HRMS-MALDI : *m/z* $[M+H]^+$ calc. : 292,09682, exp.: 292,09687.

Réaction de Click Chemistry sur les molécules bifonctionnelles

Réaction entre la coumarine **41** *et les composés* **3a-d**



Mode opératoire général

A 24,9mg (0.1éq., 0,1mmol) de sulfate de cuivre pentahydraté dissous dans 0,5ml de diméthylformamide sont ajoutés 39,6mg (0,2éq., 0,2mmol) d'ascorbate de sodium. Après quelques minutes d'agitation, 214mg (1éq., 1mmol) de 4-Méthyl-7-(2-propynyloxy)-2*H*-chromen-2-one (composé **41**) sont ajoutés au milieu ainsi que 0,5ml de diméthylformamide. Après changement de coloration du milieu, une solution de 240mg (1,01éq., 1,01mmol) de composé **3a** ou 246mg (1,01éq., 1,01mmol) de composé **3b** ou **3c**, ou 252mg (1,01éq., 1,01mmol) de composé **3d**, dissous dans 0,5ml de diméthylformamide est additionnée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité pendant 36h à température ambiante à l'abri de la lumière. La réaction est stoppée par l'ajout de 10ml d'eau. Le précipité obtenu est filtré sur Büchner et lavé à l'eau.

7-{[1-(4-Benzoylbenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl]méthoxy}-4-méthyl-2*H*-chromen-2-one (45a)

$C_{27}H_{21}N_3O_4$ *MW=451,47g.mol^{-1}*

Molécule de départ : X_1=X_2 : CH=CH (composé **3a**)

Aspect : solide jaune pâle

Rdt: 98%

Pf : 139-140°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,80 (t, 4H, J=8,0Hz); 7,64-7,59 (m, 2H); 7,52-7,46 (m, 3H); 7,38 (d, 2H, J=8,0Hz); 6,96-6,92 (m, 2H); 6,15 (s, 1H); 5,65 (s, 2H, NC*H*$_2$); 5,27 (s, 2H, OC*H*$_2$); 2,40 (s, 3H, C*H*$_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 195,8 (C=O); 161,1 (C=O); 161,0; 155,1; 152,4; 138,5; 138,1; 137,1; 132,8; 130,8 (2C); 130,0 (2C); 128,4 (3C); 127,8 (2C); 125,7; 123,0; 114,1; 112,4; 112,3; 102,1; 62,3 (OCH_2); 53,9 (NCH_2); 18,7 (CH_3).

HRMS-MALDI : *m/z* $[M+H]^+$ calc.: 452,16048, exp.: 452,16049.

7-({1-[(5-Benzoyl-2-thienyl)méthyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}méthoxy)-4-méthyl-2H-chromen-2-one (45b)

$C_{25}H_{19}N_3O_4S$ *MW=457,50g.mol^{-1}*

Molécule de départ : X_1 : CH=CH et X_2 : S (composé **3b**)

Aspect : solide jaune pâle

Rdt : 97%

Pf : 108-111°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,78 (d, 2H, J=7,2Hz); 7,73 (s, 1H); 7,59 (m, 1H); 7,54-7,47 (m, 4H); 7,14 (d, 1H, J=4,0Hz); 6,97-6,92 (m, 2H); 6,15 (s, 1H); 5,78 (s, 2H, NC*H*$_2$); 5,27 (s, 2H, OC*H*$_2$); 2,40 (s, 3H, C*H*$_3$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 187,7 (C=O); 161,2 (C=O); 161,0; 155,1; 152,5; 144,7; 144,5; 143,8; 137,3; 134,8; 132,7; 129,1 (2C); 128,6 (3C); 125,7; 122,9; 114,1; 112,4; 112,3; 102,1; 62,2 (OCH_2); 48,8 (NCH_2); 18,6 (CH_3).

HRMS-MALDI : *m/z* $[M+H]^+$ calc.: 458,11690, exp.: 458,11697.

4-Méthyl-7-({1-[4-(2-thiénylcarbonyl)benzyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}méthoxy)-2H-chromen-2-one (45c)

$C_{25}H_{19}N_3O_4S$ *MW=457,50g.mol^{-1}*

Molécule de départ : X_1 : S et X_2 : CH=CH (composé **3c**)

Aspect : solide jaune pâle

Rdt : 56%

Pf : 144-146°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,87 (d, 2H, J=8,4Hz); 7,75 (dd, 1H, J=4,9Hz et J=1.1Hz); 7,65 (s, 1H); 7,62 (dd, 1H, J=3,8Hz et J=1,1Hz); 7,51 (d, 1H, J=8,4Hz); 7,40 (d, 2H, J=8,4Hz); 7,17 (dd, 1H, J=4,9Hz et J=3,8Hz); 6,97-6,93 (m, 2H); 6,16 (s, 1H); 5,65 (s, 2H, NCH_2); 5,27 (s, 2H, OCH_2); 2,40 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 187,3 (C=O); 164,7; 161,1 (C=O); 161,0; 155,1; 152,4 (2C); 138,6; 138,4; 135,0; 134,7; 130,0 (2C); 128,1; 128,0 (3C) 127,5; 114,1; 112,4; 112,3; 102,1; 62,2 (OCH_2); 53,9 (NCH_2); 18,7 (CH_3).

HRMS-MALDI : *m/z* $[M+H]^+$ calc.: 458,11690, exp.: 458,11679.

4-Méthyl-7-[(1-{[5-(2-thiénylcarbonyl)-2-thienyl]méthyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthoxy]-2H-chromen-2-one (45d)

$C_{23}H_{17}N_3O_4S_2$ *MW=463,53g.mol^{-1}*

Molécule de départ : X_1=X_2 : S (composé **3d**)

Aspect : solide jaune

Rdt : 94%

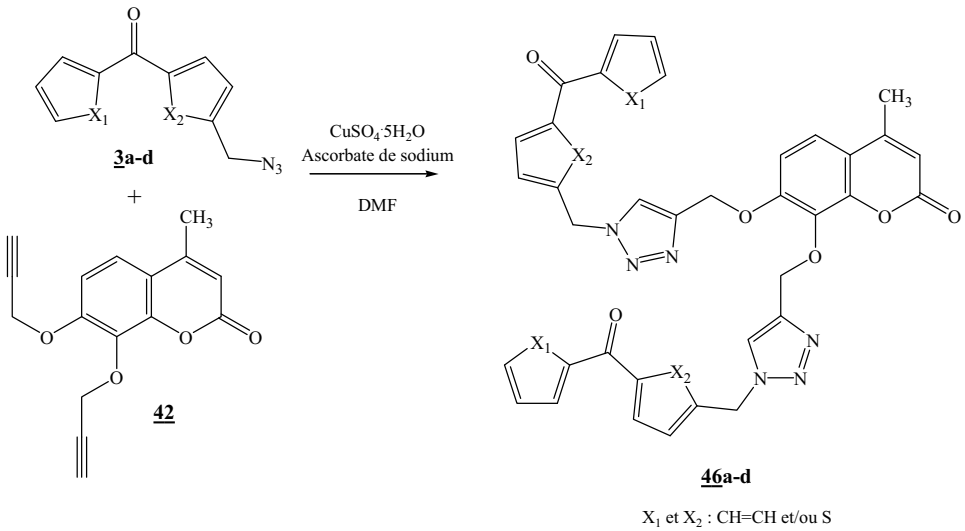
Pf : 173-175°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,86 (dd, 1H, J=3,8Hz et J=1,1Hz); 7,77 (d, 1H, J=3,8Hz); 7,73-7,70 (m, 2H); 7,51 (d, 1H, J=8,7Hz); 7,21-7,15 (m, 2H); 6,96-6,91 (m, 2H); 6,14 (s, 1H); 5,78 (s, 2H, NCH_2); 5,26 (s, 2H, OCH_2); 2,39 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 178,2 (C=O); 161,1 (C=O); 161,0; 155,1; 152,4; 144,1; 143,7; 142,2; 134,0; 133,4; 133,0; 128,6; 128,1; 125,7 (2C); 122,8; 114,1; 112,4; 112,3; 102,1; 62,2 (OCH_2); 48,7 (NCH_2); 29,7 (CH_3).

HRMS-MALDI : *m/z* $[M+H]^+$ calc.: 464,07332, exp.: 464,07331.

Réaction entre la coumarine **42** *et les composés* **3a-d**



Mode opératoire général

A 7,5mg (0.1éq., 0,03mmol) de sulfate de cuivre pentahydraté dissous dans 0,5ml de diméthylformamide sont ajoutés 11,9mg (0,2éq., 0,06mmol) d'ascorbate de sodium. Après quelques minutes d'agitation, 80,4mg (1éq., 0,3mmol) de 4-Méthyl-7,8-bis(2-propynyloxy)-2*H*-chromen-2-one (composé **42**) sont ajoutés au milieu ainsi que 0,5ml de diméthylformamide. Après changement de coloration du milieu, une solution de 142mg (2éq., 0,6mmol) de composé **3a** ou 146mg (2éq., 0,6mmol) de composé **3b** ou **3c** ou 150mg (2éq., 0,6mmol) de composé **3d** dissous dans 0,5ml de diméthylformamide est additionnée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité pendant 36h à température ambiante à l'abri de la lumière. La réaction est stoppée par l'ajout de 10ml d'eau. Le précipité obtenu est filtré sur Büchner et lavé à l'eau.

7,8-Bis{[1-(4-benzoylbenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]méthoxy}-4-méthyl-2H-chromen-2-one (46a)

$C_{44}H_{34}N_6O_6$ $MW=742,78 g.mol^{-1}$

Molécule de départ : X_1=X_2 : CH=CH (composé **3a**)

Aspect : solide beige-brun

Rdt: 92%,

Pf : 117-119°C

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 8,40 (s, 1H); 8,22 (s, 1H); 7,68-7,65 (m, 12H); 7,55-7,40 (m, 6H); 7,32-7,25 (m, 2H); 6,15 (s, 1H); 5,74 (s, 2H, NCH_2); 5,69 (s, 2H, NCH_2); 5,31 (s, 2H, OCH_2); 5,16 (s, 2H, OCH_2); 2,49 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 195,2 (2C=O); 159,4 (C=O); 153,8; 153,3; 147,3 (2C); 140,5; 140,4; 136,9; 136,8; 136,6; 136,5; 133,6; 132,7 (2C); 130,1 (2C); 130,0 (2C); 129,5 (4C); 128,5 (4C); 127,8 (2C); 127,5 (2C); 125,2; 125,1; 120,5; 114,2 (2C); 111,6; 110,2; 65,4 (OCH_2); 62,3 (OCH_2); 52,3 (NCH_2); 52,2 (NCH_2); 18,1 (CH_3).

HRMS-MALDI : *m/z* $[M+H]^+$ calc.: 767,08694, exp.: 767,08713.

7,8-Bis({1-[(5-benzoyl-2-thiényl)méthyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}méthoxy)-4-méthyl-2H-chromen-2-one (46b)

$C_{40}H_{30}N_6O_6S_2$ *MW=754,83g.mol^{-1}*

Molécule de départ : X_1 : CH=CH et X_2 : S (composé **3b**)

Aspect : solide beige-brun

Rdt: 53%

Pf : 135-137°C

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 8,41 (s, 1H); 8,23 (s, 1H); 7,80-7,76 (m, 4H); 7,67-7,59 (m, 2H); 7,57-7,7,45 (m, 7H); 7,30-7,25 (m, 2H); 7,20-7,16 (m, 1H); 6,16 (s, 1H); 5,95 (s, 2H, NCH_2); 5,88 (s, 2H, NCH_2); 5,31 (s, 2H, OCH_2); 5,15 (s, 2H, OCH_2); 2,34 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 187,1 (2C=O); 159,4 (C=O); 153,8 (2C); 153,3; 147,3; 147,1 (2C); 147,0; 143,1; 142,9; 142,7; 137,0; 135,4; 133,5; 132,6 (2C); 129,0; 128,8 (4C); 128,6 (5C); 124,9 (2C); 120,5; 114,4 (2C); 111,5; 110,2; 65,7 (OCH_2); 62,5 (OCH_2); 47,7 (NCH_2); 47,5 (NCH_2); 18,1 (CH_3).

HRMS-MALDI : *m/z* $[M+H]^+$ calc.: 755,17410, exp.: 755,17410.

4-Méthyl-7,8-bis({1-[4-(2-thiénylcarbonyl)benzyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}méthoxy)-2H-chromen-2-one (46c)

$C_{40}H_{30}N_6O_6S_2$ *MW=754,83g.mol^{-1}*

Molécule de départ : X_1 : S et X_2 : CH=CH (composé **3c**)

Aspect : solide jaune-orange

Rdt: 89%

Pf : 120-121°C

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 8,40 (s, 1H); 8,23 (s, 1H); 8,11-8,09 (m, 2H); 7,82-7,76 (m, 4H); 7,67 (d, 2H, J=3,8 Hz); 7,48-7,41 (m, 3H); 7,33-7,23 (m, 5H); 6,17 (s, 1H); 5,75 (s, 2H, NCH_2); 5,68 (s, 2H, NCH_2); 5,32 (s, 2H, OCH_2); 5,16 (s, 2H, OCH_2); 2,35 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 186,8 (2C=O); 159,5 (C=O); 153,8; 153,3; 147,3; 142,5 (2C); 140,4; 140,3; 137,1; 137,0; 135,8; 135,6; 133,6; 129,3 (4C); 129,2 (2C); 128,8 (2C); 127,9 (4C); 127,7 (2C); 125,2; 120,5; 114,4 (2C); 111,6; 110,3; 65,4 (OCH_2); 62,3 (OCH_2); 52,4 (NCH_2); 52,2 (NCH_2); 18,1 (CH_3).

HRMS-MALDI : *m/z* $[M+H]^+$ calc.: 755,17410, exp.: 755,17410.

4-Méthyl-7,8-bis[(1-{[5-(2-thiénylcarbonyl)-2-thiényl]méthyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthoxy]-2H-chromen-2-one (46d)

$C_{36}H_{26}N_6O_6S_4$ *MW=766,89g.mol^{-1}*

Molécule de départ : X_1=X_2 : S (composé **3d**)

Aspect : solide brun-rose

Rdt: 95%

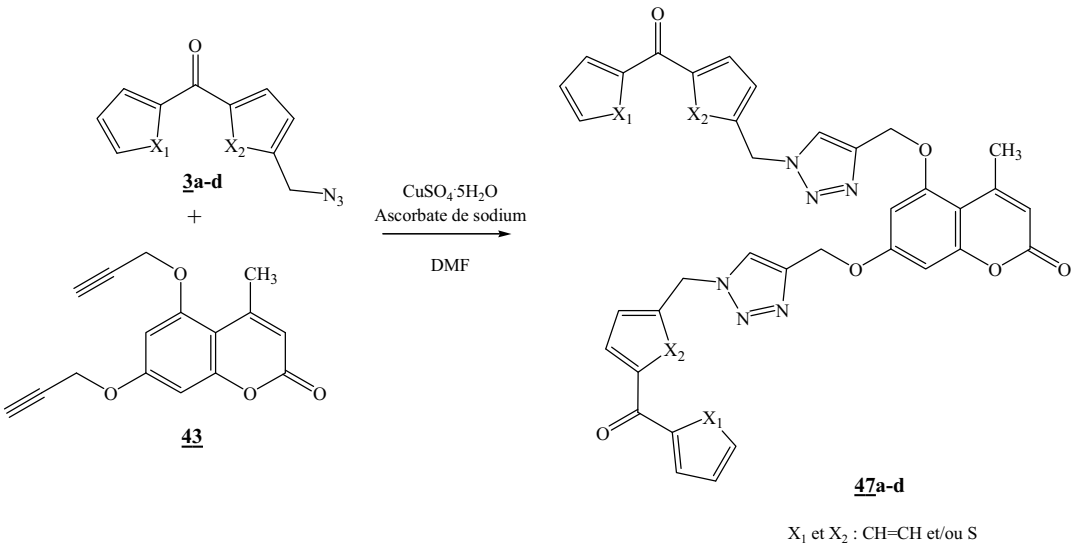
Pf : 190-191°C

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 8,41 (s, 1H); 8,22 (s, 1H); 8,09 (dt, 2H, J=5,0Hz et J=2,7 Hz); 8,00 (dd, 2H, J=3,9Hz et J=1,1 Hz); 7,93-7,88 (m, 2H); 7,43 (d, 1H, J=8,9Hz); 7,30-7,18 (m, 5H); 6,15 (d, 1H, J=1,1Hz); 5,95 (s, 2H, NCH_2); 5,87 (s, 2H, NCH_2); 5,31 (s, 2H, OCH_2); 5,16 (s, 2H, OCH_2); 2,33 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 177,7 (2C=O); 159,6 (C=O); 153,8 (2C); 153,3; 147,4; 146,4 (2C); 146,3; 142,4; 142,3; 141,6 (2C); 141,5; 135,2; 134,0 (2C); 133,8; 133,7; 133,5; 129,0; 128,9; 128,8 (2C); 124,9; 120,5; 114,4 (2C); 111,5; 110,3; 65,7 (OCH_2); 62,1 (OCH_2); 47,4 (NCH_2); 47,3 (NCH_2); 18,1 (CH_3).

HRMS-MALDI : *m/z* $[M+H]^+$ calc.: 767,08694, exp.: 767,08662.

Réaction entre la coumarine **43** *et les composés* **3a-d**



Mode opératoire général

A 7,5mg (0.1éq., 0,03mmol) de sulfate de cuivre pentahydraté dissous dans 0,5ml de diméthylformamide sont ajoutés 11,9mg (0,2éq., 0,06mmol) d'ascorbate de sodium. Après quelques minutes d'agitation, 80,4mg (1éq., 0,3mmol) de 4-Méthyl-5,7-bis(2-propynyloxy)-2*H*-chromen-2-one (composé **43**) sont ajoutés au milieu ainsi que 0,5ml de diméthylformamide. Après changement de coloration du milieu, une solution de 142mg (2éq., 0,6mmol) de composé **3a** ou 146mg (2éq., 0,6mmol) de composé **3b** ou **3c** ou 150mg (2éq., 0,6mmol) de composé **3d** dissous dans 0,5ml de diméthylformamide est additionnée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité pendant 36h à température ambiante à l'abri de la lumière. La réaction est stoppée par l'ajout de 10ml d'eau. Le précipité obtenu est filtré sur Büchner et lavé à l'eau.

5,7-Bis{[1-(4-benzoylbenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]méthoxy}-4-méthyl-2H-chromen-2-one (47a)

$C_{44}H_{34}N_6O_6$ $MW=742,78 g.mol^{-1}$

Molécule de départ : X_1=X_2 : CH=CH (composé **3a**)

Aspect : solide beige

Rdt : 74%

Pf : 99-100°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,82-7,75 (m, 8H); 7,66 (d, 2H, J=3,7Hz); 7,64-7,58 (m, 2H); 7,48 (dd, 4H, J=7,3Hz et J=1,1Hz); 7,37 (t, 4H, J=7,3Hz); 6,54 (dd, 2H, J=7,3Hz et J=2,2Hz); 5,91 (d, 1H, J=1,1Hz); 5,65 (d, 4H, NCH_2, J=3,7Hz); 5,21 (s, 4H, OCH_2); 2,42 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 195,8 (2C=O); 161,2 (C=O); 161,0; 157,5; 156,7; 154,4; 154,0; 143,5; 143,3; 138,6; 138,1; 137,0; 132,8; 130,8 (4C); 130,0 (8C); 128,4 (4C); 127,9 (2C); 127,7 (3C); 123,3; 111,9; 105,3; 96,8; 95,2; 62,5 (OCH_2); 62,1 (OCH_2); 53,8 (NCH_2); 24,4 (CH_3).

HRMS-MALDI : *m/z* $[M+H]^+$ calc.: 743,26126, exp.: 743,.26116.

5,7-Bis({1-[(5-benzoyl-2-thiényl)méthyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}méthoxy)-4-méthyl-2H-chromen-2-one (47b)

$C_{40}H_{30}N_6O_6S_2$ $MW=754,83g.mol^{-1}$

Molécule de départ : X_1 : CH=CH et X_2 : S (composé **3b**)

Aspect : solide beige

Rdt: 74%

Pf : 156-158°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,84-7,78 (m, 6H); 7,64-7,58 (m, 2H); 7,53-7,47 (m, 6H); 7,14 (t, 2H, J=3,7Hz); 6,54 (dd, 2H, J=9,0Hz et J=2,2Hz); 5,92 (s, 1H); 5,80 (s, 2H, NCH_2); 5,79 (s, 2H, NCH_2); 5,22 (s, 4H, OCH_2); 2,44 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 187,7 (2C=O); 161,0 (C=O); 160,7; 157,5; 156,8; 154,0; 144,8; 144,5; 144,4; 143,6; 143,4; 137,3 (2C); 134,7 (2C); 132,7; 132,6; 129,1 (4C); 128,6 (4C); 128,5 (4C); 123,0; 112,0; 105,5; 96,9; 95,4; 62,4 (OCH_2); 62,0 (OCH_2); 48,9 (NCH_2); 48,8 (NCH_2); 23,4 (CH_3).

HRMS-MALDI : *m/z* $[M+H]^+$ calc.: 755,17410, exp.: 755,17432.

4-Méthyl-5,7-bis({1-[4-(2-thiénylcarbonyl)benzyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}méthoxy)-2H-chromen-2-one (47c)

$C_{40}H_{30}N_6O_6S_2$ $MW=754,83g.mol^{-1}$

Molécule de départ : X_1 : S et X_2 : CH=CH (composé **3c**)

Aspect : solide jaune clair

Rdt: 89%

Pf : 147-150°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,86 (d, 4H, J=8,0Hz); 7,76-7,74 (m, 2H); 7,68 (d, 2H, J=5,0Hz); 7,62-7,60 (m, 2H); 7,38 (t, 4H, J=8,0Hz); 7,18-7,15 (m, 2H); 6,53 (dd, 2H, J=7,8Hz et J=2,3Hz); 5,91 (d, 1H, J=1,2Hz); 5,66 (s, 2H, NCH_2); 5,65 (s, 2H, NCH_2); 5,21 (s, 4H, OCH_2); 2,42 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 187,3 (2C=O); 161,0 (C=O); 160,7; 157,6; 156,8; 154,0; 143,3; 143,2; 142,6; 138,6; 138,5 (2C); 138,4; 135,0 (2C); 134,8 (2C); 134,7; 130,0 (4C); 128,2 (2C); 128,0 (2C); 127,9 (2C); 123,2; 113,7; 112,0; 105,4; 96,9; 95,3; 62,5 (OCH_2); 62,1 (OCH_2); 53,8 ($2NCH_2$); 24,4 (CH_3).

HRMS-MALDI : *m/z* $[M+H]^+$ calc.: 755,17410, exp.: 755,17424.

4-Méthyl-5,7-bis[(1-{[5-(2-thiénylcarbonyl)-2-thiényl]méthyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthoxy]-2H-chromen-2-one (47d)

$C_{36}H_{26}N_6O_6S_4$ *MW=766,89g.mol^{-1}*

Molécule de départ : X_1=X_2 : S (composé **3d**)

Aspect : solide beige clair

Rdt: 86%,

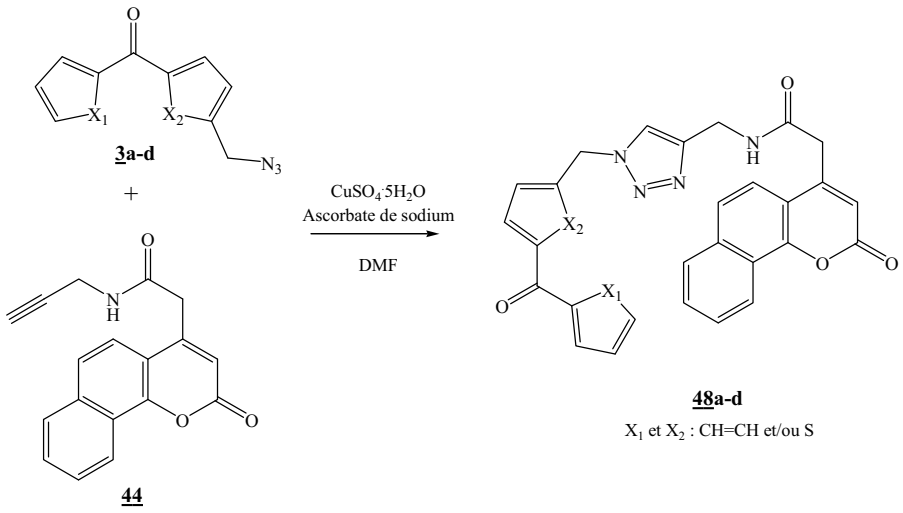
Pf : 192-195°C

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 8,42-8.43 (m, 2H); 8,09 (d, 2H, J=4,7Hz); 8,02 (d, 2H, J=3,7Hz); 7,94 (d, 2H, J=3,7Hz); 7,31-7,27 (m, 4H); 6,79 (s, 1H); 6,77 (s, 1H); 5,98-5,96 (m, 5H); 5,27 (s, 4H); 2,36 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 177,7 (2C=O); 161,1 (C=O); 159,5; 157,4; 156,2; 153,9; 146,6; 146,4; 142,4 (2C); 142,3; 141,6; 135,3 (2C); 134,0 (2C); 133,8 (2C); 129,1; 128,9 (4C); 125,1; 124,9; 111,0; 104,4 (2C); 97,4; 94,9; 62,3 (OCH_2); 61,6 (OCH_2); 47,6 (NCH_2); 47,5 (NCH_2); 23,7 (CH_3).

HRMS-MALDI : *m/z* $[M+H]^+$ calc.: 767,08694, exp.: 767,08713.

Réaction entre la coumarine **44** *et les composés* **3a-d**



Mode opératoire général

A 5mg (0.1éq., 0,02mmol) de sulfate de cuivre pentahydraté dissous dans 0,5ml de diméthylformamide sont ajoutés 7,9mg (0,2éq., 0,04mmol) d'ascorbate de sodium. Après quelques minutes d'agitation, 58,2mg (1éq., 0,2mmol) de 2-(2-Oxo-2*H*-benzo[*h*]chromen-4-yl)-*N*-(2-propynyl)acétamide (composé **44**) sont ajoutés au milieu ainsi que 0,5ml de diméthyl formamide. Après changement de coloration du milieu, une solution de 47,5mg (1éq., 0,2mmol) de composé **3a** ou 48,7mg (1éq., 0,2mmol) de composé **3b** ou **3c** ou 49,9mg (1éq., 0,2mmol) de composé **3d** dissout dans 0,5ml de diméthylformamide est additionnée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité pendant 36h à température ambiante à l'abri de la lumière. La réaction est stoppée par l'ajout de 10ml d'eau. Le précipité obtenu est filtré sur Büchner et lavé à l'eau.

N-{[1-(4-Benzoylbenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]méthyl}-2-(2-oxo-2H-benzo[h]chromen-4-yl)acétamide (48a)

$C_{32}H_{24}N_4O_4$ $MW=528,56 g.mol^{-1}$

Molécule de départ : X_1=X_2 : CH=CH (composé **3a**)

Aspect : solide beige-brun

Rdt: 92%

Pf : 165-168°C

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 8,81 (t, 1H, J=5,3Hz, N*H*); 8,36-8,32 (m, 1H); 8,01-7,97 (m, 2H); 7,80-7,66 (m, 9H); 7,57-7,51 (m, 2H); 7,40 (d, 2H, J=8,1Hz); 6,55 (s, 1H); 5,68 (s, 2H, NCH_2); 4,34 (d, 2H, J=5,4Hz, NHCH_2); 3,86 (s, 2H, COCH_2).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 195,2 (C=O); 167,6 (NHC=O); 159,6 (C=O); 151,6 (2C); 149,9; 140,5; 136,8 (2C); 136,6; 134,2; 132,7; 130,0 (3C); 129,6 (2C); 128,6; 128,5 (2C); 127,8 (2C); 127,4; 123,8; 122,2; 121,5; 121,2; 115,7; 114,7; 52,2 (NCH_2); 34,6 (CH_2CO); 33,2 ($NHCH_2$).

HRMS-MALDI : *m/z* $[M+H]^+$ calc.: 529,18703, exp.: 529,18699.

N-({1-[(5-Benzoyl-2-thiényl)méthyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}méthyl)-2-(2-oxo-2H-benzo[h]chromen-4-yl)acétamide (48b)

$C_{30}H_{22}N_4O_4S$ *MW=534,59g.mol^{-1}*

Molécule de départ : X_1 : CH=CH et X_2 : S (composé **3b**)

Aspect : solide jaune pale

Rdt: 96%

Pf : 142-145°C

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 8,81 (t, 1H, J=5,3Hz, N*H*); 8,38-8,34 (m, 1H); 8,04-7,98 (m, 2H); 7,81-7,76 (m, 3H); 7,73-7,67 (m, 4H); 7,58-7,53 (m, 3H); 7,21 (d, 1H, J=3,9Hz); 6,55 (s, 1H); 5,89 (s, 2H, NCH_2); 4,33 (d, 2H, J=5,2Hz, NHCH_2); 3,86 (s, 2H, COCH_2).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 187,1 (C=O); 167,6 (NHC=O); 159,5 (C=O); 151,6 (2C); 149,9; 147,2 (2C); 142,9; 137,0; 135,4; 134,2; 132,6; 128,9 (2C); 128,8 (2C); 128,7 (2C); 127,9; 127,4; 123,8; 122,2; 121,5; 121,2; 115,7; 114,7; 47,4 (NCH_2); 34,4 (CH_2CO); 33,4 ($NHCH_2$).

HRMS-MALDI : *m/z* $[M+H]^+$ calc.: 535,14345, exp.: 535,14352.

2-(2-Oxo-2H-benzo[h]chromen-4-yl)-N-({1-[4-(2-thiénylcarbonyl)benzyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}méthyl)acétamide (48c)

$C_{30}H_{22}N_4O_4S$ *MW=534,59g.mol^{-1}*

Molécule de départ : X_1 : S et X_2 : CH=CH (composé **3c**)

Aspect : solide jaune pâle

Rdt: 97%

Pf : 196-199°C

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 8,81 (t, 1H, J=5,3Hz, N*H*); 8,37-8,33 (m, 1H); 8,12 (dd, 1H, J=4,9Hz et J=0,8Hz) 8,02-7,98 (m, 2H); 7,81-7,67 (m, 7H); 7,41 (d, 2H, J=8,1Hz); 7,27 (dd, 1H, J=4,9Hz et J=3,9Hz); 6,55 (s, 1H); 5,68 (s, 2H, NCH_2); 4,34 (d, 2H, J=5,3Hz, NHCH_2); 3,86 (s, 2H, COCH_2).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 186,8 (C=O); 167,6 (NHC=O); 159,6 (C=O); 151,6; 149,9; 142,5; 140,4 (2C); 137,1; 135,8; 135,6; 134,2; 129,2 (2C); 128,8 (2C); 128,7 (2C); 127,9; 127,8; 127,5; 123,8; 122,2; 121,5; 121,2; 115,7; 114,7; 52,2 (NCH_2); 40,7 (CH_2CO); 34,4 ($NHCH_2$).

HRMS-MALDI : *m/z* $[M+H]^+$ calc.: 535,14345, exp.: 535,14343.

2-(2-Oxo-2H-benzo[h]chromen-4-yl)-N-[(1-{[5-(2-thiénylcarbonyl)-2-thiényl]méthyl}-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl]acétamide (48d)

$C_{28}H_{20}N_4O_4S_2$ *MW=540,61g.mol^{-1}*

Molécule de départ : X_1=X_2 : S (composé **3d**)

Aspect : solide jaune pâle

Rdt: 65%

Pf : 136-139°C

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 8,81 (t, 1H, J=5,3Hz, N*H*); 8,38-8,34 (m, 1H); 8,10 (d, 1H, J=4,1Hz); 8,04-8,00 (m, 3H); 7,89 (d, 1H, J=3,8Hz); 7,80-7,67 (m, 4H); 7,31-7,28 (m, 1H); 7,24 (d, 1H, J=3,8Hz); 6,55 (s, 1H); 5,59 (s, 2H, NCH_2); 4,33 (d, 2H, J=4,6Hz, NHCH_2); 3,86 (s, 2H, COCH_2).

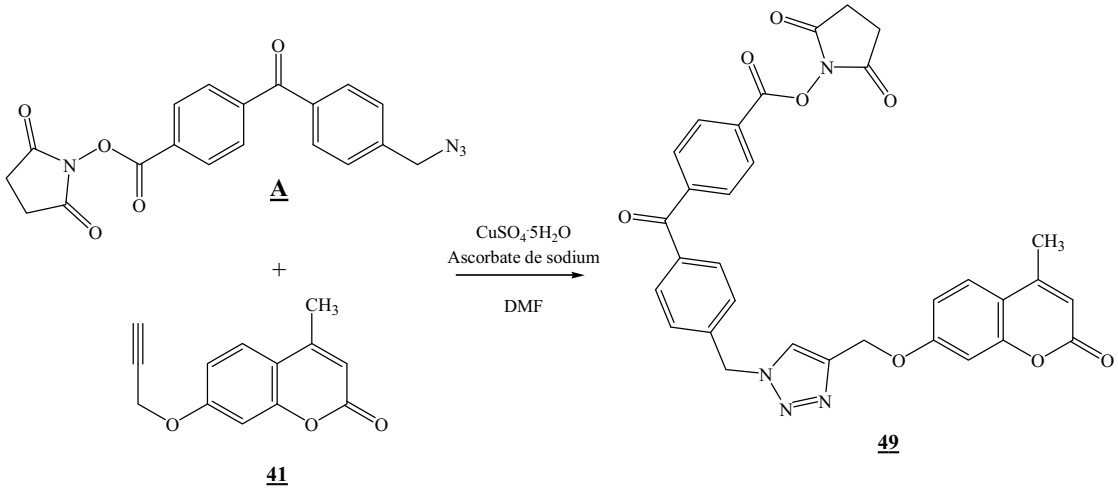
RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 177,7 (C=O); 167,6 (NHC=O); 159,5 (C=O); 151,6; 149,9; 149,8; 146,6; 142,3; 141,6; 135,3; 134,2; 134,0; 133,8; 128,9; 128,8 (2C); 128,7; 127,9; 127,4; 123,8; 122,2; 121,5; 121,2; 115,7; 114,7; 47,5 (NCH_2); 40,7 (CH_2CO); 34,5 ($NHCH_2$).

HRMS-MALDI : *m/z* $[M+H]^+$ calc.: 541,09987, exp.: 541,09993.

Essais avec une structure trifonctionelle

1-[(4-{4-[(4-{[(4-Méthyl-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy]méthyl}-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)méthyl]benzoyl}benzoyl)oxy]-2,5-pyrrolidinedione (<u>49</u>)

$C_{32}H_{24}N_4O_8$ *MW=540,61g.mol^{-1}*



A 1,5mg (0.1éq., 0,006mmol) de sulfate de cuivre pentahydraté dissous dans 0,2ml de diméthylformamide sont ajoutés 2,4mg (0,2éq., 0,012mmol) d'ascorbate de sodium. Après quelques minutes d'agitation, 12,8mg (1éq., 0,06mmol) de composé **<u>41</u>** sont ajoutés au milieu ainsi que 0,1ml de diméthylformamide. Après changement de coloration du milieu, une solution de 22,7mg (1éq., 0,06mmol) de composé **<u>A</u>** dissous dans 0,2ml de diméthylformamide est additionnée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité pendant 36h à température ambiante à l'abri de la lumière. La réaction est stoppée par l'ajout de 10ml d'eau. Le précipité obtenu est filtré sur Büchner et lavé à l'eau.

Aspect : solide rose

Rdt: 84%

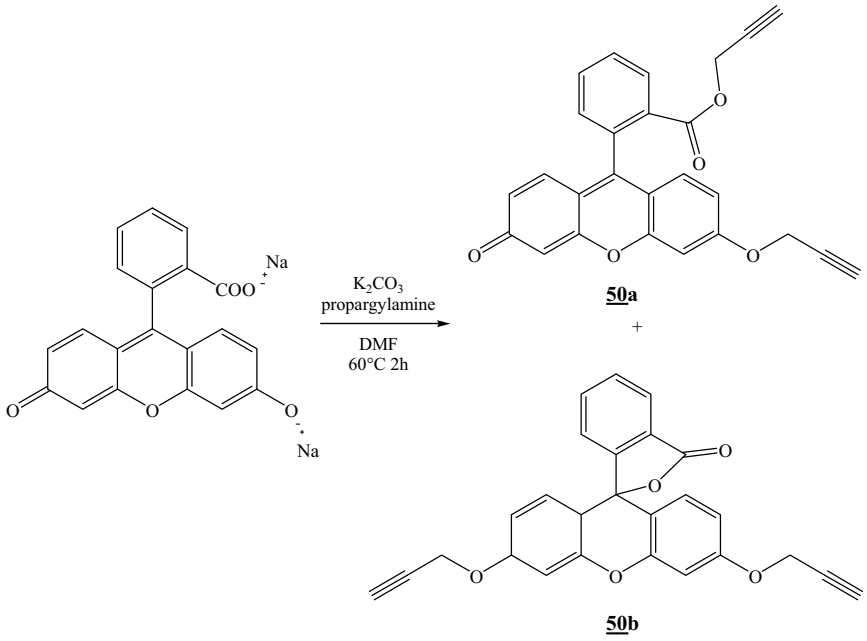
Pf : 136°C

RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ : 8,25 (d, 2H, J=8,2Hz); 7,87 (d, 2H, J=8,2Hz); 7,81 (d, 2H, J=8,2Hz); 7,66 (s, 1H); 7,51 (d, 1H, J=8,5Hz); 7,41 (d, 2H, J=8,2Hz); 6,94 (d, 1H, J=8,5Hz); 6,92 (s, 1H); 6,15 (s, 1H); 5,66 (s, 2H, NCH_2); 5,27 (s, 2H, COCH_2); 2,94 (s, 4H, CH_{2suc}); 2,40 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ : 194,6 (C=O); 169,1 (2C=O); 161,1 (C=O); 161,0; 155,0; 152,5; 142,4; 139,7; 136,7 (2C); 130,7 (2C); 130,5 (2C); 129,9 (2C); 128,3; 128,0 (2C); 125,7; 114,0; 112,4; 112,1 (2C); 110,8; 101,9; 62,1 (OCH_2); 53,6 (NCH_2); 25,6 ($2CH_2$); 18,6 (CH_3).

Détection par fluorescence avec des dérivés de la fluorescéine

Formation du dérivé alcyne de la fluorescéine



A 200mg (1éq., 0,53mmol) de sel de sodium de la fluorescéine et 206mg (2,8éq., 1,48mmol) de carbonate de potassium en suspension dans 10ml de diméthylformamide sont ajoutés 237µl (4éq., 2,12mmol) de bromure de propargyle. La réaction est chauffée à 60°C pendant 2h. Après être revenu à température ambiante, 30ml d'eau sont ajoutés au milieu réactionnel. Le précipité orange formé est filtré sur Büchner et lavé à l'eau. Le produit après séchage est repris dans l'éther à chaud. Le précipité est filtré chaque fois sur Büchner avant d'être repris pour le lavage suivant. Le précipité obtenu correspond au composé **50a**. Les filtrats obtenus lors des lavages à l'éther sont regroupés puis évaporés sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur gel de silice (dichlorométhane) pour obtenir le composé **50b**.

2-Propynyl 2-[3-oxo-6-(2-propynyloxy)-3*H*-xanthen-9-yl]benzoate (50a)

$C_{26}H_{16}O_5$ *MW=408,40g.mol^{-1}*

Aspect : solide orange

Rdt : 42%

Pf : 177°C (lit.[187] 200°C)

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 8,27 (d, 1H, J=7,5Hz); 7,80-7,67 (m, 2H); 7,33 (d, 1H, J=6,7Hz); 7,06 (d, 1H, J=2,2Hz); 6,93-6,78 (m, 3H); 6,54 (d, 1H, J=9,5Hz); 6,46 (s, 1H); 4,80 (d, 2H,

J=2,2Hz COOC*H*$_2$); 4,60 (t, 2H, J=2,5Hz, ArOC*H*$_2$); 2,61 (t, 1H, J=2,2Hz, ArOCH$_2$C≡C*H*); 2,33 (t, 1H, J=2,2Hz, COOCH$_2$C≡C*H*).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ :185,8 (C=O); 164,5 (C=O); 161,7; 158,9; 154,0; 149,2; 134,6; 133,0; 131,4; 130,6; 130,2; 130,1; 129,8; 129,7; 128,9; 118,2; 115,4; 113,6; 105,9; 101,6; 77,2; 76,8; 76,4 (≡CH); 75,3 (≡CH); 56,3 (OCH_2); 52,8 ($COOCH_2$).

3',6'-Bis(2-propinyloxy)spiro[phtalid-3,9'-xanthen](<u>50</u>b)

$C_{26}H_{16}O_5$ *MW=408,40g.mol^{-1}*

Aspect : solide beige foncé

Rdt : 8%

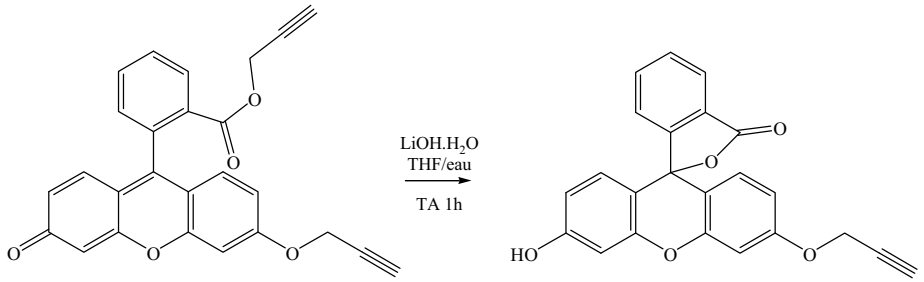
Pf : 161-163°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 8,04-8,00 (m, 1H); 7,71-7,59 (m, 2H); 7,19-7,15 (m, 1H); 6,89 (d, 2H, J=2,2Hz); 6,74-6,66 (m, 4H); 4,71 (d, 4H, J=2,2Hz, OC*H*$_2$); 2,57 (t, 2H, J=2,2Hz, ≡C*H*).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 169,3 (C=O); 159,2 (2C); 153,0; 152,3 (2C); 135,0; 129,7; 129,2 (2C); 126,7; 125,0; 123,9; 112,1 (2C); 102,1 (2C); 93,1 (2C); 82,8; 77,8 (2C≡); 76,1 (2≡CH); 56,0 ($2OCH_2$).

(3'-(2-propinyloxy)-6'-hydroxy)spiro[phtalid-3,9'-xanthen](<u>51</u>)

$C_{23}H_{14}O_5$ *MW=370,35g.mol^{-1}*



<u>50a</u> **<u>51</u>**

A 102mg (1éq., 0,25mmol) de composé **<u>50</u>a** dissous dans 2,1ml de tétrahydrofurane sont ajoutés goutte à goutte 31,4mg (3éq., 0,75mmol) d'hydroxyde de lithium monohydraté solubilisé dans 1,05ml d'eau distillée. Après une nuit à température ambiante sous agitation, le tétrahydrofurane est évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse est alors acidifiée avec de l'acide chlohydrique 1N jusqu'à l'obtention d'un pH acide puis extraite au

dichlorométhane (2x10ml). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium puis concentrées sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur gel de silice (dichlorométhane).

Rdt : 77%

Pf : 125°C

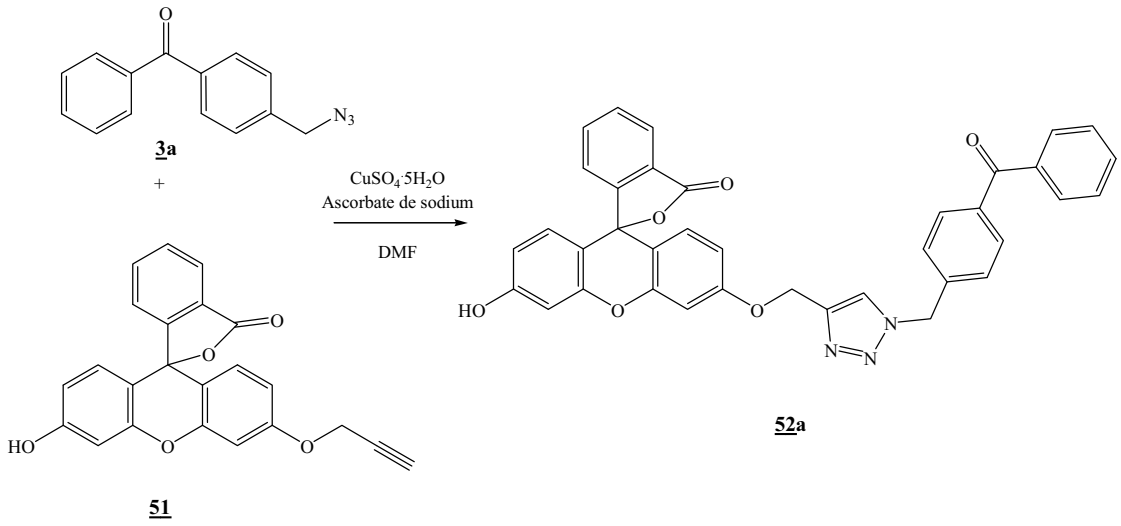
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,97-7,93 (m, 1H); 7,64-7,52 (m,2H); 7,11-7,08 (m, 1H); 6,79 (d, 1H, J=2,4Hz); 6,67 (d, 1H, J=2,4Hz); 6,62-6,54 (m, 2H); 6,56 (d, 1H, J=8,4Hz); 6,45 (dd, 1H, J=8,4Hz et J=2,4Hz); 5,55 (s large, 1H, O*H*); 4,65 (d, 2H, J=2,4Hz, OCH_2); 2,49 (t, 1H, J=2,4Hz, ≡C*H*).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 169,6 (C=O); 159,2; 157,6; 153,1; 152,4; 152,3; 135,0; 129,7; 129,4; 129,2; 126,7; 125,0; 124,0 (2C); 112,2; 112,1 (2C); 111,4; 103,1; 102,1; 77,8 (C≡); 76,1 (≡CH); 56,0 (OCH_2).

Essais des conditions de Click Chemistry sur une structure bifonctionnelle

2-(3-{[1-(4-benzoylbenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl]methoxy}-6-hydroxy)spiro[phtalid-3,9-xanthen] (<u>52</u>a)

$C_{37}H_{25}N_3O_6$ *MW=607,61g.mol^{-1}*



A une suspension de 12,8mg (1éq., 54µmol) de composé **<u>3</u>a** et 30mg (1,5éq., 81µmol) de composé **<u>51</u>** dans 2ml d'un mélange *t*-butanol/eau (1:1) sont ajoutés 1,4mg (0,1éq., 5,4µmol) de sulfate de cuivre pentahydraté ainsi que 2,1mg (0,2éq., 10,8µmol) d'ascorbate de sodium.

Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24h. Après évaporation du solvant, le résidu obtenu est purifié sur gel de silice (dichlorométhane/acétone 95:5).

Aspect : solide jaune-orange

Rdt : 24%

Pf : 149-150°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 7,93 (dd, 1H, J=6,5Hz et J=1,2Hz); 7,76-7,69 (m, 4H); 7,63-7,50 (m, 4H); 7,44-7,38 (m, 2H); 7,31 (d, 2H, J=8,3Hz); 7,07 (dd, 1H, J=6,5Hz et J=1,2Hz); 6,84 (s large, 1H, O*H*); 6,76 (d, 1H, J=1,5Hz); 6,67 (d, 1H, J=2,2Hz); 6,58-6,57 (m, 2H); 6,53-6,47 (m, 2H); 5,57 (s, 2H, NCH_2); 5,16 (s, 2H, OCH_2).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 196,0 (C=O); 169,6 (C=O); 159,6; 158,1; 153,0; 152,4 (2C); 138,5 (2C); 138,0; 137,0 (2C); 135,1; 133,5; 132,8 (2C); 130,8 (2C); 130,0 (2C); 129,7; 129,3; 129,2; 128,4 (2C); 127,9 (2C); 126,7; 125,0; 124,0; 112,0; 111,9; 110,9; 103,1; 102,0; 62,0 (OCH_2); 53,9 (NCH_2).

Conclusions et Perspectives

Conclusions et Perspectives

Le glutathion possède de nombreux rôles fonctionnels dans l'organisme. Identifier les cibles cellulaires de ce tripeptide est donc un enjeu d'un intérêt particulier. C'est dans le but de pouvoir identifier les protéines ayant une affinité pour le glutathion que nous avons synthétisé des dérivés photoactivables de ce composé. Pour cela, nous avons mis au point un outil synthétique de structure trifonctionnelle. Cette structure possède un premier groupement permettant de se fixer au glutathion. La seconde fonction permet de former une liaison covalente entre notre structure fixée au GSH et les protéines d'intérêt. Une fois cette fixation réalisée, les protéines peuvent être identifiées grâce au dernier groupement présent sur notre structure. Une molécule trifonctionnelle possédant le motif benzophénone a été synthétisée.

Une seconde partie de ce travail de recherche a consisté à modifier la structure du groupement photoactivable afin d'en améliorer les propriétés photoactivables (longueur d'onde d'absorption proche du visible et/ou le temps d'irradiation nécessaire à l'activation) pour éviter d'endommager les protéines.

Différents tests de photoactivation ont tout d'abord été réalisés sur des molécules simples (structures bifonctionnelles ne comportant pas la fonction pour fixer le glutathion), que nous avons synthétisées afin d'étudier les caractéristiques physiques de ces analogues de la benzophénone. Les résultats que nous avons obtenus attestent que ces trois analogues thiophéniques sont des groupements photosensibles. De plus des tests biologiques ont permis de montrer qu'ils sont photoactivables et que ce sont des inhibiteurs de la GST de foie de rat et de la GST π. Ces tests ont montré le grand intérêt du motif thiénylthiophène pour le marquage par photoaffinité. C'est pourquoi nous avons synthétisé trois nouvelles structures trifonctionnelles possédant les mêmes motifs utilisés lors des tests de photoactivation (remplacement d'un (ou deux) groupement(s) phényl par un (ou deux) groupement(s) thiényle du motif benzophénone. Pour la réalisation de ces molécules, la synthèse du monoester méthylique de l'acide téréphtalique ainsi que le monoester méthylique de l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique, ont été nécessaires. Nous avons mis au point une méthode simple permettant de former des monoesters issus de diacides symétriques, après avoir formé les diesters correspondants. Cette voie de synthèse a pu être généralisée aussi bien dans le cas de l'acide téréphtalique que de l'acide thiophène-2,5-dicarboxylique.

L'étape suivante a été le couplage de nos structures trifonctionnelles sur le glutathion. Ce couplage a été réalisé sur le S-trityl glutathion, pour des raisons de stabilité du groupement azoture, et a permis de former quatre nouveaux dérivés photoactivables N-substitué du S-trityl

glutathion, les composés N-substitués du glutathion réduit pouvant être obtenus par déprotection du groupement trityle. Le pouvoir inhibiteur de ces composés sera d'ailleurs évalué vis-à-vis des enzymes du système du glutathion par notre équipe de biologistes.
La détection est également un point essentiel dans notre démarche. Nous avons envisagé deux modes de détection : la chimiluminescence, avec l'introduction de la biotine qui en présence de luminol produit une émission de lumière, et la fluorescence, avec l'introduction d'un composé fluorescent. Pour cela, deux voies de synthèse ont été mises en œuvre : la ligation de Staudinger et la Click Chemistry (réaction de cycloaddition entre un azoture et un alcyne). La ligation de Staudinger nécessite la formation d'un dérivé phosphoré que nous avons obtenu. Cependant ce dernier s'oxydant rapidement, il a donc été délicat de réaliser des couplages de la biotine sur nos molécules. La seconde voie de synthèse, faisant appel à la Click Chemistry, permet également l'utilisation des deux modes de détection. Nous avons pour cela tout d'abord synthétisé un dérivé de la biotine, possédant la fonction alcyne, pour une détection par chimiluminescence. Ce composé une fois formé a été utilisé lors d'un essai de réaction de Click Chemistry dont le but a été de valider la méthode. Cette méthode pourra donc être appliquée sur nos sondes pour réaliser une détection par chimiluminescence.
Cette même voie de synthèse a été utilisée afin de fixer des composés fluorescents permettant ainsi une détection par fluorescence. Dans un premier temps, nous avons choisi des dérivés de coumarines souvent utilisés pour ce type de détection. Des essais de couplage par Click Chemistry, réalisés sur les molécules tests (structures bifonctionnelles) nous ont permis de synthétiser de nouveaux dérivés photoactivables de coumarines, dont certains sont prometteurs. D'autres expériences ont été menées sur un dérivé de la fluorescéine préalablement synthétisé. Des tests de marquage par photoaffinité ainsi que de détection ont montré l'efficacité de cette méthode et ont ainsi permis de valider notre démarche.

Les éléments nécessaires à l'aboutissement de ce travail étant validés, l'étape suivante consiste à réaliser les premiers essais de photomarquage du glutathion fixé à nos structures trifonctionnelles sur des protéines modèles avant de l'appliquer aux protéines d'intérêt, notamment les protéines nouvelles ayant une affinité pour le glutathion, et plus particulièrement les protéines transmembranaires de transport du glutathion qui jouent un rôle essentiel dans l'entrée en apoptose des cellules cancéreuses. Ces outils nécessiteront donc d'être exploités sur des lignées cellulaires cancéreuses pour trouver toute leur application.

Bibliographie

1. De Rey Pailhade, J. *Compt. Rend. Acad. Sci.* **1888**, *106*, 1683-1694.
2. Hopkins, F.G. *Biochem. J.* **1921**, *15*, 286-305.
3. Hopkins, F.G.; Dixon, M. *J. Biol. Chem.* **1922**, *54*, 527-563.
4. Hunter, G.; Eagles, B.A. *J. Biol. Chem.* **1927**, *72*, 147-166.
5. Hopkins, F.G. *J. Biol. Chem.* **1927**, 72, 185-187.
6. Hopkins, F.G. *J. Biol. Chem.* **1929**, *84*, 269-320.
7. (a) Nicolet, B.H. *J. Biol. Chem.* **1930**, *87*, 389-393. (b) Kendall, E.C.; Mason, H.L.; McKenzie, B.F. *J. Biol. Chem.* **1929**, *84*, 657-674. (c) Kendall, E.C.; Mason, H.L.; McKenzie, B.F. *J. Biol. Chem.* **1930**, *87*, 55-79. (d) Kendall, E.C.; Mason, H.L.; McKenzie, B.F. *J. Biol. Chem.* **1930**, *87*, 409-423.
8. (a) Kosower, E.M. *Glutathione. Metabolism and Function.* Ed. Arias, M.A.; Jakoby, W.B. Raven Press NY **1976**, p1-15. (b) Meister, A. *Glutathione. Metabolism and Function.* Ed. Arias, M.A.; Jakoby, W.B. Raven Press NY **1976**, p35-43. (c) Meister, A.; Anderson, M.E. *Ann. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 711-760. (d) Meister, A. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 17205-17208. (e) Deneke, S.M.; Fanburg, B.L. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **1989**, *257*, L163-L173. (f) Sies, H. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27*, 916-921. (g) Valencia, E.; Marin, A.; Hardy, G. *Nutrition* **2001**, *17*, 428-429. (h) Valencia, E.; Marin, A.; Hardy, G. *Nutrition* **2001**, *17*, 485-486. (i) Pompella, A.; Visvikis, A.; Paolicchi, A.; DeTata, V.; Cassini, A.F. *Biochem. Pharmacol.* **2003***, 66*, 1499-1503. (j) Li, Y.; Wei, G.; Chen, J. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **2004**, *66*, 233-242.
9. Hwang, C.; Sinskey, A.J.; Lodish. H.F. *Science* **1992**, *257*, 1496-1502.
10. (a) Anderson, M.E. *Chem.-Biol. Inter*. **1998**, *111–112*, 1–14. (b) Wu, G.; Fang, Y-Z.; Yang,S. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 489–492.
11. (a) www.glutathion.com. (b) Kidd, P.M. *Alt. Med. Rev.* **1997**, *2*, 155-176.
12. Arteel, G.E.; Sies, H. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2001***, 10*, 153-158.
13. (a) Dringer, R.; Gutterer, J.M.; Hirrlingen, J. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 4912-4916. (b) Dringer, R. *Prog. Neurobiol.* **2000**, *62*, 649-671.
14. Koolman, J.; Röhm, K-H. *Atlas de poche de Biochimie*, 3ème Ed., Flammarion, **2004**, p284.
15. Schafer, F.Q.; Buttner, G.R. *Free Radical Biol. Med.* **2001**, *30*, 1191–1212.
16. Rahman, I.; MacNee, W. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **1999**, *277*, 1067-1088.
17. (a) Singhal, R.K.; Anderson, M.E.; Meister, A. *FASEB J.* **1987**, *1*, 220-223. (b) Nzengue, Y.; Steiman, R.; Garrel, C. *Toxicology* **2008**, *243*, 193–206.
18. Freedman, J.H.; Ciriolo, M.R.; Peisach, J. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 5598-5605.
19. Wang, W.; Ballatori, N. *Pharmacol. Rev*. **1998**, *50*, 335-352.
20. (a) Chasseaud, L.F. *Glutathione. Metabolism and Function.* Ed. Arias M.A.; Jakoby, W.B. Raven Press, New York, **1976**, p77-114. (b) Griffith, O.W. *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *27*, 922-935.
21. Meister, A. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 1969S-1975S.
22. Butterfield, D.A.; Pocernich, C.B.; Drake, J. *Drug Dev. Res*. **2002**, *56*, 428-437.
23. Zeevalk, G.D.; Razmpour, R.; Bernard, L.P. *Biomedicine&Pharmacotherapy* **2008** *in press*.
24. Hall, A.G. *Eur. J. Clin. Invest.* **1999**, *29*, 238-245.
25. Celli, A.; Que, F.G.; Gores, G.J.; LaRusso, N.F. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. **1998**, *275*, 749-757.
26. Sen, C.K. *Nutr. Biochem.* **1997**, *8*, 660-672.
27. Balendiran, G.K.; Dabur, R.; Fraser, D. *Cell Biochem. Funct.* **2004**, *22*, 343-352.

28. McLellan, L.I.; Wolf, C.R. *Drug Resistance Updates* **1999**, *2*, 153-164.
29. Schultz, M.; Dutta, S.; Tew, K.D. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *26*, 91-104.
30. Singh, A.; Thornton, E.R.; Westheimer, F.H. *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, PC3006-PC3008.
31. Kotozyba-Hilbert, F.; Kapfer, I.; Goeldner, M *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 1294-1312.
32. Dorman, G.; Prestwich, G.D. *Trends Biotech*. **2000**, *18*, 64-77.
33. Vodovozova, E.L. *Biochemistry (Moscow)* **2007**, *72*, 1-20.
34. Wang, J.; Bauman, S.; Colman, R.F. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 5493-5503.
35. Chaudhary, A.; Prestwich, G. *Bioconjugate Chem*. **1997**, *8*, 680-685.
36. Hatanaka, Y.; Sadakane, Y. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 271-288.
37. Fleming, S.A. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12479-12520.
38. Bayley, H.; Knowles, J.R. *Methods Enzymol.* **1977**, *46*, 69-114.
39. Rizk, M.S.; Shi, X.; Platz, M.S. *Biochem*. **2006**, *45*, 543-551.
40. Smith, R.A.G.; Knowles, J.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 5072-5073.
41. Brunner, J.; Senn, H.; Richards, F.M. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3313-3318.
42. Platz, M.; Admasu, A.S.; Kwiatkowski, S.; Cracker, P.J.; Imai, N.; Watt, D.S. *Biconjugate Chem*. **1991**, *2*, 337-341.
43. Dorman, G.; Prestwich, G.D. *Biochemistry* **1994**, *33*, 5661-5673.
44. Galardy, R.E.; Craig, L.C.; Jamieson, J.D.; Printz, M.P. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 3510-3518.
45. Quelques exemples : (a) Steiner, G.; Kuechler, E.; Barta, A. *EMBO J.* **1988**, *7*, 3949-3955. (b) Suva, L.J.; Flannery, M.S.; Caulfield, M.P.; Findlay, D.M.; Jüppner, H.; Goldring, S.R.; Rosenblatt, M.; Chorev, M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *283*, 876-884. (c) Zhang, C.X.; Chang, P.V.; Lippard, S.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6536-6537. (d) Dorman, G.; Olszewski, J.D.; Prestwich, G.D. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2292-2297.
46. (a) Rao, S; He, L.; Chakravarty, S.; Ojima, I., Orr, G.A.; Horwitz, S.B. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37990-37994. (b) Xia, S.; Kenesky, C.S.; Rucker, P.V.; Smith, A.B.; Orr, G.A.; Horwitz, S.B. *Biochemistry* **2006,** *45,* 11762-11775.
47. (a) Rademann, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4554-4556. (b) David, R.; Richter, M.P.O.; Beck-Sickinger, A.G. *Eur. J. Biochem*. **2004**, *271*, 663-667.
48. Wieland, T.; Bokelmann, E.; Bauer, L.; Lang, H.U.; Lau, H. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *586*, 129-139.
49. Dawson, P.E.; Muir, T.W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S.B.H. *Science* **1994**, *266*, 776-779.
50. Kolb, H.C.; Finn, M.G.; Sharples, K.B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
51. Green, T.W.; Wuts, P.G.M. *Protective groups in Organic Synthesis* 2nd Ed., Wiley, New York, **1991**.
52. (a) Bräse, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5188-5240. (b) L'Abbé, G. *Chem. Rev.* **1969**, *69*, 345-363.
53. (a) Paul, S.; Nanda, P.; Gupta, R.; Loupy, A. *Synthesis* **2003**, 2877-2881. (b) Sarvari, M.H.; Sharghi, H. *J. Org. Chem*. **2004**, *69*, 6953-6956. (c) Kangani, C.O.; Kelley, D.E.; Day, B.W. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6289-6292.
54. (a) Xing, D.; Guan, B.; Cai, G.; Fang, Z.; Yang, L.; Shi, Z. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 693-696. (b) Ueura, K.; Miyamura, S.; Satoh, T.; Miura, M. *J. Organomet. Chem.* **2006**, *691*, 2821-2826.
55. (a) Gooβen, L.J.; Winkel, L.; Döhring, A.; Ghosh, K.; Paetzold, J. *Synlett* **2002**, 1237-1240. (b) Urawa, Y.; Ogura, K. *Tetrahedron Lett*. **2003**, *44*, 271-273. (c) Wang, D.; Zhang, Z. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4645-4648. (d) Zhou, C.; Larock, R.C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2302-2303. (e) Bandgar, B.P.; Patil, A.V. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7627-7630. (f) Xin, B.; Zhang, Y.; Cheng, K. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5725-5731.

56. (a) Olah, G.A. *Friedel-Crafts Chemistry* Ed. John Wiley & Sons NY, **1973**. (b) Matsushita, Y.; Sugamoto, K.; Matsui, T. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4723-4727. (c) Gopalkrishnan, M.; Sureshkumar, P.; Kanagarajan, V.; Thanusu, J. *Catalysis Commun.* **2005**, *6*, 753-756.
57. (a) Janssen, P.A.J.; Van Daele, G.H.P. DE Patent 2,353,357 **1974**; *Chem. Abst* **1974**, *81*, 49433. (b) Janssen, P.A.J.; Van Daele, G.H.P.; Boey, J.M. US Patent 4 035 376 **1977**; *Chem. Abst*. **1977**, *87*, 167738.
58. Suhana, H.; Srinivasan, P. *Synthetic Commun.* **2003**, *33*, 3097-3102.
59. Punna, S.; Finn, M.G. *Synlett* **2004**, *1*, 99-100.
60. Hosoya, T.; Hiramatsu, T.; Ikemoto, T.; Nakanishi, M.; Aoyama, H.; Hosoya, A.; Iwata, T.; Maruyama, K.; Endo, M.; Suzuki, M. *Org. Biomol. Chem*. **2004**, *2*, 637-641.
61. Hotten, B.W. *Ind. Eng. Chem.* **1957**, *49*, 1691-1694.
62. Rondestvedt, C.S. Jr. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3118-3123.
63. Sharma, S.K.; Tandon, M.; Lown, J.W. *Eur. J. Org. Chem*. **2000**, 2095-2103.
64. Takemoto, T.; Yasuda, K.; Ley, S.V. *Synlett* **2001**, 1555-1556.
65. (a) Webb, K.S.; Ruszkay, S.J. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 401-410. (b) Travis, B.R.; Sivakumar, M.; Hollist, G.O.; Borhan, B. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1031-1034. (c) Scholz, D. *Monatsh. Chem.* **1979**, *110*, 1471-1473.
66. Tam, S.; Jimenez, L.; Diederich, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1503-1505.
67. (a) Dufaud, V.; Thivolle-Cazat, J.; Basset, J-M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 426-427. (b) Ebert, G.W.; Juda, W.L.; Kosakowski, R.H.; Ma, B.; Dong, L.; Cummings, K.E.; Phelps, M.V.B.; Mostafa, A.E.; Luo, J. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4314-4317.
68. (a) Ho, T-L. *Synth. Commun.* **1978**, *8*, 15-17. (b) Delgado, A.; Clardy, J. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2789-2790. (b) Giurg, M.; Said, S.B.; Syper, L.; Mlochowski, J. *Synth. Commun.* **2001**, *31*, 3151-3159.
69. Bogert, M.T.; Harris, C.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1919**, *41*, 1676-1690.
70. Chihara, T. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1980**, *24*, 1215-1216.
71. (a) Ogawa, H.; Chihara, T.; Taya, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 1365-1369. (b) Ogawa, H.; Ichimura, Y.; Chihara, T.; Teratani, S.; Taya, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1986**, *59*, 2481-2483.
72. Zhu, J.; Wang, X-Z.; Chen, Y-Q.; Jiang, X-K.; Chen, X-Z.; Li, Z-T. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6221-6227.
73. Reimer, M.; Downes, H.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1921**, *43*, 945-951.
74. Williams, J.L.R.; Laakso, T.M.; Dunham, K.R.; Borden, D.G.; VanDerBerghe, J.; VanAllan, J.A.; Reynolds, D.D. *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 817-820.
75. Niwayama, S. *J. Org. Chem*. **2000**, *65*, 5834-5836.
76. Chenot, E-D.; Bernardi, D.; Comel, A.; Kirsch, G. *Synth. Commun.* **2007**, *37*, 483-490.
77. (a) Katritzky, A.R.; Zhang, Y.; Singh, S.K. *Synthesis* **2003**, 2795-2798. (b) Katritzky, A.R.; Shestepalov, A.A.; Suzuki, K. *Synthesis* **2004**, 1806-1813.
78. Katritzky, A.R.; Lan, X.; Yang, J.Z.; Denisko, O.V. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 409-548.
79. Angyal, S.J.; Tetaz, J.R.; Wilson, J.G. *Org. Synth.***1963**, *5*, 690. (b) Campaigne, E.; Bourgeois, R.C.; McCarthy, W.C. *Org. Synth.***1963**, *4*, p 918.
80. Kan, T.; Tminari, Y.; Morohashi, Y.; Natsugari, H.; Tomita, T.; Iwatsubo, T.; Fukuyama, T. *Chem. Commun.* **2003**, 2244-2245.
81. McOmie, J.F.W.; Watts, M.L.; West, D.E. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 2289-2292.
82. Aldrich Handbook **2007-2008**
83. Pollock, J. R. A.; Stevens, R. *Dictionary of Organic Compounds.* 4th Ed.; Eyre & Spottiswoode Publishers Ltd: London, **1965**; Vol. 5, p. 2949.
84. Castell, J.V.; Hernández, D.; Gómez-Lechón, M.J.; Lahoz, A.; Miranda, M.A.; Morera, I.M.; Pérez-Prieto, J.; Sarabia, Z. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 660-665.

85. Bernardi, D. *Synthèse d'analogues photoactivables du glutathion pour l'étude du système cellulaire du glutathion.* Thèse soutenue le 19 octobre **2005**. Université Paul Verlaine de Metz.
86. Rouessac, F.; Rouessac, A.; Cruché, D. *Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales modernes*. 6ème Ed., Dunod, Paris, **2004**, p148.
87. Deseke, E.; Nakatani, Y.; Ourisson, G. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 243-251.
88. Hayes, P.C.; May, L.; Hayes, J.D.; Harrison, D.J.; *Gut* **1991**, *32*, 1546-1549.
89. (a) Burg, D.; Filippov, D.V.; Hermanns, R.; Van der Marel, G.A.; Van Boom, J.H.; Mulder, G.J. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 195-205. (b) Burg, D.; Hameetman, L.; Filippov, D.V.; Van der Marel, G.A.; Mulder, G.J. *Bioorg. Med. Chem*. **2002**, *12*, 1579-1582.
90. Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Jakoby, W.B. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 7130-7139.
91. Miyaji, K.; Ishiwata, N.; Nakamura, T. WO2004033433 **2004**; *Chem. Abs. 140*, 357335.
92. Labrecque, D.; Attardo, G.; Bubenik, M.; Chan, L.; Charron, S.; Denis, R.; Falardeau, G.; Lamothe, S.; Preville, P.; Zacharie, B.; Rej, R. WO200075129; *Chem. Abs. 134*, 42055.
93. (a) Fertig, G.; Herting, F.; Koerner, M.; Kubbies, M.; Limberg, A.; Reiff, U.; Tibies, U. WO2005121119, **2005**; *Chem. Abs. 144*, 51438. (b) Fertig, G.; Herting, F.; Koerner, M.; Kubbies, M.; Limberg, A.; Reiff, U.; Tibies, U. WO2005121120, **2005**; *Chem. Abs. 144*, 69719. (c) Fertig, G.; Herting, F.; Koerner, M.; Kubbies, M.; Limberg, A.; Reiff, U.; Tibies, U. WO2005121134; *Chem. Abs. 144*, 69718.
94. Martin, E.L. GB Patent 705,950 **1954**; *Chem. Abst. 49*, 11219.
95. Birkinshaw, J.H.; Chaplen, P. *Biochem. J.* **1955**, *60*, 255-259.
96. Griffing, J.M.; Salisbury, L.F. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 3416-3419.
97. Dawson, M.I.; Jong, L.; Hobbs, P.D.; Cameron, J.F.; Chao, W.; Pfahl, M.; Lee, M-O.; Shroot, B.; Pfahl, M. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3368-3383.
98. Bäuerle, P.; Würthner, F.; Götz, G.; Effenberger, F. *Synthesis* **1993**, 1099-1103.
99. Van Pham, C.; Macomber, R.S.; Mark, H.B.Jr.; Zimmer, H. *J. Org. Chem*. **1984**, *49*, 5250-5253.
100. Decroix, B.; Morel, J.; Pastour, P. *J. Chem. Res. Miniprint* **1978**, 1848-1870.
101. Karwatsky, J.; Daoud, R.; Cai, J.; Gros, P.; Georges, E. *Biochemistry* **2003**, *42*, 3286-3294.
102. Bernardi, D.; Battaglia, E.; Kirsch, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2006**, *16*, 1601-1604.
103. Cavelier, F.; Daunis, J.; Jaquier, R. *Bull. Soc. Chim. Fr*. **1990**, *2*, 210-225.
104. Sidenius, U.; Skonberg, C.; Olsen, J.; Hansen, S.H. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 75-81.
105. D'Silva, C.; Al-Timari, A.; Douglas, K.T. *Biochem. J.* **1982**, *207*, 329-332.
106. Bernardi, D.; Dicko, A.; Kirsch, G. *Synthesis* **2006**, 509-513.
107. Larock, R.C. Comprehensive *Organic Transformation. A guid to functional Group Preparation*. VCH Publishers, Inc. **1989**, p409.
108. Ryu, HC.; Jin, M-K.; Kim, S.Y.; Choi, H-K.; Kang, S-U.; Kang, D.W.; Lee, J.; Pearce, L.V.; Pavlyukovets, V.A.; Morgan, M.A.; Tran, R.; Toth, A.; Lundberg, D.J.; Blumberg, P.M. *J. Med. Chem.* **2008**, *51,* 57-67
109. Gelinsky, M.; Volger, R.; Vahrenkamp, H. *Inorg. Chim. Acta* **2003**, *244*, 230-238.
110. (a) Kawakami, T.; Akaji, K.; Aimoto, S. *Org. Lett*. **2001**, *3*, 1403-1405. (b) Lee, H.B.; Pattarawarapan, M.; Roy, S.; Burgess, K. *Chem. Commun*. **2003**, 1674-1675. (c) Grieco, P.; Campiglia, P.; Gomez-Monterrey, I.; Lama, T.; Novellino, E. *Synlett* **2003**, 2216-2218.
111. Pearson, D.A.; Blanchette, M.; Baker, M.L.; Guindon, C.A. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739-2742.

112. Díaz, S.; González, A.; González de Riancho. S.; Rodríguez, A. *J. Organomet. Chem*. **2000**, *610*, 25-30.
113. Bernardi, D.; Ba, L.A.; Kirsch, G. *Synthesis* **2007**, 140-144.
114. Sakowski, J.; Böhn, M.; Sattler, I.; Dahse, H-M.; Schiltzer, M. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2886-2899.
115. Burg, D.; Riepsaame, J.; Pont, C.; Mulder, G.; Van de Water, B. *Biochem. Pharmacol.*, **2006**, *71*, 268-277.
116. Cook, R.J.; Björnestedt, R.; Douglas, K.T.; McKie, J.H.; King, M.D.; Coles, B.; Ketterer, B.; Mannervik, B. *Biochem. J.*, **1994**, *302*, 383-390.
117. Albert, H. *Triphényl S-glutathion : Evaluation in vitro et effet sur la résistance de cellules cancéreuses d'un puissant inhibiteur de la glutathion S-transférase π humaine* Master soutenu le 26 juin **2007**. Université Henri Poincaré de Nancy 1
118. Thiele, C.; Fahrenholz, F. *Biochemistry* **1993**, *32*, 2741-2746.
119. Albrecht, H.O. *Z. Phys. Chem*. **1928**, *135*, 321-330.
120. White, E.H.; Zafiriou, O.; Kägi, H.H.; Hill, J.H.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 940-941.
121. Mülhaupt, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1054-1063.
122. Ringsdorf, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1064-1076.
123. Staudinger, H.; Meyer, *J. Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635-646.
124. Gololobov, Y.G.; Kasukhin, L.F. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1353-1406.
125. (a) Gololobov, Y.G.; Zhmurovo, I.N.; Kasukhin, L.F. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 437-472. (b) Köhn, M.; Breinbauer, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3106-3116.
126. Saxon, E.; Bertozzi, C.R. *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
127. Lin, F.L.; Hoyt, H.M.; van Halbeck, H.; Bergman, R.G.; Bertozzi, C.R. *J. Am. Chem. Soc*. **2005**, *127*, 2686-2695.
128. (a) Hashimoto, M.; Hatanaka, Y. *Chem. Pharm. Bull*. **2005**, *53*, 1510-1512. (b) Kho, Y.; Kim, S.C.; Jiang, C.; Barma, D.; Kwon, S.W.; Cheng, J.; Jaunbergs, J.; Weinbaum, C.; Tamanoi, F.; Falck, J.; Zhao,Y. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **2004**, *101*, 12479-12484.
129. (a) Nilsson, B.L.; Kiesling, L.L.; Raines, R.T. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939-1941. (b) Nilsson, B.L.; Kiesling, L.L.; Raines, R.T. *Org. Lett*. **2001**, *3*, 9-12. (c) Soellner, M.B.; Nilsson, B.L.; Raines, R.T. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4993-4996.
130. Saxon, E.;Armstrong, J.I.; Bertozzi, C.R. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141-2143.
131. Grandjean, C.; Boutonnier, A.; Guerreiro, C.; Fournier, J-M.; Mulard, L.A. *J. Org. Chem*. **2005**, *70*, 7123-7132.
132. Soellner, M.B.; Nillson, B.L.; Raines, R.T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8820-8828.
133. (a) Saxon, E.; Luchansky, S.J.; Hang, H.C.; Yu, C.; Lee, S.C.; Bertozzi, C.R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14893-14902. (b) Bianchi, A.; Bernardi, A. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2231-2234. (c) Bianchi, A.; Russo, A.; Bernardi, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 381-386. (d) Liu, L.; Hong, Z-Y.; Wong, C-H. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 429-432.
134. (a) Köhn, M.; Wacker, R.; Peters, C.; Schröder, H.; Soulère, L.; Breinbauer, R.; Niemeyer, C.M.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5830-5834. (b) Soellner, M.B.; Dickson, K.A.; Nilsson, B.L.; Raines, R.T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11790-11791. (c) Watzke, A.; Köhn, M.; Gutierrez-Rodriguez, M.; Wacker, R.; Schröder, H.; Breinbauer, R.; Kuhnlmann, J.; Alexandrov, K.; Niemeyer, C.M.; Goody, R.S.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1408-1412. (d) Kim, H.; Cho, J.K.; Aimoto, S.; Lee, Y-S. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1149-1151.
135. Azoulay, M.; Tuffin, G.; Sallem, W.; Florent, J.C. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2006**, *16*, 3147-3149.

136. (a) Merkx, R.; Rijkers, D.T.S.; Kemmink, J.; Liskamp, R.M.J. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4515-4518. (b) Nilsson, B.L.; Hondal, R.J.; Soellner, M.B.; Raines, R.T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5268-5269.
137. (a) Wang, C.C-Y.; Seo, T.S.; Li. Z.; Ruparel, H.; Ju, J. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 697-701. (b) Lemieux, G.A.; de Graffenried, C.L.; Bertozzi, C.R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4708-4709. (c) Hang, H.C.; Yu, C.; Pratt, M.R.; Bertozzi, C.R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6-7. (d) Van Switen, P.F.; Leeuwenburgh, M.A.; Kessler, B.M. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 20-27.
138. (a) Kiick, K.L.; Saxon, E.; Tirrell, D.A.; Bertozzi, C.R. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **2002**, *99*, 19-24. (b) Ovaa, H.; Van Swieten, P.F.; Kessler, B.M.; Leeuwenburgli, M.A.; Fiebiger, E.; Van den Nieuwendjk, A.M.C.H.; Galardy, P.J.; Van der Marel, G.A.; Ploegh, H.L.; Overkleef, H.S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3626-3629. (c) Volcadlo, D.J.; Hang, H.C.; Kim, E-J.; Hanover, J.A.; Bertozzi, C.R. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **2003**, *100*, 9116-9121.
139. Tsao, M-L.; Jian, F.; Schultz, P.G. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2147-2149.
140. Figuly, G.D.; Loop, C.K.; Martin, J.C. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 654-658.
141. (a) Block, E.; Eswarakrishnan, V.; Gernon, M.; Ofori-Okai, G.; Saha, C.; Tang, K.; Zubieta, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 658-665. (b) Block, E.; Ofori-Okai, G.; Zubieta, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2327-2329.
142. Dilworth, J.R.; Wheatley, N. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *199*, 89-158.
143. Herd, O.; Heβler, A.; Hingst, M.; Machnitzki, P.; Teppler, M.; Stelzer, O. *Catayis Today* **1998**, *42*, 413-420.
144. Rauchfuss, T.B. *Inorg. Chem.* **1977**, *16*, 2966-2968.
145. (a) Bianchi, A.; Bernardi, A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4565-4577. (b) Bianchi, A.; Russo, A.; Bernardi, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 381-386.
146. (a) Yardley, J.P.; Fletcher, H. *Synthesis* **1976**, 244-244. (b) Dardoize, F.; Gaudemar, M.; Goasdoue, N. *Synthesis* **1977**, 567-568. (c) Amato, J.S.; Karady, S.; Sletzinger, M.; Weinstock, L.M. *Synthesis* **1979**, 970-971. (d) Jeganathan, S.; Tsukamoto, M.; Schlosser, M; *Synthesis* **1990**, 109-111.
147. Grotjahn, D.B.; Joubran, C.; Combs, D. *J. Organomet. Chem*. **1999**, *589*, 115-121.
148. Luo, H.; Setyawati, I.; Rettig, S.J.; Ovig, C. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 2287-2299.
149. Huisgen, R. *1,3-Dipolar cycloaddition chemistry*, Ed. A. Pawda, Wiley, New York, **1984**, 1-176.
150. Tornøe, C.W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
151. Lutz, J.F. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2007**, *46*, 1018-1025.
152. Rostovsev V.V.; Green, L.G.; Fokin, V.V.; Sharpless, K.B. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2002**, *41*, 2596-2599.
153. Wu, P.; Fokin, V.V. *AldrichimicaActa* **2007**, *40*, 7-17.
154. (a) Wang, Z-X.; Zhao, Z-G. *J. Heterocyclic Chem.* **2007**, *44*, 89-92. (b) Beckmann, H.S.G.; Wittmann, V. *Org. Lett*. **2007**, *9*, 1-4.
155. Appukkutta, P.; Dehaen, W.; Fokin, V.V.; Van der Eycken, E. *Org. Lett*. **2004**, *6*, 4223-4225.
156. Kolb, H.C.; Sharpless, K.B. *DDT* **2003**, *8*, 1128-1137.
157. Whiting, M.; Muldoon, J.; Lin, Y-C.; Silverman, S.M.; Lindostrom, W.; Olson, A.J.; Kolb, H.C.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B.; Elder, J.H.; Fokin, V.V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1435-1439.
158. Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V.V.; Noodleman, L.; Sharpless, K.B.; Fokin, V.V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210-216.
159. Orgueira, H.A.; Fokas, D.; Isome, Y.; Chan, P.C-M.; Baldino, C.M. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2911-2914.

160. Reddy, K.R.; Rajgopal, K.; Kantam, M.L. *Synlett* **2006**, 957-959.
161. Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192-3193
162. Chan, T.R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K.B.; Fokin, V.V. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855.
163. Rodionov, V. O.; Presolski, S. I.; Gardinier, S.; Lim, Y.-H.; Finn, M. G. *J. Am. Chem. Soc*. **2007**, *129*, 12696-12704.
164. (a) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.***2004***, 126,* 15046-15047. (b) Hsu, T-L.; Hanson, S.R.; Kishikawa, K.; Wang, S-K.; Sawa, M.; Wong, C-H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 2614-2619.
165. Arosio, D.; Bertoli, M.; Manzonib, L.; Scolasticoa, C. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 3697-3700.
166. Guo, Z.; Lei, A.; Liang, X.; Xu, Q. *Chem. Commun.* **2006**, 4512-4514.
167. (a) Kolb, H.C.; Walsh, J.C.; Chen, K. **2006**, XO2006116629, *Chem. Abst.145*, 455222. (b) Sirion, U.; Kim, H.J.; Lee, J.H.; Seo, J.W.; Lee, B.S.; Lee, S.J.; Oh, S.J.; Chi, D.Y. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3953-3957. (c) Lutz, J-F.; Zarafshani, Z. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 958-970.
168. Lin, P-C.; Ueng, S-H.; Yu, S-C.; Jan, M-D.; Adak, A.K.; Yu, C-C.; Lin, C-C. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2131-2134.
169. Meier, J.L.; Mercer, A.C.; Rivera, H.Jr.; Burkart, M.D. *J. Am. Chem. Soc*. **2006**, *128*, 12174-12184.
170. Sawa, M.; Hsu, T-L.; Itoh, T.; Sugiyama, M.; Hanson, S.R.; Vogt, P.K.; Wong, C-H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 12371-12376
171. Hayland, R. *The Handbook : A guide to fluorescent probes and labeling technologies.* 10th Ed. Molecular Probes Invitrogen **2005**. site internet www.probes.invotrogen.com
172. Natala, S. R., Muralidhar, R. M., Stephen, C.; Kiranmai G.; Stanley C. B.; Premkumar, R.; Ramana, M. V. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4093-4097.
173. (a) Yang, Z.-Y.; Xia, Y.; Xia, P.; Cosentino, L. M.; Lee, K.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1483-1484. (b) Spino, C.; Dodier, M.; Sotheeswaran, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3475-3478. (c) Bedoya, L. M.; Beltrán, M.; Sancho, R.; Olmedo, D. A.; Sánchez-Palomino, S.; del Olmo, E.; López-Pérez, J. L.; Muñoz, E.; San Feliciano, A.; Alcamí, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4447-4450.
174. (a) Bonsignore, L.; Cottiglia, F.; Elkhaili, H.; Jehl, F.; Lavagna, S. M.; Loy, G.; Manna, F.; Monteil, H.; Pompei, D.; Secci, D. *Farmaco* **1998**, *53*, 425-430. (b) Khan, I. A.; Kulkarni, M. V.; Sun, C.-M. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 1168-1172.
175. (a) Manolov, I.; Danchev, N. *Eur. J. Med. Chem*. **1995**, *30*, 531-535. (b) Manolov, I.; Maichle-Moessmer, C.; Danchev, N. *Eur. J. Med. Chem*. **2006**, *41,* 882-890.
176. Bariana, D. S. *J. Med. Chem.* **1970**, *13,* 544-546.
177. (a) Ghate, M.; Manohar, D.; Kulkarni, V.; Shobha, R.; Kattimani, S. Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 297-302. (b) Ghate, M.; Kusanur, R. A.; Kulkarni, M. V. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 882-887. (c) Kontogiorgis, C. A.; Hadjipavlou-Litina, D. J. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6400-6408.
178. (a) Tyagi, Y. K.; Kumar, A.; Raj, H. G.; Vohra, P.; Gupta, G.; Kumari, R.; Kumar, P.; Gupta, R. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 413-420. (b) Beillerot, A.; Rodríguez Domínguez, J. C.; Kirsch, G.; Bagrel, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2008**, *18*, 1102-1105.
179. (a) Peng, F.-C.; Cheng, J.-S. *Mycopathologia* **1997**, *137*, 125-128. (b) Onderwater, R. C. A.; Venhorst, J.; Commandeur, J. N. M.; Vermeulen, N. P. E. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12*, 555-559. (c) Laurin, P.; Ferroud, D.; Klich, M.; Dupuis-Hamelin, C.; Mauvais, P.; Lassaigne, P.; Bonnefoy, A.; Musicki, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **1999**, *9*, 2079-2084. (d) Cravotto, G.; Balliano, G.; Robaldo, B.; Oliaro-Bosso, S.; Chimichib, S.; Boccalini,

M. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2004**, *14*, 1931-1934. (e) Garino, C.; Pietrancosta, N.; Laras, Y.; Moret, V.; Rolland, A.; Quéléver, G.; Kraus, J.-L. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2006**, *16*, 1995-1999

180. (a) Kosiova, I.; Kovackova, S.; Kois, P. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 312-320. (b) Nonaka, H.; Tsukiji, S.; Ojida, A.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc*. **2007**, *129*, 15777-15779. (c) Seela, F.; Sirivolu, V. R.; Chittepu, P. *Bioconjugate Chem.* **2008,** *19,* 211-224.
181. (a) Rodríguez-Domínguez, J. C.; Kirsch, G. *Synthesis* **2006**, 1895-1897. (b) Rodríguez-Domínguez, J. C.; Kirsch, G. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 3279-3281.
182. Takagaki, K.; Kon,A.; Kawasaki, H.; Nakamura, T.; Endo, M. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1989**, *19*, 207-214.
183. Chenot, E-D.; Rodríguez-Domínguez, J-C.; Hannewald, P.; Comel, A.; Kirsch, G. *J. Heterocyclic Chem.* **2008**, *45*, 1429-1435.
184. Kosiova, I; Kois, P. *Synthesis of novel coumarin based fluorescent probes* 10th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry. (www.usc.es /congresos/ecsoc/10/ECSOC10.htm).
185. Derbré, S.; Roué, E.; Poupon, E.; Susin, S.A.; Hocquemiller, R. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 979-982.
186. Chen, L.; Hu, T-S.; Zhu, J.; Wu, H.; Yao, Z-J. *Synlett* **2006**, 1225-1229.
187. Berscheid, R.; Nieger, M.; Vögtle, F. Chem. Ber. 1992, 125, 2539-2552.
188. Chaturvedi, D.N.; Knittel, J.J.; Hruby, J.V.J.;L. Castrucci, M.L.; Hadleyt, M.C. J. Med. Chem. 1984, 27, 1406-1410.
189. Zhao, X.Z.; Semenova, E.A.; Liao, C.; Nicklaus, M.; Pommier, Y.; Burke, T.R.Jr. *Bioorg. Med Chem*. **2006**, *14*, 7816-7825.
190. Sawa, M.; Hsu, T-L.; Itoh, T.; Sugiyama, M.; Hanson, S.R.; Vogt, P.K.; Wong, C-H. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **2006**, *103*, 1271-12376.
191. Rodighiero, P.; Manzini, P.; Pastorini, G.; Bordin, F.; Guiotto, A. *J. Heterocycl. Chem.* **1987**, *24*, 485-488.
192. Punna, S.; Finn, M.G. *Synlett* **2004**, 99-100.
193. Badyal, J.P.; Cameron, A.M.; Cameron, N.R.; Coe, D.M.; Cox, R.; David, B.G.; Oates, L.J.; Oye, G.; Steel, P.G. *Tetrahedron Lett*. **2001**, *42*, 8531-8533.

ANNEXES

ANNEXE 1

Données pour la partie expérimentale

Point de fusion

Les points de fusion ont été déterminés à l'aide d'un binoculaire Stuart SMP3. Ils ne sont pas corrigés et sont exprimés en degrés Celsius (°C).

Spectres RMN (Résonance Magnétique Nucléaire)

Les spectres RMN ^{1}H, ^{13}C, ^{31}P ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre Bruker AC250 à transformé de Fourier (250Hz). Les déplacements chimiques δ sont exprimés en partie par million (ppm) relative à la référence standard interne (solvant) pour le proton (^{1}H) et le carbone (^{13}C) et H_3PO_4 pour le phosphore (^{31}P). Les constantes de couplages J sont exprimées en Hertz (Hz). Les solvants utilisés pour la réalisation des spectres ($CDCl_3$, DMSO-d_6, D_2O, MeOD-d_4, Acétone-d_6) sont indiqués entre parenthèses.

Les abréviations des signaux sont : s (singulet); d (doublet); t (triplet); q (quadruplet); sep (septuplet); m (multiplet).

Spectres de masse

Les spectres de masse ont été obtenus sur un spectromètre Hewlett Packard 5971A à impact électronique (70eV) après séparation par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire.

Spectres de masse haute résolution

Les spectres de masse haute résolution MALDI-FTICRMS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization coupled to Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry) ont été réalisés sur un spectromètre IonSpec Explorer Fourier Transform 9.4 T équipé d'un module ProMALDI (IonSpec, Lake Forest, USA) avec un synstème laser (Orion air cooled Nd:YAG System) à 355 nm (New wave research, Fremont, USA). La matrice utilisée est une solution saturée d'acide 2,5-dihydroxybenzoique (2,5-DHB) dans 50% de méthanol et 0.1% d'acide trifluoroacetique. Les spectres ont été calibrés par rapport à une référence interne (une solution de méthotrexate 1.10^{-6} M) et le pic utilisé pour la calibration correspond à l'ion pseudomoléculaire du méthotrexate $[M+H]^+$ m/z = 455.17859 Da.

Spectres infrarouges

Les spectres infrarouges ont été réalisés sur un spectromètre 1600-FTIR Perkin-Elmer sur pastilles de KBr.

Spectres UV

Les spectres ultraviolets ont été réalisés sur un spectromètre Perkin Elmer UV/Vis Spectrometer Lambda 14.

CLHP

Les chromatogrammes ont été réalisés sur colonne semi-pérparative (C18) couplée à un détecteur UV. La phase mobile utilisée est un mélange eau/acétonitrile (50:50).

Fluorescence

Les spectres de fluorescence ont été réalisés sur un spectromètre CS-9301 (Shimadzu, Japan).

ANNEXE 2

Tests de révélation des groupements fonctionnels

Test des azotures aliphatiques

Les groupements azotures sont très utilisés en synthèse organique. Dans ce manuscrit nous avons vu une de ses utilisations qui est la bioconjugaison. Ces groupements sont inertes dans la plupart des environnements biologiques mais peuvent réagir facilement avec des esters *ortho*-diphenylphosphinobenzoate (ligation de Staudinger) et avec des alcynes sous influence de catalyse au cuivre (I) (réaction de "Click Chemistry").*

Comme nous avons mis en œuvre ces deux réactions il était intéressant d'avoir une méthode, un test, facile et rapide à mettre en œuvre au laboratoire pour confirmer la présence d'un tel groupement.

Ce test consiste dans un premier temps à réduire l'azoture en amine grâce à une phosphine puis à révéler le composé par le test à la ninhydrine (décrit précédemment).

D'après les travaux de Punna et Finn[192], le test peut se faire soit en solution soit sur CCM (chromatographie sur couche mince).

Tous les tests que nous avons effectués ont été réalisés sur CCM.

Pour cela, nous avons ajouté 1% (w/v) de triphénylphosphine à l'éluant utilisé pour la réalisation de la CCM. Une fois l'élution terminée la plaque est séchée et trempée dans une solution de ninhydrine à 0,5% dans l'éthanol puis chauffée sur une plaque chauffante jusqu'à révélation (apparition d'une tâche rose si le test est positif).



* Cf. Chapitre VI

[192] Punna, S.; Finn, M.G. *Synlett* **2004**, 99-100.

Test des thiols libres

Ce test, couramment utilisé en biologie, est appelé test de Ellman. Il permet de détecter et de quantifier la présence et la concentration en thiol libre (-SH) contenu dans un échantillon. Pour cela, on peut utiliser le réactif de Ellman qui est l'acide 5,5-dithio-2-nitrobenzoique plus connu sous le nom de DTNB.[193]

Nous avons vu dans le chapitre IV de ce manuscrit, lors des tests d'inhibition, l'utilisation d'un autre composé, le CDNB (1-chloro-2,4-dinotrobenzène). Ce composé permet de former un complexe GS-DNB qui possède une absorbance caractéristique à 340nm. Nous avons donc utilisé ce composé pour pouvoir visualiser la présence ou non d'une fonction thiol libre.

Tous les tests que nous avons effectués ont été réalisés sur CCM.

Pour cela, nous avons fait une solution $10 g.L^{-1}$ de CDNB dans l'eau distillée. Après avoir fait migrer la CCM et l'avoir séchée, elle est plongée rapidement dans cette solution puis à nouveau séchée. L'apparition d'une tache jaune correspond à un test positif (présence de –SH sur la molécule).



[193] Badyal, J.P.; Cameron, A.M.; Cameron, N.R.; Coe, D.M.; Cox, R.; David, B.G.; Oates, L.J.; Oye, G.; Steel, P.G. *Tetrahedron Lett*. **2001**, *42*, 8531-8533.

ANNEXE 3

Mode opératoire pour réaliser les tests d'inhibition

Essai de marquage par photoaffinité de l'albumine (ASB) et de la $hGSTP_{1-1}$ avec le composé 52a

Exemple de protocole de test d'inhibition enzymatique
(Activité de conjugaison du CDNB au GSH catalysée par l'enzyme $hGSTP_{1-1}$)

GSH : 92,2 mg/mL (tampon[K_2HPO_4/KH_2PO_4] 0,1 M, pH 6,5)
CDNB : 81,04 mg/mL (DMSO), utiliser de préférence un tube en polypropylène

TEMOIN SOLVANT

λ (340nm); ε (9600$M^{-1}.cm^{-1}$)	Essai Volume (µL)	Témoin Volume (µL)
Tampon[K_2HPO_4/KH_2PO_4] 0,1 M, pH 6,5	436,5	436,5
$[GSH]_{initiale}$ (300mM) (3mM finale)	4,5	4,5
$[CDNB]_{initiale}$ (400mM) (4mM finale)	4,5	4,5
Tampon[K_2HPO_4/KH_2PO_4] 0,1 M, pH 6,5	-	4,5
$[hGSTP1]_{initiale}$ (0,015 $mg.mL^{-1}$)	4,5	-

Volume final: 450µL

AVEC INHIBITEUR

λ (340nm); ε (9600$M^{-1}.cm^{-1}$)	Essai Volume (µL)	Témoin Volume (µL)
Tampon[K_2HPO_4/KH_2PO_4] 0,1 M, pH 6,5	432	432
$[GSH]_{initiale}$ (300mM) (3mM finale)	4,5	4,5
$[CDNB]_{initiale}$ (400mM) (4mM finale)	4,5	4,5
Tampon[K_2HPO_4/KH_2PO_4] 0,1 M, pH 6,5	-	4,5
Inhibiteur (dans EtOH, à concentrations variables)	4,5	4,5
$[hGSTP1]_{initiale}$ (0,015 $mg.mL^{-1}$)	4,5	-

Volume final: 450µL

Essai de marquage par photoaffinité de l'albumine (ASB) et de la $hGSTP_{1-1}$ avec le composé 52a

Matériels :

- Albumin Serum Bovine (ASB) fatty acid free (A8806, Sigma). Préparer une solution à 2 mg/mL dans le tampon [K_2HPO_4/KH_2PO_4] 0,1 M, pH 7.4 (tampon P)

-GST Pi purifiée et dialysée dans ammonium bicarbonate 50 mM pH7.4 (pas d'agent réducteur qui affecterait l'azoture). Concentration = 0.146 mg/mL.

- Composé **52a**, 12,5 mM (7,59mg/mL DMSO); 3,125 mM, 2,5 mM; 1,25 mM.

Protocole :

Concentration finale µM en composé **52a**

5 expériences avec ASB :

+ UV

-① 10 µL ASB (2 mg/mL) (20 µg) + 14 µL tampon P + 1 µL DMSO (0 µM finale)
-② 10 µL ASB (2 mg/mL) + 14 µL tampon P + 1 µL **52a** (1,25 mM) (50 µM finale)
-③ 10 µL ASB (2 mg/mL) + 14 µL tampon P + 1 µL **52a** (2,5 mM) (100 µM finale)
-④ 10 µL ASB (2 mg/mL) + 14 µL tampon P + 1 µL **52a** (3,125 mM) (250 µM finale)
-⑤ 10 µL ASB (2 mg/mL) + 14 µL tampon P + 1 µL **52a** (12,5 mM) (500 µM finale)

5 expériences avec GST Pi :

+ UV

-⑥ 24 µL GST Pi (3,5 µg)+ 1 µL DMSO (0 µM finale)
-⑦ 24 µL GST Pi + 1 µL **52a** (1,25 mM) (50 µM finale)
-⑧ 24 µL GST Pi + 1 µL **52a** (2,5 mM) (100 µM finale)
-⑨ 24 µL GST Pi + 1 µL **52a** (3,125 mM) (250 µM finale)
-⑩ 24 µL GST Pi + 1 µL **52a** (12,5 mM) (500 µM finale)
Homogénéiser les tubes.

Placer le mélange dans des microtubes 1,5 mL et placer la lampe UV 365 nm le plus près possible des tubes (enlever les capuchons et mettre les tubes sur un portoir dans un lit de glace). Irradier 1 heure.

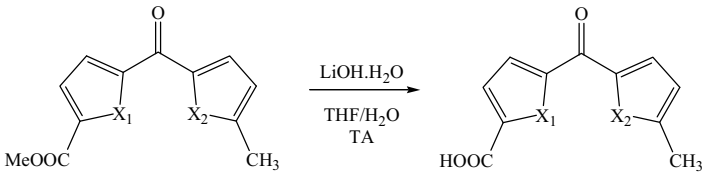
Précipiter l'ensemble des tubes au TCA 20% (25µL). Enlever soigneusement le TCA après centrifugation et resuspendre dans 25 µL de tampon de dénaturation avec dithiothéitol et SDS. Déposer sur un gel d'électrophorèse.

ANNEXE 4

Autres dérivés photoactivables du S-trityl glutathion

Formation des esters activés

Saponification



7b-d

8b X_1 : CH=CH et X_2: S
8c X_1 : S et X_2 : CH=CH
8d X_1 : S et X_2 : S

A une solution de 78,1mg (1éq., 0,3mmol) de composé **7b** ou **7c**, 79,9mg (1éq., 0,3mmol) de composé **7d**, dissous dans 6ml de tétrahydrofurane est ajoutée une solution de 37,8mg (3éq., 0,9mmol) d'hydroxyde de lithium monohydraté dissout dans 3ml d'eau distillée. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 30min puis 1ml d'acide chlorhydrique 1N est ajouté. Le tétrahydrofurane ainsi qu'une grande partie de l'eau sont évaporés, sous pression réduite. Le précipité formé est filtré sur Büchner.

Remarque :

*Le composé (**8a**), réalisé précédemment, correspond à X_1=X_2 : CH=CH.*

Acide 4-[(5-méthyl-2-thiényl)carbonyl]benzoique (8b)

$C_{13}H_{10}O_3S$ *MW=246,28g.mol^{-1}*

Produit de départ : X_1: CH=CH et X_2 : S

Aspect : solide beige

Rdt : 93%

Pf : 224°C

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 8,17 (d, 2H, J=8,1Hz); 7,88 (d, 2H, J=8,1Hz); 7,52 (d, 1H, J=3,8Hz); 6,96 (d, 1H, J=3,8Hz); 2,59 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (MeOD-d_4) δ : 189,0 (C=O); 168,8 (C=O); 153,3; 143,2; 142,0; 135,9; 135,1; 130,7 (2C); 129,9 (2C); 128,6; 15,9 (CH_3).

Acide 4-[(5-méthylbenzoyl)-2-thiophènecarboxylique (8c)

$C_{13}H_{10}O_3S$ *MW=246,28g.mol^{-1}*

Produit de départ : X_1: S et X_2 : CH=CH

Aspect : solide jaune

Rdt : 94%

Pf : 199°C

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 7.79 (d, 2H, J=7,9Hz); 7,77 (d, 1H, J=4,0Hz); 7,66 (d, 1H, J=4,0Hz); 7,38 (d, 2H, J=7,9Hz); 2,45 (s, 3H, C*H*$_3$).

RMN ^{13}C (MeOD-d_4) δ : 189,5 (C=O); 164,5 (C=O); 149,0; 145,4; 142,4; 135,8; 135,5; 134,3; 130,6 (2C); 130,4 (2C); 21,7 (CH_3).

Acide 5-[(5-méthyl-2-thiényl)carbonyl]-2-thiophènecarboxylique (8d)

$C_{11}H_8O_3S_2$ *MW=252,31g.mol^{-1}*

Produit de départ : X_1=X_2 : S

Aspect : solide jaune

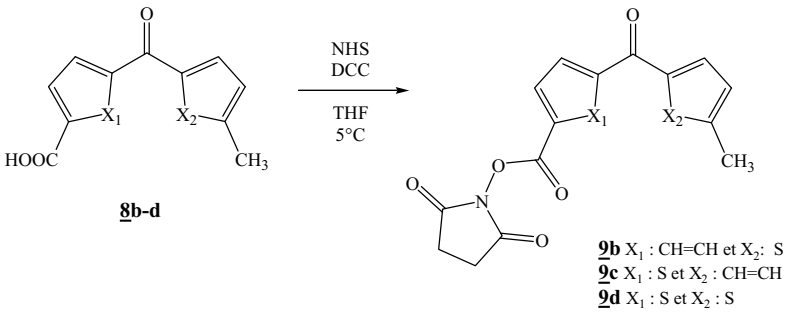
Rdt : 94%

Pf : 204°C

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 7,89 (d, 1H, J=4,0Hz); 7,85 (d, 1H, J=4,0Hz); 7,80 (d, 1H, J=4,0Hz); 6,99 (d, 1H, J=4,0Hz); 2,60 (s, 3H, C*H*$_3$).

RMN ^{13}C (MeOD-d_4) δ : 179,7 (C=O); 164,4 (C=O); 152,8; 148,3; 141,3; 141,1; 136,5; 134,4; 133,8; 128,6; 15,8 (CH_3).

Estérification



A 73,9mg (1éq., 0,3mmol) de composé **8b** ou **8c**, ou 75,7mg (1éq., 0,3mmol) de composé **8d**, dissous dans 10ml de tétrahydrofurane anhydre sont ajoutés 68,1mg (1,1éq., 0,33mmol) de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide. Le milieu réactionnel est placé dans un bain de glace et agité pendant 30min. 38mg (1,1éq., 0,33mmol) de *N*-hydroxysuccinimide sont ajoutés. La réaction est maintenue à 5°C pendant 20h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est extrait au dichlorméthane (15ml) et lavé à l'eau, puis avec de la soude 0,1N et enfin une solution saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous pression réduite. Le produit est purifié sur gel de silice (dichlorométhane).

Remarque :

*Le composé (**9a**), réalisé précédemment, correspond à X_1=X_2 : CH=CH.*

1-({4-[(5-Méthyl-2-thiényl)carbonyl]benzoyl}oxy)-2,5-pyrrolidinedione (9b)

$C_{17}H_{13}NO_5S$ MW=343,36g.mol^{-1}

Produit de départ : X_1: CH=CH et X_2 : S

Aspect : solide orange

Rdt : 79%

Pf : 173-174°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 8.18 (d, 2H, J=8,5Hz); 7,85 (d, 2H, J=8,5Hz); 7,34 (d, 1H, J=3,8Hz); 6,79 (d, 1H, J=3,8Hz); 2,87 (s, 4H, H_{suc}); 2,53 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 186,6 (C=O); 169,0 (2C=O); 161,2 (C=O); 151,8; 151,1; 143,7; 140,7; 136,2; 130,6 (2C); 129,1 (2C); 127,8; 127,1; 25,7 ($2CH_{2suc}$); 16,1 (CH_3).

1-({[5-(4-Méthylbenzoyl)-2-thiényl]carbonyl}oxy)-2,5-pyrrolidinedione (9c)

$C_{17}H_{13}NO_5S$ *MW=343,36g.mol^{-1}*

Produit de départ : X_1: S et X_2 : CH=CH

Aspect : solide incolore

Rdt : 76%

Pf : 170-172°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 8,01 (d, 1H, J=4,0Hz); 7,80 (d, 2H, J=8,0Hz); 7,66 (d, 1H, J=4,0Hz); 7,33 (d, 2H, J=8,0Hz); 2,93 (s, 4H, H_{suc}); 2,40 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 187,0 (C=O); 168,8 (2C=O); 157,1 (C=O); 150,9; 144,3; 136,0; 134,2; 133,2; 132,3; 129,6 (2C); 129,4 (2C); 25,4 ($2CH_{2suc}$); 21,7 (CH_3).

1-[({5-[(5-Méthyl-2-thiényl)carbonyl]-2-thiényl}carbonyl)oxy]-2,5-pyrrolidinedione (9d)

$C_{15}H_{11}NO_5S_2$ *MW=349,38g.mol^{-1}*

Produit de départ : X_1=X_2 : S

Aspect : solide jaune

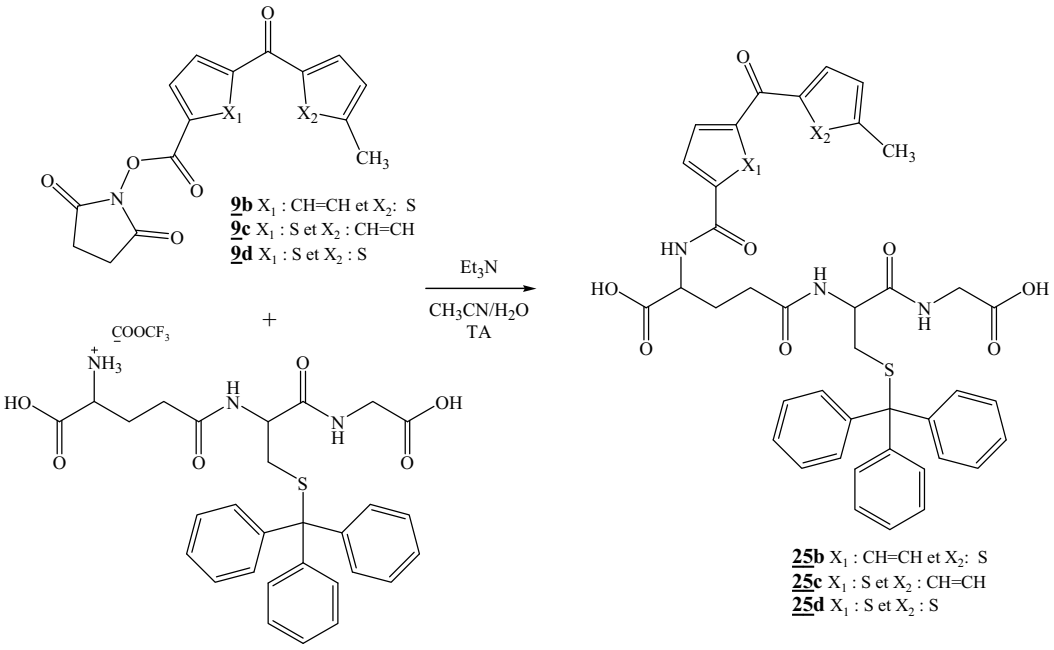
Rdt : 75%

Pf : 178-180°C

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ : 8,02 (d, 1H, J=3,8Hz); 7,83 (d, 1H, J=3,8Hz); 7,75 (d, 1H, J=3,8Hz); 6,90 (d, 1H, J=3,8Hz); 2,92 (s, 4H, H_{suc}); 2,61 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 177,5 (C=O); 168,8 (2C=O); 157,1 (C=O); 151,7; 150,2; 139,8; 136,0; 135,0; 131,8; 131,6; 127,2; 25,6 ($2CH_{2suc}$); 16,1 (CH_3).

Formation des dérivés photoactivables du glutathion S-trityle



A 49,4mg (1éq., 0,09mmol) de glutathion S-trityle (composé **22**) dissout dans un mélange eau distillée (550µl)/acétonitrile (1500µl) sont ajoutés 37,6µl (3éq., 0,27mmol) de triéthylamine et 34mg (1,1éq., 0,099mmol) de composé **9b** ou **9c**, ou 34,6mg (1,1éq., 0,099mmol) de composé **9d**. Le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris dans un minimum d'eau. La phase aqueuse est ensuite acidifiée avec de l'acide chlorhydrique 1N jusqu'à pH 7. Une fois ce pH atteint la phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (2x10ml). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium puis concentrées sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris dans l'éther à chaud puis filtré sur Büchner.

Remarque :

*Le composé (**25a**), réalisé précédemment, correspond à X_1=X_2 : CH=CH.*

N^5-{2-[(Carboxyméthyl)amino]-2-oxo-1-[(tritylsulfanyl)méthyl]éthyl}-N^2-{4-[(5-méthyl-2-thiényl)carbonyl]benzoyl}glutamine (25b)

$C_{42}H_{39}N_3O_8S_2$ *MW=777,91g.mol^{-1}*

Produit de départ : X_1 : CH=CH et X_2 : S

Aspect : solide beige

Rdt : 71%

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 8,00 (d, 2H, J=8,2Hz); 7,84 (d, 2H, J=8,2Hz); 7,47 (d, 1H, J=3,7Hz); 7,40-7,37 (m, 6H); 7,30-7,19 (m, 9H); 6,94 (d, 1H, J=3,6Hz); 4,67-4,60 (m, 1H, $H_{\alpha Cys}$); 4,30-4,24 (m, 1H, $H_{\alpha Glu}$); 3,82 (d, 2H, J=2,4Hz, $H_{\alpha Gly}$); 2,67-2,56 (m, 5H, $H_{\beta Cys}$+CH_3); 2,51-2,42 (m, 2H, $H_{\beta 2Glu}$); 2,40-2,25 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$); 2,24-2,03 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$).

N^5-{2-[(Carboxyméthyl)amino]-2-oxo-1-[(tritylsulfanyl)méthyl]éthyl}-N^2-{[5-(4-méthylbenzoyl)-2-thiényl]carbonyl}glutamine (25c)

$C_{42}H_{39}N_3O_8S_2$ *MW=777,91g.mol^{-1}*

Produit de départ : X_1 : S et X_2 : CH=CH

Aspect : solide incolore

Rdt : 56%

RMN ^{1}H (Acétone-d_6) δ : 7,83 (d, 2H, J=4,0Hz); 7,79 (d, 2H, J=8,2Hz); 7,41-7,38 (m, 8H); 7,33-7,18 (m, 9H); 4,66-4,54 (m, 1H, $H_{\alpha Cys}$); 4,45-4,34 (m, 1H, $H_{\alpha Glu}$); 3,90-3,83 (m, 2H, $H_{\alpha Gly}$); 2,67-2,58 (m, 2H, $H_{\beta Cys}$); 2,56-2,50 (m, 2H, $H_{\beta 2Glu}$); 2,44 (s, 3H, CH_3); 2,35-2,23 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$); 2,21-2,05 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$).

N^5-{2-[(Carboxyméthyl)amino]-2-oxo-1-[(tritylsulfanyl)méthyl]éthyl}-N^2-({5-[(5-méthyl-2-thiényl)carbonyl]-2-thiényl}carbonyl)glutamine (25d)

$C_{40}H_{37}N_3O_8S_3$ *MW=783,94g.mol^{-1}*

Produit de départ : X_1=X_2 : S

Aspect : solide jaune clair

Rdt : 64%

RMN ^{1}H (MeOD-d_4) δ : 7,87 (d, 1H, J=3,9Hz); 7,81 (2d, 2H, J=3,9Hz); 7,40-7,37 (m, 6H); 7,30-7,19 (m, 9H); 6,97 (d, 1H, J=3,9Hz); 4,61-4,56 (m, 1H, $H_{\alpha Cys}$); 4,29-4,23 (m, 1H,

$H_{\alpha Glu}$); 3,82 (d, 2H, J=2,4Hz, $H_{\alpha Gly}$); 2,62-2,52 (m, 5H, $H_{\beta Cys}$+CH_3); 2,48-2,40 (m, 2H, $H_{\beta 2Glu}$); 2,38-2,26 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$); 2,20-2,02 (m, 1H, $H_{\beta 1Glu}$).

ANNEXE 5

Publications

Synthetic Communications®, 37: 483–490, 2007
Copyright © Taylor & Francis Group, LLC
ISSN 0039-7911 print/1532-2432 online
DOI: 10.1080/00397910601039226

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Preparation of Monoalkyl Terephthalates: An Overview

Elodie-Denise Chenot
Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique (LIMBP), Université Paul Verlaine Metz, Metz, France

Dan Bernardi
Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans, Orléans, France

Alain Comel and Gilbert Kirsch
Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique (LIMBP), Université Paul Verlaine Metz, Metz, France

Abstract: Terephthalic acid can be readily converted to the corresponding monoalkyl terephthalate in high yield, via a two-step procedure. This method is advantageously compared to the more representative methods described in the literature. The purification of the expected monoester, a crucial problem for this synthetic pathway, is discussed, and an original procedure has been developed.

Keywords: dialkyl terephthalates, monoalkyl terephthalates, monohydrolysis, terephthalic acid

INTRODUCTION

Preparation of monoesters of symmetric dicarboxylic acids on a gram scale remains a challenge for synthetic chemists when the corresponding cyclic anhydrides are not readily available. Even recently, articles dealing with

Received in the U.K. April 24, 2006
Address correspondence to Alain Comel, Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique (LIMBP), Université Paul Verlaine Metz, 1 boulevard Arago, 57078, Metz Technopole, , France. E-mail: comel@univ-metz.fr

this problem have been published, starting either from the diacid or the dimethyl or diethyl esters.

When the diacid is the starting material, various supports acting as adsorbents[1] such as alumina or catalysts[2] (ion-exchange resins) are used in the presence of alkylating agents, and high selectivity is claimed by each author or research group. On the other hand, diesters require either selective enzymatic[3] or basic monohydrolysis under anhydrous[4] or aqueous[5] conditions. Although enzymatic hydrolysis is only used in specific cases, basic hydrolysis seems to be more general, and authors often discussed the versatility of their own method (e.g., Niwayama's procedure,[6] which has been applied successfully to several classes of aliphatic diesters).

Interesting, alternative ways are reported in the literature:

- esterification of a formyl-containing acid followed by oxidation of the formyl group to obtain the monoester of the symmetric diacid[7] and
- carboxylation of arylcopper or arylpalladium compounds.[8]

In the latter case, the availability of the starting material is the crucial point, and it can be more difficult to obtain than the monoester itself.

We were particularly interested in the preparation of monoesters of terephthalic acid **2** and describe here an easy-to-handle ester monohydrolysis of various dialkyl terephthalates **1** using solutions of potassium hydroxide in the corresponding alcohols. A comparison to the most representative methods described in the literature is also provided.

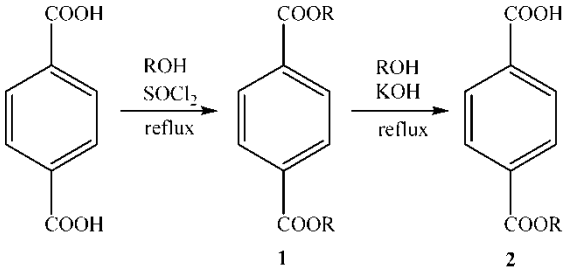
RESULTS AND DISCUSSION

We decided first to investigate the use of alumina as an adsorbent to transform specifically one of the acid groups to the corresponding ester. We therefore tried to adsorb terephthalic acid on commercial alumina following the procedure described in the literature.[1] Unfortunately, only traces of terephthalic were retained on alumina, unlike what was reported by Chihara et al.[1]

We also investigated the feasibility of a monohydrolysis of various diesters of terephthalic acid **1** in a basic medium (Scheme 1).

The latter have been prepared following a procedure often used in the laboratory (large excess of thionyl chloride added to an alcoholic solution of the diacid). The yields are reported in Table 1 and are generally more than 90% for primary alcohols, they obviously decrease for secondary alcohols (39% for isopropanol) because of the steric hindrance. No reaction has been observed when tertiobutanol was used.

Several procedures for monohydrolysis have been described in the literature,[5] generally dedicated to the formation of the monomethyl ester as starting material for different purposes.



R = Me, Et, Pr, *i*-Pr, Bu

Scheme 1.

Surprisingly, the ratios of potassium hydroxide/diester of terephthalic acid reported in the literature[5] are not exactly equal to one. Indeed, a slight excess of potassium hydroxide is used by some authors even though Hotten[5a] reported high yields of crude monomethyl terephthalic acid using a ratio of potassium hydroxide/dimethyl terephthalate equal to 0.97.

We therefore decided to evaluate the value of this ratio, and we observed that the best results were obtained when the value is logically equal to 1.

The solvent used is generally the corresponding alcohol, in order to avoid transesterification, but authors generally have not specified if anhydrous conditions are required. Nevertheless, we clearly observed an increase of terephthalic acid formation closely related to the presence of water.

The purification of the monoester obtained following this procedure is another crucial step, but still poorly described in the literature.

All the previous reports indicated that the expected monoester is always contaminated by small amounts of terephthalic acid as a by-product. The

Table 1. Preparation of dialkyl terephthalates

				Mp (°C)	
Entry	R	Product	Yield (%)	Found	Literature[a]
1	Me	1a	99	140–141	141–142
2	Et	1b	89	46–47	44
3	Pr	1c	99	29–31	31
4	*i*-Pr	1d	39	57–59	55–56
5	Bu	1e	95	Oil[b]	6

[a]See Ref. [9].
[b]At room temperature.

authors claimed that this monoester can be purified by recrystallization from water or acetone. Conversely, we observed that although purity really increases, traces of terephthalic acid are still observable by thin-layer chromatography (TLC).

However, terephthalic acid can be efficiently eliminated from the crude product when the latter is dissolved in a potassium hydroxide solution and quickly filtered to eliminate what remains in suspension.

Although the yields of monoesters decrease because of the presence of appreciable amounts of the latter in the filtration residues, this was the only practical way to obtain pure (diacid free especially) monoesters of terephthalic acid. This easy-to-handle procedure has been succesfully applied for all the monoesters listed in Table 2.

The low yield observed for monobutyl ester of terephthalic acid is only attributable to the poor solubility of potassium hydroxide in n-butanol.

In summary, we have clearly demonstrated that the easiest and less expensive way to prepare monoalkylesters of terephthalic acid consists of the monohydrolysis of the corresponding diester in the alcohol used for the preparation of the diester. The latter can be easily obtained in high yields from thionyl chloride in the corresponding alcohol.

High purity can be reached following the original procedure we describe here.

EXPERIMENTAL

Nuclear magnetic resonance spectra (^{1}H NMR and ^{13}C NMR) were expressed in parts per million and were recorded on Bruker-AC 250-MHz spectrometer. The chemicals shifts were obtained with $CDCl_3$ and DMSO-d_6 as solvent and TMS as internal standard. Melting points were determined on a Stuart SMP3 binocular and are uncorrected. Mass spectra for diester were measured with Hewlett Packard 5971A electron impact (70 eV) mass spectrometer, equipped with a Hewlett Packard 5890 series II gas chromatograph.

Table 2. Monohydrolysis of dialkyl terephthalates

				Mp (°C)	
Entry	R	Product	Yield (%)	Found	Literature[a]
1	Me	2a	77	219–220	230
2	Et	2b	72	168–169	171
3	Pr	2c	72	130	127–129
4	*i*-Pr	2d	62	164	166
5	Bu	2e	13	123–125	122–124

[a]See Ref. [9].

General Procedure for the Preparation of Dialkyl Terephthalates

A solution of terephthalic acid (1.0 g, 6 mmol) and corresponding alcohol (50 mL) was refluxed for 30 min. Thionyl chloride (18 mL, 20 eq) was added dropwise, and the mixture was maintained 4 to 10 h under reflux. After being cooled to room temperature, the solvent was removed under reduced pressure. The mixture was extracted twice with ethyl ether (50 mL) and washed with a basic (potassium hydroxide) solution. The combined organic layers were dried over $MgSO_4$. Removal of the solvent allowed as to obtain the diester as a pure product. Yields: 99% for **1a**, 89% for **1b**, 99% for **1c**, 39% for **1d**, 95% for **1e**.

Data

Terephthalic acid dimethyl ester (**1a**)**:** ^{1}H NMR ($CDCl_3$): 3.95 (s, 6H, -O-CH_3), 8.10 (m, 4H, H_{Ar}); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 52.4 (-O-CH_3), 129.5 (CH_{Ar}), 133.9 (C_{Ar}), 166.2 (C═O); GC-MS/EI: m/z (%): 194 (M^+, 25), 179 (4), 163 (100), 135 (24), 120 (9), 103 (15), 92 (4), 76 (17).

Terephthalic acid diethyl ester (**1b**)**:** ^{1}H NMR ($CDCl_3$): 1.41 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, -O-CH_2-CH_3), 4.41 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, -O-CH_2-CH_3), 8.10 (m, 4H, H_{Ar}); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 14.1 (-O-CH_2-CH_3), 61.2 (-O-CH_2-CH_3), 129.2 (CH_{Ar}), 133.9 (C_{Ar}), 165.6 (C═O); GC-MS/EI: m/z (%): 222 (M^+, 13), 194 (21), 177 (100), 149 (62), 121 (13), 104 (18), 76 (20).

Terephthalic acid dipropyl ester (**1c**)**:** ^{1}H NMR ($CDCl_3$): 1.04 (t, $J = 7.3$ Hz, 6H, -O-CH_2-CH_2-CH_3), 1.81 (m, 4H, -O-CH_2-CH_2-CH_3), 4.31 (t, $J = 6.7$ Hz, 4H, -O-CH_2-CH_2-CH_3), 8.10 (m, 4H, H_{Ar}); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 10.4 (-O-CH_2-CH_2-CH_3), 22.0 (-O-CH_2-CH_2-CH_3), 66.9 (-O-CH_2-CH_2-CH_3), 129.4 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar}), 165.8 (C═O); GC-MS/EI: m/z (%): 250 (M^+, 4), 191 (100), 167 (94), 149 (85), 104 (34), 41 (24).

Terephthalic acid diisopropyl ester (**1d**)**:** ^{1}H NMR ($CDCl_3$): 1.39 [d, $J = 6.7$ Hz, 12H, -O-CH-(CH_3)$_2$], 5.27 [sep, $J = 6.7$ Hz, 2H, -O-CH-(CH_3)$_2$], 8.08 (m, 4H, H_{Ar}); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 21.9 (-O-CH-(CH_3)$_2$), 69.0 [-O-CH-(CH_3)$_2$], 129.4 (CH_{Ar}), 134.5 (C_{Ar}), 165.4 (C═O); GC-MS/EI: m/z (%): 250 (M^+, 6), 209 (23), 197 (56), 167 (34), 149 (100), 121 (17), 104 (24), 76 (28), 59 (45), 43 (42).

Terephthalic acid dibutyl ester (**1e**)**:** ^{1}H NMR ($CDCl_3$): 0.99 (t, $J = 7.3$ Hz, 6H, -O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3), 1.48 (m, 4H, -O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3), 1.77 (m, 4H, -O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3), 4.35 (t, $J = 6.4$ Hz, 4H, -O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3), 8.10 (m, 4H, H_{Ar}); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 13.6 (-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3), 19.1 (-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3), 30.6 (-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3), 65.1

(-O-$\underline{C}H_2$-CH_2-CH_2-CH_3), 129.3 (CH_{Ar}), 134.0 (C_{Ar}), 165.7 (C═O); GC-MS/EI (m/z): 278 (M^+, 2), 235 (2), 223 (77), 205 (100), 177 (2), 167 (79), 149 (72), 132 (2), 121 (24), 104 (19).

General Procedure for the Synthesis of Monoesters of Terephthalic Acid

To the starting diester (10 mmol), 30 mL of corresponding alcohol was added, and the mixture was heated for 15 min. Potassium hydroxide (1 eq) was poured into the solution, and then the mixture was heated for 3.5 h under reflux. The mixture was cooled, and the alcohol was evaporated. The resulting crude product was dissolved in water and extracted with dichloromethane. The aqueous layer was acidified with concentrated hydrochloric acid. The precipitate was then filtered or extracted with ethyl ether, dried over magnesium sulphate, and concentrated under reduced pressure.

Data

Monomethyl ester (**2a**)**:** ^{1}H NMR ($CDCl_3$): 3.76 (s, 3H, -O-CH_3), 7.91 (m, 4H, H_{Ar}); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 51.2 (-O-CH_3), 128.2 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 132.4 (C_{Ar}), 132.9 (C_{Ar}), 165.0 (C═O), 166.1 (C═O).

Monoethyl ester (**2b**)**:** ^{1}H NMR ($CDCl_3$): 1.43 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, -O-CH_2-$\underline{C}H_3$), 4.42 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H, -O-$\underline{C}H_2$-CH_3), 8.17 (m, 4H, H_{Ar}); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 13.6 (-O-CH_2-$\underline{C}H_3$), 60.6 (-O-$\underline{C}H_2$-CH_3), 128.6 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 133.2 (C_{Ar}), 134.2 (C_{Ar}), 165.1 (C═O), 166.9 (C═O).

Monopropyl ester (**2c**)**:** ^{1}H NMR ($CDCl_3$): 0.67 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, -O-CH_2-CH_2-$\underline{C}H_3$), 1.44 (m, 2H, -O-CH_2-$\underline{C}H_2$-CH_3), 3.92 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, -O-$\underline{C}H_2$-CH_2-CH_3), 7.71 (m, 4H, H_{Ar}); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 10.0 (-O-CH_2-CH_2-$\underline{C}H_3$), 20.7 (-O-CH_2-$\underline{C}H_2$-CH_3), 65.4 (-O-$\underline{C}H_2$-CH_2-CH_3), 127.6 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 132.5 (C_{Ar}), 133.6 (C_{Ar}), 164.3 (C═O), 165.9 (C═O).

Monoisopropyl ester (**2d**)**:** ^{1}H NMR ($CDCl_3$): 1.00 [d, $J = 6.1$ Hz, 6H, -O-CH-($\underline{C}H_3$)$_2$], 4.85 [sep, $J = 6.1$ Hz, 1H, -O-$\underline{C}H$-(CH_3)$_2$], 7.69 (m, 4H, H_{Ar}); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 21.7 [-O-CH-($\underline{C}H_3$)$_2$], 68.6 [-O-$\underline{C}H$-(CH_3)$_2$], 129.2 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 134.0 (C_{Ar}), 134.7 (C_{Ar}), 165.2 (C═O), 167.1 (C═O).

Monobutyl ester (**2e**)**:** ^{1}H NMR ($CDCl_3$): 0.59 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, -O-CH_2-CH_2-CH_2-$\underline{C}H_3$), 1.08 (m, 2H, -O-CH_2-CH_2-$\underline{C}H_2$-CH_3), 1.38 (m, 2H, -O-CH_2-$\underline{C}H_2$-CH_2-CH_3), 3.93 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, -O-$\underline{C}H_2$-CH_2-CH_2-CH_3), 7.68

(m, 4H, H_{Ar}); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 12.8 (-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3), 18.2 (-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3), 29.7 (-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3), 64.2 (-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3), 128.4 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 132.9 (C_{Ar}), 134.0 (C_{Ar}), 164.8 (C═O), 166.5 (C═O).

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank G. Sommen for helpful bibliographic assistance.

REFERENCES

1. (a) Chihara, T. Highly selective monomethyl esterification of terephthalic acid by use of monocarboxylate chemisorption on alumina. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1980**, 1215–1216; (b) Ogawa, H.; Chihara, T.; Taya, K. Selective monomethyl esterification of dicarboxylic acids by use of monocarboxylate chemisorption on alumina. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 1365–1369; (c) Ogawa, H.; Ichimura, Y.; Tertani, S.; Taya, K. Methylation of alcohols, phenols and carboxylic acids and selective monomethylation of diols and dicarboxylic acids with dimethyl sulphate by use of alumina. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1986**, *59*, 2481–2483.
2. Saitoh, M.; Fujisaki, S.; Ishii, Y.; Nishiguchi, T. Convenient selective monoesterification of α,ω-dicarboxylic acids catalyzed by ion-exchange resins. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6733–6736.
3. (a) Boaz, N. W. Enzymatic desymmetrization of *cis*-1,3-cyclohexanedicarboxylic acid diesters. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 813–816; (b) Martin, M. E.; Planchenault, D.; Huet, F. Selective enzymatic hydrolysis of (*ZE*)-dimethyl-2,4-hexadienedioate: Preparation of (*ZE*)difunctionalized dienes. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 4985–4990.
4. Hasegawa, T.; Yamamoto, H. A selective partial hydrolysis of dimenthyl ester using dry tetrabutylammonium hydroxide. *Synlett* **1999**, 84–86.
5. (a) Hotten, B. W. Metal terephtalamates. *Ind. Eng. Chem.* **1957**, *49*, 1691–1694; (b) Rondestvedt, C. S., Jr. Aminations with ammonia and formamide: Synthesis of terephthalamic acid and of p-nitroaniline. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3118–3123; (c) Williams, J. L. R.; Laakso, T. M.; Dunham, K. R.; Borden, D. G.; VanDerBerghe, J.; VanAllan, J. A.; Reynolds, D. D. Bisesteramides of terephthalic acid. *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 817–820.
6. (a) Niwayama, S. Highly efficient selective monohydrolysis of symmetric diesters. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5834–5836; (b) Ballini, R.; Bosica, G.; Palmieri, A.; Petrini, M.; Pierantozzi, C. Conjugate addition of nitroalkanes to dimethyl maleate: Regioselective formation of both monoesters of 2-alkylsuccinic acids. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 7283–7289.
7. (a) Tam, S. W.; Jimenez, L.; Diederich, F. One-pot synthesis of aromatic methyl esters by electrochemical oxidation of aldehydes mediated by biscoenzyme catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1503–1505; (b) Webb, K. S.; Ruszkay, S. J. Oxidation of aldehydes with oxone in aqueous acetone. *Tetrahedron* **1998**, 401–410; (c) Sharma, S. K.; Tandon, M.; Lown, J. W. Synthesis of geometrically constrained unsymmetrical bis(polyamides) related to the antiviral

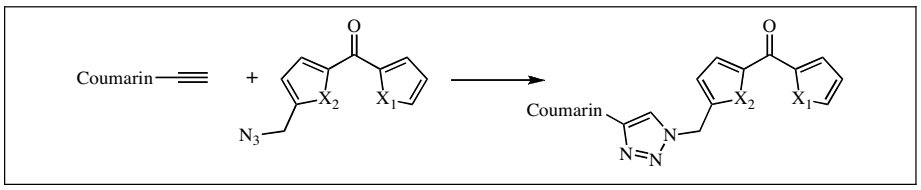
distamycin. Eur. *J. Org. Chem.* **2000**, 2095–2103; (d) Takemoto, T.; Yasuda, K.; Ley, S. V. Solid-supported reagents for the oxidation of aldehydes to carboxylic acids. *Synlett* **2001**, 1555–1556; (e) Travis, B. R.; Sivakumar, M.; Hollist, G. O.; Borhan, B. Facile oxidation of aldehydes to acids and esters with oxone. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1031–1034.

8. (a) Ebert, G. W.; Juda, W. L.; Kosakowski, R. H.; Ma, B.; Dong, L.; Cummings, K. E.; Phelps, M. V. B.; Mostafa, A. E.; Luo, J. Carboxylation and esterification of functionalized arylcopper reagents. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4314–4317; (b) Dufaud, V.; Thivolle-Cazat, J.; Basset, J. M. Palladium catalysed carbonylation of aryl chlorides to the corresponding methyl esters. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1990**, 426–427.
9. Pollock, J. R. A.; Stevens, R. *Dictionary of Organic Compounds*. *4th ed.*; Eyre & Spottiswoode Publishers Ltd: London, 1965; Vol. 5, p. 2949.

Synthesis of Potentially Photoactivatable Coumarin Derivatives *via* a 1,3-Dipolar Cycloaddition

Elodie-Denise Chenot,[a] Juan Carlos Rodríguez-Domínguez,[a] Paul Hannewald,[b] Alain Comel,[a] Gilbert Kirsch,*[a]

[a] Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique (LIMBP)
[b] Laboratoire de Spectroscopie de Masse et Chimie Laser
Université Paul Verlaine-Metz, Institut Jean Barriol, 1 Boulevard Arago, 57078 Metz, France
Received March 19, 2008



A copper (I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition reaction was used to prepare a series of mono and disubstituted 1,2,3-triazolyl-coumarins using a 1,3-cycloaddition ("Click Chemistry"). Starting coumarins were synthesized using classical or modified Pechmann's reaction. The propargyl group was introduced as either propargylether or as a propargylamide. Azides were prepared in a three steps procedure. Cycloaddition products, containing a coumarin and a photoactivatable moiety, were obtained in good yields.

J. Heterocyclic Chem., **45**, 1429 (2008).

INTRODUCTION

1,3-Dipolar cycloaddition reactions are very useful in synthetic organic chemistry. One of them is the Huisgen reaction [1], which was recently improved and named "Click Chemistry" by Sharpless *et al.* [2] This consists in a cycloaddition reaction between an azide and a terminal alkyne. The regioselectivity of this reaction, controlled by the introduction of catalytic quantities of copper (I), allows the exclusive formation of a 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole [3]. Moreover, utilization of the catalyst increases the reaction rate and allows the reaction to proceed at room temperature. The range of application of this reaction has been constantly increasing. Its tolerance to a large variety of functional groups, ease to carry out and good yields, make this method a very useful synthetic tool. This reaction has been applied in order to selectively modify biomolecules and living cells [4], synthesize pseudopeptide conjugates [5] and recently, coumarin-nucleoside conjugates [6].

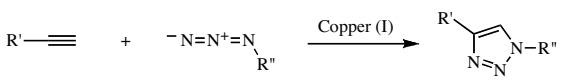
On the other hand, coumarins have a wide spectrum of biological activities and uses [7-14]. Moreover, coumarins constitute an important class of organic fluorescent dyes. These fluorescent properties have been used to study proteins and nucleic acids [15,16].

Recent articles exposed the use *via* click chemistry of some of coumarin derivatives [17]. As a continuation of our research about photolabeling of proteins [18], we choose to combine, *via* a triazole formed by click chemistry, benzophenone and thiophene analogues to coumarins in order to prepare new photoactivatable agents for proteins labeling.

Benzophenones are often used for photoaffinity labeling (PAL) [19,20]. The photolabeling principle is to form, by UV-irradiation, a covalent bond between the tag which contains the photoactivatable group and enzymes or proteins. This technique allows the access to a large amount of structural information and it is a good tool to identify molecular interaction sites. Detection of the labeled proteins through fluorescence can be achieved using the photophysical properties of coumarins. Introducing propargyl chains as coumarin side chains and azides on the benzophenones gave the starting material for the click chemistry.

In this paper, the 1,3-dipolar cycloaddition between terminal alkynes (coumarin derivatives, compound **a**) and azides (benzophenone or analogues, compound **b**) was performed using $CuSO_4.5H_2O$ and sodium ascorbate as catalytic system in DMF (Scheme I).

Scheme I



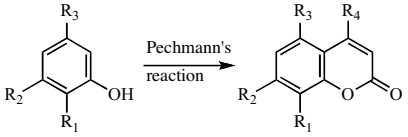
a **b**

RESULTS AND DISCUSSION

We have developed in our laboratory an environmental friendly procedure to synthesize some hydroxy substituted coumarins, (see compounds **1-3**) [21], in good yields. Only, coumarin-4-acetic acid **4** was obtained by a classical Pechmann reaction (Table 1).

Table 1

Prepared hydroxy coumarins and coumarinyl-4-acetic acid.



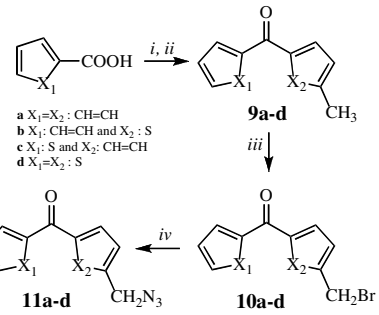
1-4

Compd	R_1	R_2	R_3	R_4	Yields (%)
1	H	OH	H	CH_3	91[i or ii]
2	OH	OH	H	CH_3	52[i]/64[ii]
3	H	OH	OH	CH_3	92[i]/48[ii]
4	CH=CH-CH=CH		H	CH_2COOH	36[iii]

Reaction conditions : *i*. SZr, b-ketoester, 80 °C, 24h or 60-65 °C, 24h; *ii*. $ZrOCl_2.8H_2O$, beta-ketoester, 80 °C, 24h or 60-65 °C, 24h; *iii*. 1,3-acetone dicarboxylic acid, sulfuric acid

The terminal alkyne group was introduced as either a propargylether for **1-3** or a propargylamide for **4**. Propargylethers **5-7** were prepared by reacting coumarins **1-3** with propargylbromide in dry acetone in presence of dry potassium carbonate. Amidification of compound **4** to yield propargyl amide **8** was done by activating the acid (NHS, DCC) and reacting the ester with propargylamine. The "one pot" reaction gave amide **8** in 57% yield (Table 2).

Scheme II

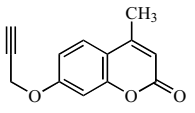
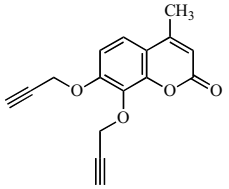
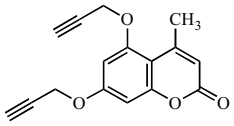
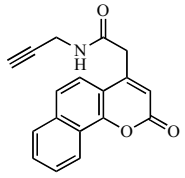


Reaction conditions: *i*. $SOCl_2$; *ii*. toluene or 2-methylthiophene, $AlCl_3$, DCM; *iii*. NBS, AIBN, DCM; *iv*. NaN_3, DMF, 50 °C.

reaction (Scheme II). Acyl chlorides were prepared from benzoic acid or 2-thiophenecarboxylic acid and thionyl chloride, and reacted with toluene or 2-methylthiophene in presence of aluminium chloride. The residual methyl chain in those di-(het) aryl-ketones was then transformed by radical substitution using NBS to obtain bromo-derivatives **10a-d** as mixtures with unreacted **9**. The mixture was reacted with sodium azide without further purification and expected azides **11a-d** were obtained in good yields (56-85 %) after final column chromatography purification.

Table 2

Prepared terminal alkyne coumarins

Compd	Starting coumarins	Product	Yields (%)	Compd	Starting coumarins	Product	Yields (%)
5	1		90[i]	7	3		80[i]
6	2		91[i]	8	4		57[ii]

Reaction conditions: i. K_2CO_3, propargylbromide, dry acetone; ii. NHS, DCC, propargylamine, DMF".

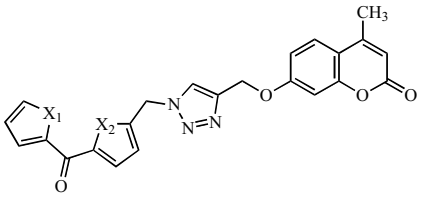
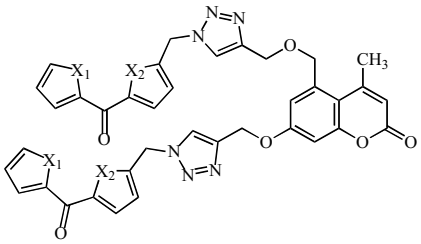
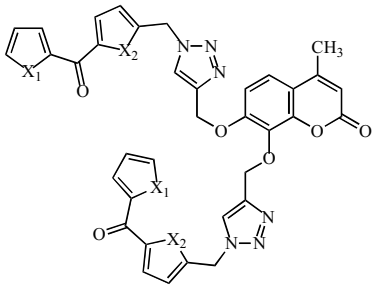
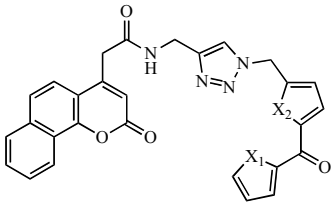
On the other hand, the azido function was introduced on benzophenone analogues. For this purpose a three-step procedure was developed to synthesize 4-azidomethyl-benzophenone and thiophene analogues (Scheme II).

The synthesis of 4-methylbenzophenone **9a** is well documented in the literature [22] contrary to thiophene analogues **9b-d**. Only several examples of them have been reported [23], being **9d** the less described [24]. Compounds **9a-d** were prepared by a Friedel-Crafts

Classical conditions were used ($CuSO_4.5H_2O$ and sodium ascorbate) for the Cu (I)-catalyzed Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition. Reactions were performed in DMF in order to increase the starting material solubility and to simplify the work up. After 36 h at room temperature reactions were quenched with water. The formed precipitate was collected by filtration, washed with water and dried at room temperature until constant weight. Recrystallization from diethyl ether gave compounds **12a-**

Table 3

Coumarin derivatives obtained by a copper(I)-catalyzed Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition.

Alkynes	Azides	Click Chemistry Product	Compd	Yields (%)
5	**11a**		**12a**	98
	11b		**12b**	97
	11c		**12c**	56
	11d		**12d**	94
6	**11a**		**13a**	74
	11b		**13b**	74
	11c		**13c**	89
	11d		**13d**	86
7	**11a**		**14a**	92
	11b		**14b**	53
	11c		**14c**	89
	11d		**14d**	95
8	**11a**		**15a**	92
	11b		**15b**	96
	11c		**15c**	97
	11d		**15d**	65

d, **13a-d**, **14a-d** and **15a-d** in good yields. Results are listed in Table 3.

CONCLUSION

Some alkyne substituted coumarins and thiophene benzophenone analogues have been synthesized and coupled using the Cu(I)-catalyzed Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition in order to obtain new potentially photoactivatable compounds. The latter have been described for the first time and fully characterized. The ability of some of them to perform photoaffinity labeling of proteins is actually under investigation and results will be published when due.

EXPERIMENTAL

Reagents and solvents used in this work were obtained from Acros Organics. Melting points were measured on a Stuart Scientific SMP3 apparatus and are uncorrected. MALDI-FTICRMS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization coupled to Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry) measurements were carried out on an IonSpec Explorer Fourier Transform Mass Spectrometer 9.4 T equipped with a ProMALDI module (IonSpec, Lake Forest, USA) provided with an Orion air cooled Nd:YAG System (355 nm, New wave research, Fremont, USA). The matrix used was a saturated 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB) solution in 50% methanol, 0.1% trifluoro acetic acid (TFA). All the depositions were made using the dried-droplet method. All the spectrum were internally calibrated using a methotrexate solution (1.10^{-6}

M) and the peak used to create a calibration list was methotrexate's $[M+H]^+$ pseudomolecular ion at m/z = 455.17859 Da. Gc/ms spectra measurements were performed on a Hewlett-Packard 5971A electron impact (70eV) mass spectrometer, equipped with a Hewlett Packard 5890 series II gas chromatograph. ^1H and ^{13}C nmr spectra were recorded on a Bruker-AC 250-M Hz spectrometer with $CDCl_3$ or DMSO-d_6 as both solvent and internal reference. The chemical shifts (δ) are expressed in ppm and coupling constants (J) in Hz. Compounds **1-3** were prepared as described in the literature [21].

(2-Oxo-*2H*-benzo[*h*]chromen-4-yl)-acetic acid (4). 1-Naphthol (4.9 g, 34.22 mmol) and 1,3-acetone dicarboxylic acid (5 g, 34.22 mmol) were added to sulfuric acid (25 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature and poured onto water. The obtained precipitate was washed with water and dried *in vacuo* until constant weight yielding 3.13 g, 36 %, as a pink solid, mp 207-208 °C (mp_{lit} 212-213 °C [25]). ^1H nmr (DMSO-d_6): δ 8.38-8.34 (m, 1H), 8.04-8.00 (m, 1H), 7.84 (d, 1H, J= 7.5 Hz), 7.74-7.69 (m, 2H), 6.61 (s, 1H), 4.00 (s, 2H, CH_2). ^{13}C nmr (DMSO-d_6): δ 170.6, 159.5, 150.8, 149.9, 134.2, 128.7, 127.9, 127.4, 123.9, 122.2, 121.5, 121.3, 115.8, 114.6, 37.5.

Methyl-7-(2-propynyloxy)-*2H*-chromen-2-one (5). To a solution of 7-hydroxy-4-methylcoumarin (4-methylumbelliferone) (2.64 g, 15 mmol) in 40 mL of dry acetone was added anhydrous potassium carbonate (2.07 g, 15 mmol) and propargyl bromide (1.67 mL, 15 mmol). The mixture was stirred at 50 °C for 18 h. After that time, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was treated with 20 mL of water and extracted with ethyl acetate. Organic phases were combined and washed with a 0.1 *N* sodium hydroxide solution and twice with water. The organic layer was dried, filtered and solvent was removed *in vacuo*. Crystallization from diethyl ether gave (2.89 g), 90 %, beige solid, mp 135-136 °C (mp_{lit} 134 °C 26). ^1H nmr ($CDCl_3$): δ 7.55-7.51 (m, 1H), 6.95-6.91 (m, 2H), 6.17 (s, 1H), 4.74 (d, 2H, J=2.3 Hz), 2.57 (t, 1H, J=2.3 Hz), 2.41 (d, 3H, CH_3, J=1.2 Hz). nmr ($CDCl_3$): δ 161.1, 160.3, 155.0, 152.4, 125.6, 114.2, 112.7, 112.4, 102.1, 77.4, 56.2, 18.7. hrms-maldi : *m/z* $[M+H]^+$ calcd for $C_{13}H_{10}O_3$: 215.07027, found : 215.07023.

General procedure for the preparation of compounds 6 and 7. Compounds **6** and **7** were obtained from 5,7-dihydroxy-4-methyl-*2H*-chromen-2-one and 7,8-dihydroxy-4-methyl-*2H*-chromen-2-one respectively, using the same procedure as for **5**. In this case twice of molar quantities of anhydrous potassium carbonate and propargyl bromide was employed.

4-Methyl-5,7-bis (2-propynyloxy)-*2H*-chromen-2-one (6). (3.64 g), 91 %, beige solid, mp 186-188 °C. ^1H nmr ($CDCl_3$): δ 6.59 (d, 1H, J=2.5 Hz), 6.47 (d, 1H, J=2.5 Hz), 6.00 (d, 1H, J=1.2 Hz), 4.75 (d, 2H, J=2.5 Hz), 4.74 (d, 2H, J=2.5 Hz), 2.60-2.49 (m, 5H). ^{13}C nmr ($CDCl_3$): δ 160.7, 160.2, 156.9, 156.7, 154.0, 112.3, 105.8, 97.3, 95.4, 77.2, 56.5, 56.2, 24.3. hrms-maldi: *m/z* $[M+H]^+$ calcd for $C_{16}H_{12}O_4$: 269.08084, found : 269.08083.

4-Methyl-7,8-bis(2-propynyloxy)-*2H*-chromen-2-one (7). (3.22 g), 80 %, yellow solid, mp 135-137 °C. ^1H nmr ($CDCl_3$): δ 7.35 (d, 1H, J=9.0 Hz), 7.05 (d, 1H, J=9.0 Hz), 6.18 (d, 1H, J=1.2 Hz), 4.90 (d, 2H, J=2.4 Hz), 4.87 (d, 2H, J=2.4 Hz), 2.55 (t, 1H, J=2.4 Hz), 2.44 (t, 1H, J=2.4 Hz), 2.41 (d, 3H, CH_3, J=1.2 Hz). ^{13}C nmr ($CDCl_3$): δ 160.2, 153.5, 152.4, 148.2, 134.2, 120.0, 115.5, 112.9, 110.2, 78.5, 77.7, 77.2, 75.9, 60.6, 57.0, 18.8. hrms-maldi: *m/z* $[M+H]^+$ calcd for $C_{16}H_{12}O_4$: 269.08084, found : 269.08087.

2-(2-Oxo-*2H*-benzo[*h*]chromen-4-yl)-N-(2-propyn-yl)-acetamide (8). To a solution of (2-oxo-*2H*-benzo[*h*]-chromen-4-yl)acetic acid (1 g, 3.93 mmol) in dry dimethylformamide (5 mL) were added *N*-hydroxysuccinimide (0.476 g, 4.13 mmol) and *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (1.7 g, 8.28 mmol) in dimethylformamide (5 mL). The mixture was stirred at room temperature for 24 h, then propargylamine (0.276 mL, 4.02 mmol) was added and left to stir overnight at the same temperature. The formed precipitate was filtered. The obtained filtrate was poured into water, filtrated, washed with water and dried at room temperature until constant weight. Pure product was obtained by cristallisation from diethyl ether. (0.65 g), 57 %, dark beige solid, mp 245-246 °C. ^1H nmr (DMSO-d_6): δ 8.71 (t, 1H, N*H*, J=5.3 Hz), 8.38-8.34 (m, 1H), 8.05-8.00 (m, 1H), 7.84 (d, 1H, J=8.7 Hz), 7.74-7.69 (m, 3H), 6.55 (s, 1H), 3.93-3.88 (m, 4H), 3.17 (t, 1H, J=2.5 Hz). ^{13}C nmr (DMSO-d_6): δ 167.5, 159.5, 151.4, 149.9, 134.2, 128.7, 127.9, 127.4, 123.9: 122.2, 121.5, 121.2, 115.6, 114.6, 80.7, 73.2, 39.7, 28.2. hrms-maldi: *m/z* $[M+H]^+$ calcd for $C_{18}H_{13}NO_3$: 292.09682, found : 292.09687.

General procedure for the preparation of compounds 9 (a-d). To benzoic acid (1.22 g, 10 mmol) or 2-thiophenecarboxylic acid (1.28 g, 10 mmol) was added thionyl chloride (10 mL). The mixture was refluxed for 4 h. Thionyl chloride excess was evaporated *in vacuo*. To the obtained acid chloride was added toluene (2.13 mL, 20 mmol) or 2-methylthiophene (1.94 mL, 20 mmol) in dichloromethane (20 mL), and aluminium chloride (2 g, 15 mmol) by portions. The mixture was stirred for 4 h at room temperature and hydrolyzed with concentrated hydrochloric acid (4 mL) in iced-water (50 mL). The product was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed twice with water, dried and solvent was removed until dryness. Pure products were obtained after purification by column chromatography using dichloromethane as eluent.

(4-Methylphenyl)(phenyl)methanone (9a). (1.41 g), 72 %, yellow solid, mp_{lit} 56.5-57 °C [22]. ^1H nmr ($CDCl_3$): 7.83-7.77 (m, 2H), 7.75 (d, 2H, J=7.9Hz), 7.62-7.56 (m, 1H), 7.51-7.44 (m, 2H), 7.29 (d, 2H, J=7.9 Hz), 2.45 (s, 3H, CH_3). ^{13}C nmr ($CDCl_3$): 196.5, 143.2, 138.0, 134.9, 132.1, 130.3, 129.9, 129.0, 128.2, 21.6. gc/ms: *m/z* (%): 196 (71, M^+), 181 (21), 119 (100), 105 (27), 91 (39).

(5-Methyl-2-thienyl)(phenyl)methanone (9b). (1.80 g), 89 %, brown oil. ^1H nmr ($CDCl_3$): δ 7.83 (d, 2H, J=7.5 Hz), 7.60-7.53 (m, 1H), 7.51-7.45 (m, 3H), 6.83 (d, 1H, J=3.6 Hz), 2.58 (s, 3H, CH_3). ^{13}C nmr ($CDCl_3$): δ 188.1, 150.4, 141.6, 138.3, 135.7, 132.0, 129.0, 128.3, 126.7, 16.1. gc/ms: m/z (%): 202 (98, M^+), 187 (11), 125 (100), 105 (16), 97 (10).

(4-Methylphenyl)(2-thienyl)methanone (9c). (0.97 g), 48 %, brown-pink solid, mp 72-75 °C. ^1H nmr ($CDCl_3$): δ 7.79 (d, 2H, J=8.1 Hz), 7.70 (d, 1H, J=4.7 Hz), 7.65 (d, 1H, J=3.6 Hz), 7.30 (d, 2H, J=8.1 Hz), 7.16 (dd, 1H, J=3.6, 4.7 Hz), 2.45 (s, 3H, CH_3). ^{13}C nmr ($CDCl_3$): δ 187.7, 143.9, 143.0, 135.4, 134.4, 133.8, 129.4, 129.1, 127.8, 21.6. gc/ms: m/z (%): 202 (100, M^+), 187 (43), 119 (87), 111 (67), 91 (43).

(5-Methyl-2-thienyl)(2-thienyl)methanone (9d). (1.00 g), 48 %, brown solid, mp 50-52 °C. ^1H nmr ($CDCl_3$): δ 7.84 (d, 1H, J=3.6 Hz), 7.72 (d, 1H, J=3.6 Hz), 7.66 (d, 1H, J=4.9 Hz), 7.17 (dd, 1H, J=3.6, 4.9 Hz), 6.85 (d, 1H, J=3.6 Hz), 2.57 (s, 3H, CH_3). ^{13}C nmr ($CDCl_3$): δ 178.4, 149.7, 143.0, 140.7, 133.9, 133.0, 132.7, 127.8, 126.7, 15.9. gc/ms: m/z (%): 208 (M^+,100), 125 (69), 11 (31), 97 (8).

General procedure for the preparation of compounds 10 (a-d). To a solution of compounds **9a-d** (5 mmol) in dichloromethane (15 mL) was added a catalytic amount of α,α'-azodiisobutyronitrile. The mixture was refluxed for 30 min with a 500 W-halogen lamp and *N*-bromosuccinimide (1.07 g, 6 mmol) was added in three portions and left to stir at reflux for 2 h. The reaction was quenched with water. The organic layer was washed with water, dried and evaporated until dryness. The crude product was directly used in the next step without further purification.

General procedure for the preparation of compounds 11 (a-d). The above obtained mixture (compounds **9** and **10**) was dissolved in dimethylformamide (20 mL) and sodium azide (0.326 g, 5 mmol) was added. The resultant mixture was heated at 50 °C for 3 h, then water (50 mL) was added at room temperature and left to stir overnight. The mixture was dissolved with diethyl ether (25 mL) and washed with water, dried and concentrated until dryness. Pure product was obtained after purification by column chromatography using dichloromethane as eluent.

[4-(Azidomethyl)phenyl](phenyl)methanone (11a). (098 g), 83 % (2steps), yellow oil. ^{1}H nmr ($CDCl_3$): δ 7.85-7.79 (m, 4H), 7.64-7.58 (m, 1H), 7.53-7.43 (m, 4H), 4.46 (s, 2H, CH_2N$_3$). ^{13}C nmr ($CDCl_3$): δ 196.1, 140.0, 137.4, 132.6, 130.6, 130.0, 128.4, 127.9, 54.3.

[5-(Azidomethyl)-2-thienyl](phenyl)methanone (11b). (0.68 g), 56 % (2 steps), orange solid, mp 33 °C. ^{1}H nmr ($CDCl_3$): δ 7.85 (d, 2H, J=7.3 Hz), 7.64-7.48 (m, 4H), 7.09 (d, 1H, J=3.7 Hz), 4.56 (s, 2H, CH_2N$_3$). ^{13}C nmr ($CDCl_3$): δ 187.9, 146.6, 143.9, 137.7, 134.8, 132.4, 129.1, 128.6, 127.4, 49.3.

[4-(Azidomethyl)phenyl](2-thienyl)methanone (11c). (1.03 g), 85 % (2steps), yellow solid, mp 42 °C. ^{1}H nmr ($CDCl_3$): δ 7.88 (d, 2H, J=7.9 Hz), 7.73 (d, 1H, J=4.9 Hz), 7.64 (d, 1H, J=3.7 Hz), 7.45 (d, 2H, J=7.9 Hz), 7.17 (dd, 1H, J=3.7, 4.9 Hz), 4.45 (s, 2H, CH_2N$_3$). ^{13}C nmr ($CDCl_3$): δ 187.5, 143.4, 139.8, 138.0, 134.8, 134.4, 129.7, 128.0, 54.3.

[5-(Azidomethyl)-2-thienyl](2-thienyl)methanone (11d). (0.97 g), 78 % (2steps), yellow oil. ^{1}H nmr ($CDCl_3$): δ 7.90 (d, 1H, J=3.6 Hz), 7.80 (d, 1H, J=3.6 Hz), 7.72 (d, 1H, J=4.9 Hz), 7.20 (dd, 1H, J=4.9, 3.8 Hz), 7.12 (d, 1H, J=3.8 Hz), 4.57 (s, 2H, CH_2N$_3$). ^{13}C nmr ($CDCl_3$): δ 178.4, 145.9, 143.2, 142.5, 133.7, 133.2, 128 .4, 128.0, 127.4, 49.3.

General procedure for the preparation of compounds 12 (a-d). A suspention of $CuSO_4$•5H_2O (0.025 g, 0.1 mmol) and sodium ascorbate (0.04 g, 0.2 mmol) in dimethylformamide (0.5 mL) was stirred at room temperature for 15 min, then compound **5** (0.22 g, 1 mmol) in dimethylformamide (0.5 mL) was added. After the mixture changed color, a suspension of compounds **11a-d** (1.01 mmol) in dimethylformamide (0.5 mL) was added dropwise. The mixture was stirred for 36 h at room temperature in the absence of light. The reaction was stopped by the addition of water (10 mL). The obtained precipitate was collected by filtration, washed with water and dried at room temperature until constant weight. Crystallization from diethyl ether yields the pure product.

7-{[1-(4-Benzoylbenzyl)-*1H*-1,2,3-triazol-4-yl]methoxy}-4-methyl-*2H*-chromen-2-one (12a). (0.44 g), 98 %, pale yellow solid, mp 139-140 °C. ^{1}H nmr ($CDCl_3$): δ 7.80 (t, 4H, J=8.0 Hz), 7.64-7.59 (m, 2H), 7.52-7.46 (m, 3H), 7.38 (d, 2H, J=8.0 Hz), 6.96-6.92 (m, 2H), 6.15 (s, 1H), 5.65 (s, 2H, NCH_2), 5.27 (s, 2H, OCH_2), 2.40 (s, 3H, CH_3). ^{13}C nmr ($CDCl_3$): δ 195.8, 161.1, 161.0, 155.1, 152.4, 138.5, 138.1, 137.1, 132.8, 130.8, 130.0, 128.4, 127.8, 125.7, 123.0, 114.1, 112.4, 112.3, 102.1, 77.2, 62.3, 53.9, 18.7. hrms-maldi: m/z [M+H]$^+$ calcd for $C_{27}H_{21}N_3O_4$: 452.16048, found : 452.16049.

7-({1-[(5-Benzoyl-2-thienyl)methyl]-*1H*-1,2,3-triazol-4-yl}-methoxy)-4-methyl-*2H*-chromen-2-one (12b). (0.44 g), 97 %, pale yellow solid, mp 108-111 °C. ^{1}H nmr ($CDCl_3$): δ 7.78 (d, 2H, J=7.2 Hz), 7.73 (s, 1H), 7.59 (m, 1H), 7.54-7.47 (m, 4H), 7.14 (d, 1H, J=4.0 Hz), 6.97-6.92 (m, 2H), 6.15 (s. 1H), 5.78 (s, 2H, NCH_2), 5.27 (s, 2H, OCH_2), 2.40 (s, 3H, CH_3). ^{13}C nmr ($CDCl_3$): δ 187.7, 161.2, 161.0, 155.1, 152.5, 144.7, 144.5, 137.3, 134.8, 132.7, 129.1, 128.6, 125.7, 122.9, 114.1, 112.4, 112.3, 102.1, 77.2, 62.2, 48.8, 18.6. hrms-maldi: m/z [M+H]$^+$ calcd for $C_{25}H_{19}N_3O_4S$: 458.11690, found : 458.11697.

4-Methyl-7-({1-[4-(2-thienylcarbonyl)benzyl]-*1H*-1,2,3-triazol-4-yl}methoxy)-*2H*-chromen-2-one (12c). (0.26 g), 56 %, light yellow solid, mp 144-146 °C. ^{1}H nmr ($CDCl_3$): δ 7.87 (d, 2H, J=8.0 Hz), 7.75 (dd, 1H, J=4.9, 1.1 Hz), 7.65 (s, 1H), 7.62 (dd, 1H, J=3.8, 1.1 Hz), 7.51 (d, 1H, J=8.7 Hz), 7.40 (d, 2H, J=7.8 Hz), 7.17 (dd, 1H, J=4.5, 3.8 Hz), 6.97-6.93 (m, 2H), 6.16 (s, 1H), 5.65 (s, 2H, NCH_2), 5.27 (s, 2H, OCH_2), 2.40 (s, 3H, CH_3). ^{13}C nmr ($CDCl_3$): δ 187.3, 164.8, 161.1, 161.0, 155.1, 152.4, 138.6, 138.4, 135.0, 134.7, 130.0, 128.1, 128.0, 125.7, 114.1, 112.4, 112.3, 102.1, 77.2, 62.2, 53.8, 18.7. hrms-maldi: m/z [M+H]$^+$ calcd for $C_{25}H_{19}N_3O_4S$: 458.11690, found : 458.11679.

4-Methyl-7-[(1-{[5-(2-thienylcarbonyl)-2-thienyl]methyl}-*1H*-1,2,3-triazol-4-yl) methoxy]-*2H*-chromen-2-one (12d). (0.44 g), 94 %, yellow solid, mp 173-175 °C. ^{1}H nmr ($CDCl_3$): δ 7.86 (dd, 1H, J=3.8, 1.1 Hz), 7.77 (d, 1H, J=3.8 Hz), 7.73-7.70 (m, 2H), 7.51 (d, 1H, J=8.7 Hz), 7.21-7.15 (m, 2H), 6.96-6.91 (m, 2H), 6.14 (s, 1H), 5.78 (s, 2H, NCH_2), 5.26 (s, 2H, OCH_2), 2.39 (s, 3H, CH_3). ^{13}C nmr ($CDCl_3$): δ 178.2, 161.1, 161.0, 155.1, 152.4, 144.1, 143.7, 142.2, 134.0, 133.4, 133.0, 128.6, 128.1, 125.7, 114.1, 112.4, 112.3, 102.1, 77.2, 62.2, 48.7, 29.7. hrms-maldi: m/z [M+H]$^+$ calcd for $C_{23}H_{17}N_3O_4S_2$: 464.07332, found : 464.07331.

General procedure for the preparation of compounds 13 (a-d) and 14 (a-d). Compounds **13a-d** and **14a-d** were obtained from 4-Methyl-5,7-bis(2-propynyloxy)-*2H*-chromen-2-one **6** and 4-Methyl-7,8-bis(2-propynyloxy)-*2H*-chromen-2-one **7** respectively, using the same procedure as for **12a-d** and twice of molar quantities of compounds **11a-d**.

5,7-Bis{[1-(4-benzoylbenzyl)-*1H*-1,2,3-triazol-4-yl]methoxy}-4-methyl-*2H*-chromen-2-one (13a). (0.55 g), 74 %, beige solid, mp 99-100 °C. ^{1}H nmr ($CDCl_3$): δ 7.82-7.75 (m, 8H), 7.66 (d, 2H, J=3.7 Hz), 7.64-7.58 (m, 2H), 7.48 (dd, 4H, J=7.3, 1.0 Hz), 7.37 (t, J=7.3 Hz, 4H), 6.54 (dd, 2H, J=7.3, 2.2 Hz), 5.91 (d, 1H, J=1.2 Hz), 5.65 (d, 4H, NCH_2, J=3.7 Hz), 5.21 (s, 4H, OCH_2), 2.42 (s, 3H, CH_3). ^{13}C nmr ($CDCl_3$): δ 195.8, 161.2, 161.0, 157.5, 156.7, 154.4, 154.0, 143.5, 143.3, 138.6, 138.1, 137.0, 132.8, 130.8, 130.0, 128.4, 127.9, 127.7, 123.3, 111.9, 105.3, 96.8, 95.2, 77.2, 62.5, 62.1, 53.8, 24.4. hrms-maldi: m/z [M+H]$^+$ calcd for $C_{44}H_{34}N_6O_6$: 743.26126, found : 743.26116.

5,7-Bis({1-[(5-benzoyl-2-thienyl)methyl]-*1H*-1,2,3-triazol-4-yl}methoxy)-4-methyl-*2H*-chromen-2-one (13b). (0.56 g), 74 %, beige solid, mp 156-158 °C. ^{1}H nmr ($CDCl_3$): δ 7.84-7.78 (m, 6H), 7.64-7.58 (m, 2H), 7.53-7.47 (m, 6H), 7.14 (t, 2H, J=3.7 Hz), 6.54 (dd, 2H, J=9.0, 2.2 Hz), 5.92 (s, 1H), 5.80 (s, 2H, NCH_2), 5.79 (s, 2H, NCH_2), 5.22 (s, 4H, OCH_2), 2.44 (s, 3H, CH_3). ^{13}C nmr ($CDCl_3$): δ 187.7, 161.0, 160.7, 157.5, 156.8, 154.0, 144.8, 144.5, 144.4, 143.4, 137.3, 134.7, 132.7, 129.1, 128.6, 128.5, 123.0, 112.0, 105.5, 96.9, 95.4, 77.2, 62.4, 62.0,

48.9, 48.8, 23.4. hrms-maldi: m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{40}H_{30}N_6O_6S_2$: 755.17410, found : 755.17432.

4-Methyl-5,7-bis({1-[4-(2-thienylcarbonyl)benzyl]-*1H*-1,2,3-triazol-4-yl}methoxy)-*2H*- chromen-2-one (13c). (0.67 g), 89 %, light yellow solid, mp 147-150 °C. ^{1}H nmr ($CDCl_3$): δ 7.86 (d, 4H, J=8.0 Hz), 7.76-7.74 (m, 2H), 7.68 (d, 2H, J=5.0 Hz), 7.62-7.60 (m, 2H), 7.38 (t, 4H, J=8.0 Hz), 7.18-7.15 (m, 2H), 6.53 (dd, 2H, J=7.8, 2.3 Hz), 5.91 (d, 1H, J=1.2 Hz), 5.66 (s, 2H, NCH_2), 5.65 (s, 2H, NCH_2), 5.21 (s, 4H, OCH_2), 2.42 (s, 3H, CH_3). ^{13}C nmr ($CDCl_3$): δ 187.3, 161.0, 160.7, 157.6, 156.8, 154.0, 143.3, 143.2, 142.6, 138.6, 138.5, 138.4, 135.0, 134.8, 134.7, 130.0, 128.2, 128.0, 127.9, 123.2, 113.7, 112.0, 105.4, 96.9, 95.3, 77.2, 62.5, 62.1, 53.8, 24.4. hrms-maldi: m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{40}H_{30}N_6O_6S_2$: 755.17410, found : 755.17424.

4-Methyl-5,7-bis[(1-{[5-(2-thienylcarbonyl)-2-thienyl]methyl}-*1H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy]-*2H*-chromen-2-one (13d). (0.66 g), 86 %, dark beige solid, mp 192-195 °C. ^{1}H nmr (DMSO-d_6): δ 8.42 (d, 2H, J=1.2 Hz), 8.09 (d, 2H, J=4.7 Hz), 8.02 (d, 2H, J=3.7 Hz), 7.94 (d, 2H, J=3.7 Hz), 7.31-7.27 (m, 4H), 6.79 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 5.98-5.96 (m, 5H), 5.27 (s, 4H), 2.36 (s, 3H, CH_3). ^{13}C nmr (DMSO-d_6): δ 177.7, 161.1, 159.5, 157.4, 156.2, 153.9, 146.6, 146.4, 142.4, 142.3, 141.6, 135.3, 134.0, 133.8, 129.1, 128.9, 125.1, 124.9, 111.0, 104.4, 97.4, 94.9, 62.3, 61.6, 47.6, 47.5, 23.7. hrms-maldi: m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{36}H_{26}N_6O_6S_4$: 767.08694, found : 767.08713.

7,8-Bis{[1-(4-benzoylbenzyl)-*1H*-1,2,3-triazol-4-yl]methoxy}-4-methyl-*2H*-chromen-2-one (14a). (0.68 g), 92 %, beige-brown solid, mp 117-119 °C. ^{1}H nmr (DMSO-d_6): δ 8.40 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.68-7.65 (m, 12H), 7.55-7.40 (m, 6H), 7.32-7.25 (m, 2H), 6.15 (s, 1H), 5.74 (s, 2H, NCH_2), 5.69 (s, 2H, NCH_2), 5.31 (s, 2H, OCH_2), 5.16 (s, 2H, OCH_2), 2.49 (s, 3H, CH_3). ^{13}C nmr (DMSO-d_6): δ 195.2, 159.4, 153.8, 153.3, 147.3, 140.5, 140.4, 136.9, 136.8, 136.6, 136.5, 133.6, 132.7, 130.1, 130.0, 129.5, 128.5, 127.8, 127.5, 125.2, 125.1, 120.5, 114.2, 111.6, 110.2, 65.4, 62.3, 52.3, 52.2, 18.1. hrms-maldi: m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{44}H_{34}N_6O_6$: 743.26126, found : 743.26120.

7,8-Bis({1-[(5-benzoyl-2-thienyl)methyl]-*1H*-1,2,3-triazol-4-yl}methoxy)-4-methyl-*2H*-chromen-2-one (14b). (0.40 g), 53 %, beige-brown solid, mp 135-137 °C. ^{1}H nmr (DMSO-d_6): δ 8.41 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.80-7.76 (m, 4H), 7.67-7.59 (m, 2H), 7.57-7.7.45 (m, 7H), 7.30-7.25 (m, 2H), 7.20-7.16 (m, 1H), 6.16 (s, 1H), 5.95 (s, 2H, NCH_2), 5.88 (s, 2H, NCH_2), 5.31 (s, 2H, OCH_2), 5.15 (s, 2H, OCH_2), 2.34 (s, 3H, CH_3). ^{13}C nmr (DMSO-d_6): δ 187.1, 159.4, 153.8, 153.3, 147.3, 147.1, 147.0, 143.1, 142.9, 142.7, 137.0, 135.4, 133.5, 132.6, 129.0, 128.8, 128.6, 124.9, 120.5, 114.4, 111.5, 110.2, 65.7, 62.5, 47.7, 47.5, 30.7, 18.1. hrms-maldi: m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{40}H_{30}N_6O_6S_2$: 755.17410, found : 755.17410.

4-Methyl-7,8-bis({1-[4-(2-thienylcarbonyl) benzyl]-*1H*-1,2,3-triazol-4-yl}methoxy)-*2H*-chromen-2-one (14c). (0.67 g), 89 %, yellow-orange solid, mp 120-121 °C. ^{1}H nmr (DMSO-d_6): δ 8.40 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.11-8.09 (m, 2H), 7.82-7.76 (m, 4H), 7.67 (d, 2H, J=3.8 Hz), 7.48-7.41 (m, 3H), 7.33-7.23 (m, 6H), 6.17 (s, 1H), 5.75 (s, 2H, NCH_2), 5.68 (s, 2H, NCH_2), 5.32 (s, 2H, OCH_2), 5.16 (s, 2H, OCH_2), 2.35 (s, 3H, CH_3). ^{13}C nmr (DMSO-d_6): δ 186.8, 159.5, 153,8, 153.3, 147.3, 142.5, 140.4, 140.3, 137.1, 137.0, 135.8, 135.6, 133.6, 129.3, 129.2, 128.8, 127.9, 127.7, 125.2, 120.5, 114.4, 111.6, 110.3, 65.4, 62.3, 52.4, 52.2, 18.1. hrms-maldi: m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{40}H_{30}N_6O_6S_2$: 755.17410, found : 755.17411.

4-Methyl-7,8-bis[(1-{[5-(2-thienylcarbonyl)-2-thienyl]-methyl}-*1H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy]-*2H*-chromen-2-one (14d). (0.73 g), 95 %, pink-brown solid, mp 190-191 °C. ^{1}H nmr (DMSO-d_6): δ 8.41 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.09 (dt, 2H, J=5.0, 2.7 Hz), 8.00 (dd, 2H, J=3.9, 1.1 Hz), 7.93-7.88 (m, 2H), 7.43 (d, 1H, J=8.9 Hz), 7.30-7.18 (m, 5H), 6.15 (d, 1H, J=1.2 Hz), 5.95 (s, 2H, NCH_2), 5.87 (s, 2H, NCH_2), 5.31 (s, 2H, OCH_2), 5.16 (s, 2H, OCH_2), 2.33 (s, 3H, CH_3). ^{13}C nmr (DMSO-d_6): δ 177.7, 159.6, 153.8, 153.3, 147.4, 146.4, 146.3, 142.4, 142.3, 141.6, 141.5, 135.2, 134.0, 133.8, 133.7, 133.5, 129.0, 128.9, 128.8, 124.9, 120.5, 114.4, 111.5, 110.3, 65.7, 62.1, 47.4, 47.3, 18.1. hrms-maldi: m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{36}H_{26}N_6O_6S_4$: 767.08694, found : 767.08662.

General procedure for the preparation of compounds 15 (a-d). Compounds **15a-d** were obtained from 2-(2-Oxo-*2H*-benzo[*h*]chromen-4-yl)-N-(2-propyn-yl)acetamide **8**, using the same procedure as for **12a-d**.

***N*-{[1-(4-Benzoylbenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl]methyl}-2-(2-oxo-*2H*-benzo[*h*]chromen-4-yl) acetamide (15a).** (0.49 g), 92 %, beige-brown solid, mp 165-168 °C. ^{1}H nmr (DMSO-d_6): δ 8.81 (t, 1H, N*H*, J=5.3 Hz), 8.36-8.32 (m, 1H), 8.01-7.97 (m, 2H), 7.80-7.66 (m, 9H), 7.57-7.51 (m, 2H), 7.40 (d, 2H, J=8.1 Hz), 6.55 (s, 1H), 5.68 (s, 2H, NCH_2), 4.34 (d, 2H, NHCH_2, J=5.4 Hz), 3.86 (s, 2H, COCH_2). ^{13}C nmr (DMSO-d_6): δ 195.2, 167.6, 159.6, 151.6, 149.9, 140.5, 136.8, 136.6, 134.2, 132.7, 130.0, 129.6, 128.6, 128.5, 127.8, 127.4, 123.8, 122.2, 121.5, 121.2, 115.7, 114.7, 52.2, 34.6, 33.2. hrms-maldi: m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{32}H_{24}N_4O_4$: 529.18703, found : 529.18699.

***N*-({1-[(5-Benzoyl-2-thienyl)methyl]-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl}-methyl)-2-(2-oxo-*2H*-benzo[*h*]chromen-4-yl)acetamide (15b).** (0.51 g), 96 %, pale yellow solid, mp 142-145 °C. ^{1}H nmr (DMSO-d_6): δ 8.81 (t, 1H, N*H*, J=5.3 Hz), 8.38-8.34 (m, 1H), 8.04-7.98 (m, 2H), 7.81-7.76 (m, 3H), 7.73-7.67 (m, 4H), 7.58-7.53 (m, 3H), 7.21 (d, 1H, J=3.9 Hz), 6.55 (s, 1H), 5.89 (s, 2H, NCH_2), 4.33 (d, 2H, NHCH_2, J=5.2 Hz), 3.86 (s, 2H, COCH_2). ^{13}C nmr (DMSO-d_6): δ 187.1, 167.6, 159.5, 151.6, 149.9, 147.2, 142.9, 137.0, 135.4, 134.2, 132.6, 128.9, 128.8, 128.7, 127.9, 127.4, 123.8, 122.2, 121.5, 121.2, 115.7, 114.7, 47.4, 34.4, 33.4. hrms-maldi: m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{30}H_{22}N_4O_4S$: 535.14345, found : 535.14352.

2-(2-Oxo-*2H*-benzo[*h*]chromen-4-yl)-N-({1-[4-(2-thienyl-carbonyl)benzyl]-*1H*-1,2,3-triazol-4-yl}methyl)acetamide (15c). (0.52 g), 97 %, pale yellow solid, mp 196-199 °C. ^{1}H nmr (DMSO-d_6): δ 8.81 (t, 1H, N*H*, J=5.3 Hz), 8.37-8.33 (m, 1H), 8.12 (dd, 1H, J=4.9, 0.8 Hz) 8.02-7.98 (m, 2H), 7.81-7.67 (m, 7H), 7.41 (d, 2H, J=8.1 Hz), 7.27 (dd, 1H, J=4.8, 3.9 Hz), 6.55 (s, 1H), 5.68 (s, 2H, NCH_2), 4.34 (d, 2H, NHCH_2, J=5.3 Hz), 3.86 (s, 2H, COCH_2). ^{13}C nmr (DMSO-d_6): δ 186.8, 167.6, 159.6, 151.6, 149.9, 142.5, 140.4, 137.1, 135.8, 135.6, 134.2, 129.2, 128.8, 128.7, 127.9, 127.8, 127.5, 123.8, 122.2, 121.5, 121.2, 115.7, 114.7, 52.2, 34.4. hrms-maldi: m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{30}H_{22}N_4O_4S$: 535.14345, found : 535.14343.

2-(2-Oxo-*2H*-benzo[*h*]chromen-4-yl)-N-[(1-{[5-(2-thienyl-carbonyl)-2-thienyl]methyl}-*1H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]-acetamide (15d). (0.35 g), 65 %, pale yellow solid mp 136-139 °C. ^{1}H nmr (DMSO-d_6): δ 8.81 (t, 1H, N*H*, J=5.3 Hz), 8.38-8.34 (m, 1H), 8.10 (d, 1Hμ, J=4.1 Hz) 8.04-8.00 (m, 3H), 7.89 (d, 1H, J=3.8 Hz), 7.80-7.67 (m, 4H), 7.31-7.28 (m, 1H), 7.24 (d, 1H, J=3.8 Hz), 6.55 (s, 1H), 5.859 (s, 2H, NCH_2), 4.33 (d, 2H, NHCH_2, J=4.6 Hz), 3.86 (s, 2H, COCH_2). ^{13}C nmr (DMSO-d_6): δ 177.7, 167.6, 159.5, 151.6, 149.9, 149.8, 146.6, 142.3, 141.6, 135.3, 134.2, 134.0, 133.8, 128.9, 128.8, 128.7, 127.9, 127.4, 123.8, 122.2, 121.5, 121.2, 115.7, 114.7, 47.5, 34.5. hrms-maldi:

m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{28}H_{20}N_4O_4S_2$: 541.09987, found : 541.09993.

Acknowledgements. We want to thank Mrs. Véronique Poddig for recording the NMR spectra.

REFERENCES

* Corresponding author. Tel.: +33 3 87 31 52 95; fax: +33 3 87 31 58 01; e-mail: kirsch@univ-metz.fr

[1] (a) Huisgen, R. *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry* Pawda, A. Ed.; Wiley, New York, 1984; Vol 1, pp 1-176. (b) Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 565. (c) Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 633.

[2] Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharples, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.

[3] Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057.

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

[5] Arosio, D.; Bertoli, M.; Manzonib, L.; Scolasticoa, C. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 3697.

[6] Kosiova, I.; Kovackova, S.; Kois, P. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 312.

[7] Natala, S. R., Muralidhar, R. M., Stephen, C.; Kiranmai G.; Stanley C. B.; Premkumar, R.; Ramana, M. V. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4093.

[8] (a) Yang, Z.-Y.; Xia, Y.; Xia, P.; Cosentino, L. M.; Lee, K.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1483. (b) Spino, C.; Dodier, M.; Sotheeswaran, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3475. (c) Bedoya, L. M.; Beltrán, M.; Sancho, R.; Olmedo, D. A.; Sánchez-Palomino, S.; del Olmo, E.; López-Pérez, J. L.; Muñoz, E.; San Feliciano, A.; Alcamí, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4447.

[9] (a) Khan, I. A.; Kulkarni, M. V.; Sun, C.-M. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 1168. (b) Bonsignore, L.; Cottiglia, F.; Elkhaili, H.; Jehl, F.; Lavagna, S. M.; Loy, G.; Manna, F.; Monteil, H.; Pompei, D.; Secci, D. *Il Farmaco* **1998**, *53*, 425.

[10] (a) Manolov, I.; Danchev, N. *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, *30*, 531. (b) Manolov, I.; Maichle-Moessmer, C.; Danchev, N. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, ***41,*** 882.

[11] Bariana, D. S. *J. Med. Chem.* **1970**, *13,* 544.

[12] (a) Ghate, M.; Kusanur, R. A.; Kulkarni, M. V. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 882. (b) Ghate, M.; Manohar, D.; Kulkarni, V.; Shobha, R.; Kattimani, S. Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 297. (c) Kontogiorgis, C. A.; Hadjipavlou-Litina, D. J. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6400.

[13] (a) Beillerot, A.; Rodríguez Domínguez, J. C.; Kirsch, G.; Bagrel, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, in press. (b) Tyagi, Y. K.; Kumar, A.; Raj, H. G.; Vohra, P.; Gupta, G.; Kumari, R.; Kumar, P.; Gupta, R. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 413.

[14] (a) Peng, F.-C.; Cheng, J.-S. Mycopathologia 1997, 137, 125. (b) Garino, C.; Pietrancosta, N.; Laras, Y.; Moret, V.; Rolland, A.; Quéléver, G.; Kraus, J.-L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1995. (c) Cravotto, G.; Balliano, G.; Robaldo, B.; Oliaro-Bosso, S.; Chimichib, S.; Boccalini, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1931. (d) Onderwater, R. C. A.; Venhorst, J.; Commandeur, J. N. M.; Vermeulen, N. P. E. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12*, 555. (e) Laurin, P.; Ferroud, D.; Klich, M.; Dupuis-Hamelin, C.; Mauvais, P.; Lassaigne, P.; Bonnefoy, A.; Musicki, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2079.

[15] Seela, F.; Sirivolu, V. R.; Chittepu, P. *Bioconjugate Chem.* **2008,** *19,* 211.

[16] (a) Kosiova, I.; Kovackova, S.; Kois, P. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 312. (b) Nonaka, H.; Tsukiji, S.; Ojida, A.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15777.

[17] (a) Beatty, K. E.; Xie, F.; Wang, Q.; Tirrell, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14150. (b) Gierlich, J.; Burley, G. A.; Gramlich, P. M. E.; Hammond, D. H.; Carell, T. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639. (c) Jawalekar, A. M.; Cremers Meeuwenoord, N. J. (S.) G. O.; Overkleeft, H. S. Van der Marel, G. S.; Rutjes, F. P. J. T.; Van Delft, F. L. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 287. (d) Haensch, C.; Hoeppener, S.; Schubert, U. S. *Nanotechnology* 2008, *19*, 035703 (7pp). (e) Sivakumar, K.; Xie, F.; Cash, B. M.; Long, S.; Barnhill, H. N.; Wang, Q. *Org. Lett.* **2004**, 6, 4603. (f) Zhou, Z.; Fahrni, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8862.

[18] (a) Bernardi, D.; Ba, L.A.; Kirsch, G. *Synthesis* **2007**, 140. (b) Bernardi, D.; Battaglia, E.; Kirsch, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1601. (c) Bernardi, D.; Dicko, A.; Kirsch, G. *Synthesis* **2006**, 509.

[19] Dorman, G.; Prestwich, G. D. *Biochemistry* **1994**, *33*, 5661.

[20] Singh, A.; Thornton, E. R.; Westheimer, F. H. *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, PC3006.

[21] (a) Rodríguez-Domínguez, J. C.; Kirsch, G. *Synthesis* **2006**, 1895. (b) Rodríguez-Domínguez, J. C.; Kirsch, G. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 3279.

[22] (a) Hatano, B.; Kadokawa, J.; Tagaya, H. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5859. (b) Wang, D.; Zhang, Z. *Org. Lett* **2003**, *5,* 4645. (c) Repichet, S.; Le Roux, C.; Roquesb, N.; Dubaca, J. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2037. (d) Urawaa, Y.; Ogurab, K. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 271. (e) Molander, G. A.; Yun, C.-S.; Ribagorda, M.; Biolatto, B. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5534. (f) Kan, T.; Tominari, Y.; Rikimaru, K.; Morohashi, Y.; Natsugari, H.; Tomita, T.; Iwatsubo, T.; Fukuyama, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1983. (g) Sarvari, M. H.; Sharghi, H. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6953. (h) Matsushita, Y.; Sugamoto, K.; Matsui, T. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4723. (i) Zhou, C.; Larock, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2302. (j) Gopalakrishnan, M.; Sureshkumar, P.; Kanagarajan, V.; Thanusu, J. *Catalysis Commun.* **2005**, *6*, 753. (k) Kang, O.; Luo, J.; Bai, Y.; Yang, Z.; Lei, Z. *J. Organomet. Chem.* **2005**, *690*, 6309.(l) Bandgar, B. P.; Patil, A. V. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7627. (m) Kangani, C. O.; Kelleya, D. E.; Day, B. W. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6289. (n) Xing, D.; Guan, B.; Cai, G.; Fang, Z.; Yang, L.; Shi, Z. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 693. (o) Jang, D. O.; Moon, K. S.; Choa, D. H.; Kim, J.-G. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6063. (p) Xin, B.; Zhang, Y.; Cheng, K *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5725.

[23] (a) Takeda, Y.; Kumazawa, T. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1988**, *61*, 455. (b) Kang, S.-K.; Ryu, H-C.; Lee, S-W. *J. Organomet. Chem.* **2000**, *610*, 38. (c) Rahman, O.; Kihlberg, T.; Langström, B. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 474. (d) Katritzky, A. R.; Suzuki, K.; Singh, S. K. *Croatica Chemica Acta,* **2004**, *77*, 175. (e) De Martino, G.; La Regina, G.; Di Pasquali, A.; Ragno, R.; Bergamini, A.; Ciaprini, C.; Sinistro, A.; Maga, G.; Crespan, E.; Artico, M.; Silvestri, R. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4378. (f) Rieke, R. D.; Suha, Y. S.; Kim, S.-H. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5961. (g) Polackova, V.; Toma, S.; Augustınova, I. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11675.

[24] (a) Futatsuya, F.; Yamane, N.; Ito, K.; Yamada, O.; Fujii, Y.; Ishida, S. German Patent 2,503,216, 1975; *Chem. Abstr.*, **1975**, *83*, 173933y. (b) Noto, R.; Gruttadauria, M.; LoMeo, P.; Spinelli, D. *Collection Czechoslovak Chem. Commun.* **1999**, *64*, 1893.

[25] Dey, B. B. *J. Chem. Soc., Trans.* **1915**, *107*, 1606.

[26] Rodighiero, P.; Manzini, P.; Pastorini, G.; Bordin, F.; Guiotto, A. *J. Heterocycl. Chem.* **1987**, *24*, 485.