



## Thèse

# "Synthèse de nouveaux $\alpha$ -nucléophiles et évaluation de leur activité hydrolytique : application à la dégradation de neurotoxiques organophosphorés"

Présentée en vue de l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université de Strasbourg**

Spécialité : Chimie Organique

Par

**Géraldine SAINT-ANDRE**

Ingénieur INSA

Soutenue le 30 octobre 2009 devant la commission d'examen composée :

Prof. Marcel HIBERT (Université de Strasbourg)  
Prof. Xavier PANNECOUCKE (I.R.C.O.F. Université de Rouen)  
Dr. Vincent LEVACHER (I.R.C.O.F. Université de Rouen)  
Dr. Rachid BAATI (Université de Strasbourg)  
Dr. Alain WAGNER (Université de Strasbourg)

Rapporteur interne  
Rapporteur externe  
Rapporteur externe  
Membre invité  
Directeur de thèse

## Remerciements

---

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein du laboratoire de Chimie des Systèmes Fonctionnels de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg sous la direction du Dr Charles Mioskowski puis du Dr Alain Wagner.

Je voudrais dédier ce manuscrit à MIKO qui a été à l'initiative de ce projet et qui m'a accueillie dans son laboratoire. Je me souviens d'un homme charismatique, exigeant et enthousiaste.

Je voudrais remercier le Dr Alain Wagner qui a repris le poste de directeur de laboratoire et donc pris ce sujet en cours de route. Votre regard neuf a permis de faire rebondir ce projet à un moment où il stagnait.

Je voudrais remercier les membres du jury pour avoir accepté et pris le temps de juger mon travail : le Pr. Marcel Hibert, le Pr. Xavier Pannecoucke et le Dr. Vincent Levacher.

Ces travaux ont été encadrés par le Dr. Rachid Baati que je remercie pour avoir corrigé ce manuscrit.

Je tiens à remercier les différentes équipes qui ont collaborées avec nous au projet A.N.R « NeuroDétox », soit celle du Pr Pierre-Yves Renard (I.R.C.O.F Rouen), celle du Dr Florian Nachon (C.R.R.S.A Grenoble) et celle du Dr François Estour (Université de Rouen).

Le Dr Kodepelly Sanjeevaro, post-doc au laboratoire, a participé aux travaux réalisés sur les empreintes moléculaires et je le remercie pour cette collaboration.

Je tiens également à remercier le service d'analyse de la Faculté de Pharmacie. Cyril Antheaume pour les analyses RMN, Patrick Wehrung et Pascale Buisine pour les masses.

Merci à Nathalie, Mariane et Liliane pour leur accueil toujours avenant et leur disponibilité.

Merci à Michel Mosser pour sa gestion des petits aléas quotidiens.

Je voudrais remercier le Dr Florian Nachon et son équipe, notamment Emilie Gillon, qui m'ont accueillie et formée sur la réactivation de l'AChe au C.R.R.S.A de Grenoble.

Un grand merci également au Dr Christian. Boudier pour ses conseils en cinétique chimique et les essais réalisés sur l' $\alpha$ -2-macroglobuline.

## Remerciements

---

Merci au Dr Nassera Tounsi pour le temps qu'elle a consacré à la détermination complexe des pKa de certaines de mes molécules.

Merci au Dr Valérie Lamour et à Julie Papillon pour les travaux réalisés sur l'ATP.

Merci également au Dr Gaetan Mislin pour m'avoir accueillie dans son laboratoire le temps de tests sur la complexation du fer.

Enfin, merci à Rkia El baghdadi pour sa patience et pour son aide précieuse lors des manipulations de gels d'électrophorèse

Et maintenant...

Je voudrais dire aux Boys du Lab1 que ça n'aurait pas été pareil sans vous, merci à Ghys et Cédric pour tous ces petits moments de folies. Merci à Ananda, Kashu et Romain...je dois avouer que j'ai toujours été très bien entourée.

Ces trois années de thèse furent jalonnées de belles rencontres, une petite aventure humaine: Damien, Martin Pasquale, Mathieu, Manu, Olivier ... Belen, Cynthia, Sylvie, Christelle merci pour vos encouragements et votre soutien dans la dernière ligne droite...

Une très forte pensée pour Karolina, merci pour ton soutien dans les moments où tout s'écroulait.

Ma Boucle, quatre années de montagnes russes émotionnelles... pour le meilleur et pour le pire et finalement pour le meilleur. Merci pour ton aide inestimable, inoubliable.

Je voudrais remercier mes Amis, ma biche, ma petite Gwen, Béné, ma Rousse, Marion...mon Daminou, Rouls, Clem, vous qui êtes tellement nécessaire à mon équilibre.

Merci à la Nick pour beaucoup de petits détails depuis plusieurs années maintenant...

## Remerciements

---

Je ne peux conclure ces remerciements sans une pensée féline pour Bliss&Mokha (connues sous le nom des Minouches)...qui ont fidèlement accompagnées mes trois années à Strasbourg et qui sont devenues expertes dans le déchiquetage de publications !

Merci à ma petite famille...un peu loin de tout ça mais si près de mon cœur.

*A papa, le temps qui passe n'atténue  
pas la douleur de ton absence.*

## Présentation

Poster DGA, Réunions ANR.

- G. Saint-André, R. Baati, A. Wagner, C. Mioskowski « *Identification d' $\alpha$ -nucléophiles et développement d'empreintes moléculaires pour l'hydrolyse des organophosphorés neurotoxiques.* », Rencontre DGA, Paris, 20 mars 2008.

## Publications

- G. Saint-André, R. Baati, A. Wagner “*SAR studies of the degradation of neurotoxic organophosphorus*”, en cours de rédaction.
- G. Saint-André, R. Baati, A. Wagner « *Ester hydrolysis by amidoxime organo-catalyst* », en cours de rédaction.
- L. Louise-Leriché, E. Păunescu, G. Saint-André, R. Baati, A. Romieu, A. Wagner, and P-Y. Renard « *A HTS Assay for the Detection of Organophosphorus Nerve Agents Scavengers* », *Chemistry: A European Journal*, **2010**, 16 (11), 3510-3523.

---

## **ABBREVIATIONS**

---

|                    |                                             |
|--------------------|---------------------------------------------|
| 2-PAM              | Pralidoxime                                 |
| AC                 | Arme chimique                               |
| ACh                | Acétylcholine                               |
| AChE               | Acétylcholinestérase                        |
| AIBN               | 2,2'-Azobisisobutyronitrile                 |
| ATC                | Acétylthiocholine                           |
| BBr <sub>3</sub>   | Tribromure de bore                          |
| BuChE              | Butyrylcholinestérase                       |
| BuLi               | Butyllithium                                |
| CAC                | Convention sur les Armes Chimiques          |
| CH <sub>3</sub> CN | Acétonitrile                                |
| CLHP               | Chromatographie liquide à haute performance |
| Cp                 | Complexe de prépolymérisation               |
| d                  | Doublet                                     |
| DCM                | Dichlorométhane                             |
| DFP                | Diisopropyl fluorophosphate                 |
| DIBAL              | Hydruure de diisobutylaluminium             |
| DL <sub>90</sub>   | Dose létale à 90%                           |
| DFP                | Diisopropyl fluorophosphonate               |
| DMAP               | 4-Diméthylaminopyridine                     |
| DMF                | Diméthylformamide                           |
| DMSO               | Diméthylsulfoxyde                           |
| DTNB               | Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)      |
| DVB                | Divinylbenzène                              |
| éq.                | Equivalent                                  |
| ESI                | Ionisation par électrospray                 |
| Et <sub>2</sub> O  | Ether diéthylique                           |
| Et <sub>3</sub> N  | Triéthylamine                               |
| EtOAc              | Acétate d'éthyle                            |
| EtOH               | Ethanol                                     |
| g                  | Gramme                                      |
| h                  | Heure                                       |
| hAChE              | Acétylcholinestérase humaine                |
| hBuChE             | Butyrylcholinestérase humaine               |
| HCl                | Acide chlorhydrique                         |

## Abréviations

---

|                                 |                                                             |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Hz                              | Hertz                                                       |
| IC <sub>50</sub>                | Concentration d'inhibition 50%                              |
| IR                              | Infrarouge                                                  |
| K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>  | Carbonate de potassium                                      |
| J                               | Constante de couplage                                       |
| L                               | Litre                                                       |
| m                               | Multiplet                                                   |
| M                               | Molaire                                                     |
| MeOH                            | Méthanol                                                    |
| min                             | Minute                                                      |
| MIP                             | Molecular imprinted polymer                                 |
| MS                              | Spectrométrie de masse                                      |
| N                               | Normal                                                      |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Sulfate de sodium                                           |
| NCS                             | <i>N</i> -Chlorosuccinimide                                 |
| NOP                             | Neurotoxique organophosphoré                                |
| OPA / OPAA                      | Organophosphorous (acid) anhydrolase                        |
| OPH                             | Organophosphorous hydrolase                                 |
| PhX                             | O-éthyl-S-(2-diisopropylaminoéthyl)-phényl-phosphonothioate |
| POP                             | Pesticide organophosphoré                                   |
| ppm                             | Partie pour million                                         |
| PTC                             | Propylthiocholine                                           |
| PTE                             | Phosphotriestérase                                          |
| q                               | Quadruplet                                                  |
| quant.                          | Quantitatif                                                 |
| Rdt                             | Rendement                                                   |
| RMN                             | Résonance magnétique nucléaire                              |
| s                               | Singulet                                                    |
| ta                              | Température ambiante                                        |
| TBAF                            | Fluorure de tétrabutylammonium                              |
| THF                             | Tétrahydrofurane                                            |
| Tris                            | Tris(hydroxyméthyl)aminométhane                             |
| UV                              | Ultra-violet                                                |
| VX                              | O-éthyl-S-(2-diisopropylaminoéthyl)-méthyl-phosphonothioate |

---

## **SOMMAIRE**

---

## ABREVIATIONS

## SOMMAIRE

## PREAMBULE ET OBJECTIFS

## INTRODUCTION GENERALE

|          |                                             |    |
|----------|---------------------------------------------|----|
| <b>1</b> | <b>LES ARMES CHIMIQUES</b>                  | 3  |
| 1.1      | Historique                                  | 3  |
| 1.2      | Classification                              | 4  |
| 1.2.1    | Les agents incapacitants                    | 4  |
| 1.2.2    | Les agents vésicants                        | 4  |
| 1.2.3    | Les agents suffocants                       | 5  |
| 1.2.4    | Les agents neurotoxiques                    | 5  |
| 1.3      | Politiques mondiales de désarmement         | 5  |
| 1.3.1    | La Convention sur les Armes Chimiques (CAC) | 7  |
| <b>2</b> | <b>LES ORGANOPHOSPHORES NEUROTOXIQUES</b>   | 8  |
| 2.1      | Définition et classification                | 8  |
| 2.2      | Mécanisme d'action                          | 10 |
| 2.3      | Traitement des intoxications                | 14 |
| 2.4      | Moyens de détection                         | 15 |
| 2.4.1    | Méthodes analytiques                        | 16 |
| 2.4.2    | Méthodes synthétiques                       | 17 |
| 2.5      | Moyens de décontamination                   | 19 |
| 2.5.1    | Décontamination physique                    | 19 |
| 2.5.2    | Décontamination chimique                    | 19 |
| 2.5.3    | Décontamination biologique                  | 23 |
| <b>3</b> | <b>CONCLUSION</b>                           | 30 |

## IDENTIFICATION DE NOUVELLES STRUCTURES POUR L'HYDROLYSE SELECTIVE DU PhX

|          |                                                                               |    |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUCTION ET OBJECTIFS</b>                                              | 33 |
| <b>2</b> | <b>MISE AU POINT DE LA METHODE ANALYTIQUE</b>                                 | 34 |
| 2.1      | Choix de la méthode                                                           | 34 |
| 2.2      | Mise au point du test de criblage                                             | 36 |
| 2.2.1    | Calibration                                                                   | 38 |
| <b>3</b> | <b>EVALUATION DES COMPOSES GRACE AU TEST DE CRIBLAGE</b>                      | 42 |
| 3.1      | Première série de nucléophiles                                                | 42 |
| 3.1.1    | Structures des nucléophiles                                                   | 42 |
| 3.1.2    | Synthèse des nucléophiles                                                     | 43 |
| 3.1.3    | Résultats du test de criblage                                                 | 47 |
| 3.2      | Les benzaldoximes                                                             | 50 |
| 3.2.1    | Première série de benzaldoximes                                               | 50 |
| 3.2.2    | Deuxième série de benzaldoximes                                               | 54 |
| 3.2.3    | Troisième série de benzaldoxime                                               | 57 |
| 3.2.4    | Conclusion sur le criblage des benzaldoximes                                  | 61 |
| 3.3      | Les benzamidoximes                                                            | 61 |
| 3.3.1    | Structure des nucléophiles                                                    | 61 |
| 3.3.2    | Synthèse des benzamidoximes                                                   | 62 |
| 3.3.3    | Résultats du test de criblage des benzamidoximes                              | 64 |
| 3.4      | Les pyridinaldoximes                                                          | 66 |
| 3.4.1    | Structure des pyridinaldoximes                                                | 66 |
| 3.4.2    | Résultats du test de criblage des pyridinaldoximes                            | 67 |
| 3.5      | Les pyridylamidoximes                                                         | 68 |
| 3.5.1    | Structure des nucléophiles                                                    | 68 |
| 3.5.2    | Résultats du test de criblage des pyridylamidoximes                           | 69 |
| 3.6      | Série d'oximes permettant de faire varier les substituant R et R <sub>1</sub> | 72 |
| 3.6.1    | Synthèse des composés                                                         | 72 |
| 3.6.2    | Résultats du test de criblage des composés                                    | 74 |

|                                                                            |                                                                                                              |     |
|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.7                                                                        | Les acides hydroxamiques                                                                                     | 77  |
| 3.7.1                                                                      | Structure des acides hydroxamiques                                                                           | 77  |
| 3.7.2                                                                      | Synthèse des acides hydroxamiques                                                                            | 77  |
| 3.7.3                                                                      | Résultats du test de criblage pour les acides hydroxamiques                                                  | 78  |
| 3.8                                                                        | CONCLUSION                                                                                                   | 80  |
| <b>CARACTERISATION CINETIQUE DE L'HYDROLYSE DU PhX</b>                     |                                                                                                              |     |
| <b>ET REACTIVATION DE L'ACHE</b>                                           |                                                                                                              |     |
| 1                                                                          | <b>CARACTERISATION CINETIQUE DE L'HYDROLYSE DU PhX</b>                                                       | 83  |
| 1.1                                                                        | Suivi cinétique de l'hydrolyse du PhX dans les conditions de criblage                                        | 83  |
| 1.1.1                                                                      | Les oximes                                                                                                   | 83  |
| 1.1.2                                                                      | Les amidoximes                                                                                               | 85  |
| 1.1.3                                                                      | Les acides hydroxamiques                                                                                     | 86  |
| 1.1.4                                                                      | Estimation des vitesses initiales                                                                            | 87  |
| 1.1.5                                                                      | Conclusion                                                                                                   | 88  |
| 1.2                                                                        | Etude du composé 62 et comparaison avec la pralidoxime                                                       | 89  |
| 1.2.1                                                                      | Etude des différents ratio nucléophile/PhX                                                                   | 89  |
| 1.2.2                                                                      | Etude préliminaire des chromatogrammes obtenus par CLHP lors de l'hydrolyse du PhX par la pyridinaldoxime 9  | 91  |
| 1.2.3                                                                      | Etude de l'élévation de la température sur les profils cinétiques des composés 62 et 3                       | 96  |
| 1.2.4                                                                      | Etude de l'influence du pH sur les profils cinétiques                                                        | 97  |
| 1.2.5                                                                      | Etude de la réaction d'hydrolyse du PhX par la 3-hydroxy-pyridylamidoxime 62 par LCMS et RMN <sup>31</sup> P | 98  |
| 1.2.6                                                                      | Conclusion                                                                                                   | 101 |
| 2                                                                          | <b>CONCLUSION et PERSPECTIVES</b>                                                                            | 102 |
| 3                                                                          | <b>REACTIVATION DE L'ACHÉ</b>                                                                                | 103 |
| 3.1                                                                        | <i>Introduction</i>                                                                                          | 103 |
| 3.2                                                                        | Evaluation des composés sur la réactivation de l'hAChE                                                       | 108 |
| 3.2.1                                                                      | Principe                                                                                                     | 108 |
| 3.2.2                                                                      | Résultats expérimentaux                                                                                      | 115 |
| 3.2.3                                                                      | Récapitulatif des résultats                                                                                  | 122 |
| 3.3                                                                        | Conclusion                                                                                                   | 123 |
| <b>DEVELOPPEMENT D'EMPREINTES MOLECULAIRES POUR LA DEGRADATION DES NOP</b> |                                                                                                              |     |
| 1                                                                          | <b>INTRODUCTION</b>                                                                                          | 125 |
| 1.1                                                                        | Principe                                                                                                     | 126 |
| 1.1.1                                                                      | Approche covalente                                                                                           | 128 |
| 1.1.2                                                                      | Approche non covalente                                                                                       | 128 |
| 1.1.3                                                                      | Approche semi-covalente                                                                                      | 129 |
| 1.2                                                                        | Techniques de polymérisation                                                                                 | 129 |
| 1.2.1                                                                      | La polymérisation en masse                                                                                   | 130 |
| 1.2.2                                                                      | Polymérisation en émulsion                                                                                   | 131 |
| 1.3                                                                        | Les polymères imprimés mimant les phosphotriestérases                                                        | 132 |
| 2                                                                          | <b>STRATEGIE</b>                                                                                             | 133 |
| 3                                                                          | <b>APPLICATION DES EMPREINTES MOLECULAIRES A LA DEGRADATION DES ORGANOPHOSPHORES TOXIQUES</b>                | 135 |
| 3.1                                                                        | Approche dite de l'analogue de l'état de transition                                                          | 135 |
| 3.1.1                                                                      | Mécanismes d'hydrolyse du VX                                                                                 | 135 |
| 3.1.2                                                                      | Conception du template                                                                                       | 140 |
| 3.2                                                                        | Nouvelle stratégie                                                                                           | 144 |
| 3.2.1                                                                      | Empreinte moléculaire <i>via</i> la polymérisation en masse                                                  | 145 |
| 3.2.2                                                                      | Polymérisation en mini-émulsion                                                                              | 158 |
| 3.2.3                                                                      | Synthèse d'un nouveau template                                                                               | 171 |
| 4                                                                          | <b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>                                                                            | 174 |
| <b>CONCLUSION GENERALE</b>                                                 |                                                                                                              |     |

**PARTIE EXPERIMENTALE**

---

## **PREAMBULE ET OBJECTIFS**

---



Depuis 1997, date à laquelle la Convention des Armes Chimiques est entrée en vigueur, le développement, la production, le stockage et l'utilisation d'armes chimiques parmi lesquelles les composés organophosphorés neurotoxiques (NOP) sont interdits. Malgré cela, elles restent une menace importante pour les populations civiles et militaires du fait de la montée du terrorisme, des instabilités géopolitiques et de l'existence de stocks importants dans le monde.

Depuis une cinquantaine d'années, de nombreux efforts sont consentis afin de mettre au point des méthodes chimiques et biologiques de détection, de décontamination et de dégradation des NOP. Deux problématiques sont posées aux chercheurs. Il faut d'une part trouver des moyens de traiter les intoxications, accidentelles ou non, des personnes exposées, et d'autre part prévenir les risques d'exposition en décontaminant les zones et le matériel pollués. Le développement de nouveaux moyens de détection et de protection est également un axe de recherche important à considérer dans la détoxification des NOP.

Les moyens de décontamination utilisés à ce jour sont souvent incompatibles avec l'organisme et bien que des traitements contre les intoxications dues aux organophosphorés existent, ils souffrent d'inconvénients tels que des effets secondaires ou une efficacité plus ou moins importante selon le toxique incriminé. Par conséquent la recherche de nouvelles alternatives reste d'un grand intérêt.

Récemment, le concept d'épurateur catalytique est apparu comme une nouvelle approche thérapeutique. Plusieurs stratégies sont à l'étude, telles que l'utilisation d'enzymes, d'anticorps, de catalyseurs chimiques, de cyclodextrines modifiées ou encore de polymères imprimés.

Devant l'importance de la découverte et de la mise au point de nouveaux moyens de décontamination et dans le cadre de mes travaux de thèse, nous avons cherché à identifier de nouvelles structures d'agents chimiques susceptibles de dégrader les neurotoxiques organophosphorés de la famille des agents **V**. En parallèle, compte tenu de l'émergence des empreintes moléculaires qui trouvent des applications en tant que bio-détecteurs et catalyseurs, nous avons envisagé de développer des polymères imprimés pour la dégradation des NOP.

Après une introduction générale rappelant la problématique et les notions fondamentales sur les neurotoxiques organophosphorés, ce manuscrit présentera les résultats obtenus et l'état d'avancement des travaux menés sur ces deux axes de recherche.

---

## **INTRODUCTION GENERALE**

---

# 1 LES ARMES CHIMIQUES<sup>1</sup>

*« C'est une substance chimique qui, lors d'une opération militaire, a pour effet de tuer, de blesser ou d'incapaciter temporairement un homme par les effets physiologiques qu'elle provoque. »<sup>2</sup>*

## 1.1 Historique

L'usage de produits toxiques comme armes chimiques (AC) remonte à l'antiquité. Par exemple, pendant la guerre du Péloponnèse (431-404 av. J.-C.) les Spartiates ont utilisé des vapeurs d'arsenic. Un millénaire plus tard, pendant le siège de Constantinople (en 637), les Grecs de l'Empire byzantin se sont servis du « feu grec » un mélange de pétrole, de soufre bitumineux et de résines. Les armes chimiques dites modernes, ont vu le jour sur les champs de bataille de la première guerre mondiale. Lors de la deuxième bataille d'Ypres, en avril 1915 l'armée allemande a déversé des centaines de tonnes de chlore. Le nuage de gaz a fait des milliers de victimes dans les rangs des Alliés. Durant toute la guerre, tous les protagonistes vont développer des agents chimiques toxiques ainsi que des moyens de les propager (obus d'artillerie, projectiles de mortier, bombes, mines...). En 1917, le phosgène puis le gaz moutarde (Ypérite) ont ainsi été utilisés. A la fin de la première guerre mondiale, 124 000 tonnes d'AC auront été répandues, causant plus de 90 000 morts et plus d'un million de victimes. Malgré les traumatismes laissés par l'emploi de ces armes durant la première guerre mondiale, leur mise au point et leur utilisation vont se poursuivre au cours du vingtième siècle. Les AC ne seront pas utilisées lors de la seconde guerre mondiale, mais auront été déployées sur tous les fronts laissant un héritage d'armes anciennes ou abandonnées qui pose encore des problèmes pour de nombreux pays. Pendant la guerre froide, les Etats-Unis et l'Union Soviétique ont maintenu d'énormes réserves d'AC soit des dizaines de milliers de tonnes,

---

<sup>1</sup> <http://www.opcw.org> Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons.

<sup>2</sup> United States Department of Defense, *US Department of Defense Dictionary of Military Terms*, Arco, New York, 1988, p. 65.

quantité suffisante pour détruire la quasi totalité de la vie animale sur terre. Dans les années 80, l'Irak utilisa des AC contre l'Iran ou encore contre les populations Turques à Halabja. Deux exemples plus récents d'intoxication au gaz Sarin, en 1994 et 1995, au Japon ont réveillé la communauté internationale sur les risques actuels liés aux AC.

## 1.2 Classification

Les agents chimiques de guerre peuvent être classés dans les catégories suivantes : les incapacitants, les vésicants, les suffocants et les neurotoxiques.<sup>3</sup>

### 1.2.1 Les agents incapacitants

Conçus pour provoquer une confusion physique ou mentale, généralement des hallucinations ou des délires, ces armes ont sur la victime un effet incapacitant qui peut durer des heures voire des jours. Les personnes affectées peuvent normalement récupérer sans assistance médicale. Le BZ (3-quinuclidinyl benzilate) est un exemple d'agent incapacitant (Figure 1).

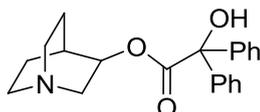


Figure 1 : Structure du BZ.

### 1.2.2 Les agents vésicants

Ces agents, libérés sous forme de liquide visqueux, causent la formation de larges cloques au contact avec la peau. En cas d'inhalation, ils peuvent entraîner une irritation sévère de la gorge et des poumons. Si une large dose peut-être fatale, ces gaz servent la plupart du temps à scarifier et à incapaciter les victimes. La

---

<sup>3</sup> S. Chauhan, S. Chauhan, R. D'Cruz, S. Faruqi, K.K. Singh, S. Varma, M. Singh, V. Karthik, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **2008**, 26, 113-122.

moutarde au soufre, la moutarde à l'azote, l'oxime de phosgène et la lewisite sont des agents vésicants (Figure 2).

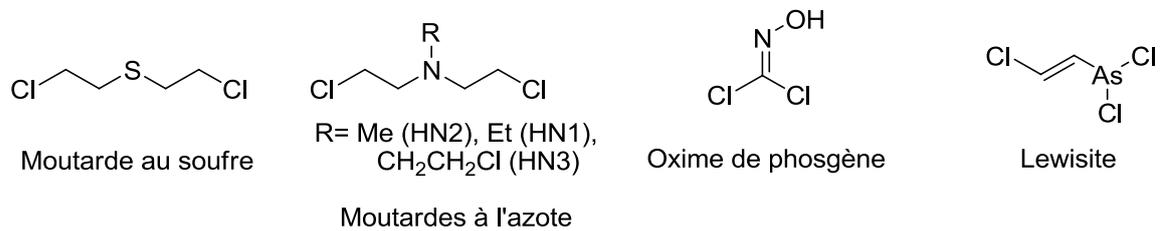


Figure 2 : Exemples d'agents vésicants.

### 1.2.3 Les agents suffocants

Les agents suffocants peuvent être libérés sous forme gazeuse ou liquide, ils causent des œdèmes pulmonaires qui asphyxient la victime. Le phosgène, le diphosgène, le chlore et la chloropicrine sont des agents suffocants (Figure 3).

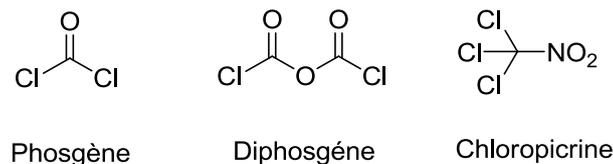


Figure 3 : Exemples d'agents suffocants.

### 1.2.4 Les agents neurotoxiques

Entreposés sous forme liquide, ces agents peuvent être libérés à partir d'une munition (nuage de vapeur ou pulvérisation). Ils peuvent être dispersés par des moyens thermiques, explosifs ou mécaniques et être absorbés par inhalation ou par voie cutanée. Une fois dans l'organisme, une quantité infime suffit pour inhiber l'activité neuronale. Les principaux symptômes sont les suivants : transpiration, bronches qui se compriment et se remplissent de mucus, vision embrouillée, vomissements, convulsions, paralysie et mort presque assurée. Le tabun, le sarin, le soman, le **GF** et le **VX** sont des agents neurotoxiques (Figure 6 et 7, p 9).

## 1.3 Politiques mondiales de désarmement

Depuis que des produits chimiques sont employés comme armes de guerre, des efforts considérables sont déployés à l'échelle internationale pour faire obstacle à leurs utilisations. Les étapes marquantes de leur emploi et de leur interdiction sont résumées ci- après.

|                  |                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1675</b>      | Accord de Strasbourg                                          | Premier accord international limitant l'emploi des armes chimiques, en l'occurrence des balles empoisonnées.                                                                                                                                                                   |
| <b>1874</b>      | Convention de Bruxelles sur les lois et coutumes de la guerre | Interdiction de l'emploi de poisons ou d'armes empoisonnées et de l'emploi d'armes, projectiles ou matériels causant des souffrances inutiles.                                                                                                                                 |
| <b>1899/1907</b> | Conférences de la paix de La Haye                             | Interdiction de l'emploi d'armes empoisonnées, de « gaz suffocants ou délétères ».                                                                                                                                                                                             |
| <b>1915/1918</b> | Europe, Première Guerre mondiale                              | Premier emploi d'armes chimiques à grande échelle : Deuxième bataille d'Ypres (Belgique).                                                                                                                                                                                      |
| <b>1925</b>      | Protocole de Genève                                           | Interdiction de l'emploi d'armes chimiques, mais pas d'interdiction de leur mise au point – 132 Etats parties en 2000.                                                                                                                                                         |
| <b>1972</b>      | Convention sur les armes biologiques ou à toxines             | Interdiction totale de l'emploi d'armes biologiques – 143 Etats parties, 17 signataires en 2000 – mais pas de mécanisme de vérification. Engagement à négocier un accord sur les armes chimiques.                                                                              |
| <b>1980/1988</b> | Guerre Iran-Iraq                                              | Emploi par l'Iraq d'armes chimiques contre l'Iran et contre ses propres populations civiles à Halabja en 1988.                                                                                                                                                                 |
| <b>1993</b>      | Convention sur les armes chimiques                            | Signature de la Convention sur les armes chimiques à Paris en janvier. Interdiction totale de la mise au point, de la fabrication, du stockage et de l'emploi d'armes chimiques et fixation de délais pour leur destruction. Création de la Commission préparatoire de l'OIAC. |
| <b>1997</b>      | OIAC, La Haye                                                 | Entrée en vigueur de la Convention sur les armes chimiques pour 87 Etats parties; l'OIAC commence ses opérations à La Haye; les inspections commencent en juin 1997.                                                                                                           |
| <b>2003</b>      | Sixième anniversaire de l'entrée en vigueur de la CAC         | L'OIAC compte 153 États membres et a effectué plus de 1 500 inspections sur le territoire de 56 États parties.                                                                                                                                                                 |

### 1.3.1 La Convention sur les Armes Chimiques (CAC)<sup>4</sup>

La convention sur l'interdiction de la mise au point, de la fabrication, du stockage et de l'emploi des armes chimiques et sur leur destruction a été ouverte à la signature lors d'une cérémonie qui a eu lieu à Paris le 13 janvier 1993. Quatre ans plus tard, en avril 1997, la convention entrerait en vigueur.

Cette convention est unique en son genre, car il s'agit du premier traité multilatéral qui interdit toute une catégorie d'armes de destruction massive et prévoit la vérification internationale de la destruction de celles-ci. Il s'agit en outre du premier traité de désarmement négocié dans un cadre entièrement multilatéral, ce qui ouvre la voie à une plus grande transparence et à une égalité d'application à tous les États parties. La convention a également été négociée avec la participation active de l'industrie chimique du monde entier, garantissant ainsi le concours continu de cette dernière au régime de vérification de l'industrie établi par la CAC. En effet, la convention prévoit l'inspection des installations de l'industrie afin de garantir que les produits chimiques toxiques servent uniquement à des fins non interdites par la Convention.

Globalement, la communauté internationale a réussi à mettre au point un traité qui permet à la fois de vérifier la destruction des armes chimiques à l'échelle mondiale et de garantir la non-prolifération de ces armes et des produits chimiques toxiques entrant dans leur fabrication. Par ailleurs, la convention favorise la coopération internationale entre les États parties dans l'utilisation pacifique de la chimie et prévoit une assistance et une protection destinées aux États parties menacés ou attaqués par des armes chimiques.

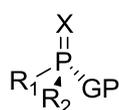
Malgré la CAC, les armes chimiques restent une menace importante pour les populations civiles et militaires du fait de la montée du terrorisme et des instabilités géopolitiques mais aussi de l'existence de stocks importants dans le monde.

---

<sup>4</sup> C.o. Disarmament, The Convention on the Prohibition of the Development, Production, Stockpiling and Use of chemical Weapons and on their Destruction, **August 1992**, CD/1170.

## 2 LES ORGANOPHOSPHORES NEUROTOXIQUES

La catégorie d'AC communément considérée comme la plus mortelle est celle des agents neurotoxiques.<sup>3</sup> De façon générale ces composés sont des dérivés du phosphore pentavalent, comprenant un atome de phosphore lié par une double liaison à un atome de soufre ou d'oxygène, un groupe partant et deux substituants dont la structure varie suivant la classe du composé<sup>5</sup> (Figure 4).



X= O ou S

GP = Groupe Partant (F, CN, S-R...)

R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> = alkyl; O-alkyl ou NH<sub>2</sub>

Figure 4 : Structure des neurotoxiques organophosphorés.

### 2.1 Définition et classification

Au sein des composés organophosphorés toxiques, il est possible de différencier les neurotoxiques de guerre (NOP) et les pesticides (POP) utilisés principalement comme insecticides (Figure 5). Ils sont responsables d'une mortalité élevée dans le monde par intoxication aiguë accidentelle ou volontaire.

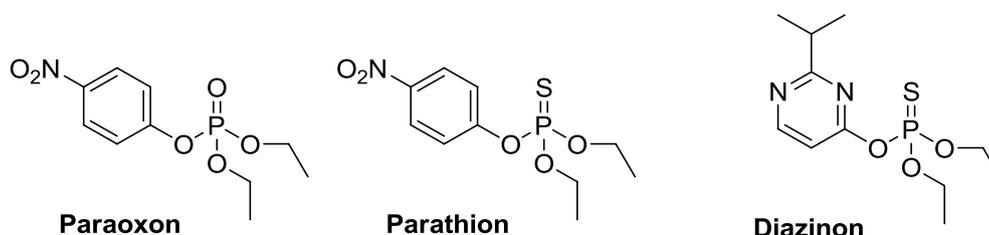


Figure 5 : Exemples de structures d'insecticides.

<sup>5</sup> L.M. Eubanks, T.J. Dickerson, K.D Janda, *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, 36, 458-470.

Les NOP sont des organophosphorés de faible poids moléculaire ( $\leq 300$  Daltons), très lipophiles, passant facilement la barrière sang-cerveau. Ce sont tous des agents liquides rendant impropre le terme habituel de gaz de combat.

Parmi les NOP militaires, on différencie les agents **G** (pour « Germans »), des agents **V** (dérivés de l'Amiton ou **VG**). Les agents **G** ont été développés en Allemagne pendant la seconde guerre mondiale et regroupent le tabun (**GA**), le sarin (**GB**), le cyclosarin (**GF**) et le soman (**GD**) (Figure 6).

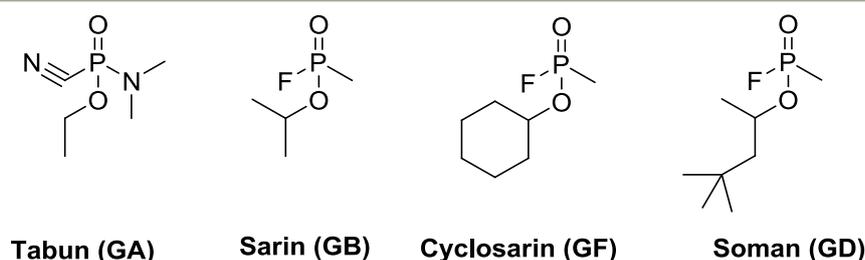


Figure 6 : Structure des principaux agents **G**.

Ce sont des liquides suffisamment volatils pour agir par voie respiratoire et être utilisés sous forme d'aérosols, mais ils sont peu persistants. Le plus dangereux est sans aucun doute le soman que ce soit lors de son utilisation, de sa fabrication ou de son stockage.

Les agents **V** ont quant à eux été développés aux Etats-Unis pendant la guerre froide et regroupent le **VX** (A4 en codification française), le **VE**, le **VG** et le **VM**. Ce sont des liquides peu volatils, destinés à être absorbés par voie percutanée. Il s'agit de produits toxiques persistants dont le plus dangereux est le **VX** ( $DL_{50} = 0.14$  mg / kg administré par voie cutanée)<sup>3</sup> (Figure 7).

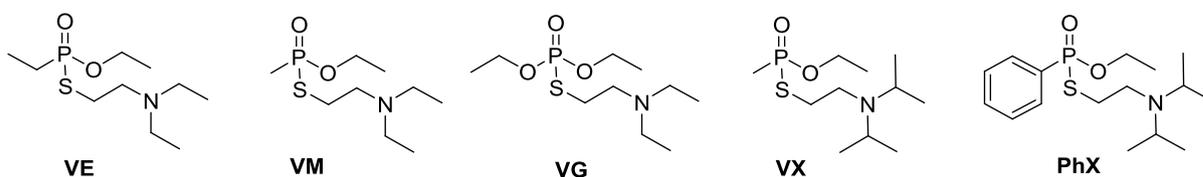


Figure 7 : Structure des principaux agents **V**.

## 2.2 Mécanisme d'action

Les NOP, très lipophiles, franchissent aisément toutes les barrières biologiques et se fixent de façon covalente aux acétylcholinestérases (AChE) du système nerveux central, des muscles et des globules rouges ou aux pseudocholinestérases du système nerveux central ou plasmique.<sup>6</sup> Notons que l'AChE est l'enzyme de dégradation de l'acétylcholine (ACh), laquelle est un neurotransmetteur (Figure 8).

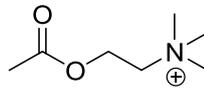


Figure 8 : Structure de l'acétylcholine (ACh).

Au cours de l'influx nerveux, l'ACh est libérée au niveau des synapses des neurones dites «cholinergiques» du système nerveux, pour transmettre l'information nerveuse d'un neurone au suivant. L'AChE permet d'hydrolyser la liaison ester entre le groupe acétyl et la choline afin de limiter la concentration de l'ACh dans les fentes synaptiques (Figure 9).

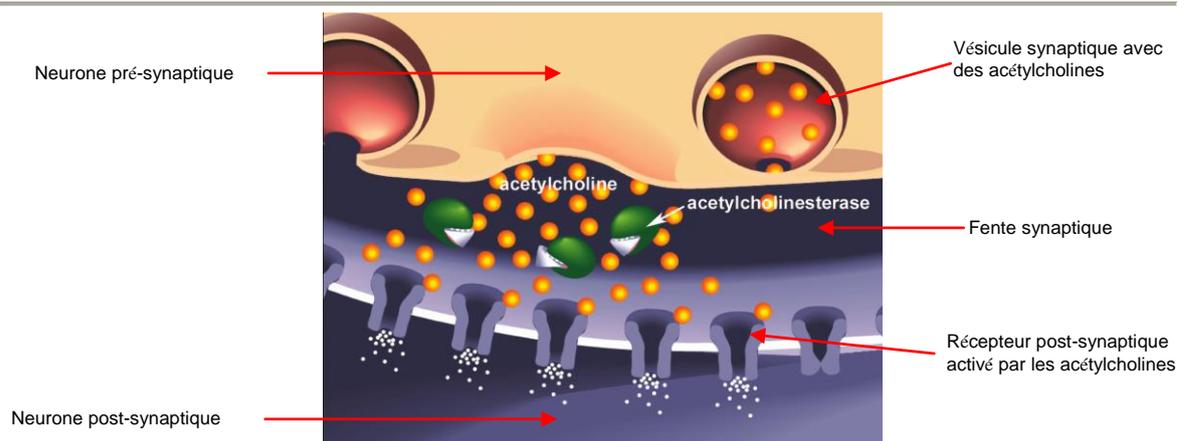


Figure 9 : Synapse cholinergique.

<sup>6</sup> a) P. Taylor in Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics 10<sup>th</sup> ed* (Eds.: J.G. Hardman, L.E. Limbird, and A.G. Goodman), Mc Graw-Hill, New-York, **2001**, 175-192. b) R.E Langford in *Introduction to weapons of mass destruction, radiological, chemical and biological*, John Wiley and Son, Chichester, **2004**.

Le site actif de l'AChE est constitué d'une triade catalytique formée par les trois acides aminés : Glutamate, Sérine, Histidine. Le neurotransmetteur se fixe par sa partie ammonium sur un site anionique (fonction carboxylate du glutamate), le site estérasique est constitué par le résidu sérine (Figure 10).

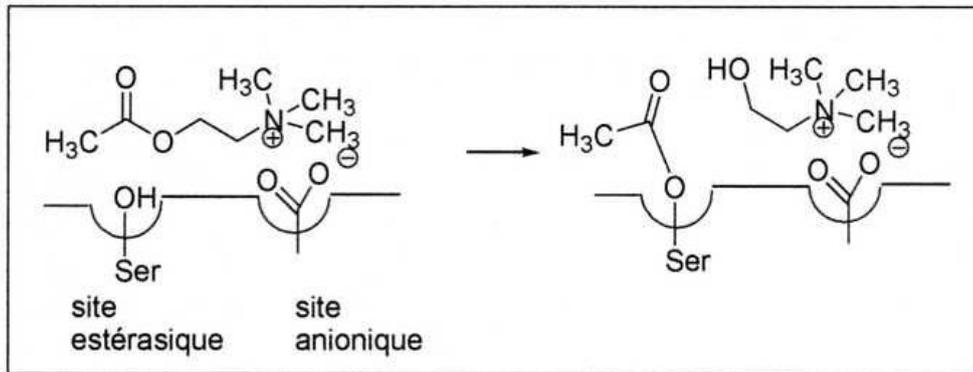
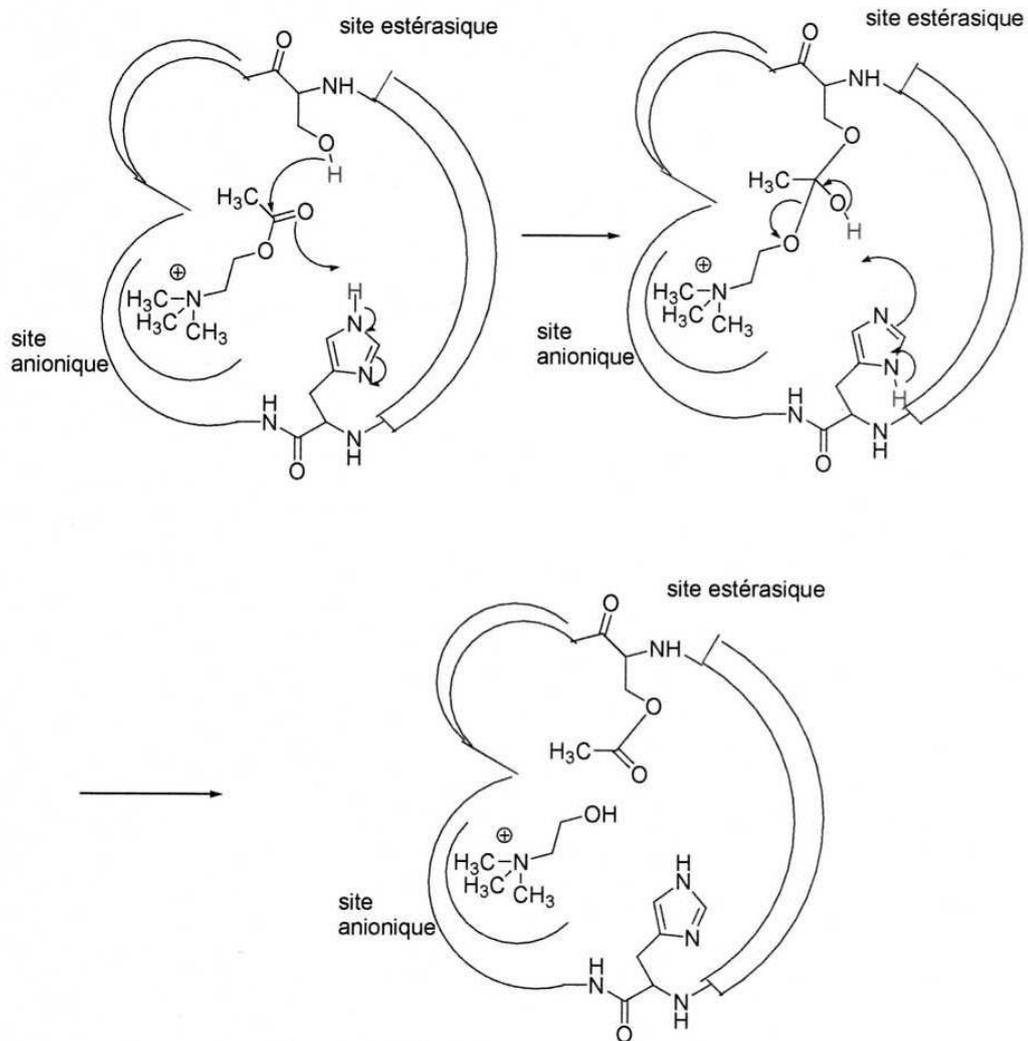


Figure 10 : Fixation et hydrolyse de l'ACh dans le site actif de l'enzyme.

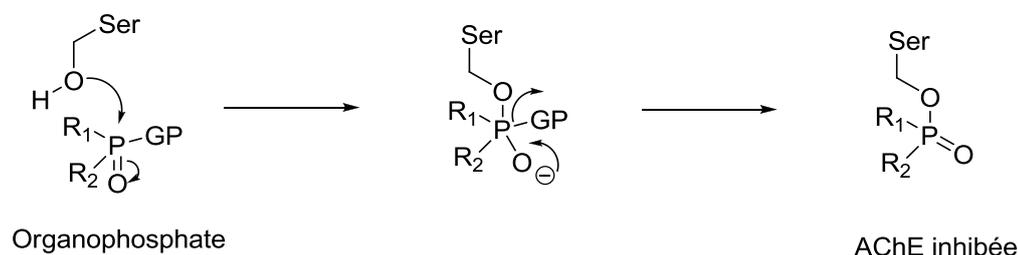
L'hydrolyse est en faite due à une cascade catalytique faisant intervenir l'imidazole du résidu histidine (Figure 11).



**Figure 11 :** Réaction enzymatique catalysée par l'AChE - cascade catalytique.

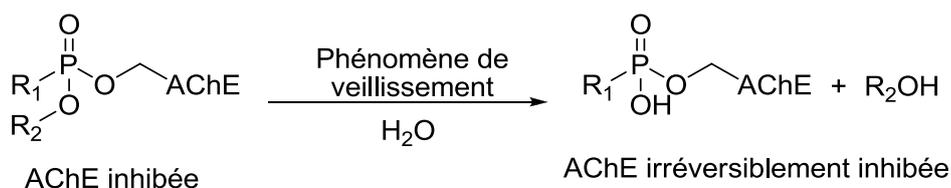
Une faible quantité de NOP suffit à inhiber la quasi-totalité de l'activité cholinestérasique. Ils viennent occuper, en le phosphorylant, le site estérasiq de l'enzyme, s'opposant ainsi à l'hydrolyse physiologique de l'acétylcholine en choline et acide acétique. La fonction de régulation du neurotransmetteur n'est alors plus assurée, celui-ci s'accumule dans les synapses entraînant un dysfonctionnement du système nerveux, pouvant conduire à la mort par asphyxie. Les neurotoxiques organophosphorés ont une structure qui s'apparente à l'état de transition de géométrie tétraédrique observé lors de la réaction d'hydrolyse des esters. Ils ont une affinité variable pour l'AChE, et sont pris en charge par la triade catalytique comme les esters d'acides carboxyliques correspondants. Ainsi dans un premier temps, l'oxygène de l'hydroxyle de la sérine attaque l'atome de

phosphore du toxique. La formation de cette liaison est accompagnée par le départ du groupe partant porté par l'organophosphoré (Figure 12).



**Figure 12 :** Inhibition de l'AChE par les organophosphorés.

Dans un deuxième temps, la phosphorylation devient irréversible par déalkylation : c'est le phénomène de vieillissement de l'enzyme, qui d'une part n'est plus fonctionnelle et d'autre part n'est plus réactivable<sup>7</sup> (Figure 13). En effet, suivant la nature des groupes R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> présents sur le neurotoxique, si l'un est un groupe alkoyle, et si l'AChE n'est pas réactivée par déphosphorylation, l'enzyme peut subir une déalkylation avec expulsion, non pas de la sérine, mais de la chaîne alkoyle. Cette forme plus stable de l'enzyme est appelée forme vieillie. Cette réaction est très rapide dans le cas de l'AChE inhibée par le soman (t<sub>1/2</sub>=10min), moins rapide dans le cas du sarin (t<sub>1/2</sub>=10h) et n'a pas été observée pour le VX après 24h d'intoxication.<sup>8</sup>



**Figure 13 :** Inhibition irréversible de l'AChE par les NOP.

<sup>7</sup> M. Vigny, S. Bon, J. Massoulie, F. Leterrier, *Eur. J. Biochem.*, **1978**, *85*, 317-323

<sup>8</sup> a) *Organophosphates Nerve Agent Poisoning: Mechanism of Action, Diagnosis, Prophylaxis and Treatment Advances in Clinical Chemistry*; J. Bajgar, Ed.; Elsevier, **2004**; Vol. 38. b) J. Bajgar, J. Fusek, K. Kuca, L. Bartosova, D. Jun, *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2007**, *7*, 461-466.

## 2.3 Traitement des intoxications

La régénération de l'acétylcholinestérase est une voie de décontamination des personnes exposées très étudiée. Certaines molécules, appelées réactivateurs, sont en effet capables de déphosphoryler efficacement l'acétylcholinestérase inhibée par un neurotoxique organophosphoré et de régénérer ainsi l'enzyme active (Figure 14).<sup>9</sup>

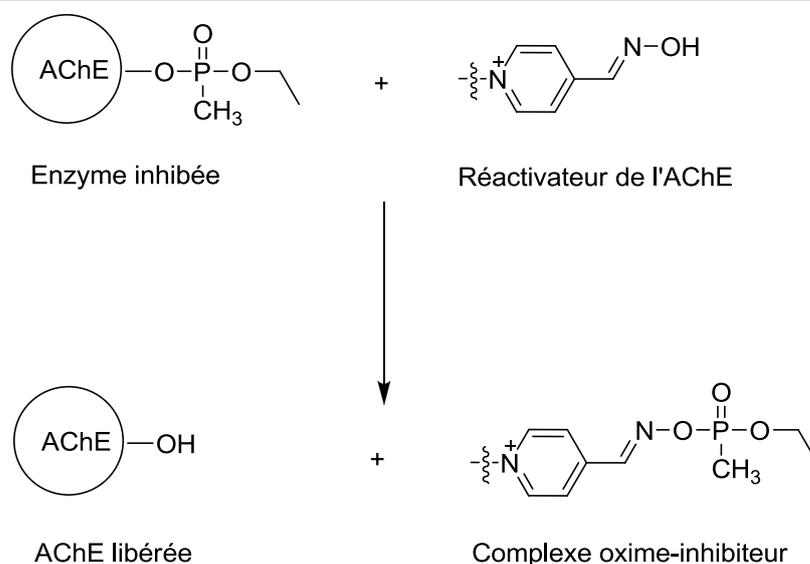


Figure 14 : Réactivation de l'AChE inhibée par le **VX**.

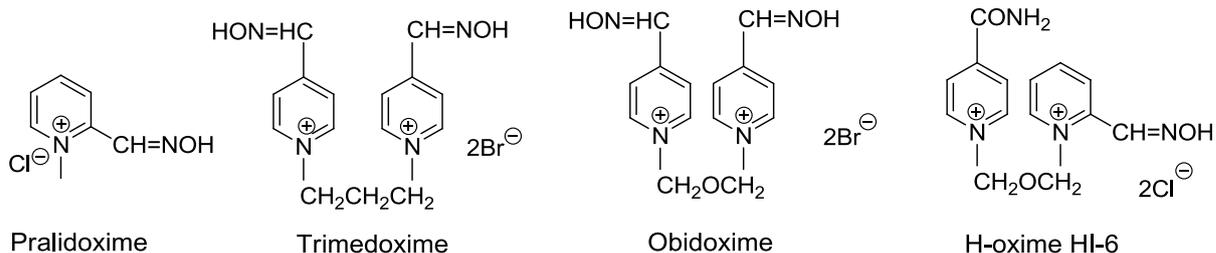
Les réactivateurs de l'AChE sont des composés très importants dans le traitement des intoxications causées par les inhibiteurs organophosphorés. Parmi ces molécules, la pralidoxime (2-PAM) fût, dans le milieu des années 50, le premier réactivateur efficace de l'AChE.<sup>10</sup> Par la suite, de nouvelles structures telles que la Trimedoxime,<sup>11</sup> l'Obidoxime et l'H-oxime HI-6 ont été élaborées<sup>12</sup> (Figure 15).

<sup>9</sup> K. Musilek, K. Kuca, D. Jun, M. Dolezal, *Cur. Org. Chem.*, **2007**, *11*, 229-238.

<sup>10</sup> I.B. Wilson, *J. Biol. Chem.*, **1951**, *190*, 111-117.

<sup>11</sup> E.J. Poziomek, B.E. Hackley, G.M. Steinberg, *J. Org. Chem.*, **1958**, *23*, 714-717.

<sup>12</sup> J. Kassa, *Clinical Toxicology*, **2002**, *40*, 803-816.



Figures 15 : Exemples de réactivateurs de l'AChE inhibée.

Depuis la découverte de ces structures à double noyaux pyridiniums, de nombreuses équipes se sont efforcées de développer des analogues de ces composés en faisant varier la longueur de la chaîne liant les deux noyaux pyridiniums ainsi que la nature et la position des substituants sur ces hétérocycles aromatiques.<sup>13</sup>

Ces réactivateurs sont actuellement utilisés pour le traitement curatif des intoxications aux organophosphorés. Ils sont fréquemment associés à l'atropine (agent anticholinergique, inhibiteur des récepteurs muscariniques) à forte dose et au diazépam (benzodiazépine anticonvulsive). En France, le sulfate de Pralidoxime est utilisé à des doses de 200 à 400 milligrammes chez l'adulte, à renouveler 30 minutes après la première injection, puis toutes les 4 à 6 heures. Les doses maximales vont de 2 à 12 grammes par 24 heures. Ces thérapies sont efficaces mais induisent de lourds effets secondaires tels que de la tachycardie, des poussées hypertensives ou encore des laryngospasmes.

## 2.4 Moyens de détection

La détection et l'identification des toxiques sont un préalable indispensable à la prise en charge des victimes, que ce soit dans un contexte militaire ou civil.

<sup>13</sup> a) T-H. Kim, K. Kuca, D. Jun, Y6S. Jung, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15, 2914-2917. b) K. Kuca, D. Jun, K. Musilek, *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2006**, 6, 269-277. c) J. Kassa, K. Kuca, L. Bartosova, G. Kunesova, *Cur. Org. Chem.*, **2007**, 11, 267-283. d) C.M. Timperlez, M. Bird, S.C. Heard, S. Notman, R.W. Read, J.E.H Tattersall, S.R. Turner, *Journal of Fluorine Chemistry*, **2005**, 126, 1160-1165.

Différentes techniques ont été mises au point ces dernières années, pour la détection rapide des composés organophosphorés.<sup>14</sup> D'une manière générale, le but de la détection est de constater l'émission ou la présence d'un agent neurotoxique, ou de ses produits de dégradation, dans un endroit donné. Ces différentes techniques peuvent être classées dans deux catégories : les méthodes analytiques et les méthodes synthétiques.

#### 2.4.1 Méthodes analytiques

Les méthodes analytiques utilisent par exemple la chromatographie en phase gazeuse (GC)<sup>15</sup>, la spectrométrie de masse,<sup>16</sup> la détection électrochimique<sup>17</sup> ou encore la spectrométrie de flamme.<sup>18</sup> Un exemple intéressant combine la micro-extraction en phase solide (SPME) à la GC<sup>19</sup> pour la détection des composés organophosphorés et de leurs produits de dégradation dans l'air, l'eau et les sols. Le principal intérêt de cette technique réside dans l'utilisation combinée des deux méthodes (SPME et GC) qui permet la détection spécifique de très faibles taux de composés toxiques (1ppb pour la détection de l'acide benzylique dans les sols et 200ppb pour le thiodiglycol, produit de dégradation du gaz moutarde). La SPME est une technique simple et rapide, décrite pour la première fois en 1990,<sup>20</sup> et qui combine l'échantillonnage, l'extraction et la concentration, en une seule étape. Cette méthode permet la préparation d'échantillons qui peuvent être directement analysés en GC et présente comme autres avantages l'absence de solvants, des temps et un coût d'analyse réduits, une régénération de la fibre pour une réutilisation immédiate et la possibilité d'analyser des composés de différentes polarités présents dans des échantillons gazeux, liquides ou solides.

---

<sup>14</sup> a) B.C. Giordano, G.E. Collins, *Cur. Org. Chem.*, **2007**, 11, 255-265. b) L.M Eubanks, T.J. Dickerson, K.D. Janda, *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, 36, 458-470.

<sup>15</sup> S. Kendler, A. Zifman, N. Gratziany, A. Zaltsman, G. Frishman, *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 548, 58-65.

<sup>16</sup> a) P. Rearden, P.B. Harrington, *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 545, 13-20. b) W.E. Steiner, W.A. English, H.H Hill, *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 532, 37-45. c) W.E. Steiner, S.J. Klopsch, W.A. English, B.H. Clowers, H.H. Hill, *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 4792-4799. d) Y.R. Shu, A.K. Su, J.T. Liu, C.H. Lin, *Anal. Chem.*, **2006**, 78, 4697-4701.

<sup>17</sup> a) R.P. Deo, J. Wang, I. Block, A. Mulchandani, K.A. Joshi, M. Trojanowicz, F. Scholz, W. Chen, Y. Lin, *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 530, 185-189. b) G. Liu, S.L. Riechers, M.C. Mellen, Y. Lin, *Electrochem. Comm.*, **2005**, 7, 1163-1169.

<sup>18</sup> D. Richardson, J. Caruso, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, 389, 679-682.

<sup>19</sup> B. Zygmunt, A. Zaborowska, J. Swiatlowska, J. Namiesnik, *Cur. Org. Chem.*, **2007**, 11, 241-253.

<sup>20</sup> C.L. Arthur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, **1990**, 62, 2145-2148.

Dans le cas du **VX**, la limite de détection décrite<sup>21</sup> pour des échantillons aqueux est de 0,5 µg/L.

## 2.4.2 Méthodes synthétiques

Parallèlement à ces méthodes analytiques d'autres techniques, dites synthétiques,<sup>9</sup> ont été mises au point pour la détection des toxiques organophosphorés. Elles ont l'avantage de ne pas nécessiter d'instrumentation lourde, et même si elles demandent une conception et une mise au point beaucoup plus complexes, elles sont utilisables facilement, y compris sur le terrain. Ces méthodes incluent l'utilisation de polymères imprimés<sup>22</sup> pour l'absorption sélective, l'adaptation de tests enzymatiques<sup>23</sup> combinés à la colorimétrie, la fluorescence ou l'électrochimie, ou encore la dérivatisation chimique des agents nerveux en espèces facilement détectables par fluorométrie<sup>24</sup> ou colorimétrie.<sup>25</sup>

L'utilisation de réaction enzymatique repose généralement sur la mesure de l'inhibition de l'activité enzymatique de l'AChE à la suite d'une exposition aux toxiques.<sup>26</sup> L'activité de l'AChE est classiquement mesurée grâce à l'utilisation du réactif d'Ellman développé à la fin des années 50<sup>27</sup> (Figure 16).

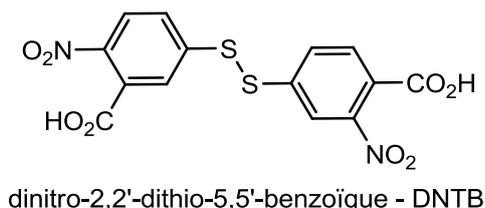


Figure 16 : Réactif d'Ellman.

<sup>21</sup> H.A. Lakso, W.F. Ng, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 1866-1872.

<sup>22</sup> a) A.L. Jenkins, O.M. Uy, G.M. Murray, *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 373-378. b) K.P. Prathish, K. Prasad, T. Parasada Rao, M.V.S Suryanarayana, *Talanta*, **2007**, 71, 1976-1980. c) J.L. Urraca, M.C. Morendo-Bondi, G. Orellana, B. Sellergren, A.J. Hall, *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 4915-4923.

<sup>23</sup> S. Lin, Z. Xu, J. Chen, X. Liang, Y. Wu, X. Qian, *Anal. Chim. Acta.*, **2004**, 523, 117-123.

<sup>24</sup> K.J. Wallace, R.I. Fagbemi, F.J. Folmer-Andersen, J. Morey, V.M. Lynch, E.V. Anslyn, *Chem. Comm.*, **2006**, 3886-3888.

<sup>25</sup> K.J. Wallace, M. Morey, V.M. Lynch, E.V. Anslyn, *New J. Chem.*, **2005**, 29, 1469-1474.

<sup>26</sup> F. Worek, M. Koller, H. Thiermann, L. Szinicz, *Toxicology*, **2005**, 214, 182-189.

<sup>27</sup> G.L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1959**, 82, 70-77.

Plusieurs groupes se sont attachés au développement de tests enzymatiques similaires de façon à améliorer les limites de détection. Mioskowski et coll.<sup>28</sup> ont synthétisé un nouveau substrat chemiluminescent améliorant de 10 fois la sensibilité de détection de l'activité de l'AChE (Figure 17).

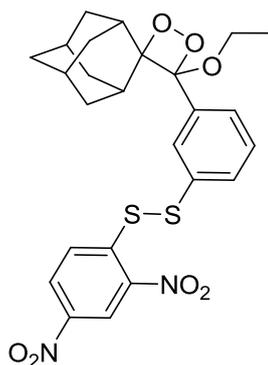


Figure 17 : Substrat chemiluminescent permettant la détection de l'activité de l'AChE.

Il est alors possible qu'un test de ce type puisse être appliqué à la détection d'inhibiteur de l'AChE incluant ainsi les agents neurotoxiques.

Mais l'utilisation d'enzymes pour la détection des neurotoxiques organophosphorés n'est pas limitée à la seule utilisation de l'AChE. D'autres enzymes incluant les OrganoPhosphorus Hydrolase (OPH) ont été utilisées pour la mise au point de tests de détection du Diisopropyl Fluorophosphate (DFP), analogue du sarin.<sup>29</sup> L'enzyme OPH est immobilisée sur gel de silice et exposée au DFP. Le toxique hydrolysé libère l'ion fluorure, qui peut être détecté par une électrode sélective. La même stratégie a été utilisée en remplaçant l'enzyme OPH par l'enzyme OrganoPhosphorus Acid Anhydrolase (OPAA) qui présente l'avantage d'hydrolyser sélectivement la liaison P-F du sarin.<sup>30</sup>

<sup>28</sup> S. Sabelle, P-Y. Renard, K. Pecorella, S. de Suzzoni-Dezard, C. Creminon, J. Grassi, C. Mioskowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 4874-4880.

<sup>29</sup> L. Viveros, S. Paliwal, D. McCrae, J. Wild, A. Simonian, *Sensors and Actuators*, **2006**, B115, 150-157.

<sup>30</sup> A.L. Simonian, J.K. Grimsley, A.W. Flounders, J.S. Schoeniger, T.C. Cheng, J.J DeFrank, J.R. Wild, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 442, 15-23.

## 2.5 Moyens de décontamination

La décontamination du matériel militaire et des surfaces peut être réalisée soit par des méthodes physiques dites « non-réactives » soit par des méthodes « réactives », lesquelles peuvent être chimiques ou biologiques. Dans tous les cas, lors d'une contamination il faut limiter au maximum les risques de transfert.

### 2.5.1 Décontamination physique

Elle regroupe tous les méthodes non-réactives telles que la dissolution, l'évaporation et l'adsorption. Il existe notamment des gants poudreux qui, sur une face, utilisent de la terre de Foulon pour adsorber les toxiques, l'autre face servant à l'élimination des agglomérats.

### 2.5.2 Décontamination chimique<sup>31</sup>

La nécessité de trouver des moyens de décontamination est apparue durant la première guerre mondiale lorsque les troupes allemandes utilisèrent le gaz moutarde sur les troupes des Alliés à Ypres en France. Ainsi, le premier décontaminant utilisé fût l'hypochlorite de sodium sous forme de poudre ou de solution (eau de javel) qui permet la dégradation de l'agent chimique en composés moins toxiques voire non toxiques. Des décontaminants plus puissants à base d'hypochlorite de calcium furent aussi utilisés, pourtant leur utilisation présente des désavantages tels que la grande quantité d'eau de javel nécessaire à l'oxydation des agents, la nécessité d'utiliser des solutions fraîchement préparées afin de garantir le taux en chlore actif, les propriétés corrosives et l'inefficacité par temps froid des solutions d'eau de javel.

Avec l'arrivée des NOP, la recherche de nouveaux moyens de décontamination s'est faite de plus en plus pressante. Il est rapidement apparu que les agents **G** étaient facilement et efficacement hydrolysables en milieu alcalin ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaOH}$  ou  $\text{KOH}$ ).

---

<sup>31</sup> a) Y.C Yang, *Acc. Chem. Res.*, **1999**, 32, 109-115. b) Y.C. Yang, J.A. Baker, J.R. Ward, *Chem. Rev.*, **1992**, 92, 1729-1743.

Le **VX** est le composé neurotoxique le plus difficile à détruire. Contrairement aux agents **G**, une hydrolyse efficace du **VX** requiert des conditions acides, ou du moins proches de la neutralité. En effet, à pH élevé, la solubilité du **VX** en milieu aqueux est réduite de manière significative et la réaction d'hydrolyse se fait lentement ( $t_{1/2} = 31$  min en solution 0,1N NaOH à 22°C ;  $k_{OH}(\mathbf{VX}) = 10^{-3}k_{OH}$  (Sarin)).<sup>25</sup> De plus, son hydrolyse en composés non toxiques dépend de la rupture sélective de la liaison P-S, ce qui n'est pas envisageable en milieu basique à température ambiante. En effet, celle-ci n'est pas sélective et jusqu'à 22% d'hydrolyse peut se faire au niveau de la liaison P-O conduisant à la formation d'un composé phosphonothioate tout aussi toxique que le **VX** (Figure 18).

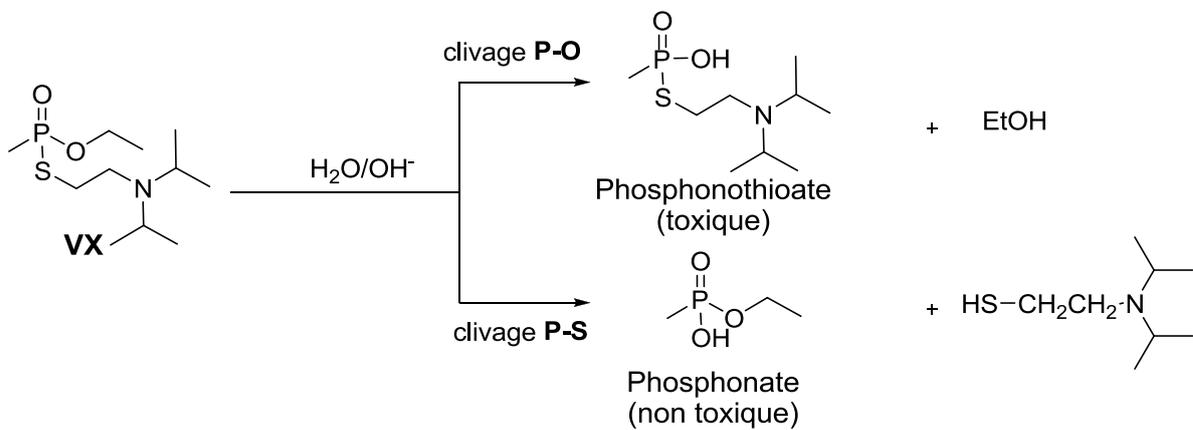


Figure 18 : Dégradation non sélective du **VX** par hydrolyse basique.

La détoxification du **VX** peut se faire par l'utilisation d'une grande quantité d'eau de javel (20 moles de chlore actif par mole de **VX**), l'hydrolyse intervient rapidement *via* la protonation de l'amine tertiaire puis l'hydrolyse oxydante de la liaison P-S (Figure 19). Mais comme nous l'avons vu précédemment, cette méthode présente quelques inconvénients.

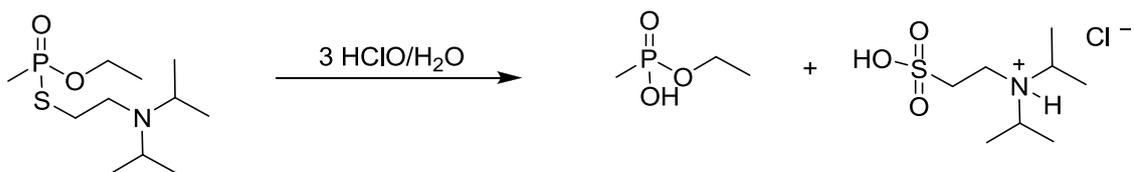


Figure 19 : Hydrolyse du **VX** en présence d'ions hypochlorite.

En 1960, un nouveau décontaminant fût adopté : la solution « DS2 ». Cette solution prête à l'emploi et à longue durée de conservation est stable de -26°C à 52°C. Il s'agit d'une solution polaire non aqueuse composée de 70% de diéthylènetriamine, 28% d'éther monoéthylique de l'éthylène glycol ( $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ) et de 2% de soude, l'espèce réactive étant la base 2-méthoxy éthanoate. Bien que cette solution soit un décontaminant très efficace et non-corrosif vis-à-vis de la plupart des métaux, elle dégrade certains types de matériaux comme les peintures, le plastique, le caoutchouc et le cuir. De plus elle se révèle corrosive pour la peau et présente des risques tératogènes. Sa manipulation nécessite donc un équipement adapté.

Des kits de décontamination pour la peau furent également produits. Ils consistent pour le **VX** en une serviette imprégnée de chloramine-B puis humidifiée avec une solution contenant 5% de  $\text{ZnCl}_2$ , 45% d'éthanol et 50% d'eau. Le chlorure de zinc permet de maintenir le pH de la solution entre 5 et 6 tandis que la chloramine-B réagit avec le **VX** (Figure 20).

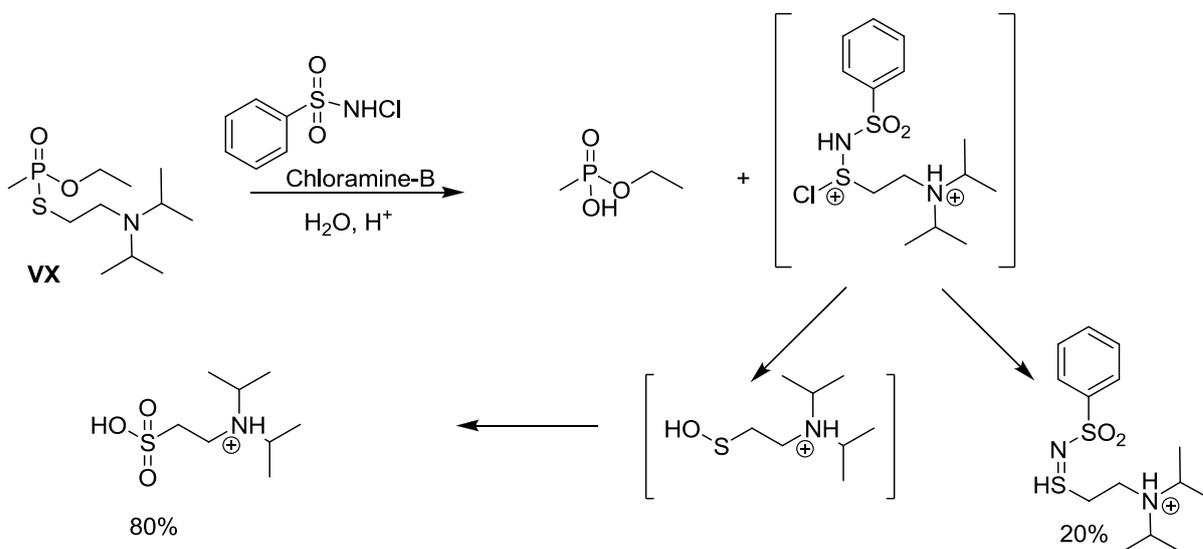


Figure 20 : Hydrolyse du **VX** en conditions acides en présence de Chloramine-B.

L'hydrolyse du **VX** par perhydrolyse<sup>32</sup> a également été largement étudiée. Le **VX** peut rapidement être détruit par substitution nucléophile sur le phosphore de l'ion peroxy ( $\text{HO}_2^-$ ) qui joue ici le rôle de nucléophile alpha ( $t_{1/2} = 42\text{s}$  en milieu 0,1N

<sup>32</sup> Y.C. Yang, L.L. Szafraniec, W.T. Beaudry, C.A. Bunton, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 6964-6965.

NaOH et 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et de façon entièrement sélective vis-à-vis de la liaison P-S. Ainsi, un procédé de vaporisation de peroxyde d'hydrogène (VHP) a été développé, la vapeur étant générée à partir d'une solution concentrée en peroxyde (≥ 30%). Cette technologie est actuellement en cours d'expérimentation.<sup>33</sup>

D'autres espèces chimiques ont également été décrites pour la dégradation du VX : des oxydants (N,N-dichloroisocyanurate de sodium (Fichlor)),<sup>34</sup> des peroxyacides (oxone,<sup>35</sup> acides *mé*ta-chloroperbenzoïque (mCPBA)<sup>36</sup> et MMPP (magnésium monoperoxyphthalate)<sup>37</sup> ou des α-nucléophiles tels que les oximes,<sup>38</sup> Parmi les travaux récents sur l'hydrolyse des neurotoxiques organophosphorés, Kuo et coll.<sup>39</sup> ont présenté le premier réactif organométallique pour l'hydrolyse sélective de la liaison P-S (agent V) en conditions douces. Une autre étude a montré l'efficacité de sels de fluorure supportés sur des poudres d'oxyde d'alumine.<sup>40</sup> Une dernière approche fait état de l'utilisation de polymères réactifs de type polyacryloximate et polyacrylamidoximate permettant l'hydrolyse d'agents chimiques de guerre.<sup>41</sup>

Les hypochlorites restent les décontaminants les plus efficaces, même si leur utilisation sur les matériels s'accompagne de taux de corrosion important. Pour le moment aucune des méthodes de décontamination chimique n'est pleinement satisfaisante.

<sup>33</sup> G.W. Wagner, D.C. Sorrick, L.R. Procell, M.D. Brickhouse, I.F. McVey, L.I. Schwartz, *Langmuir*, **2007**, 23, 1178-1186.

<sup>34</sup> a) Y.C. Yang, J.A. Baker, J.R. Ward, *Chem. Rev.*, **1992**, 92, 1729-1743. b) S.S Talmage, A.P. Watson, V. Hauschild, N.B. Munro, J. King, *Curr. Org. Chem.*, **2007**, 11, 285-298.

<sup>35</sup> Y.C. Yang, F.J. Berg, L.L. Szafraniec, W.T. Beaudry, C.A. Bunton, A. Kumar, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1997**, 607-613.

<sup>36</sup> Y.C. Yang, L.L. Szafraniec, W.T. Beaudry, D.K. Rohrbaugh, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 6621-6627.

<sup>37</sup> T. Cassagne, H-J. Cristau, G. Delmas, M. Desgranges, C. Lion, G. Magnaud, E. Torreilles, D ; Virieux, *Heteroatom Chemistry*, **2001**, 12, 485-490.

<sup>38</sup> a) J. Epstein, J.J. Kaminski, N. Bodor, R. Enever, J. Sowa, T. Higuchi, *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 2816-2821. b) G. Beker, A. Kawan, D. Gutzeit, F. Worek, L. Szinicz, *Archives of Toxicology*, **2007**, 81, 415-420.

<sup>39</sup> L.Y. Kuo, T.T. Adint, A.E. Akagi, L. Zakharov, *Organometallics*, **2008**, 2560-2564.

<sup>40</sup> E. Gershonov, I. Columbus, Y. Zafrani, *J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 329-338.

<sup>41</sup> L. Bromberg, H. Schreuder-Gibson, W.R. Creasy, D.J. McGarvey, R.A. Fry, T.A. Hatton, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2009**, 48, 1650-1659.

### 2.5.3 Décontamination biologique

La décontamination biologique est basée sur l'utilisation de récepteurs biologiques (enzymes, anticorps) et constitue une méthode de décontamination plus douce que la décontamination chimique et potentiellement compatible avec une application *in vivo*. Si de nombreuses enzymes hydrolysent les monoesters ou diesters phosphoriques, type de substrats naturellement présents *in vivo*, ce n'est le cas ni des triesters, ni des phosphonates. Pour trouver de tels épurateurs utilisables *in vivo*, il faut soit être capable de cribler une large population de candidats et de conditions d'hydrolyse, soit disposer de moyens efficaces de mutagenèse, dirigée ou non, d'enzymes existantes.

#### 2.5.3.1 Les OPA et OPH (Organophosphorus Acid Anhydrases et Hydrolases)

En 1946, Mazur<sup>42</sup> a démontré la capacité de certaines enzymes à catalyser l'hydrolyse de triesters organophosphorés. Par la suite, de très nombreuses enzymes telles que les somanases, les tabunases, les sarinases, les paraoxonases, ont été découvertes (dans les tissus des mammifères, des crustacés et dans des bactéries), étudiées et rassemblées sous le nom générique d'OPA ou OPH.<sup>43</sup> Au début des années 70, la découverte de bactéries capables de se développer sur les milieux à forte concentration en pesticide tels que le diazinon, l'isophenos et la parathion a suscité un engouement pour les enzymes microbiennes telles que l'hydrolase du parathion capable de dégrader certains organophosphorés toxiques.<sup>44</sup> Une enzyme phosphotriestérase (PTE) identique a été trouvée dans les espèces *Pseudomonas diminutia* et *Flavobacterium*. Le gène codant pour l'hydrolase de parathion a été cloné et le mécanisme de la réaction déterminé<sup>45</sup> (Figure 21).

---

<sup>42</sup> A. Mazur, *J. Bio. Chem*, **1946**, 164, 271-289.

<sup>43</sup> Z. Prokop, F. Oplustil, J. DeFrank, J. Damborsky, *Biotechnology Journal*, **2006**, 1, 1370-1380.

<sup>44</sup> K.D. Racke, J.R. Coats, *J. Agric. Food Chem*, **1987**, 35, 94-99.

<sup>45</sup> S.D. Aubert, Y. Li, F.M. Raushel, *Biochemistry*, **2004**, 43, 5707-5715.

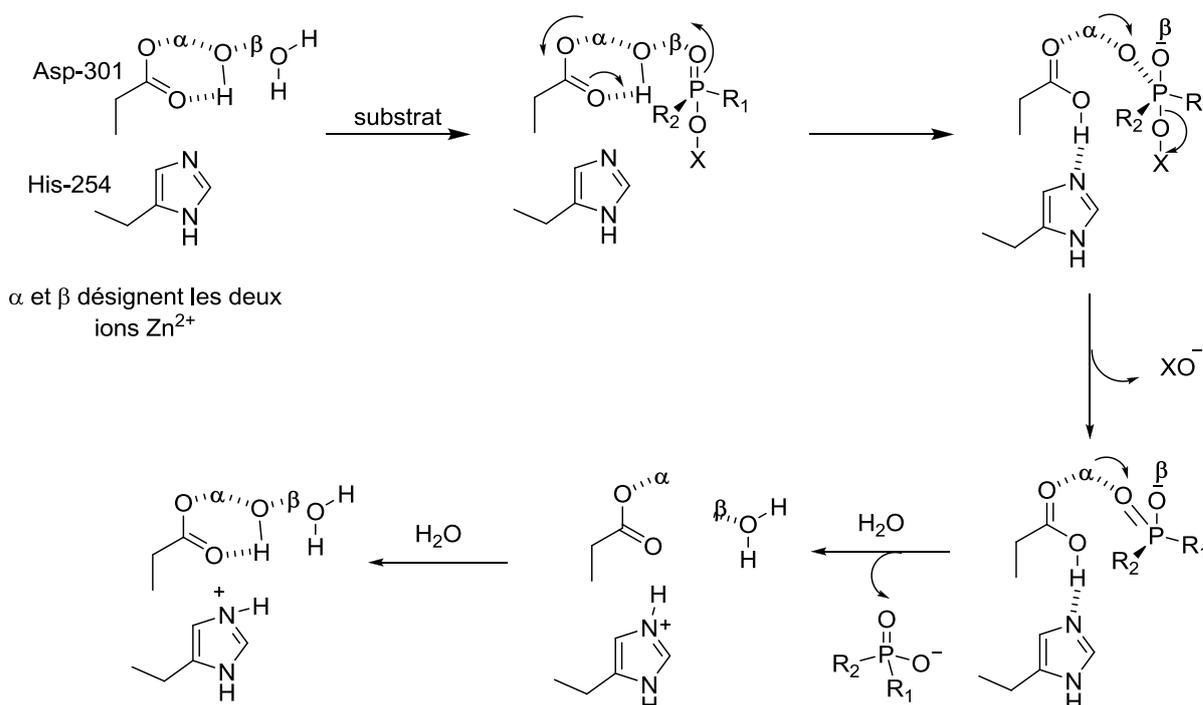


Figure 21 : Mécanisme d'hydrolyse d'un organophosphoré par une enzyme PTE.

D'une manière générale, ces études montrent que l'enzyme est capable de catalyser la dégradation d'un grand nombre de pesticides organophosphorés,<sup>46</sup> bien qu'elle soit moins efficace vis-à-vis des agents neurotoxiques.<sup>47</sup> La dégradation du **VX** par des bactéries a fait l'objet d'un dépôt de brevet par une équipe française de la DGA, sans que l'enzyme responsable n'ait été isolée.<sup>48</sup> Si ces enzymes apparaissent comme étant de très bons candidats pour la décontamination *ex vivo* des pesticides organophosphorés, leur utilisation est limitée puisque l'enzyme se dénature rapidement et perd toute activité après quelques heures. C'est pourquoi l'immobilisation de ces enzymes sur des supports solides est apparue comme une solution intéressante pour prolonger l'activité enzymatique de ces organophosphatases. A cet effet, des matériaux biocatalytiques ont été récemment développés en immobilisant l'enzyme phosphotriestérase issue de la bactérie *Pseudomonas diminuta* via la formation de

<sup>46</sup> J.D.P. Dumas, S.R. Caldwell, J.R. Wild, F.M. Raushel, *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 19659-19665.

<sup>47</sup> .E. Kolakowski, J.J. Defrank, S.O. Harvey, L.L. Szafraniec, W.T. Beaudry, K. Lai, J.R. Wild, *Biocatalysis and Biotransformation*, **1997**, 15, 297-312

<sup>48</sup> L. Debordes, S. Bezeau, D. Charpagne, L. Coppet, H. Garrigue, P. Silvestre, DGA France, Fr 2740347, **1997**.

polymère nanocomposites protéine-silicone.<sup>49</sup> Les matériaux résultants, très stables et très actifs, permettent une dégradation efficace des organophosphorés toxiques tels que le paraoxon, le dichlovos et le diisopropylfluorophosphate sous forme de gaz ou de liquide. Cette méthode pourra permettre de concevoir à terme des équipements de protection vestimentaires « actifs », ou des catalyseurs à grande échelle utilisés pour la destruction massive de grands volumes de NOP. Plusieurs autres méthodes d'immobilisation d'enzymes OPA ou OPH ont été développées. Ainsi, l'équipe de Singh<sup>50</sup> a mis au point une méthode permettant d'accrocher des enzymes OPH sur des tissus par adsorption électrostatique (PEMs pour polyelectrolyte multilayers) pour la décontamination du méthyl parathion. Cette méthode est particulièrement efficace pour l'encapsulation non covalente d'enzymes tout en conservant sa fonction catalytique et sa stabilité. Enfin d'autres formulations<sup>51</sup> d'OPA ont été testés tels que des mousses,<sup>52</sup> des sprays, des détergents, du coton.<sup>53</sup> D'une manière générale, de bonnes stabilités et de bonnes activités sont obtenues. Reste à disposer d'une enzyme capable de cibler avec autant d'efficacité tous les organophosphorés toxiques, ou d'un jeu d'enzymes complémentaires.

### 2.5.3.2 Les cholinestérases

Une autre stratégie consiste à utiliser les cholinestérases, bons récepteurs des organophosphorés toxiques, comme moyen de décontamination biologique, à condition qu'une méthode de déphosphorylation de l'enzyme avant vieillissement soit mise en place.

---

<sup>49</sup> I. Gill, A. Ballestros, *Biotech. & Bioeng.*, **2000**, 70, 400-410.

<sup>50</sup> a) A. Singh, Y. Lee, W.J. Dressick, *Advanced materials*, **2004**, 16, 2112-2115. b) Y. Lee, I. Stanish, V. Rastogi, T-C. Cheng, A. Singh, *Langmuir*, **2003**, 1330-1336.

<sup>51</sup> T-C. Cheng, J.J. De Frank, *Proceedings of Chemical and Biological Medical treatment Symposium*, **2001**, May 7-12.

<sup>52</sup> K.E. LeJeune, A.J. Russell, *Biotech. & Bioeng.*, **1999**, 659-665.

<sup>53</sup> A.A. Wang, W. Chen, A. Mulchandani, *Biotech. & Bioeng.*, **2005**, 91, 379-386.

- **Les cholinestérases immobilisantes**

Cette stratégie de protection consiste en l'utilisation de cholinestérases additionnelles pour immobiliser stœchiométriquement les NOP<sup>54</sup> ; l'enzyme ajoutée est alors irréversiblement phosphorylée. La butyrylcholinestérase humaine (HuBuChE) est apparue comme un antidote prometteur puisqu'elle a démontré un effet protecteur contre le sarin, le soman, le tabun et le **VX** chez la souris<sup>55</sup> et contre le soman et le **VX** chez le singe.<sup>56</sup> Toutefois cette approche peut être qualifiée de passive car elle ne tire pas profit des activités catalytiques dont sont capables les enzymes.

- **Les cholinestérases catalytiques**

Une approche plus prometteuse consiste à modifier par ingénierie moléculaire des cholinestérases afin qu'elles soient capables d'hydrolyser les organophosphorés toxiques et non plus simplement de les immobiliser. Lors d'une première étude, la mutagenèse dirigée a permis de substituer une glycine par une histidine dans le site catalytique de la HuBuChE.<sup>57</sup> Le mutant obtenu catalyse l'hydrolyse de plusieurs organophosphorés dont le sarin et le **VX**, mais il demeure inhibé irréversiblement par le soman. Un deuxième mutant a été décrit qui catalyse l'hydrolyse du soman tout en conservant une activité cholinestérasique.<sup>58</sup> Cependant, le développement et la production en grande quantité de ces enzymes modifiées sont des processus coûteux et longs. De plus leur stabilité est faible et leur durée de vie dans l'organisme est réduite car ces protéines sont reconnues comme élément du non soi, elles sont donc rapidement détruites par le système immunitaire. Les méthodes modernes de production en grande quantité d'enzymes modifiées par génie génétique permettent toutefois d'ouvrir des

---

<sup>54</sup> a) L. Raveh, Y. Ashani, D. Levy, D. De la Hoz, A.D. Wolfe, B.P. Doctor, *Biochem. Pharmacol.*, **1989**, *38*, 529-534. b) Y. Ashanti, S. Shapira, D. Levy, A.D. Wolfe, B.P. Doctor, L. Raveh, *Biochem. Pharmacol.*, **1991**, *41*, 37-41. c) B.P. Doctor, L. Raveh, A.D. Wolfe, D.M. Maxwell, Y. Ashani, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **1991**, *15*, 123-128.

<sup>55</sup> L. Raveh, J. Grunwald, D. Marcus, Y. Papier, E. Cohen, Y. Ashani, *Biochem. Pharmacol.*, **1993**, *45*, 2465-2474.

<sup>56</sup> L. Raveh, E. Grauer, J. Grunwald, E. Cohen, Y. Ashani, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **1997**, *145*, 43-53.

<sup>57</sup> C.B. Millard, O. Lockridge, C.A. Broomfield, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 15925-15933.

<sup>58</sup> C.B. Millard, O. Lockridge, C.A. Broomfield, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 237-247.

perspectives intéressantes pour la neutralisation *ex vivo* des neurotoxiques organophosphorés, en particulier *via* l'immobilisation sur support solide de ces enzymes. Ainsi, l'équipe de Gordon<sup>59</sup> a breveté une éponge et une mousse utilisant diverses enzymes (AChE, BuChE mais également OPH) immobilisées sur un support polymérique polyuréthane poreux.

### 2.5.3.3 Les anticorps

L'utilisation d'anticorps apparaît comme une alternative intéressante soit par vaccination (l'organisme produit ses propres anticorps), soit par sérothérapie (injection de sérum contenant les anticorps). Dans le cas de la sérothérapie, il est possible de produire de grandes quantités d'anticorps (polyclonaux ou monoclonaux) et les techniques d'humanisation de ces derniers leur assurent une durée de vie raisonnable dans l'organisme, soit trois semaines environ dans le plasma.<sup>60</sup>

- **Les anticorps immobilisants**

Plusieurs équipes se sont intéressées au potentiel des anticorps immobilisants pour neutraliser les substances toxiques de l'organisme.

Ainsi, l'équipe de Lenz<sup>61</sup> a sélectionné un anticorps monoclonal spécifique du soman ; les auteurs ont montré que cet anticorps est un compétiteur de l'AChE pour le soman *in vitro*. Cependant, les études *in vivo* sur des souris n'ont pas mis en évidence la survie des sujets (seul le temps de survie entre l'injection de DL<sub>90</sub> de soman et la mort est doublé).

De même une équipe du CEA<sup>62</sup> a étudié, *in vivo*, l'effet protecteur d'anticorps polyclonaux anti-VX après administration à des souris. Malgré une bonne affinité de ces anticorps pour le VX (de l'ordre de 10<sup>-9</sup> M), les auteurs ont abouti au même constat d'échec. Toutefois des calculs théoriques, basés sur la loi d'action de

---

<sup>59</sup> R.K. Gordon, B.P. doctor, PCT Int. Appl., USA, 2000064957, **2000**.

<sup>60</sup> a) G.A. Leget, M.S. Czuczman, *Curr. Op. Oncol.*, **1998**, *10*, 548-551. b) P.J. Hudson, C. Souriau, *Nat. Med.*, **2003**, *9*, 129-134.

<sup>61</sup> D.E. Lenz, A.A. Brimfield, K.W. Hunter, H.P. Benschop, L.P.A. de Jong, C. van Dijk, T.R. Clow, *Fund. Appl. Toxicol.*, **1984**, *4*, S156-S164.

<sup>62</sup> J.M. Grognet, T. Ardouin, M. Istin, A. Vandais, J.P. Noel, G. Rima, J. Satge, C. Pradel, H. Sentenac-Roumanou, C. Lion, *Archives of Toxicology*, **1993**, *67*, 66-71.

masse, montrent qu'un effet de protection durable de l'AChE peut être obtenu par des affinités allant de  $10^{-9}$  à  $10^{-11}$  M, mais en présence d'un large excès d'anticorps par rapport à la concentration du **VX**, excès qui n'était pas atteint avec les anticorps polyclonaux utilisés.

Une équipe chinoise a également publié la production d'un anticorps monoclonal spécifique du **VX** dont l'injection massive à des souris a permis de démontrer un effet protecteur *in vivo*.<sup>63</sup> Pour obtenir ce résultat, compte tenu de l'affinité moyenne des anticorps pour le **VX** (de l'ordre de  $10^{-5}$  M), les auteurs ont dû administrer des quantités très fortes d'anticorps, avec le risque léthal (choc anaphylactique) que cela implique.

Cette approche, basée sur les anticorps immobilisants a montré son efficacité mais également ses limites, la quantité d'anticorps circulants ou à introduire par sérothérapie devant être au moins équivalente à la quantité d'organophosphorés pour qu'une activité notable soit détectée.

- **Les anticorps catalytiques**

Certains anticorps, cependant, ont non seulement la capacité de neutraliser une substance étrangère, mais également la particularité de catalyser sa dégradation : ce sont les anticorps catalytiques. Depuis les travaux pionniers de P.G. Schultz<sup>64</sup> et R.A. Lerner,<sup>65</sup> montrant qu'il est possible de sélectionner, dans le vaste répertoire immunitaire, un anticorps capable de catalyser une réaction donnée, ces biocatalyseurs ont montré leur intérêt dans le domaine de la synthèse organique. Ils présentent également un potentiel thérapeutique important. Quelques exemples d'anticorps catalytiques appliqués à la dégradation des neurotoxiques organophosphorés ont été présentés dans la littérature en vue d'une application thérapeutique potentielle. Différentes approches ont été envisagées, telles que le « *bait and switch* »,<sup>66</sup> l'analogue de l'état de transition<sup>67</sup> et pseudo-état de transition<sup>68</sup> et l'utilisation d'un cofacteur métallique.<sup>69</sup>

---

<sup>63</sup> Y-X. Ci, Y-X. Zhou, Z-Q. Guo, K-T. Rong, W-B. Chang, *Archives of Toxicology*, **1995**, 69, 565-567.

<sup>64</sup> S.J. Pollack, J.W. Jacobs, P.G. Schultz, *Science*, **1986**, 234, 1570-1573.

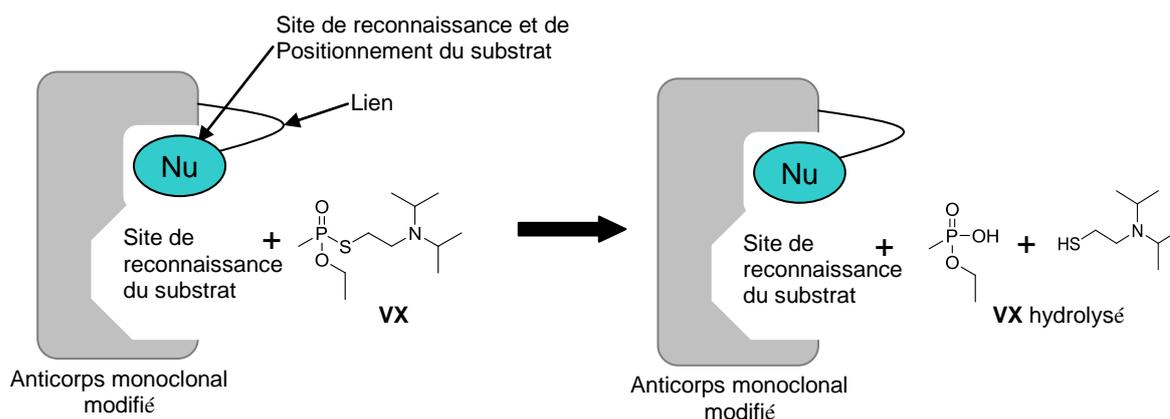
<sup>65</sup> A. Tramontano, K.D. Janda, R.A. Lerner, *Science*, **1986**, 234, 1566-1570.

<sup>66</sup> a) J.S. Rosenbum, L-C. Lo, T. Li, K.D. Janda, R.A. Lerner, *Ang. Chem. Int. Ed.*, **1995**, 34, 2275-2277. b) B.J. Lavey, K.D. Janda, *Bioorg. Chem. Lett.*, **1996**, 6, 1523-1524. c) B.J. Lavey, K.D. Janda, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 7633-7636.

Plus tard, Vayron et *coll.* se sont intéressés à la dégradation du **VX** et de son analogue aromatique le **PhX**, par les anticorps catalytiques<sup>70</sup> en utilisant l'approche de l'analogue de l'état de transition.<sup>71</sup> Ils ont ainsi décrit le premier anticorps catalytique pour l'hydrolyse des agents **V**.<sup>72</sup> Cette activité catalytique notable reste cependant insuffisante pour envisager une application *in vivo*.

Récemment l'équipe du Professeur P.Y. Renard a développé une nouvelle stratégie d'ingénierie immunocontrôlée d'anticorps pour la dégradation du **PhX**.<sup>73</sup>

Le principe de cette approche consiste à sélectionner dans un premier temps les anticorps les plus affins pour le substrat choisi, et dans un second temps à modifier chimiquement ces anticorps monoclonaux en introduisant de façon covalente, à proximité du site de reconnaissance du substrat, une fonction réactive capable d'assurer la catalyse (Figure 22).



**Figure 22 :** Stratégie d'ingénierie immunocontrôlée d'anticorps pour la dégradation du **VX**.

<sup>67</sup> a) R.M. Moriarty, J. Hiratake, K. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 8575-8577. b) J. Yli-Kauhaluoma, T. Humpi, A. Yliniemela, *Acta Chem. Scand.*, **1999**, 473-479.

<sup>68</sup> R.F. Yang, L-H. Yun, Z-L. Wang, K-T. Rong, *Bull. Acad. Mil. Med. Sci*, **2000**, *24*, 105-109.

<sup>69</sup> J.J. Brandt, Patent, USA, 2003087435, **2003**.

<sup>70</sup> P. Vayron, *Application des anticorps catalytiques à la dégradation des organophosphorés toxiques*, Thèse de doctorat de l'Université de Paris XI Orsay, **1999**.

<sup>71</sup> P-Y. Renard, P. Vayron, F. Taran, C. Mioskowski, *Tet. Lett.*, **1999**, *40*, 281-284.

<sup>72</sup> P. Vayron, P-Y. Renard, F. Taran, C. Creminon, Y. Frobert, J. Grassi, C. Mioskowski, *PNAS*, **2000**, *97*, 7058-7063.

<sup>73</sup> a) F. Jovic, *Ingénierie chimique immunocontrôlée des anticorps : une nouvelle méthode pour la dégradation des neurotoxiques organophosphorés*, Thèse de doctorat de l'université de Paris XI Orsay, **2003**. b) F. Jovic, L. Louise, C. Mioskowski, P-Y. Renard, *Tet. Lett.*, **2005**, *46*, 6809-6814. c) L.; Louise-Leriché, *Ingénierie chimique immunocontrôlée des anticorps : application à la dégradation des neurotoxiques organophosphorés*, Thèse de doctorat de l'université de Rouen, **2007**.

Cette nouvelle approche n'a, pour l'instant, pas permis d'obtenir une activité catalytique probante des anticorps monoclonaux modifiés.

Par analogie aux systèmes biologiques qui possèdent une très grande affinité avec leur substrat (enzymes, anticorps), une technique est actuellement de plus en plus utilisée pour le développement de récepteurs macromoléculaires artificiels : l'impression moléculaire de polymères synthétiques

### 3 CONCLUSION

Malgré les traités internationaux qui proscrivent l'utilisation des agents de guerre chimiques, l'analogie de leur structure avec les réactifs de départ utilisés pour la synthèse de pesticides, rend le contrôle des matières premières permettant la production de ces composés très difficile à gérer. Ces difficultés ont été illustrées par des événements de l'actualité internationale : problèmes rencontrés par les experts de l'ONU en Irak ou encore utilisation du sarin lors d'un attentat dans le métro japonais en 1994 et 1995. Des problèmes se posent également quant à la destruction des stocks, détenus notamment par les Etats-Unis et la Russie, dans le cadre de la CAC.

Il apparaît donc important de disposer de techniques de détection rapides et fiables de ces composés neurotoxiques mais aussi de moyens de les détruire, aussi bien *in vitro* pour la décontamination des surfaces et du matériel, qu'*in vivo* dans un but thérapeutique.

La recherche de nouveaux moyens biocatalytiques d'hydrolyse de ces composés reste donc une priorité. Les nouvelles technologies se doivent d'être saines pour l'environnement et les enzymes apparaissent, pour l'instant, comme le meilleur choix alliant sécurité et efficacité. Pourtant leur faible stabilité dans le temps et leur important coût de production limitent leurs utilisations.

Une technologie prometteuse dans le domaine de la reconnaissance moléculaire est l'impression moléculaire de polymères synthétiques.<sup>74</sup> Leur utilisation comme « biomimes » d'enzymes pour des applications en catalyse est

---

<sup>74</sup> K. Haupt, *Chem. Comm.*, **2003**, 171-178.

largement étudiée, pourtant peu d'exemples d'hydrolyse de neurotoxiques organophosphorés sont décrits dans la littérature et aucun exemple sur l'hydrolyse catalytique du **VX** n'existe.

Dans le cadre de nos recherches, nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à la décontamination des organophosphorés de la famille des agents **V**. En effet, le **VX**, est le plus toxique, le plus persistant et le plus difficile à dégrader des neurotoxiques de guerre. Son analogue aromatique, le **PhX**, moins toxique, sera utilisé pour l'ensemble de nos travaux, pour des raisons de sécurité et de législation.

Dans le but de découvrir et de mettre au point de nouveaux moyens de décontamination des organophosphorés toxiques, nous avons en parallèle effectué nos travaux de recherche dans deux domaines qui sont l'identification de nouvelles structures d'agents chimiques et le développement d'empreinte moléculaire.

---

**IDENTIFICATION DE NOUVELLES  
STRUCTURES POUR L'HYDROLYSE  
SELECTIVE DU PhX**

---

## 1 INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Devant l'importance de la découverte et du développement de nouveaux moyens de décontamination des NOP, nous avons axé notre recherche sur l'identification de nouveaux agents chimiques permettant l'hydrolyse sélective de la liaison P-S des agents **V** de type **VX** ou **PhX**.

Dans ce but, une chimiothèque d'une soixantaine de molécules a été synthétisée et testée sur l'hydrolyse du **PhX** en solution (Schéma 1).

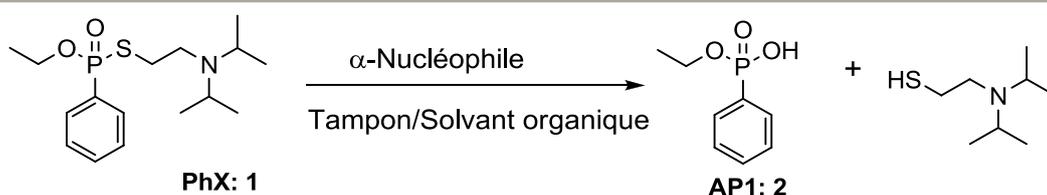


Schéma 1 : Hydrolyse du **PhX** par un  $\alpha$ -nucléophile.

Nous avons pour ce faire choisi comme composé de référence la pralidoxime **3** encore appelée la 2-PAM (Figure 23). Elle est actuellement utilisée dans le traitement des intoxications aux organophosphorés en tant que réactivateur de l'AChE phosphorylée. Elle est également capable de réagir avec le **VX**, et de l'hydrolyser en composés non toxiques comme le montrent les études menées par Szinicz et coll.<sup>75</sup>

La pralidoxime est ce qu'on appelle un  $\alpha$ -nucléophile. Il a été prouvé que les nucléophiles possédant un hétéroatome avec une paire d'électrons libres adjacente à un centre nucléophile ont une réactivité supérieure aux nucléophiles de même basicité sans hétéroatome. L'origine de ce phénomène, appelé effet  $\alpha$ , a été beaucoup étudiée durant les vingt dernières années mais n'a pas encore été complètement comprise.<sup>76</sup>

Nous verrons au cours de ce chapitre que la première série de composés testés nous a amené à concentrer nos recherches sur les fonctions oximes et amidoximes. Ainsi, quatre familles de molécules, que sont les benzaldoximes, les

<sup>75</sup> a) G. Becker, A. Kawan, D. Gutzeit, F. Worek, L. Szinicz, *Arch. Toxicol.*, **2007**, *81*, 415-420. b) G. Becker, A. Kawan, L. Szinicz, *Arch. Toxicol.*, **1997**, *71*, 714-718.

<sup>76</sup> I-H. Um, E. Buncel, *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 577-582.

benzamidoximes, les pyridinaldoximes et les pyridylamidoximes, nous ont tout particulièrement intéressées (Figure 23).

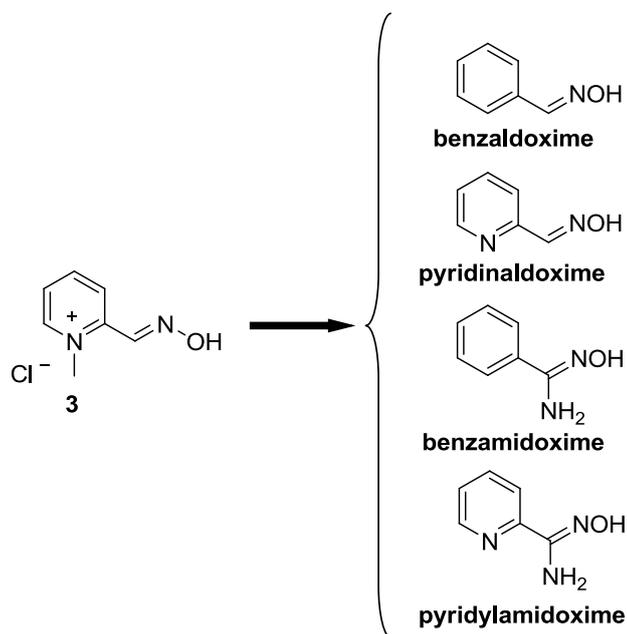


Figure 23 : Structure de la pralidoxime et des principales familles de composés testés.

En premier lieu, pour réaliser le criblage de ces composés, la mise au point d'un test analytique permettant de mesurer l'activité hydrolytique des  $\alpha$ -nucléophiles a été nécessaire.

## 2 MISE AU POINT DE LA METHODE ANALYTIQUE

### 2.1 Choix de la méthode

Le but de cette étude est la mise au point d'une méthode rapide et simple capable de détecter et de quantifier l'activité organophosphonothioase des  $\alpha$ -nucléophiles synthétisés au cours de ce projet et plus tard des empreintes moléculaires.

De nombreux tests utilisent des substrats fluorogéniques ou chromogéniques.<sup>77</sup> Dans ces approches, il s'agit de modifier la molécule de **PhX** afin que l'hydrolyse de la liaison Phosphore-Soufre (P-S) libère un fluorophore ou un chromophore, facilement détectable. Mais ces techniques ne sont pas applicables à l'étude des empreintes moléculaires. En effet, l'empreinte doit être spécifique d'un substrat, en l'occurrence le **PhX**. Elle ne peut donc pas réagir avec une molécule de **PhX** modifiée, souvent plus volumineuse.

L'utilisation du réactif d'Ellman (DTNB : acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)) est une autre méthode que nous avons envisagée. En effet, le DTNB est le réactif le plus employé pour la détection et la quantification des thiols libres des protéines. Or, lors de l'hydrolyse du **PhX** une fonction thiol est libérée (Schéma 2).

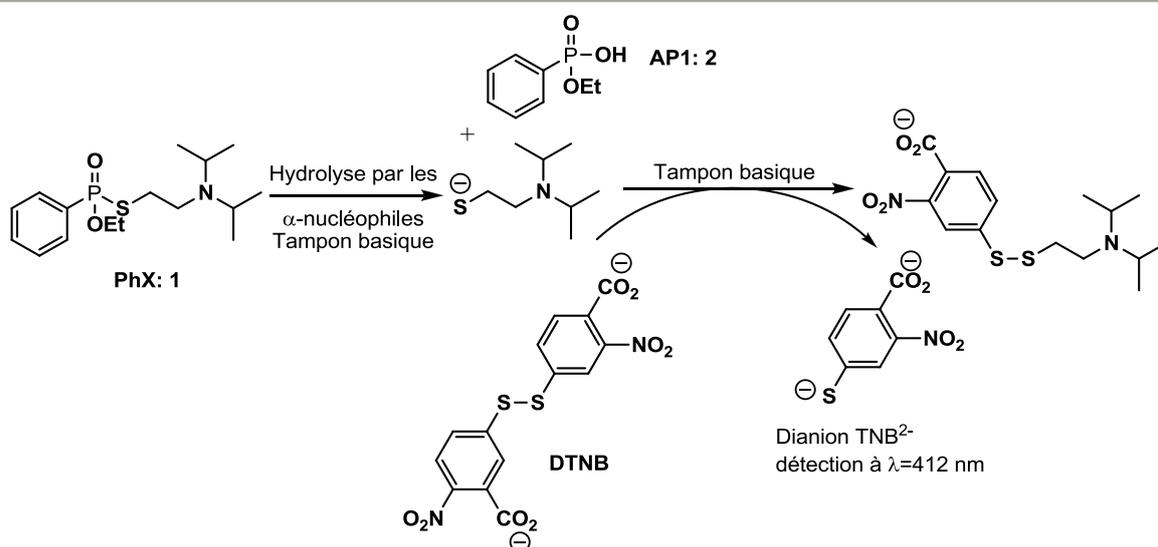


Schéma 2 : Utilisation du réactif d'Ellman pour le suivi de l'hydrolyse du **PhX**.

L'inconvénient des méthodes précédemment citées est quelle ne permettront pas de suivre la formation éventuelle d'intermédiaires au cours de la réaction et donc d'apporter des informations sur le mécanisme d'hydrolyse.

Enfin, le suivi de la réaction d'hydrolyse du **PhX** par RMN du Phosphore 31 (<sup>31</sup>P) a aussi été étudié par le Professeur P.Y Renard (IRCOF de Rouen) mais s'est avéré peu fiable.

<sup>77</sup> a) J.-L. Reymond, *J. immune. Meth.*, **2002**, 269, 125-131. b) N. Bensel, M.T. Reymond, J.-L. Reymond, *Chem. Eur. J.*, **2001**, 4604-4612. c) N. Jourdain, R. Perez Carlon, J.-L. Reymond, *Tet. Lett.*, **1998**, 39, 9415-9418. d) D. Wahler, J.-L. Reymond, *Can. J. Chem.*, **2002**, 80, 665-670.

Compte tenu des inconvénients des méthodes présentées ci-dessus, nous avons choisi de mettre au point et de suivre la réaction d'hydrolyse du **PhX** par CLHP.

## 2.2 Mise au point du test de criblage

L'analyse de l'efficacité des  $\alpha$ -nucléophiles quant à l'hydrolyse du **PhX** est effectuée en deux temps. Toutes les molécules sont d'abord soumises au test de criblage afin de sélectionner rapidement les plus efficaces. Les meilleurs candidats sont ensuite caractérisés cinétiquement afin d'estimer la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse.

La méthode de criblage doit être simple et rapide à mettre en œuvre et applicable à l'évaluation des polymères imprimés. En conditions standard, pour le criblage primaire des composés, nous avons choisi d'utiliser cinq équivalents d'agent d'hydrolyse pour un équivalent de **PhX**, ce qui nous garanti la détection d'une activité même faible et des temps suffisamment courts pour permettre le criblage d'un grand nombre de molécules. Une solution tampon est utilisée pour nous affranchir des fluctuations de pH induites par l'avancement de la réaction.

Les conditions expérimentales d'hydrolyse du **PhX** sont donc les suivantes :

- 50  $\mu$ L d'une solution de **PhX** dans l'acétonitrile à 100mM (1 mmol/L)
- 500  $\mu$ L d'acétonitrile
- 4,45 mL de tampon Tris 0,1 N, pH= 8,5
- 0,025 mmol d' $\alpha$ -nucléophile (5 mmol/L)
- Température ambiante (20-22°C)

Notons qu'un test de contrôle a été effectué, dans les conditions opératoires sans agent d'hydrolyse, afin de vérifier la stabilité du **PhX**. Il en a résulté que celui-ci est stable dans les conditions du test.

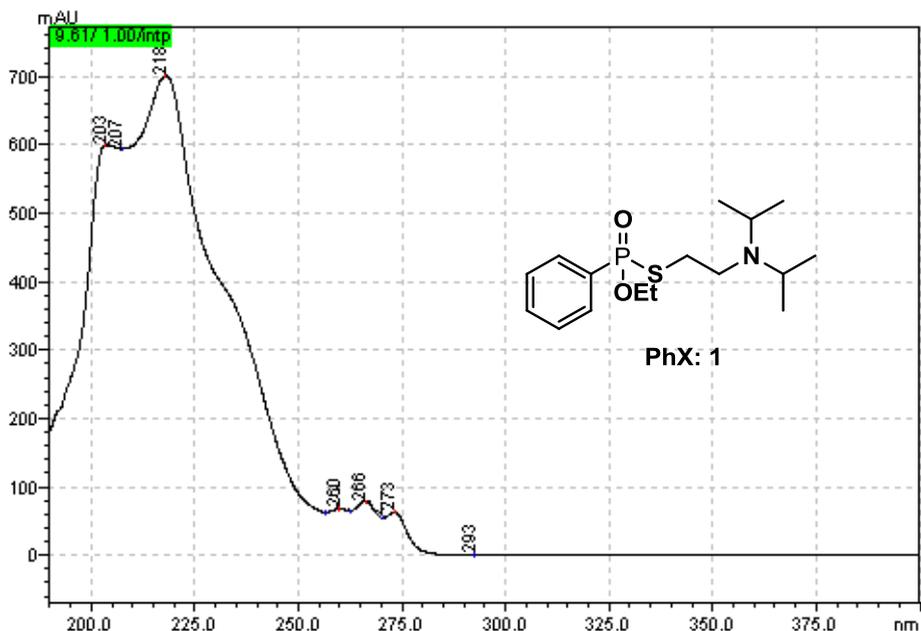
Comme indiqué précédemment, la pralidoxime a été choisie comme molécule de référence. Nous avons constaté, que dans les conditions du test de criblage, 5

équivalents de pralidoxime hydrolysent 1 équivalent de **PhX** en 2 heures. Ce temps est donc pris comme temps de référence. Pour chaque nucléophile testé la réaction d'hydrolyse est maintenue pendant 2 heures, temps au bout duquel l'avancement de la réaction est quantifié par CLHP.

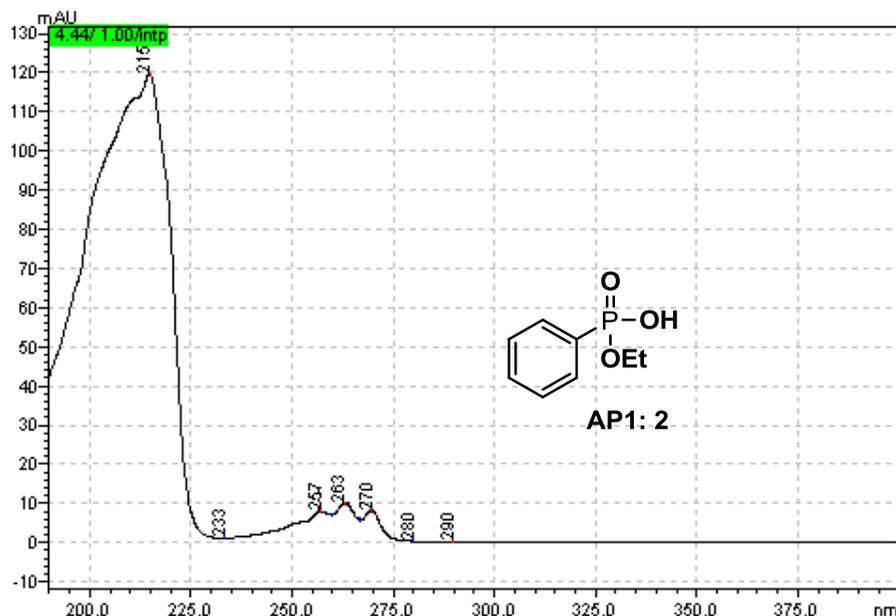
Par cette méthode, il est possible de suivre soit la disparition du **PhX** (1) soit l'apparition de l'acide phosphononique **AP1** (2). La première solution permet d'observer la diminution de la toxicité tandis que la deuxième permet de confirmer la sélectivité de l'hydrolyse vis-à-vis de la liaison P-S.

Les spectres d'absorption UV du **PhX** (Graphique 1) et de **AP1** (Graphique 2) présentent trois bandes d'absorption caractéristiques des composés organophosphorés liés directement à un cycle benzénique (pour le **PhX** :  $\lambda_1= 260$  nm,  $\lambda_2= 266$  nm,  $\lambda_3= 273$  nm ; pour **AP1** :  $\lambda_1= 257$  nm,  $\lambda_2= 263$  nm, et  $\lambda_3= 270$  nm).

Afin de nous affranchir du bruit de fond, la détection et le dosage du **PhX** ou de **AP1** par CLHP ont été réalisés à la longueur d'onde de 263 nm.



Graphique 1 : Spectre d'absorption UV du **PhX**.



## 2.2.1 Calibration

Dans le but de suivre la disparition du **PhX** ou l'apparition de **AP1**, nous avons effectué les courbes de calibration adéquates. Pour ce faire nous avons dans un premier temps synthétisé ces deux composés en suivant les modes opératoires décrits par P. Vayron dans ses travaux de thèse.<sup>78</sup>

### 2.2.1.1 Synthèse du **PhX** et des produits d'hydrolyse **AP1** et **AP2**

- **Synthèse du **PhX****

Le **PhX** a pu être synthétisé en 3 étapes avec un rendement global de 27% par réaction de l'éthylphénylphosphinate sur le N,N'-diisopropylaminoéthylthiocyanate **4** (Schéma 3). Deux mécanismes sont susceptibles d'expliquer cette réaction car les hydrogénophosphinates sont en équilibre sous deux formes P(III) et P(IV) (Figure 24).

<sup>78</sup> P. Vayron, *Application des anticorps catalytiques à la dégradation des organophosphorés toxiques*, Thèse de doctorat de l'Université de Paris XI Orsay, **1999**.

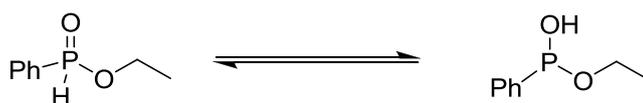


Figure 24 : Equilibre des formes P(III) et P(IV) des hydrogénophosphinates.

Vayron et *coll.* ont mis en évidence le rôle de la fonction diisopropyléthylamine du thiocyanate **4** dans cette réaction. Cette fonction amine est très basique et conduit à la formation de l'anion du diéthylphénylphosphinate qui réagit alors par substitution nucléophile sur le soufre entraînant le départ de l'ion cyanate (Schéma 3).

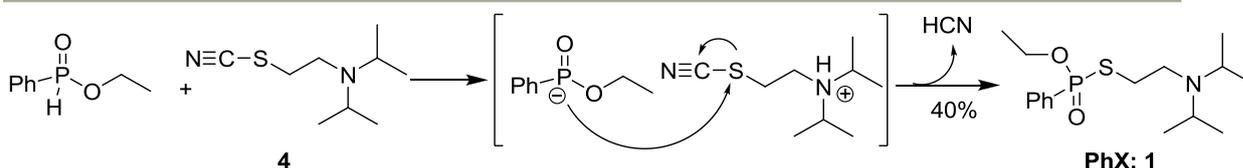


Schéma 3 : Mise en évidence du mécanisme de formation du **PhX**.

La purification du **PhX** est délicate. Nous l'avons réalisée sur colonne d'alumine neutre avec un mélange d'éluant de composition cyclohexane/acétate d'éthyle (30/70). Toutefois, nous avons pu noter que le composé se dégrade s'il reste trop longtemps en contact avec l'alumine.

#### Synthèse du N,N-diisopropylaminoéthylthiocyanate **4**

Le N,N-diisopropylaminoéthanol commercial est bromé par  $\text{PPh}_3\text{Br}_2$  formé *in situ*. Le produit de bromation **5** en solution dans le THF ne réagit pas avec  $\text{TMSNCS}$ , alors que la réaction est quasi totale en quelques minutes après addition d'un équivalent de TBAF (Schéma 4).

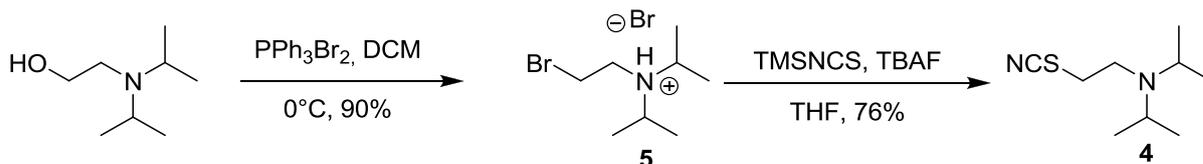


Schéma 4 : Synthèse du thiocyanate **4**.

Le thiocyanate **4** formé peut alors être purifié par chromatographie sur gel de silice.

- **Synthèse de AP1**

L'acide phosphorique **AP1** (**2**), produit de la coupure de la liaison P-S du **PhX**, est obtenu par hydrolyse du diéthylphénylphosphonate commercial dans la soude à chaud<sup>79</sup> (Schéma 5).

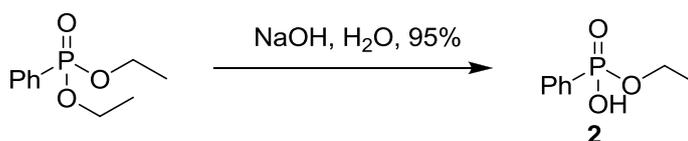


Schéma 5 : Synthèse du produit d'hydrolyse **AP1**.

- **Synthèse de AP2**

Afin d'apporter des informations supplémentaires quant à la rupture sélective de la liaison P-S lors de l'hydrolyse du **PhX**, nous avons également cherché à synthétiser le produit **AP2** issu de la coupure de la liaison P-O du **PhX**. Cette synthèse décrite par P. Vayron fait réagir le phosphinate **6**, provenant du traitement de la dichlorophénylphosphine par deux équivalents d'eau, sur le thiocyanate **4** (Schéma 6).

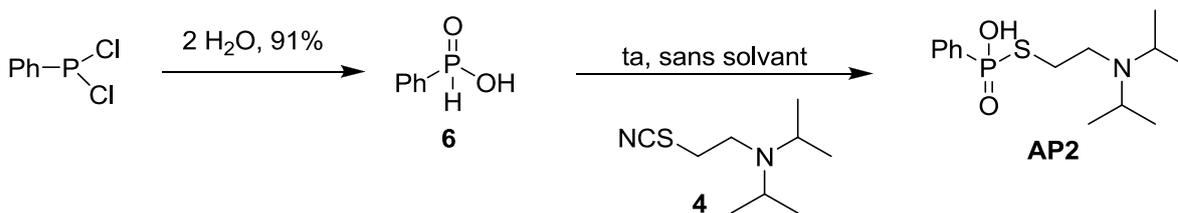


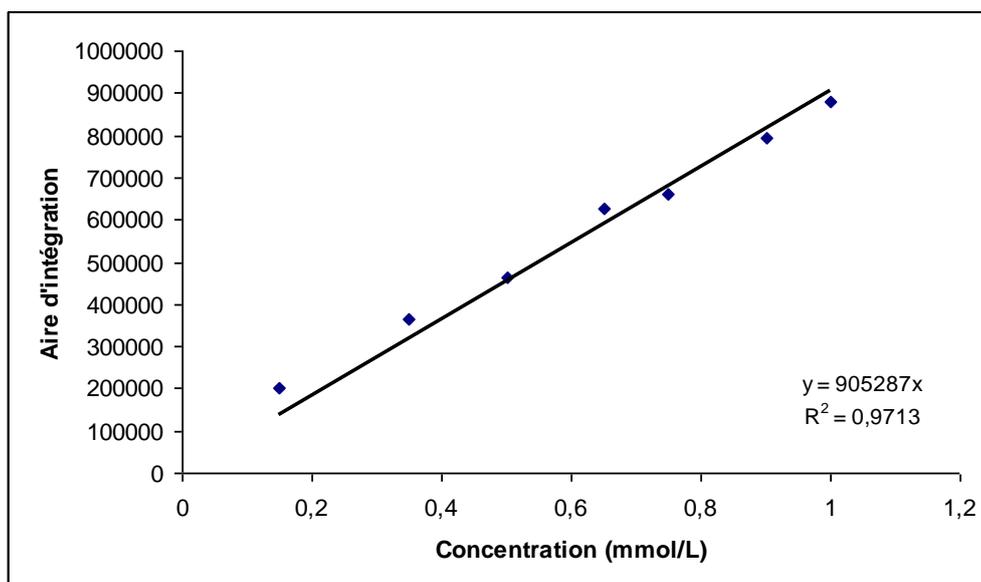
Schéma 6 : Schéma de synthèse du produit d'hydrolyse **AP2**.

Cependant, nous n'avons pas été en mesure d'obtenir le composé **AP2** et ceux malgré plusieurs tentatives.

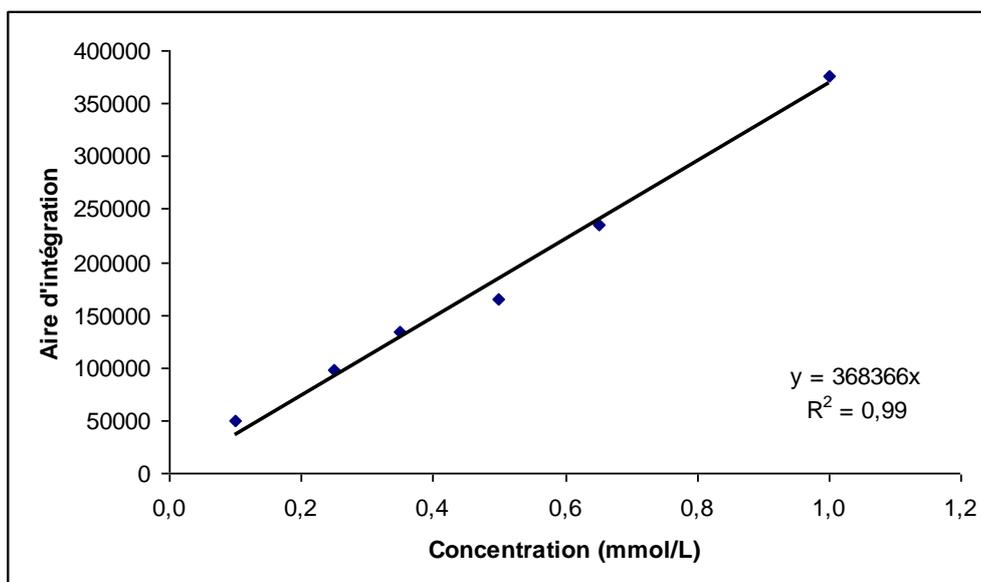
<sup>79</sup> R. Rabinowitz, *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, *82*, 4564-4567.

### 2.2.1.2 Courbes de calibration

Les courbes de calibration sont obtenues en mesurant les aires d'intégration des pics pour différentes concentrations connues de **PhX** (Graphique 3) et de **AP1** (Graphique 4). La gamme des concentrations correspond aux conditions expérimentales choisies et varie de 1 mmol/L (0% de conversion du **PhX**) à 0 mmol/L (100% de conversion du **PhX**). S'agissant d'un test de criblage, seules les molécules présentant une réactivité importante seront retenues, la sensibilité du test est estimée à +/- 5%.



Graphique 3 : Droite de calibration, aire=f(**[PhX]**).



Graphique 4 : Droite de calibration, aire=f(**[AP1]**).

Ayant mis au point la méthode de criblage, nous avons pu démarrer l'évaluation de la réactivité des composés nucléophiles et de leur capacité à hydrolyser la molécule de **PhX**.

En pratique, nous nous sommes aperçus qu'il était plus facile de suivre la disparition du **PhX** que l'apparition de **AP1**. En effet le caractère hydrophobe du **PhX** par rapport aux nucléophiles testés, permet de s'affranchir des perturbations liées en CLHP aux recouvrements partiels des pics des différents produits. Les résultats de l'évaluation des nucléophiles seront donc relatifs à la disparition du pic correspondant au **PhX**.

### 3 EVALUATION DES COMPOSES GRACE AU TEST DE CRIBLAGE

#### 3.1 Première série de nucléophiles

Nous avons synthétisé une première série de nucléophiles en nous inspirant de la structure de la pralidoxime **3** (Figure 25), laquelle est constituée d'une fonction aldoxime en position 2 d'une pyridine N-méthylée dont le contre ion est un chlorure.

##### 3.1.1 Structure des nucléophiles

Nous avons synthétisé un certain nombre de molécules, facilement accessible, permettant de faire varier :

- La nature du groupement lié à l'azote du noyau pyridinium
- Le contre ion du noyau pyridinium
- La nature du noyau aromatique
- La nature de la fonction  $\alpha$ -nucléophile

Des molécules dont la structure est plus éloignée de celle de la pralidoxime ont également été testées.

Les premières structures envisagées (Figure 25) sont de type pyridine oxime (**7**, **8** et **9**), thiophène oxime (**10**), quinoline oxime (**11**), amidrazone (**12**) hydrazone (**13**, **14** et **15**), semicarbazone (**16**), amidoxime (**17** et **18**), pyridinone (**19**), 1,5,7-Triazabicyclo[4.4.0]déc-5-ène (TBD : **20**) et acide violurique (**21**).

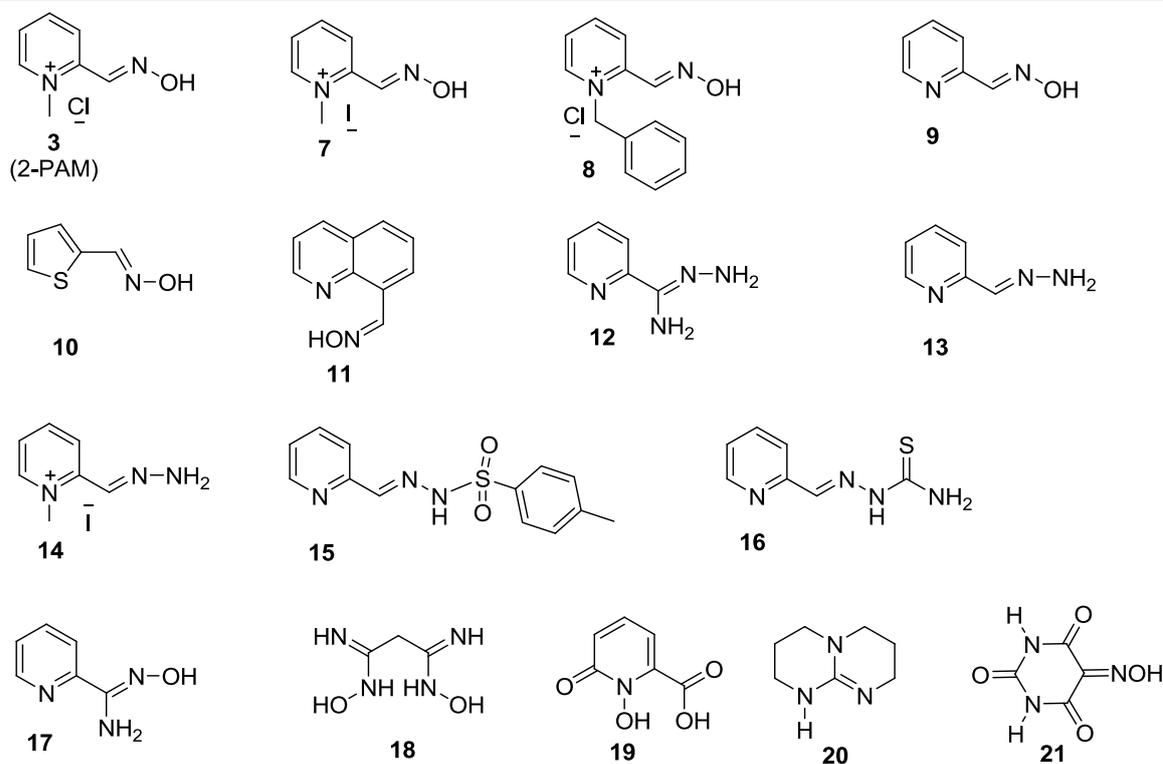


Figure 25 : Première série de composés testés pour l'hydrolyse du **PhX**.

La pralidoxime **3**, la 2-pyridinaldoxime **9**, la TBD **20** et l'acide violurique **21** sont des produits commerciaux.

### 3.1.2 Synthèse des nucléophiles

#### 3.1.2.1 Synthèse générale des oximes

Les oximes sont, de façon générale, obtenues par condensation de l'hydroxylamine avec un aldéhyde ou une cétone (obtention respectivement d'aldoximes ou de cétoximes). Nous avons utilisé une même procédure pour la synthèse de toutes les oximes (sauf exceptions mentionnées). Nous appellerons

ce protocole, protocole A. Un équivalent d'aldéhyde ou de cétone est chauffé à 70°C, entre 2 et 16 heures, avec 4 équivalents de chlorohydrate d'hydroxylamine et 2 équivalents de carbonate de sodium dans un mélange H<sub>2</sub>O/Méthanol (6/1). Dans de nombreux exemples, l'oxime obtenue précipite dans le milieu réactionnel à froid du fait de la faible solubilité des oximes dans l'eau. Si ce n'est pas le cas, l'oxime est purifiée sur colonne de silice avec comme éluant un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle.

De cette façon, nous avons pu obtenir les composés **10** et **11** avec des rendements respectifs de 85% et 87% (Schéma 7).

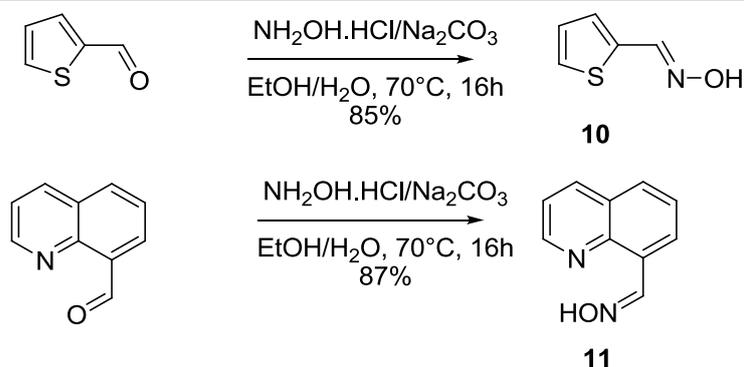


Schéma 7 : Synthèse des oximes **10** et **11**.

### 3.1.2.2 Synthèse des N-alkyl 2-pyridinaldoximes

Les composés N-alkylés **7** et **8** sont obtenus avec des rendements relativement faibles, soit respectivement 30% et 20% par action des halogénures d'alkyle sur la 2-pyridinaldoxime.

L'iodure de N-méthyl-2-pyridinaldoxime **7** a été obtenu par N-alkylation de l'iodure de méthyle à température ambiante sous atmosphère inerte pendant 16 heures (Schéma 8).

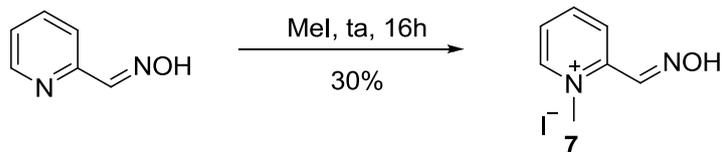


Schéma 8 : Synthèse de l'iodure de N-méthyl-2-pyridinaldoxime **7**.

Le chlorure de N-benzyl-2-pyridinaldoxime **8** a lui été obtenu par N-alkylation du chlorure de benzyle dans l'acétonitrile à reflux pendant 48 heures (Schéma 9).

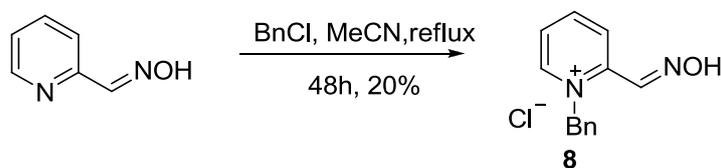


Schéma 9 : Synthèse du chlorure de N-benzyl -2-pyridinaldoxime **8**.

### 3.1.2.3 Synthèse de la 2-pyridylamidrazone **12**

Les amidrazones sont principalement obtenues par condensation de l'hydrazine sur un nitrile.

La 2-pyridylamidrazone a été obtenue avec un rendement de 90% (Schéma 10).

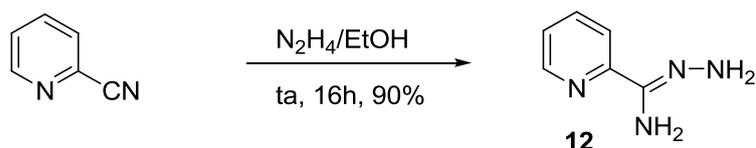


Schéma 10 : Formation de la 2-pyridylamidrazone **12**.

### 3.1.2.4 Synthèse de la 2-pyridinaldazine **13**, de l'iodure de N-méthyl-2-pyridinaldazine **14** et de la 2-pyridinecarboxaldehyde tosylhydrazone **15**

Les hydrazones sont classiquement obtenues par action de l'hydrazine sur un aldéhyde ou une cétone. Les composés **13** et **14** ont ainsi été obtenus avec des rendements respectifs de 80% et 90% (Schéma 11).

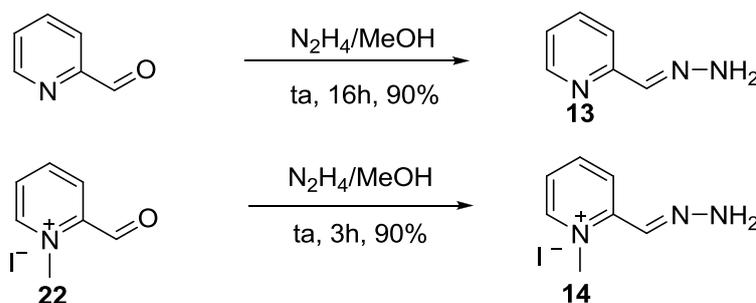


Schéma 11 : Synthèse des 2-pyridinaldazines **13** et **14**.

Le composé **22** a été obtenu avec un rendement de 30% par action de l'iodure de méthyle sur le 2-pyridinaldéhyde (Schéma 12).

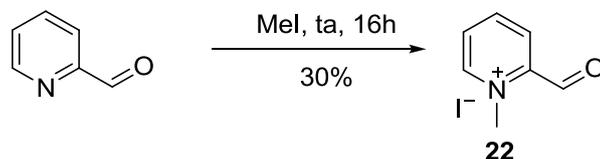


Schéma 12 : Synthèse de l'iodure de N-méthyl-2-pyridinaldoxime.

Dans le cas de la synthèse du composé **15**, nous avons utilisé le *p*-toluènesulfonylhydrazide disponible commercialement. Le rendement de la réaction est de 54% (Schéma 13).

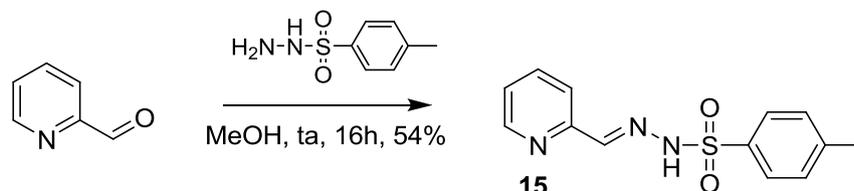


Schéma 13 : Synthèse du composé **15**.

### 3.1.2.5 Synthèse de la thiosemicarbazone **16**

Le composé **16** a été obtenu par condensation de la pyridine 2-carboxaldehyde et de l'hydrazinecarbothioamide à reflux dans l'éthanol. Le rendement de la réaction est de 52% (Schéma 14).

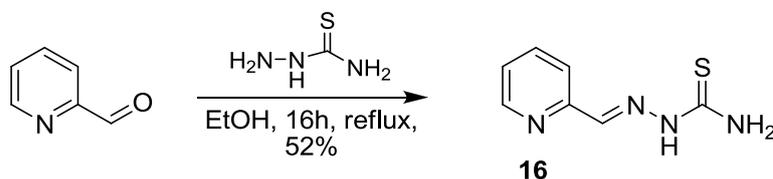


Schéma 14 : Synthèse du composé **16**.

### 3.1.2.6 Synthèse générale des amidoximes

Les amidoximes sont, de façon générale, obtenues par condensation de l'hydroxylamine sur un nitrile. Nous avons utilisé une même procédure pour la

synthèse de toutes les amidoximes (sauf exceptions mentionnées). Celle-ci est identique à celle utilisée pour la synthèse des oximes, l'aldéhyde ou la cétone étant remplacé par un nitrile. Nous appellerons ce protocole, protocole B.

De cette façon, les composés **17** et **18** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 75% et 77% (Schéma 15).

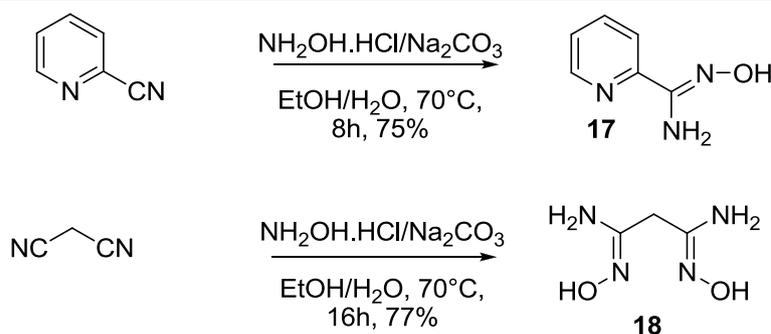


Schéma 15 : Synthèse des amidoximes **17** et **18**.

### 3.1.2.7 Synthèse de la pyridinone **19**

Ce composé a été obtenu par réaction de l'acide 6-hydroxy-picolinique et de l'acide peracétique formé *in situ*, dans un mélange d'acide trifluoroacétique et d'acide acétique glacial, avec un rendement de 73% (Schéma 16).

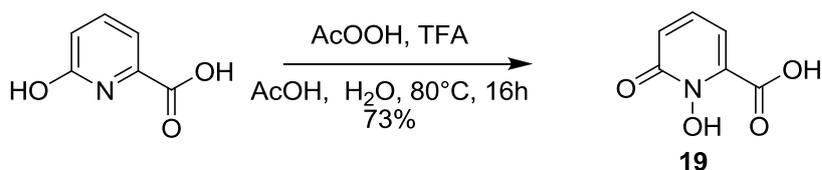
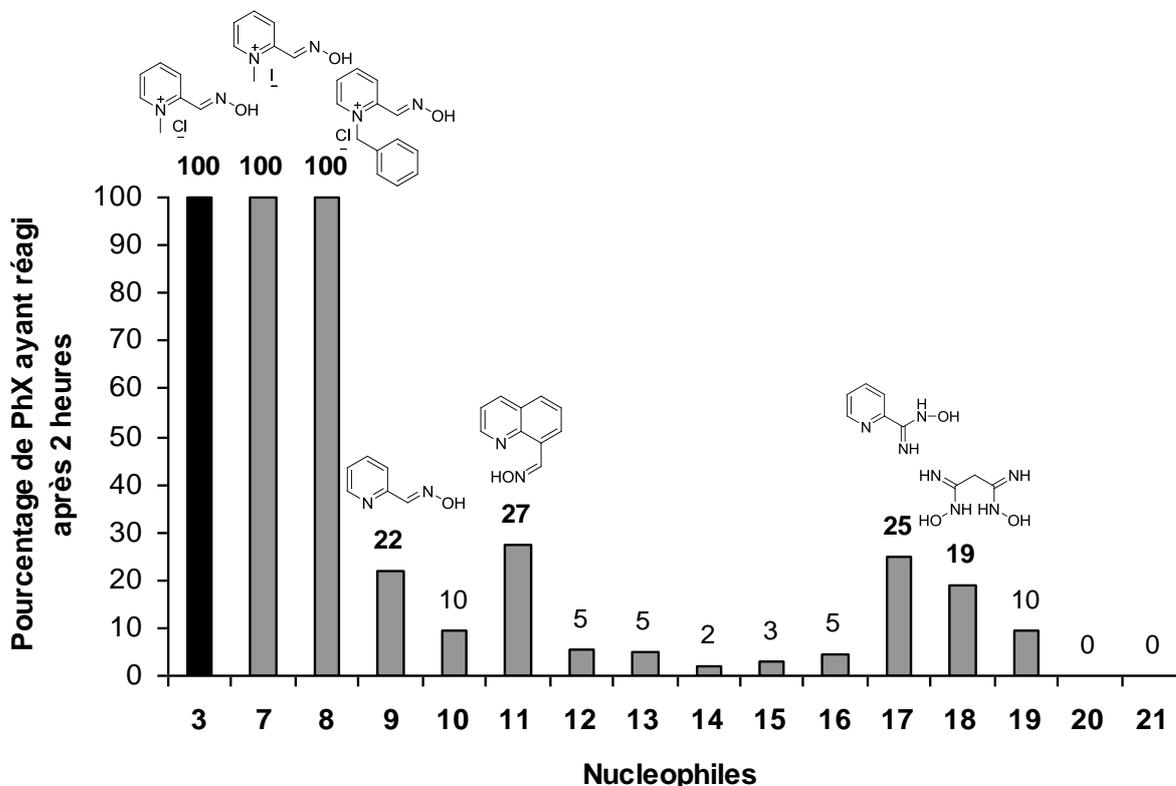


Schéma 16 : Synthèse de la pyridinone **19**.

### 3.1.3 Résultats du test de criblage

La réactivité de chacune des molécules de cette première série vis-à-vis de l'hydrolyse du **PhX** a été évaluée selon le test de criblage décrit précédemment (Graphique 5). Notons que les chiffres indiqués sur les barres correspondent au pourcentage de **PhX** ayant réagi après deux heures de réaction dans les

conditions décrites pour le test de criblage. La barre noire correspond quant à elle au composé de référence, ici la pralidoxime **3**.



Graphique 5 : Résultats du test de criblage pour la première série.

Ces résultats montrent, tout d'abord, une hydrolyse totale du **PhX**, dans les conditions du test après deux heures de réaction, par les trois N-pyridinium aldoximes testées (**3**, **7** et **8**). Ainsi le fait de remplacer la fonction N-méthyle par la fonction N-benzyle ou bien encore l'ion chlorure par l'ion iodure (contre ion) ne semble pas affecter la réactivité de la fonction oxime.

Nous observons aussi une différence de réactivité, déjà bien connue, entre la pralidoxime **3** et la 2-pyridinaldoxime **9**, son analogue non quaternarisé. En effet, la présence de l'ammonium quaternaire diminue le pKa de la fonction oxime du composé, augmentant l'acidité et donc la nucléophilie de l'oxime. En effet, dans la littérature,<sup>80</sup> le pKa de la pralidoxime est donné à 7,82, alors que le pKa de la 2-pyridinaldoxime est de 10,15. L'absence de quaternarisation fait chuter la quantité

<sup>80</sup> a) R.L. Salvador, M. Saucier, D. Simon, R. Goyer, *J. Med. Chem*, **1972**, *15*, 646-650. b) J.H Blanch, *J. Chem. Soc.*, **1966**, 937-939.

de **PhX** ayant réagi de 100% à 22%. Cependant, ceci n'est plus vrai dans le cas de l'hydrazone **13** et de son analogue quaternarisé **14** où il n'y a quasiment pas de variation du taux de conversion du **PhX** entre les deux composés. Un résultat équivalent a déjà été décrit par Hackley<sup>81</sup> sur l'hydrolyse du DFP (Diethyl FluoroPhosphonate) par l'acide picolinhydroxamique et son dérivé quaternarisé. La quaternarisation de l'azote de la pyridine n'implique donc pas une amélioration de la réactivité quelque soit la fonction  $\alpha$ -nucléophile associée.

Parmi les composés testés, hormis les dérivés pyridinium aldoximes (**7** et **8**), trois présentent une réactivité intéressante à savoir les composés **11**, **17** et **18**. Certes ils sont moins performants que la pralidoxime **3**, mais ils ont une efficacité comparable à celle de la 2-pyridinaldoxime **9**. Ces composés correspondent à la quinoline oxime **11**, à l'amidoxime **17** et à la bisamidoxime **18** et permettent d'hydrolyser respectivement 27%, 25% et 19% de **PhX**.

Cette première série de nucléophiles nous a permis de sélectionner deux fonctions  $\alpha$ -nucléophiles, que sont la fonction oxime et la fonction amidoxime, comme potentiellement intéressantes. La fonction oxime étant déjà connue pour cette activité.

La suite de notre travail portera donc sur l'étude plus approfondie de la réactivité de ces deux fonctions auxquelles nous ajouterons la fonction acide hydroxamique mise en avant par l'équipe du Professeur P.Y Renard et les travaux de Ludivine Louise-Leriché<sup>82</sup> (IRCOF) avec qui nous avons collaboré sur ce projet.

Nous avons ainsi décidé d'étudier plus particulièrement quatre familles de composés (benzaldoximes, benzamidoximes, pyridinaldoximes et pyridylamidoximes) afin d'optimiser les structures et d'obtenir des composés très efficaces pour l'hydrolyse du **PhX** et plus généralement des agents de classe **V**.

---

<sup>81</sup> B.E. Hackley, R. Plapinger, M. Stolberg, T. Wagner-Jauregg, *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, *77*, 3651-3653.

<sup>82</sup> L. Louise-Leriché, *Ingénierie Chimique Immunocontrôlée des Anticorps Application à la Dégradation des Neurotoxiques Organophosphorés*, Thèse de doctorat de l'Université de Rouen, **2007**.

## 3.2 Les benzaldoximes

### 3.2.1 Première série de benzaldoximes

#### 3.2.1.1 Structure des benzaldoximes

Suite aux premiers résultats obtenus, nous avons choisi de tester une série de neuf benzaldoximes ortho-substituées (Figure 26).

Avec cette série, nous nous affranchissons de l'influence sur la réactivité du noyau pyridinique en le substituant par un noyau aromatique phényle. Cette simplification nous permet d'avoir accès à un plus grand nombre d'aldéhydes commerciaux pour la synthèse des oximes.

Cette série de benzaldoximes monosubstituées permet de tester l'influence de groupements en position ortho de la fonction oxime sur l'activité hydrolytique.

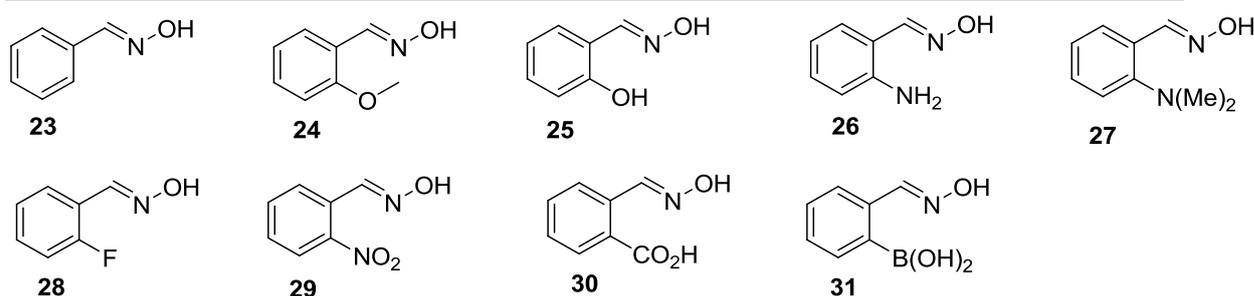
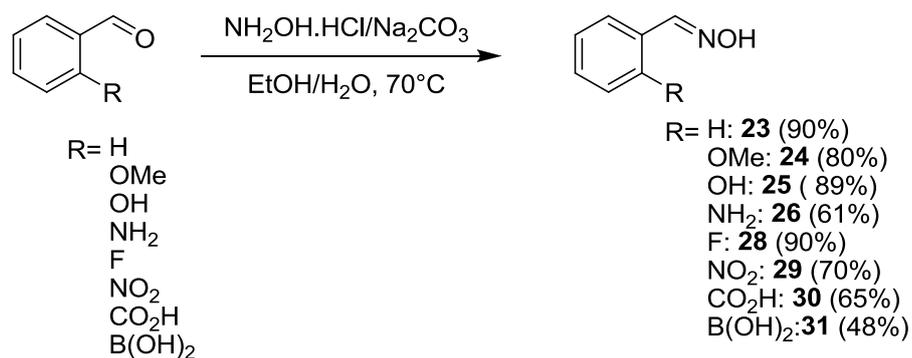


Figure 26 : Structure des benzaldoximes ortho-substituées.

#### 3.2.1.2 Synthèse des benzaldoximes

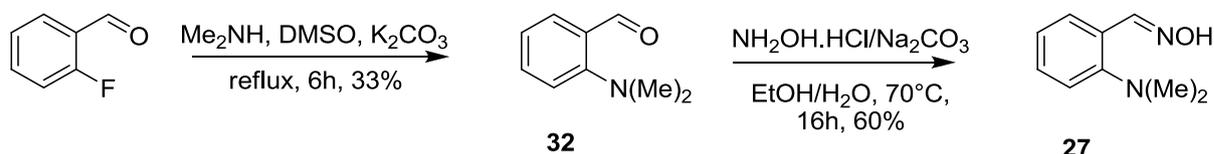
Les benzaldoximes, à l'exception du composé **27**, ont été synthétisées en une étape à partir des benzaldéhydes correspondants en suivant le protocole général A (Schéma 17).



**Schéma 17 :** Synthèses des benzaldoximes ortho-substituées.

• **Synthèse de la 2-(N,N-diméthylamino)benzaldoxime 27**

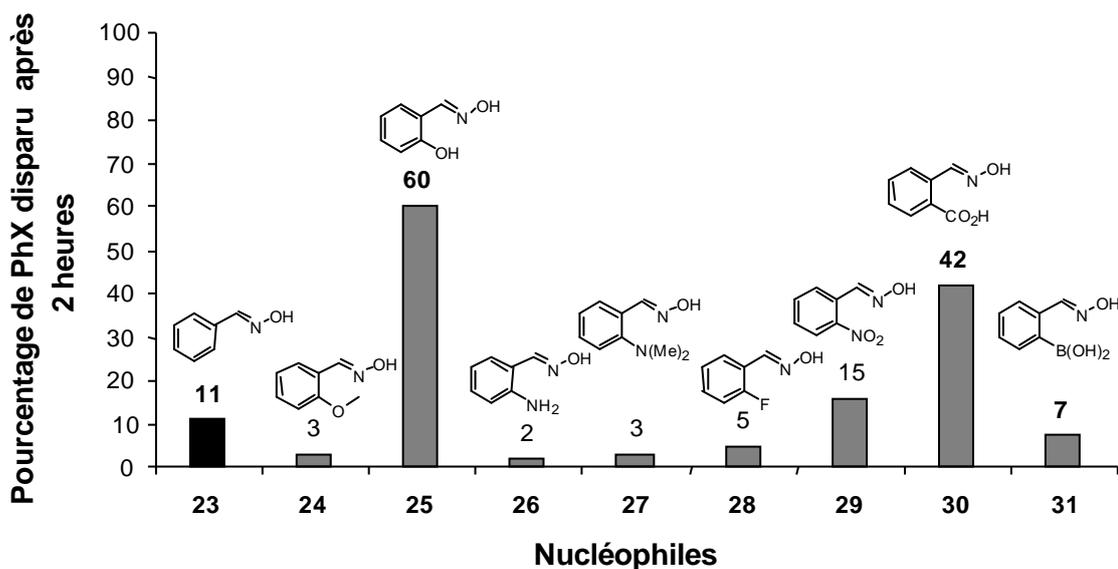
Le composé **27** a été synthétisé en deux étapes à partir du 2-fluorobenzaldéhyde. La première étape est une substitution nucléophile aromatique du fluor par la diméthylamine dans le THF à reflux pendant 16 heures. La 2-(N,N-diméthylamino)benzaldéhyde **32** est obtenue avec un rendement de 33%. Celle-ci est ensuite transformée en oxime en suivant le protocole A pour donner le composé **27** avec un rendement de 60% (Schéma 18).



**Schéma 18 :** Synthèse du composé **27**.

3.2.1.3 Résultat du test de criblage

Le test de criblage général a été effectué sur chacune des molécules de la première série de benzaldoximes (Graphique 6). La barre noire correspond au composé de référence, pour cette série il s'agit de la simple benzaldoxime **23**.



Graphique 6 : Résultats obtenus pour la première série de benzaldoximes.

En comparant l'efficacité de la 2-pyridinaldoxime **9** et de la benzaldoxime **23**, qui hydrolysent respectivement 22% et 11% de **PhX**, il semblerait que le passage du noyau pyridine au noyau phényle a diminué celle-ci de moitié. Pourtant, de façon intéressante, la 2-hydroxy-pyridinaldoxime **25** et l'acide **30** ont un pourcentage d'hydrolyse du **PhX** respectivement trois et deux fois supérieur à la 2-pyridinaldoxime **9** soit respectivement 60% et 42%.

Si nous essayons de rationaliser ces résultats, nous pouvons penser que de manière générale la présence de groupements électro-donneurs (MeO-, HO-, R<sub>2</sub>N-, H<sub>2</sub>N-, ...) aurait tendance à augmenter le pKa de l'oxime. Inversement, la présence de groupements électro-attracteurs (O<sub>2</sub>N-, HO<sub>2</sub>C-, ...) devrait diminuer ce même pKa. Au regard des résultats, il n'apparaît pas d'influence nette sur la réactivité liée aux effets électroniques qu'ils soient de type mésomère ou inductif, dans tous les cas l'efficacité reste inférieure à 15% de conversion. Par exemple, le groupement méthoxy (**24**) électro-donneur par effet mésomère +M, le groupement fluoro (**28**), électro-attracteur par effet inductif -I et le groupement nitro (**29**) attracteur par effet inductif -I et effet mésomère -M, ne permettent pas de faire varier l'efficacité de manière significative.

Ainsi, l'effet électronique des groupements hydroxyle et acide carboxylique des composés **25** et **30** ne peut pas expliquer à lui seul leur réactivité vis-à-vis du **PhX**.

Les fonctions doivent participer au mécanisme d'hydrolyse du **PhX** en assistant la fonction oxime du fait de leur proximité. Il est possible d'expliquer cette augmentation significative de la réactivité par la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'hydrogène du groupement hydroxyle en position ortho et l'azote de la fonction oxime. Ce phénomène a été observé précédemment par Blatt et Russell<sup>83</sup> qui ont mis en évidence l'existence de cette liaison hydrogène intramoléculaire grâce aux analyses infrarouges d' $\alpha$ -benzoin oximes et d'ortho-hydroxybenzophenone oximes. En 1961, Freedmann publie une étude spectroscopique de la liaison hydrogène entre un groupement hydroxyle et le doublet libre de l'atome d'azote, avec notamment l'étude de liaisons hydrogènes intramoléculaires.<sup>84</sup> Ces antécédents permettent à Shimizu et coll.<sup>85</sup> d'expliquer la bonne réactivité des ortho-hydroxy oximes aromatiques, par rapport aux oximes ne portant pas de groupement hydroxyle en ortho, sur la synthèse et l'aminolyse d'ester d'o-hydroxy oximes aromatiques. Dans leur étude ils corrélient cette réactivité au pKa de la fonction oxime. D'après eux, l'existence de cette liaison hydrogène intramoléculaire diminue le pKa de la fonction oxime, augmentant ainsi la réactivité des oximes ortho-hydroxylées (Figure 27).

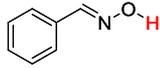
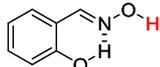
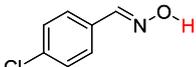
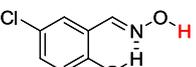
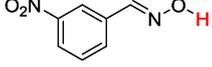
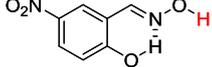
| Composé                                                                             | pKa de la fonction oxime |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
|  | 10.9                     |
|  | 9.3                      |
|  | 10.1                     |
|  | 8.8                      |
|  | 10.1                     |
|  | 6.7                      |

Figure 27 : Influence de la liaison hydrogène intramoléculaire sur le pKa de l'oxime.

<sup>83</sup> A.H. Blatt, L.A. Russell, *J. Am. Chem. Soc.*, **1936**, 58, 1903-1908.

<sup>84</sup> H.H. Freedmann, *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, 83, 2900-2905.

<sup>85</sup> a) I. Hayashi, K. Ogihara, K. Shimizu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1983**, 56, 2432-2437. b) I. Hayashi, K. Shimizu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1983**, 56, 3197-3198.

Ainsi, il apparaît que les substitutions aromatiques ont une influence modeste sur le pKa, alors que la présence du groupement hydroxyle en ortho et donc de la liaison intramoléculaire entre l'hydrogène du groupement hydroxyle et le doublet libre de l'azote permet de diminuer le pKa de manière significative de 10,9 à 9,3. De plus, la présence de groupements électro-attracteurs en para de la fonction hydroxyle diminue encore le pKa de l'oxime. Les résultats que nous avons obtenus avec le test de criblage sont bien en accord avec ces observations. Les effets électroniques des différentes ortho-substitutions de la benzaldoxime ne sont pas suffisants pour influencer le pKa de la fonction oxime et donc la réactivité vis-à-vis de la réaction d'hydrolyse du **PhX**. En revanche, dans le cas d'une ortho-substitution par un groupement hydroxyle, la diminution de pKa de l'oxime, résultant de l'existence d'une liaison hydrogène intramoléculaire, est significative et permet une augmentation de la réactivité. En effet en diminuant le pKa, on augmente la quantité d'oximates présents en solution et donc d'entités nucléophiles réactives. Il est aussi possible de penser, qu'au-delà de la simple influence sur le pKa, les ortho-hydroxybenzaldoximes ont une réactivité particulière liée à l'existence de la liaison hydrogène intramoléculaire. Il apparaît donc intéressant dans la suite de notre étude de faire varier le pKa de la fonction phénol afin d'établir une corrélation entre réactivité et acidité.

Une nouvelle série d' $\alpha$ -nucléophiles a ainsi été synthétisée et testée afin de faire varier le pKa du phénol, induisant également une variation du pKa de l'oxime.

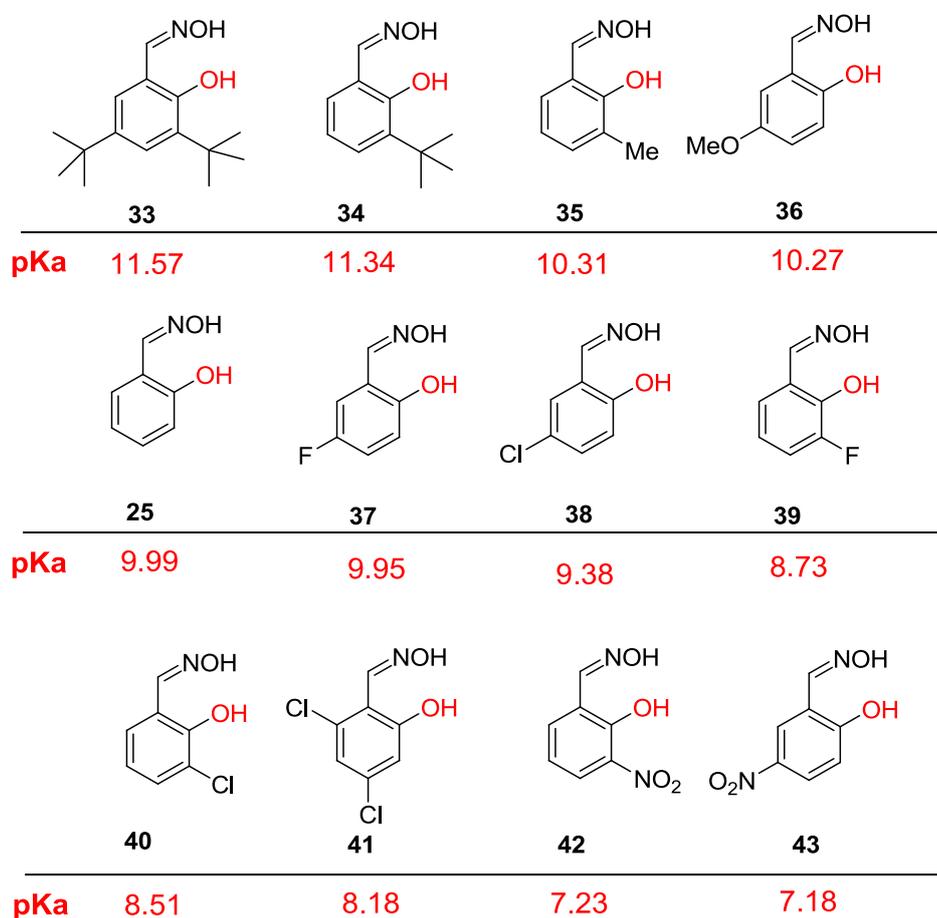
Le pKa du couple phénol/phénolate est particulièrement faible (9,99 dans l'eau à 25°C) du fait de la stabilisation par résonance de la charge négative du phénolate. Les électrons libres de l'oxygène sont impliqués dans la résonance, d'où cette grande stabilité. Cette acidité est augmentée par les groupes électro-attracteurs en positions ortho et para et diminuée par les groupes électro-donneurs aux mêmes positions.

### **3.2.2 Deuxième série de benzaldoximes**

#### **3.2.2.1 Structure des 2-hydroxybenzaldoximes**

Les différentes 2-hydroxybenzaldoximes que nous avons envisagées pour cette étude comportent toutes une fonction oxime, une fonction phénol en position ortho

de la fonction oxime et la présence de groupements électro-attracteurs ou électro-donneurs en position ortho ou para de la fonction phénol (Figure 28). Les valeurs des pKa rapportées sous chaque molécule correspondent aux pKa des fonctions phénols en l'absence des fonctions oximes, dans l'eau à 25°C. En effet, les pKa des phénols substitués sont disponibles dans la littérature,<sup>86</sup> ce qui n'est pas le cas des pKa de la fonction hydroyles des 2-hydroxybenzaldoxime substituées. Il ne s'agit donc pas du pKa exact des molécules représentées mais nous avons considéré hypothétiquement que l'impact de la fonction oxime serait le même dans chacun des cas. De manière générale le phénol est plus acide que l'oxime et se déprotonera en premier en milieu basique.<sup>87</sup>



**Figure 28 :** Structures des 2-hydroxybenzaldoximes et pKa des analogues phénols sans fonction oxime.

<sup>86</sup> J. Jover, R. Bosque, J. Sales, *QSAR Comb. Sci.*, **2007**, 26, 385-397.

<sup>87</sup> J. Tshuma, G. Alarcon-Angeles, E. Palacios-Beas, R. Vargas-Garcia, M.T. Ramirez-Silva, A. Rojas-Hernandez, *Spectrochimica Acta Part A*, **2007**, 66, 879-883.

### 3.2.2.2 Synthèse des 2-hydroxybenzaldoximes

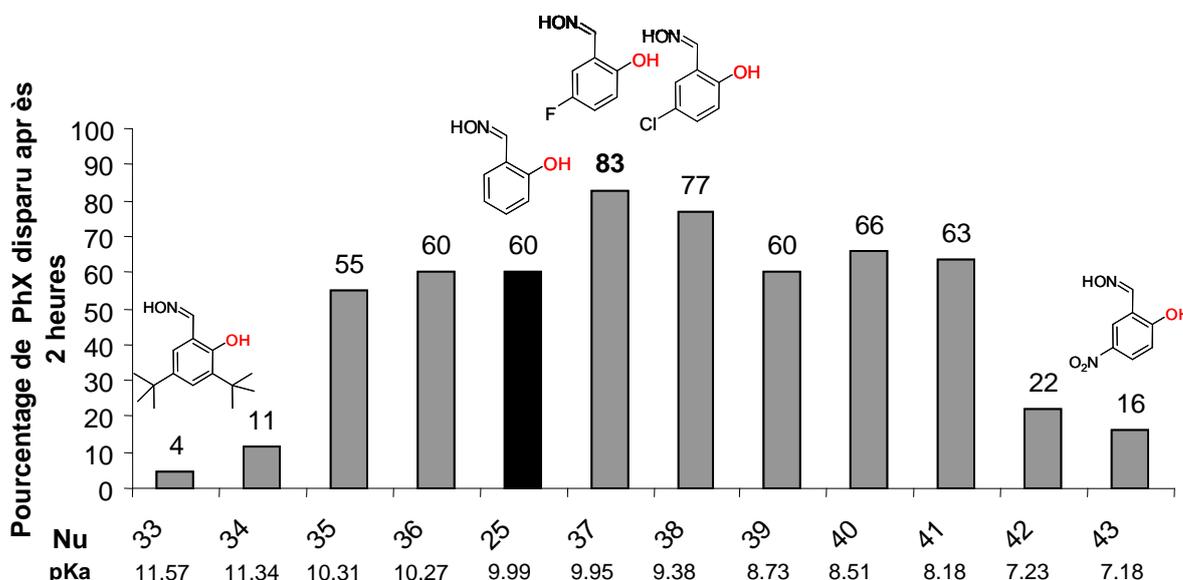
Tous les nucléophiles de cette série ont été synthétisés en une étape à partir des 2-hydroxybenzaldéhydes correspondants, toujours en appliquant le protocole A avec des rendements compris entre 56 et 93% (Tableau 1).

| Composé   | Rendement | Composé   | Rendement |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>33</b> | 85%       | <b>38</b> | 90%       |
| <b>34</b> | 86%       | <b>39</b> | 66%       |
| <b>35</b> | 86%       | <b>40</b> | 91%       |
| <b>36</b> | 80%       | <b>41</b> | 93%       |
| <b>25</b> | 89%       | <b>42</b> | 81%       |
| <b>37</b> | 80%       | <b>43</b> | 56%       |

Tableau 1 : Rendement des réactions d'oximation.

### 3.2.2.3 Résultats du test de criblage

Le test de criblage général a été effectué sur chacune des molécules de la seconde série de benzaldoximes (Graphique 7). La barre noire représente le composé de référence pour cette série, il s'agit de la 2-hydroxybenzaldoxime **25** qui permet d'hydrolyser 60% du **PhX**. Notons également que les structures sont classées par ordre de pKa décroissant.



Graphique 7 : Résultat du test de criblage des 2-hydroxybenzaldoximes.

La corrélation entre la réactivité du nucléophile et le pKa du phénol n'est pas évidente. Mais on peut noter que pour des pKa aux alentours de 11-12 et de 7, la réactivité chute de manière importante atteignant des valeurs qui laissent à penser qu'on perd le bénéfice de la fonction phénol.

Nous pouvons cependant faire le postulat suivant : la présence en position 5 de groupements électro-attracteurs, tels que NO<sub>2</sub> ou des halogènes, va réduire la densité électronique sur l'oxygène du phénol entraînant une diminution de son pKa. Cette augmentation de l'acidité du phénol va favoriser la formation de la liaison hydrogène intramoléculaire entre l'hydroxyle et l'azote, diminuant ainsi également le pKa de l'oxime. Les mesures de pKa des fonctions oximes, faites par Shimizu et coll.<sup>85</sup> (Figure 27), sur les composés **25**, **38** et **43** sont respectivement de 9,3, 8,8 et 6,7. Ceci permet de valider le fait que la diminution du pKa du phénol entraîne une diminution du pKa de l'oxime *via* la liaison hydrogène intramoléculaire.

Comme nous travaillons en milieu tamponné à pH=8,5, nous pouvons considérer que les composés **42** et **43** seront sous forme phénolate rendant impossible la formation de la liaison intramoléculaire et donc le bénéfice du groupement hydroxyle en position ortho. Ceci se traduit par des pourcentages faibles de **PhX** ayant réagi après deux heures, respectivement 22% et 16%. De manière opposée, les composés **33** et **34** sont majoritairement sous forme protonée avec une forte densité électronique sur l'oxygène du phénol qui réduit la disponibilité du proton pour la liaison hydrogène intramoléculaire. Le pKa de la fonction oxime reste donc élevé, ne favorisant pas l'hydrolyse du **PhX** (respectivement 4% et 11% de **PhX** hydrolysé). Entre ces cas extrêmes, nous ne pouvons pas trouver une corrélation immédiate entre les pKa du phénol et la réactivité de la fonction oxime. Il existe une gamme de pKa de la fonction phénol, et donc de la fonction oxime, pour laquelle les résultats d'hydrolyse sont aux alentours de 75-80%.

### 3.2.3 Troisième série de benzaldoxime

#### 3.2.3.1 Structure des nucléophiles

Une dernière série de benzaldoximes comportant plusieurs di-hydroxybenzaldoximes et une tri-hydroxybenzaldoxime a été synthétisée et testée

(Figure 29). Cette série permettra d'évaluer l'influence de la présence de plusieurs fonctions hydroxyles sur la réactivité des benzaldoximes.

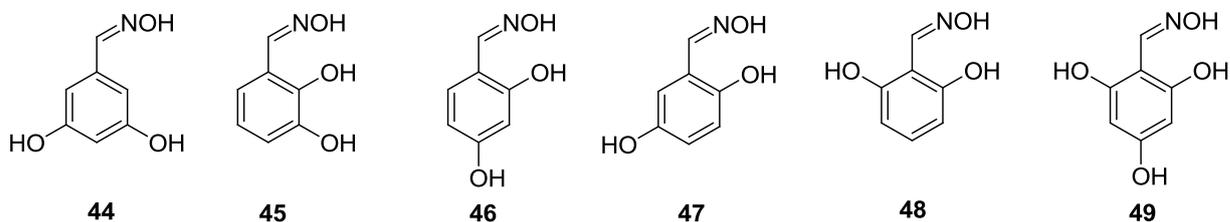


Figure 29 : Structure des composés testés.

### 3.2.3.2 Synthèse des composés

Les composés **44**, **45**, **46**, **47** et **49**, ont été synthétisés en une étape à partir des benzaldéhydes correspondants, en appliquant le protocole A. Notons toutefois que la formation du composé **49** se fait à température ambiante (Schéma 19).

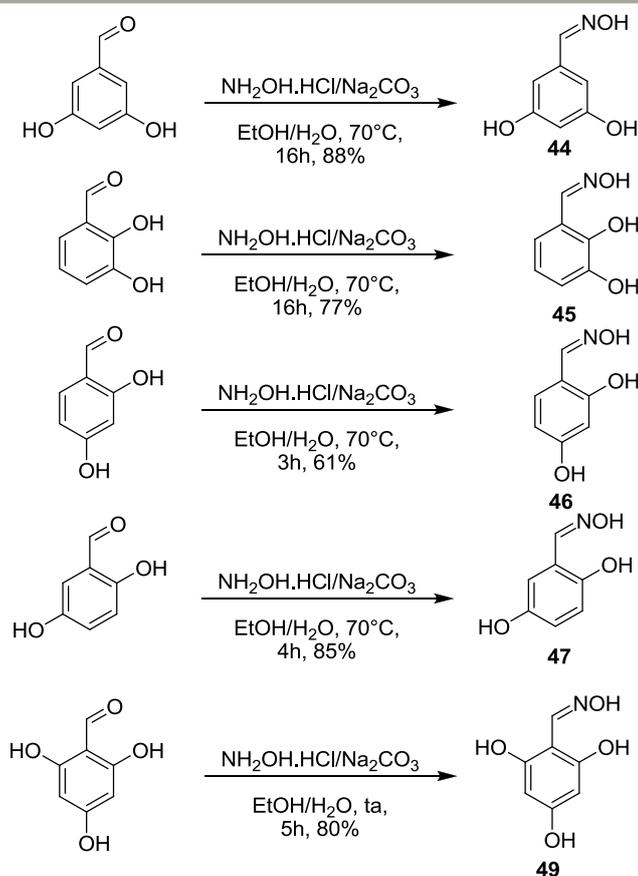


Schéma 19 : Synthèse des benzaldoximes à partir des benzaldéhydes correspondant.

• Synthèse de la 2,6-dihydroxybenzaloxime **48**

Le composé **48** a été synthétisé en trois étapes à partir de l'acide 6-hydroxy salicylique.

La première étape est la formation de la 2,2-diméthyl-1,3 benzodioxan-4-one **50** en présence d'anhydride trifluoroacétique et d'acide trifluoroacétique (Schéma 20).

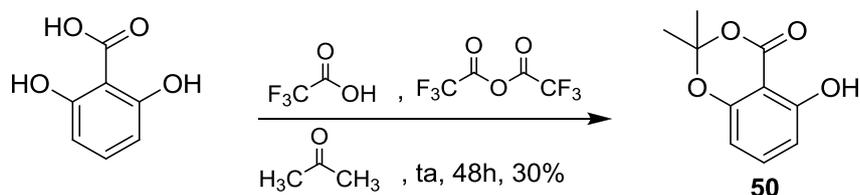


Schéma 20 : Synthèse du composé **50**.

L'intermédiaire **50** est ensuite réduit en présence de Dibal-H (1 molaire dans le dichlorométhane) pour donner le 2,6-dihydroxybenzaldéhyde **51** avec un rendement de 9%.<sup>88</sup> Celui-ci est transformé en oxime toujours en suivant le protocole A, avec un rendement de 45% (Schéma 21).

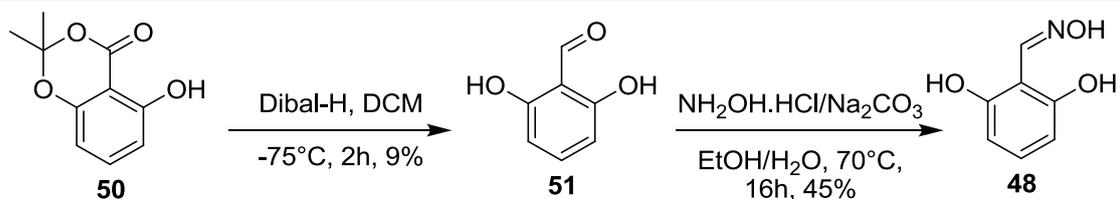
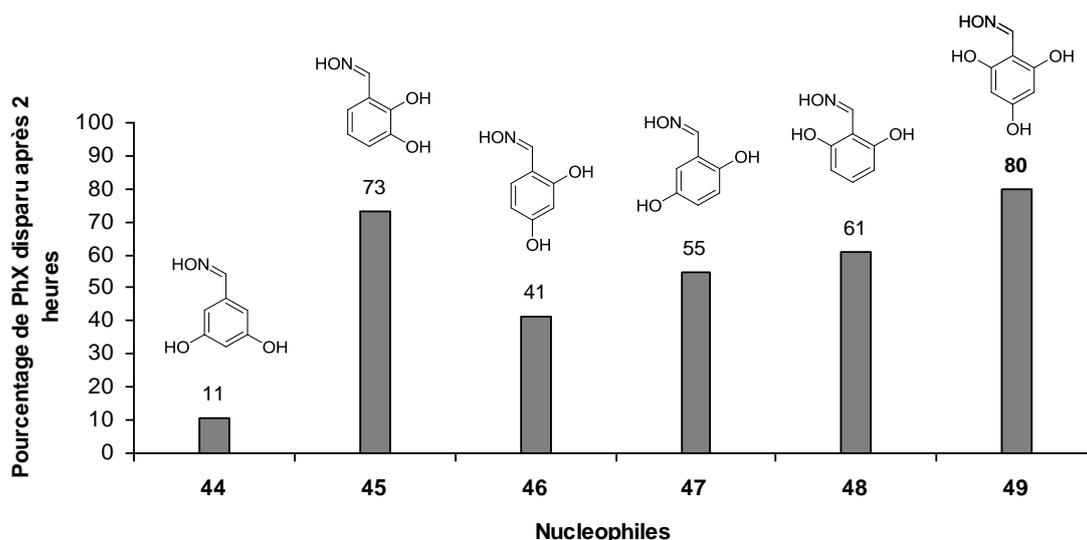


Schéma 21 : Synthèse du composé **48**.

### 3.2.3.3 Résultat du test de criblage

Le test de criblage général a été effectué sur chacune des molécules de la troisième série de benzaldoximes (Graphique 8).

<sup>88</sup> N. Bajwa, M.P. Jennings, *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 3646-3649.



Graphique 8 : Résultats du test de criblage.

En l'absence de groupement hydroxyle en position ortho de la fonction oxime, soit le composé **44**, le pourcentage de **PhX** hydrolysé après deux heures est de 11%, résultat identique à celui observé avec la benzaldoxime **23** (Graphique 6). Les deux groupements hydroxyles en position 3 et 5 n'ont donc pas d'influence sur la réactivité de la benzaldoxime.

Toutes les autres molécules de cette série possèdent un groupement hydroxyle en position ortho de la fonction oxime. Nous rappelons que la 2-hydroxybenzaldoxime **25** hydrolyse 60% de **PhX**. Le composé **48**, qui possède un groupement hydroxyle sur les deux positions ortho de la fonction oxime permet d'hydrolyser 61% de **PhX**, soit la même quantité que le composé **25**. Ceci s'explique par le fait que l'atome d'azote de la fonction oxime ne peut être engagé que dans une seule liaison hydrogène intramoléculaire. Le deuxième groupement hydroxyle n'agit pas sur la réactivité de l'oxime. Ainsi parmi les molécules testées, deux sont plus efficaces que le composé **25** : les composés **45** et **49** qui permettent d'hydrolyser respectivement 72% et 80% de **PhX**. Le bon résultat obtenu avec la trihydroxybenzaldoxime **49** est assez surprenant compte tenu des résultats obtenus avec les composés **46** et **48**. Etant donné que le deuxième groupement hydroxyle en ortho ne joue pas sur la réactivité et que le composé possédant deux groupements hydroxyles en ortho et para est désactivé, on pouvait s'attendre à une hydrolyse du même ordre que le composé **47** soit autour de 40% or nous obtenons 80%.

### 3.2.4 Conclusion sur le criblage des benzaldoximes

A partir d'une série de benzaldoximes monosubstituées nous avons pu identifier la 2-hydroxybenzaldoxime **25** comme beaucoup plus réactive que son analogue non hydroxylé **23**, le pourcentage de **PhX** ayant réagi au cours du temps étant respectivement de 60% et de 11%. Cette augmentation de la réactivité a pu être expliquée par la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'hydrogène du groupement hydroxyle et l'azote de la fonction oxime qui diminue le pKa de l'oxime. Suite à ce bon résultat, une série de 2-hydroxybenzaldoximes substituées sur le noyau aromatique a été synthétisée dans le but de tester l'influence du pKa de la fonction phénol sur la réactivité et a permis d'obtenir une hydrolyse du **PhX** de 83% avec la 5-fluoro-2-hydroxybenzaldoxime **37**. S'appuyant sur une étude menée par Shimidzu et coll.,<sup>85</sup> nous savons que les pKa de la fonction phénol et de la fonction oxime évoluent dans le même sens sous l'influence de la substitution aromatique du noyau phényle. Pourtant, nous n'avons pas observé de corrélation directe entre diminution du pKa de l'oxime et augmentation de la réactivité. Ceci peut être dû au fait de travailler en milieu tamponné puisque le pH détermine les formes acido-basiques en présence, mais également à une réactivité particulière des benzaldoximes ortho-hydroxylées. La dernière série testée, faisant intervenir des di-hydroxybenzaldoximes et une tri-hydroxybenzaldoxime n'a pas permis d'identifier un meilleur nucléophile que le composé **37**, cependant les composés **45** et **49** donnent également de bons résultats.

## 3.3 Les benzamidoximes

### 3.3.1 Structure des nucléophiles

Suite aux résultats obtenus avec la première série de nucléophile la fonction amidoxime avait été jugée intéressante. Ainsi, les résultats obtenus avec les

benzaldoximes nous ont permis de sélectionner les structures à tester pour cette série de benzamidoximes.

Outre la benzamidoxime **52** qui sert de référence pour cette série, trois benzamidoximes possédant un groupement hydroxyle en position ortho de la fonction amidoxime ont été synthétisés (**55**, **56**, **57**). La 2-amino-benzamidoxime **54** et la molécule **53** possédant les deux fonctions nucléophiles jugées intéressantes viennent compléter cette série (Figure 30).

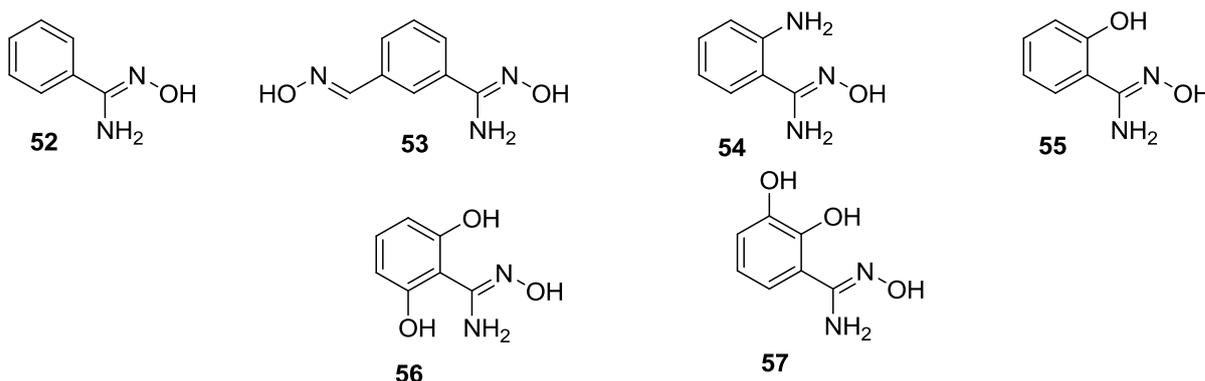
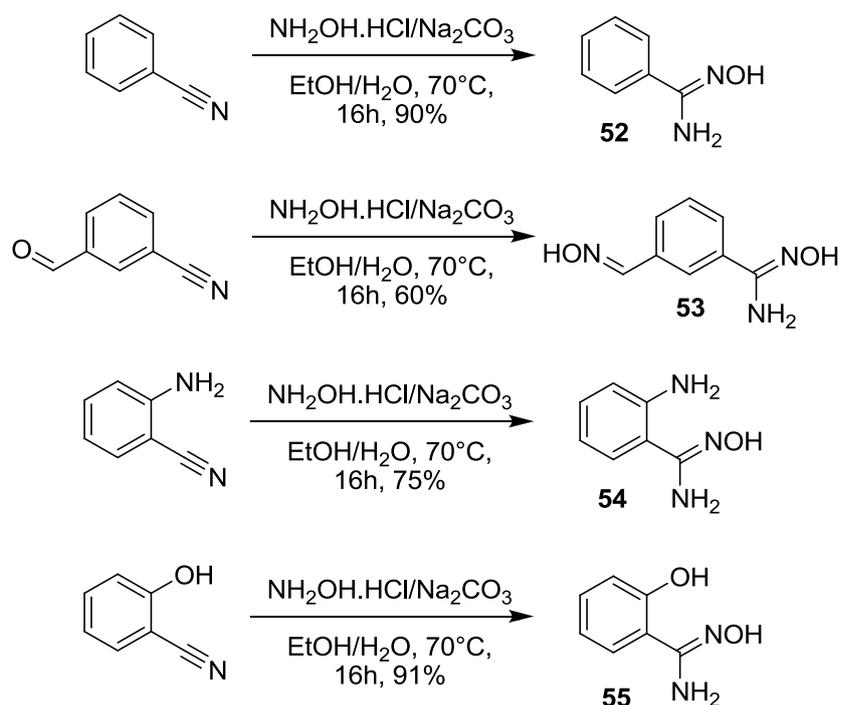


Figure 30 : Structure des benzamidoximes.

### 3.3.2 Synthèse des benzamidoximes

Exception faite des deux dihydroxy-benzamidoximes **56** et **57**, les autres composés ont été obtenus en une étape à partir des nitriles correspondants en appliquant le protocole de synthèse général des amidoximes, le protocole B, avec des rendements compris entre 60% et 91% (Schéma 22).

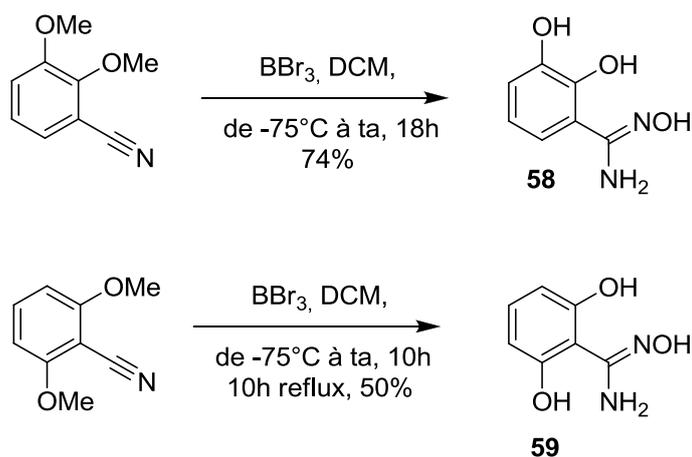


**Schéma 22 :** Synthèse des benzamidoximes à partir des nitriles correspondants.

### 3.3.2.1 Synthèse des 2,6-dihydroxybenzamidoxime **56** et 2,3-dihydroxybenzamidoxime **57**

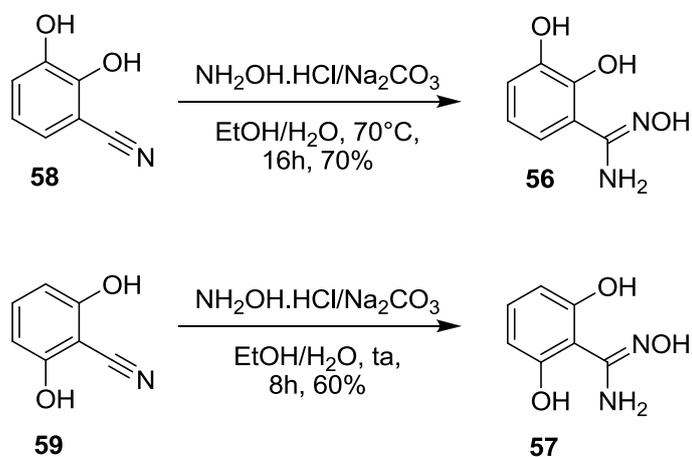
Les composés **56** et **57** ont été obtenus en deux étapes à partir des diméthoxybenzonitriles correspondants. Dans un premier temps, le tribromure de bore permet de déprotéger les fonctions alcools<sup>89</sup> (Schéma 23).

<sup>89</sup> a) R.J. Bergeron, J. Wiegand, J.S. McManis, W.R. Weimar, J. Bergeron, G.M. Brittenham, *J. Med. Chem*, **2005**, 48 (N°3), 821-831. b) R. Amaranatha Reddy, B.K. Sadashiva, *Liquid crystals*, **2003**, 30 (N°3), 273-283.



**Schéma 23 :** Déprotection des alcools par  $\text{BBr}_3$ .

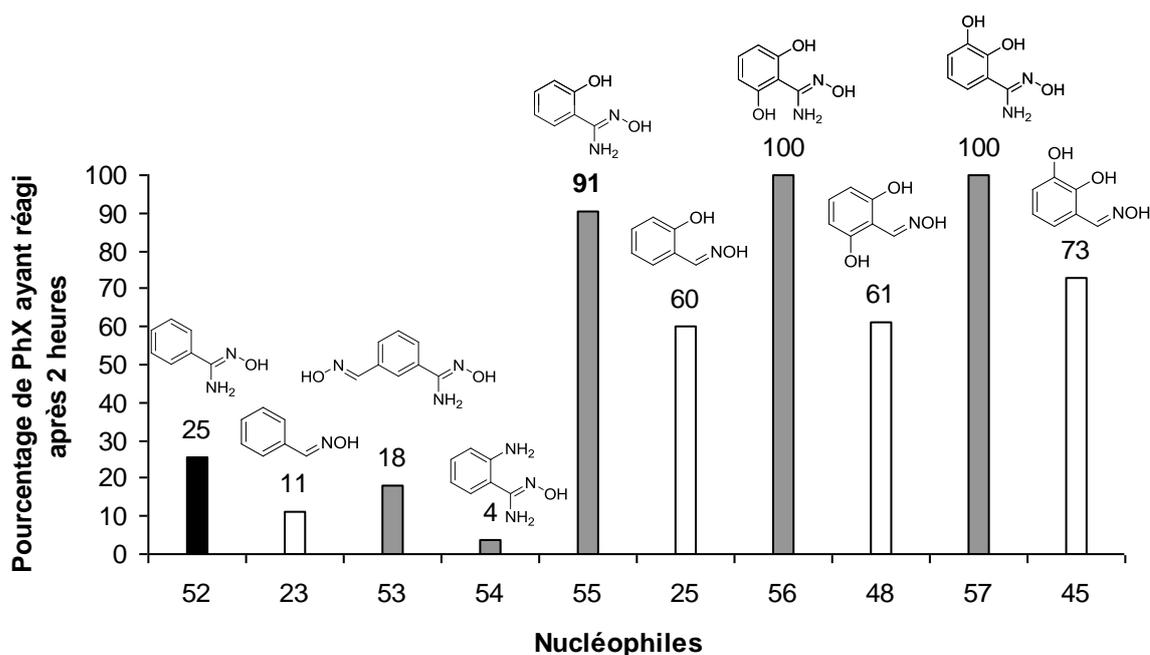
Dans un deuxième temps, les fonctions nitriles sont transformées en fonctions amidoximes, selon le protocole B (Schéma 24). Notons toutefois que la synthèse de la 2,6-dihydroxybenzamidoxime est assez sensible et se fait à température ambiante.



**Schéma 24 :** Synthèse des benzamidoximes **57** et **58**.

### 3.3.3 Résultats du test de criblage des benzamidoximes

Le test de criblage général a été effectué sur chacune des molécules de cette série de benzamidoximes (Graphique 9).



**Graphique 9 :** Résultats obtenus pour la série de benzamidoximes (noir et gris) et comparaison avec les benzaloximes (blanc).

Les résultats obtenus confirment le potentiel de la fonction amidoxime. Les trois molécules possédant une fonction hydroxyle en position ortho de la fonction nucléophile, soit les composés **55**, **56** et **57**, donnent de très bons résultats ( $\geq 90\%$  d'hydrolyse). Ceux-ci sont d'ailleurs meilleurs que celui obtenu avec la meilleure benzaloxime **37** qui était de 83%. On remarque également que le composé **53**, qui cumule les fonctions oximes et amidoximes est en réalité moins efficace que la simple benzaloxime **52**, il n'y a donc pas d'effet additif, mais plutôt un effet désactivant à travers le cycle aromatique.

Les résultats du test de criblage obtenus avec les benzamidoximes sont extrêmement positifs. La réactivité de la fonction amidoxime apparaît meilleure que celle de la fonction oxime. La présence du groupement hydroxyle sur les composés **55**, **56** et **57** permet, comme dans le cas de la fonction oxime, une augmentation importante de la réactivité. Il est naturel de supposer que ceci est dû à la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre les deux fonctions, même si elle n'a jamais été mise en évidence pour des amidoximes. Pour deux de ces composés, **56** et **57**, nous observons même une hydrolyse totale du **PhX** en deux heures.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence du noyau pyridinique sur la réactivité des nucléophiles en synthétisant et testant des dérivés de la famille des pyridinaldoxime puis de la famille des pyridylamidoximes.

### 3.4 Les pyridinaldoximes

#### 3.4.1 Structure des pyridinaldoximes

Pour cette série, seul le composé **60** a été synthétisé, les autres pyridinaldoximes (**8** et **9**) ont été testées lors de la première série (Figure 31).

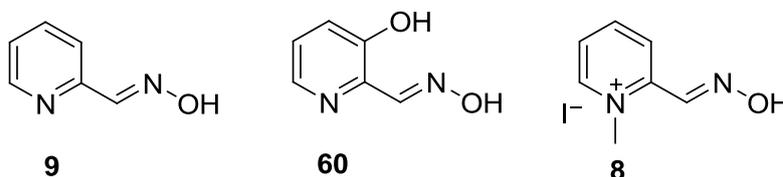


Figure 31 : Structure des pyridinaldoximes testées.

##### 3.4.1.1 Synthèse du composé 60

Ce composé a été synthétisé en deux étapes à partir de la 2-hydroxyméthyl-3-hydroxypyridine. Il est tout d'abord oxydé avec un rendement de 33% par traitement avec  $\text{MnO}_2$  pour donner le composé **61**. La formation de l'oxime a alors été réalisée suivant le protocole A, pour donner le composé **60** avec un rendement de 68% (Schéma 25).

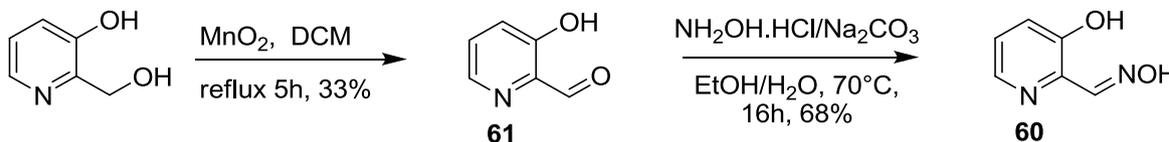
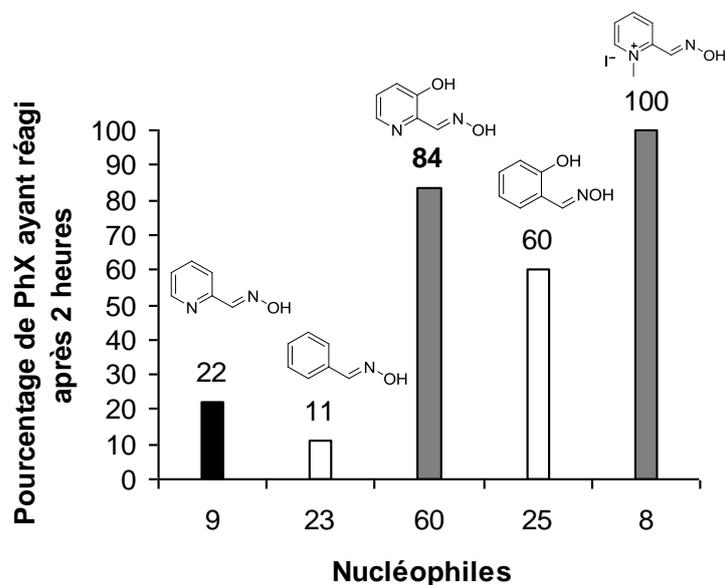


Schéma 25 : Synthèse du composé **62**.

### 3.4.2 Résultats du test de criblage des pyridinaldoximes

Le test de criblage général a été effectué sur chacune des molécules de cette série de pyridinaldoximes (Graphique 10). La barre noire correspond au composé de référence pour cette série, ici la pyridinaldoxime **9**.



Graphique 10 : Résultats obtenus pour la série des pyridinaldoximes (noir et gris) et comparaison avec les benzaldoximes (blanc).

Nous observons une amélioration de l'efficacité vis-à-vis de l'hydrolyse du **PhX** avec les composés pyridiniques. Dans le cas de la pyridinaldoxime **9** l'hydrolyse du **PhX** est de 22% contre 11% pour la benzaldoxime **23**. L'efficacité a ainsi été multipliée par deux du fait de la substitution du noyau phényle par le noyau pyridine. Pour cette série également la présence du groupement hydroxyle en ortho de la fonction oxime permet une augmentation significative de la réactivité qui atteint 84%, contre 60% pour le dérivé phényle **25**. Cette série de pyridinaldoxime montre que la combinaison noyau pyridine et fonction hydroxyle en ortho de l'oxime permet de passer de 11% d'hydrolyse à 84% d'hydrolyse du **PhX**.

### 3.5 Les pyridylamidoximes

#### 3.5.1 Structure des nucléophiles

De la même façon que pour la fonction oxime, nous avons testé une série de pyridylamidoximes. A cet effet, cinq composés ont été synthétisés (Figure 32).

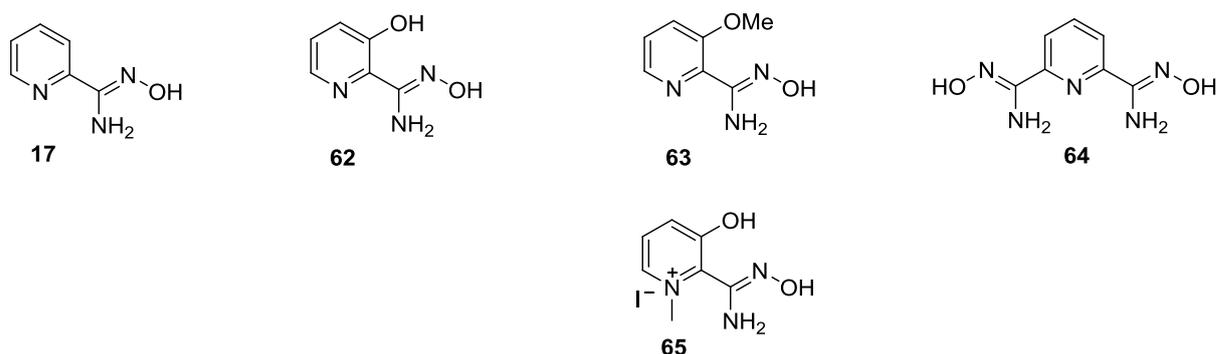


Figure 32 : Structure des pyridylamidoximes testées.

Les composés **62** et **64** ont été obtenus en une étape, en utilisant le protocole B, à partir des nitriles correspondants avec des rendements respectifs de 82% et 95% (Schéma 26).

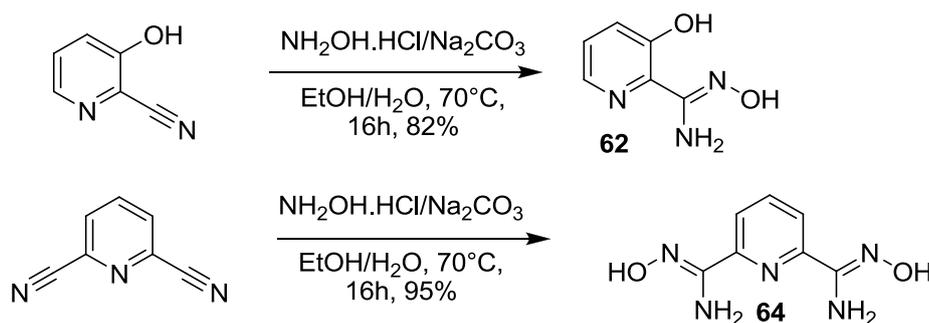


Schéma 26 : Synthèse des composés **62** et **64**.

Le composé **63** a été obtenu en deux étapes à partir de la 2-cyano-3-hydroxypyridine. Dans un premier temps, l'alcool est méthylié en présence d'iodure de méthyle et de  $K_2CO_3$ , dans la DMF, avec un rendement de 91%. Le composé

**66** est converti en amidoxime **63** avec un rendement de 56% grâce au protocole B (Schéma 27).

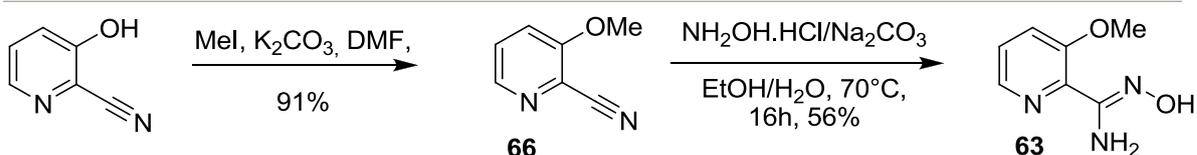


Schéma 27 : Synthèse du composé **63**.

Le composé **65** est obtenu en deux étapes également à partir de la 2-cyano-3-hydroxypyridine. Celle-ci est tout d'abord N-méthylée par l'iodure de méthyle à reflux dans le méthanol, avec un rendement de 44%. Le composé **67** est ensuite transformé en amidoxime par action d'une solution d'hydroxylamine dans l'eau (50% massique) dans le méthanol à reflux pendant 18 heures. Le rendement de cette dernière étape est de 45% (Schéma 28).

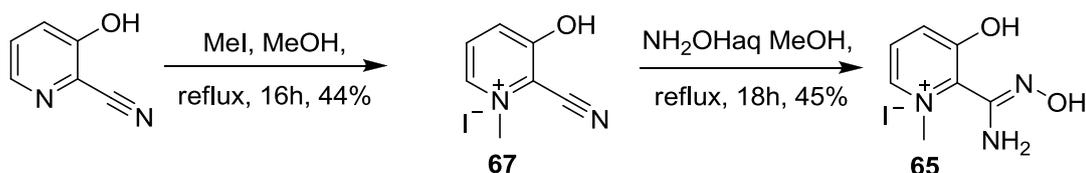
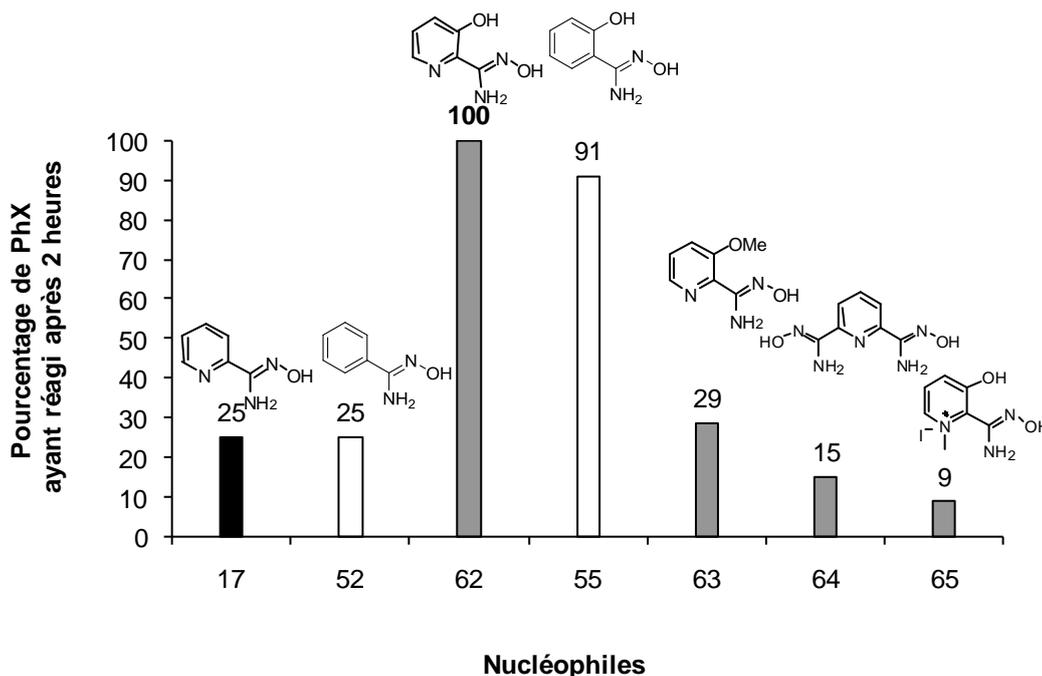


Schéma 28 : Synthèse du composé **65**.

### 3.5.2 Résultats du test de criblage des pyridylamidoximes

Le test de criblage général a été effectué sur chacune des molécules de cette série de pyridylamidoximes (Graphique 11). La barre noire correspond au composé de référence pour cette série, ici la pyridylamidoxime **17**.



Graphique 11 : Résultats obtenus pour la série de pyridylamidoximes (noir et gris) et comparaison avec les benzamidoximes (blanc).

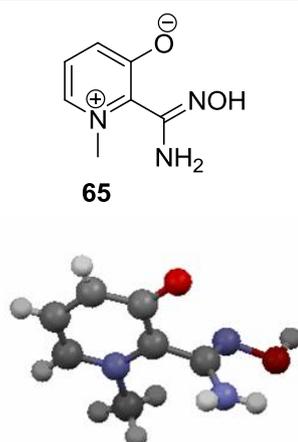
D'après les résultats obtenus, il semble que pour la pyridylamidoxime **17** et la benzamidoxime **52**, la substitution du noyau phényle par le noyau pyridine soit sans effet sur la réactivité puisque ces deux composés hydrolysent la même quantité de **PhX** en deux heures soit 25%. En revanche, dans le cas des composés ortho hydroxylés, l'hydrolyse passe de 91% pour le composé **55** (noyau phényle) à 100% pour le composé **62** (noyau pyridine).

Le composé **62**, possédant un groupement hydroxyle en position ortho de la fonction amidoxime permet une hydrolyse totale du **PhX**. Cette augmentation de la réactivité de la fonction amidoxime est, comme nous l'avons déjà observé, probablement due à la formation d'une liaison intramoléculaire entre l'hydrogène de la fonction hydroxyle et l'azote de la fonction amidoxime. Les résultats obtenus avec le composé **63** vont également dans ce sens. En effet, lorsque la fonction alcool est protégée sous forme de méthoxy, nous n'observons que 29% d'hydrolyse, soit la même quantité que pour le composé **17** ne possédant pas de groupement hydroxyle en position ortho. Même si elle n'a jamais été mise en évidence sur la fonction amidoxime l'existence d'une liaison intramoléculaire entre l'hydrogène du groupement hydroxyle en ortho et le doublet libre de l'azote de la

fonction amidoxime semble plus que probable. En tout cas les résultats obtenus avec cette série et la série de benzamidoximes vont dans ce sens.

La réactivité des composés **64** et **65** est inférieure à celle du composé **17**. Or il était possible de penser que la bisamidoxime **64** serait plus efficace que la simple amidoxime **17** du fait de l'action simultanée de deux fonctions amidoximes, mais en fait elles se désactivent l'une l'autre à travers le cycle aromatique, et on observe seulement 15% d'hydrolyse. Il était également possible de penser qu'en cumulant l'effet du pyridinium et du groupement hydroxyle en ortho sur le composé **65** nous aurions une augmentation de la réactivité. Or, l'hydrolyse est seulement de 9%. L'élucidation de la structure de ce composé par diffraction des rayons X, nous a permis de comprendre que l'hydroxyle se trouve en réalité totalement déprotoné (présence d'une forme zwitterionique) (Figure 33). De ce fait la liaison hydrogène intramoléculaire ne peut s'établir.

---



---

Figure 33 : Structure du composé **65** : un zwitterion.

La fonction amidoxime est en fait une fonction oxime dont l'un des substituants ( $R_1$ ) est un groupement amino. Nous avons pu observer que la nature de ce groupement a une influence importante sur la réactivité de la fonction oxime, puisque les amidoximes ont donné de meilleurs résultats que les oximes. Nous avons donc choisi de synthétiser une série en faisant varier la nature du substituant  $R_1$  afin de tester son influence sur la réactivité (Figure 34).

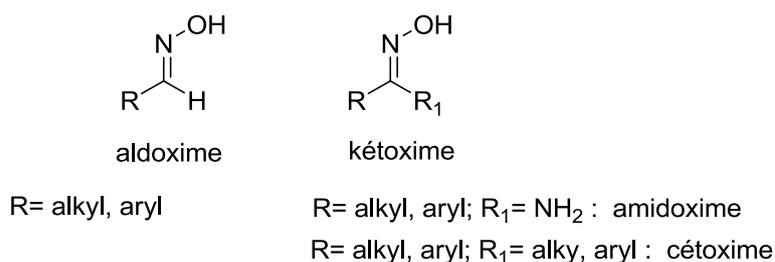


Figure 34 : Structure des oximes, cétoximes et amidoximes.

### 3.6 Série d'oximes permettant de faire varier les substituant R et R<sub>1</sub>

#### 3.6.1 Synthèse des composés

Une série de quatre cétoximes et de deux N'-hydroxy-N,N-diméthylbenzimidamides a été synthétisée et testée (Figure 35).

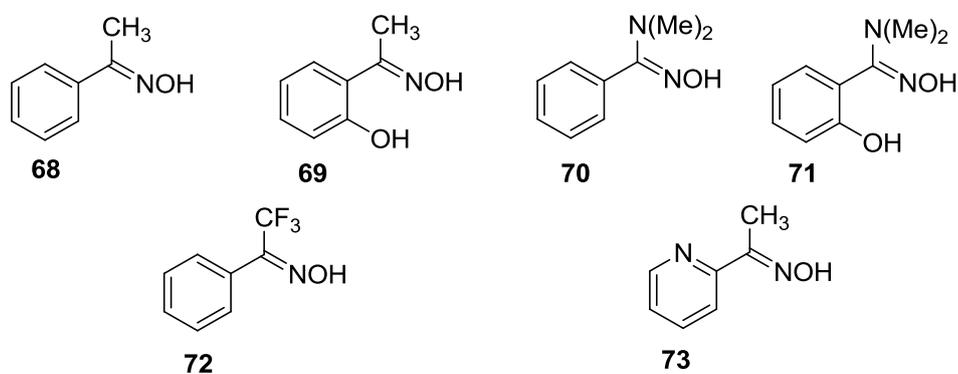


Figure 35 : Structure des molécules testées pour cette série.

Les composés **68**, **69**, **72** et **73** ont été obtenus en une étape à partir des cétones correspondantes avec des rendements compris entre 55% et 98% (Schéma 29).

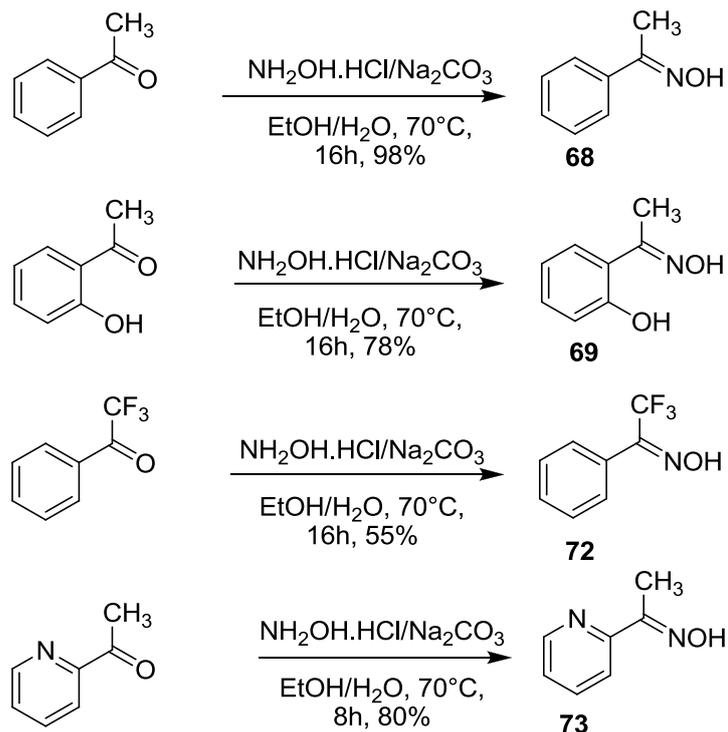


Schéma 29 : Synthèse des cétoximes.

Les composés **70** et **71** ont été synthétisés en deux étapes à partir des benzaldoximes **23** et **25**. La chloration des oximes par la *N*-chlorosuccinimide permet d'obtenir les intermédiaires **74** et **75**. Ces composés étant instables, il s'en suit directement une substitution nucléophile du chlore par la *N,N*-diméthylamine pour obtenir les composés **70** et **71** avec des rendements respectifs de 50% et 55% sur les deux étapes (Schéma 30).

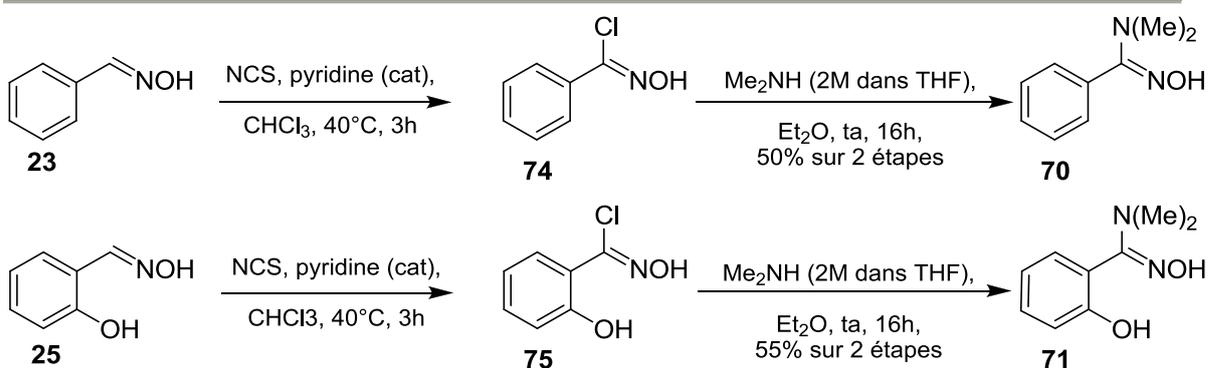
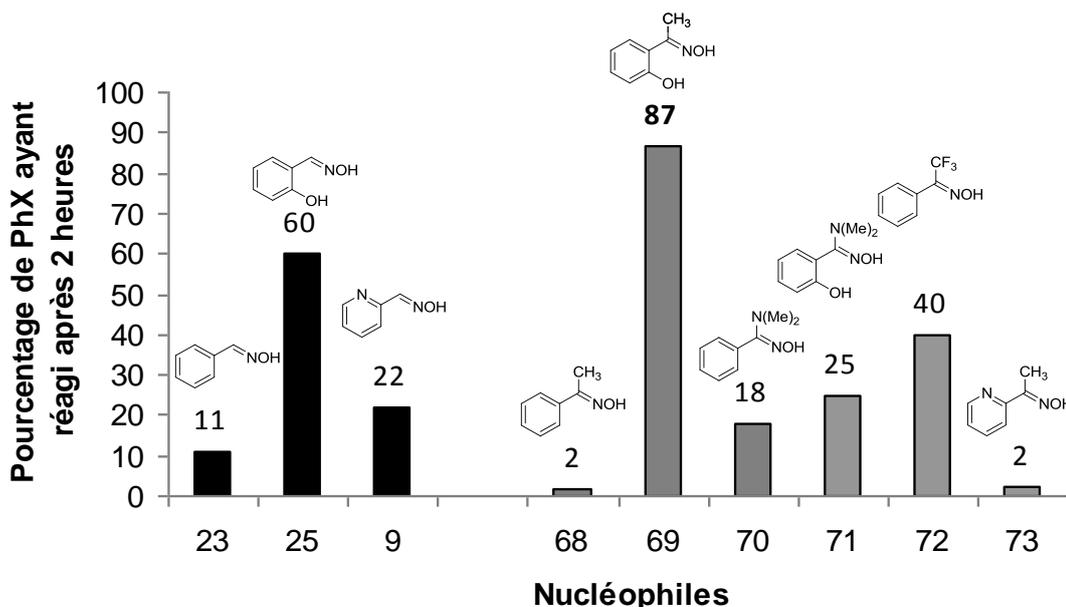


Schéma 30 : Synthèse des composés **70** et **71**.

### 3.6.2 Résultats du test de criblage des composés

Les six composés ont été soumis au test de criblage et les résultats sont présentés par le graphique 12. Les trois barres noires correspondent aux composés aldoximes de référence pour cette série.



Graphique 12 : Résultats obtenus pour cette série.

Dans un premier temps, nous nous intéressons aux composés **68**, **70** et **72** ne possédant pas de groupement hydroxyle en ortho de la fonction oxime. Nous comparons leur résultat avec la benzaldoxime **23** qui hydrolyse 11% de **PhX**. Nous observons que lorsque  $R_1 = \text{CH}_3$  (**68**) la quantité de **PhX** hydrolysée chute à 2%. En revanche lorsque  $R_1 = \text{N}(\text{Me})_2$  (**70**) et  $R_1 = \text{CF}_3$  (**72**), le pourcentage de **PhX** hydrolysé est supérieur à celui obtenu avec la benzaldoxime **23**, pourtant les groupements  $\text{N}(\text{Me})_2$  et  $\text{CF}_3$  ont des influences électroniques opposées. En effet, nous pouvons grâce aux effets électroniques prévoir l'effet du substituant  $R_1$  sur l'acidité de la fonction oxime. Ainsi les groupements électro-attracteurs ( $\text{CF}_3$ , **72**, effet -I) devraient diminuer le pKa de l'oxime, alors que les groupements électro-donneurs ( $\text{N}(\text{Me})_2$ , **70**, effet +M, et  $\text{CH}_3$ , **68**, effet +I) devraient augmenter ce même pKa.

La valeur du pKa de l'oxime pour les composés **23** et **68** est donnée dans le tableau 2.

| Composé   | R <sub>1</sub>  | pKa  | Pourcentage de PhX ayant réagi après 2 heures |
|-----------|-----------------|------|-----------------------------------------------|
| <b>68</b> | CH <sub>3</sub> | 12,0 | 2%                                            |
| <b>23</b> | H               | 10,9 | 11%                                           |

Tableau 2 : Valeur des pKa des fonctions oximes.

La présence d'un groupement CH<sub>3</sub> (composé **68**) sur l'oxime a pour conséquence une augmentation significative du pKa de l'oxime qui passe de 10,9 (composé **23**) à 12,0 et donc une diminution de la réactivité. En revanche la présence du groupement R<sub>1</sub>= N(Me)<sub>2</sub> (**70**), également électro-attracteur, se traduit par une augmentation de la réactivité. Il serait donc intéressant de mesurer la valeur pKa de la fonction oxime du composé **70** afin de la relier à la réactivité. En ce qui concerne le composé **72**, R<sub>1</sub>= CF<sub>3</sub> (40% de **PhX** hydrolysé), la réactivité est améliorée par rapport au composé **23**, R<sub>1</sub>= H (11% de **PhX** hydrolysé) ce qui en accord avec l'influence du groupement CF<sub>3</sub> sur le pKa de la fonction oxime.

Les résultats obtenus avec les composés ayant un groupement hydroxyle en position ortho de la fonction oxime, soit les composés **69** et **71**, sont comparés à celui obtenu avec la 2-hydroxybenzaloxime **25** (60% de **PhX** hydrolysé). Comme dans les séries précédentes une amélioration de la réactivité est observée par rapport aux composés n'ayant pas de groupement hydroxyle en ortho. Lorsque R<sub>1</sub>= CH<sub>3</sub> (composé **69**) la quantité de **PhX** hydrolysé est de 87%, soit une amélioration de la réactivité par rapport au composé **25** malgré l'effet électro-donneur du groupement méthyle. Le tableau 3 indique les valeurs des pKa pour les composés **25** et **69**.

| Composé   | R <sub>1</sub>  | pKa | Pourcentage de PhX ayant réagi après 2 heures |
|-----------|-----------------|-----|-----------------------------------------------|
| <b>25</b> | H               | 9,3 | 60%                                           |
| <b>69</b> | CH <sub>3</sub> | 9,2 | 87%                                           |

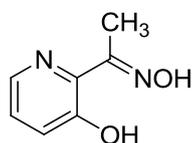
Tableau 3 : Valeur des pKa des fonctions oximes.

D'après le pKa du composé **68** (12,0), on sait que l'influence du groupement R<sub>1</sub>= CH<sub>3</sub> est une augmentation du pKa de l'oxime. Or lorsqu'il y a un groupement

hydroxyle en ortho (**69**) le pKa chute à 9,2 et donc l'effet du groupement OH annule celui du groupement CH<sub>3</sub> en ce qui concerne l'acidité de la fonction oxime. Etant donnée la proximité des valeurs des pKa des composés **25** et **69**, ceux-ci ne peuvent à eux seuls expliquer la différence de réactivité entre ces deux composés. Cette observation va dans le sens d'une réactivité particulière des oximes ortho-hydroxylées. Dans le cas du composé **71**, pour lequel R<sub>1</sub>= N(Me)<sub>2</sub>, le pourcentage d'hydrolyse du **PhX** est de 25% seulement, ce qui en fait le composé ortho-hydroxylé le moins efficace.

Une seule cétoxime sur le noyau pyridine a été synthétisée et testée, il s'agit du composé **73** pour lequel R<sub>1</sub>= CH<sub>3</sub> qui permet d'hydrolyser 2% de **PhX**. Ce résultat est en accord avec celui obtenu pour le composé **67** qui hydrolysait également 2% de **PhX**.

L'étude de cette série a permis d'obtenir des résultats intéressants qui demandent à être confirmés par la synthèse et l'évaluation d'autres composés. Notamment le composé présenté par la figure 36 qui devrait hydrolyser au moins 87% de **PhX** comme le composé **69**.



---

Figure 36 : Structure d'un composé potentiellement intéressant à tester.

La présence du groupement hydroxyle en ortho influence de manière très importante la réactivité de la fonction oxime et les résultats obtenus vont dans le sens d'une réactivité particulière des oximes ortho-hydroxylées. En effet, il a été montré que deux composés (**25** et **69**) ayant des pKa très proches (9,3 et 9,2) ont des réactivités assez différentes (60% et 87%), ce qui laisse à penser que la valeur du pKa de l'oxime ne peut à elle seule expliquer la réactivité de ces composés vis-à-vis de l'hydrolyse du **PhX**. Il serait également intéressant d'élargir la gamme des groupements R<sub>1</sub> étudiée aux alkyles et aryles ainsi que d'étudier l'influence de la substitution en position 5 du noyau phényle sur le pKa de l'oxime et sur la réactivité.

## 3.7 Les acides hydroxamiques

### 3.7.1 Structure des acides hydroxamiques

Dans le cadre d'une collaboration ANR avec l'équipe du Professeur P.Y Renard nous avons testé deux acides hydroxamiques synthétisés par Ludivine Louise-Leriché (produit notés **LUD**) afin d'évaluer leur efficacité sur l'hydrolyse du **PhX**. Cette série a été complétée par un composé commercial (**77**) et deux composés que nous avons synthétisés (**76** et **78**) (Figure 37).

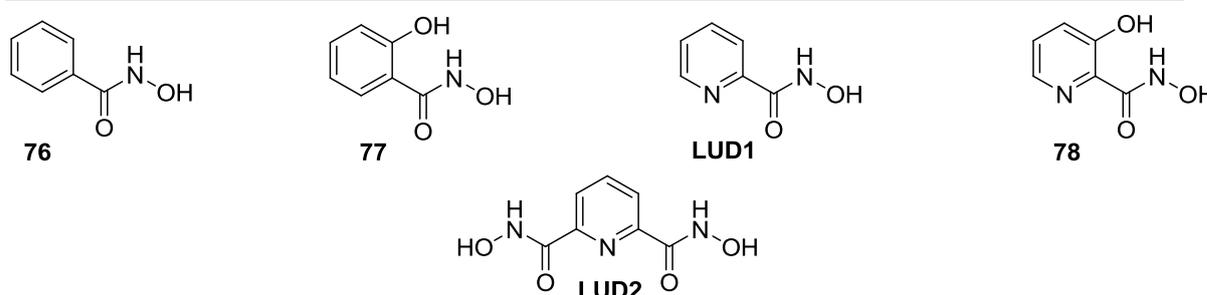


Figure 37 : Structure des acides hydroxamiques testés.

### 3.7.2 Synthèse des acides hydroxamiques

Les acides hydroxamiques sont, de façon générale, obtenus par addition de l'hydroxylamine sur un ester carboxylique (en général méthylique), à température ambiante, suivie de l'élimination de l'alcool correspondant.<sup>90</sup> Nous avons utilisé les procédures de synthèse décrites par Ludivine Louise –Leriché lors de ses travaux de thèses.<sup>91</sup> Les esters méthyliques ont été obtenus à partir des acides correspondant chauffés à reflux en présence de méthanol et d'acide sulfurique. Ainsi les esters **79** et **80** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 71%

<sup>90</sup> H.L. Yale, *Chem. Rev.*, **1943**, 33, 209-256.

<sup>91</sup> L. Louise-Leriché, *Ingénierie Chimique Immunocentrée des Anticorps Application à la Dégradation des Neurotoxiques Organophosphorés*, Thèse de doctorat de l'Université de Rouen, **2007**.

et 45%. La deuxième étape met en œuvre l'hydroxylamine aqueuse dans un milieu MeOH/THF en présence d'une quantité catalytique de KCN (Schéma 31).<sup>92</sup>

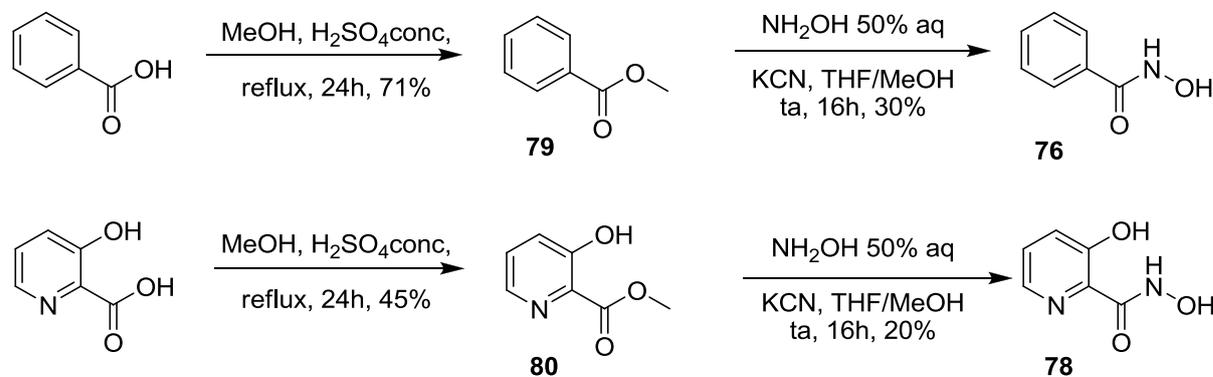


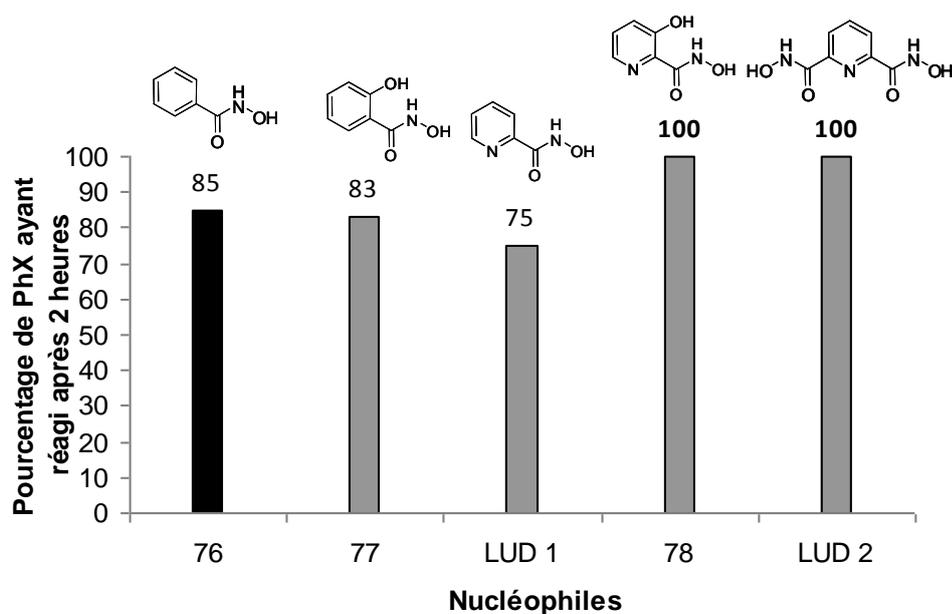
Schéma 31 : Synthèse des acides hydroxamiques.

Après purification, les deux acides hydroxamiques ont pu être isolés avec des rendements respectifs de 30% et 20%.

### 3.7.3 Résultats du test de criblage pour les acides hydroxamiques

La réactivité des cinq acides hydroxamiques a été évaluée grâce au test de criblage (Graphique 13). La barre noire correspond au composé **76** référence pour cette série.

<sup>92</sup> C.Y. Ho, E. Strobel, J. Ralbovsky, R.A. Galemno, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 4873-4875.



Graphique 13 : Résultats du test pour les acides hydroxamiques.

La fonction acide hydroxamique permet d'obtenir d'excellents résultats avec le test de criblage puisque tous les composés testés hydrolysent au moins 75% du **PhX**. Notamment deux composés permettent d'hydrolyser la totalité du **PhX** en deux heures. Les résultats obtenus avec les dérivés pyridiniques et les dérivés phényles sont contradictoires, en effet sur les dérivés phényles la présence de la fonction hydroxyle en ortho (composé **77**) n'influence pas la réactivité. En revanche dans le cas des dérivés pyridiniques, la présence de la fonction hydroxyle en ortho de la fonction acide hydroxamique permet de passer de 75 % d'hydrolyse avec le composé **LUD 1** à 100% d'hydrolyse avec le composé **78**. Cette différence pourrait s'expliquer par les deux formes tautomères des acides hydroxamiques (Figure 38).



Figure 38 : Deux formes tautomères possibles des acides hydroxamiques.

Si l'acide hydroxamique est dans la configuration **I**, il n'y a pas de doublet libre sur l'azote disponible pour la liaison intramoléculaire avec le groupement hydroxyle en

ortho. En revanche dans la configuration **II** l'existence de la liaison hydrogène intramoléculaire est possible. La différence de réactivité observée pourrait donc s'expliquer par les deux formes tautomères. Le résultat obtenu avec la molécule **LUD 2** est également intéressant puisqu'elle permet d'hydrolyser 100% du **PhX** en deux heures. Précédemment le composé **64** possédant deux groupements amidoximes en position 2 et 6 du noyau pyridine permettait d'hydrolyser seulement 15% de **PhX** du fait de la désactivation des deux fonctions amidoximes probablement par conjugaison avec le cycle hétéro-aromatique. Si le composé **LUD 2** est dans configuration **I**, les deux fonctions acides hydroxamiques sont indépendantes, la conjugaison avec le cycle n'affectant que le groupement carbonyle et pas le groupement réactif N-hydroxyle de la fonction acide hydroxamique. Les analyses des composés par diffraction aux rayons X permettraient d'élucider les structures et de valider ces hypothèses.

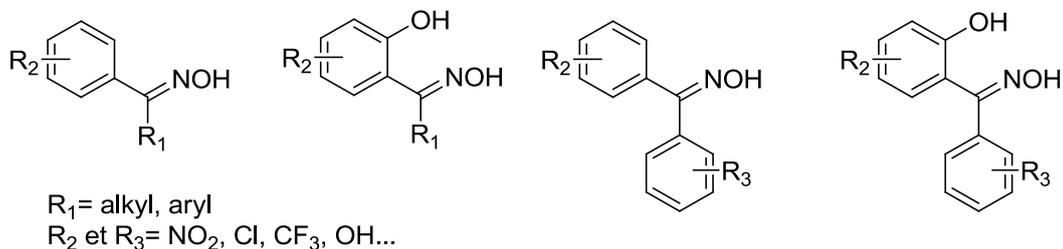
### 3.8 CONCLUSION

Le test de criblage des nucléophiles sur la réaction d'hydrolyse du **PhX** a permis d'identifier de nouvelles structures pour la décontamination des agents de type **V**. Trois fonctions ont attiré notre attention et ont ainsi été plus particulièrement étudiées. Il s'agit de la fonction oxime (déjà connue pour cette utilisation) et des fonctions amidoxime et acide hydroxamique. Plus particulièrement les oximes et amidoximes ortho-hydroxylées ont montré une réactivité très intéressante attribuée à l'existence d'une liaison intramoléculaire entre l'hydrogène de la fonction hydroxyle et l'azote de la fonction oxime, qui a pour première conséquence une diminution du pKa de l'oxime. Il est également possible que cette famille de composés ait une réactivité particulière, des études de pKa et de cristallographie pourraient permettre de mieux comprendre cette réactivité. Dans ce but des études de pKa sont en cours au laboratoire.

De manière générale, les dérivés pyridiniques sont plus actifs que les dérivés phényles, toutefois ces derniers sont de bons modèles qui permettent d'avoir accès facilement à une plus grande diversité de structures.

La dernière famille étudiée pour laquelle les substituants R et R<sub>1</sub> de l'oxime varient a donné des résultats encourageants et son étude mériterait d'être élargie à d'autres structures (Figure 39).

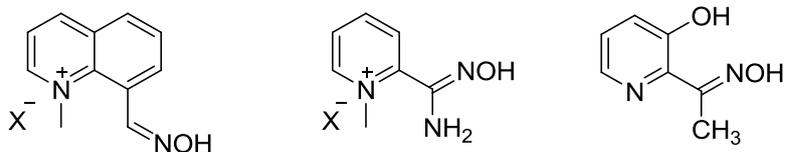
---



**Figure 39 :** Structure de composés potentiellement intéressants à tester.

D'autres composés pourraient également être envisagés afin de compléter les séries déjà étudiées (Figure 40).

---



**Figure 40 :** Autres structures permettant de compléter l'étude.

Le test de criblage a permis de sélectionner neuf premiers composés originaux potentiellement aussi efficaces que la pralidoxime **3** (Figure 41).

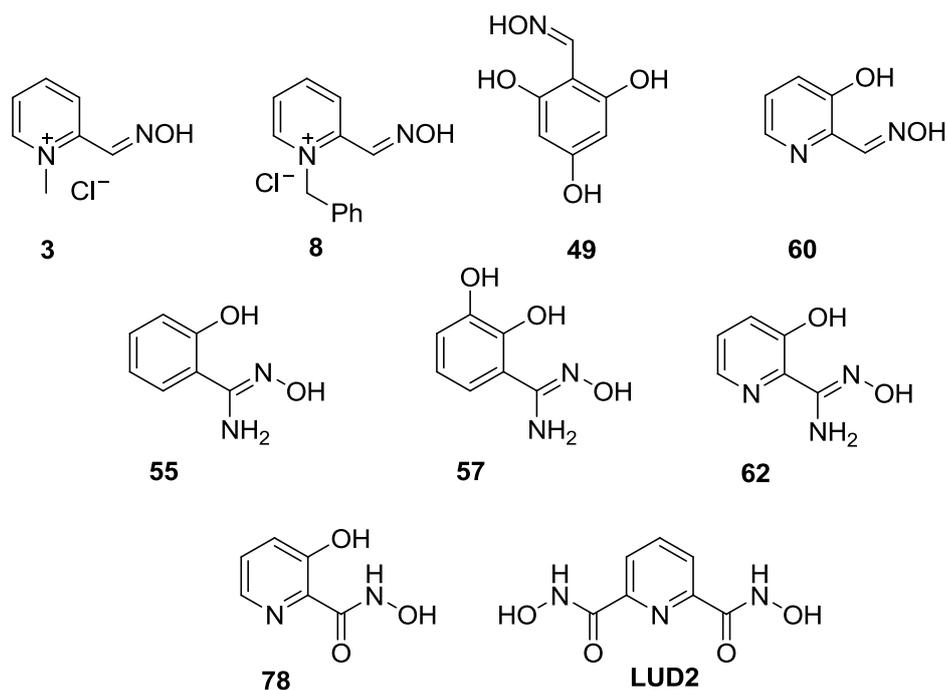


Figure 41 : Structure des premières molécules les plus actives identifiées lors du test de criblage.

La suite de notre étude nous a mené à mieux caractériser la cinétique d'hydrolyse du **PhX** par ces composés afin de pouvoir les comparer entre eux.

Par ailleurs, les composés les plus réactifs seront testés directement dans des tests *in vitro* pour la réactivation de l'AChE. Ces deux études font l'objet du chapitre suivant.

---

**CARACTERISATION CINETIQUE DE  
L'HYDROLYSE DU PhX  
ET REACTIVATION DE l'AcH<sub>E</sub>**

---

## 1 CARACTERISATION CINÉTIQUE DE L'HYDROLYSE DU **PhX**

La caractérisation cinétique de l'hydrolyse du **PhX** par les  $\alpha$ -nucléophiles va permettre de comparer l'efficacité des molécules et de déterminer si l'activité des  $\alpha$ -nucléophiles est catalytique.

### 1.1 Suivi cinétique de l'hydrolyse du **PhX** dans les conditions de criblage

Afin de caractériser le profil cinétique des premiers  $\alpha$ -nucléophiles sélectionnés par le test de criblage, l'hydrolyse du **PhX** a été suivie par CLHP. Les conditions expérimentales utilisées sont les mêmes que lors du test de criblage. Chaque échantillon, dont le volume total est de 5 mL, a été préparé dans un mélange acétonitrile/tampon Tris-HCl (0,1 N, pH 8,5) à 25°C dans un rapport 11/89, contient l' $\alpha$ -nucléophile testé à une concentration de 5 mM et du **PhX** à une concentration de 1 mM (soit 50  $\mu$ L de la solution mère à 100 mM dans l'acétonitrile). Le milieu réactionnel est injecté en CLHP toutes les 15 minutes afin de mesurer la disparition du **PhX** en fonction du temps.

#### 1.1.1 Les oximes

##### 1.1.1.1 Structure des composés

Parmi les différentes oximes testées précédemment, quatre ont été sélectionnées pour effectuer le suivi cinétique (Figure 42).

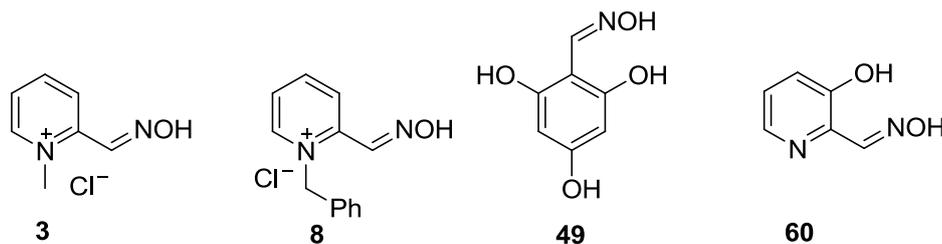
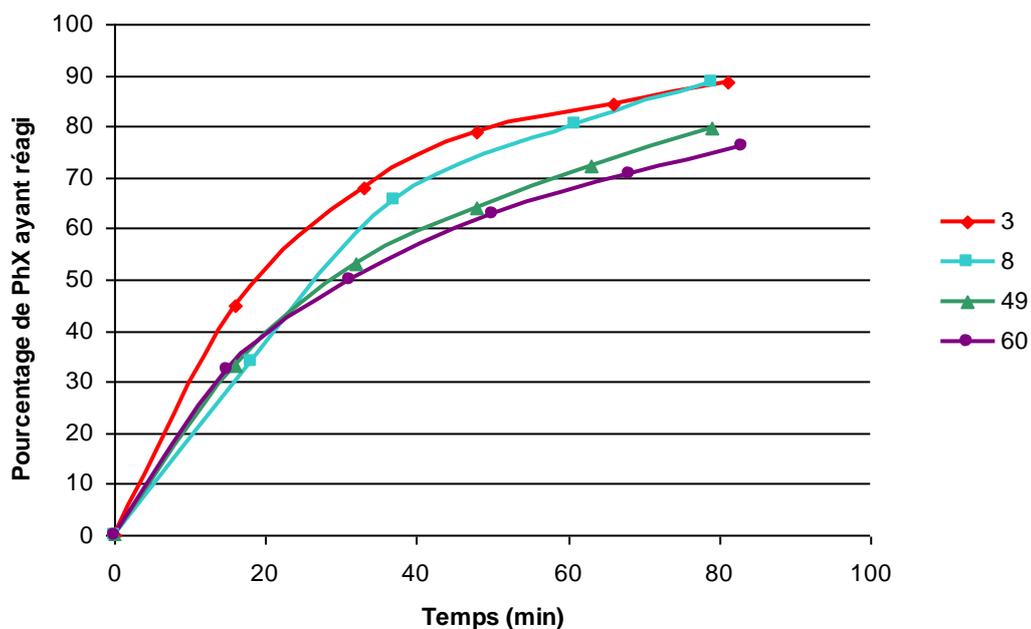


Figure 42 : Structures des quatre oximes.

### 1.1.1.2 Profils cinétiques

Le graphique ci-dessous (Graphique 14) présente les profils cinétiques obtenus pour ces nucléophiles.



Graphique 14 : Courbes cinétiques de l'hydrolyse du **PhX** par les oximes.

La courbe rouge représente le profil cinétique de l'hydrolyse du **PhX** par la pralidoxime **3**, composé de référence. Elle est d'ailleurs la plus rapide des oximes testées. Tous les autres profils cinétiques ont la même allure et tendent vers une hydrolyse totale du **PhX** de façon plus ou moins rapide.

## 1.1.2 Les amidoximes

### 1.1.2.1 Structure des composés

Trois amidoximes ont été sélectionnées grâce au test de criblage, elles possèdent toutes un groupement hydroxyle en position ortho de la fonction amidoxime (Figure 43).

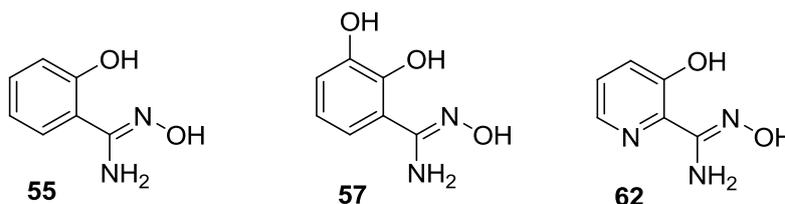
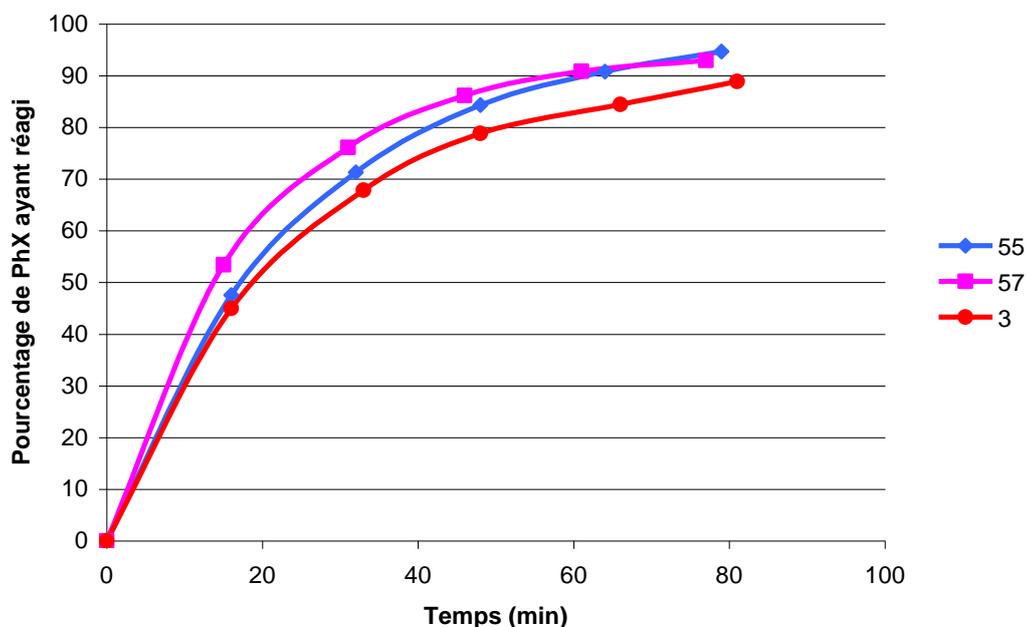


Figure 43 : Structure des trois amidoximes.

### 1.1.2.2 Profil cinétique

Le graphique ci-dessous (Graphique 15) présente les profils cinétiques obtenus pour ces nucléophiles.



Graphique 15 : Courbes cinétiques de l'hydrolyse du **PhX** par les amidoximes.

La courbe rouge rappelle le profil cinétique du composé de référence **3** en guise de comparaison. Les profils cinétiques de tous ces nucléophiles ont la même allure et de manière intéressante, les deux amidoximes **55** et **57** sont plus rapides que la pralidoxime **3**.

Notons que le profil cinétique de l'amidoxime **62** n'a pas pu être tracé dans les conditions utilisées ici, puisqu'au bout de 15 minutes, temps d'une analyse CLHP du milieu réactionnel, la totalité du **PhX** est hydrolysée. Ceci traduit une très bonne réactivité du composé **62**, il sera donc étudié plus en détails par la suite.

### 1.1.3 Les acides hydroxamiques

#### 1.1.3.1 Structure des composés

La structure des deux acides hydroxamiques analysés est représentée dans la figure 44.

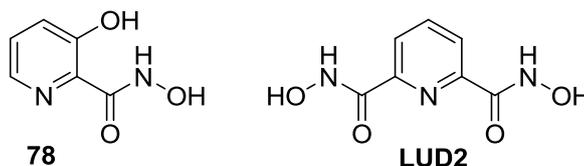
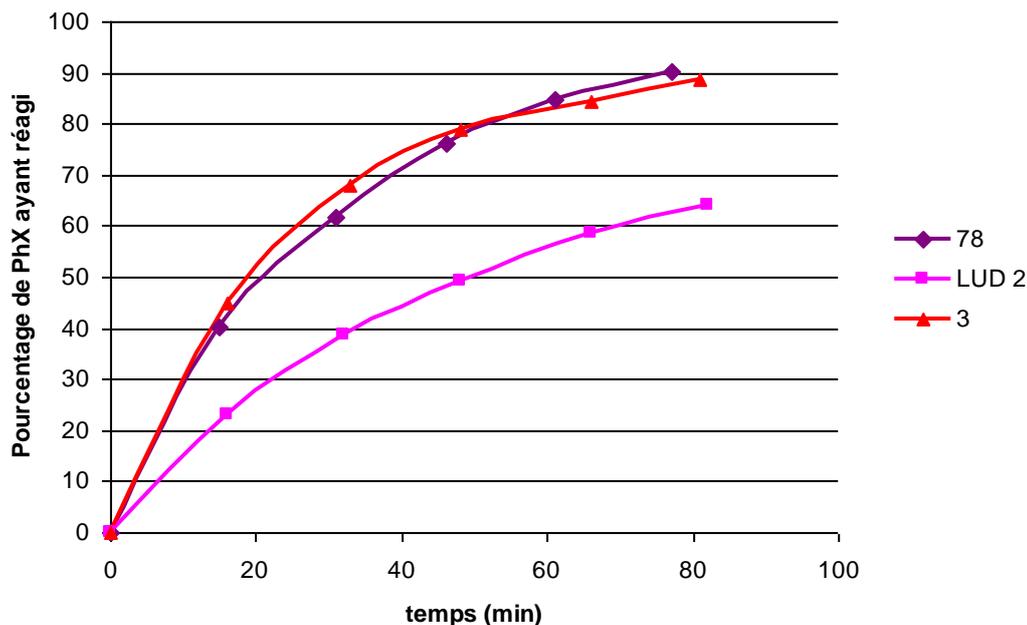


Figure 44 : Structure des deux acides hydroxamiques.

#### 1.1.3.2 Profil cinétique

Le graphique 16 présente les profils cinétiques obtenus pour ces deux nucléophiles.



Graphique 16 : Courbes cinétiques de l'hydrolyse du PhX par les acides hydroxamiques.

Comme pour les précédents graphiques, la courbe rouge représente le profil cinétique de la pralidoxime **3**. D'après leur profil cinétique, les acides hydroxamiques **78** et **LUD2** présentent des performances plus ou moins bonnes. En effet, alors que la réactivité **78** est très proche de celle de la pralidoxime **3**, **LUD2** est beaucoup moins efficace. Il est même le moins bons des neuf composés testés au cours de cette étude cinétique.

#### 1.1.4 Estimation des vitesses initiales

Afin de comparer les composés entre eux, les vitesses initiales ont été estimées. Le fait de travailler en excès de nucléophiles permet de remplir les conditions d'une cinétique de pseudo premier ordre en début de réaction et donc d'utiliser la méthode des tangentes à l'origine pour estimer la vitesse initiale à partir des profils cinétiques.

Les résultats obtenus pour les différentes molécules précédemment analysées sont récapitulés dans le tableau 4.

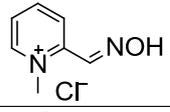
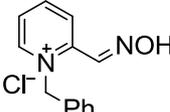
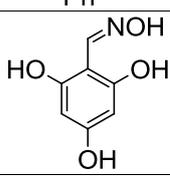
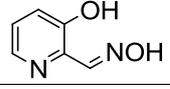
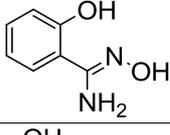
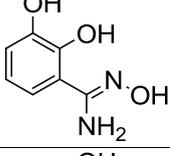
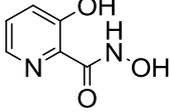
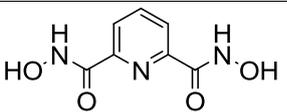
| Composé | Structure                                                                           | Vitesse initiale estimée en $\mu\text{mol}/\text{min}$ |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 3       |    | 30                                                     |
| 8       |    | 23,3                                                   |
| 49      |    | 22                                                     |
| 60      |    | 19                                                     |
| 55      |    | 31,3                                                   |
| 57      |   | 38,1                                                   |
| 78      |  | 28,6                                                   |
| LUD 2   |  | 14,7                                                   |

Tableau 4 : Estimation des vitesses initiales

La vitesse initiale pour la pralidoxime est estimée à  $30 \mu\text{mol}/\text{min}$ , les composés **55** et **78** ont quasiment la même réactivité que la pralidoxime. Le composé **57** est celui qui à la plus grande vitesse initiale avec  $38,1 \mu\text{mol}/\text{min}$ .

### 1.1.5 Conclusion

Les profils cinétiques et les estimations des vitesses initiales par la méthode des tangentes des neuf composés ont montré que les amidoximes **55**, **57** et **62** sont plus efficaces que la pralidoxime. La fonction amidoximes apparaît, suite à cette étude comme une fonction très intéressante pour la décontamination des NOP.

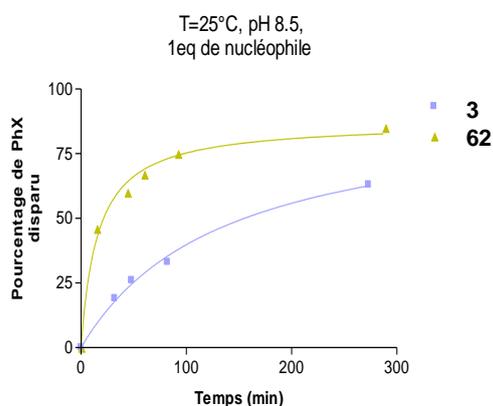
Notamment le composé **62** qui n'a pas pu être étudié dans les concentrations du test de criblage du fait de la rapidité de la réaction d'hydrolyse du **PhX**. Afin de pouvoir le comparer à la pralidoxime nous avons fait des études cinétiques complémentaires en faisant varier certaines conditions expérimentales.

## 1.2 Etude du composé **62** et comparaison avec la pralidoxime

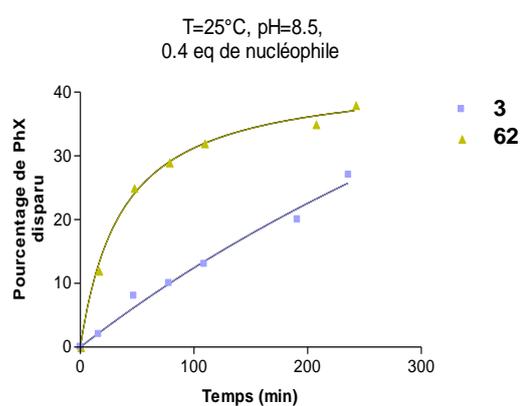
Dans cette deuxième partie nous allons comparer la réactivité de la 3-hydroxypyridylamidoxime **62** et de la pralidoxime **3** grâce à l'étude de leur profils cinétiques à différents ratios nucléophile/**PhX**.

### 1.2.1 Etude des différents ratios nucléophile/**PhX**

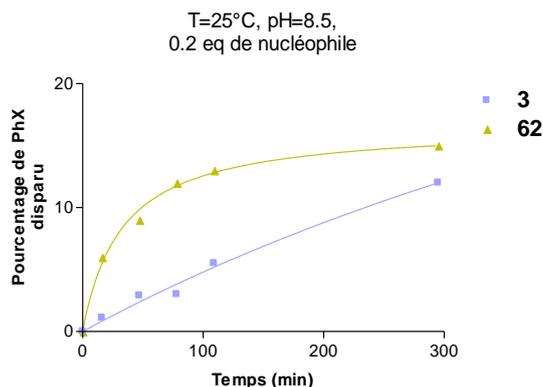
Trois ratios différents ont été étudiés. La quantité de **PhX** reste inchangée à 1mM et la concentration en  $\alpha$ -nucléophiles varie selon les expériences, soit 1 mM, 0,4 mM et 0,2 mM (Graphiques 17, 18 et 19). Le volume total des échantillons est toujours de 5 mL avec un rapport 11/89 acétonitrile/tampon Tris 0,1 N pH 8,5, les expériences se font à température ambiante. Les milieux réactionnels sont analysés toutes les 15 minutes par CLHP.



Graphique 17 : Etude du ratio 1/1



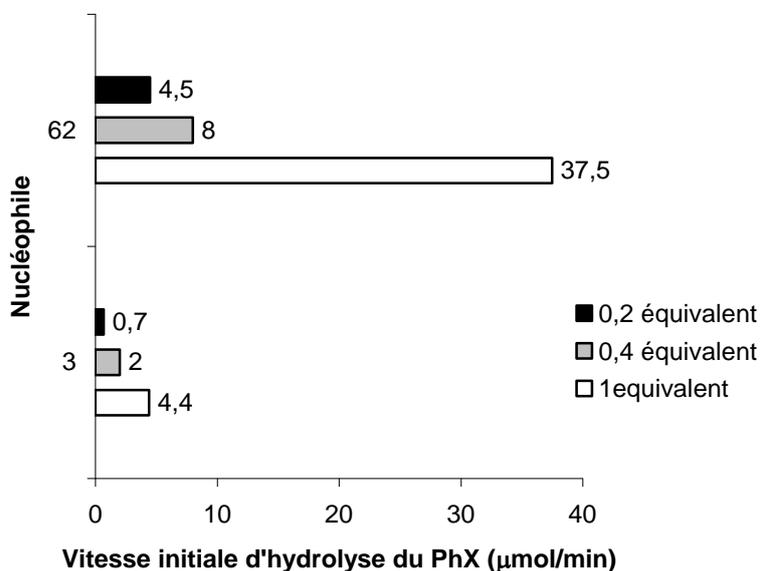
Graphique 18 : Etude du ratio 0,4/1



Graphique 19 : Etude du ratio 0,2/1

Les profils cinétiques obtenus confirment que la vitesse d'hydrolyse est plus rapide avec le composé **62** qu'avec la pralidoxime. Par ailleurs, ils ont des allures différentes, ce qui peut traduire un mécanisme d'hydrolyse différent. Le composé **62** s'inhibe alors que dans le cas de la pralidoxime l'hydrolyse semble être linéaire au cours du temps, sans inhibition.

Afin de comparer les deux composés, nous avons estimé les vitesses initiales par la méthode des tangentes (Graphique 20).



Graphique 20 : Estimation des vitesses initiales d'hydrolyse du **PhX** pour les différents ratios.

Les résultats obtenus sont assez éloquent, puisque la vitesse initiale pour la réaction d'hydrolyse du **PhX** par le composé **62** avec un ratio 1/1 est meilleure que

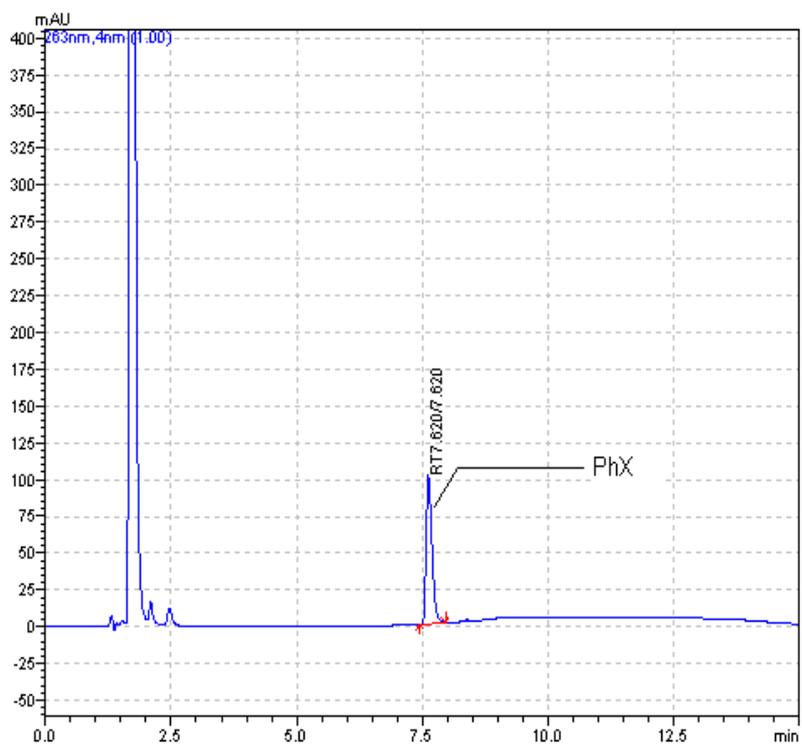
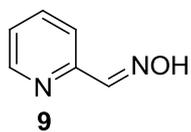
la vitesse initiale obtenue avec la pralidoxime avec un ratio 5/1, soit respectivement 37.5  $\mu\text{mol}/\text{min}$  et 30  $\mu\text{mol}/\text{min}$ .

Le composé **62** permet d'obtenir d'excellents résultats, mais ne présente pas pour autant d'activité catalytique pour l'hydrolyse du **PhX**.

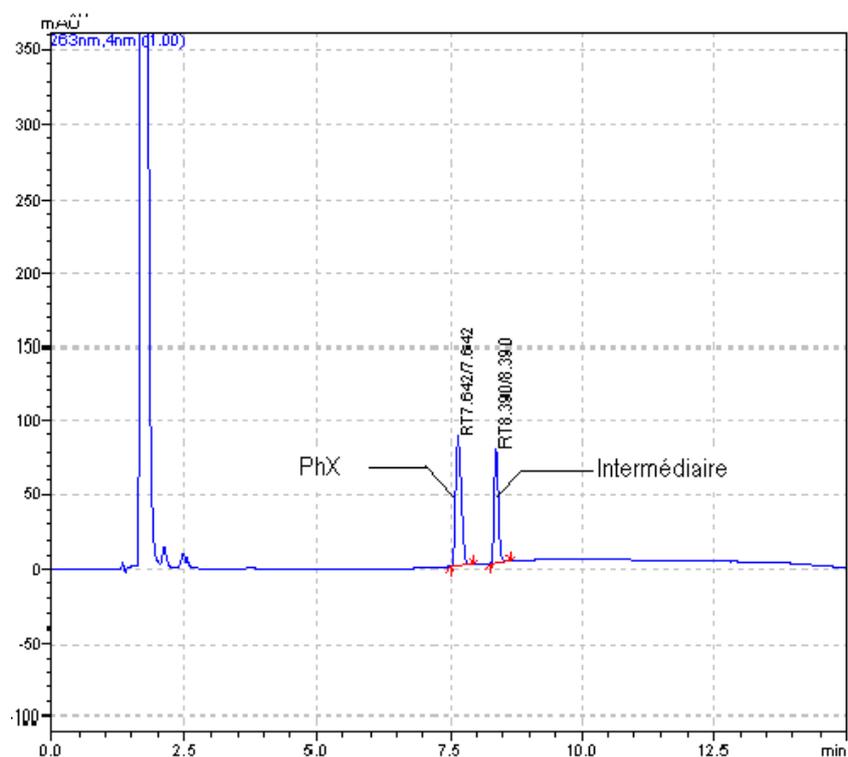
A la suite de ces résultats, les spectres CLHP du composé **9** ont été étudiés afin de déterminer la présence d'intermédiaires réactionnels pouvant expliquer les profils cinétiques.

### 1.2.2 Etude préliminaire des chromatogrammes obtenus par CLHP lors de l'hydrolyse du PhX par la pyridinaldoxime **9**

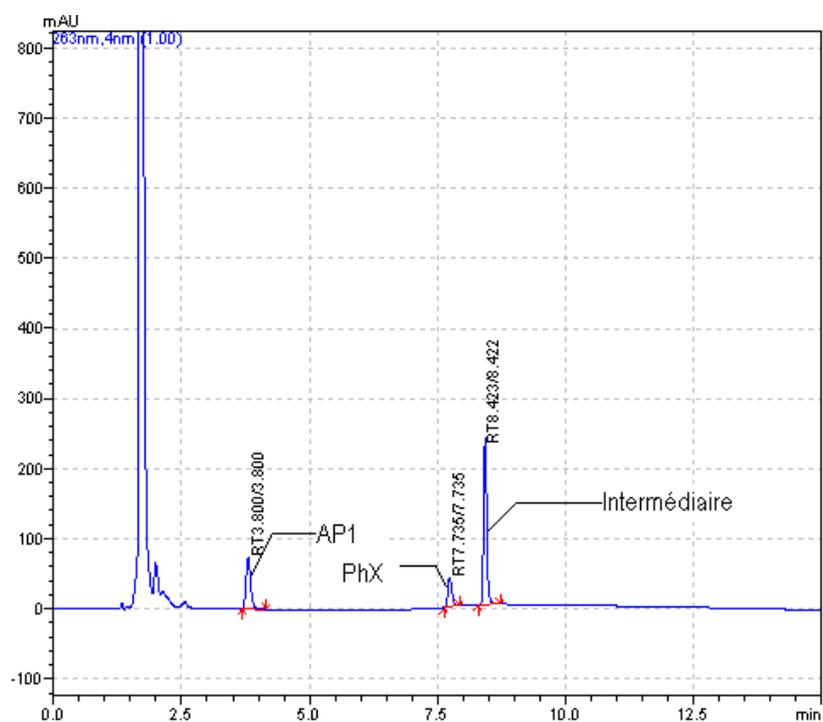
Lors du suivi CLHP des réactions d'hydrolyse du **PhX** par les  $\alpha$ -nucléophiles nous avons dans certains cas pu remarquer la formation d'un intermédiaire, identifié par l'apparition d'un nouveau pic sur les chromatogrammes. Cette observation est illustrée par les chromatogrammes correspondants au suivi d'hydrolyse du **PhX** par la pyridinaldoxime **9** à  $t= 0$ ,  $t= 3\text{h}$  et  $t= 48\text{h}$  (Chromatogramme 1, 2 et 3).



Chromatogramme 1 : Hydrolyse du **PhX** par l'oxime **9** à t=0.



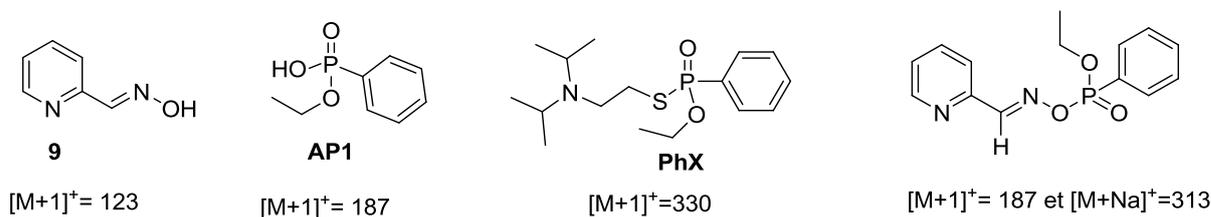
Chromatogramme 2 : Hydrolyse du PhX par l'oxime 9 à t= 3h.



Chromatogramme 3 : Hydrolyse du PhX par l'oxime 9 à t= 48h.

L'analyse par LCMS de l'échantillon a permis d'identifier quatre espèces dont les valeurs de l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  sont les suivantes : 123, 187, 330 et 291,

(313). Ces valeurs ont été attribuées aux quatre composés présentés dans la figure 45.



**Figure 45 :** Structures possibles des composés identifiés par LCMS.

L'intermédiaire serait donc une phosphoryloxime. Dans nos conditions d'hydrolyse cet intermédiaire non fugace semble relativement stable et libère lentement l'acide phosphononique **AP1** par hydrolyse. En effet, comme le montre le tableau 5, l'aire correspondant au pic du **PhX** diminue au profit de l'intermédiaire phosphoryloxime. Au bout de 8 heures de réaction le produit **AP1** commence à se former.

| Temps (heure) | Aires   |               |         |
|---------------|---------|---------------|---------|
|               | PhX     | Intermédiaire | AP1     |
| 0             | 993 062 | 0             | 0       |
| 2             | 913 520 | 286 955       | 0       |
| 5             | 800 731 | 660 104       | 0       |
| 8             | 789 670 | 939 065       | 53 938  |
| 24            | 609 161 | 1 589 445     | 211 913 |

**Tableau 5 :** Résultats d'analyse CLHP de la réaction d'hydrolyse du PhX par **9**.

La réaction d'hydrolyse du **PhX** avec le composé **9** semble donc être un processus en deux étapes probablement de cinétiques différentes et pourrait être réécrite de la manière suivante (Schéma 32). Au cours de cette réaction le nucléophile serait régénéré mais extrêmement lentement.

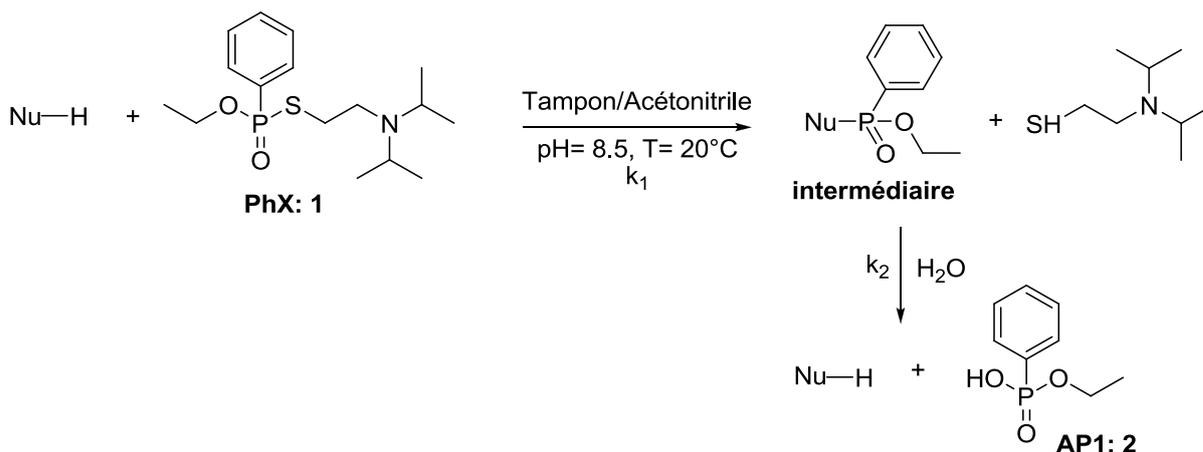


Schéma 32 : Hydrolyse du **PhX** avec formation d'un intermédiaire non fugace.

Par la suite la réaction a été étudiée à 40°C afin de vérifier la stabilité de l'intermédiaire formé (Tableau 6).

| Temps<br>(heure) | Aires     |               |           |
|------------------|-----------|---------------|-----------|
|                  | PhX       | Intermédiaire | AP1       |
| 0                | 1 005 896 | 0             | 0         |
| 2                | 913 986   | 325 819       | 0         |
| 5                | 800 120   | 638 697       | 138 658   |
| 8                | 733 052   | 658 840       | 342 428   |
| 24               | 243 663   | 353 235       | 1 258 630 |

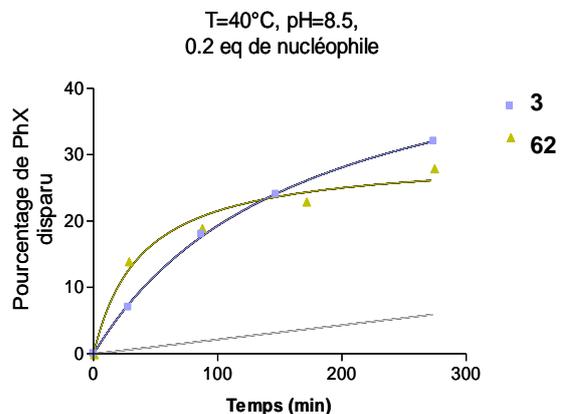
Tableau 6 : Résultats d'analyse CLHP de la réaction d'hydrolyse du PhX par **9** à 40°C.

Il apparait clairement lorsque l'on observe les intégrations des aires des différents pics que la stabilité de l'intermédiaire diminue avec l'élévation de température et que celui-ci s'hydrolyse pour donner **AP1** mais cette réaction reste trop lente pour avoir une activité catalytique.

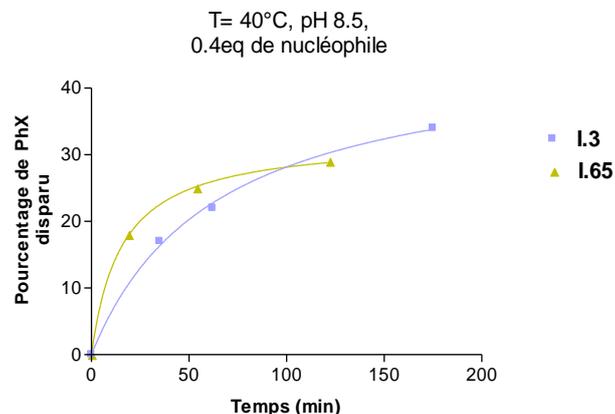
Grâce à cette étude nous avons pu mettre en évidence la formation d'un intermédiaire phosphoryloxime relativement stable. Nous allons donc étudier le comportement cinétique des composés **62** et **3** à l'élévation de température.

### 1.2.3 Etude de l'élévation de la température sur les profils cinétiques des composés 62 et 3

Nous avons fait varier la température de la réaction, que nous avons fait passer de 25°C à 40°C avec les ratios 0,2/1 et 0,4/1 (Graphiques 21 et 22).

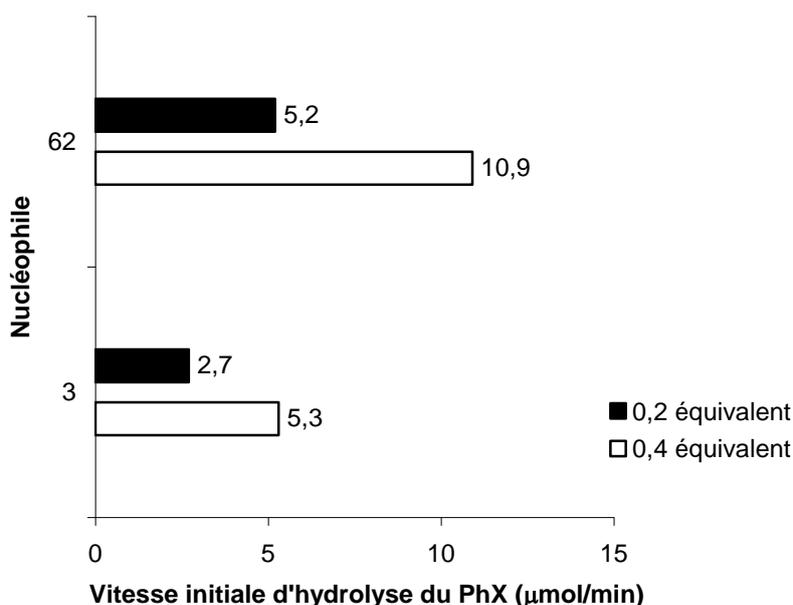


Graphique 21 : Etude du ratio 0,2/1 à 40°C.



Graphique 22 : Etude du ratio 0,4/1 à 40°C.

En augmentant la température de réaction à 40°C les profils cinétiques semblent avoir la même allure avec donc une inhibition du nucléophile. Il est possible de penser qu'en élevant la température, la vitesse réaction de formation de l'intermédiaire augmente plus rapidement que celle de l'hydrolyse de cet intermédiaire. La vitesse initiale (en  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) a également été évaluée (Graphique 23).



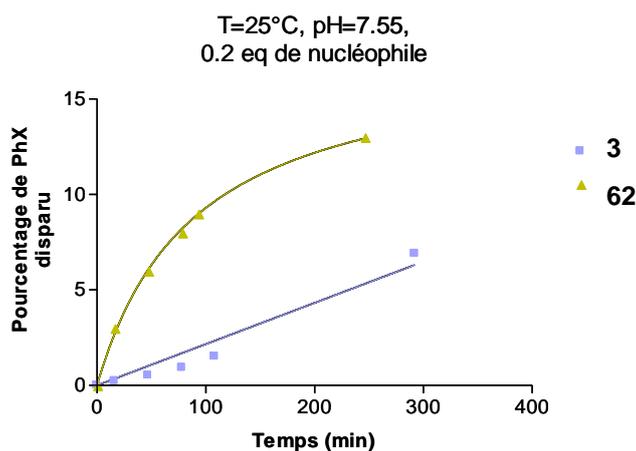
Graphique 23 : Estimation des vitesses initiales à 40°C.

Logiquement nous avons une accélération de la vitesse de la réaction d'hydrolyse liée à l'augmentation de la température. Le composé **62** est toujours plus rapide que la pralidoxime **3**. L'augmentation de la température d'hydrolyse à 40°C ne permet pas d'observer une activité catalytique pour l'un ou l'autre des deux composés.

Pour compléter cette étude nous avons réalisé les cinétiques à un autre pH.

#### 1.2.4 Etude de l'influence du pH sur les profils cinétiques

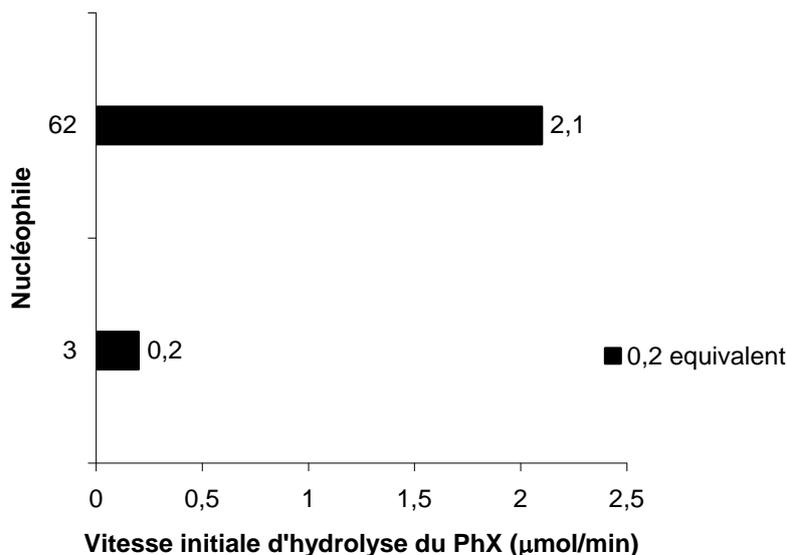
La réaction d'hydrolyse du **PhX** par les composés **62** et **3** a été étudiée à pH 7,55, à 25°C avec le ratio 0,2/1. Les résultats sont regroupés dans le graphique 24:



Graphique 24 : Etude du ratio 0,2/1 à pH 7,55.

Les deux profils sont de nouveau différents. Il semble qu'avec le ratio utilisé (0,2/1) la réaction entre la pralidoxime et le **PhX** soit relativement lente et dans le temps d'analyse (300 min) le plateau d'inhibition n'est pas atteint. Mais compte tenu du profil cinétique obtenu pour la pralidoxime à 40°C, il semble que celle-ci s'inhibe de la même manière que le composé **62**.

Les vitesses initiales ont également été estimées (Graphique 25).



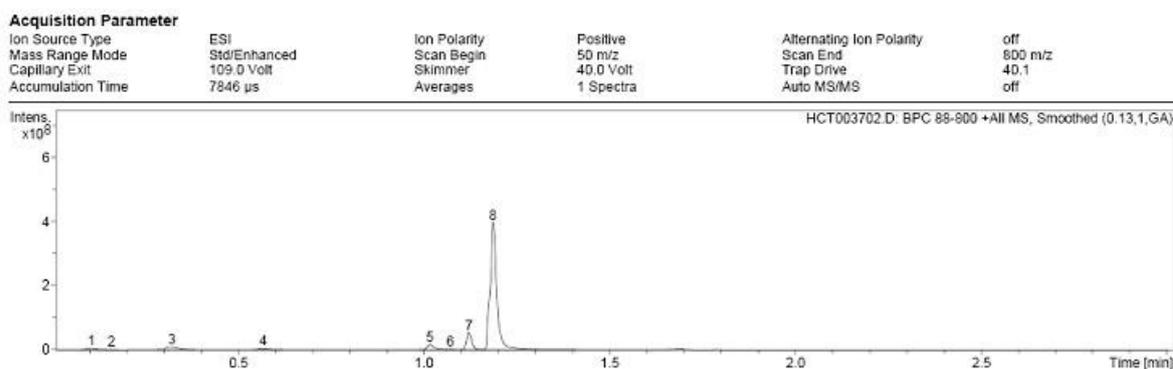
Graphique 25 : Estimation des vitesses initiales à pH 7,55.

La diminution du pH de la solution tampon d'une unité fait chuter la vitesse initiale de manière assez importante pour les deux composés. Ceci est dû à une diminution de la réactivité des deux fonctions qui se trouvent en plus grande proportion sous leur forme acide (peu réactive) au pH 7,55 qu'au pH 8,5. Le pH du tampon a donc une influence non négligeable sur la réactivité des deux nucléophiles.

Quel que soit les conditions utilisées nous n'avons pas décelé une activité hydrolytique catalytique mais plutôt une inhibition des nucléophiles. Pour permettre de comprendre cette inhibition un échantillon a été analysé par LCMS et RMN du  $^{31}\text{P}$  afin d'identifier les espèces en présence.

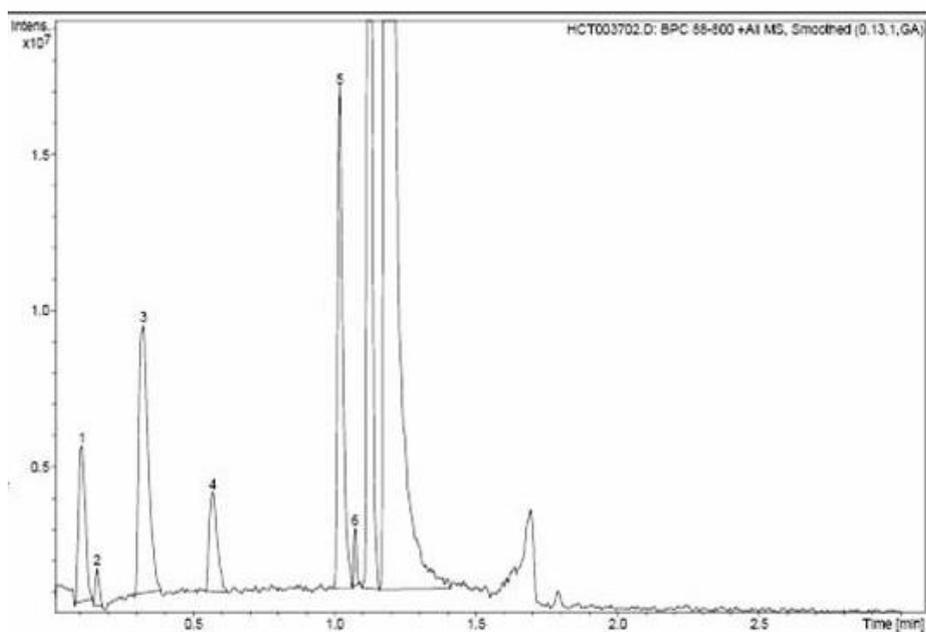
### 1.2.5 Etude de la réaction d'hydrolyse du **PhX** par la 3-hydroxy-pyridylamidoxime **62** par LCMS et RMN $^{31}\text{P}$

Le milieu réactionnel de la réaction d'hydrolyse du **PhX** par le composé **65** a été analysé par LCMS. Nous avons choisi d'analyser le milieu réactionnel lorsque l' $\alpha$ -nucléophile est en défaut afin que le pic de celui-ci ne couvre pas d'autres pics importants. Huit pics ont ainsi été mis en évidence (Chromatogrammes 4 et 5).



Chromatogramme 4 : Analyse LCMS d'un milieu réactionnel.

Le chromatogramme 5 correspond à un zoom du chromatogramme 4.



Chromatogramme 5 : Zoom du chromatogramme 4.

En fonction des masses obtenues par LCMS, nous avons attribué les différents pics aux structures suivantes (Figure 46).

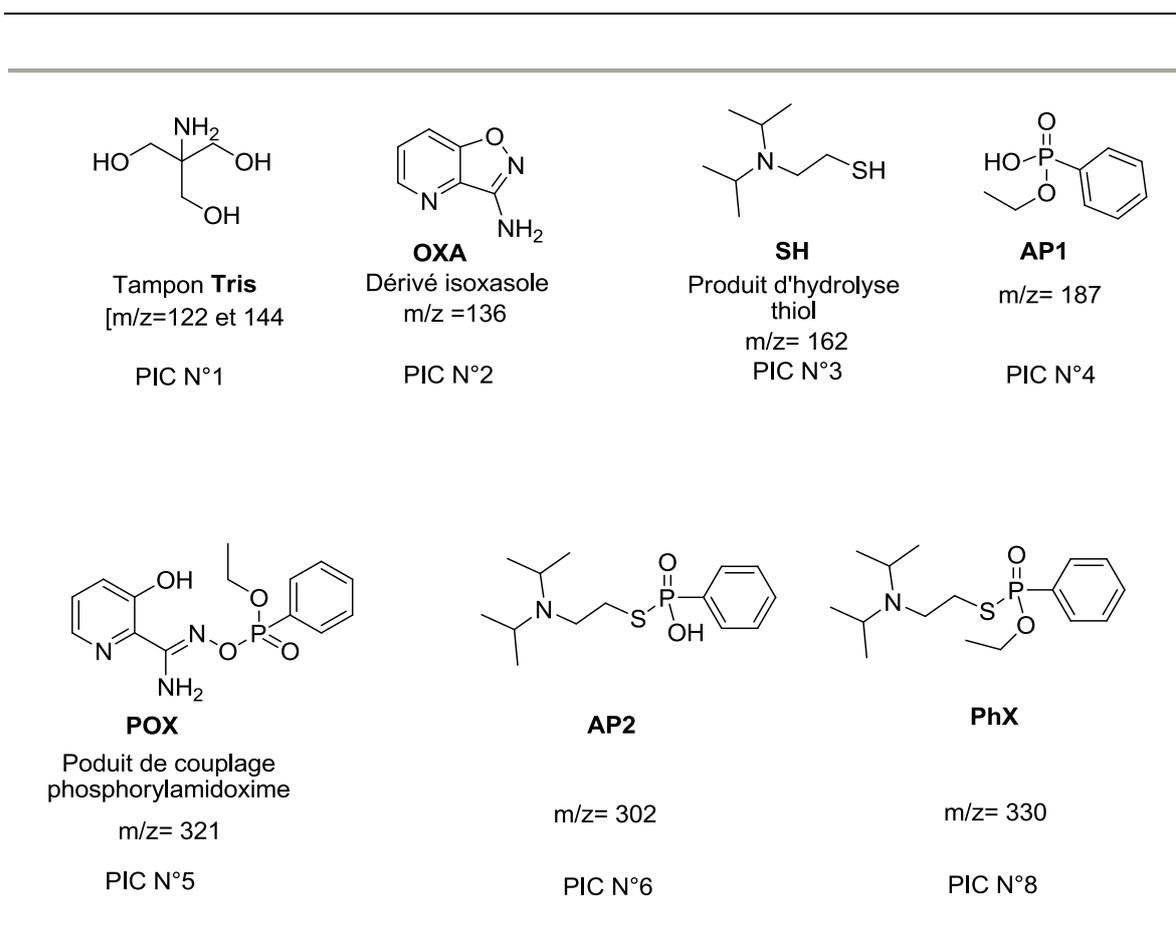
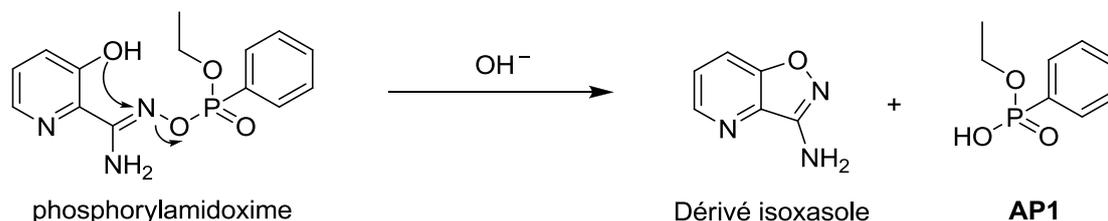


Figure 46 : Structures possibles des composés identifiés par LCMS.

Nous avons également analysé un échantillon par RMN du  $^{31}\text{P}$ , nous observons trois pics à 49,1 ppm, 29,8 ppm et 15,1 ppm. Le pic à 49,1 ppm correspond au pic du **PhX** et le pic à 29,8 ppm correspond au composé d'hydrolyse **AP1**. Il reste donc un composé phosphoré, pouvant correspondre au produit **AP2** ou au produit de couplage phosphorylamidoxime **POX**. La structure de **AP2** étant très proche de celle du **PhX**, il est peu probable que le pic à 15,1 ppm corresponde à ce produit **AP2**. Nous avons donc attribué le pic à 15,1 ppm à **POX**. Nous avons une bonne corrélation entre les analyses LCMS et RMN  $^{31}\text{P}$  quant à l'attribution des structures. On peut noter que le produit **AP2**, non désiré et toxique, a été identifié par l'analyse LCMS, en revanche nous n'avons pas de traces de ce composé sur l'analyse RMN. Il est donc possible qu'il se forme lors de l'analyse LCMS.

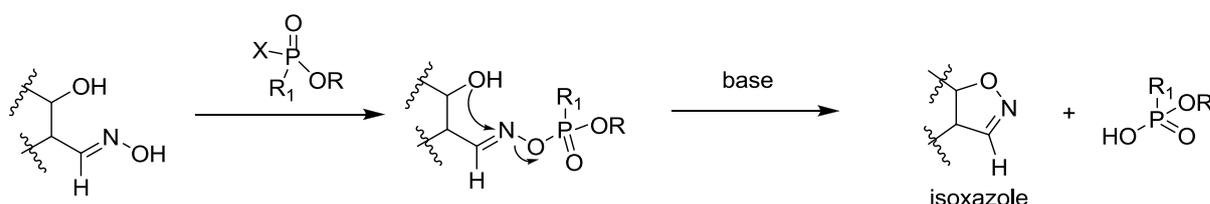
Nous pensons qu'en milieu basique la phosphorylamidoxime peut former un dérivé isoxazole par cyclisation intramoléculaire selon la réaction présentée dans le schéma 33. Ceci est en accord avec l'analyse LCMS, puisque nous observons

un pic à  $[M+H]^+ = 136$  pouvant correspondre au dérivé isoxazole. Cette réaction expliquerait le fait que nous n'observons pas d'activité catalytique.



**Schéma 33 :** Cyclisation intramoléculaire en milieu basique.

Récemment Rebek a publié ses travaux sur la détection et l'hydrolyse d'organophosphorés toxiques par des oximes  $\beta$ -hydroxylées.<sup>93</sup> Il a montré qu'en milieu basique, la réaction entre une oxime et une organophosphoré était suivi d'une cyclisation conduisant à la formation d'un isoxazole (Schéma 34). Ces travaux viennent valider nos observations expérimentales.



**Schéma 34 :** Séquence réactionnelle mise en évidence par Rebek

### 1.2.6 Conclusion

Les analyses LCMC et RMN  $^{31}\text{P}$  nous ont permis de mieux comprendre le mécanisme d'hydrolyse des agents **V** par les  $\alpha$ -nucléophiles. Dans le cas des oximes et des amidoximes, l'hydrolyse passe par la formation de dérivés phosphorylés de types phosphoryloximes et phosphorylamidoximes, plus ou moins stables. Ces intermédiaires vont subir une cyclisation intramoléculaire, en milieu basique, pour donner des dérivés isoxazoles complètement inactifs vis-à-

<sup>93</sup> J.D. Trevor, J. Rebeck, Jr, *Angew.Chem. Int. Ed.*, **2009**; 48, 1-4.

vis de l'hydrolyse du **PhX**. Par conséquent les dérivés d'oximes et d'amidoximes ortho-hydroxylées ne peuvent pas être catalytiques.

## 2 CONCLUSION et PERSPECTIVES

A la suite du test de criblage et des suivis cinétiques, quatre composés se sont révélés particulièrement actifs pour l'hydrolyse du **PhX**, donnant des résultats meilleurs ou équivalents à ceux obtenus avec la pralidoxime **3** (Figure 47). Il s'agit de composés appartenant aux familles des amidoximes et des acides hydroxamiques.

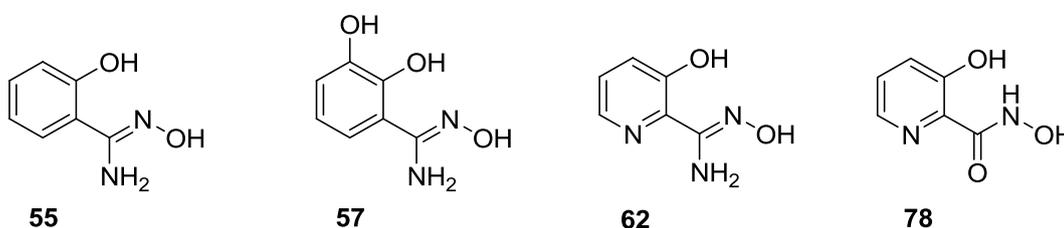


Figure 47 : Structure des composés susceptibles d'être utilisés pour la dégradation des agents **V**.

Parmi eux, la 3-hydroxy-pyridylamidoxime **62** a permis d'obtenir les meilleurs résultats. Cette molécule réagit avec le **PhX** plus rapidement que la pralidoxime. Les premières études mécanisme ont permis de mettre en évidence la formation probable d'un dérivé isoxazole, formé en milieu basique par cyclisation intramoléculaires, qui expliquerait le fait que le composé ne soit pas catalytique et qu'il s'inhibe. En effet, malgré les très bons résultats obtenus avec les oximes et les amidoximes ortho-hydroxylées, il ne sera possible pas obtenir des catalyseurs avec ces structures puisqu'elles se transforment en dérivés inactifs vis-à-vis du **PhX**. L'élucidation du mécanisme devra être poursuivie, notamment avec la synthèse des dérivées isoxazoles afin de les identifier de manière certaine dans le milieu réactionnel.

### 3 REACTIVATION DE L'ACHÉ

#### 3.1 Introduction

Les réactivateurs de l'AChE sont des composants importants dans le traitement des intoxications liées aux inhibiteurs organophosphorés tels que le VX. Nous avons vu que le mécanisme d'action de ces toxiques est l'inhibition de l'AChE du système nerveux par phosphorylation du groupement hydroxyle de la sérine du centre actif<sup>94</sup> (cf Introduction générale) (Figure 48).

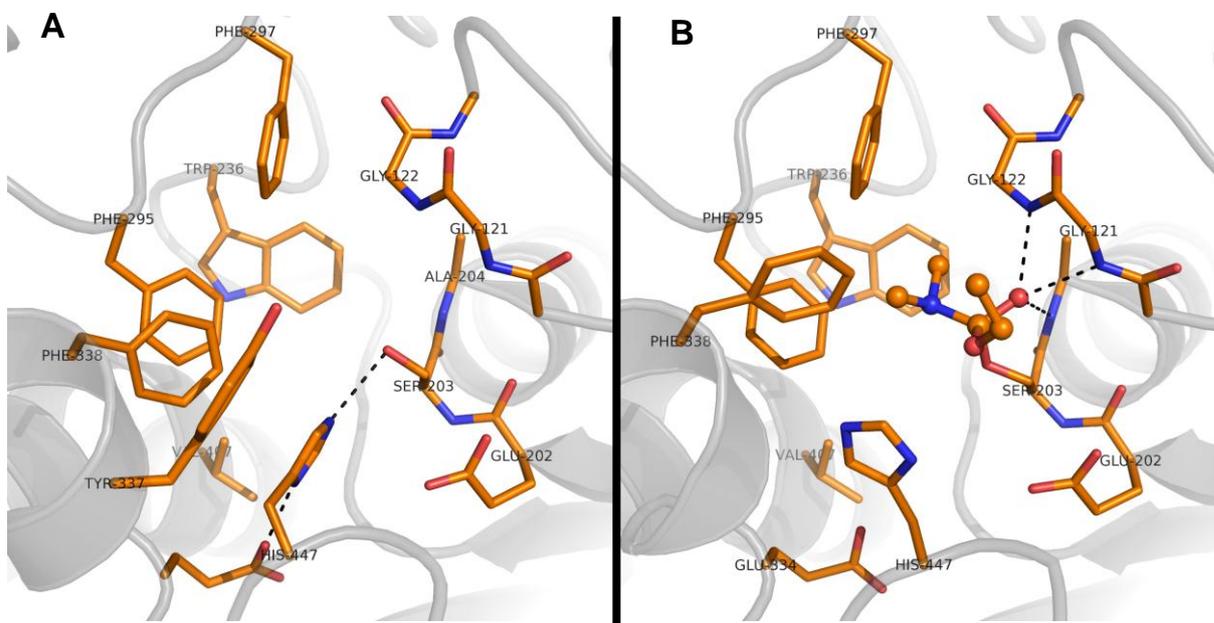


Figure 48 : Représentation du site actif de l'AChE. **A** : non inhibée. **B** : Inhibée par le tabun.

Le complexe formé par l'AChE et l'organophosphoré peut être détruit par l'action d'un réactivateur de l'AChE qui permet de rompre la liaison entre l'organophosphoré et l'enzyme réactivant ainsi cette dernière.<sup>95</sup> Les principaux réactivateurs utilisés aujourd'hui sont représentés dans la figure 49.

<sup>94</sup> T.C. Marrs, *Pharmacol. Therap.*, **1993**, 58, 51.

<sup>95</sup> J. Kassa, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, **2002**, 40, 803.

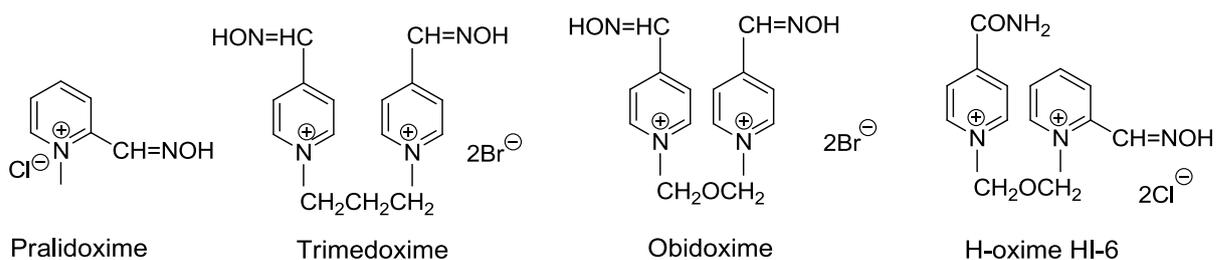


Figure 49 : Principaux réactivateurs de l'AChE.

En 2007, Kuca et coll.<sup>96</sup> font le point sur les avancées faites dans le domaines des réactivateurs de l'AChE phosphorylée. Trois groupes de composés se dégagent :

- × Les dérivés d'hétéroarénium monocarbaldoxime (Figure 50).

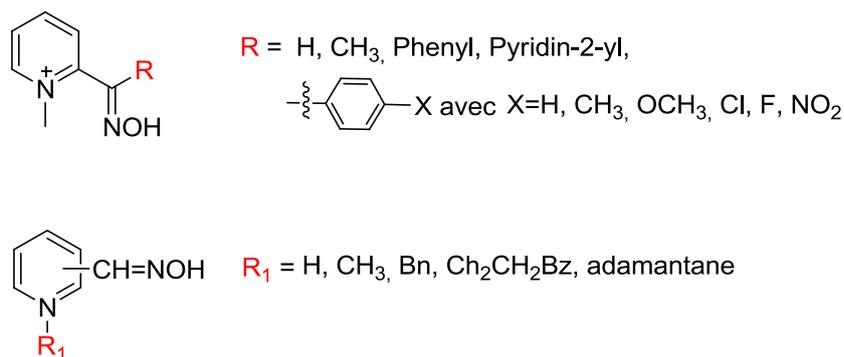


Figure 50 : Structure des dérivés d'hétéroarénium monocarbaldoxime.

Ces structures ont été testées sur des AChE inhibées par différents organophosphorés neurotoxiques mais aucunes des nouvelles structures n'a montré une meilleure réactivation que les molécules de référence.<sup>97</sup>

<sup>96</sup> K. Musilek, K. Kuca, D. Jun, M. Dolezal, *Curr. Org. Chem.*, **2007**, 11, 229-238.

<sup>97</sup> a) F. Hampl, J. Mazac, F. Liska, J. Srogl, L. Kabrt, M. Suchanek, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1995**, 883. b) K. Kuca, J. Picha, J. Cabal, F. Liska, *J. Appl. Biomed.*, **2004**, 2, 51.

× Les dérivés de bispyridinium mono- et dicarbaldoxime (Figure 51).

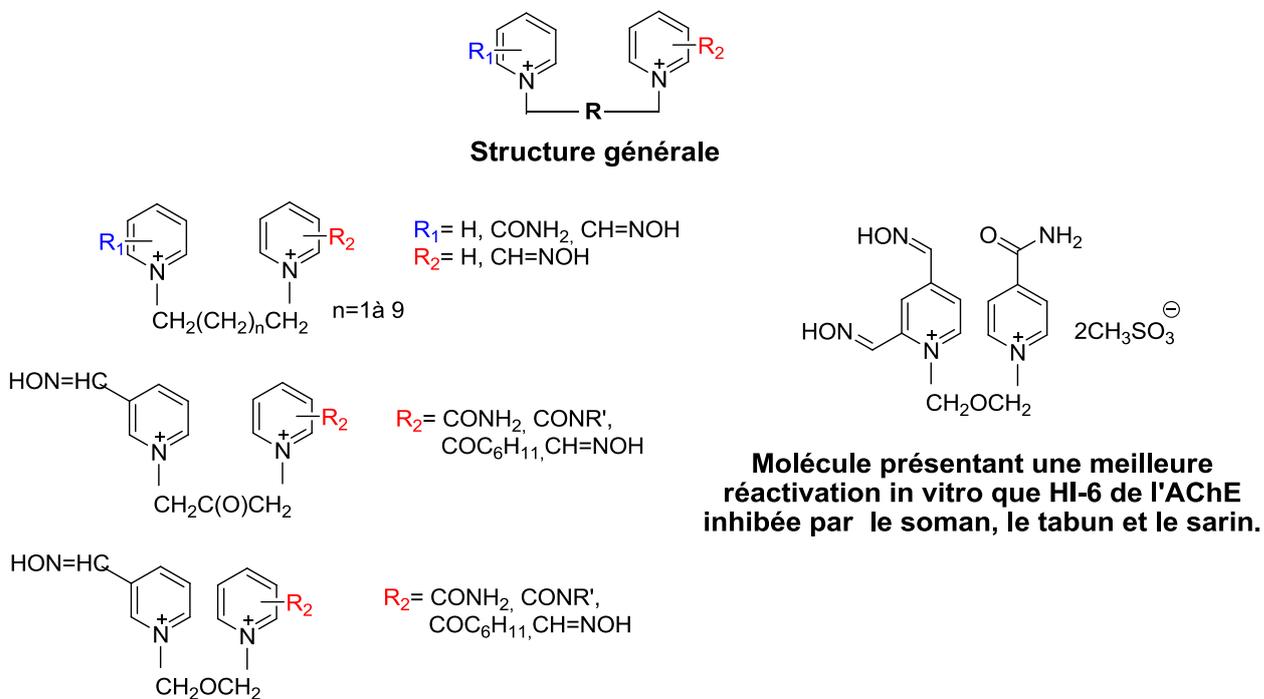


Figure 51 : Structure des dérivés de bispyridinium mono- et dicarbaldoximes.

Parmi les dérivés de type bispyridinium mono et dicarbaldoximes testés, un composé présente une meilleure réactivation in vitro que le composé de référence HI-6 dans le cas où l'AChE est inhibée par le soman, le tabun et le sarin.<sup>98</sup>

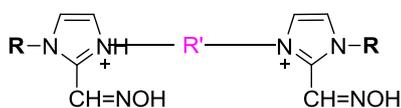
<sup>98</sup> P. Eyer, I. Hagedorn, R. Klimmek, P. Lippstreu, M. Löffler, H. Oldiges, U. Spöhrer, I. Steidl, L. Szinicz, F. Worek, *Arch. Toxikol.*, **1992**, 66, 603.

- × Les dérivés d'imidazolium carbaldoximes (figure 52).

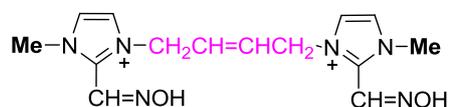


$R_1$  = ether, silicone, nitrile, ester, halogen, nitro, sulfone, amino group

#### Dérivés d'imidazole monoquaternarisé



$R$  = methyl, phenyl, 4-fluorophenyl  
 $R'$  =  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$



**Molécules présentant des résultats in vitro intéressants sur l'AChE inhibée par sarin, VX et tabun.**

#### Composés symétriques de type imidazolium bisquaternarisé

Figure 52 : Structure des dérivés d'imidazolium carbaldoximes.

Parmi toutes les molécules testées seulement une présente des résultats potentiellement intéressants pour la réactivation de l'AChE inhibée par le sarin, le VX et le tabun.<sup>99</sup>

D'après ces études quatre facteurs reliant structure et réactivation ont pu être définis.

- × Présence d'un atome d'azote quaternarisé. Les composés ayant deux azotes quaternarisés montrant plus d'affinité vis-à-vis de l'AChE inhibée.
- × Importance de la longueur de la chaîne reliant les deux noyaux hétéroaromatiques.

<sup>99</sup> V. Deljac, A. Deljac, M. Mesic, V. Kilibarda, M. Maksimovic, Z. Binenfeld, *Acta Pharma. Jugosl.*, **1992**, 42, 173.

- × Présence de la fonction aldoxime.
- × Position de la fonction oxime sur la pyridine (2 et 4 meilleures que 3).

Néanmoins, il est assez compliqué de comparer les différents résultats obtenus par les différents groupes travaillant sur la réactivation de l'acétylcholinestérase. En effet, l'origine et la pureté des acétylcholinestérases utilisées varient d'un groupe à l'autre, de même que les NOP testés et les méthodes de détection.

La recherche de nouveaux réactivateurs plus actifs et agissant sur un large spectre d'organophosphorés reste aujourd'hui d'un grand intérêt. En effet il n'existe pas de réactivateur « universel » capable d'agir quelque soit la nature du NOP ayant inhibée l'AChE.

A la suite aux bons résultats obtenus avec certaines de nos molécules sur la réaction d'hydrolyse du **PhX**. Nous avons décidé d'en tester quelques unes sur la réactivation de l'AChE humaine inhibée par le **VX**. Les travaux suivants ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration, financée par l'Agence Nationale de la Recherche, avec le Dr F. Nachon du département de Toxicologie au Centre de Recherche du Service de Santé des Armées (C.R.S.S.A).

A ce jour, cinq molécules ont été testées (Figure 53).

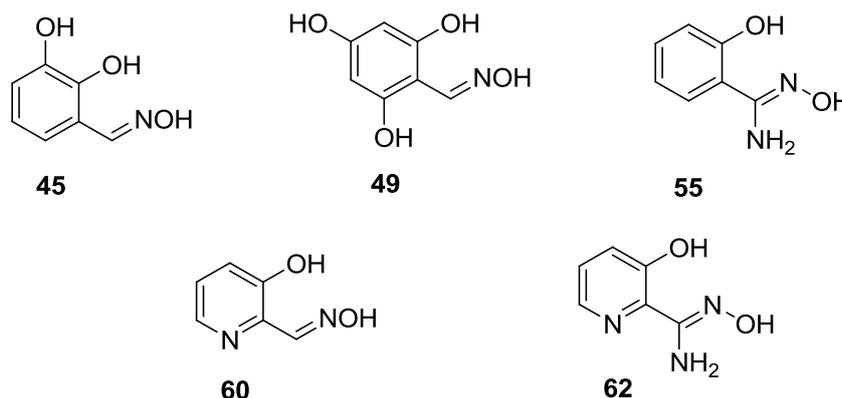


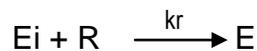
Figure 53 : Structure des nucléophiles testés sur l'AChE humaine inhibée par le VX.

## 3.2 Evaluation des composés sur la réactivation de l'hACHé

### 3.2.1 Principe

#### 3.2.1.1 Equations cinétiques

Nous nous intéressons à la réaction suivante :



avec

$E_i$ , l'enzyme inhibée

R, le réactivateur

E, l'enzyme réactivée

Et  $kr$  la constante de vitesse observée en  $M^{-1} \text{ min}^{-1}$

Cette réaction est soumise aux relations suivantes :

$$d[E_i]/dt = -kr[E_i][R] \text{ et donc } d[E_i]/[E_i] = -kr[R]dt \quad (1)$$

$$E_i = E_{i0} - E \quad (2)$$

Si on intègre l'équation (1) entre  $t=0$  et  $t$ , on a  $E_i$  qui varie entre  $E_{i0}$  et  $E_i$  soit l'égalité suivante :

$$\int_{E_{i0}}^{E_i} \frac{dE_i}{E_i} = \int_0^t -kr \times R \times dt$$

On peut faire certaines simplifications puisqu'on considère que  $R \gg E$  (la quantité en réactivateur est de l'ordre du millimolaire alors que la quantité d'enzyme est de l'ordre du nanomolaire) et donc que  $R=R_0$  (la quantité de réactivateur est considérée comme constante au cours du temps). Ces approximations permettent de se trouver dans une cinétique de pseudo premier ordre

Ainsi l'intégration donne

$$\begin{aligned} \ln E_i - \ln E_{i0} &= -krRt \\ \ln \frac{E_i}{E_{i0}} &= -krRt \\ \frac{E_i}{E_{i0}} &= e^{-krRt} \\ E_i &= E_{i0} \times e^{-krRt} \end{aligned}$$

En introduisant l'équation (2) dans (1) on obtient :

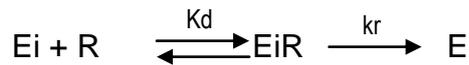
$$Ei0 - E = Ei0 \times e^{-krRt}$$

$$E = Ei0 - Ei0 \times e^{-krRt}$$

finalemet

$$E = Ei0(1 - e^{-krRt})$$

Maintenant on peut aussi écrire la réaction de réactivation comme suit :



avec,

Kd la constante d'affinité entre le réactivateur et l'enzyme en M<sup>-1</sup>

EiR le complexe formé par l'enzyme inhibée et le réactivateur

kr la constante de vitesse de réactivation en min<sup>-1</sup>.

Cette réaction est soumise aux relations suivantes :

$$d[E]/dt = kr[EiR] \quad (1),$$

$$Kd = \frac{[Ei] \times [R]}{[EiR]} \quad (2),$$

$$[Ei0] = [Ei] + [EiR] + [E] \quad (3).$$

En combinant les équations (2) et (3) on peut écrire que

$$Ei0 = \frac{Kd \times EiR}{R} + EiR + E,$$

$$Ei0 = EiR \times \left( \frac{Kd}{R} + 1 \right) + E$$

finalemet

$$EiR = \frac{Ei0 - E}{1 + \frac{Kd}{R}} \quad (4)$$

En combinant les équations (1) et (4) on obtient :

$$\frac{dE}{dt} = kr \frac{Ei0 - E}{1 + \frac{Kd}{R}}$$

$$\frac{dE}{Ei0 - E} = \frac{kr}{1 + \frac{Kd}{R}} dt$$

par analogie à la relation précédemment démontrée, on peut finalement écrire que :

$$E = E_{i0} \left( 1 - e^{-\left( \frac{kr}{1 + \frac{Kd}{R}} \right) \times t} \right)$$

En connaissant  $E_{i0}$ , soit le pourcentage d'enzyme inhibée au temps  $t=0$ , et en mesurant le pourcentage d'enzyme réactivée  $E$  aux différents temps  $t$ , cette équation cinétique permettra de traiter les résultats expérimentaux. En première évaluation, ceux ci permettront de déterminer la constante de vitesse apparente

$$k_{obs} = \left( \frac{kr}{1 + \frac{Kd}{R}} \right) \text{ à une concentration } R \text{ en réactivateur donnée.}$$

Pour les meilleurs candidats, une étude plus approfondie sera faite en suivant la réactivation de l'hAChE pour des concentrations en réactivateur différentes, donnant accès à la constante de réactivation  $kr$  et à la constante d'affinité  $Kd$ .

### 3.2.1.2 Mesure de l'activité enzymatique par la méthode d'Ellman

Le test de routine mis au point au laboratoire pour l'évaluation de l'activité enzymatique de l'AChE utilise le réactif d'Ellman. En effet le 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) ou DTNB est couramment utilisé pour la détection et la quantification des thiols. Il réagit avec ceux-ci en libérant le TNB (2-nitro-5-mercaptobenzoic acid) qui se trouve sous forme ionique ( $TNB^{2-}$ ) en milieux aqueux, neutres et alcalins (Schéma 35). L'ion ainsi formé a une vive couleur jaune avec un maximum d'absorbance à 412 nm. Cette réaction, rapide et stœchiométrique peut-être suivi par spectrophotométrie.

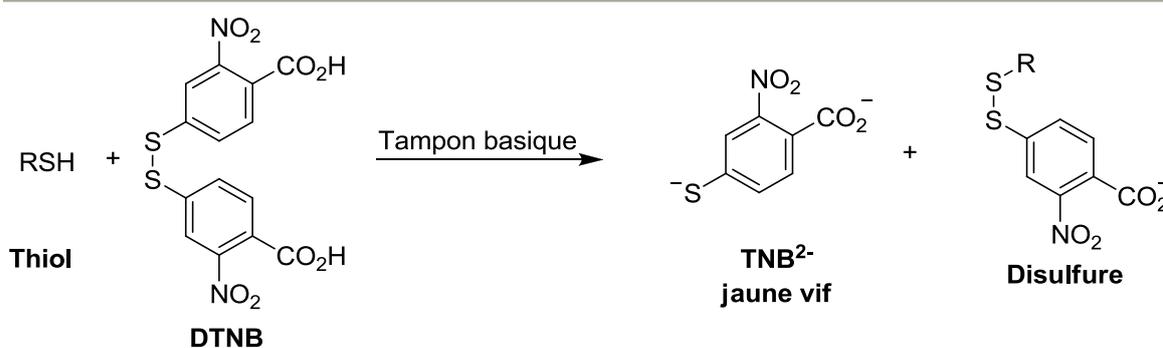


Schéma 35 : Détection des thiols par le réactif d'Ellman.

Cette méthode permet de mesurer l'activité de l'acétylcholinestérase dont le rôle biologique est l'hydrolyse du neurotransmetteur l'acétylcholine (ACh). Lorsqu'on veut détecter son activité par le test d'Ellman on remplace l'acétylcholine par des thiocholines, notamment l'acétylthiocholine (ou ATC). Dans nos mesures de réactivation nous avons utilisé dans un premier temps l'ATC puis le propylthiocholine (ou PTC) (Figure 54).

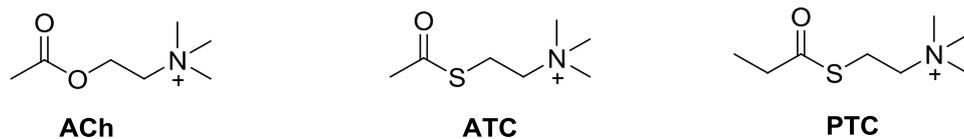


Figure 54 : Différents substrats de l'AChE.

Le schéma 36 représente la détection de l'activité de l'acétylcholinestérase par la méthode d'Ellman.

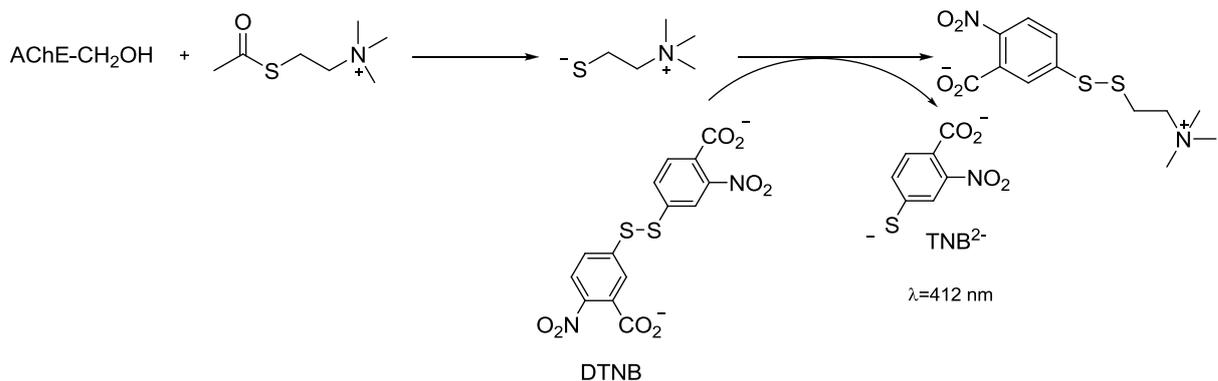


Schéma 36 : Détection de l'activité enzymatique par la méthode d'Ellman.

Lorsque l'enzyme est mise en présence d'organophosphorés neurotoxiques, elle s'inhibe de façon irréversible, perdant ainsi son activité hydrolytique vis-à-vis de l'acétylcholine. Cette perte d'activité peut-être mesurée par la méthode d'Ellman.

Il est également possible, par la méthode d'Ellman, de mesurer la réactivation de l'enzyme sous l'action d'un réactivateur (Schéma 37).

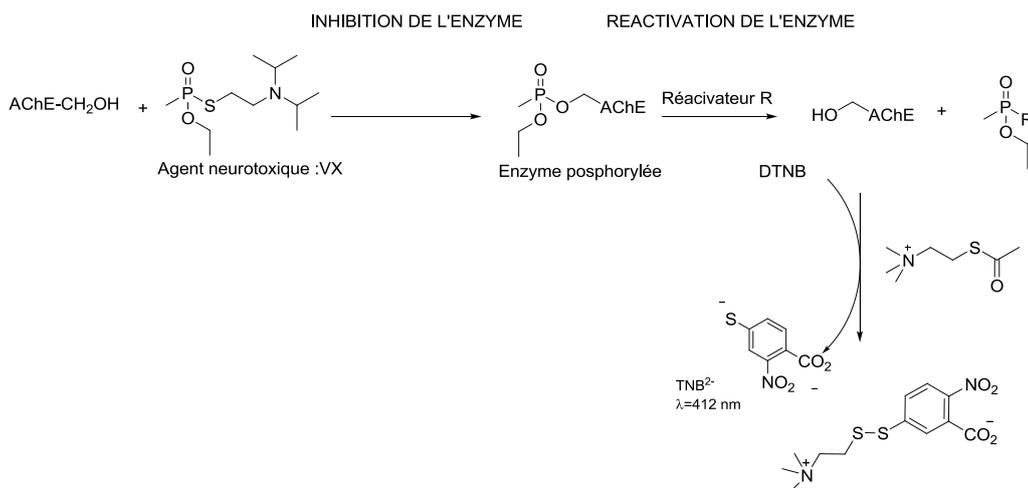


Schéma 37 : Mesure de la réactivation de l'enzyme par le DTNB.

### 3.2.1.3 Mode opératoire

- **Données expérimentales**

Solution de DTNB : solution initiale à 10mM en 5,5'-Dithiobis(2-nitro-benzoic acid) dans le tampon utilisé pour l'étude .La concentration finale lors de l'analyse est de 0,5 mM.

Solution en substrat ATC ou PTC : solution initiale à 100 mM en substrat dans l'eau milliQ conservée a 0°C pendant toute la durée de l'étude. La concentration finale, lors de l'analyse, en substrat est 0,75 mM.

Solutions tampons à 0,1% d'albumine : Ajout de 0,1% massique d'albumine aux solutions tampons phosphate 0,1 N pH 7ou Tris 50 mM pH 8. Les solutions tampons peuvent être congelées et réutilisées. Durand l'étude elles sont thermostatées à 37°C.

Solution de VX : Deux solutions de VX ont été préparées à partir d'une solution mère à 1 mM dans l'isopropanol. Une solution de VX à 1 µM dans le méthanol et une solution à 10 µM dans le méthanol.

Solution de réactivateur : Les réactivateurs sont solubilisés dans les solutions tampon avec si besoin une quantité minimum de méthanol. La quantité de méthanol lors de l'analyse doit être inférieure à 10% pour ne pas influencer sur l'activité de l'enzyme.

- **Détermination de la concentration en enzyme hAChE**

Avant toute chose, il faut déterminer la concentration d'enzyme de travail permettant d'avoir une absorbance du TNB<sup>2-</sup> comprise entre 0,3 et 0,6. Cette concentration doit être déterminée quotidiennement.

Nous disposons de solutions d'enzyme à 7,8mg/mL déjà diluée et stockée au 1/1000. Il faut donc tester plusieurs concentration d'enzyme grâce au réactif d'Ellman jusqu'à obtenir une concentration correcte.

Pour stabiliser l'enzyme diluée, les dilutions d'enzymes ainsi que les mesures d'activité se font en solution tampon additionnée de 0,1% massique d'albumine.

- **Détermination de la concentration en VX**

Une fois la concentration en AChE déterminée, il faut également déterminer la concentration en VX adéquate qui permet d'obtenir un palier d'inhibition compris entre 5 et 10%. Les tests se font sur petites quantités, l'activité de l'enzyme inhibée est mesurée toutes les 10 minutes jusqu'à obtention du palier d'inhibition. De manière générale la première mesure d'activité, soit au bout de 10 minutes d'inhibition, doit être comprise entre 20 et 40% pour obtenir un palier dans la bonne gamme.

Une fois la concentration de VX déterminée, l'inhibition de l'enzyme est réalisée à plus grande échelle (4 ml de dilution d'enzyme). Elle est alors de nouveau suivie toute les 10 minutes jusqu'à l'obtention d'un palier d'inhibition stable. La valeur du palier est notée et correspond au pourcentage d'enzyme inhibée au temps  $t=0$ , soit  $E_{i0}$ .

- Réactivation de l'enzyme

Une fois le palier d'inhibition obtenu, le réactivateur à la concentration R est ajouté à l'enzyme inhibée au temps  $t=0$ . La réactivation de l'enzyme est suivie par spectrophotométrie U.V grâce à la méthode d'Ellman.

La figure 55 présente de manière schématique le protocole expérimental.

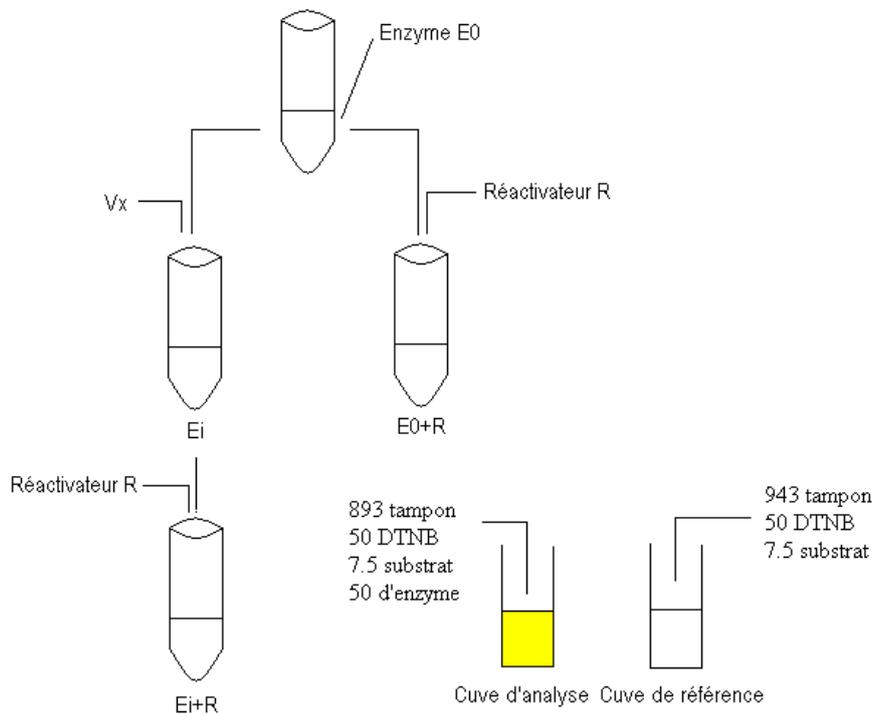


Figure 55 : Protocole expérimental pour la réactivation de l'AChE (volumes en  $\mu\text{L}$ ).

La mesure de l'activité du mélange  $E_0+R$  est réalisée à intervalle régulier et sert à contrôler les interactions possibles entre l'enzyme et le réactivateur.

Deux méthodes ont été utilisées pour les mesures de réactivation :

Méthode A : Les études ont été faites en solution tampon **Tris 10 mM pH=8** en utilisant comme substrat l'**acétylthiocholine**.

Méthode B : Les études ont été faites en solution tampon **phosphate 100 mM pH=7** en utilisant comme substrat le **propylthiocholine**.

La méthode A présentait des limitations du fait de réactions parasites d'hydrolyse du substrat ATC par certains réactivateurs, qui faussent les résultats de réactivation. Nous avons donc envisagé une méthode B, en utilisant comme substrat le propylthiocholine (PTC) et en diminuant le pH de 8 à 7. Ces deux modifications ont permis de rendre négligeables les interactions entre l'hydrolyse du substrat par les réactivateurs. Si le réactivateur ne réagit pas avec l'ATC, la méthode A sera préférée.

### 3.2.2 Résultats expérimentaux

Dans une première évaluation, les composés ont été testés à une seule concentration afin de déterminer les constantes de vitesse apparente  $k_{obs}$ . La concentration testée dépend de la solubilité du composé en milieu aqueux et de sa capacité de réactivation. Plus il réactivera vite et plus il sera possible de diminuer sa concentration.

#### 3.2.2.1 Pralidoxime (2-PAM) **3**

La pralidoxime **3** est un réactivateur connu de l'AChE, elle a été testée pour servir de référence aux autres composés (Figure 56).

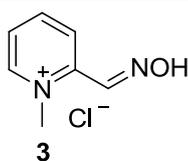


Figure 56 : Structure de la pralidoxime.

La réactivation de l'AChE, inhibée par le VX, par pralidoxime a été testée selon la méthode A.

La concentration en pralidoxime lors de la réactivation était de 1 mM.

On obtient la constante de vitesse  $k_{obs} = 0,078 \pm 0,005 \text{ min}^{-1}$  à 1 mM.

Les valeurs des constantes  $k_r$  et  $K_d$  sont disponibles dans la littérature. F.Worek et coll.<sup>100</sup> rapportent pour la réactivation de l'AChE inhibée au VX les constantes cinétiques suivantes :  $k_r=0,215 \text{ min}^{-1}$   $K_d=28,1 \text{ } \mu\text{M}$  soit  $t_{1/2}= 3,22 \text{ min}$ .

### 3.2.2.2 3-Hydroxy-2-pyridinaldoxime 60

La 2-hydroxy-pyridinaldoxime **60** a été testée sur la réactivation de l'AChE humaine, inhibée par le VX, selon les méthodes A et B.

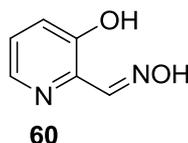


Figure 57 : Structure de la 3-hydroxy-pyridinaldoxime.

- **Méthode A**

La concentration en composé **60** lors de la réactivation était de 10 mM.

On obtient la constante de vitesse  $k_{obs}= 0,054 \pm 0,009 \text{ min}^{-1}$  à 10 mM.

Cette première évaluation du composé **60** permet d'obtenir une constante de vitesse apparente du même ordre de grandeur que celle obtenue avec la pralidoxime, mais à une concentration 10 fois supérieure.

Pour déterminer les constantes de réactivation  $k_r$  et d'affinité  $K_d$ , la méthode B a été utilisée pour éviter les réactions parasites.

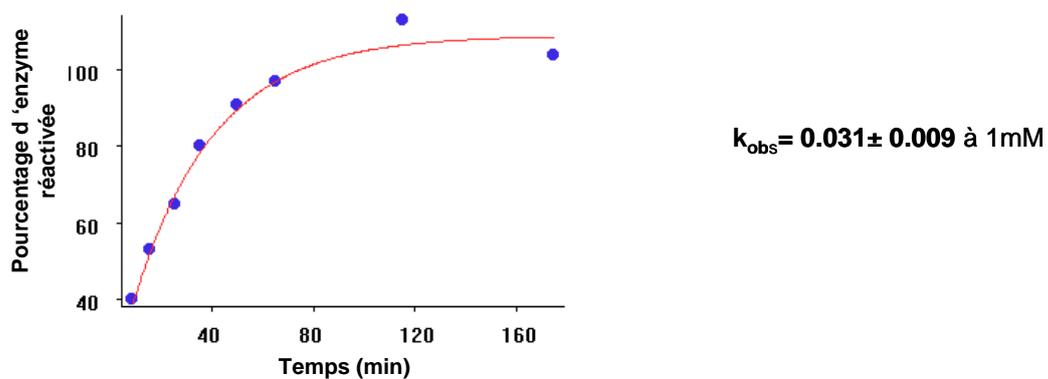
- **Méthode B**

La réactivation a été évaluée aux quatre concentrations suivantes: 1mM, 3mM, 10mM et 20mM.

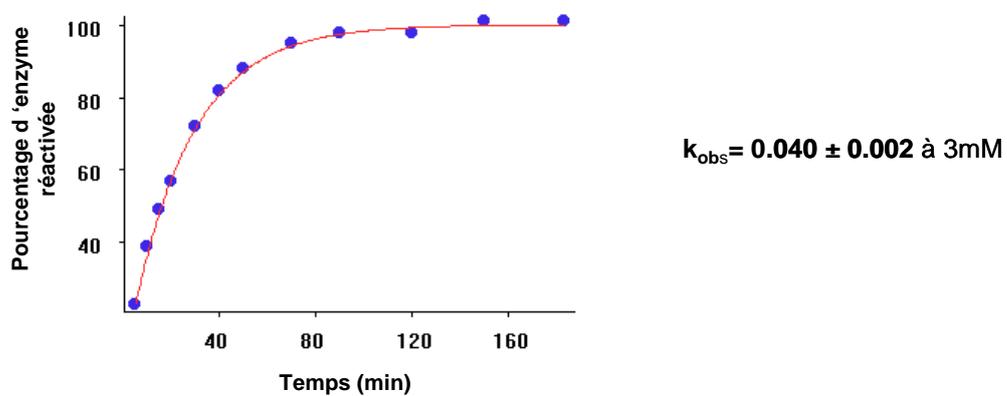
Les graphiques ci-dessous, présentent le pourcentage de réactivation de l'AChE en fonction du temps, sont des exemples de courbes expérimentales obtenues avec le composé **60**. Les  $k_{obs}$  obtenus sont en  $\text{min}^{-1}$ .

---

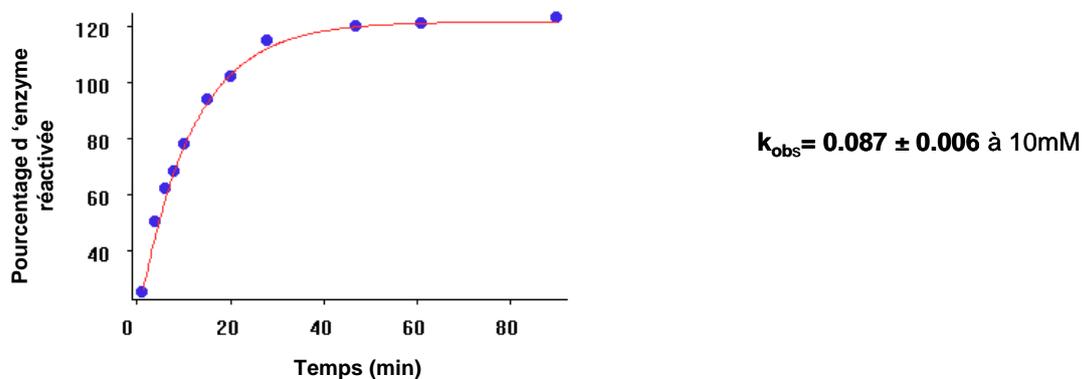
<sup>100</sup> F. Worek, *Arch. Toxicol.*, **2002**, 76, 523-529.



Graphique 26 : Réactivation de l'AChE par **60** à 1 mM.



Graphique 27 : Réactivation de l'AChE par **60** à 3 mM.

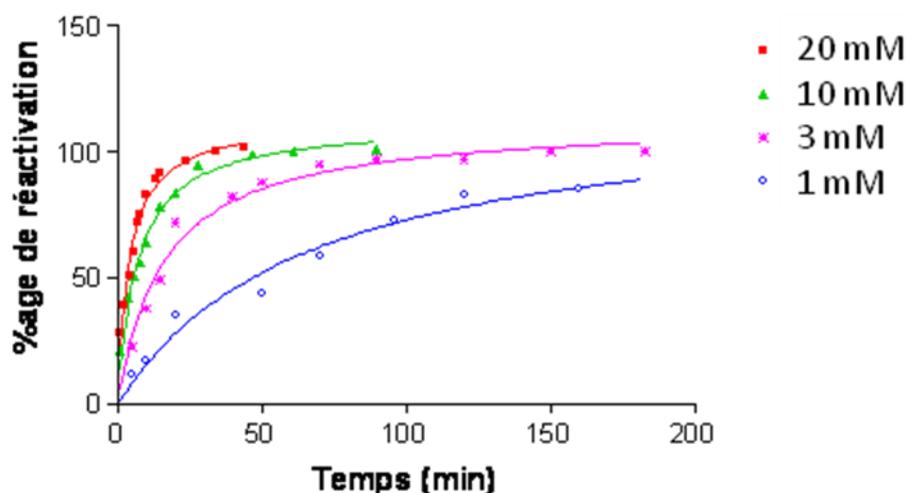


Graphique 28 : Réactivation de l'AChE par **60** à 10 mM.

Quel que soit la concentration utilisée la réactivation totale de l'AChE est atteinte en un temps raisonnable. La  $k_{obs}$  obtenue à une concentration de 1 mM soit  $k_{obs} = 0,031 \pm 0,09 \text{ min}^{-1}$  est directement comparable avec celle obtenue pour la pralidoxime soit  $k_{obs} = 0,078 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$ . Plus la constante de vitesse est élevée, meilleure est le réactivateur. Donc la pralidoxime est un meilleur réactivateur que le composé **60** mais celui-ci permet une réactivation toute à fait intéressante.

Les données expérimentales sont ensuite traitées pour déterminer les constantes  $k_r$  et  $K_d$ .

Le graphique suivant permet de visualiser les différentes courbes de réactivation, aux différentes concentrations, sur un même graphique.



Graphique 29 : Résultat de réactivation obtenu aux différentes concentrations avec le composé **60**.

Les résultats obtenus sont les suivants :  $k_r = 0,5 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$  et  $K_d = 32 \pm 11 \text{ mM}$  et  $t_{1/2} = 1,38 \text{ min}$ .

En comparant ces résultats avec ceux de la pralidoxime, il apparaît que la constante de réactivation obtenue avec le composé **60** est meilleure que celle de la pralidoxime, ce qui est un très bon résultat. Par contre la constante d'affinité est beaucoup moins bonne, puisque 1000 fois supérieure à celle de la pramidoxime.

### 3.2.2.3 3-Hydroxy-pyridylamidoxime 62

La 3-hydroxy-pyridylamidoxime **62** (Figure 58) a été testée sur la réactivation de l'AChE selon la méthode B. Ce composé n'a pas pu être étudié selon la méthode A car il hydrolyse l'ATC en proportion suffisante pour fausser les résultats.

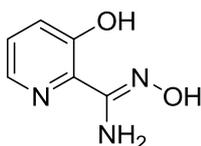
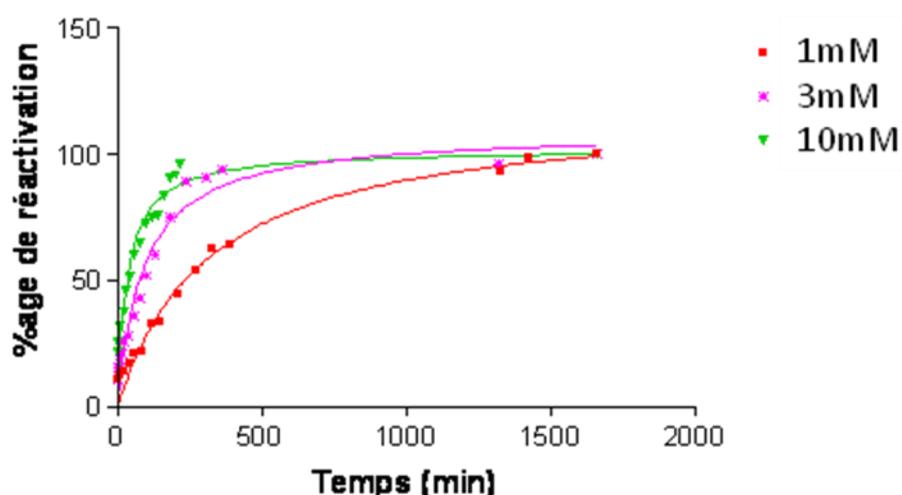


Figure 58 : Structure de la 3-hydroxy-pyridylamidoxime **62**.

- **Méthode B**

La constante apparente de vitesse obtenue est de  $k_{obs} = 0,010 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$  à 10mM. Ce résultat est moins bon que celui obtenu avec le composé **60**, mais reste tout à fait intéressant et de ce fait les autres constantes ont également été déterminées. Dans ce but la réactivation de l'AChE a été suivie à trois concentrations différentes : 1 mM, 3 mM et 10 mM.

Le graphique suivant présente les courbes de réactivation obtenues, qui permettent de déterminer  $k_r$  et  $K_d$ .

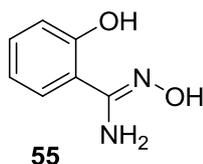


Graphique 30 : Résultat de réactivation obtenu aux différentes concentrations avec le composé **62**.

Le palier de réactivation totale de l'enzyme est obtenu assez rapidement pour une concentration en réactivateur supérieure à 3 mM. Les constantes cinétiques sont les suivantes :  $k_r = 0,078 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$  et  $K_d = 27 \pm 30 \text{ mM}$  et  $t_{1/2} = 8,90 \text{ min}$ . La constante de réactivation est environ trois fois plus faible que celle obtenue avec la pralidoxime et la constante d'affinité est du même ordre de grandeur que le composé **60**.

#### 3.2.2.4 2-hydroxybenzamidoxime 55

L'analogue phényle du composé (Figure 59) précédent a été testé sur la réactivation de l'AChE selon la méthode A.



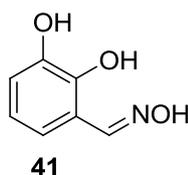
---

Figure 59 : Structure de la 2-hydroxy-benzamidoxime.

La concentration en réactivateur **55** lors de la réactivation était de 10 mM. Au bout de 24h un plateau de réactivation est atteint à 23% seulement, c'est-à-dire que le composé testé n'a pas pu réactiver la totalité de l'enzyme. La constante de vitesse apparente a tout de même été déterminée  $k_{obs} = 0,0039 \pm 0,0023 \text{ min}^{-1}$  à 10mM. Le plateau de réactivation n'étant pas atteint, la constante  $k_{obs}$  n'est pas vraiment significative. Il semble d'après ces résultats expérimentaux que le composé **55** soit un mauvais réactivateur.

#### 3.2.2.5 2,3-Dihydroxybenzaloxime 45

Le composé di-hydroxylé **45** (Figure 60) a été testé sur la réactivation de l'AChE selon la méthode A.



---

Figure 60 : Structure de la 2, 3-dihydroxybenzaloxime.

La concentration en réactivateur **45** lors de la réactivation était de 10 mM. Au bout de 24h le plateau de réactivation n'est pas atteint. Les données expérimentales obtenues n'ont pas permis de déterminer de constante cinétique de réactivation de l'AChE par la 2,3-dihydroxybenzaloxime **45**.

#### 3.2.2.6 2,4,6- Trihydroxybenzaloxime 49

Le dernier composé testé est la tri-hydroxybenzaldoxime (Figure 61). Il a été évalué selon la méthode A.

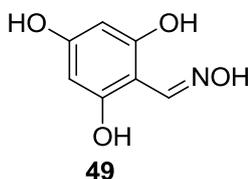


Figure 61 : Structure de la 2,4,6- trihydroxybenzaldoxime.

La concentration en composé **49** lors de la réactivation était de 1 mM du fait de problème de solubilité à plus forte concentration.

La constante de vitesse apparente obtenue est  $k_{obs} = 0,0050 \pm 0,0012 \text{ min}^{-1}$  à 10mM avec un plateau de réactivation à 60% seulement. D'après les résultats obtenus le composé 49 semble être un mauvais réactivateur.

### 3.2.3 Récapitulatif des résultats

Le tableau 7 rappelle les résultats obtenus pour la détermination de la constante de vitesse apparente.

| Composé   | Concentration | $k_{obs} \text{ (min}^{-1}\text{)}$ |
|-----------|---------------|-------------------------------------|
| <b>3</b>  | 1 mM          | $0,077 \pm 0,005$                   |
| <b>60</b> | 10 mM         | $0,055 \pm 0,009$                   |
| <b>62</b> | 10 mM         | $0,010 \pm 0,002$                   |
| <b>55</b> | 10 mM         | $0,004 \pm 0,002$                   |
| <b>45</b> | 10 mM         | NA                                  |
| <b>49</b> | 1 mM          | $0,005 \pm 0,0012$                  |

Tableau 7 : Récapitulatif des résultats pour les constantes de vitesse apparente.

Outre la pralidoxime, les deux premiers composés sont les meilleures de la série testée, ils ont donc été caractérisés plus finement. Les trois autres composés sont de mauvais réactivateurs dans la mesure où ils ne permettent d'atteindre une réactivation de 100%.

Le tableau 8 rappelle les constantes de réactivation et d'affinité obtenues pour les composés **60** et **62**.

| Composé   | Concentrations utilisées  | Résultats                                                                  |
|-----------|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b>3</b>  | NA                        | $k_r = 0.215 \text{ min}^{-1}$<br>$K_d = 28 \mu\text{M}^{-1}$              |
| <b>60</b> | 1 mM, 3 mM, 10 mM et 20mM | $k_r = 0.5 \pm 0.1 \text{ min}^{-1}$<br>$K_d = 32 \pm 11 \text{ M}^{-1}$   |
| <b>62</b> | 1 mM, 3 mM et 10 mM       | $k_r = 0.078 \pm 0.1 \text{ min}^{-1}$<br>$K_d = 27 \pm 11 \text{ M}^{-1}$ |

Tableau 8 : Récapitulatif des résultats obtenus pour les constantes de réactivation et d'affinité.

Les deux composés **60** et **62** donnent de bonne constante de réactivation, et plus particulièrement le composé **60** qui a une meilleure constante de réactivation que la pralidoxime. En revanche, leurs constantes d'affinité sont éloignées d'un facteur 1000 de celle de la pralidoxime et ils ont donc une mauvaise affinité avec l'AcChE.

### **3.3 Conclusion**

Les résultats obtenus sur la réactivation de l'acétylcholinestérase inhibée par le VX montrent que deux nucléophiles (**60** et **62**) présentent une bonne réactivité, c'est-à-dire une bonne valeur de constante de réactivation  $k_r$ . En revanche leur affinité avec l'enzyme n'est pas bonne, les valeurs de  $K_d$  sont trop élevées. Cette configuration est pourtant prometteuse dans la mesure où la valeur du  $K_d$  peut être améliorée d'un facteur 100 voir 1000 par des modifications structurales qui permettront aux composés d'être plus affins avec l'enzyme. Le meilleur composé testé pour la réactivation est la 2-hydroxy-pyridylaloxime. D'autres molécules, identifiées par le test de criblage sont actuellement à l'étude au C.R.S.S.A de Grenoble.

A titre indicatif, les deux composés **60** et **62** ont également été testés sur l'AcChE inhibée par le tabun, mais ils n'ont pas montré une activité de réactivateur satisfaisante.

Les molécules chargées telles que la pralidoxime passent difficilement la barrière sang/cerveau. La découverte de molécules non chargées comme réactivateurs de l'acétylcholinestérase est donc d'une grande importance pour l'amélioration des

traitements des intoxication aux NOP. Néanmoins pour en faire de très bons candidats, leur affinité doit être améliorée et elle le sera, notamment par la synthèse de composés bicycliques. En effet, de tels composés favoriseraient les interactions avec le site périphérique de l'enzyme, augmentant ainsi l'affinité avec celle-ci.

---

**DEVELOPPEMENT D'EMPREINTES  
MOLECULAIRES POUR LA DEGRADATION  
DES NOP**

---

## 1 INTRODUCTION

Les chimistes se sont inspirés des systèmes biologiques naturels pour tenter de développer des moyens de reconnaissance moléculaire artificiels possédant une activité catalytique comme les éthers couronnes,<sup>101</sup> les cryptates<sup>102</sup> ou les cyclodextrines.<sup>103</sup>

Il se développe, depuis une quarantaine d'années, une autre approche consistant à produire des récepteurs spécifiques artificiels au sein de matrices polymériques : les empreintes moléculaires (MIPs - Molecularly Imprinted Polymers).<sup>104</sup> Leur synthèse est basée sur le principe de la reconnaissance moléculaire. Les sites de liaisons créés ont une structure macromoléculaire tridimensionnelle présentant une sélectivité et une affinité telles que ces polymères ont été qualifiés d'analogues synthétiques d'enzymes<sup>105</sup> ou d'anticorps artificiels.<sup>106</sup> Ils sont conçus par assemblage d'une matrice polymérique réticulée autour d'une molécule empreinte plus communément appelée template. La première difficulté de l'impression moléculaire est de concevoir cette molécule à imprimer de manière adaptée à la synthèse du polymère et à son utilisation future. Il nous est apparu intéressant d'utiliser cette technologie pour la décontamination des organophosphorés toxiques : l'objectif étant de synthétiser des empreintes moléculaires capables de reconnaître et d'hydrolyser de manière catalytique ces organophosphorés.

---

<sup>101</sup> D.J. Cram, *Angew. Chem.*, **1988**, *100*, 1041-1052 ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1988**, *27*, 1009-1020.

<sup>102</sup> J.M. Lehn, *Angew. Chem.*, **1988**, *100*, 91-106 ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1988**, *27*, 89-104.

<sup>103</sup> G. Wenz, *Angew. Chem.*, **1994**, *106*, 851-870 ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1994**, *33*, 803-822.

<sup>104</sup> a) G. Wulff, *Angew. Chem. Ed. Engl.*, **1995**, *34*, 1812-1832. b) M.J. Whitcombe, E.N. Vulfson, *Adv. Mater.*, **2001**, *13*, 467-478

<sup>105</sup> G. Wulff, *Chemical reviews*, **2002**, *102*, 1-27.

<sup>106</sup> a) G. Vlatakis, L.I. Andersson, R. Müller, K. Mosbach, *Nature*, **1993**, *361*, 645-647. b) O. Ramström, L. Ye, K. Mosbach, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 471-477.

## 1.1 Principe

L'impression moléculaire a été définie par Whitcombe et coll.<sup>107</sup> de la manière suivante :

*« Il s'agit de la construction de sites de reconnaissance sélectifs de ligands dans un polymère synthétique pour lesquelles un template (atome, ion, molécule, complexe ou encore assemblage moléculaire, ionique, macromoléculaire, incluant des micro-organismes) est utilisé dans le but de faciliter la formation du site de reconnaissance pendant le processus de polymérisation. Le retrait de tout ou partie du template est nécessaire pour permettre la reconnaissance dans les espaces ainsi libérés. »*

Ce procédé permet donc de préparer un matériau synthétique sélectif d'une molécule cible, puisque celui-ci est façonné sur-mesure par impression de la molécule visée. A ce titre, les polymères imprimés sont aussi qualifiés d'anticorps ou d'enzymes synthétiques et pourraient être utilisés pour la reconnaissance et l'hydrolyse des NOP. Ils sont chimiquement et physiquement plus stables et plus robustes que les anticorps et les enzymes. L'atout majeur de l'impression moléculaire est de pouvoir préparer en grande quantité des polymères de haute stabilité pouvant être utilisés à haute température, haute pression et dans des conditions acides ou basiques extrêmes.<sup>108</sup>

Le procédé consiste à co-polymériser des monomères fonctionnels et un agent de réticulation en présence de la molécule à imprimer, agissant en qualité de modèle (qui sera appelée template dans la suite de ce manuscrit) (Figure 62).

---

<sup>107</sup> C. Alexander, H.S. Andersson, L.I. Andersson, R.J. Ansell, N. Kirsch, I.A. Nicholls, J. O'Mahony, M.J. Whitcombe, *J. Mol. Recognit.*, **2006**, 19, 106-180.

<sup>108</sup> G. Wulff in *Polymeric Reagents and Catalysts* (Ed. W.T. Ford) (ACS Symp. Ser. **1986**, 308), pp.186.

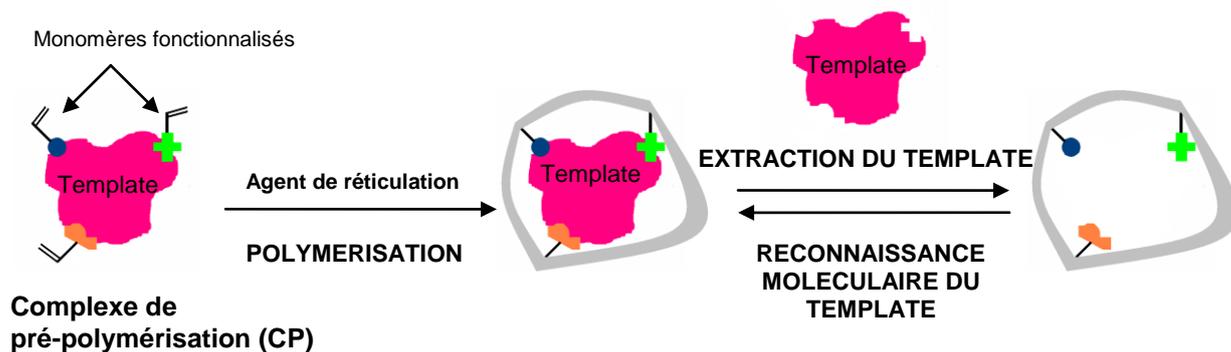


Figure 62 : Principe de l'impression moléculaire.

Idéalement, les monomères fonctionnels et le template forment, dans un premier temps, un complexe de pré-polymérisation qui est figé par l'étape de polymérisation, permettant ainsi de positionner spatialement des groupements fonctionnels dans l'empreinte. L'extraction du template conduit ensuite à des sites de reconnaissance possédant une complémentarité de forme et de taille avec la molécule imprimée. Ainsi, le polymère possèdera la mémoire de la molécule cible et pourra reconnaître le substrat *via* des liaisons covalentes ou non covalentes de types : interactions électrostatiques, liaisons hydrogène ou interactions de type Van der Waals.

Dans les procédures d'impression moléculaire, les groupes fonctionnels ont plusieurs rôles. D'une part, les liens entre le template et ces groupes doivent être aussi forts que possible au moment de la polymérisation pour permettre aux groupes fonctionnels d'être fixés par le template dans une orientation définie au sein de la matrice polymérique. Par la suite, le template doit pouvoir être retiré en totalité ou en quasi-totalité. D'autre part, la reconnaissance de la molécule cible grâce aux interactions entre celle-ci et les groupements fonctionnels doit être aussi rapide et réversible que possible pour permettre des applications notamment en chromatographie séparative ou en catalyse.

Différentes méthodologie ont été élaborées pour permettre de créer les sites de reconnaissance. Trois approches générales ont été développées : l'approche covalente introduite par Wulff<sup>109</sup> en 1972, l'approche non covalente initialement

<sup>109</sup> G. Wulff, A. Sarhan, *Angew. Chem.*, **1972**, *84*, 364.

étudiée par Mosbach<sup>110</sup> en 1981 et l'approche semi-covalente publiée en 1990 par Sellergren et coll.<sup>111</sup>

### 1.1.1 Approche covalente<sup>112</sup>

Elle se distingue par l'utilisation de templates qui possèdent un ou plusieurs groupes polymérisables. Après polymérisation, le template est ainsi lié de manière covalente à la matrice polymérique. Il est ensuite clivé, laissant dans le site les groupes fonctionnels nécessaires à la reconnaissance moléculaire. La molécule cible est ensuite reconnue en se fixant de manière covalente dans le site.

L'avantage de cette approche est qu'elle permet d'avoir les groupements fonctionnels localisés dans les sites associés au template. Ceci permet de bonnes affinités et limite ainsi les interactions non spécifiques. En revanche elle présente quelques inconvénients. En premier lieu, seul certains composés peuvent être imprimés par cette méthode (alcools, aldéhydes, cétones, amines et acides carboxyliques). Ensuite, elle nécessite des étapes de synthèse afin d'obtenir des templates polymérisables. De plus, les traitements chimiques pour permettre l'extraction du template ne sont pas forcément évidents et sans conséquence sur la structure du polymère.

### 1.1.2 Approche non covalente<sup>113</sup>

Cette approche utilise les forces d'attraction qui existent entre les molécules, telles que les liaisons hydrogènes, les liaisons ioniques, les interactions dipôle-dipôle et les forces de Van der Waals, pour générer un complexe de pré-polymérisation entre le template et les monomères fonctionnalisés. Du fait de ces interactions non covalentes le complexe de pré-polymérisation est instable. Celui-ci est figé lors de l'étape de polymérisation, mais les conditions du passage du complexe de pré-polymérisation au site de l'empreinte moléculaire fait encore débat. Le template peut être extrait par de

---

<sup>110</sup> R. Arshady, M. Mosbach, *Macromol. Chem. Phys-Makromol. Chem*, **1981**, 182, 687-692.

<sup>111</sup> B. Sellergren, L. Andresson, *J. Org. Chem*, **1990**, 55, 3381-3383.

<sup>112</sup> A.G. Mayes, M.J. Whitcombe, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2005**, 57, 1742-1778.

<sup>113</sup> M.J. Whitcombe, M.E. Rodriguez, P. Villar, E.N. Vufson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 7105-7111.

simples lavages. La reconnaissance moléculaire se fait par des interactions également non covalentes.

Le premier avantage de cette approche est sa simplicité de mise en œuvre puisqu'elle ne requière aucune étape de synthèse. Par rapport à l'approche précédente, elle est également plus flexible puisqu'elle permet un plus large choix de monomères fonctionnels et donc de fonctions imprimables. Toutefois, les trois principaux inconvénients de cette approche, sont tout d'abord la création de sites de reconnaissance hétérogènes qui entraîne une hétérogénéité dans l'affinité de ces sites. De plus les groupes fonctionnels ne sont pas localisés exclusivement dans les sites associés au template, ce qui entraîne de la reconnaissance non spécifique. Enfin le rapport entre la quantité de template utilisée et le nombre de site de haute affinité formé est faible. En effet certaines des interactions non covalentes ne résistent pas ou mal aux procédés de polymérisation.

### 1.1.3 Approche semi-covalente

Cette approche permet de combiner les avantages des deux méthodes précédemment citées<sup>114</sup>. Elle regroupe tous les procédés qui utilisent un template ayant au moins une fonction polymérisable et dont la reconnaissance moléculaire se fait par des interactions non covalentes.

## 1.2 Techniques de polymérisation

Plusieurs techniques de polymérisation existent et sont applicables au développement des polymères imprimés, à savoir la polymérisation en masse, en suspension,<sup>115</sup> par précipitation<sup>116</sup> et en émulsion.<sup>117</sup>

Dans le cadre de nos travaux de recherche nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la polymérisation en masse et à une nouvelle technique de polymérisation mise au point au laboratoire.<sup>118</sup>

---

<sup>114</sup> N. Kirsch, M.J. Whitcombe, *Molecularly Imprinted Materials*, Eds : Marcel Dekker, New York, USA **2005**, 93-122.

<sup>115</sup> a) A. Flores, D. Cunliffe, M.J Whitcombe, E.N. Vulfson, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2000**, *77*, 1841-1850. b) A.G. Strikovskiy, D. Kasper, M. Grun, B.S. Green, J. Hradil, G. Wulff, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 6295-6296.

<sup>116</sup> a) L. Ye, P.A.G Cormack, K. Mosbach, *Anal. Commun.*, **1999**, *36*, 35-38. b) L. Ye, K. Mosbach, *Reac. Func. Polym.*, **2001**, *48*, 149-157.

<sup>117</sup> J.M. Asua, *Prog. Polym. Sci.*, **2002**, 1283-1349.

### 1.2.1 La polymérisation en masse

La plus répandue et la plus simple à mettre en œuvre est la polymérisation dite en masse (ou bulk polymerization) pour laquelle le polymère se présente sous la forme d'un bloc monolithique. Le template, les monomères fonctionnels, l'agent de réticulation sont mélangés en présence d'un initiateur radicalaire, dans un faible volume de solvant, puis co-polymérisés par initiation photochimique ou thermique.<sup>119</sup> Le polymère obtenu nécessite ensuite un traitement de broyage et de tamisage pour pouvoir être utilisé (Figure 63). Pour cette raison la forme des particules obtenues est très irrégulière et présente une large distribution de taille. Il a été estimé que seulement 20% des sites de reconnaissances sont conservés après l'étape de broyage.<sup>120</sup> L'une des plus importantes limitations de la polymérisation en masse est la grande quantité de template ne pouvant pas être extraite de la matrice polymérique dans le cas de l'approche covalente.<sup>121</sup>

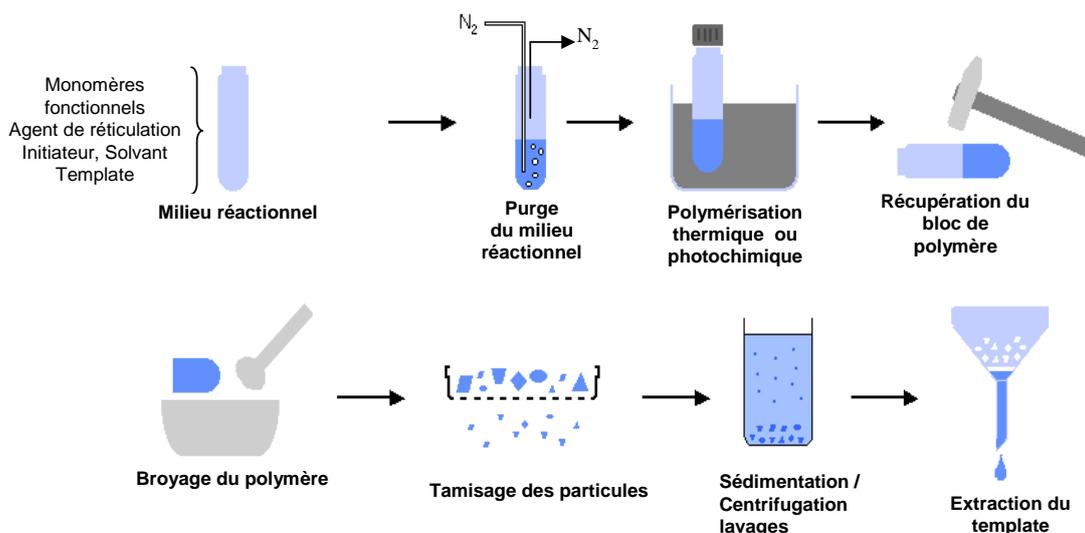


Figure 63 : Principe de la polymérisation en masse.

<sup>118</sup> P. Curcio, C. Zandanel, A. Wagner, C. Mioskowski, R. Baati, *Macromolecular Biosciences*, **2009**, 9, 596-604.

<sup>119</sup> a) K. Landfester, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 2-22. b) K. Landfester, *Annual Review of Materials Research*, **2006**, 36, 231-279.

<sup>120</sup> O. Brüggemann, K. Haupt, L. Ye, E. Yilmaz, K. Mosbach, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 889, 15-24.

<sup>121</sup> G. Tovar, I. Kräuter, C. Gruber, *Topics in Current Chemistry – Colloid Chemistry II*, **2003**, 125-144.

## 1.2.2 Polymérisation en émulsion

La polymérisation en émulsion (et mini-émulsion) utilise la dispersion grâce à un tensioactif des monomères insolubles dans l'eau. Le tensioactif sert à stabiliser l'émulsion des gouttelettes de monomères et à contrôler la taille des particules de polymère (Figure 64). De plus, il est possible d'obtenir des polymères fonctionnalisés en surface par l'utilisation d'un template surfactant.<sup>122</sup> Ceci permet une amélioration au niveau de l'extraction du template après polymérisation. Cinétiquement le phénomène de diffusion de la molécule cible vers les sites de reconnaissance est accéléré.

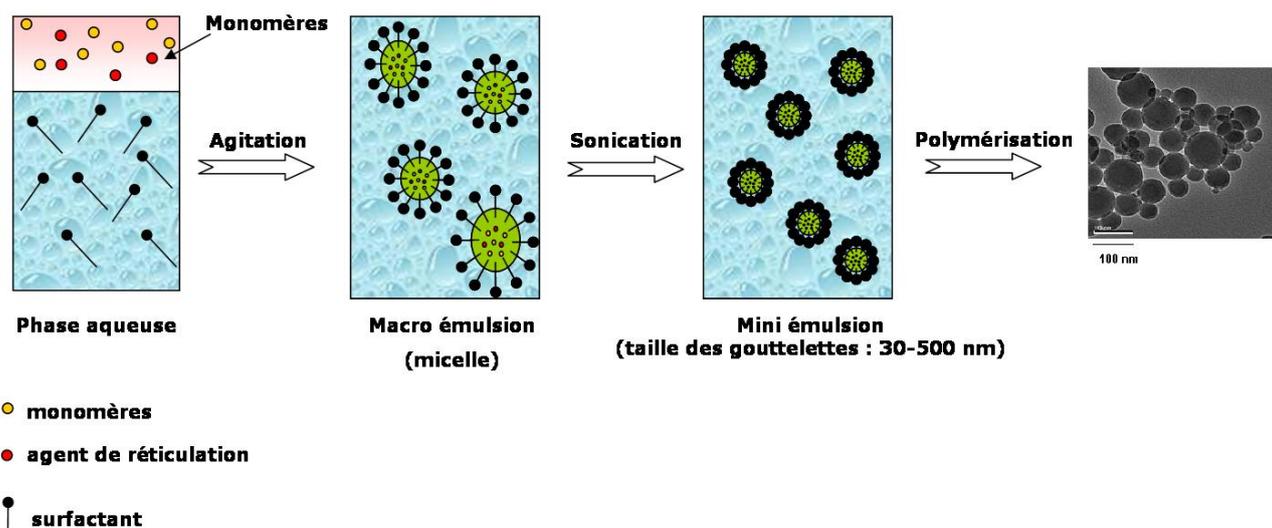


Figure 64 : Principe de la polymérisation en mini-émulsion.

La polymérisation en émulsion permet d'obtenir des particules synthétiques uniformes de taille inférieure au micromètre (50 nm-1  $\mu\text{m}$ ).

<sup>122</sup> a) A. Weber, M. Dettling, H. Brunner, G. Tovar, *Macromol. Rapid Commun.*, **2002**, 23, 824-828.  
 b) D. Vaihinger, K. Landfester, I. Kräuter, H. Brunner, G. Tovar, *Macromol. Chem. Phys.*, **2002**, 203, 1965-1973.

### 1.3 Les polymères imprimés mimant les phosphotriestérases

A l'heure actuelle, deux groupes se sont intéressés à l'hydrolyse catalytique d'organophosphorés en utilisant des empreintes moléculaires. Dans le premier exemple, le site catalytique du polymère est composé d'un complexe de cobalt (II)-imidazole, mimant le centre catalytique d'une phosphotriestérase (Figure 65).<sup>123</sup>

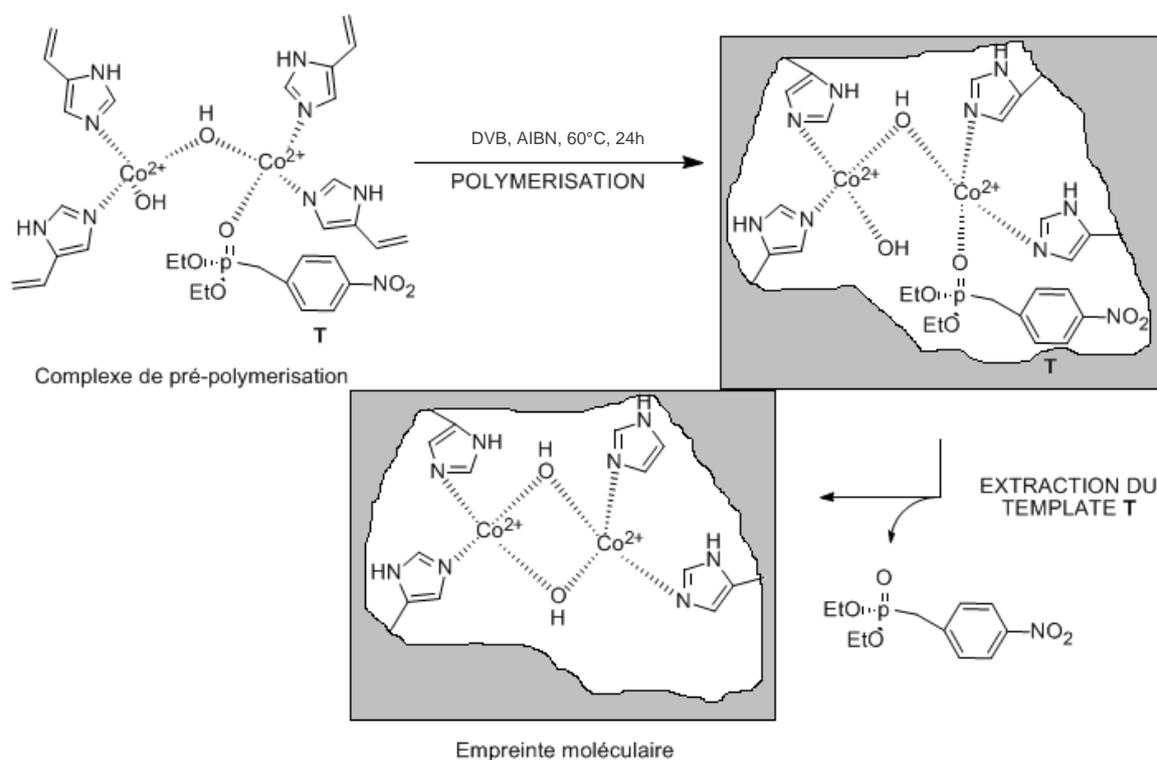


Figure 65 : Préparation de l'empreinte moléculaire utilisant le diethyl(4-nitrobenzyl)phosphonate comme template T.

Les auteurs utilisent la polymérisation en masse pour la synthèse des empreintes moléculaires. Ensuite les MIP sont utilisés pour la réaction d'hydrolyse du

<sup>123</sup> T. Yamazaki, E. Yilmaz, K. Mosbach, K. Sode., *Analytica Chimica Acta*, **2001**, 435, 209-214.

paraoxon en diéthylphosphate et para-nitrophénol. La formation de ce dernier est suivie par spectrophotométrie UV. Ils ont pu montrer que le polymère imprimé avec la complexe  $\text{Co}^{2+}$ -imidazole possède une activité hydrolytique du paraoxon 20 fois supérieure à celle, du polymère imprimé avec les imidazoles mais sans  $\text{Co}^{2+}$ . Il est également 100 fois plus actif qu'une solution de cobalt II. Par ailleurs, la polymérisation réalisée en présence ou en l'absence du template (analogue du paraoxon **T**) a permis de démontrer l'existence d'un effet d'empreinte puisque la vitesse d'hydrolyse est 1,5 fois plus rapide lorsque le polymère est synthétisé en présence de template **T**. Cette étude a permis de décrire le premier polymère imprimé possédant une activité hydrolytique vis-à-vis d'un organophosphotriester.

Dans le même objectif, R. Say et coll.<sup>124</sup> ont préparé des empreintes moléculaires à partir d'un complexe de pré-polymérisation constitué d'histidines polymérisables, de cuivre (II) et de L-paraoxon comme template. Ils ont utilisé la polymérisation en suspension, permettant d'obtenir des billes de diamètre compris entre 63 et 140  $\mu\text{m}$ . Une activité hydrolytique du paraoxon associée à un effet d'empreinte ont également été mis en évidence. Avec une constante de vitesse d'hydrolyse due aux polymères imprimés de  $k_{\text{PIB}} = 0,173 \text{ M}\cdot\text{min}^{-1}$  contre  $k_{\text{NIB}} = 4,3 \times 10^{-3} \text{ M}\cdot\text{min}^{-1}$  pour le polymère de contrôle, l'effet catalytique relatif est de 40,2 ( $k_{\text{PIB}}/k_{\text{NIB}}$ ).

A ce jour, les polymères imprimés enzymo-mimétiques de phosphotriestérases restent moins efficaces que les enzymes naturelles. Mais les premiers résultats obtenus ouvrent de belles perspectives.

## 2 STRATEGIE

La stratégie qui prédomine dans l'élaboration des empreintes moléculaires à activité catalytique est celle de l'analogie de l'état de transition de la réaction à catalyser. En 1948, Pauling fait l'hypothèse que la structure des enzymes est adaptée, non pas au réactif, mais à l'état de transition. En stabilisant celui-ci, elles

---

<sup>124</sup> R. Say, M. Erdem, A. Ersöz, H. Türk, A. Denizli, *Applied Catalysis A: General*, **2005**, 286, 221-225.

abaissent la barrière d'activation, et ce gain d'énergie se traduit par une augmentation de la vitesse de réaction.

Cette stratégie, appelée TSA (Transition State Analogue) s'est développée, pour les empreintes moléculaires, suite à d'excellents résultats obtenus avec des anticorps catalytiques générés contre des analogues stables d'état de transition de réactions<sup>125</sup> (abzymes). De plus, dans certains cas, il a été montré que la présence d'un groupe fonctionnel catalytique greffé au sein même de l'anticorps pouvait augmenter de manière significative la vitesse de la réaction catalysée par ce dernier. Par analogie, des polymères imprimés possédant des sites actifs ayant la forme de l'analogue de l'état de transition (effet d'empreinte) et disposant de groupes catalytiques correctement placés ont été développés. La plupart des exemples de préparation d'empreintes moléculaires à activité hydrolytique concerne des fonctions esters dont l'état de transition peut-être mimé par un groupement phosphonate.

Dans un premier cas de figure, l'analogue de l'état de transition et les groupes fonctionnels sont maintenus dans une bonne orientation spatiale grâce à leur coordination à un métal (par exemple  $\text{Co}^{2+}$ ).<sup>126</sup> Une autre alternative utilise des liaisons non covalentes entre les différents protagonistes au moment de la polymérisation pour assurer la création du site actif.<sup>127</sup> Le dernier cas de figure, fait intervenir des liaisons covalentes qui permettent une meilleure disposition des sites d'interaction à l'intérieur de l'empreinte.<sup>128</sup> En revanche l'étape d'extraction du template peut être plus délicate et nécessite l'utilisation de liaisons covalentes labiles, facilement clivables.

Dans certains cas, le template (analogue de l'état de transition ou pas) est conçu dans le but de placer dans l'empreinte les éléments clé de l'enzyme (par exemple une triade catalytique) permettant l'hydrolyse de la fonction souhaitée<sup>129</sup>. Comme précédemment, les liaisons de coordination, les liaisons non-covalentes et

---

<sup>125</sup> a) R.A. Lerner, S.J. Benkovic, P.G. Schultz, *Science*, **1991**, 252, 659-667. b) P.G. Schultz, *Angew. Chem.*, **1989**, 101, 1336-1348. c) P.G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1989**, 28, 1283-1295.

<sup>126</sup> a) A. Leonhardt, K. Mosbach, *React. Polym. Ion. Exch. Sorbents*, **1987**, 6, 285-286. b) D.K. Robinson, K. Mosbach, *J. Chem. Soc, Chem. Commun.*, **1989**, 969-970.

<sup>127</sup> a) K. Ohkubo, Y. Funakoshi, Y. Urata, S. Hirota, S. Usui, T. Sagawa, *Chem. Commun.*, **1995**, 2143-2144. b) Y. Kawanami, T. Yunoki, A. Nakamura, K. Fujii, K. Umano, H. Yamauchi, K. Masuda, *J. Mol. Catal. A*, **1999**, 145, 107-110.

<sup>128</sup> a) B. Sellergren, K.J. Shea, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1994**, 5, 1403-1406. b) B. Sellergren, R.N. Karmalkar, K.J. Shea, *J. Org. Chem*, **2000**, 65, 4009-4027.

<sup>129</sup> C.M. Hartshorn, J.R. Deschamps, A. Singh, E.L. Chang, *Reactive & Functional polymers*, **2003**, 55, 219-229.

covalentes sont utilisées pour obtenir l'arrangement souhaité dans le site de reconnaissance des MIPs.

### **3 APPLICATION DES EMPREINTES MOLECULAIRES A LA DEGRADATION DES ORGANOPHOSPHORES TOXIQUES**

#### **3.1 Approche dite de l'analogue de l'état de transition**

Notre première idée fût donc d'appliquer cette stratégie à la dégradation du **VX** (ou du **PhX**). En nous inspirant des travaux réalisés par Vayron et *coll.* sur les anticorps catalytiques<sup>130</sup> et après étude du mécanisme d'hydrolyse du **VX**, nous avons imaginé un premier template utilisant l'approche dite de l'analogue de l'état de transition.

##### **3.1.1 Mécanismes d'hydrolyse du VX**

Pour dégrader le **VX** en produits non toxiques, comme nous l'avons vu dans la partie introductive, il est nécessaire de couper sélectivement la liaison P-S car l'acide phosphorique formé par la coupure de la liaison P-O est presque aussi toxique que le **VX** lui-même<sup>131</sup> (Schéma 38).

---

<sup>130</sup> P. Vayron, *Application des anticorps catalytiques à la dégradation des organophosphorés toxiques*, Thèse de doctorat de l'université de Paris XI Orsay, **1999**.

<sup>131</sup> Y.C. Yang, *Acc. Chem. Res.*, **1999**, 32, 109-115.

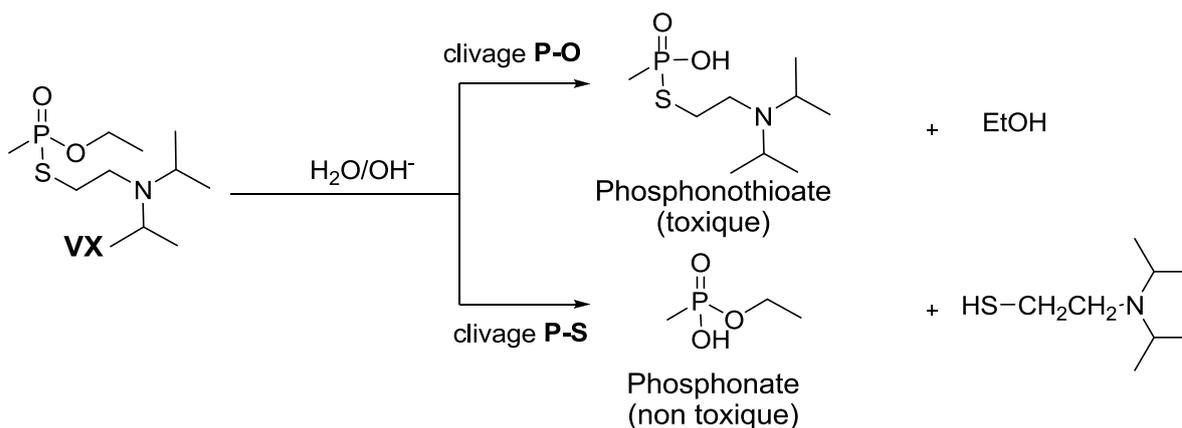


Schéma 38 : Hydrolyse basique du **VX**.

Pour réaliser cette coupure, on peut envisager soit une hydrolyse soit une perhydrolyse.

En effet, Yang<sup>132</sup> a montré que le **VX** peut rapidement ( $t_{1/2} = 42\text{s}$ ) être dégradé par perhydrolyse *via* un transfert d'oxygène intramoléculaire de façon totalement spécifique envers la liaison P-S. Mais cette réaction nécessite la présence d'eau oxygénée ou d'un autre peroxyde ou peracide, conditions peu compatibles avec des applications *in vivo*. C'est pourquoi nous nous focaliserons sur l'hydrolyse

Celle-ci ne procède pas par un mécanisme unique mais par plusieurs mécanismes différents en fonction des conditions réactionnelles.

Le mécanisme le plus communément admis pour l'hydrolyse de phosphotriesters en milieu aqueux basique implique l'attaque nucléophile d'un ion hydroxyde sur l'atome de phosphore et la formation d'un intermédiaire bipyramide trigonale.<sup>133</sup> Ce type de substitution nucléophile sur le phosphore satisfait un certain nombre de règles :

- Les groupements en position équatoriale et apicale peuvent se réarranger par pseudo-rotation ou effet tourniquet autour du phosphore<sup>134</sup> (Figure 66).

<sup>132</sup> Y.C. Yang, L.L. Szafraniec, W.T. Beaudry, C.A. Bunton, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 6964-6965

<sup>133</sup> F.H. Westheimer, *Acc. Chem. Res.*, **1968**, 1, 70-78.

<sup>134</sup> a) P. Gillespie, R. Ramirez, I. Ugi, D. Marquarding, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1973**, 12, 91-119. b) R.S. Berry, *J. Chem. Phys.*, **1960**, 32, 933-938.



Figure 66 : Réarrangement des groupements autour du phosphore par effet tourniquet.

- Le nucléophile et le nucléofuge entrent ou sortent préférentiellement par la position apicale.
- Les groupes électronégatifs, ou possédant une orbitale vacante de basse énergie, occupent préférentiellement la position apicale.<sup>135</sup>
- Les groupes encombrés ou  $\pi$ -donneurs (atomes possédant un doublet libre notamment) occupent préférentiellement la position équatoriale.<sup>136</sup>

Le mécanisme d'hydrolyse du **VX** en solution basique peut alors être décrit selon le schéma réactionnel suivant.

---

<sup>135</sup> a) S. Trippett, *Pur. Appl. Chem.*, **1974**, 40, 595-605. b) S. Trippett, *Phosphorus and Sulfur and the Related Elements*, **1976**, 1, 89-98.

<sup>136</sup> Y.C. Yang, L.L. Szafraniec, W.T. Beaudry, D.K. Rohrbaugh, L.R. Procell, J.B. Samuel, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 8407-8413.

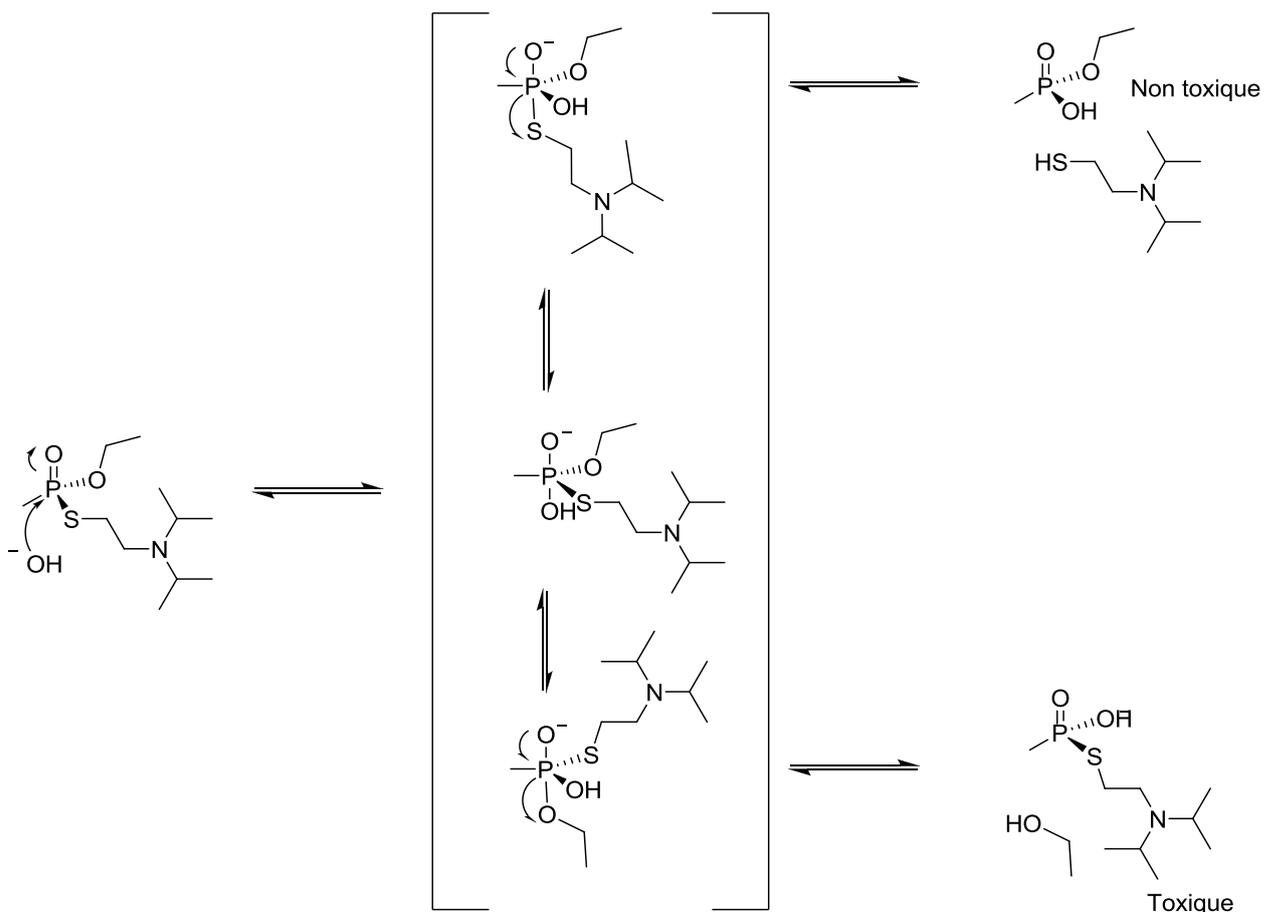


Schéma 39 : Mécanisme d'hydrolyse du VX – passage par un intermédiaire P(V).

Ainsi dans le cas du **VX**, on observe la formation de deux acides phosphoniques résultants de la coupure non exclusive des liaisons P-S et P-O dans un rapport 88/12 en solution diluée.<sup>136</sup> Ce rapport est en contradiction avec la règle énoncée par Trippett selon laquelle l'oxygène étant plus électronégatif que le soufre, il devrait se positionner préférentiellement en position apicale et donc la coupure de la liaison P-O devrait être majoritaire. L'hydrolyse ne se fait donc sans doute pas exclusivement *via* un intermédiaire P(V).

Yang et *coll.* ont étudié en détail les mécanismes de l'attaque nucléophile des ions hydroxydes, hydroperoxydes, alkoxydes et oximates sur le méthylphosphonothioate de O,S-diéthyle. Ils ont confirmé par des expériences de cinétiques et de marquages isotopiques que les résultats ne peuvent pas être interprétés par la formation d'un intermédiaire bipyramide trigonale.<sup>137</sup> Les auteurs

<sup>137</sup> Y.C. Yang, F.J. Berg, L.L. Szafraniec, W.T. Beaudry, C.A. Bunton, A. Kumar, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1997**, 607-613.

concluent donc que le mécanisme est de type  $SN_2(P)$  avec formation et coupure simultanées de liaisons.

Deux autres types de mécanisme mettant en jeu l'assistance de la chaîne azotée ont été décrits.<sup>138</sup> Le premier implique l'attaque du doublet libre de l'azote sur le carbone en  $\alpha$  du soufre et la coupure consécutive de la liaison C-S (Schéma 40). Ce mécanisme est minoritaire ( $k_0 = 4,6 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ) sauf à des températures élevées.

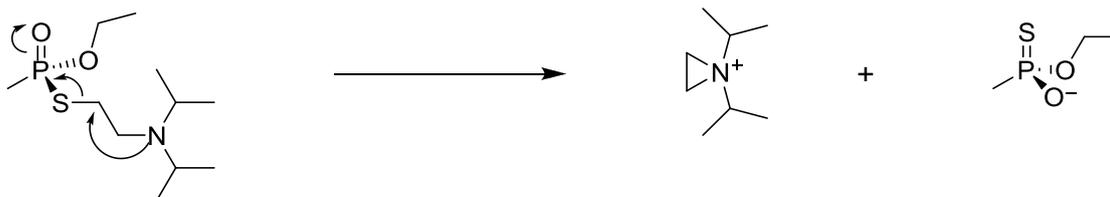


Schéma 40 : Mécanisme d'hydrolyse du VX – Assistance de l'azote.

Le second implique une catalyse basique intramoléculaire résultant du repliement de la chaîne azotée sur le phosphore qui facilite l'attaque d'une molécule d'eau (Schéma 41). En fonction du groupement présent en position apicale, ce mécanisme peut conduire aux coupures des liaisons P-S ou P-O dans un rapport 45/55 avec une constante de vitesse de  $3,6 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ .

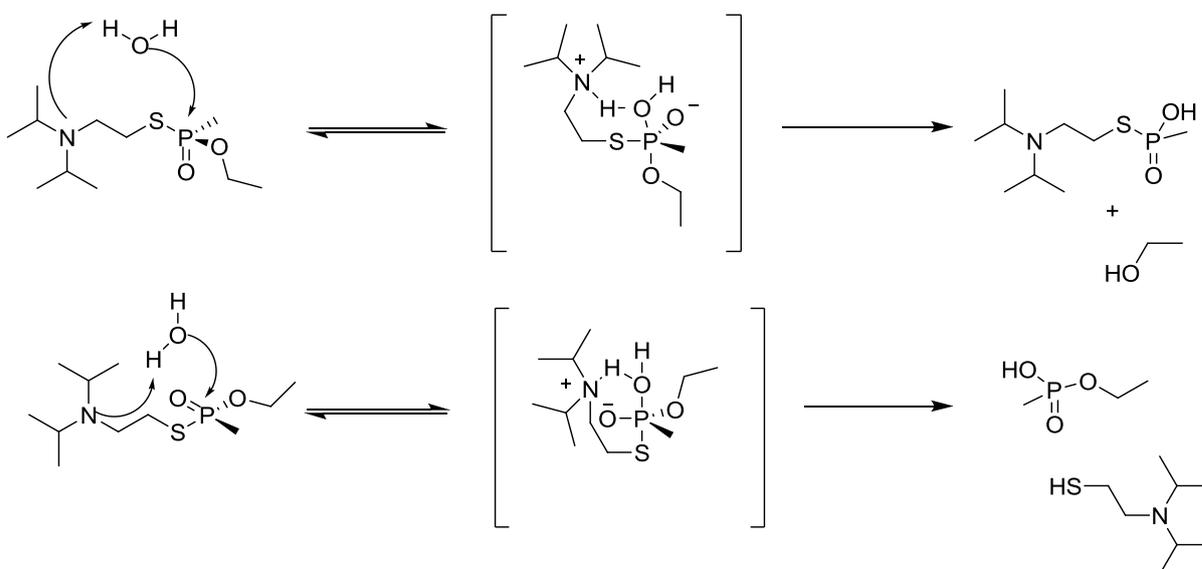


Schéma 41 : Mécanisme d'hydrolyse du VX – Catalyse basique intramoléculaire.

<sup>138</sup> Y.C. Yang, L.L. Szafraniec, W.T. Beaudry, D.K. Rohrbaugh, L.R. Procell, J.B. Samuel, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 8407-8413.

Ce mécanisme est favorisé pour les faibles concentrations en ions hydroxydes (pH entre 7 et 9). De plus, à pH neutre, aucune réaction n'est observée avec le méthylphosphonothioate de O-S-diéthyle (qui ne possède pas le groupement azoté du **VX**) après sept mois d'incubation à température ambiante.

Un troisième mécanisme a été décrit en milieu concentré en toxique et permet d'expliquer le phénomène d'hydrolyse auto-catalytique<sup>139</sup> observé dans du tampon phosphate. En effet, en présence d'une petite quantité d'eau (70 mg par g de **VX**), le toxique est totalement hydrolysé dans une période de 1 à 2 mois à température ambiante par une coupure exclusive de la liaison P-S, comme décrit dans le schéma ci-dessous.

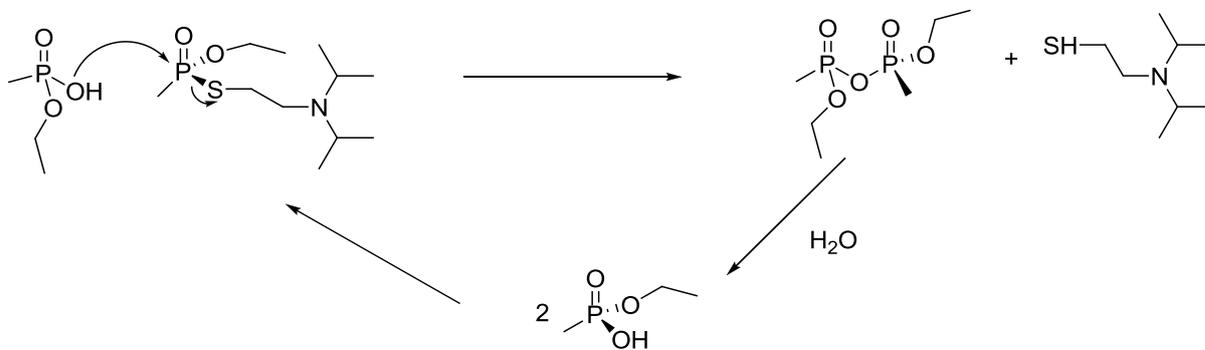


Schéma 42 : Hydrolyse auto-catalytique du **VX**.

### 3.1.2 Conception du template

Il apparaît que l'hydrolyse du **VX** est complexe et peut se faire par divers mécanismes. Nous avons choisi de privilégier le mécanisme le plus communément admis pour les phosphotriesters, soit le passage par un intermédiaire de géométrie de type pyramidal trigonal.

La structure du template envisagé pour l'hydrolyse du **VX** (Figure 67) présente les caractéristiques suivantes :

- Une chaîne azotée et un groupement éthoxy qui mime la structure du **VX**, assurant la reconnaissance moléculaire du substrat.
- Un phénol possédant un groupement bezyloxy en ortho qui vont participer à l'équilibre entre les formes P(IV) et P(V).
- Une fonction polymérisable, permettant l'approche covalente.

<sup>139</sup> P.Y. Renard, P. Vayron, F. Taran, C. Mioskowski, *Tet. Lett.* **1999**, 40, 281-284.

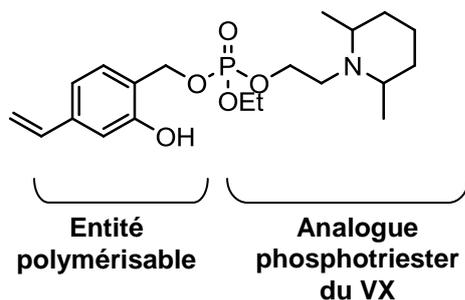


Figure 67 : Structure du template analogue de l'état de transition.

Lors de ses travaux de thèse, P. Vayron a montré qu'un tel template pouvait se réarranger par pseudo-rotation autour du phosphore. Lorsque le groupement éthyle est en position apicale, alors l'intermédiaire P(V) conduit à l'expulsion irréversible d'une molécule d'éthanol et à la formation d'un phosphate cyclique (Schéma 43). Ce phénomène compromet l'équilibre entre les formes P(IV) et P(V).

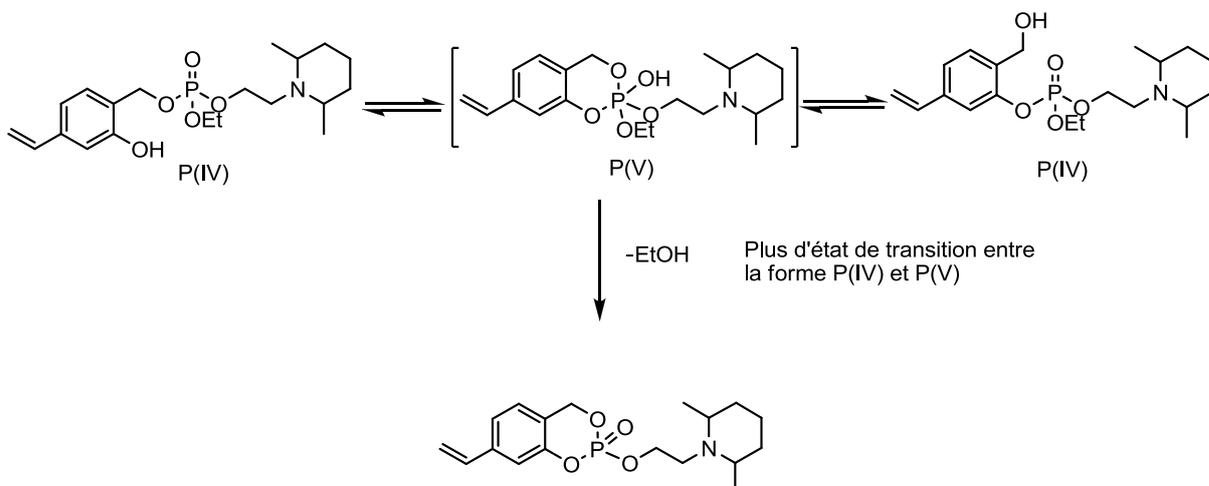
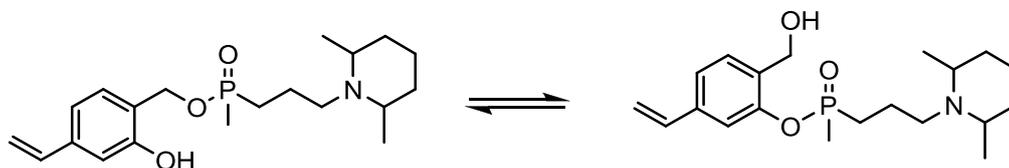


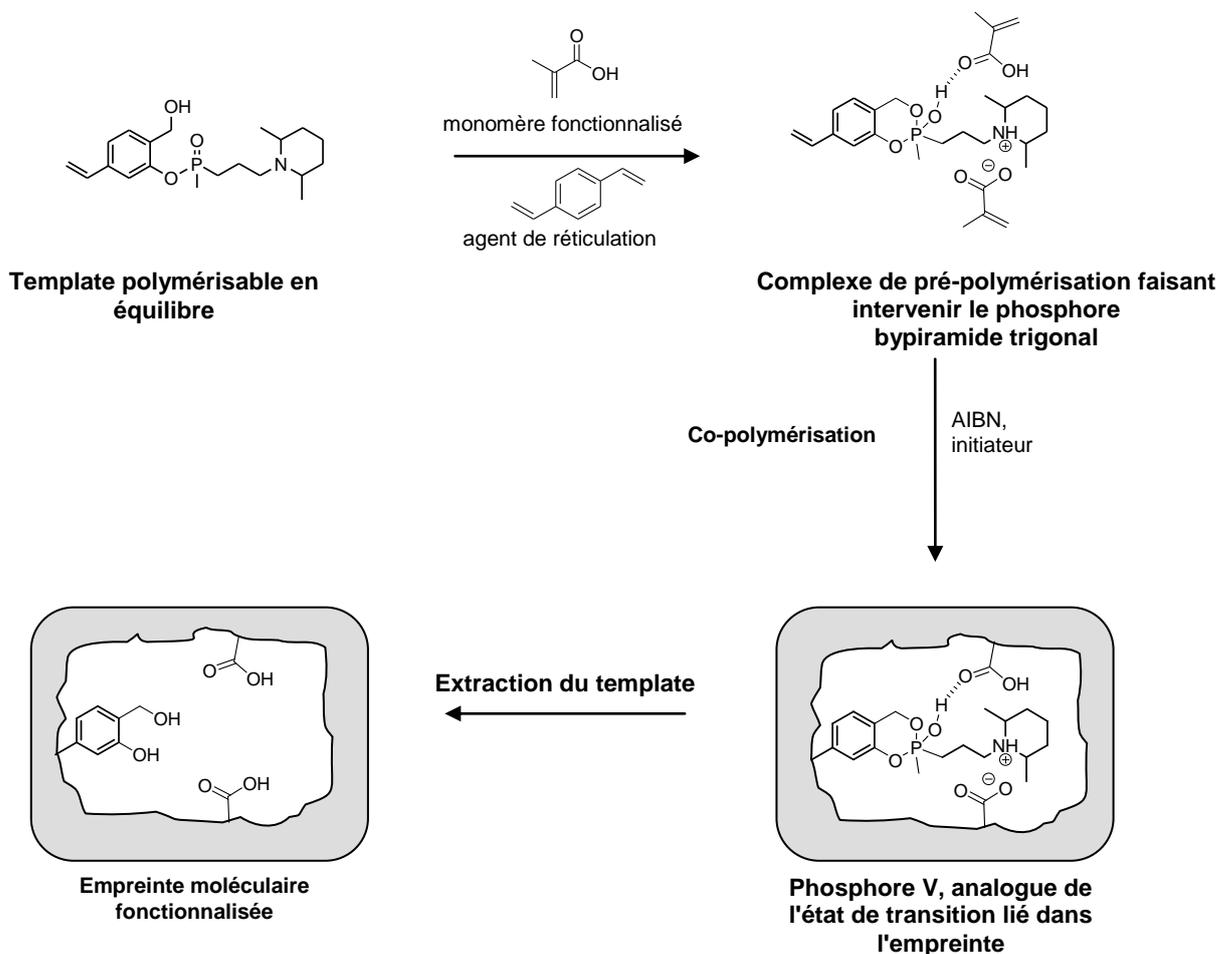
Schéma 43 : Illustration du phénomène d'irréversibilité.

Il est possible de remédier à ce problème d'irréversibilité en remplaçant les deux groupements alkoxy par des groupements carbonés sur l'atome de phosphore. Le phénomène d'expulsion est alors rendu impossible (Schéma 44).



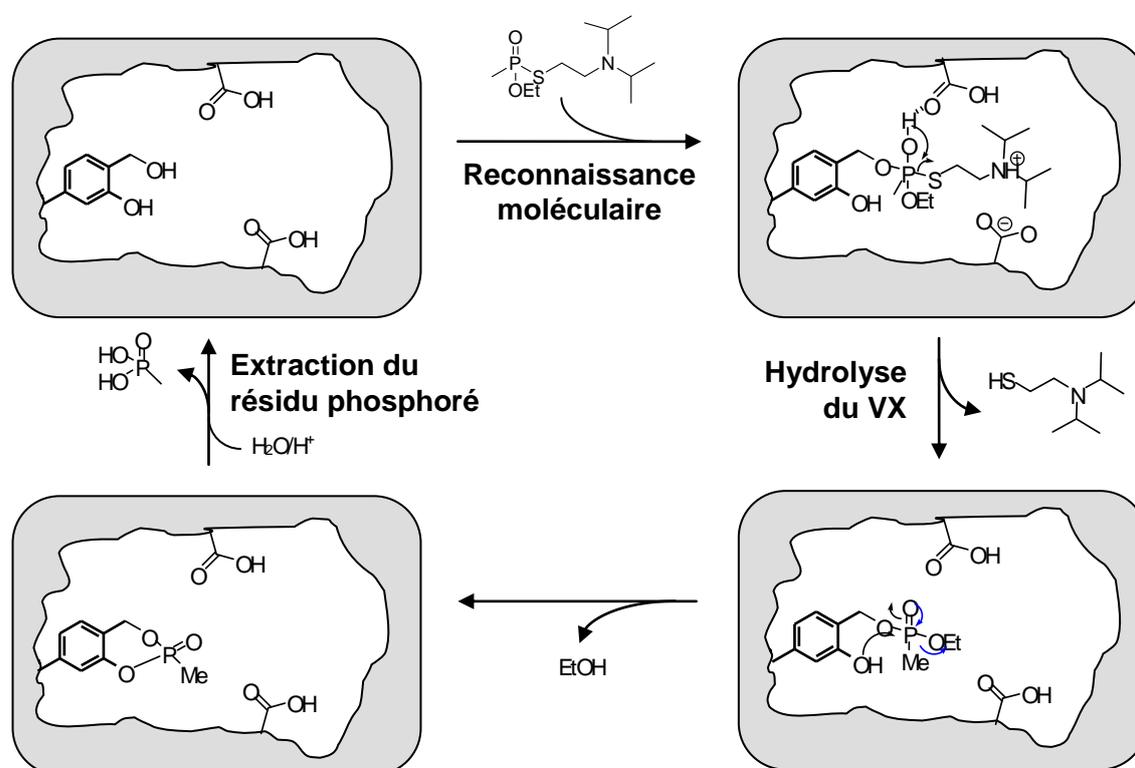
**Schéma 44 :** Template TSA en équilibre.

Ce template en équilibre a donc été choisi pour la synthèse d'empreinte moléculaire selon la stratégie de l'analogue de l'état de transition. Il est alors possible d'envisager la synthèse des polymères imprimés en présence d'acide acrylique (monomère fonctionnalisé) et de divinylbenzène (agent de réticulation) (Schéma 45).



**Schéma 45 :** Synthèse envisagée de l'empreinte moléculaire avec le template en équilibre.

Les monomères fonctionnalisés s'organisent autour du template, par liaisons hydrogène pour former un complexe de pré-polymérisation. Ce complexe est ensuite figé lors de l'étape de polymérisation. Après extraction du template, l'empreinte moléculaire contient le motif phénol et des fonctions acides théoriquement bien disposées spatialement. L'hydrolyse du **VX** devrait ensuite avoir lieu hypothétiquement de la manière suivante.



**Schéma 46 :** Schéma hypothétique d'hydrolyse du **VX** par l'empreinte moléculaire.

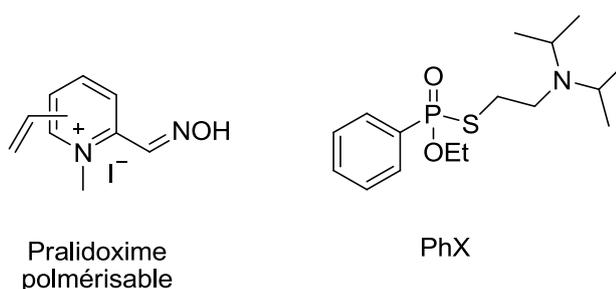
Au regard du schéma 46, il apparaît qu'une telle empreinte moléculaire ne possèdera pas une activité catalytique. En effet, même si elle permettrait l'hydrolyse du **VX**, le phosphore est lié de manière irréversible au phénol après expulsion d'une molécule d'éthanol. Une étape d'extraction du template serait nécessaire pour la régénération de l'empreinte. Celle-ci ne peut donc convenir à l'objectif que nous nous sommes fixé, qui est l'obtention d'une empreinte moléculaire permettant l'hydrolyse catalytique du **VX**.

Devant les limites de cette première approche, nous nous sommes orientés vers une autre stratégie consistant à intégrer dans l'empreinte, au moment de sa formation, un groupe catalytique assurant l'hydrolyse de l'organophosphonothioate. La reconnaissance moléculaire serait permise par la présence d'un analogue du **VX** et de monomères fonctionnalisés, le tout assurant la complémentarité de taille et de forme de l'empreinte.

### 3.2 Nouvelle stratégie

La nouvelle stratégie consiste à utiliser l'approche covalente afin d'intégrer dans une empreinte moléculaire une molécule réactive capable d'hydrolyser sélectivement la liaison P-S des organophosphonothioates. L'entité hydrolytique devra comporter une fonction polymérisable pour être liée de manière covalente au polymère et ainsi rester de manière permanente dans la cavité de l'empreinte.

Le choix de l'entité hydrolytique s'est porté sur l'utilisation d' $\alpha$ -nucléophiles. Parmi eux, les oximes<sup>140</sup> semblent être les mieux adaptés dans la mesure où elles sont connues pour cliver sélectivement la liaison P-S des agents **V**.<sup>141</sup> Ainsi la pralidoxime nous est apparue comme la meilleure option. La figure 68 présente les deux molécules à partir desquels le template devra être construit.



**Figure 68 :** Molécules clés pour la conception des nouveaux templates.

<sup>140</sup> a) Y.C. Yang, F.J. Berg, L.L. Szafraniec, W.T. Beaudry, C.A. Bunton, A. Kumar, *J. Chem. Soc., Perkin trans . 2*, **1997**, 607-613. b) J. Epstein, J.J Callahan, V.E. Bauer, *Phosphorus*, **1974**, *4*, 157-163

<sup>141</sup> a) C.A. Boulet, A.S. Hansen, *Phosphorus, Sulfur, Silicone*, **1991**, *57*, 147-161. b) P.M. Lundy, A.S. Hansen, B.T. Hand, C.A. Boulet, *Toxicology*, **1992**, *72*, 99-105.

Quelque soit le mode de polymérisation choisi, le template mis en présence des monomères fonctionnels (acide acrylique) et de l'agent de réticulation formera un complexe de pré-polymérisation (CP) par le biais d'interactions non covalentes (liaisons hydrogènes et électrostatiques). Ce complexe, figé lors de l'étape de polymérisation, permettra d'obtenir une structure rigide garante d'une empreinte moléculaire efficace. Après un traitement adéquat du polymère, celui-ci devrait disposer de cavités ayant une complémentarité avec la molécule de **PhX**. Cette cavité devrait contenir l'entité  $\alpha$ -nucléophile nécessaire à l'hydrolyse du toxique ainsi que des fonctions acides susceptibles d'assurer la reconnaissance moléculaire, d'activer la liaison P-S à rompre et également d'éviter que les intermédiaires réactionnels ne bloquent l'empreinte moléculaire en les rendant plus labiles et donc plus facilement hydrolysables.

Nous avons choisi de développer en parallèle deux types d'empreintes moléculaires synthétisées soit par polymérisation en masse soit par polymérisation en mini-émulsion. Notons que pour le polymère en mini-émulsion nous avons utilisé une technique innovante « one pot ». Mise au point au laboratoire et inspirer des travaux de Tovar et Whitcombe.<sup>142</sup> Cette nouvelle technique de polymérisation combine l'approche semi-covalente avec la polymérisation en mini-émulsion tout en permettant une impression en surface à l'aide d'un template tensioactif.<sup>143</sup>

### 3.2.1 Empreinte moléculaire *via* la polymérisation en masse

La polymérisation en masse est de loin la technique la plus utilisée pour la synthèse d'empreintes moléculaires du fait de sa simplicité de mise en œuvre.<sup>144</sup> Cependant, les étapes de broyage et de tamisage, nécessaires à l'obtention de particules de petites tailles, entraîne une perte importante de polymère imprimé. De plus la taille et la forme des particules obtenues sont très irrégulières.

---

<sup>142</sup> a) N. Pérez, M.J. Whitcombe, E.N. Vulfson, *Macromolecules* **2001**, *34*, 830-836. b) D. Vaihinger, K. Landfester, I. Kräuter, H. Brunner, G.E.M. Tovar, *Macromol. Chem. Phys.* **2002**, *203*, 1965-1973.

<sup>143</sup> P. Curcio, C. Zandanel, A. Wagner, C. Mioskowski, R. Baati, *Macromolecular Biosciences*, **2009**, *9*, 596-604.

<sup>144</sup> a) K. Mosbach, O. Ramson, *Biotechnology*, **1996**, *14*, 163. b) G. Wulff, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1995**, *34*, 1812-1832.

### 3.2.1.1 Principe et choix du template

Les deux impératifs de notre stratégie pour la conception du template sont la présence d'une entité nucléophile de type pralidoxime et d'un analogue du **PhX**. La structure la plus simple du template envisagée pour la polymérisation en masse est présentée dans la figure 69.

---

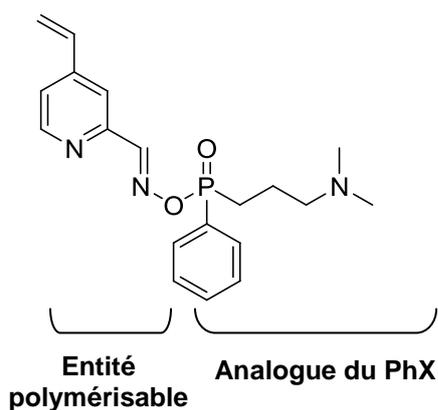


Figure 69 : Structure du template pour la polymérisation en masse.

Ainsi, comme nous l'avons expliqué précédemment, le template formera un complexe de pré-polymérisation en présence d'acide acrylique (3 équivalents). Après l'étape de polymérisation, le polymère obtenu sous la forme d'un bloc monolithique subira des étapes de broyage/tamisage afin de rendre accessible les empreintes proprement dites. L'extraction du template permettra d'obtenir des cavités comportant le nucléophile et des fonctions acides (Schéma 47 ).

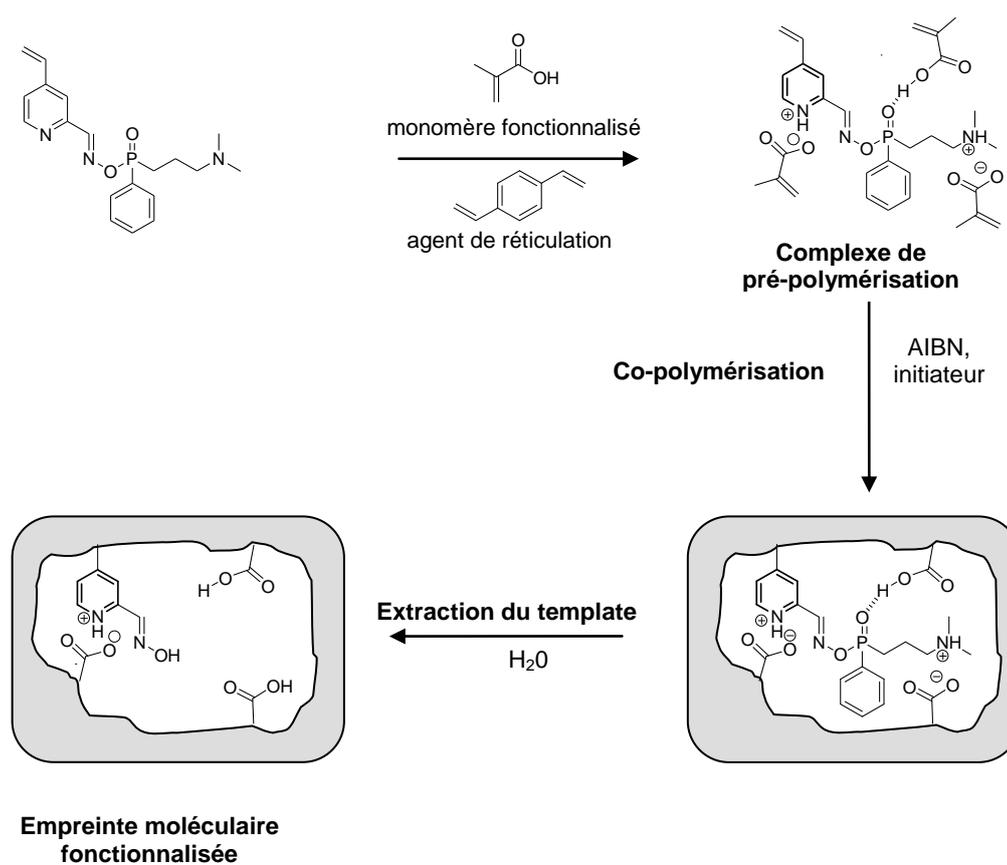
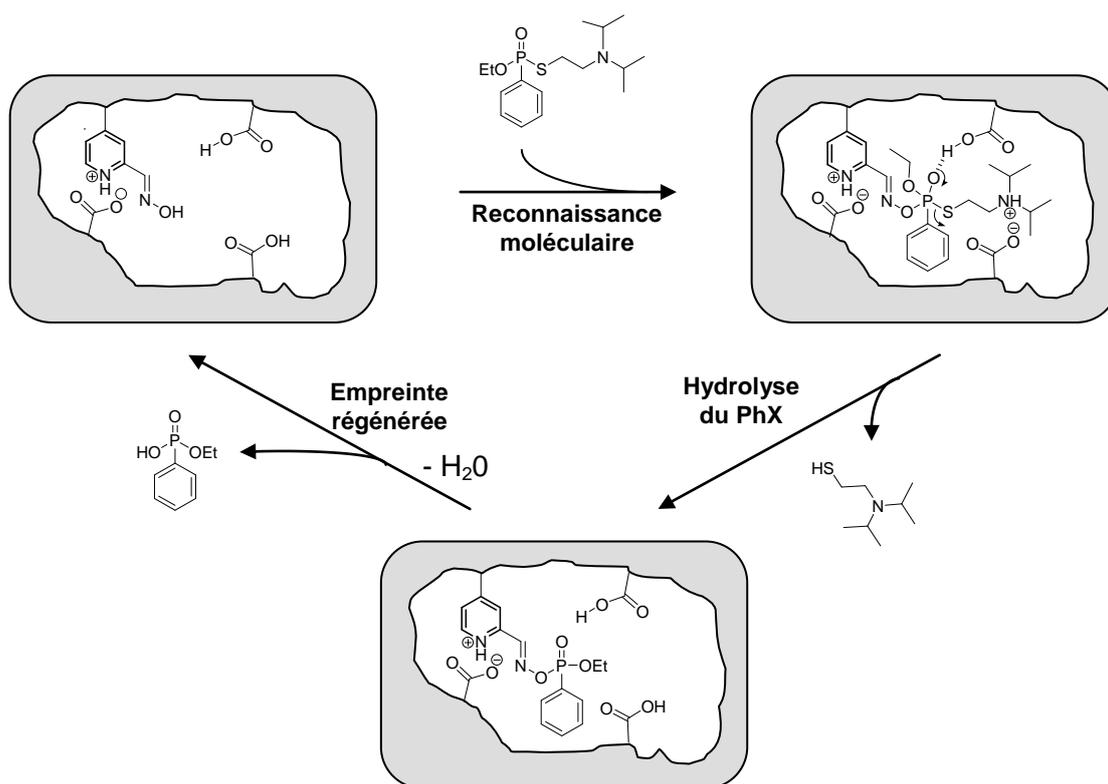


Schéma 47 : Synthèse envisagée de polymères imprimés par polymérisation en masse

L'empreinte ainsi obtenue devrait permettre l'hydrolyse du **PhX** comme indiquée par le schéma 48.



**Schéma 48** : Schéma hypothétique d'hydrolyse du **PhX** par l'empreinte moléculaire.

Après l'étape de reconnaissance moléculaire, le substrat serait hydrolysé par rupture de la liaison P-S. La phosphoryloxime résultante serait à son tour hydrolysée, permettant la régénération de l'oxime et la mise en place du cycle catalytique.

### 3.2.1.2 Etudes sur stabilité de la liaison N-O-P

Cette stratégie repose sur la stabilité relative de la liaison N-O-P. En effet celle-ci doit être suffisamment stable pour résister à l'étape de polymérisation mais elle doit être également labile afin de permettre la régénération du catalyseur à l'intérieur de l'empreinte moléculaire.

P. Vayron, lors de ses travaux de thèse,<sup>145</sup> a étudié la réaction présentée dans le schéma 49 afin de tester la stabilité de l'intermédiaire formé par l'attaque de l'oxime sur le **PhX**.

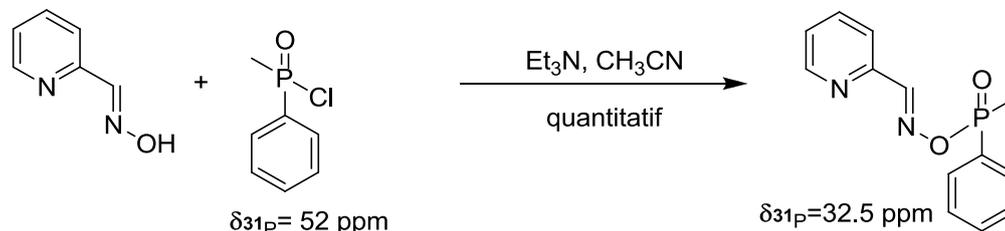


Schéma 49 : Synthèse d'un analogue pour l'étude de la stabilité de la liaison N-O-P.

La phosphoryloxime a été isolée sous atmosphère inerte et caractérisée. Dans le chloroforme deutérié anhydre, le spectre RMN du  $^{31}\text{P}$  donne un singulet à 32,5 ppm, alors que le chlorure de phosphinyle de départ présente un signal à 52 ppm et l'acide phosphonique correspondant donne un singulet à 40,1 ppm. Le spectre  $^1\text{H}$  montre quant à lui une modification des déplacements chimiques des protons de la pyridine et la disparition du proton de l'oxime.

L'ajout d'une goutte d'eau au milieu réactionnel provoque immédiatement l'hydrolyse de la liaison N-O-P pour redonner la 2-pyridine aldoxime et l'acide phosphinique (Schéma 50).

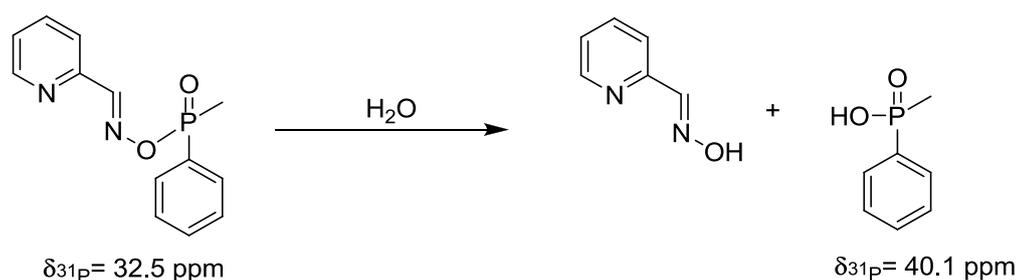


Schéma 50 : Hydrolyse de la liaison N-O-P en présence d'eau.

Ceci a été démontré en suivant l'évolution du mélange réactionnel en RMN  $^{31}\text{P}$  : en présence d'eau, le signal à 32,5 ppm disparaît au profit d'un singulet à 40,1

<sup>145</sup> P. Vayron, *Application des anticorps catalytiques à la dégradation des organophosphorés toxiques*, Thèse de doctorat de l'Université de Paris XI Orsay, **1999**

ppm. Ces observations lui ont permis de conclure quant à l'instabilité en milieu aqueux des phosphoryloximes.

Les travaux suivant concernant l'étude et la synthèse du template pour la polymérisation en masse ont été réalisés en collaboration avec le Dr Sanjeevaroo (projet "neurodetox" 2006-2010, financé par l'Agence Nationale de la Recherche) Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes également intéressés à la stabilité des phosphoryloximes à plus haute température, afin de nous assurer de leur stabilité pendant la préparation des polymères.

Pour cela, nous avons étudié la réaction de synthèse de la phosphoryloxime **81** à partir de deux produits commerciaux (Schéma 51).

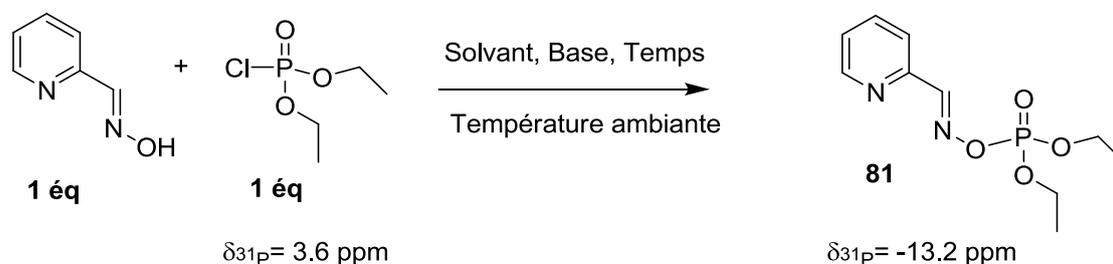


Schéma 51 : Réaction choisie pour l'étude de la stabilité de la liaison N-O-P.

L'avancement de la réaction est suivi par RMN du  $^{31}\text{P}$ . En effet dans le chloroforme deutérié anhydre, le composé P-Cl de départ donne un singulet à 3,6 ppm alors que la phosphoryloxime d'arrivée donne un singulet à -13,2 ppm. En intégrant les deux pics il est possible d'évaluer le rendement de la réaction. Dans un premier temps différentes conditions expérimentales ont été testées afin de déterminer celles permettant d'obtenir le meilleur rendement.

Les réactions sont effectuées à température ambiante avec un équivalent de chacun des deux réactifs. Nous avons fait varier le solvant, la base à différentes concentrations et le temps de réaction. Les résultats sont résumés dans les tableaux suivants. Le pourcentage de conversion du composé P-Cl et le rendement de la réaction ont été obtenu par intégration des signaux des spectres RMN  $^{31}\text{P}$ .

| Entrée | Solvant            | Base                       | Temps de réaction | Pourcentage de conversion du composé P-Cl | Rendement de la réaction |
|--------|--------------------|----------------------------|-------------------|-------------------------------------------|--------------------------|
| 1      | CDCl <sub>3</sub>  | Et <sub>3</sub> N (1.1 eq) | 4h                | 100%                                      | 83%                      |
| 2      | CDCl <sub>3</sub>  | Et <sub>3</sub> N (1.1 eq) | 19h               | 100%                                      | 19%                      |
| 3      | CH <sub>3</sub> CN | Et <sub>3</sub> N (1.1eq)  | 5h                | 100%                                      | 77%                      |
| 4      | CH <sub>3</sub> CN | Et <sub>3</sub> N (7% mol) | 4h                | 100%                                      | 16%                      |
| 5      | CH <sub>3</sub> CN | TBD (7% mol)               | 4h                | 100%                                      | 77%                      |
| 6      | CH <sub>3</sub> CN | DMAP (7% mol)              | 4h                | 100%                                      | 91%                      |
| 7      | CH <sub>3</sub> CN | sans base                  | 4h                | 100%                                      | 5%                       |
| 8      | CDCl <sub>3</sub>  | DMAP (7% mol)              | 4h                | 100%                                      | 19%                      |
| 9      | DMSO               | DMAP (7% mol)              | 4h                | 100%                                      | 5%                       |
| 10     | DCM                | DMAP (7% mol)              | 7h                | 100%                                      | 83%                      |
| 11     | THF                | DMAP (7% mol)              | 7h                | 100%                                      | 33%                      |

Tableau 9 : Criblage des conditions réactionnelles.

Dans un premier temps, l'utilisation de la triéthylamine en quantité stœchiométrique dans le chloroforme deutérié et dans l'acétonitrile a été envisagée. Au bout de 4 heures, le rendement obtenu était satisfaisant (entrées 1 et 3). Cependant, la phosphoryloxime **81** semble être relativement instable puisqu'au bout de 19 heures, le rendement chute de 83% à 19%, ce qui montre une dégradation du produit final (entrée 2). Nous avons par la suite estimé plus intéressant de réaliser la réaction avec une quantité catalytique de base plutôt que stœchiométrique. Malheureusement, la triéthylamine à 7 % molaire n'ayant pas donné un rendement satisfaisant (entrée 4), nous avons donc rapidement testé différentes bases. La TBD et la DMAP ont été testées (entrées 5 et 6), cette dernière s'est révélée la plus efficace avec un rendement de 91%. Un essai sans base a également été réalisé afin de vérifier la nécessité de celle-ci (entrée 7). Quasi aucune réaction ne s'est produite. Mais la conversion totale de notre P-Cl montre une forte instabilité de ce dernier dans l'acétonitrile, qui se dégrade entièrement au bout de 4 heures. Par conséquent, il apparaît que la DMAP permet un couplage extrêmement rapide des deux entités vis-à-vis de la réaction de dégradation du composé P-Cl (seulement 9% de perte de rendement). Enfin, l'influence du solvant a été étudiée avec la DMAP. L'acétonitrile s'est avéré être le

meilleur solvant (entrée 6). Les faibles rendements obtenus dans le DMSO et le THF (entrées 9 et 10) peuvent s'expliquer par une diminution de la vitesse de réaction de couplage, par rapport à la dégradation du composé P-Cl de départ.

Nous nous sommes également intéressés à la quantité catalytique de base à utiliser, les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous

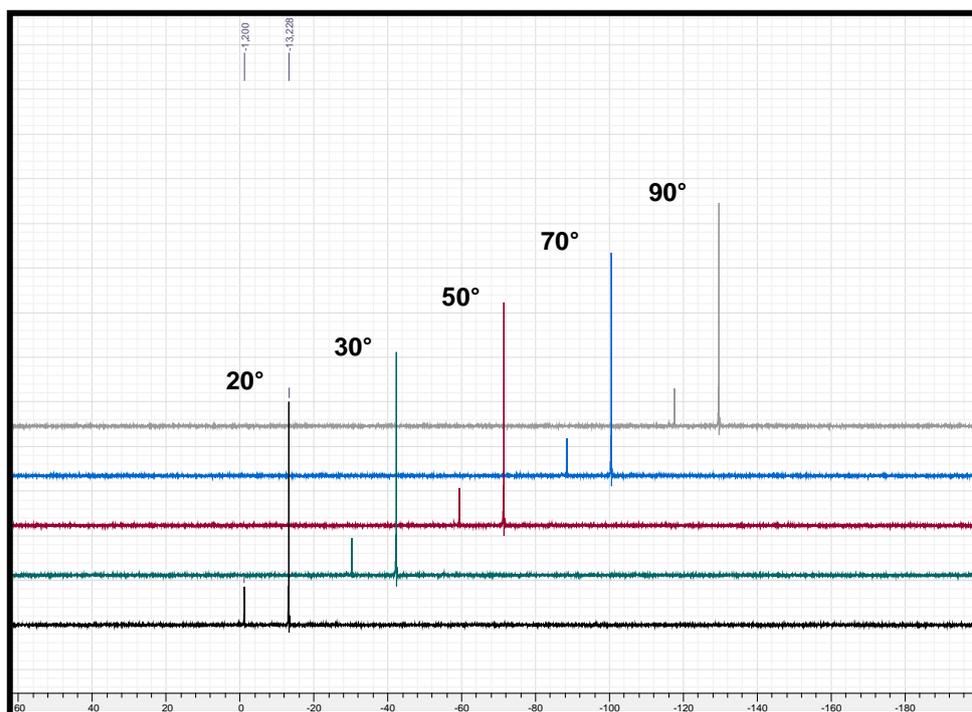
| Entrée | Pourcentage de base | Pourcentage de conversion du composé P-Cl | Rendement de la réaction |
|--------|---------------------|-------------------------------------------|--------------------------|
| 1      | 1%mol               | 100%                                      | 6%                       |
| 2      | 3%mol               | 100%                                      | 33%                      |
| 3      | 5%                  | 100%                                      | 59%                      |
| 4      | 7%mol               | 100%                                      | 91%                      |
| 5      | 10%mol              | 100%                                      | 83%                      |

Tableau 10 : Influence de la quantité de DMAP.

Nous avons ainsi constaté qu'une quantité inférieure à 7% molaire ne permettait pas un couplage suffisamment rapide entre l'oxime et le composé phosphoré P-Cl pour limiter le phénomène de dégradation de ce dernier.

Les principaux problèmes de cette réaction mis à jour par cette étude sont : l'instabilité du produit phosphoré de départ et celle de la phosphoryloxime **81** finale. Les conditions mises au point, à savoir DMAP 7% molaire dans l'acétonitrile nous ont permis de palier à ces difficultés. Finalement la concentration initialement (7% molaire) utilisée permet d'obtenir les meilleurs résultats.

La stabilité du composé **81** a ensuite été étudiée dans le DMSO deutérié à différentes températures allant de 20 °C à 90°C (Graphique 31). Le suivi RMN <sup>31</sup>P montre qu'il n'y a pas de dégradation du produit final puisque l'intégration du pic à -13.2 reste constante. Le pic correspondant au produit phosphoré minoritaire à -1.2 ppm peut avoir deux origines, soit il provient de la dégradation du produit P-Cl de départ soit il s'agit d'un produit de dégradation du produit d'arrivée **81**. La stabilité thermique du composé **81** est importante puisque lors de l'étape de polymérisation, l'initiation se fait soit par activation thermique soit par activation photochimique, dans les deux cas il y a une augmentation de la température du milieu réactionnel.



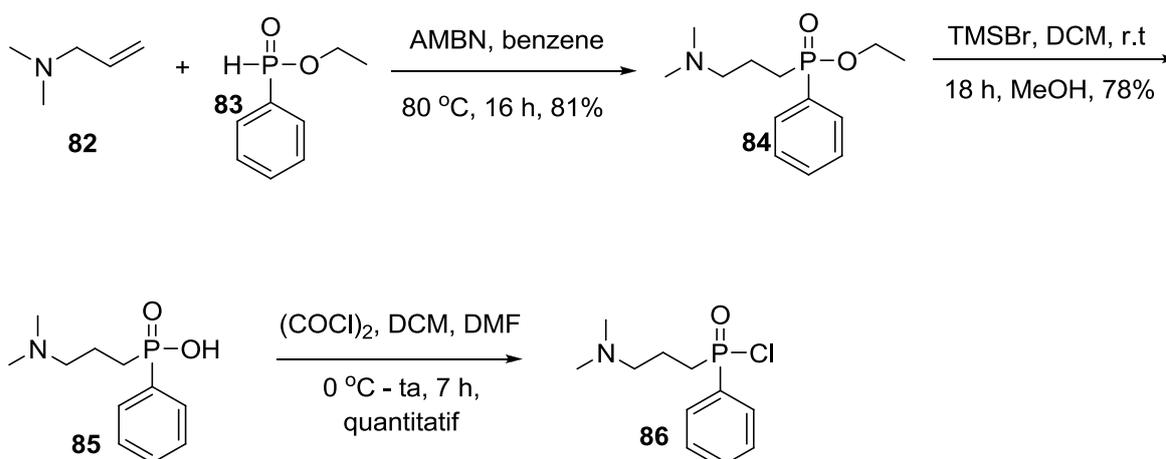
Graphique 31 : Etude de la stabilité du composé **81** sous l'effet de l'élévation de température.

Ces résultats permettent de conclure sur le fait que la liaison N-O-P de la phosphoryloxime **81** est stable, sous atmosphère inerte, même à température élevée. Notre stratégie apparaît donc viable, à condition de respecter des conditions expérimentales permettant de garder le template intègre lors de l'étape de polymérisation.

De plus l'hydrolyse du **PhX** par les empreintes moléculaires se fait en milieu aqueux tamponné, conditions dans lesquelles la liaison N-O-P est labile, favorisant la régénération de l'entité nucléophile et ainsi le cycle catalytique.

### 3.2.1.3 Synthèse du template

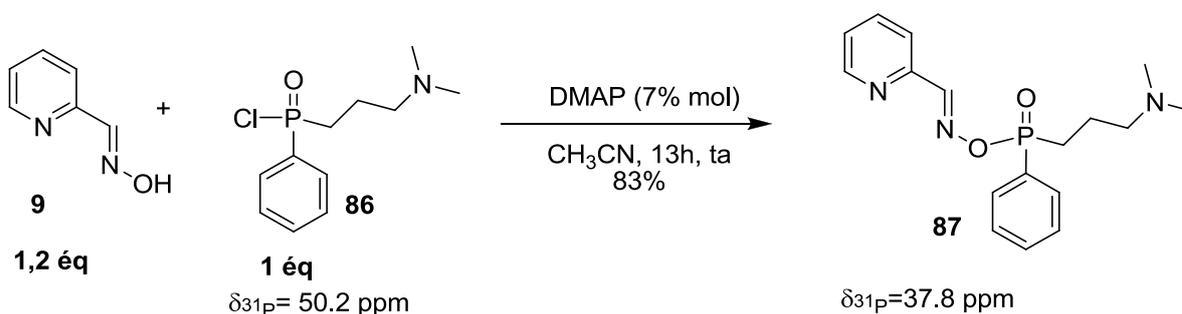
Nous avons tout d'abord étudié la synthèse du template avec un modèle simplifié où le noyau pyridine ne porte pas la fonction polymérisable. Et pour cela, le chlorure de phosphinyle nécessaire a été synthétisé en 3 étapes avec un rendement global de 63% (Schéma 52).



**Schéma 52 :** Schéma de synthèse du chlorure de phosphinyle.

La première étape est hydrophosphination de l'éthyl-(phényl)phosphinate **83** sur la N,N-diméthylallylamine **82** de sur initié par AMBN (10% mol).<sup>146</sup> Elle est suivie d'une déprotection de la fonction hydroxyle en présence de bromotriméthylsilane afin d'obtenir l'acide phosphonique **85**. Celui-ci est totalement converti en chlorure de phosphinyle **86** en présence de chlorure d'oxalyle.

Une fois le phosphinyle **86** en notre possession nous avons pu tester les conditions précédemment mises au point pour le couplage avec la 2-pyridinaldoxime **9** (Schéma 53).

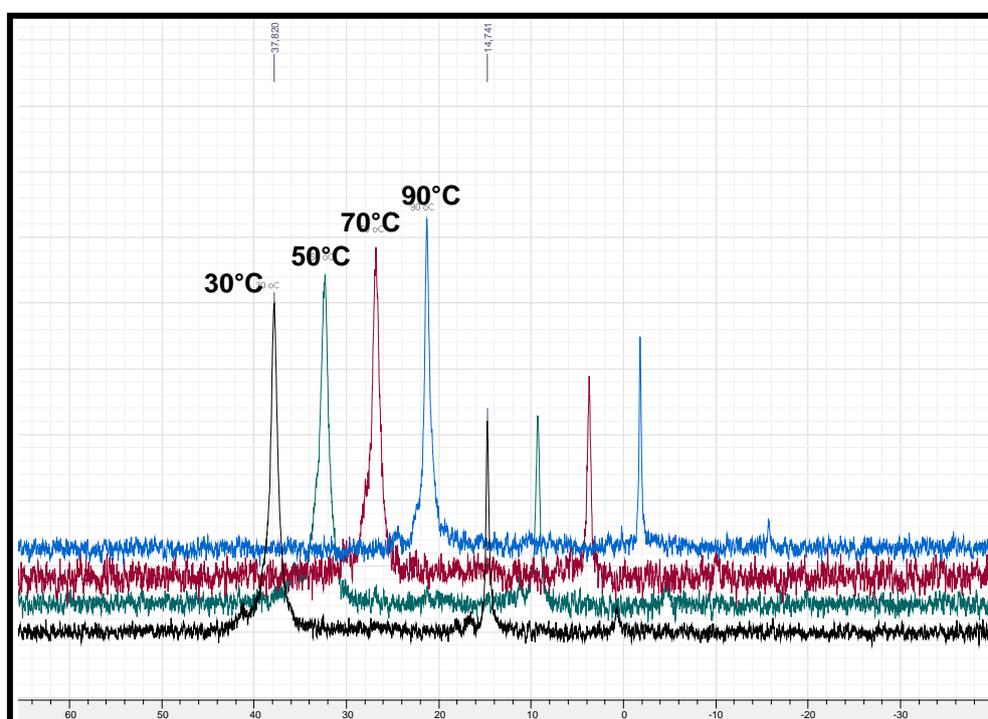


**Schéma 53 :** Etude de la formation de la phosphoryloxime **87**

<sup>146</sup> L.B. Han, C.Q. Zhao, *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 10121-10123.

Le produit **87** a ainsi été obtenu avec un rendement satisfaisant de 83%. Il est à noter que le temps de réaction est plus long que celui observé précédemment et passe de 4 à 13 heures, toujours à température ambiante. La réaction est plus lente avec **86** qu'avec le chlorure de phosphinyle commercial. Le spectre RMN  $^{31}\text{P}$  montre un second pic minoritaire à 14,6 ppm, pouvant correspondre à un produit de dégradation.

La stabilité thermique du composé **87** entre 20°C et 90°C (Graphique 3) a été ensuite étudiée par RMN du  $^{31}\text{P}$ . Elle a été vérifiée puisque l'intégration du signal des pics correspondant au composé **87** reste inchangée.



Graphique 32 : Etude de la stabilité thermique du composé **87**.

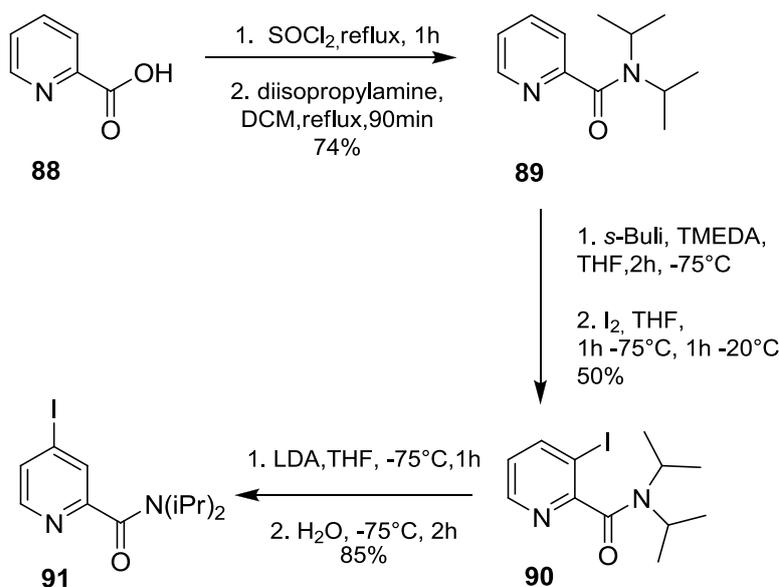
Les études de stabilité des modèles ayant donné des résultats encourageant pour la suite de nos travaux nous avons poursuivi la synthèse du tempate pour la polymérisation en masse.

- **Synthèse de la 2-pyridinaldoxime polymérisable 94**

Les trois premières étapes de la synthèse ont été décrites par Quéguiner et coll.<sup>147</sup> Elle fait intervenir la réaction d'halogène dance qui permet de manière assez

<sup>147</sup> C. Cochenec, P. Rocca, F. Marsais, A. Godard, G. Queguiner, *Synthesis*, **1995**, 3, 312-324.

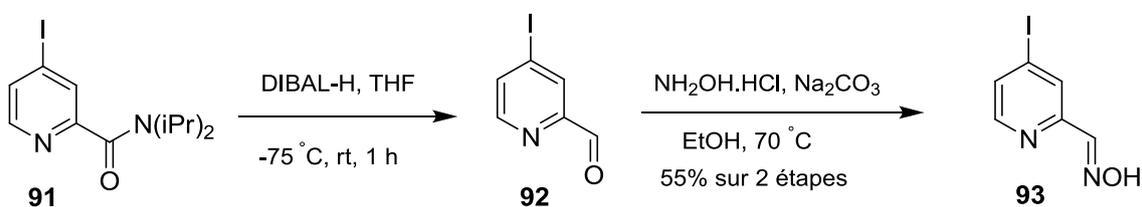
élégante d'obtenir des pyridines trisubstituées avec un halogénure (principalement iode et brome) en position 4 (Schéma 54 ).



**Schéma 54 :** Premières étapes de la synthèse de la 2-pyridinaldoxime polymérisable.

La première étape permet de transformer la fonction acide en un groupement ortho directeur sous la forme d'un diisopropyle amide **89**. Cet intermédiaire est ensuite iodé dans les conditions classiques d'ortholithiation/iodation pour obtenir le composé **90**. La réaction d'halogène dance permet de faire migrer l'iode de la position 3 à la position 4 avec un bon rendement de 85%. Nous obtenons ainsi la pyridine disubstituée désirée **91**.

La fonction amide est ensuite réduite en aldéhyde en présence de Dibal-H (solution molaire dans l'hexane) (Schéma 55). L'aldéhyde **92** résultant n'est pas très stable et est transformé directement en oxime en présence d'hydroxylamine et de carbonate de sodium. Le rendement global est de 55% après deux étapes.



**Schéma 55 :** Formation de l'oxime **93**.

La dernière étape de cette synthèse est un couplage de Stille entre le composé iodé **93** et le *tert*-butyl vinyle d'étain à 100°C en présence de 10% molaire de catalyseur PdP(Ph<sub>3</sub>)<sub>4</sub> qui a lieu avec un rendement de 66% (Schéma 56)

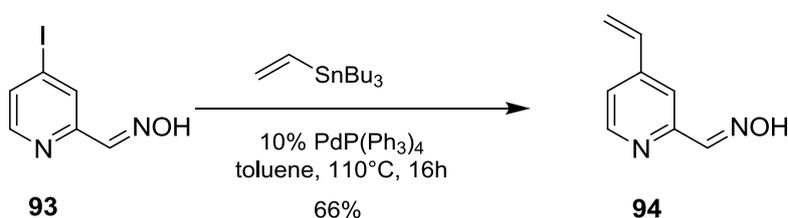


Schéma 56 : Réaction de Stille sur le composé **93**.

#### 3.2.1.4 Conclusion

La synthèse des deux molécules **87** et **94** a été achevée avec un rendement global respectif de 64% et 11%. Leur réaction de couplage, dans les conditions mises au point précédemment, ainsi que les études de stabilité du template sont en cours au laboratoire. Si ces études s'avèrent concluantes, il sera possible d'envisager la synthèse des empreintes moléculaires par polymérisation en masse.

### 3.2.2 **Polymérisation en mini-émulsion**

En parallèle, nous avons décidé de synthétiser des empreintes moléculaires *via* la polymérisation en mini-émulsion. La technique mise au point au laboratoire permet en plus d'obtenir une impression en surface grâce à l'utilisation de template surfactant. Théoriquement, cette technique permet obtenir des sites de reconnaissance plus accessibles ainsi qu'une diffusion plus rapide des templates vers les empreintes moléculaires.

#### 3.2.2.1 Procédé de polymérisation en mini-émulsion

Le nouveau procédé consiste à co-polymériser le template polymérisable tensioactif, caractérisé par la présence simultanée d'une entité polymérisable hydrophobe et d'une tête polaire soluble dans l'eau. Pendant le processus de

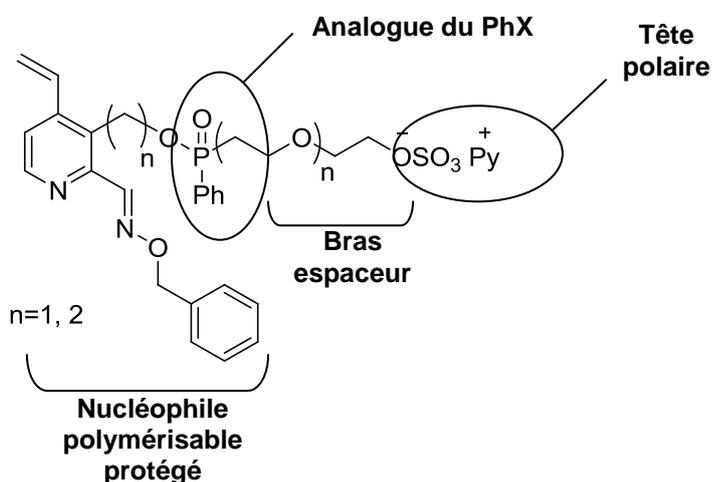
mini-émulsification (huile dans eau) en présence d'un agent de réticulation, d'un tensioactif (le dodécylsulfate de sodium ou SDS) et d'un initiateur radicalaire de polymérisation, des micelles ayant un diamètre compris entre 50 et 500 nm sont obtenues. Du fait de sa nature, le template va se positionner à la surface des micelles, c'est-à-dire à l'interface entre la phase organique et la phase aqueuse. Les micelles sont ensuite polymérisées pour obtenir un latex de nanoparticules.

### 3.2.2.2 Choix du template

Compte tenu du choix d'utiliser l'approche covalente et la polymérisation en mini-émulsion de surface, la structure de la molécule template, nécessaire à la formation des sites de reconnaissance au moment de la polymérisation, devra posséder les caractéristiques suivantes :

- Un nucléophile polymérisable qui restera dans la poche de l'empreinte pour hydrolyser le **PhX**.
- Un analogue du **PhX** pour la reconnaissance moléculaire.
- Un bras espaceur possédant une tête polaire pour la polymérisation en mini-émulsion (surfactant).

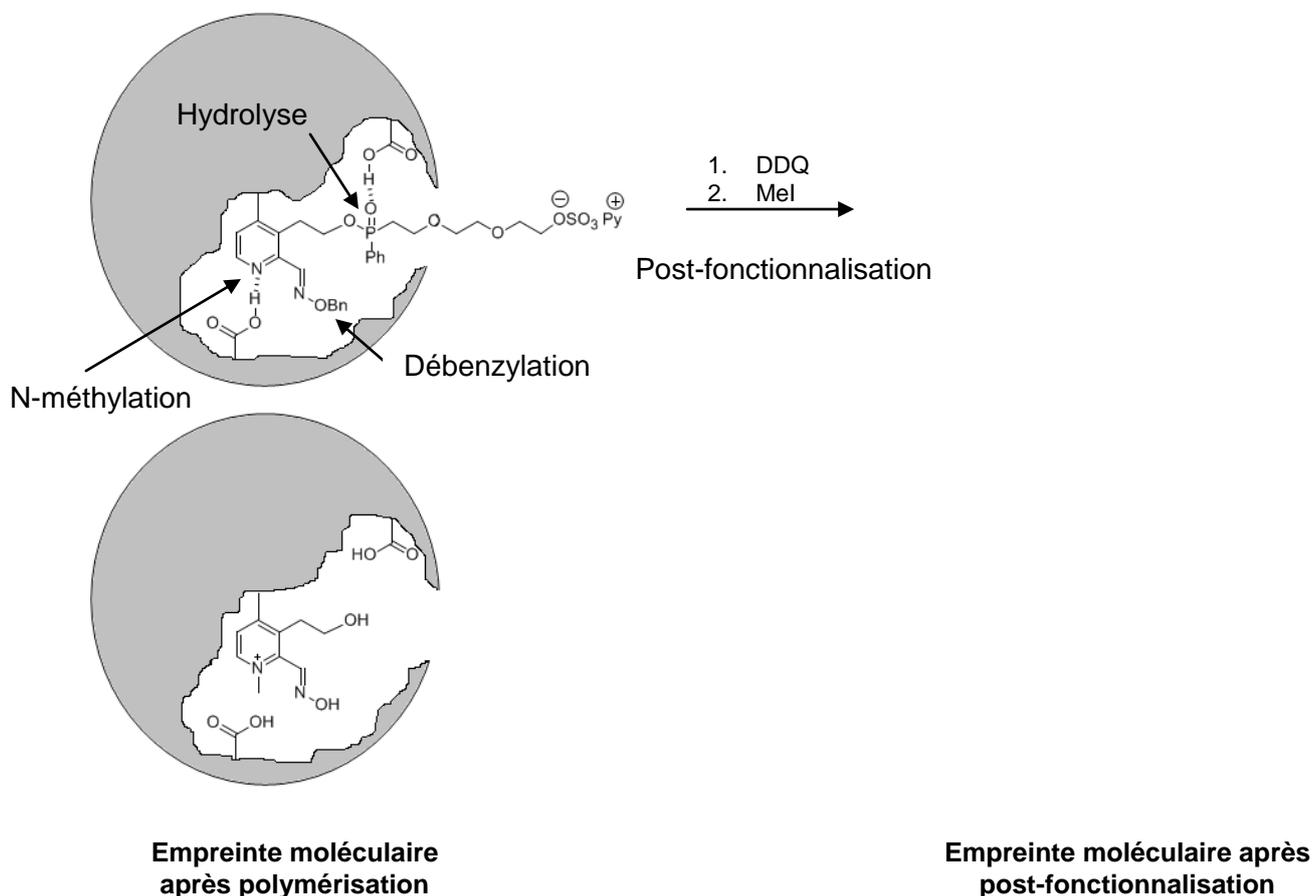
Grâce à l'étude de la stabilité de la liaison N-O-P, nous savons que celle-ci n'est pas stable dans les conditions de la polymérisation en mini-émulsion, qui s'effectue en milieu aqueux. Il faut donc envisager une autre liaison entre l'entité nucléophile et le composé phosphoré. La molécule template envisagée pour la polymérisation est présentée dans la figure 69.



**Figure 69 :** Template tensioactif envisagé pour la polymérisation en mini-émulsion.

Notons que la fonction oxime sera introduite dans la poche du polymère sous forme protégée O-benzyle afin de créer, à terme, de l'espace dans le site de l'empreinte pour l'approche du **PhX** dans la cavité du polymère.

Après l'étape de polymérisation selon le procédé décrit précédemment des particules sphériques imprimées en surface devrait être obtenues. L'extraction du template de l'empreinte sera réalisée par rupture de la liaison covalente P-O (en milieu légèrement alcalin) entre l'entité nucléophile et l'analogue du **PhX**. D'autres étapes de post-fonctionnalisation seront nécessaires au bon fonctionnement de l'empreinte (Figure 70).



**Figure 70 :** Post-fonctionnalisation de l'empreinte moléculaire formée.

En effet pour que l'empreinte moléculaire puisse être efficace et fonctionnelle, il faudra débenzyler la fonction oxime pour désencombrer l'entité nucléophile et permettre l'hydrolyse du **PhX**. La N-méthylation de la pyridine sera également à

réaliser afin d'obtenir le nucléophile le plus réactif possible (analogue à la pralidoxime). Cette dernière étape apparaît comme la plus délicate.

Cette molécule template pourra être obtenue, comme le montre le schéma 57, à partir des précurseurs A et B, obtenus respectivement à partir de polyéthylène glycol (PEG) et d'une pyridine-2-substituée.

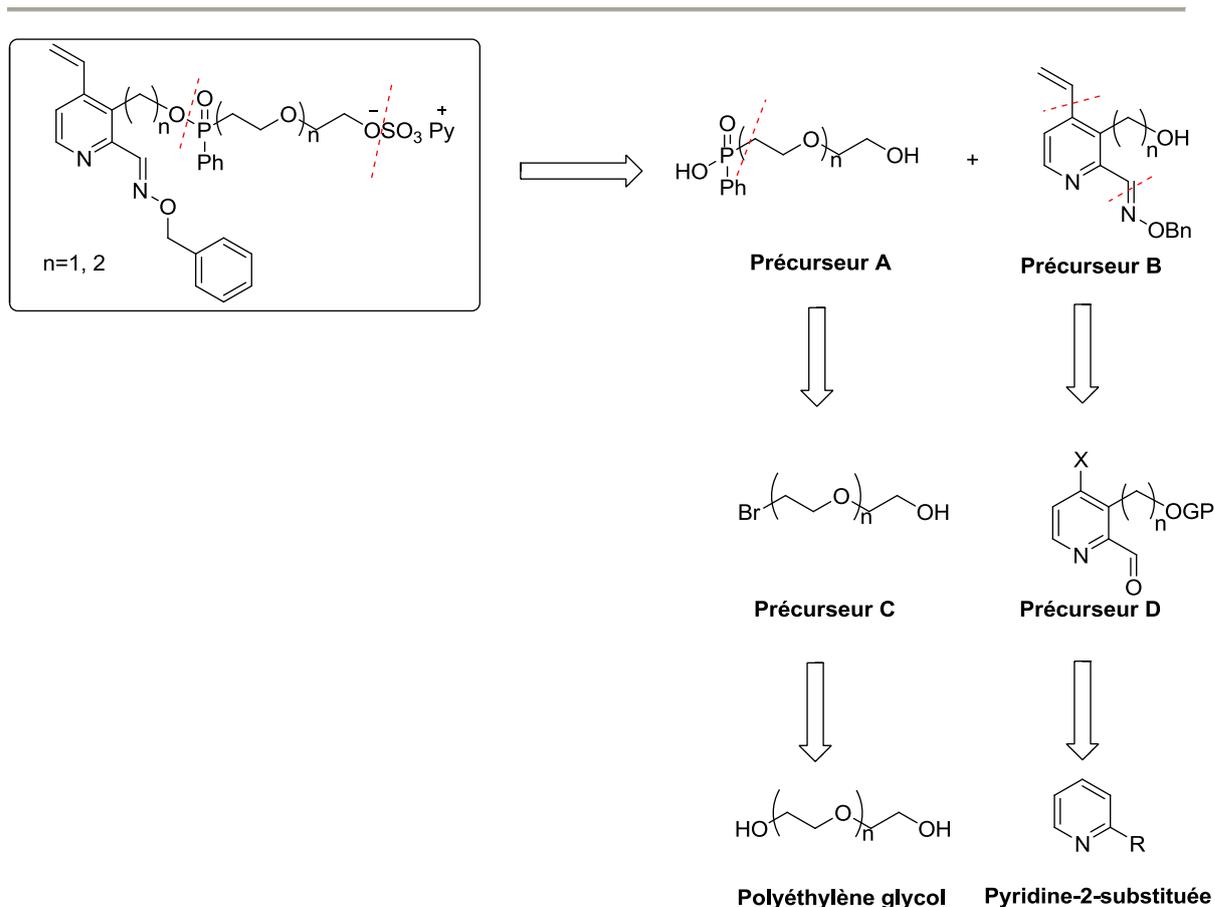


Schéma 57 : Rétrosynthèse du template.

Le précurseur A pourrait être obtenu par la réaction de Mickaelis-Arbuzov nécessitant la synthèse du précurseur bromé C, celui-ci peut être synthétisé à partir de polyéthylène glycol.

Sur le précurseur B, la fonction polymérisable pourrait être introduite par la réaction de Stille sur une 4-halo-pyridine. La fonction oxime quant à elle serait obtenue à partir d'une fonction aldéhyde. Il serait donc nécessaire de synthétiser

une pyridine 2, 3, 4-trisubstituée du type du précurseur D. Le composé commercial de départ serait une pyridine-2-substituée.

La tête polaire sera introduite en dernière étape de synthèse du template.

### 3.2.2.3 Synthèse du précurseur A

L'étape clé de cette synthèse est basée sur la réaction de Michaelis-Arbusov qui permet d'obtenir un phosphonate à partir d'un halogénure d'alkyle et d'un phosphite.

- **Synthèse des halogénures d'alkyle**

La mono protection des PEG, en l'occurrence le diéthylène glycol et le triéthylène glycol, par le groupement trytile a été décrite dans la littérature,<sup>148</sup> et se fait avec de bons rendements (respectivement 65% et 97%). Cette étape est suivie d'une activation de la fonction alcool non protégée sous forme de tosylate puis de la substitution nucléophile de ce dernier par un atome de brome. En effet, les tentatives de bromation directe des alcools **95** et **96** avec PBr<sub>3</sub> présentées dans la littérature<sup>149</sup> ne nous ont pas permis d'obtenir directement les produits bromés désirés (Schéma 58).

---

<sup>148</sup> E.M.D. Keegstra, J.W. Zwikkern M.R. Roest, L.W. Jenneskens, *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 6678-6680.

<sup>149</sup> T.W. Brockmann, J.M. Tour, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 17, 4437-4447.

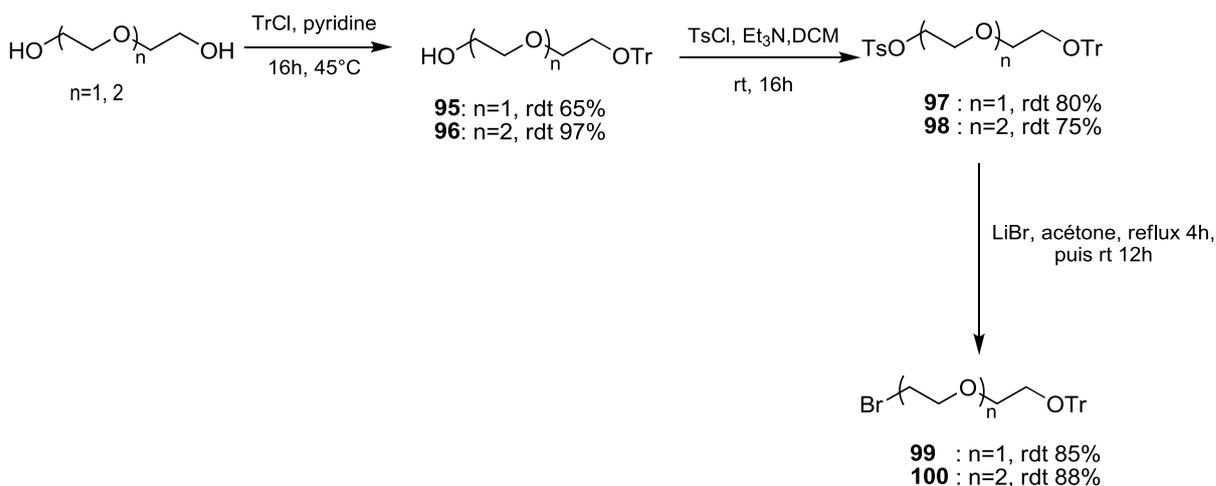


Schéma 58 : Synthèse des bromures d'alkyle.

La réaction de Mickaelis-Arbuzov entre le composé **99** et le diméthyl phénylphosphonite **101** (produit malodorant) se fait à 160°C, sous vide (13 mbar) pendant 24 heures. Elle permet d'obtenir le produit désiré **102** avec un rendement de 66% (Schéma 59).

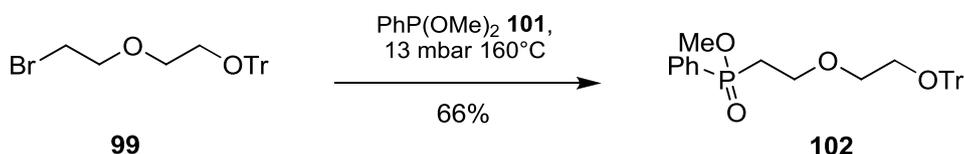


Schéma 59 : Réaction de Mickaelis-Arbuzov.

La tentative de déprotection du composé **102** par le bromotriméthylsilane pour obtenir l'acide phosphonique correspondant s'est soldée par une double déprotection puisque le groupement trityle a également été ôté lors de la réaction. L'alternative envisagée serait l'utilisation d'un mélange NaOH(2N)/EtOH à chaud.

#### 3.2.2.4 Synthèse du précurseur B

La première voie de synthèse envisagée utilise les réactions classiques de la substitution des pyridines N-oxyle. Les trois premières étapes ont été décrites par Fukaya et coll.<sup>150</sup> (Schéma 60).

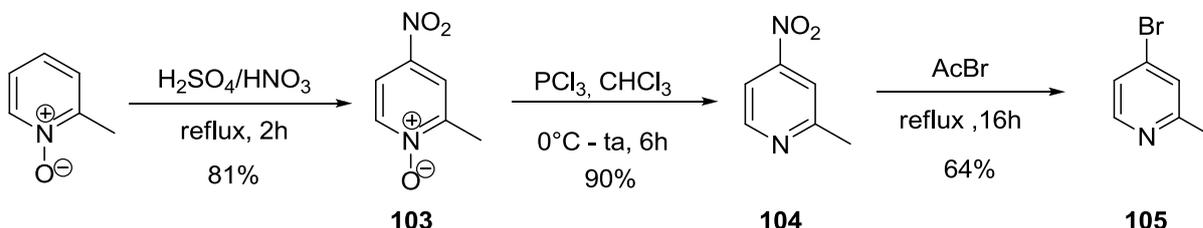


Schéma 60 : Synthèse du noyau pyridine **105** à partir d'une pyridine N-oxyle.

Ainsi le composé commercial 2-méthyl picoline-N-oxyle est facilement nitré en position 4 pour obtenir le composé **103** avec un bon rendement (81%).<sup>151</sup> La pyridine N-oxyle est ensuite réduite par  $\text{PCl}_3$  pour donner le composé **104**, qui subit enfin une substitution nucléophile aromatique permettant d'obtenir le dérivé bromé **105** en position 4.<sup>152</sup>

L'oxydation du 4-bromo-2-picoline **105** en acide 4-bromo-2-picolinique **106** est réalisée en conditions oxydantes ( $\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{O}$ ) avec un rendement de 54%<sup>153</sup> (Schéma 61).

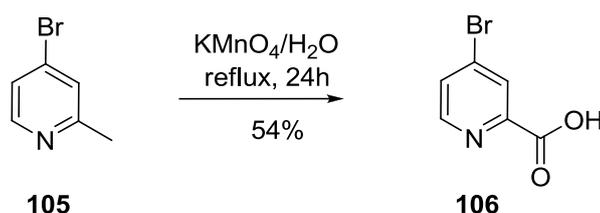


Schéma 61 : Réaction d'oxydation du composé **105**.

Ensuite, les étapes clés de cette synthèse sont l'ortholithiation suivie d'une substitution électrophile en position 3 afin d'obtenir une pyridine trisubstituée. Pour

<sup>150</sup> A. Ashimori, T. Ono, T. Uchida, Y. Ohtaki, C. Fukaya, M. Watanbe, K. Yokoyana, *Chem. Pharm. Bull.*, **1990**, 38(9), 2446-2458.

<sup>151</sup> H.J. den Hertog, J. Overhoff, *Rec. Trav. Chim. Pays-bas*, **1950**, 69, 468.

<sup>152</sup> a) E. Ochiai, I. Suzuki, *Chem. Pharm. Bull.*, **1954**, 2, 147. b) R. Adams, S. Miyano, *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, 76, 3168.

<sup>153</sup> a) P. Meier, S. Legraverant, S. Müller, J. Schaub, *Synthesis*, **2003**, 4, 551-554. b) H.M. Reyes-Rivera, Ro.O. Hutchins, D.R. Dalton, *J. Heterocycl. Chem.*, **1995**, 32, 665-669. c) H.L. Bradlow, C.A. Vanderwerf, *J. Org. Chem.*, **1949**, 14, 509-515.

ce faire, nous devons dans un premier temps transformer la fonction acide en un bon groupement ortho-directeur. Ainsi le composé **106** réagit avec la N,N-diisopropylamine pour donner l'amide correspondant **107** après activation de l'acide sous forme de bromure d'acide (Schéma 62).

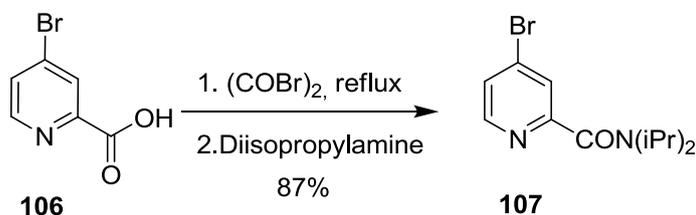


Schéma 62 : Synthèse des composés **107**.

Le bromure d'oxalyle a été préféré au chlorure de thionyle pour l'activation de l'acide afin d'éviter la substitution nucléophile de l'atome de brome par un atome de chlore. En effet nous prévoyons d'introduire une fonction polymérisable par la réaction de Stille qui se fait plus aisément sur un atome de brome.

Deux essais d'orthoméallation suivie d'une substitution électrophile ont été réalisés sans succès sur le composé **107** (Schéma 63).

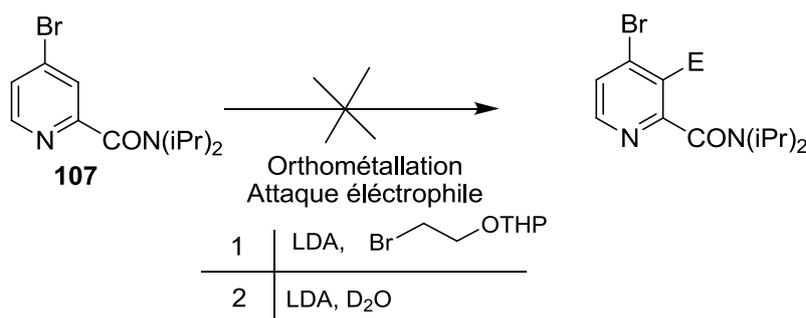


Schéma 63 : Tentatives d'orthoméallation/substitution électrophile sur le composé **107**.

Pour éviter les problèmes d'échange halogène/métal nous avons inversé les étapes en synthétisant le composé **108** obtenu à partir du composé **107** dans les conditions décrites par Stille et *coll.*<sup>154</sup> avec un rendement de 80% (Schéma 64).

<sup>154</sup> D.R. McKean, G. Parrinello, A.F. Renaldo, J.K. Stille, *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 422-424.

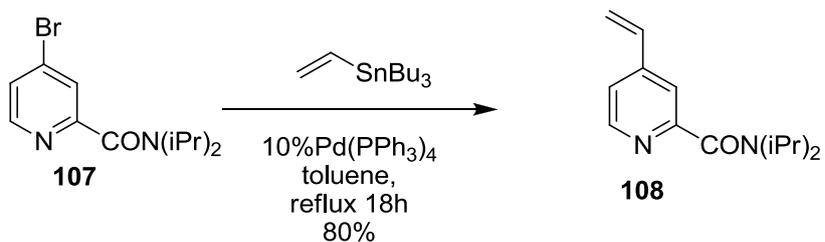
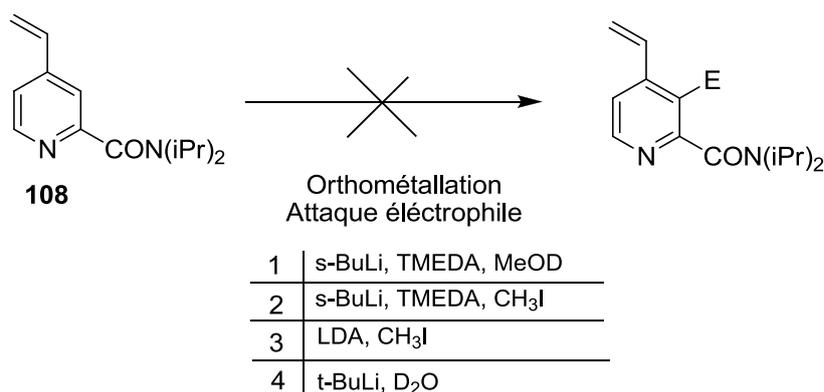


Schéma 64 : Synthèse du composé **108**.

Les différents essais d'orthoméallation suivie d'une substitution électrophile ont été réalisés sur le composé **108** mais le composé désiré n'a pas pu être obtenu (Schéma 65).



**Schéma 65 :** Tentatives d'orthoméallation/substitution électrophile sur le composé **108**.

Devant l'impossibilité d'obtenir la pyridine trisubstituée, cette première voie de synthèse a été abandonnée au profit d'une seconde dont l'étape clé est la réaction dite d'Halogène Dance. Il est important de noter que ces travaux ont été réalisés avant ceux concernant la synthèse du template pour la polymérisation en masse.

### Halogene Dance

Cette réaction a été observée pour la première fois en 1951<sup>155</sup> et a fait l'objet d'une revue en 2007.<sup>156</sup> La réaction "d'halogene dance" permet d'obtenir en deux étapes des pyridines trisubstituées possédant un iode en position 4,<sup>157</sup> ce qui correspond précisément à nos prérogatives. Son mécanisme, qui fût élucidé au début des années 70, consiste en une cascade de déprotonations et de réactions d'échanges halogène-métal conduisant au composé organométallique le plus stable. Elle fût observée sur une pyridine en 1962,<sup>158</sup> et par la suite les principaux travaux ont été réalisés par l'équipe du professeur Quéguiner.<sup>159</sup>

Les trois premières étapes de cette synthèse ont été décrites dans la littérature<sup>160</sup> (Schéma 66).

<sup>155</sup> A. Vaitiekunas, F.F. Nord, *Nature*, **1951**, 168, 875-876.

<sup>156</sup> M. Schnürch, M. Spina, A. F. Khan, M.D. Mihovilovic, P. Stanetty, *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, 1046-1057.

<sup>157</sup> P. Rocca, C. Cochenec, F. Marsais, L. Thomas-dit-Dumont, M. Mallet, A. Godard, G. Queguiner, *J. Org. Chem*, **1993**, 58, 7832-7838.

<sup>158</sup> M.J. Pieterse, H.J. den Hertog, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.*, **1962**, 81, 855-863.

<sup>159</sup> a) M. Mallet, F. Marsais, G. Queguiner, P. Pastour, *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. C*, **1972**, 23, 1439-1442. b) M. Mallet, G. Queguiner, *Tetrahedron*, **1985**, 41, 3433-3440. c) M. Mallet, G. Branger, F. Marsais, G. Queguiner, *J. Organomet. Chem.*, **1990**, 328, 319-332.

<sup>160</sup> C. Cochenec, P. Rocca, F. Marsais, A. Godard, G. Queguiner, *Synthesis*, **1995**, 3, 312-324.

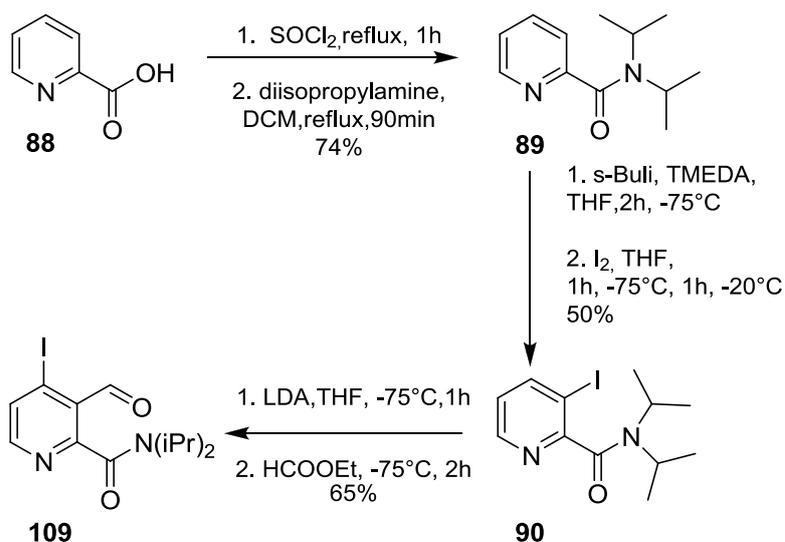
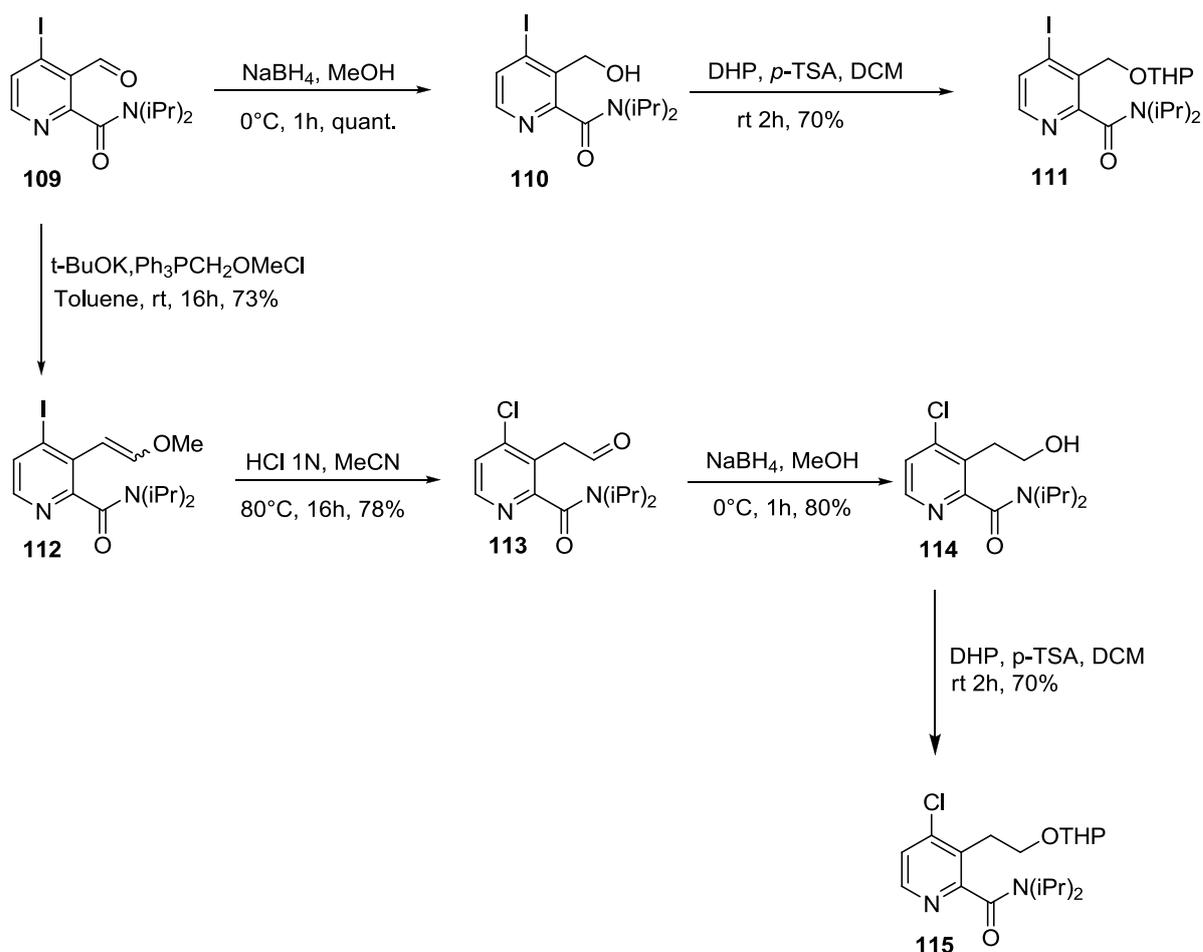


Schéma 66 : Synthèse de la pyridine trisubstituée **109**.

Dans un premier temps, l'acide picolinique est transformé en un groupe ortho-directeur sous la forme de N,N-diisopropyle amide **89**. Ceci permet l'orthoméallation/iodation du composé **89** en composé **90** dans des conditions classiques. Puis, la réaction d'halogène dance permet, avec 2 équivalents de LDA à basse température, d'obtenir l'iodolithiopyridine stable qui peut ensuite réagir avec le formiate d'éthyle pour donner le composé **109** avec un rendement de 65%. Nous avons observé que le rendement de cette réaction peut varier de manière significative en fonction de la qualité de la LDA. Pour conclure, nous avons pu obtenir la pyridine trisubstituée et résoudre le problème auquel nous nous étions heurtés, avec la voie de synthèse précédente en diminuant le nombre d'étapes. A partir du composé **109**, deux voies de synthèse ont été réalisées afin de préparer deux dérivés **111** et **115**, ayant un carbone de différence sur la chaîne alkyle en position 3 (Schéma 67).



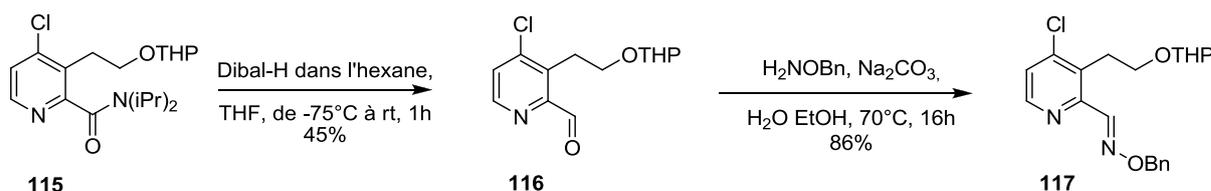
**Schéma 67 :** Synthèse des composés **114** et **115**.

Dans le premier cas, la fonction aldéhyde est simplement réduite en alcool par  $\text{NaBH}_4$  pour donner le composé **109**. L'alcool est ensuite protégé sous forme OTHP (**110**).

Dans le deuxième cas, la réaction de Wittig permet d'obtenir le composé **112**, possédant une chaîne à 2 carbones en position 3. En milieu acide (HCl 1N à chaud) l'éther d'énol est hydrolysé en aldéhyde **113**. Notons qu'au cours de cette étape, l'iode en position 4 de la pyridine se retrouve échangé par un atome de chlore. Comme pour l'autre voie de synthèse, l'aldéhyde est réduit en l'alcool **114** et celui-ci est protégé sous forme OTHP **115**.

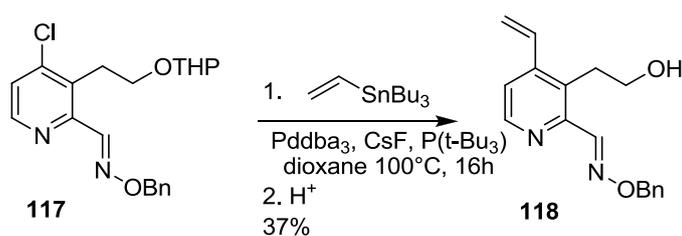
La suite de la synthèse n'a été pour l'instant réalisée qu'avec le composé **115**. La réduction de l'amide **115** en aldéhyde **116** a posé des problèmes dans la mesure

où le Dibal-H dans le toluène était complètement inactif même à chaud. Nous avons donc envisagé l'emploi de réducteurs plus forts (type  $\text{LiAlH}_4$ ) mais ces derniers réduisaient la fonction amide en alcool. Finalement, la réaction a été réalisée en utilisant, du Dibal-H dans l'hexane à  $-78^\circ\text{C}$  et en laissant remonter le milieu à température ambiante.<sup>161</sup> L'oxime **117** est obtenue avec un bon rendement dans les conditions utilisées précédemment, en employant ici la O-benzylhydroxylamine commerciale (Schéma 68).



**Schéma 68 :** Schéma réactionnel pour l'obtention du composé **117**.

La dernière étape, qui permet d'introduire la fonction polymérisable, est le couplage de Stille sur la 4-chloro-pyridine pour obtenir le composé **118**. La réaction de Stille est plus délicate sur un dérivé chloré puisque la réaction ne se fait qu'avec un rendement de 37% sur deux étapes (Schéma 69). Notons que la fonction alcool est déprotégée aisément par un traitement acide ( $\text{HCl}$  1N).



**Schéma 69 :** Réaction de Stille sur le dérivé chloré.

Le précurseur B a ainsi été obtenu selon un schéma réactionnel comportant 10 étapes et avec un rendement global de 1%.

<sup>161</sup> T. Sammakia, E.L. Stangeland, M.C. Whitcombe, *Org. Lett.*, **2002**, 4(14), 2385-2388.

### 3.2.2.5 Conclusion

La synthèse du précurseur B a été longue et laborieuse, du fait du nombre de fonctions mises en jeu et du nombre d'étapes. La synthèse du template pour la mini-émulsion n'a pas pu être achevée au cours de ces travaux de thèse.

D'autre part la N-méthylation de l'azote de la pyridine dans l'empreinte semble inévitable pour obtenir une hydrolyse efficace. Hors les réactions de N-méthylation des pyridines sont assez délicates et dépendent fortement des substituants de celle-ci. Cette donnée compromet partiellement notre stratégie pour la polymérisation en mini-émulsion et remet en cause l'utilisation de la pralidoxime comme entité nucléophile à l'intérieur de l'empreinte.

## 3.2.3 Synthèse d'un nouveau template

### 3.2.3.1 Principe et choix du template

Compte tenu des résultats obtenus au cours du criblage des différents nucléophiles pour l'hydrolyse du **PhX** (Chapitre I), nous avons envisagé un dernier template, pour la synthèse d'empreintes moléculaires par polymérisation en masse ou par polymérisation en mini-émulsion.

Ce nouveau template fait intervenir l'amidoxime **62**,  $\alpha$ -nucléophile qui s'est montré le plus efficace pour l'hydrolyse du **PhX** en solution. Ce composé présente le grand avantage de ne pas être chargé. En effet, dans le template précédent la post-fonctionnalisation par N-méthylation de la pyridine s'est avérée une étape limitante dont nous nous affranchissons ici. Ainsi, deux nouveaux templates ont été envisagés correspondants aux deux modes de polymérisation (Figure 71).

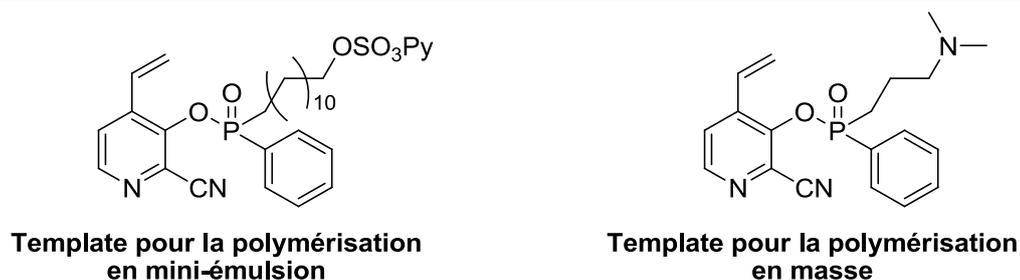
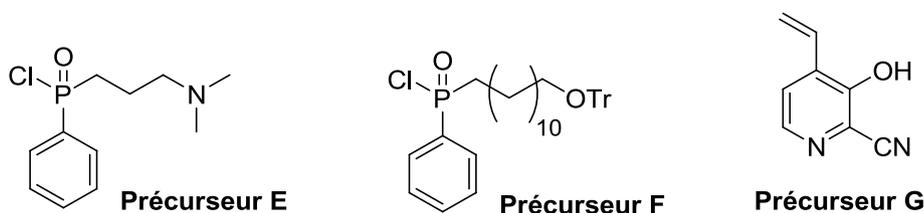


Figure 71 : Nouveaux templates faisant intervenir un précurseur de la 3-hydroxy-2-pyridylamidoxime **62**.

La chaîne PEG pour le template de la polymérisation en mini-émulsion est remplacée, ici, par une chaîne alkyle. Ce changement a été opéré suite à d'autres résultats obtenus par ailleurs au laboratoire. En effet, le rendement de polymérisation s'avère plus élevé avec une chaîne alkyle qu'avec une chaîne de type PEG.

### 3.2.3.2 Synthèse des tempates

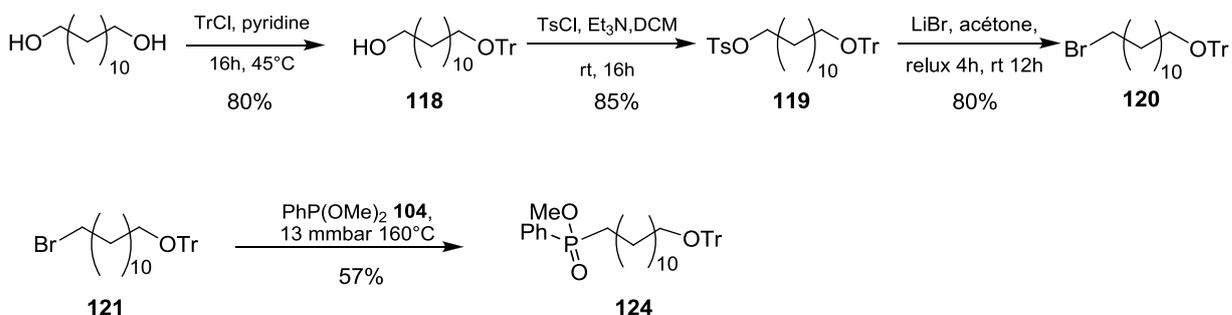
Trois précurseurs doivent être synthétisés afin d'obtenir les templates ci-dessus (Figure 72).



**Figure 72:** Précurseurs nécessaires à la synthèse des nouveaux templates.

La synthèse du précurseur E est détaillée dans le paragraphe 3.2.1.3, nous ne reviendrons donc pas dessus (composé **86**).

Le précurseur F, correspondant au dérivé phosphoré substitué avec une chaîne alkyle en C12, a été partiellement synthétisé et ce en suivant les mêmes procédures que pour les chaînes PEG (Schéma 70).



**Schéma 70 :** Synthèse du précurseur F.

Une première tentative de synthèse du précurseur G a pu être menée au cours de ces travaux de thèse. La fonction alcool de la 3-hydroxy-2-cyano-pyridine commerciale est protégée sous forme de carbamate **123** afin de permettre l'ortholithiation suivi de la réaction d'iodation (Schéma 71). Nous obtenons ainsi une pyridine trisubstituée avec un iode en position 4 pour nous permettre de greffer la fonction polymérisable.

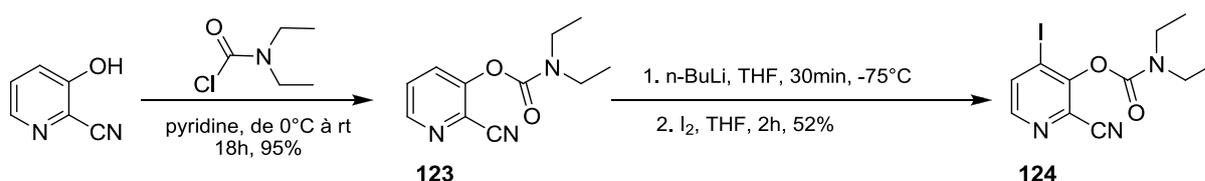


Schéma 71 : Synthèse de la pyridine trisubstituée **124**.

Malheureusement les tentatives de déprotection des carbamates **124** et **125**, dans les conditions classiques MeONa/MeOH ou NaOH/MeOH, n'ont pas permis d'obtenir le produit désiré (Schéma 72). Des mixtures complexes dans lesquelles n'émerge pas de produit majoritaire sont obtenues.

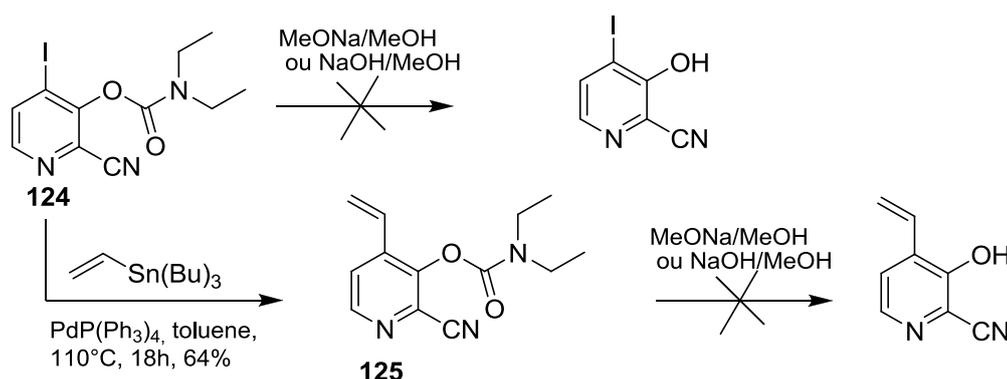


Schéma 72 : Tentatives de synthèse du précurseur G.

Faute de temps, nous n'avons pas pu exploiter cette voie de synthèse de manière plus poussée, notamment en faisant varier les groupements protecteur/orthodirecteur sur la fonction alcool.

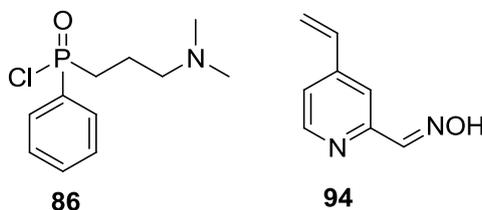
### 3.2.3.3 Conclusion

Cette ultime tentative pour la synthèse d'un template adéquat à la synthèse d'empreinte moléculaire à activité catalytique n'a pu aboutir. Elle reste néanmoins une voie très intéressante du fait de l'efficacité du nucléophile choisi.

De plus la synthèse des amidoximes par condensation de l'hydroxylamine et d'un nitrile se fait avec de bons rendements en solution. Il n'est donc pas illogique de penser que la réaction de post-fonctionnalisation permettant de transformer le précurseur nitrile en entité nucléophile amidoxime au sein même de l'empreinte pourrait se faire également avec un bon rendement.

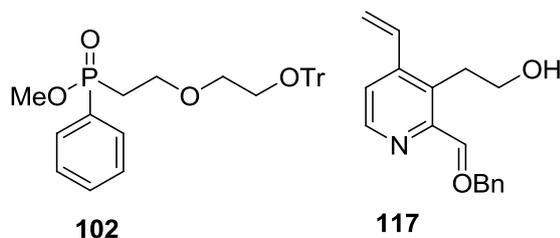
## 4 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Concernant la synthèse du template pour la polymérisation en masse, les deux précurseurs **86** et **94** ont été obtenus avec un rendement global respectif de 64% et 11%.



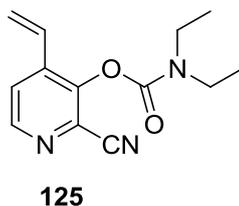
La réaction de couplage entre ces deux intermédiaires, ainsi que la stabilité à l'élévation de température du composé formé doivent être testées avant de pouvoir envisager la synthèse des empreintes moléculaires.

Pour la polymérisation en mini-émulsion, les précurseurs **102** et **117** ont été synthétisés avec un rendement global respectif de 27% et 1%.



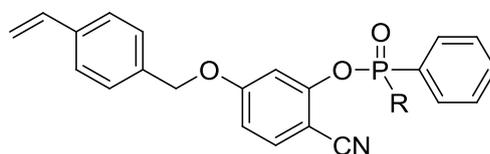
Il reste à coupler ces deux intermédiaires et à ajouter la tête polaire afin de pouvoir terminer la synthèse du template surfactant. Malgré l'avancement des synthèses, cette voie est pour l'instant mise en suspend dans la mesure où il semble qu'il sera difficile de quaternariser l'azote de la pyridine, au sein même de l'empreinte, avec un rendement suffisant pour obtenir une activité hydrolytique notable.

Les nouvelles structures identifiées dans la partie concernant le criblage des  $\alpha$ -nucléophiles permettent d'envisager une simplification des templates à synthétiser. Dans ce cadre, un premier précurseur a été synthétisé avec un rendement global de 32%.



L'étape de déprotection du carbamate pose cependant problème.

D'autres nucléophiles, encore plus simples et ayant une bonne activité vis-à-vis de la réaction d'hydrolyse du **PhX**, ouvrent d'autres perspectives pour la synthèse des templates.



---

## **CONCLUSION GENERALE**

---

L'utilisation potentielle des composés organophosphorés neurotoxiques à des fins militaires ou terroristes reste encore aujourd'hui une préoccupation majeure de la défense civile et militaire. L'action de ces neurotoxiques se caractérise par l'inhibition souvent irréversible des cholinestérases tissulaires et cérébrales, conduisant à une accumulation d'acétylcholine au niveau du système nerveux central et des plaques neuromusculaires. L'activité des neurotoxiques peut aussi dans certains cas entraîner la mort de l'individu intoxiqué et est à l'origine de nombreuses séquelles neuropathologiques. C'est pourquoi le développement de nouveaux épurateurs capables de dégrader ces organophosphorés constitue une des préoccupations importantes des systèmes de défense militaire.

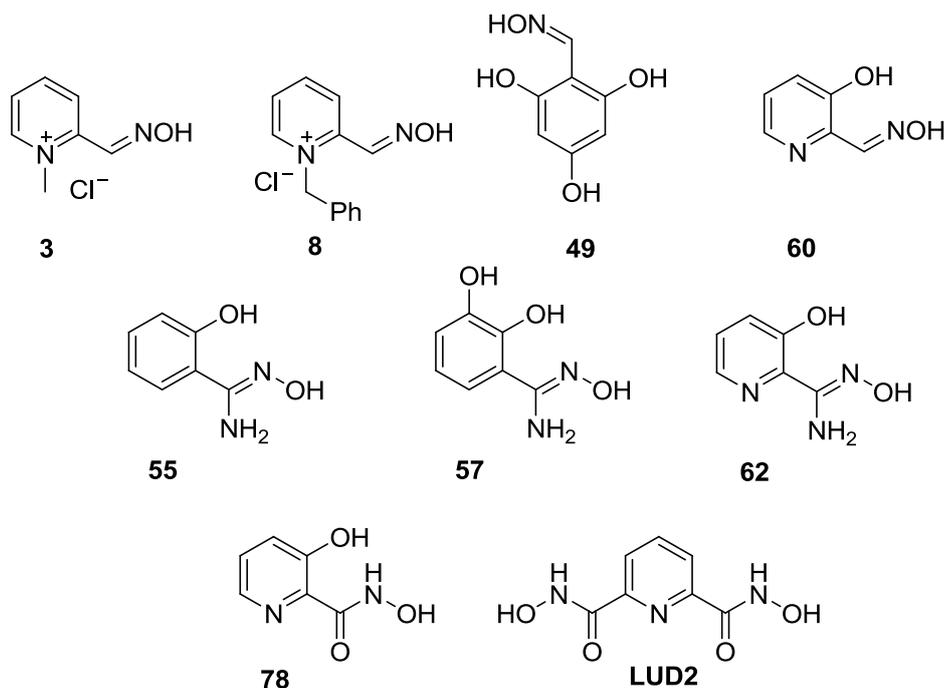
Dans ce cadre, notre travail de recherche, consistant à mettre au point de nouveaux épurateurs pour la dégradation des neurotoxiques de classe **V**, s'est divisé en deux axes que nous avons mené en parallèle :

- Identification de nouveaux composés susceptibles de dégrader les neurotoxiques organophosphorés de la famille des agents **V**.
- Développement d'empreintes moléculaires à activité organophosphonothioase.

Le **VX**, notre cible finale pour cette étude, étant extrêmement toxique, nous avons travaillé au laboratoire sur son analogue aromatique, moins toxique, le **PhX**.

Dans un premier temps nous avons mis au point une méthode analytique par CLHP pour nous permettre de cribler différents composés sur la réaction d'hydrolyse du **PhX** en solution tamponnée. En utilisant comme référence la pralidoxime **3**, nous avons pu identifier de nouvelles molécules très réactives. Notamment, nous avons mis en évidence la très bonne réactivité de la fonction amidoxime et nous avons confirmé l'intérêt de la fonction oxime pour la dégradation des agents **V**.

Dans le cadre d'un projet de collaboration, nous nous sommes également intéressés à la famille des acides hydroxamiques. Au final nous avons pu identifier neuf premiers composés à la réactivité intéressante.

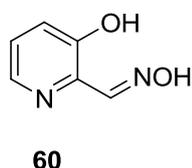


Afin de comparer ces candidats, leur cinétique d'hydrolyse du **PhX** a été suivie par CLHP, et les vitesses initiales ont été estimées par la méthode des tangentes. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les composés de la famille des amidoximes (**55**, **57** et **62**). Le composé le plus prometteur, identifié à la suite de ces études, est le composé **62**, soit la 3-hydroxybenzamidoxime.

De manière générale au cours de notre étude, nous avons observé l'augmentation de la réactivité des oximes et des amidoximes ortho-hydroxylées du fait de l'existence d'une liaison intramoléculaire entre l'hydrogène du groupement hydroxyle et l'azote de la fonction oxime qui augmente l'acidité de cette dernière. Malheureusement, lorsque ces composés réagissent avec des organophosphorés en milieu basique il est possible qu'ils subissent une cyclisation intramoléculaire, pour donner des dérivés d'isoxazole. Ces derniers étant inertes vis-à-vis de la réaction d'hydrolyse du **PhX**, il serait peu probable d'obtenir une hydrolyse catalytique avec ces composés ortho-hydroxylés. L'élucidation du mécanisme doit être poursuivie. La détermination des structures RX et des pKa des composés ortho-hydroxylés devraient permettre de mieux comprendre leur réactivité.

Les résultats obtenus lors du criblage des  $\alpha$ -nucléophiles permettent d'envisager la synthèse d'autres composés potentiellement intéressants, notamment dans la famille des cétooximes ou des quinolines.

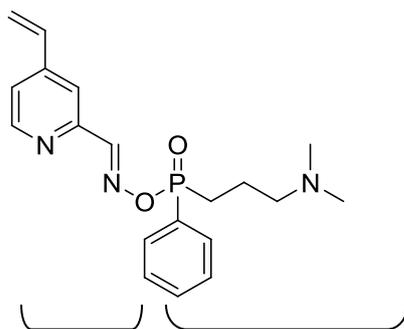
Etant donné les bons résultats obtenus sur l'hydrolyse du **PhX** en solution, nous avons testé les meilleurs composés sur la réactivation de l'acétylcholinestérase humaine, inhibée par le **VX**. Deux composés ont permis d'obtenir une bonne réactivation de l'enzyme, malgré leur mauvaise affinité pour celle-ci.



La meilleure réactivation a été obtenue avec le composé **60**. Ces résultats sont prometteurs dans la recherche de nouveaux moyens de traiter les intoxications aux NOP *in vivo*. En effet ces composés ne sont pas chargés, contrairement aux réactivateurs utilisés actuellement, et pourraient passer plus facilement la barrière sang/cerveau. Leur affinité reste néanmoins à améliorer pour en faire de bons candidats. Dans ce but, la synthèse de dérivés bicycliques permettant des interactions avec le centre actif et avec le site périphérique de l'enzyme est en cours au laboratoire.

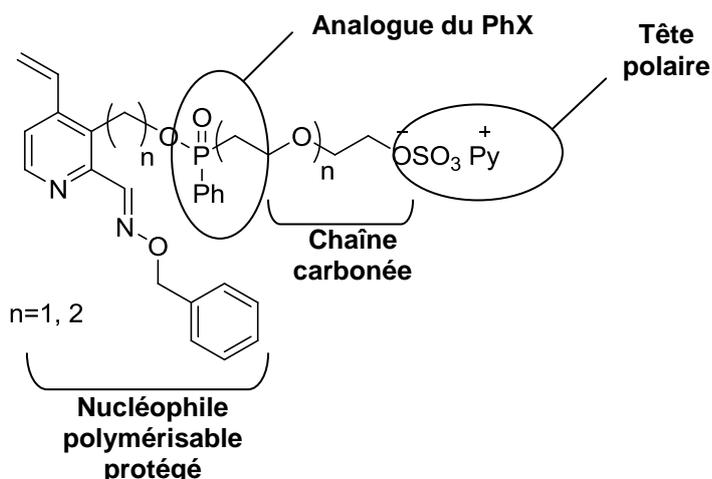
Dans la dernière partie de ce projet, dans le cadre de la mise au point de nouveaux épurateurs catalytiques, nous avons souhaité développer des empreintes moléculaires pour la dégradation des neurotoxiques de classe **V**. Notre stratégie était de synthétiser un template polymérisable possédant une entité nucléophile et un analogue du **PhX**. L'impression d'un tel template permettrait de laisser dans l'empreinte l'entité nucléophile pouvant assurer l'hydrolyse du neurotoxique.

La synthèse du template envisagé pour l'obtention des empreintes par polymérisation en masse a posé le problème de la stabilité de la liaison N-O-P.



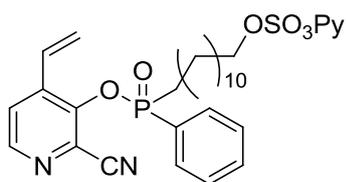
D'après nos résultats il semblerait ~~polymérisable~~ mais délicat de réaliser des empreintes moléculaires avec un tel template. La synthèse des empreintes moléculaires par polymérisation en masse n'a pas encore été réalisée mais la synthèse des intermédiaires est bien avancée.

Parallèlement, nous avons également envisagé de réaliser des empreintes moléculaires par polymérisation en mini-émulsion en surface. Cette technique nécessite la synthèse d'un template polymérisable surfactant.

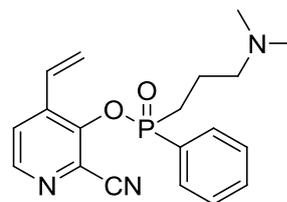


La synthèse de ce template n'a pas pu être achevée au cours de mes travaux de thèse. Il s'agit d'une synthèse relativement compliquée, vue le nombre d'étapes et de fonctions mises en jeu. De plus nous avons émis des doutes sur la possibilité de N-méthyle la pyridine au sein de l'empreinte elle-même avec un rendement suffisant pour avoir une bonne activité hydrolytique.

Finalement, suite aux résultats du test de criblage qui ont permis d'identifier le composé **62** comme très réactif, nous avons envisagé la synthèse de deux nouveaux templates.



**Template pour la polymérisation  
en mini-émulsion**



**Template pour la polymérisation  
en masse**

La synthèse des différents précurseurs est en cours au laboratoire. L'avantage de ce template est que la réaction de transformation des nitrile en amidoximes se fait en solution avec de bons rendements, ce qui garantirait une bonne activité hydrolytique de l'empreinte.

L'identification de nouvelles structures relativement simples (dérivés phényles) et très réactives vis-à-vis de l'hydrolyse du **PhX** devrait permettre d'envisager la synthèse de templates facilement accessibles, permettant d'obtenir des empreintes moléculaires plus rapidement.

---

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

---

## Δ Equipment

$^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ ,  $^{31}\text{P-NMR}$  used for the product characterizations were recorded on Bruker DPX200, DPX300 and DPX400. Chemical shifts ( $\delta$ ) are quoted in parts per million and are calibrated relative to solvent residual peaks. Multiplicity are reported as follows: s=singlet, d=doublet, t=triplet, m=multiplet, br=broad.

Thin layer chromatographies (TLC) were carried out using Merck silica gel plates 0.25 mm (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 40-60 $\mu\text{m}$ , 230-400 mech ASTM). TLC plates were visualized using a combination of UV lamps (256, 365 nm), followed by detection with *p*-anisaldehyde, ceric ammonium molybdate, ninhydrin.

Flash chromatographies were performed using silica gel Merck Kieselgel (40-60  $\mu\text{m}$ , 230-400 mech ASTM).

Mass spectra were recorded on a MS/MS high resolution Micromass ZABSpecTOF spectrometry.

## Δ Buffer composition

All aqueous buffers were prepared using water purified with a Milli-Q system (purified to 18.2M $\Omega$ .cm)

∂ Tris-HCl buffer 0.1 N, 0.15 N NaCl, pH 8.5: [Tris] = 0.1 N, [NaCl] = 0.15 N, adjusted to pH 8.5 with concentrated HCl solution.

∂ Tris-HCl buffer 0.1 N, 0.15 N NaCl, pH 7.55: [Tris] = 0.1 N, [NaCl] = 0.15 N, adjusted to pH 7.5 with concentrated HCl solution.

∂ Tris-HCl buffer 0.05, pH 8: [Tris] = 0.05 N, [NaCl] = 0.15 N, adjusted to pH 8 with concentrated HCl solution

∂ Phosphate buffer 0.1 N pH 7: [NaHPO<sub>4</sub>] = 0.1 N, [Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] = 0.1 N.

## Δ Reactants

**PhX** solution in CH<sub>3</sub>CN (20 mg/mL) is stored at -20°C

**VX** solutions in isopropanol (1 mM and 5 mM) are stored at -20°C

## Δ UV-visible spectra

UV-visible spectra were obtained on KRONTON Instruments UVIKON 943 and UVIKON 933.

(Hellma 100-OS 10mm)

#### Δ **High performance liquid chromatography separations**

The analytical experiments were performed on Shimadzu 10 AVP HPLC (column Agilent Zorbax SB-CN, 5 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 150 mm) with 0.012 % (v/v) trifluoroacetic acid CH<sub>3</sub>CN/ 0.008% (v/v) trifluoroacetic acid H<sub>2</sub>O as the eluent [75% H<sub>2</sub>O (2.5min), linear gradient from 75% to 40% (2.5-5.00 min), 40% (5.00-10.00 min), linear gradient from 40% to 75% (10.00-11.00 min), 75% (11.00-15.00 min)] at a flow rate of 1 mL/min. UV detection was achieved at 263 nm. The volume injected was 20  $\mu$ L.

#### Δ **PhX hydrolysis in the presence of nucleophiles (Screening test)**

Samples preparation: Samples containing 1 mM of PhX (50  $\mu$ L of 100mM stock solution in CH<sub>3</sub>CN) and nucleophile 5 mM were prepared in CH<sub>3</sub>CN (500  $\mu$ L) and Tris-HCl buffer (0.1 N pH 8.5, V<sub>TOT</sub>= 5 mL).

HPLC analysis: Each sample was analysed by HPLC at t=0 and t=2 h. The **PhX** peaks areas (RT $\approx$  8 min) were measured.

#### Δ **PhX hydrolysis in the presence of nucleophiles (Kinetics)**

Samples preparation: Samples containing 1 mM of **PhX** (50  $\mu$ L of 100mM stock solution in CH<sub>3</sub>CN) and nucleophile 5 mM, 1 mM, 0.4 mM or 0.2 mM were prepared in CH<sub>3</sub>CN (500  $\mu$ L) and Tris-HCl buffer (0.1 N pH 8.5 or 0.1N pH 7.55, V<sub>TOT</sub>= 5 mL). The samples were dispatched in HPLC samples and put into the HPLC auto-sampler.

For the experiment at 40°C, the samples were maintained at 40°C in an oil bath, and the injections were done manually every 15 minutes

HPLC analysis: Each sample was analysed by HPLC every 15 minutes. The **PhX** peaks areas (RT $\approx$  8 min) were measured.

#### Δ **AChE reactivation**

DTNB solution: stock solutions at 10 mM were prepared in the suitable buffer.

ATC or PTC solutions: stock solutions at 100 mM in water purified in a Milli-Q system were prepared and stored at 0°C during the analysis.

Buffer solutions with 0.1 % albumine: 0.1% weight of albumine was added to the suitable buffer solution. The resulting buffer solution could be stored at 0°C and could be reused. During the analysis the buffer is maintained at 37°C.

VX solution: Two solutions were prepared from the stock solution at 1mM in isopropanol: one at 1 µM and the other at 10 µM.

Determination of the AChE concentration: The suitable enzyme concentration has to be determined every day.

The enzyme stock solution were 7.8mg/mL, already diluted 1/1000.

Reference cell: 943 µL of buffer, 50 µL of DTNB solution, 7.5 µL of ATC solution

Sample cell: 893 µL of buffer, 50 µL of DTNB, 7.5 µL of ATC and 50 µL of AChE solution

The resulting sample cell (TNB) absorbance should be between 0.3 and 0.6. The AChE solution should be diluted in buffer with 0.1% albumine in order to reach the desired absorbance.

Determination of the VX concentration: The VX concentration is related to the enzyme concentration and has to be determined every day. The suitable VX concentration allows reaching an inhibition plateau at 10 to 5%, considering the AChE activity at 100% at the beginning.

Reference cell: 943 µL of buffer, 50 µL of DTNB solution, 7.5 µL of ATC solution

Sample cell: 893 µL of buffer, 50 µL of DTNB, 7.5 µL of ATC and 50 µL of inhibited AChE solution.

*Example of inhibited AChE solution:* 200 µL of AChE solution at the concentration previously determined and 2.4 µL of VX solution at 1 µM.

A sample of inhibited AChE was analyzed every 10 minutes. After 10 minutes (first sample) the inhibition should be between 20 and 40%.

When the good VX concentration was obtained, the sample of inhibited AChE was scaled-up to prepare around 4 mL of inhibited AChE solution.

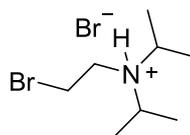
AChE reactivation test:

When the inhibition plateau was obtained with the scaled-up inhibited AChE solution, a reactivator was added to the inhibited AChE solution: this is  $t=0$

Reference cell: 943  $\mu\text{L}$  of buffer, 50  $\mu\text{L}$  of DTNB solution, 7.5  $\mu\text{L}$  of ATC solution

Sample cell: 893  $\mu\text{L}$  of buffer, 50  $\mu\text{L}$  of DTNB, 7.5  $\mu\text{L}$  of ATC and 50  $\mu\text{L}$  of inhibited AChE solution+reactivateur.

A sample of inhibited AChE+Reactivator was analyzed as often as possible. The frequency depends on the activity of the reactivator.

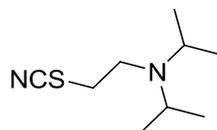
**(2-Bromo-ethyl)-diisopropyl-ammonium bromide 5**

A solution of triphenylphosphine (2.20 g, 8.20 mmol) in DCM was cooled at 0°C. A dilute solution of bromine in DCM was added dropwise to reach the typical orange color of bromine in solution. Diisopropylaminoethanol (1.45 mL, 8.20 mmol) was added dropwise to the mixture, which was allowed to stir at room temperature for 1 hour. The mixture was poured in Et<sub>2</sub>O to precipitate the desired compound. After filtration and washing with Et<sub>2</sub>O, 2.1 g of a light brown solid were obtained (90%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.49 (d, 6H, *J*= 8Hz), 1.60 (d, 6H, *J*= 8Hz), 3.33 (td, 2H, *J*= 8Hz, *J*= 4Hz), 3.70 (hept, 2H, *J*= 8Hz), 3.96 (t, 2H, *J*= 4Hz) 10.92 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 17.0, 18.7, 24.5, 48.9, 55.6.

**M.S** *m/z* (ESI) = 208, 210 [M+H-HBr]<sup>+</sup>.

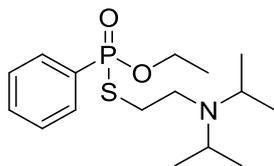
**Diisopropyl(2-thiocyanato-ethyl)-amine 4**

A suspension of (2-Bromo-ethyl)-diisopropyl-ammonium bromide **5** (1.27 g, 4.39 mmol) in THF (20 mL) was cooled down to 0°C, TMSNCS (0.9 mL, 6.59 mmol) and TBAF 1M in THF (6.6 mL, 6.6 mmol) were added slowly. The dissolution of the suspension was observed. After 16 hours of stirring at room temperature the solvent was removed under vacuum. The crude compound was purified by column chromatography using pentane/ethyl acetate (80/20) as eluent to obtain 625 mg of slightly yellow liquid (76%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.01 (d, 12H, *J*= 6.8 Hz), 2.82 (t, 2H, *J*= 7 Hz), 2.97 (hept, 2H, *J*= 6.8 Hz), 3.11 (t, 2H, *J*= 7 Hz).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 20.9, 36.0, 43.7, 48.2, 114.1.

**M.S** *m/z* (ESI) = 187 [M+H]<sup>+</sup>.

**PhX: O-ethyl-S-(2-diisopropylamino-ethyl)phenyl-phosphonothioate 1**

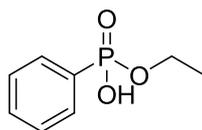
Diisopropyl(2-thiocyanato-ethyl)-amine **4** (625 mg, 3.35 mmol) and ethylphenylphosphinate (0.8 mL, 5.03 mmol) were stirred together under argon atmosphere for 10 days. The reaction was followed by  $^{31}\text{P}$  N.M.R. The mixture was quickly purified by neutral alumina column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (30/70) as eluent. 400 mg of clear yellow oil were obtained (40%).

$^1\text{H}$  N.M.R (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0.94 (d, 12H,  $J = 6.5$  Hz), 1.40 (t, 3H,  $J = 7$  Hz), 2.52-2.58 (m, 2H), 2.63-2.73 (m, 2H), 2.91 (hept., 2H,  $J = 7$  Hz), 4.25 (q, 2H,  $J = 7$  Hz), 7.44-7.55 (m, 3H), 7.89 (m, 2H).

$^{13}\text{C}$  N.M.R (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 16.5 (d,  $J_{\text{P-C}} = 6.5$  Hz), 21.0, 31.5, 46.3 (d,  $J_{\text{P-C}} = 4.5$  Hz), 49.0, 62.2 (d,  $J_{\text{P-C}} = 6.5$  Hz), 128.6 (d,  $J_{\text{P-C}} = 14.5$  Hz), 131.4 (d,  $J_{\text{P-C}} = 11$  Hz), 132.5.

$^{31}\text{P}$  N.M.R (121.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 45.7

M.S m/Z (ESI) = 330

**AP1: O-ethyl-phenyl-phosphonic acid 2**

Diethylphenylphosphonate (530 mg, 2.47 mmol) and NaOH 1N solution (10 mL) were refluxed for 2 hours. The homogenous mixture was extracted with chloroform. The aqueous layer was acidified to pH 2-3 by HCl 1N solution, and then extracted with chloroform. The organic layer was washed with brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solvent was removed to give 436 mg of colorless oil (95%).

$^1\text{H}$  N.M.R (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 1.30 (t, 3H,  $J = 7$  Hz), 4.08 (q, 2H,  $J = 7$  Hz), 7.42-7.53 (m, 3H), 7.75-7.85 (m, 2H).

$^{13}\text{C}$  N.M.R (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 16.3 (d,  $J_{\text{P-C}} = 6.5$  Hz), 62.1 (d,  $J = 5$  Hz), 128.5 (d,  $J = 14.5$  Hz), 131.4 (d,  $J = 5$  Hz), 132.4.

$^{31}\text{P}$  N.M.R (121.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 21.0

**Protocol A: general procedure for oximes synthesis:**

Hydroxylamine hydrochloride (4 mmol) and  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2 mmol) were mixed together in water (3 mL) until the solids dissolve and the gas emission stops. This aqueous solution was added to the corresponding aldehyde (1 mmol) in absolute ethanol (0.5 ml). The mixture was heated at 70°C for 2 to 16 hours. The reaction mixture was then allowed to cool down to room temperature.

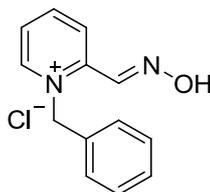
If the compound precipitate, the solid was filtered off and washed with cold water before being dried under vacuum.

If the compound did not precipitate, the reaction mixture was extracted with ethyl acetate and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . After removal of the solvent the compound was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate as eluent to afford the desired oxime.

**Protocol B : General procedure for amidoximes synthesis:**

Hydroxylamine hydrochloride (4 mmol) and  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2 mmol) were mixed together in water (3 mL) until the solids dissolve and the gas emission stops. This aqueous solution was added to the corresponding nitrile (1 mmol) in absolute ethanol (0.5 ml). The mixture was heated at 70°C for 2 to 24 hours. The reaction mixture was allowed to cool down to room temperature. If the compound precipitate, the solid was filtered off and washed with cold water before being dried under vacuum.

If the compound did not precipitate, the reaction mixture was extracted with ethyl acetate, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . After removal of the solvent the compound was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate as eluent to afford the desired amidoxime.

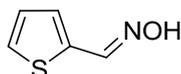
**Benzyl-2-hydroxyiminopyridinium chloride 8**

Syn-2- pyridinaldoxime (97.2 mg, 0.8 mmol) and Benzyl chloride (100  $\mu$ L, 0.9 mmol) were refluxed in acetonitrile (2 mL) for 48 hours. The reaction mixture was cooled down to room temperature meanwhile the compound crystallized. The precipitate was filtered and washed with acetonitrile to give 39 mg of pale yellow crystals (20%).

**$^1\text{H N.M.R}$**  (300 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  : 6.12 (s, 2H), 7.30-7.50 m, 5H), 8.19 (t, 1H,  $J=6$  Hz ), 8.32 (d, 1H,  $J=6$  Hz), 8.55 (t, 1H,  $J=6$  Hz), 8.74 (s, 1H), 9.25 (d, 1H,  $J=6$  Hz), 13.2 (s, 1H).

**$^{13}\text{C N.M.R}$**  (75 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  : 60.3, 126.0, 127.3, 127.8, 129.2, 134.0, 141.3, 145.9, 146.5, 147.3.

**M.S**  $m/z$  (ESI) = 213.[M] $^+$ .

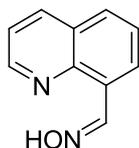
**2-Thiophene carboxaldoxime 10**

2-thiophene carboxaldehyde (112 mg, 1mmol), hydroxylamine hydrochloride (70mg, 1mmol) and pyridine (0.16 mL, 2 mmol) were mixed together in ethanol (2 mL). The reaction mixture was refluxed for 16 hours, before cooling down to room temperature. The reaction mixture was extracted with ethyl acetate, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (50/50) as euent. 114 mg of whitish solid were obtained (90%,  $E \geq 95\%$ )

**$^1\text{H N.M.R}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 7.11 (dd, 1H,  $J=3$  Hz,  $J=6$  Hz) 7.40 (dd, 1H,  $J=3$  Hz,  $J=6$  Hz), 7.58 (d, 1H,  $J=6$  Hz), 7.73 (s, 1H)

**$^{13}\text{C N.M.R}$**  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 127.0, 128.1, 132.3, 141.6, 145.0.

**M.S**  $m/z$  (ESI) = 128 [M+H] $^+$ .

**Quinoline-8-carboxaldoxime 11**

The quinoline-8-carboxaldoxime was obtained from the quinoline-8-carboxaldehyde using the protocol A.

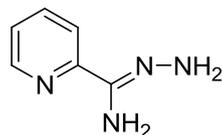
The mixture was heated for 16 hours and then was allowed to cool down to room temperature. After work-up the crude was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (50/50) as eluent to give 149 mg of yellow powder as the pure compound (87%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 7.48 (dd, 1H, *J*= 4 Hz, *J*= 8 Hz), 7.58 (t, 1H, *J*= 8 Hz), 7.88 (dd, 1H, *J*= 1 Hz, *J*= 8 Hz) 8.20 (d, 2H, *J*= 8 Hz), 8.98 (dd, 1H, *J*= 1 Hz, *J*= 4 Hz).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 121.6, 126.5, 126.8, 128.5, 129.8, 130.0, 136.5, 145.9, 148.2, 150.3.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3202, 2876, 1501, 791.

**M.S** *m/z* (ESI) = 173 [M+H<sup>+</sup>].

**2-Pyridylamidrazone 12**

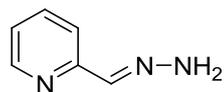
2-cyanopyridine (2.18 g, 21 mmol) and excess hydrazine hydrate (1.5 mL, 48 mmol) were mixed in a minimum amount of ethanol (2 mL) and allowed to stir at room temperature overnight. The crystals were filtered, washed with diethyl ether and vacuum dried to give 2.55 g of pale yellow needles (90%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ : 4.42 (s br, 2H), 5.29 (s br, 2H), 7.24 (dd, 1H, *J*= 1.6 Hz, <sup>3</sup>*J*= 5 Hz), 7.67 (td, 1H, *J*= 1.6 Hz, *J*= 8 Hz), 8.00 (d, 1H, *J*= 8 Hz), 8.50 (d, 1H, *J*= 5 Hz).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (50 MHz, D<sub>2</sub>O) δ : 121.1, 125.3, 138.1, 148.5, 149.9, 151.2.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3436, 3280, 3166, 1635, 1587, 1559.

**M.S** *m/z* (ESI) = 137 [M+H]<sup>+</sup>.

**2-Pyridinaldazine 13**

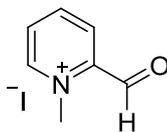
Hydrazine hydrate (0.7 mL, 22.5 mmol) was slowly added to a stirred solution of 2-pyridinaldehyde (1.8 mL, 18.9 mmol) in methanol (2.5 mL). During the addition the solution became quite hot and crystals of 2-pyridinaldazine appeared. The reaction mixture was cooled using an ice bath and filtered. The solid was recrystallized from methanol to afford 1.81 g of bright yellow needles (80%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 7.52 (m, 1H), 7.90 (m, 1H), 8.18 (d, 1H,  $J=8$  Hz), 8.63 (s, 1H), 8.67 (d, 1H,  $J=5$  Hz).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 123.8, 127.0, 138.7, 150.8, 153.7, 162.8.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) 3053, 3004, 1631, 1586, 1564, 1465, 1434, 779.

**M.S**  $m/z$  (ESI) = 122 [M+H]<sup>+</sup>.

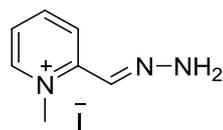
**N-Methyl-2-pyridinaldehyde iodide 22**

2-pyridinaldehyde (3.9 mL, 41 mmol) and MeI (3mL, 48 mmol) were stirred together overnight under argon. The precipitate was filtered and washed with cold THF to afford 3 g of orange solid (30%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (200 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  : 4.64 (s, 3H), 8.34 (t, 1H,  $J=6$  Hz), 8.52 (d, 1H,  $J=8$ Hz), 8.78 (t, 1H,  $J=8$  Hz), 9.13 (d, 1H,  $J=6$ Hz), 10.27 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R**. (75 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  : 45.9, 127.7, 130.6, 144.7, 146.7, 147.7, 183.4.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3036, 2983, 1695, 1615, 1225.

**N-Methyl-2-pyridinaldazine Iodide**

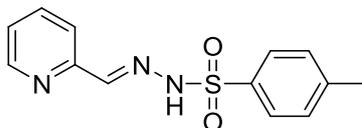
To a suspension of N-methyl-2-pyridinaldehyde iodide **22** (521 mg, 2.09 mmol) in MeOH (3mL), hydrazine hydrate (0.1 mL, 3.2 mmol) was added. The mixture turned dark green, with an instantaneous precipitation. The mixture was allowed to stir at room temperature for 3 hours and was then cooled down to 0°C. The precipitate was filtered and washed with cold MeOH to give 503 mg of pale green solid (91%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (200 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  : 4.40 (s, 3H), 8.03 (t, 1H, *J*=6 Hz), 8.24 (d, 1H, *J*= 8Hz), 8.58 (t, 1H, *J*=8 Hz), 8.96 (d, 1H, <sup>3</sup>*J*= 6Hz).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (100 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  : 45.2, 80.5, 126.4, 126.5, 145.0, 146.6, 156.2

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3309, 3158, 3032, 1629, 1605.

**M.S** *m/z* (ESI) = 136 [M]<sup>+</sup>.

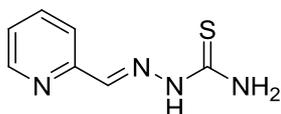
**2-Pyridinecarboxaldehyde tosylhydrazone 15**

p-toluenesulfonylhydrazide (186 mg, 1 mmol) was suspended in methanol (2 mL), 2-pyridinaldehyde (0.95 mL, 1 mmol) was added dropwise at 0°C. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. A precipitate has formed that was filtered off and washed with cold methanol. 150 mg of the desire product were obtained (54%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 2.40 (s, 3H), 7.35-7.39 (m, 3H), 8.81-7.84 (m, 4H), 7.88 (dd, 1H, *J*=1Hz, *J*= 8 Hz), 8.48 (dq; 1H, *J*= 1Hz, *J*= 5Hz).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 21.5, 121.5, 125.7, 128.8, 130.7, 137.4, 138.6, 145.6, 146.9, 150.0, 154.1.

**M.S** *m/z* (ESI) = 276 [M+H]<sup>+</sup>.

**2-Pyridinecarbaldehyde thiosemicarbazone 16**

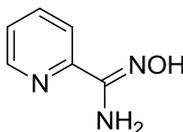
Pyridine-2-carboxaldehyde (95  $\mu\text{L}$ , 1 mmol) and hydrazinecarbothioamide (91 mg, 1mmol) were refluxed in 2 mL ethanol for 16 hours. The mixture was allowed to cool down to room temperature, meanwhile a precipitate formed. The pale yellow crystals were filtered and washed with cold ethanol. 93 mg of the desired product were obtained (52%).

**$^1\text{H N.M.R}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 7.42 (t, 1H,  $J=5$  Hz), 7.86-7.97 (m, 2H), 8.01 (s, 1H), 8.57 (d, 1H,  $J=5$  Hz).

**$^{13}\text{C N.M.R}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 123.8, 125.8, 138.9, 142.7, 150.5, 154.0, 181.0.

**I.R** ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 3432, 3149, 2972, 1601, 1520.

**M.S**  $m/z$  (ESI) = 181  $[\text{M}+\text{H}]^+$

**2-Pyridylamidoxime 17**

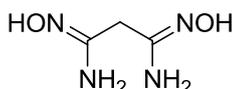
The 2-pyridylamidoxime was synthesized from 2-cyanopyridine using the protocol B. The reaction mixture was heated for 8 hours. The compound precipitated when cooling the reaction mixture at  $0^\circ\text{C}$ . The light brown solid was filtrated and washed with cold ethanol to give the desired compound (80%).

**$^1\text{H N.M.R}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  : 5.84 (s, 2H), 7.40 (t, 1H), 7.83 (m, 2H), 8.56 (d, 1H), 9.92 (s, 1H).

**$^{13}\text{C N.M.R}$**  (50 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  : 119.4, 124.0, 136.6, 148.2, 149.4, 150.0.

**I.R** ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 3429, 3176, 2849, 1653, 1594, 1567.

**M.S**  $m/z$  (ESI) = 137  $[\text{M}]^+$ .

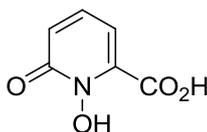
**N',N'-Dihydroxymalonimidamide 18**

N',N'-dihydroxymalonimidamide was obtained from malonitrile using the protocole B. The precipitate was filtered and washed with cold water to give 102 mg of the desired compound (77%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (400 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  : 2.67 (s, 2H), 5.32 (s, 4H), 8.94 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (100 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  : 33.3, 149.5.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3341, 3257, 3169, 2741, 1657, 1373.

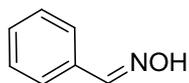
**1-hydroxy-2-pyridinone-6-carboxylic acid 19**

Acetic anhydride (10 mL) was mixed with 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution (2.5 mL) in an ice bath. The mixture was stirred for 4 hours until an homogenous peracetic acid solution formed. This solution was added dropwise with stirring to a solution of 6-hydroxy-picolinic acid (2.6 g, ) in a mixture of trifluoroacetic acid (22.5 mL) and glacial acetic acid (15 mL). The mixture was stirred at room temperature for 1 hour and then heated slowly to 80°C and kept at 80°C for 16 hours. A slightly brown precipitate formed during this period, which was collected by filtration, washed with cold methanol, and dried. It was dissolved in aqueous 10% KOH, heated to 80°C for 6 hours, and re-precipitated with concentrated HCl. The white product was collected by filtration, washed with water and dried under vacuum (73%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  : 6.63 (dd, 1H,  $J=7\text{Hz}$ ,  $J=1\text{Hz}$ ), 6.71 (dd, 1H,  $J=9\text{Hz}$ ,  $J=1.2\text{Hz}$ ), 7.43 (dd, 1H,  $J=9\text{Hz}$ ,  $J=7\text{Hz}$ ).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  : 106.4, 120.4, 136.8, 139.0, 157.2, 161.9.

**M.S**  $m/z$  (ESI) = 156 [M+H]<sup>+</sup>.

**Benzaldoxime 23**

The benzaldoxime was obtained from the benzaldehyde using the protocol A.

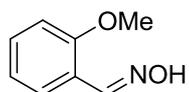
The reaction mixture was heated for 16 hours and was then allowed to cool down to room temperature. After work-up the crude was quickly purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (50/50) as eluent to give 109 mg of white crystals as the pure compound (90%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 6.29-6.35 (m, 3H), 7.06 (d,  $J$ = 8 Hz), 8.11 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 127.7, 129.7, 130.5, 134.4, 150.2.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3281, 1493, 1444, 1303, 1288, 1209.

**M.S** m/z (ESI) = 122 [M+H]<sup>+</sup>

**2-Metoxybenzaldoxime 24**

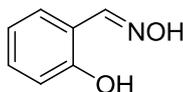
The 2-metoxybenzaldoxime was obtained from the 2-methoxybenzaldehyde using the protocol A.

The reaction mixture was heated for 1.5 hours and was then allowed to cool down to room. The desired compound has precipitated and was filtered off and washed with cold water to give the desired oxime as white crystals (80%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 3.86 (s, 3H), 6.92 (t, 1H,  $J$ = 7.5 Hz), 7.00 (d, 1H,  $J$ = 8 Hz), 7.34 (t, 1H,  $J$ = 8 Hz), 7.69 (d, 1H,  $J$ = 7.5 Hz), 8.39 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (50 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  : 55.6, 111.7, 120.6, 125.4, 130.7, 143.4, 156.8.

**M.S** m/z = 152 [M+H]<sup>+</sup>

**2-Hydroxybenzaldoxime 25**

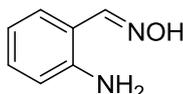
The 2-hydroxybenzaldoxime was obtained from the 2-hydroxybenzaldehyde using the protocol A.

The reaction mixture was heated for 16 hours and then was allowed to cool down to room temperature. After work-up the crude was quickly purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (50%/50%) as eluent to give 101 mg of white solid as the pure compound (89%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 6.84-6.91 (m, 2H), 7.18-7.29 (m, 2H), 8.24 (s, 1H), 9.76.

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 116.5, 116.9, 119.9, 130.9, 131.5, 153.2, 157.3.

**M.S** m/z (ESI) = 138 [M+H]<sup>+</sup>.

**2-Aminobenzaldoxime 26**

The 2-aminobenzaldoxime was obtained from the 2-aminobenzaldehyde using the protocol A.

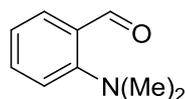
The reaction mixture was heated for 16 hours and then was allowed to cool down to room temperature. The precipitate was collected by filtration and washed with cold water. 83 mg of white needle like crystals were obtained (61%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 6.62 (t, 1H,  $J$ = 8 Hz), 6.72 (d, 1H,  $J$ = 8 Hz ), 7.07 (t, 2H,  $J$ = 8Hz), 8.15 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 113.8, 117.6, 119.5, 130.7, 135.7, 150.2, 158.7.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3386, 3367, 2359, 1495, 966, 737.

**MS** m/z (ESI) = 137 [M+H]<sup>+</sup>.

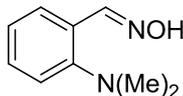
**2-(N,N-Dimethylamino)benzaldehyde 32**

2-fluorobenzaldehyde (420 mL, 4 mmol), dimethylamine 2M in THF (2 mL, 4 mmol), and  $K_2CO_3$  (1.12 g, 8 mmol) in dry DMSO (4 mL) were refluxed for 16 hours. The reaction mixture was allowed to cool down to room temperature and was then poured in ice. The compound was extracted with dichloromethane. The compound was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (80/20) to give 197 mg of brown liquid (33%).

**$^1H$  N.M.R** (200 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  : 2.90 (s, 6H), 7.01 (t, 1H,  $J= 7.5Hz$ ), 7.14 (d, 1H,  $J= 7.5Hz$ ), 7.50 (td, 1H,  $J= 2Hz$ ,  $J= 7.5Hz$ ), 7.76 (dd, 1H,  $J= 2Hz$ ,  $J= 7.5Hz$ ), 10.22 (s, 1H).

**$^{13}C$  N.M.R** (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 45.7, 117.7, 120.7, 127.1, 131.1, 134.7, 155.9, 191.4.

**M.S** m/z (ESI) = 150  $[M+H]^+$ .

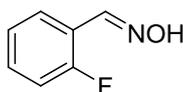
**2-(N,N-Dimethylamino)benzaldoxime 27**

2-(N,N-dimethylamino)benzaldoxime was obtained from 2-(N,N-dimethylamino)benzaldehyde **32** usind protocol A.

The reaction mixture was refluxed for 16 hours, and was then allowed to cool down to room temperature. The crude was purified by column chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (50/50) as eluent. 64 mg of pure compiund were obtained (60%).

**$^1H$  N.M.R** (200 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  : 2.70 (s, 6H), 7.01 (td, 1H,  $J= 12 Hz$ ,  $J= 6 Hz$ ), 7.11 (dd, 1H,  $J= 8 Hz$ ,  $J= 1 Hz$ ), 7.531 (td, 1H,  $J= 12 Hz$ ,  $J= 6 Hz$ ), 7.71 (dd, 1H,  $J= 8 Hz$ ,  $J= 1 Hz$ ), 8.36 (s, 1H).

**M.S** m/z (ESI) = 165  $[M+H]^+$ .

**2-Fluorobenzaldoxime 28**

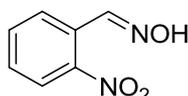
The 2-fluorobenzaldoxime was obtained from the 2-fluorobenzaldehyde using the protocol A.

The reaction mixture was heated for 16 hours and was complete. The reaction mixture was extracted with ethyl acetate. The solvent was removed to afford the desired compound (90%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 7.16 (m, 2H), 7.36 (qd, 1H, *J*= 1.5 Hz, *J*= 7.5 Hz) , 7.76 (td, 1H, *J*= 1.5 Hz, *J*= 7.5 Hz), 8.38 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, DMSO-*d*6) δ : 116.2 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 83 Hz), 120.0 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 40 Hz), 124.6 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 13 Hz), 127.4, 131.7 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 35 Hz), 144.6 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 9 Hz), 161 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 1000 Hz).

**M.S** *m/z* (ESI) = 140 [M+H]<sup>+</sup>.

**2-Nitrobenzaldoxime 29**

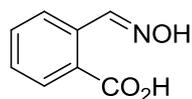
The 3-nitrobenzaldoxime was obtained from the 3-nitrobenzaldehyde using the protocol A. The reaction mixture was heated for 16 hours and then was allowed to cool down to room temperature meanwhile a precipitate has formed. It was filtered and washed with cold water to give 116 mg of pure compound (70%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 7.58 (td, 1H, *J*= 8 Hz, *J*= 1.6 Hz), 7.68 (td, *J*= 8 Hz, *J*= 1.6 Hz), 7.96 (dd, 1H, *J*= 8 Hz, *J*= 1.6 Hz), 8.01 (dd, 1H, *J*= 8 Hz, *J*= 1.6 Hz).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 125.6, 129.0, 129.4, 131.1, 134.3, 146.1, 149.4.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3249, 3080, 1515, 1485, 1343.

**M.S** *m/z* (ESI) = 167 [M+H]<sup>+</sup>.

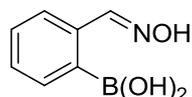
**Phthalaldehydic acid oxime 30**

Phthalaldehydic acid (126 mg, 0.84 mmol) and an excess of hydroxylamine hydrochloride (117 mg, 1.68 mmol) were dissolved in a mixture of methanol (2 mL) and water (10 mL) and the mixture was kept at room temperature for 15 min. The resulting precipitate was filtered off and washed with cold water to afford 90 mg of white powder as the pure compound (65%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 7.45 (td, 1H,  $J= 1\text{Hz}$ ,  $J= 7.5\text{Hz}$ ), 7.54 (t, 1H,  $J= 7.5\text{Hz}$ ), 7.88 (d, 1H,  $J= 7.5\text{Hz}$ ), 7.97 (dd, 1H,  $J= 1\text{Hz}$ ,  $J= 7.5\text{Hz}$ ), 8.85 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 128.1, 130.1, 131.0, 131.8, 133.1, 135.1, 149.6, 170.0.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3500-2500 (broad), 1673, 1574.

**2-((hydroxyimino)methyl)phenylboronic acid 31**

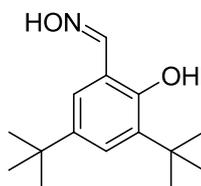
2-((hydroxyimino)methyl)phenylboronic acid was obtained from 2-formylphenylboronic acid using the protocol B.

The reaction mixture was refluxed for 16 hours, and then was allowed to cool down to room temperature. After work-up the crude was purified by column chromatography using dichloromethane/methanol (50/50) as eluent to give 101 mg of white solid as the pure compound (89%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  : 2.92 (s, 6H), 7.00 (t, 1H,  $J= 8\text{ Hz}$ ), 7.04 (d, 1H,  $J= 8\text{ Hz}$ ), 7.46 (td, 1H,  $J= 2\text{ Hz}$ ,  $J= 8\text{ Hz}$ ), 7.76 (dd, 1H,  $J= 2\text{ Hz}$ ,  $J= 8\text{ Hz}$ ), 10.22 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 45.7, 117.7, 120.7, 127.1, 131.1, 134.7, 155.9, 191.4.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3000-2500 (broad), 1605, 1519, 1439, 1209.

**3,5 -Di-tert-butyl-2-hydroxybenzaloxime 33**

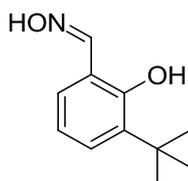
The 3,5-Di-tert-butyl-2-hydroxybenzaloxime was obtained from the 3,5-Di-tert-butyl-2-hydroxybenzaldehyde using the protocol A.

The reaction mixture was heated for 16 hours and then was allowed to cool down to room temperature. The precipitate was collected by filtration and washed with cold water. 212 mg of white solid were obtained (85%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 1.29 (s, 9H), 1.41 (s, 9H), 7.07 (s, 1H), 7, 31 (s, 1H), 8.21 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 30.0, 31.9, 35.0, 36.0, 117.9, 126.1, 126.4, 137.0, 142.2, 153.8, 155.3.

**M.S** m/z (ESI) = 206 [M+H]<sup>+</sup>.

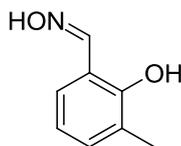
**3-tert-Butyl-2-hydroxybenzaloxime 34**

The 3-tert-butyl-2-hydroxybenzaloxime was obtained from the 3-tert-butyl-2-hydroxybenzaldehyde using the protocol A.

The mixture was heated for 16 hours and then was allowed to cool down to room temperature. The precipitate was collected by filtration and washed with cold water. 166 mg of white solid were obtained (86%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 1.41 (s, 9H), 6.81 (t, 1H,  $J$  = 8 Hz), 7.06 (d, 1H,  $J$  = 8 Hz), 7.25 (d, 1H,  $J$  = 8 Hz), 8.21 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 29.9, 35.7, 118.6, 119.9, 128.8, 129.9, 137.8, 153.4, 157.6. **M.S** m/z (ESI) = 194 [M+H]<sup>+</sup>.

**2-Hydroxy-3-methylbenzaloxime 35**

The 2-hydroxy-3-methylbenzaloxime was obtained from the 2-hydroxy-3-methylbenzaldehyde using the protocol A.

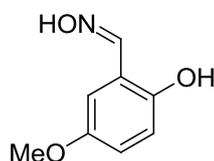
The mixture was heated for 16 hours and then was allowed to cool down to room temperature. The precipitate was collected by filtration and washed with cold water. 130 mg of white solid were obtained (86%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 2.21 (s, 3H), 6.77 (t, 1H, J= 7.5Hz), 7.03-7.10 (m, 2H), 8.19 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 15.8, 117.8, 120.1, 126.3, 129.2, 132.7, 152.8, 156.6.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3348, 2486, 1473, 1441, 1258, 1241, 1003.

**M.S** m/z (ESI) = 152 [M+H]<sup>+</sup>.

**2-Hydroxy-5-methoxybenzaloxime 36**

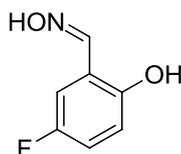
The 2-hydroxy-5-methoxybenzaloxime was obtained from the 2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde using the protocol A.

The reaction mixture was heated for 16 hours and then was allowed to cool down to room temperature. The precipitate was collected by filtration and washed with cold water. 134 mg of whitish solid were obtained (80%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 3.74 (s, 3H), 6.78-6.86 (m, 3H), 8.21 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 56.2, 114.7, 117.9, 118.2, 118.8, 151.7, 152.3, 154.2.

**M.S** m/z (ESI) = 168 [M+H]<sup>+</sup>.

**5-Fluoro-2-hydroxybenzaloxime 37**

The 5-fluoro-2-hydroxybenzaloxime was obtained from the 5-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde using the protocol A.

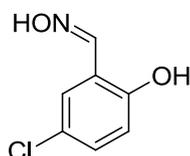
The reaction mixture was heated for 16 hours and then was allowed to cool down to room temperature. The precipitate was collected by filtration and washed with cold water. 124 mg of white powder were obtained (80%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 6.86-7.06 (m, 3H), 7.33 (s, 1H), 8.17 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 115.9 (d, *J* = 105 Hz), 117.8, 118.1, 119.5 (d, *J* = 31 Hz), 150.6, 155.9, 156.7 (d, *J* = 1360 Hz)

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3346, 2987, 2900, 1494, 1387.

**M.S** *m/z* (ESI) = 156 [M+H<sup>+</sup>].

**5-Chloro-2-hydroxybenzaloxime 38**

The 5-chloro-2-hydroxybenzaloxime was obtained from the 5-chloro-2-hydroxybenzaldehyde using the protocol A.

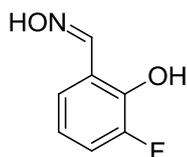
The reaction mixture was heated for 16 hours and then was allowed to cool down to room temperature. The precipitate was collected by filtration and washed with cold water. 154 mg of white solid were obtained (90%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 6.94 (t, 1H, *J* = 8 Hz), 7.73 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz, *J* = 8 Hz), 7.90 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz, *J* = 8 Hz), 8.31 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 118.7, 120.3, 125.2, 129.8, 131.1, 150.5, 157.0.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>): 3405, 1479, 1380, 1257.

**M.S** *m/z* (ESI) = 172 [M+H]<sup>+</sup>.

**3-Fluoro-2-hydroxybenzaloxime 39**

The 3-fluoro-2-hydroxybenzaloxime was obtained from the 3-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde using the protocol A.

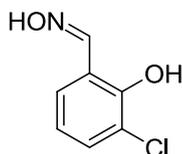
The reaction mixture was heated for 2 hours and then was allowed to cool down to room temperature. The precipitate was collected by filtration and washed with cold water. 102 mg of white needle like crystals were obtained (66%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 7.01 (t, 1H,  $J=8$  Hz), 7.12 (d, 1H,  $J=8$  Hz), 7.25 (d, 1H,  $J=8$  Hz), 8.24 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 117.7 ( $J_{C-F}=75$ Hz), 120.3 ( $J_{C-F}=31$ Hz), 121.3 ( $J_{C-F}=13$ Hz), 125.8 ( $J_{C-F}=13$ Hz), 146.3 ( $J_{C-F}=53$ Hz), 151.2 ( $J_{C-F}=13$ Hz), 154.2.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3395, 2518, 1480, 725.

**M.S** m/z (ESI) = 156 [M+H]<sup>+</sup>.

**3-Chloro-2-hydroxybenzaloxime 40**

The 3-chloro-2-hydroxybenzaloxime was obtained from the 3-chloro-2-hydroxybenzaldehyde using the protocol A.

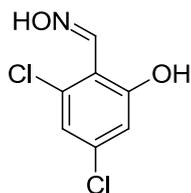
The mixture was heated for 16 hours and then was allowed to cool down to room temperature. The precipitate was collected by filtration and washed with cold water. 156 mg of white solid were obtained (91 %).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 6.87 (t, 1H,  $J=8$  Hz), 7.22 (d, 1H,  $J=8$  Hz), 7.32 (d, 1H,  $J=8$  Hz), 8.26 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 120.1, 121.0, 122.1, 129.8, 131.8, 151.6, 154.1.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3400, 1453, 1431, 1399, 1289.

**M.S** m/z (ESI) = 172 [M+H]<sup>+</sup>.

**4,6-Dichloro-2-hydroxybenzaloxime 41**

The 4,6-dichloro-2-hydroxybenzaloxime was obtained from the 4,6-dichloro-2-hydroxybenzaldehyde.

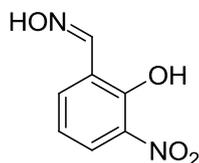
The reaction mixture was heated for 16 hours and then was allowed to cool down to room temperature. The precipitate was collected by filtration and washed with cold water. 192 mg of white solid were obtained (93%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 6.91 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 8.62 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 115.0, 116.8, 121.5, 135.5, 137.0, 148.6, 160.5.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3363, 2988 1605, 1556, 1408.

**M.S** m/z (ESI) =206 [M+H]<sup>+</sup>.

**3-Nitro-2-hydroxybenzaloxime 42**

The 3-nitro-2-hydroxybenzaloxime was obtained from the 3-nitro-2-hydroxybenzaldehyde using the protocol A.

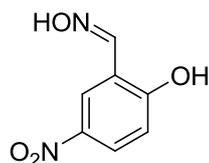
The reaction mixture was heated for 2 hours and then was allowed to cool down to room temperature. The precipitate was collected by filtration and washed with cold water. 148 mg of pure compound were obtained (81%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 7.04 (t, 1H,  $J$ = 8 Hz), 7.83 (dd, 1H,  $J$ = 8 Hz,  $J$ = 1.6 Hz), 8.00 (dd, 1H,  $J$ = 8 Hz,  $J$ = 1.6 Hz), 8.41 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 120.4, 123.5, 126.9, 135.1, 137.8, 147.8, 152.9.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3411, 2536, 1622, 1526, 739.

**M.S** m/z (ESI) = 183 [M+H]<sup>+</sup>.

**5-Nitro-2-hydroxybenzaldoxime 43**

The 5-nitro-2-hydroxybenzaldoxime was obtained from the 5-nitro-2-hydroxybenzaldehyde using the protocol A.

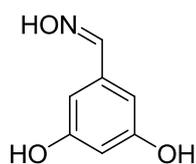
The mixture was heated for 16 hours. After cooling down to room temperature the reaction mixture was extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and concentrated under vacuum. Chromatography on silica gel with cyclohexane/ethyl acetate (50/50) as the eluent afforded the targeted compound as a yellow powder (102 mg, 56%).

**$^1\text{H N.M.R}$**  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 7.29 (t, 1H,  $J = 8$  Hz), 7.99 (dd, 1H,  $J = 1.5$  Hz,  $J = 8$  Hz), 8.21 (dd, 1H,  $J = 1.5$  Hz,  $J = 8$  Hz), 8.35 (s, 1H).

**$^{13}\text{C N.M.R}$**  (75 Hz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 117.8, 119.5, 126.3, 126.9, 141.9, 149.6, 163.6.

**I.R** ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 3307, 2457, 1505, 1329, 751.

**M.S**  $m/z$  (ESI) = 183  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**3,5-Dihydroxybenzaldoxime 44**

The 3,5-dihydroxybenzaldoxime was obtained from the 3,5-dihydroxybenzaldehyde using the protocol A.

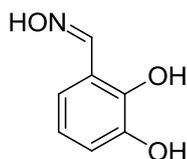
The reaction mixture was heated for 16 hours and then was allowed to cool down to room temperature. After work-up the crude was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (50/50) as eluent to give 130 mg of pure compound (85%).

**$^1\text{H N.M.R}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 6.26 (t, 1H,  $J = 2$  Hz), 6.51 (d, 2H,  $J = 2$  Hz), 7.89 (s, 1H).

**$^{13}\text{C N.M.R}$**  (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 104.9, 106.3, 136.1, 150.4, 159.8.

**I.R** ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 3249, 1592, 1338, 1154, 669.

**M.S**  $m/z$  (ESI) = 154  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**2,3-Dihydroxybenzaloxime 45**

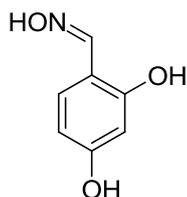
The 2,3-dihydroxybenzaloxime was obtained from the 2,3-dihydroxybenzaldehyde using the protocol A.

The mixture was heated for 16 hours and then was allowed to cool down to room temperature. After work-up the crude was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (50%/50%) as eluent to give 118 mg pure compound (77%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 6.77 (m; 3H), 8.20 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OH)  $\delta$  : 117.6, 118.8, 120.6, 121.9, 146.3, 148.2, 152.3.

**M.S**  $m/z$  (ESI) = 154 [M+H]<sup>+</sup>.

**2,4-Dihydroxybenzaloxime 46**

The 2,4-dihydroxybenzaloxime was obtained from the 2,4-dihydroxybenzaldehyde using the protocol A.

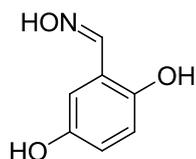
The mixture was heated for 3 hours and then was allowed to cool down to room temperature. The precipitate was collected by filtration and washed with cold water. 94 mg of white needles were obtained (61%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 6.32 (m, 2H), 7.05 (d, 2H,  $J$  = 8Hz), 8.11 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 103.3, 108.1, 110.8, 132.0, 151.9, 159.8, 160.9.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3365, 1624, 1525, 1307, 1208, 975.

**M.S**  $m/z$  (ESI) = 154 [M+H]<sup>+</sup>.

**2,5-Dihydroxybenzaloxime 47**

The 2,5-dihydroxybenzaloxime was obtained from the 2,5-dihydroxybenzaldehyde using the protocol A.

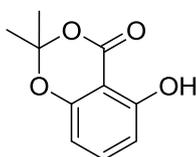
The mixture was heated for 4 hours and then was allowed to cool down to room temperature. After work-up the crude was quickly purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (30/70) as eluent to give 130 mg of white solid as the pure compound (85%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 6.71 (s; 3H), 8.14 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 116.3, 117.7, 118.8, 118.9, 151.1, 151.5, 151.7

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3273, 1495, 1258, 1004, 784.

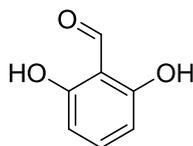
**M.S** m/z (ESI) = 154 [M+H]<sup>+</sup>.

**2,2-Dimethyl-1,3-benzodioxane-4-one 50**

To an ice-cold suspension of 2,6-dihydroxy salicylic acid (2.0g, 13 mmol) in trifluoroacetic acid (16 mL), were added trifluoroacetic anhydride (10 mL) and acetone (2 mL). The mixture was warmed slowly to room temperature, and then stirred for 48 h. The slightly yellow solution was then concentrated under vacuum, poured into a saturated solution of aqueous NaHCO<sub>3</sub> and extracted with three portions of ethyl acetate. The combined organic layer was washed with water and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated to leave the crude product. Chromatography over silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (95/5) as eluent afforded the pure compound. 765 mg of white solid were obtained (30%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.75 (s, 6H), 6.43 (d, 1H, J= 8Hz), 6.63 (d, 1H, J= 8Hz), 7.41 (t, 1H, J= 8Hz), 10.34 (s, 1H).

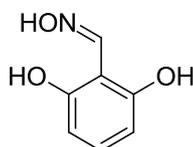
**M.S** m/z (ESI) 195 [M+H]<sup>+</sup>.

**2,6-Dihydroxybenzaldehyde 51**

A solution of 2,2-Dimethyl-1,3-benzodioxane-4-one **50** (735 mg, 4.6 mmol) in DCM (60 mL) at -75°C (dry ice /acetone) was treated with DIBAL-H (1 M in DCM , 13.8 mL, 13.8 mmol). The reaction mixture was stirred at -75°C for 2 hours and then quenched with 1M HCl and MeOH. After warming to room temperature, H<sub>2</sub>O was added, and the aqueous layer was extracted with Et<sub>2</sub>O (3x30 mL). The combined organic layers were washed with water and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. Chromatography on silica gel with cyclohexane/ethyl acetate (95/5) as the eluent afforded the targeted compound (55 mg, 9 %).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 6.45 (d, 1H, *J*= 8Hz), 6.64 (d, 1H, *J*= 8Hz), 7.42 (t, 1H, *J*= 8Hz), 10.34 (s, 1H).

**M.S** m/z (ESI) = 139 [M+H]<sup>+</sup>.

**2,6-Dihydroxybenzaldoxime 48**

2,6-dihydroxybenzaldoxime was obtained from 2,6-dihydroxybenzaldehyde **51** using protocol A.

The mixture was heated for 16 hours and then was allowed to cool down to room temperature. After work-up the crude was quickly purified by column chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (30/70) to give 69 mg of white powder as the pure compound (45%).

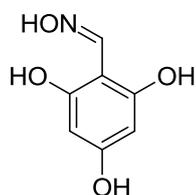
**<sup>1</sup>H N.M.R** (300MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 6.32 (d, 2H, *J*= 8Hz), 7.01 (t, 1H; *J*= 8 Hz), 8.56 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 106.6, 107.5, 132.2, 148.5, 158.9.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3500-2500 (broad), 1622, 1467, 1227

**M.S** m/z (ESI) = 154 [M+H]<sup>+</sup>.

### 2,4,6- Trihydroxybenzaloxime 49



The 2,4,6-trihydroxybenzaloxime was obtained from the 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde using the protocol A.

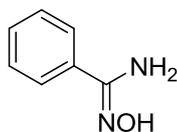
The mixture was stirred at room temperature for 5 hours and then was allowed to cool down to room temperature. The reaction mixture was extracted with ethyl acetate, and the compound was purified by column chromatography to give AA mg of orange powder (80%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 6.86-7.06 (m, 3H), 7.33 (s, 1H), 8.17 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (50 Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 105.5, 110.4, 147.6, 160.9

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3364, 1507, 1015.

**M.S** m/z (ESI) = 170 [M+H<sup>+</sup>].

**Benzamidoxime 52**

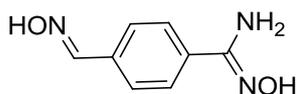
The benzamidoxime was obtained from the benzonitrile using the protocol B.

The reaction mixture was heated for 16 hours. After work-up the compound was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (50/50) as eluent to give the desired compound as white crystals (123 mg, 90%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 4.88 (s broad, 2H), 7.41 (m, 3H), 7.64 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 126, 128.8, 130.2, 132.6, 152.8.

**M.S** m/z (ESI) = 137 [M+H]<sup>+</sup>.

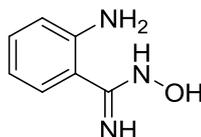
**N'-Hydroxy-4-((hydroxyimino)methyl)benzimidamide 53**

Hydroxylamine hydrochloride (4.24 mg, 6.10 mmol) and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (323 mg, 3.05 mmol) were mixed together in water (6 mL) until the solids dissolve and the gas emission stop. This solution was added to 4-cyanobenzaldehyde (101.7 mg, 0.76 mmol) in absolute ethanol (1 mL). The mixture was heated at 70°C for 16 hours. The reaction mixture was allowed to cool at room temperature, extracted with ethyl acetate (3×10 mL), and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After removal of the solvent the compound was crystallized in cold DCM. The filtration of the white precipitate gave 81 mg of the desired compound (60%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, DMSO-*d*6) δ : 5.82 (s, 2H), 7.57 (d, 2H, *J* = 8 Hz), 7.69 (d, 2H, *J* = 8 Hz), 8.14 (s, 1H), 9.71 (s, 1H), 11.28 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75.5 MHz, DMSO-*d*6) δ : 125.6, 126.1, 133.4, 134.0, 147.7, 150.4.

**M.S** m/z (ESI) = 180 [M+H]<sup>+</sup>

**2-Amino-benzamidoxime 54**

The 2-amino-benzamidoxime was obtained from the 2-amino-benzonitrile using the protocol B.

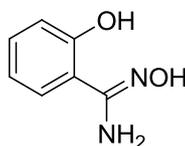
The mixture was heated for 5 hours. After work-up the compound was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (50/50) as eluent to give the desired compound as white solid (109 mg, 75%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 6.67 (td, 1H,  $J = 6$  Hz,  $J = 3$  Hz), 6.75 (dd, 1H,  $J = 6$  Hz,  $J = 3$  Hz), 7.10 (td, 1H,  $J = 6$  Hz,  $J = 3$  Hz), 7.33 (dd, 1H,  $J = 6$  Hz,  $J = 3$  Hz).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 117.5, 117.8, 118.1, 128.9, 130.9, 147.3, 155.4.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3354, 1622, 1498, 1454, 752.

**M.S** m/z (ESI) 152 [M+H]<sup>+</sup>.

**2-Hydroxybenzamidoxime 55**

The 2-hydroxy-benzamidoxime was obtained from the 2-hydroxy-benzonitrile using the protocol B.

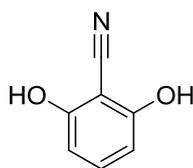
The mixture was heated for 16 hours. After work-up the compound was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (40/60) to give the desired compound as a beige solid (138 mg, 91%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 3.35 (s, 1H), 6.86 (t, 2H,  $J = 8$  Hz), 7.22 (td, 1H,  $J = 1.5$  Hz,  $^3J = 8$  Hz), 7.50 (dd, 1H,  $J = 1.5$  Hz,  $J = 8$  Hz)

**<sup>13</sup>C N.M.R** (50MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 116.2, 117.8, 119.7, 126.5, 131.4, 155.2, 158.7.

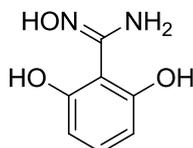
**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3367, 2360, 2342, 1645, 1254.

**M.S** m/z (ESI) 153 [M+H]<sup>+</sup>.

**2,6-Dihydroxybenzonitrile 59**

A solution of 2,6- dimethoxybenzonitrile (300 mg, 1.8 mmol) in dry DCM (3 mL) was cooled to  $-78^{\circ}\text{C}$ . To this, a solution of boron tribromide (1 M in DCM, 7.4 ml, 7.4 mmol) was added dropwise over a period of 1 hour, the temperature was maintained for 2-3 hours, then allowed slowly to attain room temperature. The reaction mixture was stirred for about 10 hours. Excess of boron tribromide was decomposed carefully by the addition of moist chloroform; removal of solvent then gave a crude product which was passed through a column of silica gel using 5% acetone in chloroform as eluent. The light brown solid obtained was crystallized using a mixture of chloroform and acetonitrile; yield  $^1\text{H N.M.R}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 6.36 (d, 2H,  $J= 8$  Hz), 7.19 (t,  $J= 8$  Hz).

**M.S**  $m/z$  (ESI) = 136  $[\text{M}+\text{H}]^+$

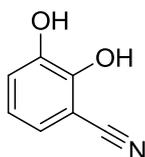
**2,6-Dihydroxybenzamidoxime 56**

The 2,6-dihydroxybenzamidoxime was obtained from the 2,6-dihydroxybenzonitrile **59** using the protocol B.

The reaction mixture was stirred at room temperature for 8 hours meanwhile it turned black. After work-up the compound was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (40/60) as eluent to give the desired compound as a beige solid (101 mg, 60%)

$^1\text{H N.M.R}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 6.33 (d, 2H,  $J= 8$  Hz), 6.98 (t,  $J= 8$  Hz).

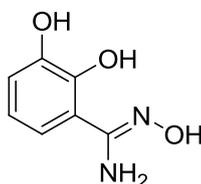
**M.S**  $m/z$  (ESI) = 169  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**2,3-Dihydroxybenzonitrile 58**

Boron tribromide (1M in DCM, 7.4 mL, 7.4 mmol) was added dropwise to 2,3-Methoxybenzonitrile (300mg, 1.8 mmol) in dry DCM (3 mL) at  $-75^{\circ}\text{C}$  (dry ice/acetone cooling). The reaction solution was allowed to warm to room temperature and was stirred for 18 hours. After quenching with  $\text{H}_2\text{O}$  (7 mL) at  $0^{\circ}\text{C}$  (ice bath cooling), solids were filtered, and the layers of the filtrate were separated. The aqueous phase was diluted with  $\text{H}_2\text{O}$  (30 mL); and the pH was adjusted to 2 with HCl 1N. Extraction with ethyl acetate (3x25mL) was performed and the extracts were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , concentrated in vacuo to produce 184 mg of pale yellow powder (74%).

**$^1\text{H N.M.R}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 6.75 (t, 1H,  $J=8$  Hz), 6.94-7.01 (m, 2H).

**M.S**  $m/z$  (ESI) = 136  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**2,3-Dihydroxybenzamidoxime 57**

2,3-dihydroxybenzamidoxime was obtained from 2,3-dihydroxybenzonitrile **58** using protocol B.

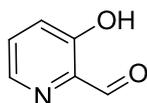
The mixture was heated for 16 hours. After work-up the compound was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (40/60) to give the desired compound as a whitish solid (118 mg, 70%).

**$^1\text{H N.M.R}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 6.71 (t, 1H,  $J=8$  Hz), 6.80 (dd,  $J=8$  Hz,  $J=1.5$  Hz), 7.00 (dd, 1H,  $J=8$  Hz,  $J=1.5$  Hz).

**$^{13}\text{C N.M.R}$**  (75MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 116.2, 117.0, 117.2, 119.5, 146.9, 147.0, 155.5.

**I.R** ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 3354, 2487, 1622, 1583, 1462.

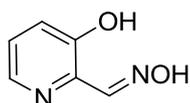
**M.S**  $m/z$  (ESI) = 169  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**3-Hydroxy-2-pyridinecarboxaldehyde 61**

3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)pyridine hydrochloride 85% (1.05g, 5.53 mmol) dissolved in MeOH (5 mL) was neutralized with 295 mg of KOH in a salt-ice bath for 1 hour and the precipitate of KCl was removed by filtration. The MeOH phase was evaporated to dryness in vacuo. The free 3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)pyridine is suspended in DCM (10 mL) and then was treated with grams of active MnO<sub>2</sub> (2.5 g). The reaction was refluxed for 5 hours and then was allowed to warm up to room temperature overnight. The crude mixture was filtered and the MnO<sub>2</sub> cake was washed well with DCM. The extracts were concentrated to dryness and the crude product was chromatographed on silica gel with cyclohexane/ethyl acetate (90%/10% to 80%/20%) as eluent. 225 mg of the desired compound were obtained as a pale green solid. (33%).

<sup>1</sup>H N.M.R (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 7.37 (dd, 1H, *J* = 1 Hz, *J* = 8 Hz), 7.45 (dd, 1H, *J* = 4 Hz, *J* = 8 Hz), 8.35 (dd, 1H, *J* = 1 Hz, *J* = 4 Hz), 10.08 (s, 1H), 10.7 (s, 1H).

<sup>13</sup>C N.M.R (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 126.1, 130.1, 136.8, 142.6, 158.7, 198.8.

**3-Hydroxy-2-pyridinaldoxime 69**

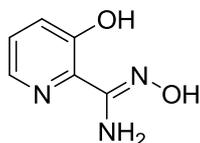
The 3-hydroxy-2-pyridinaldoxime was obtained from the 3-hydroxy-2-pyridinecarboxaldehyde using the protocol A.

The mixture was heated for 16 hours and then was allowed to cool down to room temperature. The precipitate was collected by filtration and washed with cold water. 94 mg of white needle like crystals were obtained (68%).

<sup>1</sup>H N.M.R (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 7.28 (dd, 1H, *J* = 5 Hz, *J* = 8 Hz), 7.36 (dd, 1H, *J* = 2 Hz, *J* = 8 Hz), 8.12 (dd, 1H, *J* = 2 Hz, *J* = 5 Hz), 8.30 (s, 1H).

<sup>13</sup>C N.M.R (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 125.5, 126.1, 137.5, 141.8, 152.4, 155.7.

**M.S** *m/z* (ESI) = 139 [M+H]<sup>+</sup>.

**2-Hydroxypyridylamidoxime 62**

The 2-hydroxy-2-pyridylamidoxime was obtained from the 2-cyano-3-hydroxy-pyridine using the protocol B.

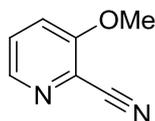
The reaction mixture was heated for 16 hours. The reaction mixture was cooled down to room temperature meanwhile a precipitate formed. It was filtered and washed with cold water to give 125 mg of white needle like crystals (82%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  : 7.21 (t, 1H, *J* = 3 Hz), 7.24 (d, 1H, *J* = 3 Hz), 8.04-8.09 (m, 1H)

**<sup>13</sup>C N.M.R** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 125.1, 126.2, 133.9, 140.4, 155.0, 155.7.

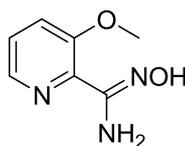
**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3428, 2849, 1653, 1594, 1567, 1390, 939.

**M.S** *m/z* (ESI) = 154 [M]<sup>+</sup>.

**2-Cyano-3-methoxypyridine 66**

2-cyano-3-hydroxypyridine (120 mg, 1mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (415 mg, 3 mmol) and MeI (112 mL, 1.8 mmol) were refluxed in dry DMF. The solvent was under vacuum and the crude was purified by column chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (40/60) as eluent to give the desired compound (91%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 3.91 (s, 3H), 7.68 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz, *J* = 8 Hz), 7.91 (dd, 1H, *J* = 8 Hz, *J* = 4 Hz), , 8.02 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz, *J* = 4 Hz)

**3-Methoxy-pyridylamidoxime 63**

The 3-methoxy-pyridylamidoxime was obtained from the 2-cyano-3-methoxypyridine using the protocol B.

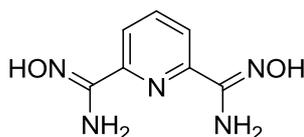
The mixture was heated for 16 hours. After work-up the compound was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (40/60) as eluent to give the desired compound as a beige solid (94 mg, 56%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 3.90 (s, 3H), 7.43 (dd, 1H,  $J=8$  Hz,  $J=4$  Hz), 7.55 (dd, 1H,  $J=1.5$  Hz,  $J=8$  Hz), 8.15 (dd, 1H,  $J=4$  Hz)

**<sup>13</sup>C N.M.R** (50MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 56.3, 121.3, 126.7, 141.3, 152.9, 156.1.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) 3191, 1652, 1579, 1463, 1432, 1277, 940.

**M.S** m/z (ESI) 168 [M+H]<sup>+</sup>.

**Pyridine-2,6-diamidoxime 64**

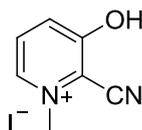
The mixture was heated for 2 hours. The compound precipitated during the reaction, and was filtered at room temperature. 185 mg of white solid were obtained (95%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  : 6.28 (s broad, 4H), 7.76-7.85 (m, 3H), 9.84 (s, 2H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (50 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  : 118.2, 136.7, 149.0, 149.6.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3089, 2749, 1652, 1633, 1587, 1557, 1477.

**M.S** m/z (ESI) = 196 [M]<sup>+</sup>.

**N-Methyl-2-cyano-3-hydroxypyridine iodide 67**

2-cyano-3-hydroxypyridine (1.00 g, 8.33 mmol) and methyl iodide (1.6 mL, 25 mmol) were refluxed in methanol (10 mL) for 16 hours. The solvent was removed in vacuum. The

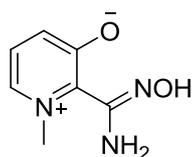
crude was purified by column chromatography on silica gel using DCM/MeOH (95/5) as eluent to produce 968 mg of pure compound as an orange powder (44%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 4.27 (s, 3H), 7.48 (d, 1H, J= 10Hz), 7.59 (dd, 1H, J= 5Hz, J= 10Hz), 7.88 (d, 1H, J= 5Hz).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 47.0, 114.3, 128.1, 129.9, 130.0, 137.6, 170.3.

**M.S** m/z (ESI) = 135 [M]<sup>+</sup>

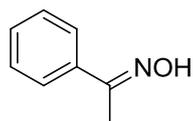
### N-methyl-3-hydroxy-2-pyridylamidoxime iodide 65



N-methyl-2-cyano-3-hydroxypyridine iodide (221 mg, 0.84 mmol) and hydroxylamine (50% wt in H<sub>2</sub>O, 5eq ) in methanol were refluxed for 18 hours. The reaction mixture was allowed to cool down at room temperature and was extracted with ethyl acetate, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After removal of the solvent the compound was purified by column chromatography on silica gel using DCM/MeOH (90/10) as eluent. 62 mg of pale orange compound were obtained (45%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, DMSO-*d*6) δ : 3.95 (s, 3H), 5.90 (s broad, 2H), 6.95 (d, 1H, J= 9Hz), 7.23 (dd, 1H, J= 9Hz, J=5 Hz), 7.33 (d, 1H, J= 5Hz).

**M.S** m/z (ESI) =168 [M+H]<sup>+</sup>.

**Acetophenone oxime 68**

Acetophenone oxime was obtained from acetaldehyde using protocol A.

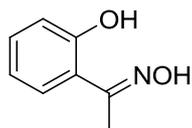
The mixture was heated for 16 hours and then was allowed to cool down to room temperature. The compound was extracted with ethyl acetate, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the solvent was removed. 135 mg of pure compound were obtained (100%).

**$^1\text{H N.M.R}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 2.23 (s, 3H), 7.34-7.36 (m, 3H), 7.61-7.64 (m, 2H).

**$^{13}\text{C N.M.R}$**  (75 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 12.1, 127.0, 129.3, 129.8, 138.5, 156.1.

**I.R** ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 3205, 2350, 1444, 1364.

**M.S**  $m/z$  (ESI) 136  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**2-Hydroxyacetophenone oxime 69**

2-hydroxyacetophenone oxime was obtained from 2-hydroxyacetophenone using protocole A.

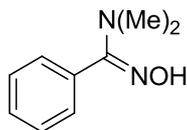
The mixture was heated for 16 hours and then was allowed to cool down to  $0^\circ\text{C}$ . The precipitate was collected by filtration and washed with cold water. 118 mg of white powder were obtained (78%).

**$^1\text{H N.M.R}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 2.31 (s, 3H), 6.87 (td, 2H,  $J=8\text{Hz}$ ,  $J=1.5\text{Hz}$ ), 7.20 (td, 1H,  $J=8\text{Hz}$ ,  $J=1.5\text{Hz}$ ), 7.47 (dd, 1H,  $J=8\text{Hz}$ ,  $J=1.5\text{Hz}$ ).

**$^{13}\text{C N.M.R}$**  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 10.6, 117.7, 120.0, 120.4, 128.6, 131.1, 158.9, 160.0.

**I.R** ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 3323, 1633, 1589, 1252

**M.S**  $m/z$  (ESI) = 152  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

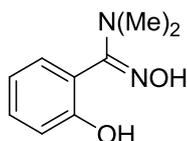
**N'-Hydroxy-N,N-dimethylbenzimidamide 70**

To a solution of benzaldoxime (300 mg, 2.5 mmol) in  $\text{CHCl}_3$  (2 mL) was added pyridine (20  $\mu\text{L}$ , 0.25 mmol). The temperature was raised to  $40^\circ\text{C}$  and N-chlorosuccinimide (365 mg, 2.73 mmol) was added to the resulting solution. Stirring was continued at this temperature for 3 hours before the reaction mixture was diluted by DCM (20 mL). The organic layer was washed by water (2x10 mL) and brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and concentrated under reduced pressure to afford the chlorinated oxime. The compound was dissolved in  $\text{Et}_2\text{O}$  (3 mL) and the temperature was raised to  $70^\circ\text{C}$ . Dimethylamine 2M in THF (2.6 mL, 5.14 mmol) was added. The reaction mixture was allowed to cool down to room temperature and was stirred for 16 hours. The reaction mixture was poured into ice and the compound was extracted with dichloromethane. The compound was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (60/40) as eluent to give 205 mg of beige solid (50% for two steps).

**$^1\text{H N.M.R}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 2.23 (s, 3H), 7.35 (m, 3H), 7.63 (m, 3H).

**$^{13}\text{C N.M.R}$**  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 10.6, 117.7, 120.0, 120.4, 128.6, 131.1, 158.9, 159.0.

**M.S**  $m/z$  (ESI) = 165  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**N',2-Dihydroxy-N,N-dimethylbenzimidamide 71**

To a solution of 2-hydroxybenzaldoxime (203 mg, 1.5 mmol) in  $\text{CHCl}_3$  (2 mL) was added pyridine (12  $\mu\text{L}$ , 0.15 mmol). The temperature was raised to  $40^\circ\text{C}$  and N-chlorosuccinimide (217 mg, 1.63 mmol) was added to the resulting solution. Stirring was continued at this temperature for 3 hours before the reaction mixture was diluted by DCM (15 mL). The organic layer was washed by water (2x10 mL) and brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and concentrated under reduced pressure to afford the chlorinated oxime. The compound was dissolved in  $\text{Et}_2\text{O}$  (2 mL) and the temperature was raised to  $70^\circ\text{C}$ . Dimethylamine 2M in THF (1.7 mL, 3.5 mmol) was added. The reaction mixture was allowed to cool down to

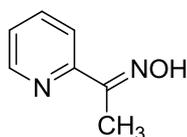
room temperature and was stirred for 16 hours. The reaction mixture was poured into ice and the compound was extracted with dichloromethane. The compound was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (60/40) to give 148 mg of beige solid (55% for two steps).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OH) δ : 2.71 (s, 6H), 6.90 (t, 2H, *J* = 8 Hz), 7.11 (d, 1H, *J* = 8 Hz), 7.26 (t, 2H, *J* = 8 Hz).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 39.3, 117.6, 120.7, 120.8, 130.8, 131.7, 156.0, 162.0.

**M.S** *m/z* (ESI) = 181 [M+H]<sup>+</sup>.

### 1-(pyridin-2-yl)ethanone oxime 73



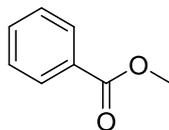
1-(pyridin-2-yl)ethanone oxime was obtained from 1-(pyridin-2-yl)ethanone using protocol A.

The mixture was heated for 8 hours and then was allowed to cool down to room temperature. After work-up the crude was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (10/90) to give 109 mg of the desired compound (80%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 2.27 (s, 3H), 7.33 (t, 1H, *J* = 5Hz), 7.76 (t, 1H, *J* = 8Hz), 7.87 (d, 1H, *J* = 8Hz), 8.52 (d, 1H, *J* = 5Hz).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 10.7, 121.8, 124.7, 137.9, 149.6, 156.2, 156.4.

**M.S** *m/z* (ESI) = 137 [M+H]<sup>+</sup>.

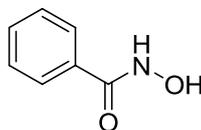
**Methylbenzoate 79**

Benzoic acid (500 mg, 4.09 mmol) was dissolved in MeOH (16 mL). Concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.5 mL) was added and the mixture was refluxed for 24 hours. After cooling to room temperature, the mixture was concentrated, diluted in H<sub>2</sub>O (10 mL) and neutralized with addition of solid K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The solution was extracted with EtOAc (2×20 mL), the organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated to give the desired product as a low melting point solid (396 mg, 71%)

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 3.92 (s, 3H), 7.44 (td, 2H, *J* = 8 Hz, *J* = 1.5 Hz), 7.56 (tt, 1H, *J* = 8 Hz, *J* = 1.5 Hz), 8.04 (dd, 1H, *J* = 8 Hz, *J* = 1.5 Hz).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 52.2, 128.5, 129.7, 130.3, 133.0, 167.2

**M.S** m/z (ESI) = 137 [M+H<sup>+</sup>].

**Methyl benzoic hydroxamic acid 76**

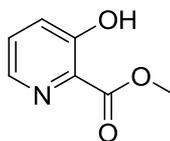
Methyl benzoate **79** (300 mg, 1.95 mmol) was dissolved in a mixture of THF-MeOH (3 mL-3 mL). 50% aqueous hydroxylamine solution (1.2 mL) and KCN (36 mg, 0.53 mmol) were added to the solution and the mixture was stirred at room temperature overnight. After adding citric acid 10% (40 mL) the mixture was extracted with EtOAc (2×40 mL). The organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated to give the desired product (80 mg, 30%)

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 7.46 (tt, 2H, *J* = 8 Hz, *J* = 1.5 Hz), 7.54 (tt, 1H, *J* = 8 Hz, *J* = 1.5 Hz), 7.74 (dt, 2H, *J* = 8 Hz, *J* = 1.5 Hz).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 128.0, 129.6, 132.7, 133.5, 168.2.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>): 3287, 3053, 2727, 2444, 1642, 1601, 1549.

**M.S** m/z (ESI) = 138 [M+H<sup>+</sup>].

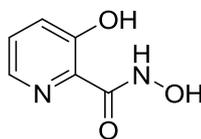
**Methyl-3-hydroxypicolinate 80**

3-hydroxy-picolinic acid (500 mg, 3.6 mmol) was dissolved in MeOH (16 mL). Concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 mL) was added and the mixture was refluxed for 24 hours. After cooling to room temperature, the mixture was concentrated, diluted in H<sub>2</sub>O (10 mL) and neutralized with addition of solid K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The solution was extracted with EtOAc (2×20 mL), the organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated to give 247 mg of white solid, as the desired product (45%)

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 4.05 (s, 3H), 7.35-7.45 (m, 2H), 2.27 (dd, 1H, *J*= 2 Hz, *J*= 4 Hz), 10.63 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 53.3, 126.3, 129.8, 130.1, 141.6, 158.9, 170.0.

**M.S** *m/z* (ESI) = 154 [M+H]<sup>+</sup>.

**Methyl 3-hydroxypicolinic hydroxamic acid 78**

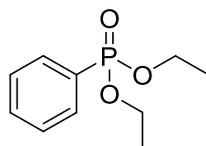
Methyl 3-hydroxypicolinate **80** (150 mg, 0.98 mmol) was dissolved in a mixture of THF-MeOH (1.5 ml-1.5 mL). 50% aqueous hydroxylamine solution (0.6 mL, 9.8 mmol) and KCN (13 mg, 0.19 mmol) were added to the solution and the mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was concentrated and citric acid 10% (20 mL) was added to the crude product. is extracted with EtOAc (2×20 mL). The organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrated and chromatographed on silica gel with cyclohexane/ethyl acetate (50/50) as eluent. 30 mg of beige solid were obtained as the desired compound (20%)

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 7.38 (dd, 1H, *J*= 8 Hz, *J*= 1 Hz), 7.46 (dd, 1H, *J*= 8 Hz, *J*= 4 Hz), 8.11 (dd, 1H, *J*= 4 Hz, *J*= 1Hz)

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 127.6, 129.8, 131.9, 149.5, 158.3, 166.5.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 3300-2700 (broad), 1661, 1634, 1519, 1443.

**M.S**  $m/z$  (ESI) = 155 [M+H<sup>+</sup>].

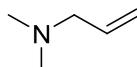
**Diethyl pyridine-2-ylmethyleneaminoxyphosphonate 81****General procedure**

A highly flame dried flask was filled with oxime (0.071 gm, 17 mmol) and solvent (4 ml) under argon at 0 °C. The reaction mixture was stirred, added phosphorous reagent (0.083 ml, 17 mmol) followed by corresponding base as required quantity at same temperature. The reaction mixture was stirred for required time as mentioned in tables. The reaction mixture was directly concentrated at rotary evaporator under argon. Then applied vacuum under argon for 30 min (when triethyl amine was used, the crude residue was dissolved in ether and filtered followed by concentrated before applying vacuum). Then analysis was performed. Compound 30 was colorless oil at r.t and solid at -20 °C. In all reactions crude compound was obtained quantitatively. In tables the yield was calculated by measuring peak areas and <sup>31</sup>P NMR spectra recorded with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> calibration at 0 ppm.

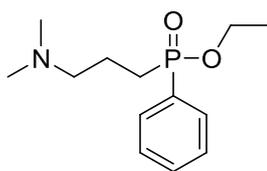
<sup>1</sup>H N.M.R (200 MHz, DMSO-*d*6) δ : 8.7 (d, *J* = 6 Hz, 1H), 7.91-7.69 (m, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.36 (d, *J* = 8Hz, 1H), 7.33-7.22 (m, 1H), 3.55-3.25 (m, 4H), 0.69-.54 (m, 6H) , 1.

<sup>13</sup>C N.M.R (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 148.7, 147.8, 144.9, 143.9, 128.4, 126.7, 67.8 (2C), 17.1 (2C). KSR215-2008, 125.

<sup>31</sup>P N.M.R (75 MHz, DMSO-*d*6) δ : 13.23.

**N,N-diisopropylprop-2-en-1-amine 82**

A two neck round bottomed flask was charged with diisopropyl amine (10 g, 100 mmol) in dry THF (200 ml) was added NaH (4.7 gm, 100 mmol), allylbromide (8.3 ml, 100 mmol) at 0 °C and the reaction mixture was allowed to r.t followed by reflux for 20 h. The reaction mixture was brought to 0 °C and quench with ice water. The reaction mixture extracted with ethyl acetate, dried and concentrated followed by cool water circulated distillation of the crude oil gives pure allylamine (9.2 gm, 66%) as colorless oil.

**Ethyl 3-(dimethylamino)propyl(phenyl)phosphinate 84**

To a stirred solution of N,N-diisopropylprop-2-en-1-amine **82** (0.49 gm, 25 mmol) in anhydrous benzene (20 mL) and AMBN (0.11 gm, 2.5 mmol) was added ethyl phenylphosphinate (1.0 gm, 25 mmol) at room temperature under argon. The reaction mixture was stirred under reflux conditions at 80 °C for 16 h. The reaction mixture was allowed to room temperature, evaporation of the solvent followed by neutral alumina column chromatography using MeOH/DCM (from 2/98 to 4/96) as eluent furnished compound the desired compound (1.21 gm, 81%) as a yellow oil.

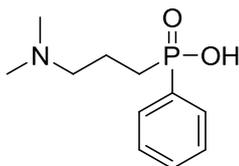
**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 7.79 - 7.72 (m, 2H), 7.52 - 7.44 (m, 3H), 4.13 – 3.75 (m, 2H), 2.26 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.14 (s, 6H), 1.97 - 1.63 (m, 4H), 1.26 (t, J = 7.2 Hz, 3H)

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 131.85, 131.81, 131.33, 131.20, 129.88, 128.35, 128.18, 60.16, 60.07, 59.61, 59.39, 44.90, 27.72, 26.37, 19.56, 16.23, 16.15.

**<sup>31</sup>P N.M.R** (81 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 45.1

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 2976, 2936, 2765, 2360, 2341, 1458, 1438, 1218, 1120, 1026.

**M.S** m/z (ESI) = 256 [M]<sup>+</sup>.

**3-(Dimethylamino)propyl(phenyl)phosphinic acid 85**

To a stirred solution of compound ethyl 3-(dimethylamino)propyl(phenyl)phosphinate **84** (0.50 g, 25 mmol) in anhydrous DCM (10 mL) was added trimethylsilylbromide (0.98 g, 100 mmol) at room temperature under argon and continued stirring for 18 h at room temperature. The reaction mixture was concentrated and added methanol (7.5 ml), stirred for 1 h at room temperature followed by solvent evaporation gives crude residue. The residue was subjected to column chromatography on neutral alumina using MeOH/DCM (5/95 to 15/85) as eluent furnished the desired compound (0.351 gm, 78%) as a white solid.

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 7.84 - 7.76 (m, 2H), 7.47 - 7.44 (m, 3H), 3.17 – 3.10 (m, 2H), 2.82 (s, 6H), 1.92 - 1.75 (m, 4H)

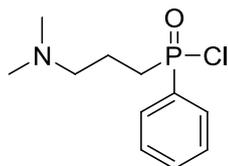
$^{13}\text{C}$  N.M.R (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 132.19, 130.77, 130.62, 128.46, 128.28, 57.52, 57.30, 41.96, 27.01, 25.68, 17.36.

$^{31}\text{P}$  N.M.R (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 39.2

I.R ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2952, 2678, 2264, 1476, 1438, 1215, 1129.

M.S  $m/z$  (ESI) = 228  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

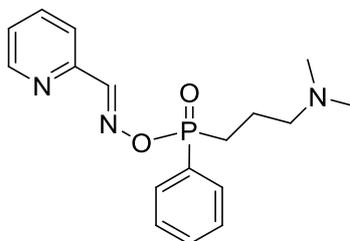
### 3-(Dimethylamino)propyl(phenyl)phosphinic chloride **86**



3-(dimethylamino)propyl(phenyl)phosphinic acid **85** (0.150 g, 10 mmol) was dissolved in dry DCM (10 mL) and added oxalylchloride (0.39 ml, 70 mmol), dry DMF (4.5  $\mu\text{l}$ , 1 mmol) at  $0^\circ\text{C}$ , under argon. The reaction mixture was allowed to room temperature and continued stirring for 10 hours. The solvent was evaporated which gives the desired compound as a yellow oil which was used without purification.

$^{31}\text{P}$  N.M.R (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 50.2.

### Picolinaldehyde O-(3-(dimethylamino)propyl)(phenyl)phosphoryl oxime **87**



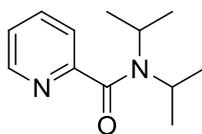
#### General procedure

A highly flame dried flask was filled with chlorinated compound **11** (0.050 gm, 5 mmol) in solvent (2 ml) under argon at room temperature. The reaction mixture was stirred, added oxime (0.029 gm, 6 mmol) followed by corresponding base as required quantity at same temperature. The reaction mixture was stirred for 13 h, directly concentrated at rotary evaporator and applied vacuum under argon for 15 min. Analysis of crude black solid was performed. In all reactions quantitative yield was obtained. During the mass analysis the N-O-P compound cleaved to POH compound.

**<sup>1</sup>H N.M.R** (200 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  : 8.78 – 8.71 (m, 2H), 8.21 (s, 1H), 8.08 – 7.99 (m, 2H), 7.80 – 7.47 (m, 5H), 3.04 – 2.90 (t,  $J = 12.8, 16.2$  Hz, 2H), 2.68 (s, 6H), 1.89 – 1.73 (m, 4H)

**<sup>13</sup>C N.M.R** (100 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  : 155.93, 150.57, 138.16, 137.39, 131.62, 131.02, 130.07, 128.40, 127.73, 127.26, 116.99, 116.45, 56.18, 41.71, 16.34, 9.04

**<sup>31</sup>P N.M.R** (81 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  : 37.8.

**N,N-diisopropyl-2-pyridinecarboxamide 89**

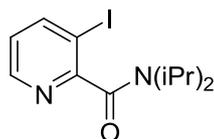
Picolinic acid (10.10 g, 82 mmol) and thionyl chloride (23 mL, 0.31 mol) were refluxed for 2 hours. Excess of  $\text{SOCl}_2$  was removed by vacuum distillation to leave a burgundy solid. To this was added DCM (150 mL) and the mixture was cooled at  $0^\circ\text{C}$ . Diisopropylamine (40 mL, 0.31 mol) was added dropwise and the reaction mixture was refluxed for 90 minutes. The solvent was removed and the crude compound was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (from 20/80 to 0/100). The compound was finally recrystallized from heptane to give 10.99 g of a whitish solid (65%).

$^1\text{H N.M.R}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 1.18 (d, 6H,  $J=6\text{Hz}$ ), 1.56 (d, 6H,  $J=6\text{Hz}$ ), 3.55 (sept, 1H,  $J=6\text{Hz}$ ), 3.84 (sept, 1H,  $J=6\text{Hz}$ ), 7.28 (dd, 1H,  $J=6\text{Hz}$ ).

$^{13}\text{C N.M.R}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  20.6, 20.8, 46.1, 50.8, 122.0, 123.6, 137.0, 148.8, 156.7, 168.8.

**I.R** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2974, 1628, 1368, 1347.

**M.S**  $m/z$  (ESI)= 207 [M+H].

**3-Iodo- N,N-diisopropyl-2-pyridinecarboxamide 90**

$s\text{-BuLi}$  (42 mL, 58.8 mmol) was slowly added to a cold solution of N,N-diisopropyl-2-pyridinecarboxamide **89** (6.06g, 29.4 mmol) and TMEDA (8.8mL, 58.7 mmol) in anhydride THF (150mL). The resulting solution was stirred 2 hours at  $-75^\circ\text{C}$  before addition of iodine (15 g, 59 mmol) in THF (60 ml) *via* a cannula. Stirring was continued for 2 hours at  $-75^\circ\text{C}$  and 1 hour at  $-20^\circ\text{C}$ , before hydrolysis by  $\text{H}_2\text{O}$  (75 mL), further addition of  $\text{H}_2\text{O}$  (150mL) at  $0^\circ\text{C}$  and reductive workup with solid  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (15g). Extraction with  $\text{Et}_2\text{O}$  ( $3 \times 225\text{mL}$ ), drying over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and removal of the solvent afforded a crude solid that was purified by recrystallization from acetone (62%).

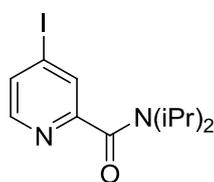
**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.21 (d, 6H, *J* = 6Hz), 1.60 (d, 6H, *J* = 6Hz), 3.45 (sept, 1H, <sup>3</sup>*J* = 6Hz), 3.55 (sept, 1H, *J* = 6Hz), 7.01 (dd, 1H, *J* = 5Hz, *J* = 8Hz), 8.11 (dd, 1H, *J* = 1.5Hz, *J* = 8Hz), 8.53 (dd, 1H, *J* = 1.5Hz, *J* = 5Hz).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 20.3, 20.8, 46.2, 51.2, 89.8, 124.4, 146.8, 148.5, 159.5, 167.9.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>): 3451, 1627, 1476, 1374, 1342.

**M.S** *m/z* (ESI) = 333 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 4-Iodo-N,N-diisopropyl-2-pyridinecarboxamide **91**



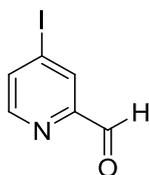
Lithium diisopropylamide (LDA) was prepared by reaction of (i-Pr)<sub>2</sub>NH (5.3 mL, 38 mmol) in THF (100 mL) with *n*-BuLi (24 mL, 38 mmol) at -75°C for 15 min. 3-iodo- N,N-diisopropyl-2-pyridinecarboxamide **90** (6.25 g, 19 mmol) in THF (200 mL) was slowly added to the cold (-75 °C) solution of LDA. The resulting mixture was stirred for 1 hour at -75°C before the slow addition of H<sub>2</sub>O (10 mL). The mixture was allowed to warm up to room temperature before further addition of H<sub>2</sub>O (100mL). Extraction with Et<sub>2</sub>O (3×150 mL), drying over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and removal of the solvent afforded a crude product, which was purified by flash chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (from 80/20 to 30/70) as eluent to give 5.3 g of orange solid as the pure compound (85%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.18 (d, 6H, *J* = 6Hz), 1.53 (d, 6H, *J* = 6Hz), 3.54 (sept, 1H, *J* = 6Hz), 3.81 (sept, 1H, *J* = 6Hz), 7.66 (dd, 1H, *J* = 5Hz, *J* = 1.5Hz), 7.83 (d, 1H, *J* = 1.5Hz), 8.20 (d, 1H, *J* = 5Hz).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 20.8, 21.1, 46.6, 51.2, 106.5, 131.8, 133.3, 149.2, 157.3, 167.5.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 2966, 1631, 1539, 1442, 1331.

**M.S** *m/z* (ESI) = 333 [M+H]<sup>+</sup>.

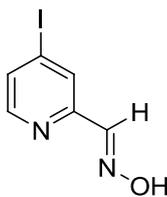
**4-Iodo- 2-pyridinecarboxaldehyde 92**

4-iodo-N,N-diisopropyl-2-pyridinecarboxamide **91** (500 mg, 1.5 mmol) was dissolved in THF (15 mL) under nitrogen atmosphere and then cooled to  $-78^{\circ}\text{C}$ . Diisobutylaluminium hydride 1M in hexane (2.25 mL, 2.25 mmol) was added dropwise via syringe, the mixture turned to a yellow color. After 15 minutes, the cold bath was removed, and the reaction was allowed to come to room temperature, going from a yellow to an orange solution. The reaction was followed by TLC, after 45 minutes at room temperature; the reaction was quenched by HCl 1N and diluted with ethyl acetate. The aqueous layer was extracted once with ethyl acetate. The aqueous layer was neutralized by a solution of NaOH 1N and extracted with DCM. The organic layer was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under reduced pressure. The resulting white solid was used without further purification (quant.).

$^1\text{H N.M.R}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 7.87-7.89 (m, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.41 (d, 1H,  $J=5$  Hz), 9.98 (s, 1H).

$^{13}\text{C N.M.R}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 131.4, 137.2, 150.7, 153.2, 162.7, 192.4.

**M.S**  $m/z$  (ESI) = 234  $[\text{M}+\text{H}]^+$

**4-Iodo- 2-pyridinecarboxaloxime 93**

Hydroxylamine hydrochloride (417 mg, 6 mmol) and  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (317 g, 3 mmol) were mixed together in water (5 mL) until the solids dissolved and the gas emission stopped. This aqueous solution was added to 4-iodo-2-pyridinecarboxaldehyde **92** (396 mg, 1.5 mmol) in absolute ethanol (1 ml). The mixture was heated at  $70^{\circ}\text{C}$  for 16 hours. The reaction mixture was allowed to cool down to room temperature. The brownish solid was filtered and was purified by flash chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (30/70) as eluent to give 193 mg of white solid (52%).

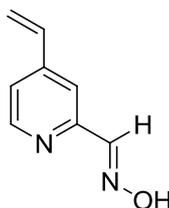
$^1\text{H N.M.R}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 7.78 (dd, 1H,  $J=3$  Hz,  $J=6$  Hz), 8.01 (s, 1H), 8.20 (d, 1H,  $J=6$ Hz), 8.24 (d, 1H,  $J=3$  Hz).

$^{13}\text{C N.M.R}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 107.2, 130.9, 134.3, 148.4, 150.5, 154.4.

**M.S**  $m/z$  (ESI) = 249  $[\text{M}+\text{H}]^+$

**I.R** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3167, 3105, 3000, 2880, 2794, 1574, 1503, 1361, 1317, 1209.

#### 4-Ethenyl- 2-pyridinecarboxaldoxime **94**



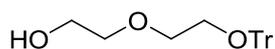
4-iodo- 2-pyridinecarboxaldoxime **93** (61.6 mg / 0.25 mmol) was dissolved in dry THF (4 mL), *tert*-butyl tin (80  $\mu\text{L}$  / 0.275 mmol),  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (35 mg, 0.03 mmol),  $\text{CuI}$  (6 mg/ 0.03 mmol) and  $\text{CsF}$  (76 mg, 0.5 mmol) were added to the solution. The mixture was heated at  $80^\circ\text{C}$ , under argon, for 16 hours. The reaction mixture was allowed to cool down to room temperature and was filtered through celite. The solvent was removed under vacuum and the crude compound was purified by flash chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (from 80/20 to 70/30) as eluent. 16 mg of white solid were obtained (43%)

$^1\text{H N.M.R}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 5.55 (d, 1H,  $J=11$  Hz), 6.10 (d,  $J=17.6$  Hz, 1H), 6.76 (dd, 1H,  $J= 11$  Hz,  $J= 18\text{Hz}$ ), 7.42 (d, 1H,  $J= 5$  Hz), 7.88 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.45 (d, 1H,  $J= 5$  Hz,).

$^{13}\text{C N.M.R}$  (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 119.7, 121.2, 123.0, 136.4, 148.5, 150.2, 151.2, 154.8 .

**I.R** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2943, 2671, 2460, 2359, 2099, 1948, 1663, 1459, 1438, 1236.

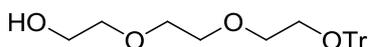
**M.S**  $m/z$  (ESI)=149  $[\text{M}+\text{H}]^+$

**7,7,7-Triphenyl-3,6-dioxaheptanol 95**

Trityl chloride (10.35 g, 37 mmol) was added to a solution of diethylene glycol (59 g, 0.56 mol) and pyridine (4.5 mL, 56 mmol) under vigorous stirring. The mixture was then heated at 45°C under argon atmosphere for 16 hours meanwhile a precipitate had formed. The mixture was extracted with toluene (3x50 mL). The combined organic layers were washed with H<sub>2</sub>O and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The toluene was removed under reduced pressure. The crude compound was purified by crystallization, first from DCM, and then from a mixture of ethyl acetate and hexane to give 8.4 g of white crystalline solid (65%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 3.23 (t, 2H, *J*= 5 Hz), 3.58-3.61 (m, 2H), 3.64 (t, 2H, *J*= 5 Hz), 3.69-3.75 (m, 2H), 7.17-7.43 (m, 15H).

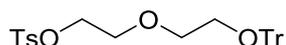
**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 62.0, 63.5, 70.8, 72.4, 86.8, 127.2, 128.0, 128.9, 144.2

**10,10,10-Triphenyl-3,6,9-trioxadecanol 96**

The compound was prepared as described for diethylene glycol. After the reaction was finished the mixture was poured in a separatory funnel and an equal volume of water was added. The mixture was shaken vigorously and allowed to settle for 2 hours. The orange bottom layer was extracted from the aqueous layer and the aqueous solution was extracted with toluene. The combined organic layers were washed with H<sub>2</sub>O and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The toluene was removed under reduced pressure to obtain the compound in 97% yield as yellowish oil. The product was used without further purification.

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 3.22 (t, 2H, *J*= 5 Hz), 3.58 - 3.70 (m, 10H), 7.17-7.45 (m, 15H).

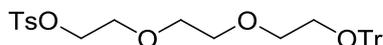
**<sup>13</sup>C N.M.R** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 61.9, 63.4, 70.7, 70.8, 70.9, 72.6, 86.7, 127.1, 127.9, 128.8, 144.2.

**Tosyloxy-7,7,7-triphenyl-3,6-dioxaheptane 97**

A solution of 7,7,7-triphenyl-3,6-dioxaheptanol **95** (1.56 g, 4.47 mmol) and Et<sub>3</sub>N (2.1 mL, 15 mmol) in DCM (8 mL) under argon atmosphere was cooled at 0°C. A solution of tosyl chloride (0.9 mL, 4.78 mmol) in DCM (7 mL) was added dropwise. The mixture was allowed to stir overnight at room temperature. The solution was washed with saturated K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution (2× 5 mL) and H<sub>2</sub>O (5 mL). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was removed to give the crude compound, which was purified by column chromatography using cyclohexane /ethyl acetate (60/40) as eluent. 1.78g of a white solid were obtained (80%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 2.40 (s, 3H), 3.17 (t, 2H, *J*= 5 Hz), 3.56-3.70 (m, 8H), 4.17 (t, 2H, *J*= 5 Hz), 7.19-7.45 (m, 17H), 7.81 (d, 2H, *J*=5 Hz)

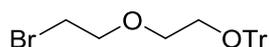
**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 21.4, 63.2, 68.6, 69.3, 70.6, 86.5, 126.9, 127.7, 128.6, 129.7, 133.0, 143.9, 144.6, 146.9

**Tosyloxy-10,10,10-triphenyl-3,6,9-trioxadecane 98**

The compound was prepared as described for 1-osyloxy-7,7,7-triphenyl-3,6-dioxaheptane **96**. After purification pure compound was obtained as a yellow oil (75%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 2.39 (s, 3H), 3.18 (t, 2H, *J*= 5 Hz), 3.60 (t, 2H, *J*= 5 Hz), 3.73 (t, 2H, *J*= 5 Hz), 4.19 (t, 2H, *J*= 5 Hz), 7.23-7.45 (m, 17H), 7.80 (d, 2H, *J*=5 Hz)

**<sup>13</sup>C N.M.R** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 21.2, 62.1, 68.7, 69.8, 70.5, 70.6, 71.9, 86.5, 126.9, 127.9, 128.5, 129.5, 132.9, 143, 4, 144.5, .147.0.

**Bromo-7,7,7-triphenyl-3,6-dioxaheptane 99**

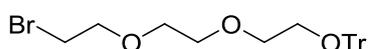
To LiBr (1.74 g, 20 mmol) dissolved in 20 mL of acetone p.a., tosyloxy-7,7,7-triphenyl-3,6-dioxaheptane **97** (422 mg, 1.8 mmol) in 2 mL acetone was added. The mixture was heated at 80°C for 5 hours, and then was allowed to stir overnight at room temperature. The solvent was removed and chloroform was added to the resulting mixture in order to

remove the white precipitate. The filtrate was washed with H<sub>2</sub>O (2 times) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After removal of the solvent, the compound was purified by column chromatography using cyclohexane /ethyl acetate (60/40) as eluent. 232 mg of desired compound were collected (85%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 3.25 (t, 2H, *J*= 5 Hz), 3.49 (t, 2H, *J*= 6 Hz), 3.69 (t, 2H, *J*= 5 Hz), 3.85 (t, 2H, *J*= 6 Hz), 7.23-7.48 (m, 15H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 21.3, 30.7, 63.2, 70.4, 71.2, 86.5, 126.9, 127.8, 128.6, 133.1, 143.6, 144.6, 147.0.

### Bromo-10,10,10-triphenyl-3,6,9-trioxadecane 100

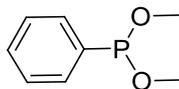


The compound was prepared as described for 1-bromo-7,7,7-triphenyl-3,6-dioxaheptane. After purification, 720 mg of pure compound were obtained (88%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.25 (t, 2H, *J*= 4Hz), 3.46 (t, 2H, *J*= 6 Hz), 3.66-3.73 (m, 6H), 3.84 (t, 2H, *J*= 6 Hz), 7.22-7.50 (m, 15H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 30.5, 63.5, 70.9, 71.4, 86.7, 99.7, 99.9, 127.1, 127.9, 128.9, 144.3.

### Dimethyl phenylphosphonite 101



To a solution of 39 mL (0.28 mmol) of dichloro(phenyl)phosphonite in 150 mL of anhydrous hexane was added pyridine 48 mL (0.59 mmol). Then the solution was cooled to 0°C and a solution of 23 mL (0.56 mL) of MeOH and 8 mL of hexane was slowly added within 1 h. Stirring was continued for an additional hour. Then, the precipitate solid was filtered off and the filtrate was evaporated. Distillation of the residual oily liquid gave 36.7 g (77%) of a colourless oily liquid (b.p. 56-58°C, 2.0 10<sup>-1</sup> mbar).

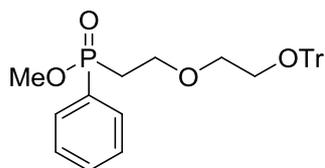
**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 3.58 (d, 6H, *J*= 11 Hz), 7.41-7.43 (m, 3H), 7.62-7.57 (m, 2H)

<sup>13</sup>C N.M.R (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 54.1, 128.3 (d, J<sub>p-c</sub>= 5 Hz), 129.5, 129.9 (d, J<sub>p-c</sub>= 11 Hz), 140.4 (d, J<sub>p-c</sub>= 10 Hz).

<sup>31</sup>P N.M.R (81 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 161.

M.S m/z (ESI) = 170 [M]<sup>+</sup>

### Mehtyl phenyl(2-(2-(trityloxy)ethoxy)ethyl)phosphinate 102

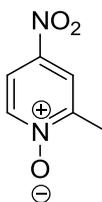


A mixture of 161 mg (1 mmol) dimethyl phenylphosponite **101** and 196 mg (0.5 mmol) of bromo-7,7,7-triphenyl-3,6-dioxahseptane **99** was heated at 160°C under vacuum (13 mbar) for 8 hours. The remaining material was purified by column chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (50/50) as eluent. 161 mg of oily liquid were obtained as the pure compound (66%)

<sup>1</sup>H N.M.R (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 2.31-2.40 (m, 1H), 3.09 (t, 2H, J= 6 Hz), 3.21 (t, 2H, J= 6 Hz), 3.47 (t, 2H, J= 6 Hz), 3.67-3.70 (m, 3H), 7.42-7.70 (m, 18H), 7.75-7.81 (m, 2H).

<sup>13</sup>C N.M.R (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 31.5 (d, J<sub>p-c</sub>= 600 Hz), 63.3 (d, J<sub>p-c</sub>= 33 Hz), 63.7 (d, J<sub>p-c</sub>= 27 Hz), 64.8, 70.3, 86.5, 127.1, 127.9, 128.2, 131.7 (d, J<sub>p-c</sub>= 39 Hz), 132.1, 132.4 (d, J<sub>p-c</sub>= 6 Hz) 144.2.

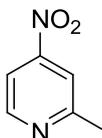
<sup>31</sup>P N.M.R (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 43.6

**4-Nitro-2-picoline N-oxide 103**

To a mixture of 2-picoline-N-oxide (8.53 g, 78.2 mmol) and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (30 mL), fuming HNO<sub>3</sub> (24 mL) was added portionwise at below 10°C. After the addition was completed, the mixture was heated to 100-105°C and stirred for 2 hours. After cooling to room temperature, the resulting mixture was poured into crushed ice, neutralized with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, and extracted with CH<sub>3</sub>Cl. The extract was washed with brine, dried and the solvent was evaporated to dryness to give the product as a pale yellow solid (9.85 g, 81%).

<sup>1</sup>H N.M.R (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 2.56 (s, 3H), 7.99 (dd, 1H, *J*= 3Hz, *J*= 7Hz), 8.13 (d, 1H, *J*= 3Hz), 8.31 (d, 1H, *J*= 7Hz).

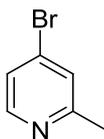
<sup>13</sup>C N.M.R (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 18.2, 118.2, 120.8, 140.2, 150.8.

**4-Nitro-2-picoline 104**

To a solution of 4-nitro-2-picoline-N-oxide **103** (3.89 g, 25.3 mmol) in CH<sub>3</sub>Cl (55 mL) a solution of PCl<sub>3</sub> (8.8 mL, 101 mmol) in CH<sub>3</sub>Cl (55 mL) was added dropwise with ice-water cooling under N<sub>2</sub> atmosphere. After the addition was completed, the solutions was stirred at room temperature for 6 hours, poured into crushed ice, and neutralized with aqueous ammonia. The organic layer was separated and the aqueous layer was further extracted with CH<sub>3</sub>Cl. The combined extract was washed with brine, dried, and the solvent was evaporated to dryness to give the product as a yellow solid (3.16 g, 90%).

<sup>1</sup>H N.M.R (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 2.73 (s, 3H), 7.83 (dd, 1H, *J*= 2Hz, *J*= 5Hz), 7.88 (d, 1H, *J*= 2Hz), 8.80 (d, 1H, *J*= 5Hz).

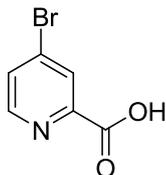
<sup>13</sup>C N.M.R (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 24.8, 113.5, 115.8, 151.5, 162.0.

**4-Bromo-2-picoline 105**

4-nitro-2-picoline **104** (2.19 g, 16 mmol) and acetyl bromide (3.5 mL, 47.6 mmol), slow addition, were refluxed together until the gas emission stopped. The resulting mixture was allowed to cool to room temperature before addition of H<sub>2</sub>O (5 mL) and NH<sub>4</sub>OH to basify the media. The mixture was extracted with Et<sub>2</sub>O. The combined organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was removed under vacuum (the compound is quite volatile). The crude was used without further purification. 1.75 g of liquid compound were obtained (64%)

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 2.54 (s, 3H), 7.27 (dd, 1H, *J*= 1.5 Hz, *J*= 6 Hz), 7.35 (d, 1H, *J*= 1.5Hz), 8.30 (d, 1H, *J*= 6 Hz).

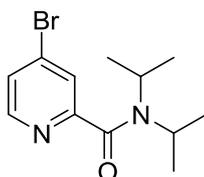
**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 24.3, 124.3, 126.7, 133.1, 150.0, 160.1

**4-Bromo-2-picolinic acid 106**

4-bromo-2-picoline **105** (228 mg, 1.32 mmol) and KMnO<sub>4</sub> (209 mg, 1.32 mmol) were refluxed for 4 hours in H<sub>2</sub>O (4 mL). Another portion of KMnO<sub>4</sub> (209 mg, 1.32 mmol) was added, the resulting reaction mixture was refluxed for 20 hours. The reaction mixture was filtered over celite and extracted with EtOAc. The aqueous layer was separated and acidified (1N HCl, adjusted to pH 3). The precipitate was filtered off, washed with H<sub>2</sub>O (5 mL) DCM (4 mL), and was dried to give the desired compound as a white solid (54%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, DMSO-*d*6) δ : 7.92 (dd, 1H, *J*= 2Hz, *J*= 5Hz), 8.18 (d, 1H, *J*= 2Hz), 8.59 (d, 1H, *J*= 5Hz), 13.5 (s broad, 1H).

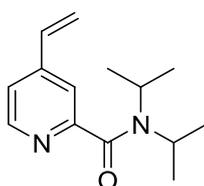
**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, DMSO-*d*6) δ : 127.6, 130.0, 133.0, 149.9, 150.8, 165.0.

**4-Bromo-N,N-diisopropyl-2-pyridinecarboxamide 107**

4-bromo-2-picolinic acid **106** (205 mg, 1 mmol) was dissolved in 3 mL of dry toluene under an inert atmosphere ( $N_2$ ) and  $(COBr)_2$  (300  $\mu$ L, 3 mmol) and DMF (9  $\mu$ L) were added slowly. The resulting solution was vigorously stirred for 1 hour and then heated at 70°C for 2 hours. The brown solid obtained after evaporation was pumped for 1 hour and dissolved in 3 mL of dry DCM. N,N-diisopropylamine (0.5 ml, 4 mmol) was added dropwise under an inert atmosphere. The solution was refluxed under nitrogen for 90 minutes and, after cooling, 10 mL of DCM were added. The solution was washed with water (2x10 mL). The combined organic layer was dried over  $Na_2SO_4$  and the solvent was removed under vacuum. The resulting product was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (30/70) as eluent to get the desired compound (251 mg, 87%).

$^1H$  N.M.R (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 1.18 (d, 6H,  $J=6.5$ Hz), 1.54 (d, 6H,  $J=6.5$ Hz), 3.55 (sept, 1H,  $J=6.5$ Hz), 3.82 (sept, 1H,  $J=6.5$ Hz), 7.46 (dd, 1H,  $J=2$ Hz,  $J=5$ Hz), 7.63 (d, 1H,  $J=2$ Hz), 8.36 (d, 1H,  $J=5$ Hz), 13.5 (s broad, 1H).

$^{13}C$  N.M.R (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 20.5, 20.8, 46.4, 51.0, 122.7, 124.1, 145.2, 149.7, 157.9, 167.5.

**N,N-Diisopropyl-4-vinylpicolinamide 108**

To a solution of 4-bromo-N,N-diisopropyl-2-pyridinecarboxamide **107** (204 mg, 0.7 mmol),  $PdP(Ph_3)_4$  (14 mg, 0.01 mmol), and a few crystals of 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol in 1.5 mL of dry toluene was added tributyl(vinyl)tin (0.23 mL, 0.77 mmol). The resulting solution was refluxed overnight. The reaction mixture was allowed to cool down to room temperature and was filtered through celite. The solvent was removed under vacuum and

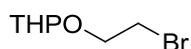
the crude compound was purified by flash chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (from 100/0 to 60/40) as eluent. 130 mg of pure compound were obtained (80%)

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.20 (d, 6H, *J*= 6Hz), 1.58 (d, 6H, *J*= 6Hz), 3.59 (sept, 1H, *J*=6Hz), 3.90 (sept, 1H, *J*=6Hz), 5.53 (d, 1H, *J*=9Hz), 6.02 (d, 1H, *J*= 18Hz), 6.69 (dd, *J*= 9Hz, *J*=18Hz), 7.28 (d, 1h, *J*= 3Hz), 7.45 (s, 1H), 8.52 (d, 1H, *J*= 3Hz).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 20.6, 20.9, 46.2, 50.8, 119.1, 119.3, 134.6, 145.9, 149.1, 157.2, 162.0, 188.7.

**M.S** *m/z* (ESI) = 233 [M+H]<sup>+</sup>.

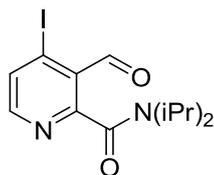
### Tetrahydropyranyl Ether of 2 Bromoethanol



To a stirred solution of 2,4-dihydro-pyran (0.5 g, 5.9 mmol) at 0°C was added dropwise a mixture of 2-bromoethanol (0.4 g, 2.9 mmol) and *p*-toluenesulfonic acid (6 mg, 0.024 mmol). The solution was stirred an additional 12 hours, after which 10% aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution was added. The resulting mixture was extracted with DCM, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated under vacuum to give the crude compound. The crude as purified by distillation (bp 75°C, 1mmHg) to give the protected alcohol as an oil (0.55 g, 91%)

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.51-1.88 (m, 6H), 3.48-3.54 (m, 3H), 3.73-4.03(m, 3H), 4.67 (m, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 19.4, 25.5, 30.6, 31.0, 62.4, 67.7, 99.0.

**3-Formyl-4-iodo-N,N-diisopropyl-2-pyridinecarboxamide 109**

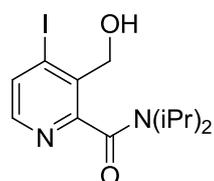
Lithium diisopropylamide (LDA) was prepared by reaction of (i-Pr)<sub>2</sub>NH (7.9 mL, 60 mmol) in THF (120 mL) with *n*-BuLi (37.6 mL, 60 mmol) at -75°C for 15 min. Then 110 mL of THF were added to the LDA solution. 3-Iodo-N,N-diisopropyl-2-pyridinecarboxamide **90** (10.01, 30 mmol) in THF (250 mL) was slowly added to the cold (-75 °C) solution of LDA. The resulting mixture was stirred for 1 hour at -75°C before the addition of ethyl formate (4.9 mL, 60 mmol) in THF (30 mL). Stirring was continued for 2 hours at the same temperature before hydrolysis at -75°C by H<sub>2</sub>O and further addition of H<sub>2</sub>O at room temperature. Extraction with Et<sub>2</sub>O, drying over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and removal of the solvent afforded a crude product, which was purified by flash chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (40/60) as eluent. 7 g of pure compound were obtained as a pale orange solid (65%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.18 (d, 6H, *J* = 6Hz), 1.59 (d, 6H, *J* = 6Hz), 3.48 (sept, 1H, *J* = 6Hz), 3.57 (sept, 1H, *J* = 6Hz), 7.89 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 6Hz), 8.23 (d, 1H, *J* = 6Hz), 10.1 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 20.2, 20.8, 46.3, 51.4, 110.1, 129.1, 135.3, 152.2, 158.1, 166.2, 193.5.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>): 2963, 1706, 1636, 1539, 1475, 1368, 1339.

**M.S.** *m/z* (ESI) = 361[M+H]<sup>+</sup>

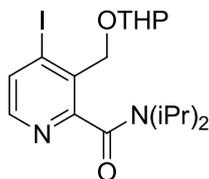
**3-(hydroxymethyl)-4-iodo-N,N-diisopropyl-2-pyridinecarboxamide 110**

NaBH<sub>4</sub> (0.21g, 5.55 mmol) was added to a suspension of 3-formyl-4-iodo-N,N-diisopropyl-2-pyridinecarboxamide **109** (1.00g, 2.78 mmol) in methanol (50 mL) at 0°C. After one hour the reaction was quenched by H<sub>2</sub>O (75 mL). Extraction with DCM (3×100 mL), drying over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and removal of the solvent afforded the crude compound, which was used without further purification (quantitative).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.19 (d, 6H, *J* = 6Hz), 1.57 (d, 6H, *J* = 6Hz), 3.58 (sept, 1H, *J* = 6Hz), 3.72 (sept, 1H, *J* = 6Hz), 4.66 (d, 2H, *J* = 6Hz), 7.81 (d, 1H, *J* = 6Hz), 8.03 (d, 1H, *J* = 6Hz).

<sup>13</sup>C N.M.R (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 20.4, 20.6, 46.5, 51.4, 66.3, 113.2, 135.2, 137.1, 148.2, 155.7, 168.3

### 3-[[tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]methyl]-4-iodo-N,N-diisopropyl-2-pyridinecarboxamide 111



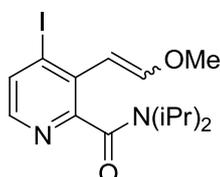
To a solution of DHP (150 μL, 1.59 mmol) in DCM (1.5 mL) at 0°C a mixture of 3-(hydroxymethyl)-4-iodo-N,N-diisopropyl-2-pyridinecarboxamide **110** (115 mg, 0.32 mmol) and p-toluenesulfonic acid (5mg, 0.03 mmol) in DCM (2 mL) was added slowly. The stirring was maintained at room temperature for two hours before quenching by H<sub>2</sub>O. The mixture was extracted with Et<sub>2</sub>O and the organic layers were washed with brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was removed and the crude was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (45/55) as eluent. 99 mg of oily compound were obtained (70%).

<sup>1</sup>H N.M.R (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 4.44 (d, 1H, *J*=12 Hz); 4.78 (t, 1H, *J*=3 Hz), 4.86 (d, 1H, *J*=12 Hz), 7.75 (d, 1H, *J*=6Hz), 8.01 (d, 1H, *J*=6Hz).

<sup>13</sup>C N.M.R (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 19.2, 20.5, 25.4, 30.3, 46.0, 62.2, 69.0, 99.5, 114.1, 133.5, 134.8, 148.6, 156.6, 166.9

M.S m/z (ESI) = 447 [M+H]<sup>+</sup>

### 3-(2-methoxyethenyl)-4-iodo-N,N-diisopropyl-2-pyridinecarboxamide 112



t-BuOK (436 mg, 3.89 mmol) was slowly added to a suspension of methoxymethyl triphenylphosphonium chloride (1.33 g, 3.89 mmol) in dry toluene (20 mL) under argon at -15°C. The mixture was stirred at -15°C for 1 hour, the mixture turned to an orange-red color. 3-formyl-4-iodo-N,N-diisopropyl-2-pyridinecarboxamide **109** (500 mg, 1.39 mmol) in dry toluene (10 mL) was added dropwise at -15°C. The mixture was allowed to stir at

room temperature for 20 hours. The reaction was quenched by H<sub>2</sub>O, the organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with Et<sub>2</sub>O. The organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the solvent was removed under vacuum. The crude compound was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate from (80/20 to 40/60) to give 392 mg of the desired compound (73%).

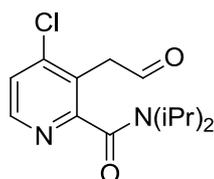
**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.11 (d, 6H, *J*= 6 Hz), 1.55 (d, 6H, *J*= 6 Hz), 3.37 (sept, 1H, *J*=6Hz), 3.48 (sept, 1H, *J*= 6 Hz), 3.70 (s, 3H), 5.65 (d, 1H, <sup>3</sup>*J*= 15 Hz), 7.03 (d, 1H, *J*= 15Hz), 7.76 (d, 1H, *J*= 3 Hz), 7.95 (d, 1H, *J*= 3 Hz).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 20.4, 20.6, 45.9, 51.0, 57.2, 104.1, 113.4, 134.1, 146.7, 149.4, 154.1, 167.8.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 2962, 2934, 2369, 2342, 1630, 1333.

**M.S** *m/z* (ESI) = 389 [M+H]<sup>+</sup>.

### 3-(2-oxoethyl)-4-chloro-N,N-diisopropyl-2-pyridinecarboxamide 113

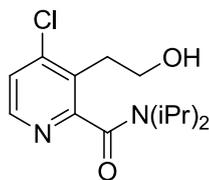


3-(2-methoxyethenyl)-4-iodo-N,N-diisopropyl-2-pyridinecarboxamide **112** (1.5 g/ 3.89 mmol) was heated at 80°C for 20 hours in THF (15 mL) and HCl 2N.(3 mL). The reaction mixture was allowed to cool at room temperature and 15 mL of water were added. The reaction mixture was washed once by ethyl acetate (10 mL). Using NaOH pellets the pH of the aqueous layer was neutralized (pH =7-8), the solution was extracted by DCM (3x15 mL). The organic solution was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was removed under vacuum. The crude compound was purified by column chromatography using cyclohexane/ ethyl acetate (50/50) as eluent to give 860 mg of pure compound (78%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.12 (d, 6H, *J*= 6 Hz), 1.52 (d, 6H, *J*= 6 Hz), 3.51 (sept, 1H, *J*=6 Hz), 3.60 (sept, 1H, *J*= 6 Hz), 4.00 (s, 3H), 7.34 (d, 1H, *J*= 15 Hz), 7.76 (d, 1H, *J*= 6 Hz), 8.39 (d, 1H, *J*= 6Hz), 9.76 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 20.4, 20.6, 44.1, 46.3, 51.2, 124.4, 146.0, 148.6, 157.7, 167.0, 196.7.

**M.S** *m/z* (ESI) = 283 [M+H]<sup>+</sup>

**3-(2-hydroxyethyl)-4-chloro-N,N-diisopropyl-2-pyridinecarboxamide 114**

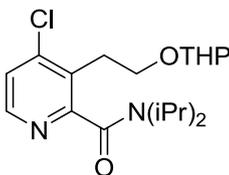
NaBH<sub>4</sub> (174 mg, 4.6 mmol) was added to a suspension of aldehyde **113** (650 mg, 2.3 mmol) in methanol (50 mL) at 0°C. After one hour the reaction was quenched by H<sub>2</sub>O (75 mL). Extraction with DCM (3×100 mL), drying over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and removal of the solvent afforded the crude compound (490 mg, 75%), which was used without further purification.

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.12 (d, 6H, *J* = 7Hz), 1.53 (d, 6H, *J* = 7Hz), 2.96 (t, 2H, *J* = 5Hz), 3.58 (m, 2H), 3.87 (t, 2H, *J* = 5Hz), 4.32 (s broad, 1H), 7.29 (d, 1H, *J* = 5Hz), 8.29 (d, 2H, *J* = 5Hz).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 20.3, 20.6, 32.4, 46.5, 51.3, 60.2, 124.9, 130.5, 145.4, 147.8, 156.9, 168.4.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>): 3367, 2966, 2929, 1612, 1552, 1441.

**M.S** *m/z* (ESI) = 285 [M+H]<sup>+</sup>.

**3-[[tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]ethyl]-4-chloro-N,N-diisopropyl-2-pyridinecarboxamide 115**

To a solution of DHP (0.6 mL, 6.01 mmol) in DCM (10 mL) at 0°C a mixture of alcohol **114** (338 mg, 1.20 mmol) and *p*-TSA (23 mg, 0.12 mmol) in DCM (15 mL) was added slowly. The stirring was maintained at room temperature for two hours before quenching by H<sub>2</sub>O (20 mL). The organic layer was separated, and the aqueous layer was washed by DCM once (20 mL). The crude compound was purified by column chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (50/50) as eluent to give 353 mg of pure compound (78%).

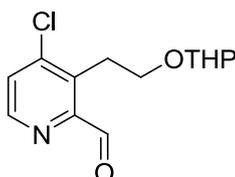
**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.13 (d, 6H, *J* = 7Hz), 1.52 (d, 6H, *J* = 7Hz), 1.56-1.80 (m, 3H), 2.88 (t, 2H, *J* = 5Hz), 3.56 (m, 3H), 3.84 (t, 2H, *J* = 5Hz), 4.96 (t, 1H, *J* = 5 Hz), 7.30 (d, 1H, *J* = 5Hz), 8.26 (d, 2H, *J* = 5Hz).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 19.2, 20.0, 20.3, 25.2, 29.8, 30.3, 45.7, 50.6, 61.8, 65.4, 98.4, 124.0, 128.7, 145.3, 147.5, 157.3, 166.8.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 2962, 2940, 1633, 1552, 1441.

**M.S** m/z (ESI) = 369 [M+H]<sup>+</sup>

### 3-[[tetrahydro-2H-pyran-2-yl]oxy]ethyl]-4-chloro-2-pyridinecarboxaldehyde 116



3-[[tetrahydro-2H-pyran-2-yl]oxy]ethyl]-4-chloro-N,N-diisopropyl-2-pyridinecarboxamide (202 mg, 0.44 mmol) was dissolved in THF (6 mL) under nitrogen atmosphere and then cooled to -78°C. Diisobutylaluminium hydride (1M in hexane, 660 μL, 0.66 mmol) was added dropwise via syringe. After 15 minutes, the cold bath was removed, and the reaction was allowed to come to room temperature, going from a yellow to an orange solution. The reaction was followed by TLC, after 45 minutes at room temperature, the reaction was quenched by NaOH 1N. The aqueous layer was extracted with DCM, the combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (30/70) as eluent to give 53 mg of pure compound (45%).

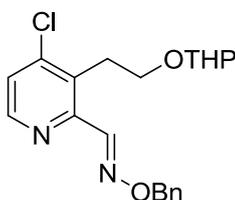
**<sup>1</sup>H N.M.R** (MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.49-1.76 (m, 6H), 2.84 (t, 2H, *J* = 5 Hz), 3.60-3.70 (m, 4H), 4.90 (t, 1H, *J* = 5 Hz), 8.00 (d, 1H, *J* = 5 Hz), 8.31 (d, 1H, *J* = 5 Hz), 10.08 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 20.2, 25.1, 29.9, 30.3, 62.0, 65.5, 98.4, 124.0, 128.7, 146.3, 148.3, 157.3, 187.8.

**I.R** (cm<sup>-1</sup>) : 2941, 2868, 1713, 1561, 1544, 1444.

**M.S** m/z (ESI) = 270 [M+H]<sup>+</sup>

### 4-chloro-3-(2(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)ethyl)picolinaldehyde O-benzyl oxime 117



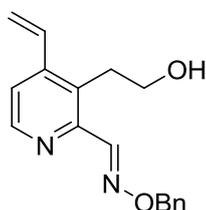
O-benzyl hydroxylamine hydrochloride (188 mg, 1.18 mmol) and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (63 g, 0.59 mmol) were mixed together in water (3 mL) until the solids dissolve and the gas emission stops. This aqueous solution was added to 3-[[tetrahydro-2H-pyran-2-yl]oxy]ethyl]-4-chloro-2-pyridinecarboxaldehyde **116** (107mg, 0.40 mmol) in absolute ethanol (0.5 ml). The mixture was heated at 70°C for 16 hours. The reaction mixture was then allowed to cool down to room temperature and was extracted with EtOAc and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was removed under reduced pressure and the crude was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (40/60) as eluent. 129 mg of the desired compound were obtained (86%).

<sup>1</sup>H N.M.R (MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.50-1.77 (m, 6H), 2.73 (t, 2H, *J* = 5 Hz), 3.55-3.64 (m, 4H), 4.95 (t, 1H, *J* = 5 Hz), 5.24 (s, 2H), 7.30-7.42 (m, 5H), 7.65 (d, 1H, *J* = 5 Hz), 8.02 (d, 1H, *J* = 5 Hz),

<sup>13</sup>C N.M.R (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 19.2, 25.5, 29.4, 30.5, 61.9, 65.5, 98.6, 124.8, 128.2, 128.6, 128.7, 132.5, 137.2, 145.9, 148.4, 148.8, 151.3.

I.R (cm<sup>-1</sup>) : 2940, 2864, 1549, 1441.

### 3-(2-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)ethyl)-4-vinylpicolinaldehyde O-benzyl oxime **118**

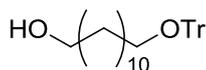


4-chloro-3-(2(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)ethyl)picolinaldehyde O-benzyl oxime **117** (67 mg/ 0.18 mmol) was dissolved in dry dioxane (7 mL), *tert*-butylvinyl tin (79 μL / 0.27 mmol), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (17 mg, 0.02 mmol), P(*t*-Bu)<sub>3</sub> (70 μL/ 0.07 mmol) and CsF (59 mg, 0.4 mmol) were added to the solution. The mixture was heated at 80°C, under argon, for 16 hours. The reaction mixture was allowed to cool down to room temperature and was filtered through celite. HCl 1N was added and the reaction mixture was stirred for one hour. NaOH pellets were added to basify the media. The reaction mixture was extracted with ethyl acetate, and the combined organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was removed under vacuum and the crude compound was purified by column chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (40/60) as eluent. 19 mg of white solid were obtained (37%)

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.11 (t, 2H, *J*= 6 Hz), 3.73 (t, 2H, *J*= 6 Hz), 5.26 (s, 2H), 5.53 (d, 1H, *J*= 12Hz), 5.80 (d, 1H, *J*= 18 Hz), 7.01 (dd, 1H, *J*= 12Hz, *J*= 18 Hz), 7.31-7.45 (m; 5H), 8.41 (d, 1H, *J*= 6Hz), 8.49 (d, 1H, *J*= 6Hz).

**<sup>13</sup>C N.M.R** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 33.4, 61.5, 211.1, 123.5 117.8, 128.1, 128.3, 129.1, 132.3, 137.6, 146.2, 148.9, 150.5, 152.6.

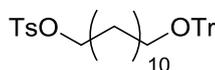
**M.S** m/z (ESI)= 283 [M+H]<sup>+</sup>

**12-(trityloxy)dodecan-1-ol 118**

Trityl chloride (3.3 g, 0.012 mmol) was added to a solution of diethylene glycol (10 g, 0.05 mol) and pyridine (1.5 mL, 0.018 mmol) in DCM (under vigorous stirring. The mixture was then heated at 45°C under argon atmosphere for 16 hours. After the reaction was finished the mixture was poured in a separatory funnel and an equal volume of water was added. The mixture was shaken vigorously and was extracted with EtOAc. The combined organic layer was washed with brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was removed under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (50/50) to obtain the desired compound (4.2g, 80%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.25-1.65 (m, 20H), 2.40 (s, 3H), 3.04 (t, 2H, *J*= 6.5 Hz), 3.63 (t, 2H, *J*=6.5Hz), 7.19-7.45 (m, 15H).

**N.M.R** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 25.9, 26.4, 29.6, 29.7, 30.2, 63.2, 63.8, 126.9, 127.8, 128.8, 144.7.

**Tosyloxy-12-(trityloxy)dodecane 119**

A solution of 12-(trityloxy)dodecan-1-ol **118** (3.12 g, 7 mmol) and Et<sub>3</sub>N (3.5 mL) in DCM (15 mL) under argon atmosphere was cooled at 0°C. A solution of tosyl chloride (1.3 g, 7 mmol) in DCM (15 mL) was added dropwise. The mixture was allowed to stir overnight at room temperature. The solution was washed with saturated K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution (2× 15 mL) and H<sub>2</sub>O (15 mL). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was removed to give the crude compound, which was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (60/40) as eluent. 3.5 g of a white solid were obtained (85%).

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.26-1.67 (m, 20H), 3.22 (t, 2H, *J*= 6.5 Hz), 4.30 (t, 2H, *J*=6.5Hz), 7.19-7.45 (m, 17H), 7.76 (d, 2H, *J*= 5 Hz)

**N.M.R** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 25.9, 26.4, 29.6, 29.7, 30.2, 63.2, 63.8, 126.9, 127.8, 128.8, 144.7.

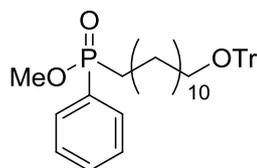
**Bromo-12-(trityloxy)dodecane 120**

To LiBr (4.8 g, 55 mmol) dissolved in 80 mL of acetone p.a., tosyloxy-12-(trityloxy)dodecane

(3 g, 5 mmol) in 10 mL acetone was added. The mixture was heated at 80°C for 5 hours, and then was allowed to stir overnight at room temperature. The solvent was removed and chloroform was added to the resulting mixture in order to remove the white precipitate. The filtrate was washed with H<sub>2</sub>O (2 times) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After removal of the solvent, the compound was purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (50/50) as eluent. 2.0 g of desired compound were collected (80%).

<sup>1</sup>H N.M.R (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.24-1.40 (m, 20H), 3.06 (t, 2H, J= 6.5 Hz), 3.42 (t, 2H, J=6.5Hz), 7.23-7.49 (m, 15H).

<sup>13</sup>C N.M.R (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 26.4, 28.3, 28.9, 29.6, 30.2, 33.0, 34.2, 63.8, 86.4, 126.9, 127.8, 128.8, 144.7.

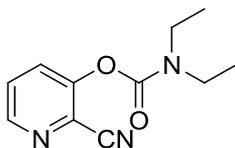
**Methyl phenyl(11-(trityloxy)undecyl)phosphinate 121**

A mixture of 760 mg (4.5 mmol) dimethyl phenylphosphonite **101** and 1.5 g (3 mmol) of bromo-12-(trityloxy)dodecane **120** was heated at 130°C under vacuum (13 mbar) for 6 hours. The remaining material was purified by column chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (from 80/20 to 30/70) as eluent. 990 mg of white solid (low melting point) were obtained as the pure compound (57%)

<sup>1</sup>H N.M.R (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.24-1.40(m, 20H), 3.06 (t, 2H, J= 6.5 Hz), 3.42 (t, 2H, J=6.5Hz), 7.23-7.49 (m, 15H).

<sup>13</sup>C N.M.R (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 21.8, 26.4, 28.9, 29.2, 29.5, 29.6, 30.2, 30.3, 30.7, 30.9, 63.8, 86.4, 126.8, 127.8, 128.7, 128.8, 131.8, 131.9, 132.4, 144.7.

<sup>31</sup>P N.M.R (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 45.9

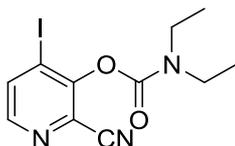
**2-Cyanopyridin-3-yl diethylcarbamate 124**

Diethylcarbamoyl chloride (2.2 mL, 17.5 mmol) was added to a stirred cold (0°C) solution of 2-Cyano-3-hydroxypyridine (2 g, 16.7 mmol) in 37 mL of pyridine. The solution was stirred at room temperature overnight. Water was added and the mixture was extracted with ether. The combined ether extracts were washed with 10% aqueous sodium carbonate solution and brine, dried with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and evaporated. The crude was purified by flash chromatography over silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (50/50) as eluent. 3.47g of low melting point white solid were obtained as pure compound (95%)

**$^1\text{H N.M.R}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 1.24 (t, 3H,  $J = 7\text{Hz}$ ), 1.32 (t, 3H,  $J = 7\text{Hz}$ ), 3.40 (q, 2H,  $J = 7\text{Hz}$ ), 3.52 (q, 2H,  $J = 7\text{Hz}$ ), 7.52 (dd, 1H,  $J = 5\text{Hz}$ ,  $J = 8.5\text{Hz}$ ), 7.85 (d, 1H,  $J = 8.5\text{Hz}$ ), 8.50 (d, 1H,  $J = 5\text{Hz}$ ).

**$^{13}\text{C N.M.R}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 13.2, 14.3, 42.6, 43.0, 114.6, 127.4, 131.1, 147.1, 151.5, 151.9.

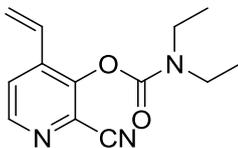
**M.S**  $m/z$  (ESI) = 220  $[\text{M}+\text{H}]^+$

**2-Cyano-4-iodopyridin-3-yl diethylcarbamate**

To a solution of 2-Cyanopyridin-3-yl diethylcarbamate D (1.0 g, 4.56 mmol) in THF (45 mL) at -75°C was added dropwise *n*-BuLi in hexane (4.3 mL, 6.84 mmol). After 30 min stirring at the temperature. Iodine (1M in THF, 6.84 mmol) was added dropwise. After one hour stirring at -78°C, 10%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  was added and the crude material was obtained by extractive work-up with  $\text{Et}_2\text{O}$ . Purification was achieved by means of column chromatography through silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (50/50) as eluent to give 829 mg of pure compound (52%)

**$^1\text{H N.M.R}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 1.26 (t, 3H,  $J = 7\text{Hz}$ ), 1.39 (t, 3H,  $J = 7\text{Hz}$ ), 3.43 (q, 2H,  $J = 7\text{Hz}$ ), 3.55 (q, 2H,  $J = 7\text{Hz}$ ), 7.98 (d, 1H,  $J = 5\text{Hz}$ ), 8.14 (d, 1H,  $J = 5\text{Hz}$ ).

**M.S**  $m/z$  (ESI) =

**2-Cyano-4-vinylpyridin-3-yl diethylcarbamate 125**

To a solution of 2-Cyano-4-iodopyridin-3-yl diethylcarbamate **124** (359 mg, 1.04 mmol), PdP(Ph<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (11 mg, 0.10 mmol), and a few crystals of 2,6-di-*tert*-4-methylphenol in 10 mL of dry toluene was added tri-*tert*-butylethenylstannane (0.33 mL, 1.15 mmol). The mixture was heated at 80°C, under argon, for 16 hours. The reaction mixture was allowed to cool down to room temperature and was filtered through celite. The solvent was removed under vacuum and the crude compound was purified by flash chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (from 50/50) as eluent. 165 mg of pure compound were obtained (64%)

**<sup>1</sup>H N.M.R** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.24 (t, 3H, *J*= 7Hz), 1.36 (t, 3H, *J*= 7Hz), 3.42 (q, 2H, *J*= 7Hz), 3.55 (q, 2H, *J*= 7Hz), 5.66 (d, 1H, *J*= 11Hz), 6.02 (d, 1H, *J*= 18Hz), 6.73 (dd, 1H, *J*= Hz, *J*= 18Hz), 7.61 (d, 1H, *J*= 5Hz), 8.49 (d, 1H, *J*= 5Hz).

**M.S** m/z (ESI) = 246 [M+H]<sup>+</sup>

## RESUME

---

Les neurotoxiques organophosphorés sont des inhibiteurs irréversibles de l'acétylcholinestérase (AChE). Ils agissent en se liant de manière covalente au niveau du centre actif de l'enzyme qui ne peut plus de ce fait hydrolyser l'acétylcholine. Le neurotransmetteur s'accumule dans les synapses conduisant à une paralysie du système neuromusculaire pouvant provoquer la mort par insuffisance respiratoire. L'utilisation potentielle de ces neurotoxiques à des fins militaires ou terroristes reste encore aujourd'hui une menace importante.

Notre travail de recherche, qui a consisté à mettre au point de nouveaux systèmes de décontamination, s'est divisé en deux axes :

- Δ Identification de nouveaux composés susceptibles de dégrader les neurotoxiques organophosphorés de la famille des agents V.
- Δ Développement d'empreintes moléculaires à activité organophosphonothioase.

Dans un premier temps nous avons mis au point un test analytique par CLHP pour la détection d'activité organophosphonothioase que ce soit pour des agents chimiques ou pour des empreintes moléculaires.

Celui-ci nous a permis de cribler une soixantaine d' $\alpha$ -nucléophiles dont neuf se sont montrés particulièrement réactifs. Des études cinétiques plus approfondies ont permis d'identifier de nouvelles structures susceptibles d'être utilisées comme agents détoxifiants (oximes, amidoximes). Une autre étude a également montré que certains de ces composés étaient de bons réactivateurs de l'AChE inhibée par le VX.

En parallèle nous avons développé l'utilisation des empreintes moléculaires comme épurateurs catalytiques. Cette stratégie consiste à imaginer et synthétiser des templates polymérisables possédant une entité nucléophile et un analogue de l'agent V (PhX) à hydrolyser. Plusieurs approches ont été envisagées mais les synthèses souvent difficiles du fait de la complexité des templates n'ont pu aboutir à l'obtention d'empreintes moléculaires.

## ABSTRACT

---

Organophosphorous nerve agents are toxic compounds that inhibit acetylcholinesterase (AChE) by covalent bonding to their active center serine. Consequently the inability of AChE to hydrolyze acetylcholine results in accumulation of the neurotransmitter in the synapse gap leading to paralysis of neuromuscular functions and to death by respiratory failures. The potential use of these neurotoxins for military or terrorist ends is still a current worldwide threat.

We have oriented our research in two different axes:

- Δ Identification of new structures for the hydrolysis of neurotoxic organophosphorous (agent V).
- Δ Development of imprinted polymers with organophosphonothioase activity.

First of all, an HPLC analytical test was developed in order to detect the organophosphonothioase activity of either chemical agents or imprinted polymers.

Around sixty  $\alpha$ -nucleophiles were screened and nine of them showed an interesting reactivity. Further kinetic studies permitted the selection of new nucleophilic structures which could be used as detoxifying agents (oximes, amidoximes). Another study showed that they were also potential AChE inhibited reactivators.

At the same time we have developed imprinted polymers as new decontamination means. This strategy consists in designing and synthesizing polymerisable templates bearing a nucleophilic moiety and a PhX analogue. Different approaches were used but many difficulties in the template synthesis unable us to obtain the desired imprinted polymers.