

Université

de Strasbourg

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences Chimiques

UMR 7199 – Laboratoire des Systèmes Chimiques Fonctionnels

THÈSE

présentée par :

Eric Thomas

soutenue le : **29 septembre 2017**

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

Discipline / Spécialité : Chimie / Chimie Biologie

Stratégies de marquage chimiospécifique et bioorthogonale pour l'analyse métabolomique des rétinoïdes

THÈSE dirigée par :

Wagner Alain
Krezel Wojciech

Docteur, Université de Strasbourg
Docteur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Defrancq Eric
Subra Gilles

Professeur, Université Grenoble-Alpes
Professeur, Université de Montpellier

Loi de Hofstadter :

« Il faut toujours plus de temps que prévu,
même en tenant compte de la Loi de
Hofstadter. »

D. Hofstadter : Gödel, Escher, Bach : Les
Brins d'une Guirlande Éternelle

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au Laboratoire de Chimie Biofonctionnel (BFC) de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, sous la direction du Docteur Alain Wagner et du Docteur Wojciech Krezel.

Je souhaite tout d'abord remercier Alain pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Merci pour ta confiance, en m'ayant permis de participer à tes côtés aux entretiens et à la review. J'ai beaucoup appris grâce à ça. Merci à Wojciech pour m'avoir donné l'opportunité de découvrir la biologie *in vivo*.

Je souhaite également remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse : Pr. Eric Defrancq de l'Université de Grenoble-Alpes et le Pr. Gilles Subra de l'Université de Montpellier.

Merci au Docteur Gilles Frison, de l'Ecole Polytechnique de Paris, pour notre collaboration sur le projet ADPN. Merci également aux Docteurs Dimitri Heintz et Julien Delecolle, de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes à Strasbourg, pour notre collaboration sur le projet de sonde ATPP.

Merci à Jean-Serge, pour m'avoir encouragé à faire partie du Conseil de Laboratoire de l'UMR, mais aussi à représenter les doctorants du Campus D'Illkirch auprès de l'Ecole Doctorale des Sciences Chimiques.

Merci à Alexandre Specht, pour nos discussions concernant la synthèse du rétinoloïde. Et merci aux autres personnes qui ont parlé de science avec moi, et qui ont travaillé, directement ou non, à l'avancée de ces projets.

Un immense merci à Guilhem pour avoir relu aussi rapidement cette thèse. Merci Sylvain U., pour avoir été mon voisin de bureau et de paillasse et pour tes nombreux conseils. Merci d'avoir lutté vaillamment contre le pillage du labo en ma compagnie.

Merci Sasha, pour tes conseils sur les APN et d'avoir partagé tes nombreuses lectures. Thanks, Zolo, Table tennis master, Mongolian and English teacher! Maybe I

will know how to count to ten in Mongolian in few years! Merci Célia et Manon, qui avez commencés votre thèse en même temps que moi, et qui avez apprécié mes superbes éclairs (pas de commentaire). Merci à Fabr... Fabien, Sébastien¹ et Jérémy pour les soirées jeu. Merci également à tous les autres, Igor, Elisabetta, Florence, Alexandre, Linda, Patrick, Chloé, Sergii, Michel, Sylvain J., Sébastien², David, Julie, et ceux que j'ai oublié de mentionner, pour les repas et sorties de labo.

Merci également au 2^{ème} étage, Bastien, Laurie, William, Lucas et Kate, pour les pauses-café (très ?) irrégulières, de préférence au soleil. Et merci en particulier à Bastien, pour les kilomètres de falaises et murs d'escalade gravis, et pour notre ascension de la Pigne de la Lé. On remet ça ?

Merci aux copains de Licence, pour les soirées lan/jeux/Perudo/tartes flambées/crêpes/gaufres.

Merci aux copains de Pharma, pour les thèses *de pharma*, les crémaillères, les vacances au ski et en Corse, les soirées piscine, les fêtes du vin, et pour les *instants* passés ensemble, et tous ceux à venir !

Merci à toute ma famille, pour votre soutien constant, autant moral que nutritionnel. Rien de tel qu'un petit saut à Fouchy pour soigner le cœur et l'estomac !

Merci à toi Célia, pour ton soutien sans faille. Du fond du cœur, merci d'être là pour moi.

Merci !

Abréviations

4-HNE	4-hydroxynonéнал	mCPBA	Acide méta-chloroperbenzoïque
ACN	Acétonitrile	MS	Spectrométrie de masse
ADC	Conjugué anticorps-drogue	Ms	mésyl
ADH	Alcool dehydrogenase	MS ²	Spectrométrie de masse en tandem
ADN	Acide désoxyribonucléique	NAGABald	N-acétyl-gamma-aminobutyraldéhyde
ADPN	Aryldipropionitrile	NBS	N-bromosuccinimide
APN	Arylpropionitrile	PDPN	Phényldipropionitrile
ARN	Acide ribonucléique	PTSA	Acide p-toluenesulfonique
ATRA	Acide all-trans rétinolique	RAL	Rétinaldéhyde
BCN	Bicyclo[6.1.0]nonyne	RALDH	Rétinaldéhyde déhydrogénase
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène	RAR	Récepteur de l'acide rétinolique
DCM	Dichlorométhane	RBP	Protéine de liaison au rétinol
DFT	Théorie de la fonctionnel de la densité	RDH	Rétinol déhydrogénase
DMF	Diméthylformamide	RXR	Récepteur X des rétinoïdes
DMSO	Diméthylsulfoxyde	SEP	Sclérose en plaque
DOPAL	3,4-dihydroxyphénylacétaldehyde	SMCC	Succinimidyl4-(N-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate
GABA	Acide gamma-aminobutyrique	TCEP	Tris(2-carboxyéthyl)phosphine
HD	Maladie de huntington	TEA	Triéthylamine
HMBD	Base de données du métabolome humain	TFA	Acide trifluoroacétique
HMPA	Héxaméthylphosphoramide	THF	Tétrahydrofurane
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance	TMP	Tétraméthylpipéridine
HRMS	Spectrométrie de masse à haute résolution	TMPP	(2,4,6-triméthoxyphényl)phosphine
IRM	Imagerie à résonance magnétique	TMS	triméthylsilane
LC	Chromatographie en phase liquide	UPLC	Chromatographie en phase liquide à ultra haute performance
MA	Maladie d'Alzheimer	UV	Ultraviolet

Table des matières

Chapitre 1 : Vers une meilleure compréhension des métabolites des rétinoïdes	1
1. La métabolomique	1
1.1. Définitions	1
1.2. Méthodes analytiques	1
1.3. Stratégies en étude métabolomique.....	2
1.4. Applications.....	3
2. Les rétinoïdes	4
2.1. Voie métabolique et mode d'action	5
2.2. Impact sur le développement embryonnaire	6
2.3. Maladies liées aux rétinoïdes	7
2.4. Problématique	8
3. Notre approche	9
4. Synthèse de l'azidorétinol.....	12
4.1. Synthèse multi-étapes.....	12
4.2. Fonctionnalisation tardive du rétinaldéhyde	21
5. Tests in vitro	22
6. Conclusion et perspectives	23
Chapitre 2 : Etude de l'aldéhydome par une approche métabolomique chimiospécifique	25
1. Les aldéhydes dans le vivant.....	25
1.1. Le 4-hydroxynonéal (4-HNE).....	26
1.2. Le 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde (DOPAL).....	27
1.3. Le N-acétyl-γ-butyraldéhyde (NAGABald).....	27
2. Stratégie de marquage des aldéhydes : la ligation oxime.....	27
3. Synthèse de la sonde ATPP	29
4. Evaluation du gain de sensibilité après réaction avec la sonde	30
5. Mise en place de la méthode analytique.....	32
5.1. Synthèse des références aldéhydiques.....	32

5.2. Injection des différents adduits.....	35
6. Mesure des limites de quantification et courbes de calibration	36
7. Biodistribution de la sonde in vivo.....	37
8. Conclusions et perspectives	40
Chapitre 3 : Elaboration d'un réactif de couplage « thiol-thiol » hétérobifonctionnel.	43
1. Introduction.....	43
2. Conception du réactif de couplage homobifonctionnel	45
2.1. Synthèse du PDPN et mesure de sa réactivité	45
2.2. Synthèse de plusieurs APN et mesure de leur constante cinétique	46
2.3. Modélisation moléculaire.....	49
2.4. Stabilité de l'adduit de l'APN	54
2.5. Synthèse de l'ADPN.....	56
3. Applications du réactif de couplage homobifonctionnel	61
3.1. Mesure des constantes cinétiques d'addition du glutathion de l'ADPN	61
3.2. Résolution cinétique pour le couplage de deux thiols à l'aide de l'ADPN.	62
3.3. Stabilité de l'adduit du ADPN	63
3.4. Application au couplage de biomolécules	65
4. Conclusions et perspectives	68
Conclusions générales et perspectives	69
Experimental part	71
General Methods.....	71
Chapter 1: Metabolomic labeling.....	72
Chapter 2: Chemospecific-based metabolomic.....	78
Chapter 3: Thiol-to-thiol coupling reagent	82
Références	95

Chapitre 1 : Vers une meilleure compréhension des métabolites des rétinoïdes

Au cours de ce projet, nous nous sommes intéressés au développement d'un outil permettant d'améliorer la compréhension de la métabolisation des rétinoïdes. Pour ce faire, nous avons mis au point un analogue d'un rétinoïde permettant l'analyse facilitée de ses métabolites par l'utilisation de la chimie « Click ». Ce projet fait partie intégrante du domaine de la métabolomique.

1. La métabolomique

1.1. Définitions

La métabolomique est une science consistant à étudier le métabolome, c'est-à-dire l'ensemble des métabolites présents dans une cellule, un organe, un fluide biologique ou un organisme. Les métabolites sont des composés organiques de petites tailles (généralement d'un poids moléculaire inférieur à 1500 Daltons) issus du métabolisme, qui est défini comme l'ensemble des réactions chimiques ayant lieu dans un organisme vivant. Les métabolites ont des rôles très variés, allant de leur utilisation comme source d'énergie jusqu'à des effets de défense, de signalisation, de stimulation, d'inhibition ou de détoxification. Le métabolome est dynamique et peut grandement varier en fonction de l'homéostasie naturelle, ou dépendamment de perturbations internes comme dans le cas de maladies, ou faisant suite à la prise de médicaments. Ainsi, en observant ces métabolites grâce à des méthodes analytiques, quelles soit quantitative ou qualitative, il est possible de suivre l'état d'un organisme.

1.2. Méthodes analytiques

Les méthodes analytiques les plus communes utilisées en métabolomique sont la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse (MS)¹.

Parmi les premières publications de métabolomique, la première méthode était majoritairement utilisée². La spectroscopie par RMN, permet d'obtenir des résultats

très reproductibles, car ils sont indépendants du champ appliqué³. Les données générées peuvent être utilisées afin de quantifier les métabolites présents dans les échantillons, tandis que le motif des pics donne des informations sur la structure des métabolites⁴. De plus, cette méthode possède l'avantage d'être non-destructive. Cependant, sa limitation majeure est sa sensibilité.

La spectrométrie de masse, quant à elle, a pris son essor progressivement en compensant la faiblesse principale de la spectrométrie RMN. En effet, l'avantage majeur de la spectrométrie de masse est sa sensibilité, qui permet d'observer des molécules présentes à de très faibles concentrations. Cette méthode est destructive, bien que ce défaut soit compensé par la faible quantité de matière à injecter. Elle est appréciée pour sa haute discrimination des métabolites, grâce à une sensibilité importante⁵ et elle possède, de plus, l'avantage d'être quantitative, un point important en métabolomique. Elle est généralement couplée à un système de chromatographie, tel que la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou en phase liquide (LC), ce qui permet de séparer les métabolites observés, et ainsi de réduire la complexité des spectres de masse. En GC-MS, les échantillons sont à l'état gazeux, ce qui ne permet pas d'analyser directement les molécules non volatiles. La LC-MS, quant à elle, permet d'analyser une vaste gamme de molécules, des molécules hydrophobes aux molécules hydrophiles. C'est cette méthode analytique que nous avons choisi d'employer pour l'analyse des métabolites des rétinoïdes.

1.3. Stratégies en étude métabolomique

Ces méthodes analytiques peuvent être appliquées à deux stratégies : la métabolomique ciblée ou non ciblée.

La métabolomique non ciblée repose sur l'analyse d'une vaste gamme de métabolites, sans qu'ils soient nécessairement identifiés. Dans cette stratégie, le but est d'observer autant de métabolites que possible, et de les quantifier, afin d'identifier des changements dans le métabolome, changements qui peuvent être liés à des perturbations dans les voies métaboliques. Ici, l'intérêt est d'obtenir une empreinte digitale d'un échantillon, en observant l'absence ou la présence de certains métabolites, ou en comparant leurs intensités relatives, permettant d'obtenir un diagnostic.

La deuxième stratégie est la métabolomique ciblée, et se concentre sur un nombre plus restreint de métabolites, qui sont liés à des voies métaboliques connues ou qui sont des biomarqueurs (des molécules qui peuvent être utilisées comme indicateurs d'un état biologique, pour la détection d'une maladie par exemple). L'objectif est de quantifier ces métabolites, mais avec une sensibilité bien plus importante. En effet, les métabolites ciblés étant connus, il est possible de sélectionner un nombre réduit de masse à observer, entraînant un gain de sensibilité important et permettant ainsi d'obtenir des limites de quantification bien plus basses qu'en métabolomique non-ciblée.

1.4. Applications

La métabolomique annonce des perspectives dans des domaines variés. Des recherches sont notamment menées en oncologie, et en particulier pour le diagnostic du cancer du sein⁶⁻⁹. Plusieurs études ont permis l'identification de plus de 30 métabolites endogènes dans les tissus mammaires¹⁰⁻¹³ comme par exemple la choline et la glycérophosphocholine, dont des niveaux respectivement élevés et bas sont corrélés avec l'apparition d'un cancer du sein, ce qui facilite son diagnostic.

Dans ce cas, la métabolomique par spectroscopie RMN peut être utilisée pour mesurer la choline, un biomarqueur du cancer du sein, lors d'un examen similaire à celui classiquement réalisé en imagerie par résonance magnétique¹⁴. Les données préliminaires indiquent que cette méthode pourrait réduire le nombre de biopsies, qui est une méthode de diagnostic très invasive. Bien que les résultats soient prometteurs, il est difficile d'obtenir une suppression des signaux de l'eau et des lipides suffisante pour permettre une quantification précise de la concentration en choline. De plus, la méthode souffre également d'une faible résolution spatiale, empêchant la détection de tumeur de taille réduite (inférieure à 2 cm)¹⁵.

Des perturbations caractéristiques du métabolome peuvent être également observées grâce à la métabolomique dans des maladies neurodégénératives telles que la sclérose en plaque^{16,17}. Huit métabolites ont des concentrations significativement plus basses dans le liquide cébrospinal de patients sains que dans celui de patients souffrant de sclérose en plaque^{18,19}. D'autres études établissent un lien entre une altération du métabolisme des neurotransmetteurs et des phospholipides chez les patients atteints de dépression²⁰, dont les biomarqueurs principaux sont l'acide

gamma-aminobutyrique, le glycérol et plusieurs acides gras. Il est ainsi possible de distinguer, parmi un panel d'individus, les patients sains de ceux affectés par la dépression. Dans notre cas, nous avons souhaité utiliser la métabolomique pour étudier les rétinoïdes, ceux-ci étant impliqués dans de nombreuses maladies.

2. Les rétinoïdes

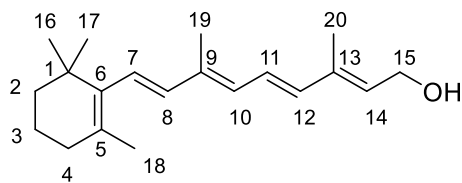


Figure 1. Structure du rétinol et numérotation des carbones

Les rétinoïdes sont une classe de molécules dérivés du rétinol (Figure 1), aussi appelé vitamine A. Ils sont composés de quatre unités isoprénoïdes et varient suivant le degré d'oxydation du carbone n° 15, mais également

suivant l'isomérisation des doubles liaisons. Les neuf principaux rétinoïdes sont présentés dans la Figure 2. On peut observer trois degrés d'oxydation du carbone terminal, l'alcool, l'aldéhyde et l'acide carboxylique, et trois familles d'isomères : *all-trans*, *9-cis* et *11-cis*.

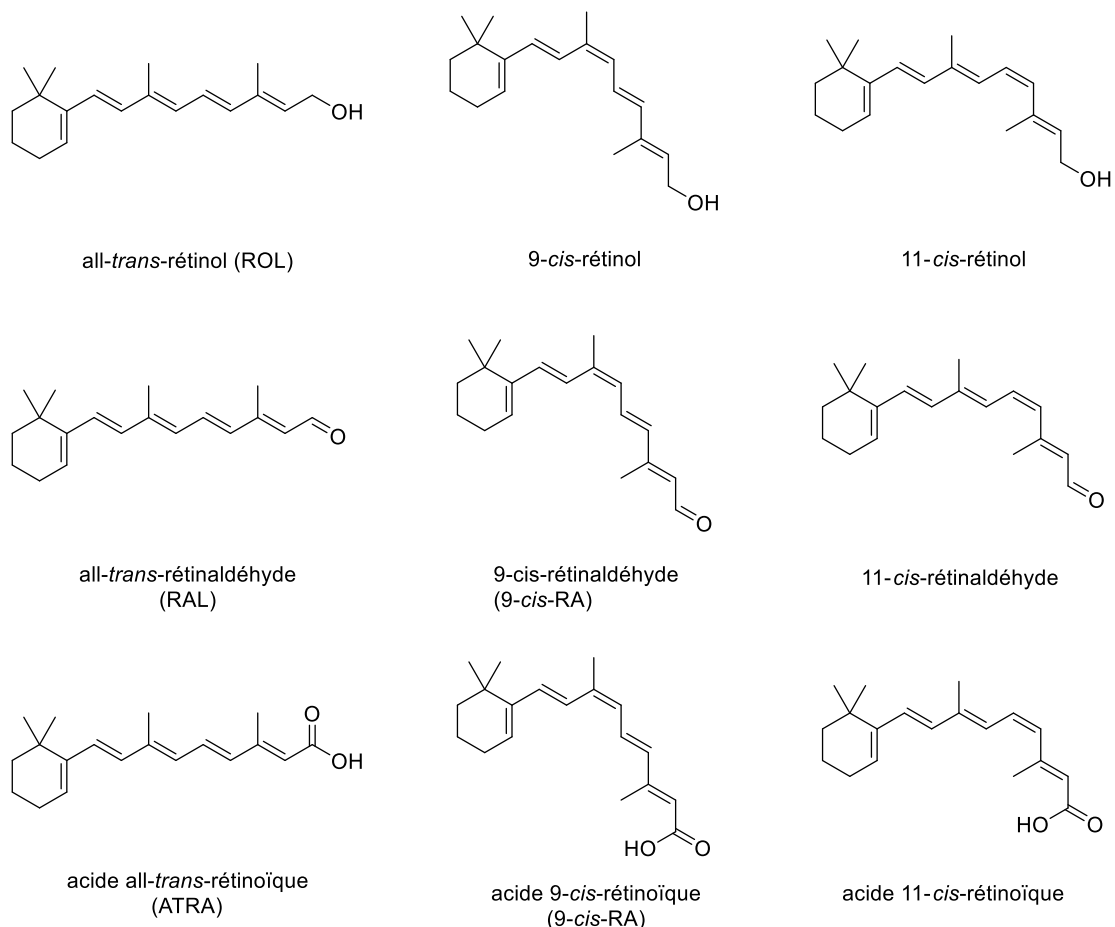


Figure 2. Structures des rétinoïdes majoritaires

La vitamine A est un micronutriment essentiel de l'alimentation, car elle ne peut pas être synthétisée *de novo* et est indispensable pour la vie. Cette vitamine est considérée comme l'une des vitamines ayant le plus de fonctions dans le corps humain²¹. Elle est impliquée dans le cycle de la vision, basé sur l'isomérisation d'une double liaison du 11-*cis*-rétinaldéhyde. C'est également une vitamine nécessaire afin d'assurer le développement normal d'un fœtus et le maintien de différentes fonctions chez l'adulte²². L'ensemble de ces rétinoïdes peut être transformé dans la voie métabolique des rétinoïdes, dont nous avons représenté une version simplifiée (Figure 3).

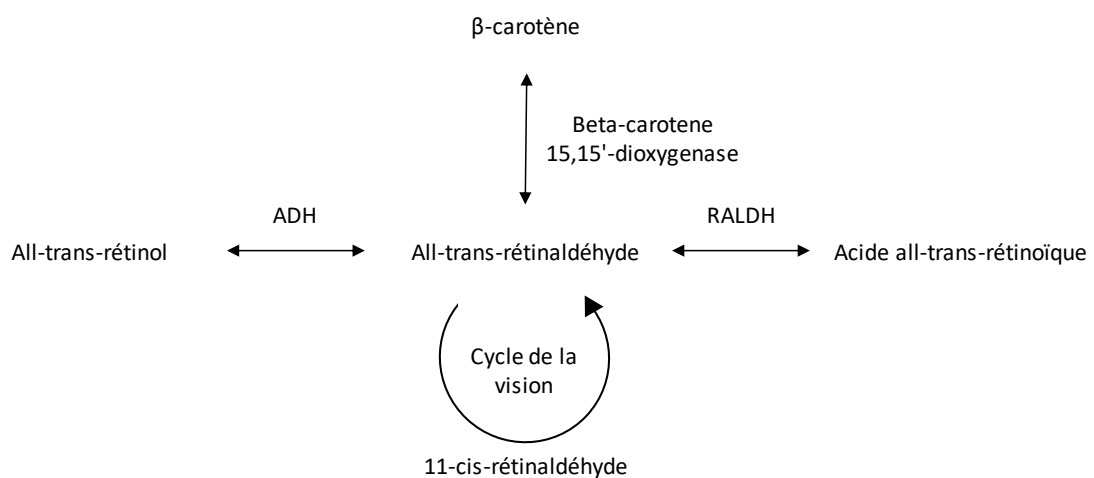


Figure 3. Voie métabolique simplifiée des all-trans-rétinoïdes chez l'animal

2.1. Voie métabolique et mode d'action

Les rétinoïdes sont obtenus à partir de caroténoïdes, et majoritairement à partir du β-carotène, présent en quantité dans de nombreux végétaux. Après avoir ingéré ces végétaux, le β-carotène est transformé dans les intestins²³ et pris en charge par une dioxygénase, le transformant en all-trans-rétinaldéhyde. Plusieurs enzymes permettant la transformation du rétinaldéhyde, tel que les enzymes ADH (pour alcool dehydrogenase, aussi appelée RDH pour retinol dehydrogenase), impliquées dans l'oxydation du rétinol en rétinaldéhyde, ou les enzymes de la famille RALDH (pour retinal dehydrogenase) qui sont capables d'oxyder le rétinaldéhyde en acide rétinoïque. Les rétinoïdes sont majoritairement stockés sous formes d'ester dans le foie.

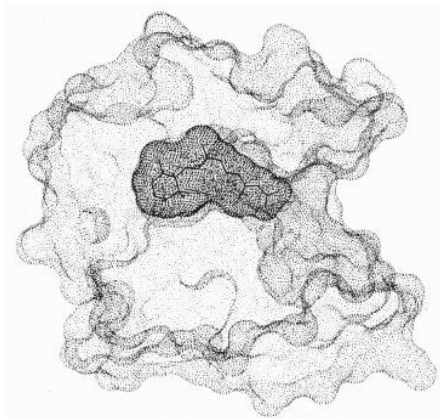


Figure 4. Section transversale de la poche de liaison de l'acide 9-cis-rétinoïque chez le rat¹²¹

Afin de les acheminer d'un endroit à un autre, les rétinoïdes, très hydrophobes, sont transportés avec le soutien de protéines de liaison du rétinol (retinol binding protein, RBP). Le rétinol, le rétinaldéhyde et l'acide rétinoïque peuvent se lier aux RBP (Figure 4) grâce à une poche hydrophobe qui les reconnaît spécifiquement et qui les protège²⁴.

Les rétinoïdes exercent leurs effets en se liant à deux types de récepteurs : les récepteurs de l'acide rétinoïque (RARs) et les récepteurs X de rétinoïdes (RXRs), chaque famille étant composée de trois paralogues (α , β et γ). La famille des RARs est activée par l'acide all-trans-rétinoïque (ATRA), mais également par le 9-cis-RA, tandis que la famille des RXRs n'est activée que par le 9-cis-RA^{25,26}. Ces deux récepteurs forment des hétérodimères et agissent comme des facteurs de transcription, qui dépendent du ligand. Ces récepteurs sont observés dans la plupart des tissus, et leurs concentrations sont particulièrement élevés dans l'hippocampe, le cervelet, l'hypothalamus et les testicules²⁷.

2.2. Impact sur le développement embryonnaire

Une carence complète en vitamine A durant le développement embryonnaire ne mène à une mortalité embryonnaire, tandis qu'une carence partielle mène à de sévères malformations, voire à la mort de l'embryon²⁸. Ces malformations congénitales sont appelées le syndrome de la déficience en vitamine A (vitamine A deficiency, VAD)²⁹. Un excès d'acide all-trans rétinoïque ou de ses analogues synthétiques, est aussi associé à des effets tératogènes, comme décrit chez des patients traités à l'acide 13-cis-rétinoïque (Roaccutane®), pour les maladies de la peau, tel que acné vulgaris³⁰. Ces observations indiquent qu'une signalisation équilibrée des rétinoïdes est nécessaire pour un développement embryonnaire normal. De nombreuses équipes^{31,32} ont modélisé cette carence en étudiant l'impact de l'absence de récepteurs aux rétinoïdes sur le développement embryonnaire de la souris. Par manipulation génétique, des souris mutantes n'exprimant pas certains types de récepteurs ont été générées,

conduisant à la présence de malformations embryonnaires. De manière similaire, une inactivation génétique des enzymes clés de la synthèse de l'acide rétinoïque reproduit la plupart des malformations de type VAD. Par exemple, une déficience en RALDH2 (enzyme responsable de la réduction de l'acide rétinoïque) mène à une absence de rotation axiale, à une fermeture incomplète du tube neural, à une réduction du torse, mais également à des malformations cardiaques graves²⁸. L'absence de RDH10 crée également des malformations nasales chez les foetus³². Grâce à ces expériences, et la possibilité de prévenir une grande partie du phénotype des malformations du VAD par un traitement aux rétinoïdes, il a été possible de mettre en évidence l'importance des rétinoïdes.

2.3. Maladies liées aux rétinoïdes

Malgré les nombreux effets biologiques des rétinoïdes, seules deux maladies sont clairement liées avec des mutations des protéines impliquées dans la signalisation de l'acide rétinoïque : acute promyelocytic leukemia, une leucémie résultant de la fusion du récepteur RAR α et du gène codant pour la protéine promyelocytic leukemia^{33,34}, et également de rares cas de mutations du récepteur RAR β ³⁵. Avec l'âge, la disponibilité de la vitamine A diminue et la baisse de signalisation par l'acide rétinoïque peut être d'autant plus importante chez les patients atteints de maladies neurodégénératives, tel qu'Alzheimer, la sclérose en plaque ou la maladie d'Huntington.

Il a été montré que le stress oxydant joue un rôle pathogène essentiel dans l'apparition de la maladie d'Alzheimer (MA)³⁶. Ce stress est associé à une baisse des concentrations plasmatiques de molécules antioxydantes, telles que la vitamine A ou à la baisse de la signalisation des récepteurs de l'acide rétinoïque³⁷. La prise d'antioxydants ou d'agonistes des RAR α par des patients ayant un déficit cognitif léger permettrait de diminuer ou retarder l'apparition de la MA^{38,39}.

Les rétinoïdes peuvent également jouer un rôle dans la pathogénicité de la sclérose en plaque, puisqu'ils agissent sur les récepteurs RXR, qui contribuent au processus de remyélinisation⁴⁰. Chez le rat, il a été démontré qu'un régime alimentaire dépourvu de rétinoïdes entraînait un défaut dans les voies de métabolisation et de signalisation cellulaire lié aux rétinoïdes, entraînant ainsi une perte de motoneurones et l'apparition de la sclérose amyotrophique latérale (SAL)⁴¹. Chez l'Homme, on observe également une diminution du nombre de motoneurones exprimant le RAR α chez les patients

atteints de SAL, comparé à des individus sains. Lors d'un essai clinique, une supplémentation en vitamine A chez ces patients a permis de ralentir la progression de la maladie⁴².

Récemment, il a été montré que l'acide all-trans-rétinoïque (ATRA) pourrait être intéressant comme traitement de la maladie d'Huntington (HD). Il a été montré que la protéine mutante huntingtine impliquée dans l'HD, réduirait l'expression de groupes de gènes associés aux voies de signalisations des rétinoïdes^{43,44}.

Ainsi les rétinoïdes pourraient être utilisés comme traitement pour compenser les perturbations pathologiques des voies de signalisation des rétinoïdes. Ils sont fréquemment utilisés pour le traitement de maladies de la peau, et en particulier pour l'acné, qui est traité par l'utilisation de l'acide 13-*cis* rétinoïque. Des médicaments agonistes des RAR ont déjà fait leur preuve en temps qu'antitumoraux dans le cas des leucémies et sont disponibles sur le marché^{45,46}. Cependant, l'utilisation de ce type de médicaments ou de l'acide rétinoïque dans le cas des maladies neurodégénératives reste encore hypothétique et nécessite encore des recherches pré-cliniques plus approfondies.

2.4. Problématique

Pendant plus d'un demi-siècle, l'ATRA était décrit comme étant la seule forme active de la vitamine A, produite à partir du rétinol en deux étapes, grâce aux enzymes RDH et ALDH1-3, générant respectivement le rétinaldéhyde et l'ATRA. Cependant, deux études publiées par l'équipe des Docteurs Dollé et Krezel, indiquent l'existence d'autres types de métabolites actifs de la vitamine A^{28,47}. Des souris ont subi une ablation génétique des enzymes Raldh2 (enzymes responsable de la conversion du rétinaldéhyde en acide rétinoïque), menant à des déficiences développementales importantes, allant jusqu'à la mort de l'embryon. Chez ces souris, un traitement à base d'acide rétinoïque ne permet pas de restaurer totalement la viabilité de l'embryon²⁸. De plus, chez des souris n'exprimant pas les enzymes RDH10 (enzymes transformant le rétinol en rétinaldéhyde), une mortalité embryonnaire est également observée, RDH10 régulant la voie de synthèse de l'acide rétinoïque⁴⁷. De manière similaire à l'exemple précédent, un traitement à l'acide rétinoïque ne permet pas de restaurer entièrement la viabilité de l'embryon, suggérant que l'acide rétinoïque ne serait pas la forme active principale de la vitamine A.

Il y a par conséquent un réel besoin d'identifier les métabolites actifs de la vitamine A, et de nouveaux rétinoïdes, tels que l'acide 9-*cis*-13,14-dihydro-rétinoïque, ont été détectés chez les vertébrés, et jouent un rôle important dans le contrôle des fonctions cognitives, sans effet développemental évident⁴⁸. Nous conjecturons qu'il serait possible d'identifier d'autres de ces métabolites en comparant, par exemple, des souris « wild-type », exprimant les enzymes impliquées dans la voie métabolique des rétinoïdes et des souris déficientes pour les enzymes RDH, qui ne devrait pas produire ces métabolites actifs. En comparant ces deux groupes, il serait possible d'identifier les métabolites obtenus à partir de la transformation du rétinol par les RDH.

Cependant, l'observation de métabolites rétinoïques dans un mélange complexe est très difficile car ceux-ci sont présents en faible quantité et sont mélangés à de nombreuses autres biomolécules. Leur étude est donc un défi. Nous proposons donc de développer une approche plus sensible permettant d'atteindre cet objectif.

3. Notre approche

Afin de déterminer les métabolites actifs de la vitamine A, nous proposons de développer une méthode permettant l'étude métabolomique. Celle-ci se base sur l'utilisation d'un analogue de la vitamine A contenant une fonction azoture. Cet analogue devrait être métabolisé de la même manière que la vitamine A mais également induire les mêmes réponses. Cette modification permettra la capture et l'identification de ses métabolites, via l'azoture, grâce à une réaction de la famille de

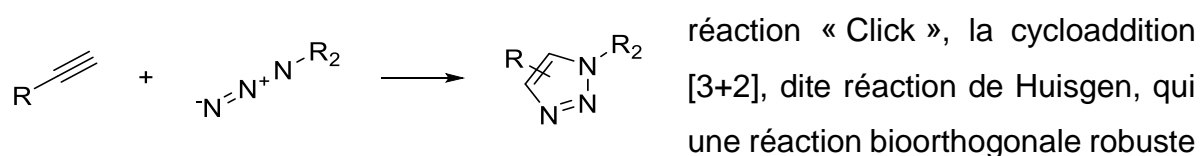


Figure 5. Schéma de la réaction de cycloaddition [3+2]

réaction « Click », la cycloaddition [3+2], dite réaction de Huisgen, qui est une réaction bioorthogonale robuste (Figure 5).

Elle est basée sur la réaction d'un azoture avec un alcyne et nécessite généralement l'utilisation d'un catalyseur au cuivre. Cependant, une alternative permet de s'affranchir de ce catalyseur, facilitant son utilisation. Cette alternative repose sur l'utilisation d'un alcyne cyclique tendu, classiquement de type cyclooctyne.

3.1.1. L'alcyne dans la réaction « Click » de Huisgen

Le BCN (bicyclo[6.1.0]nonyne, Figure 6), un alcyne cyclique tendu utilisé pour des réactions « Click » sans catalyseur a été sélectionné. Les rétinoïdes étant peu ionisables, nous proposons d'introduire une étiquette de masse afin de faciliter leur observation en augmentant leur signal en spectrométrie de masse. Nous avons choisi d'utiliser comme étiquette de masse le TMPP (tris(triméthoxyphényl)phosphonium) (Figure 6), qui est largement utilisé pour la détection de biomolécules marquées^{4, 5} et

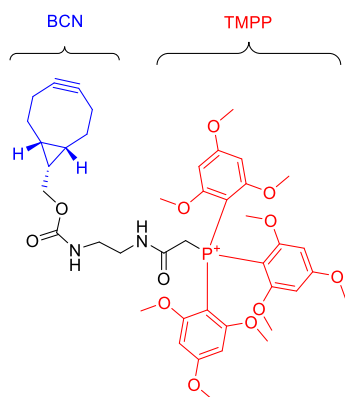


Figure 6. Structure du TMPP-alcyne

qui permet, grâce à sa charge permanente, d'augmenter l'abondance en ion des produits auxquels il est lié. Par cette méthode, un signal important sera obtenu en spectrométrie de masse, ce qui permettra d'en augmenter la sensibilité. De plus, son caractère hydrophobe permet, en LC, d'augmenter le temps de rétention des molécules capturées, déplaçant les pics dans une zone moins dense en molécules.

3.1.2. L'analogue du rétinoïde dans la réaction « Click » de Huisgen

L'autre groupement chimique impliqué dans la réaction de Huisgen est l'azoture. Le rétinol ne comportant pas de groupement azoture, nous avons dû introduire ce groupement dans sa formule chimique. Afin de pouvoir suivre son devenir *in vivo*, il est nécessaire que l'insertion du nouveau groupement ne perturbe pas sa prise en charge par les mêmes enzymes que le rétinol natif. Des simulations structurales ont montré que c'est principalement la chaîne insaturée qui participe à la reconnaissance des rétinoïdes. Par la même méthode, il a été montré que l'ajout d'une fonction en position 4 ou 10 ne devrait pas interférer avec la métabolisation du rétinol^{49,50}.

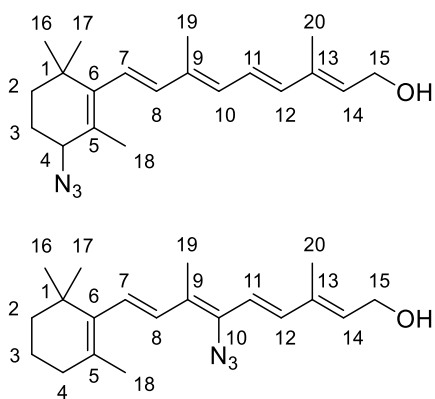


Figure 7. Structures des dérivés du rétinol

Ainsi, les deux stratégies envisageables sont l'ajout d'un azoture en position 4 ou en position 10 (Figure 7). Notre choix s'est porté sur l'ajout d'un azoture en position 4. En effet, de nombreuses publications décrivent la synthèse du rétinol à partir de dérivés de l'ionone (Figure 8), qui peut être facilement fonctionnalisé en position 4. Ainsi, cette stratégie semblait être la plus fiable.

La stratégie choisie a été de synthétiser l'azidorétinol en une synthèse multi-étape. De nombreux travaux décrivent la synthèse de rétinoïdes, dont certaines revues très complètes²².

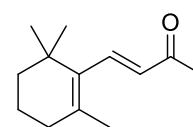


Figure 8. Structure de l'ionone

4. Synthèse de l'azidorétinol

4.1. Synthèse multi-étapes

Une analyse rétrosynthétique du 4-azidorétinol **(I)** a été effectuée (Figure 9). Celle-ci doit prendre en compte la compatibilité des synthèses avec la présence de la fonction azoture, qui est sujette aux réductions.

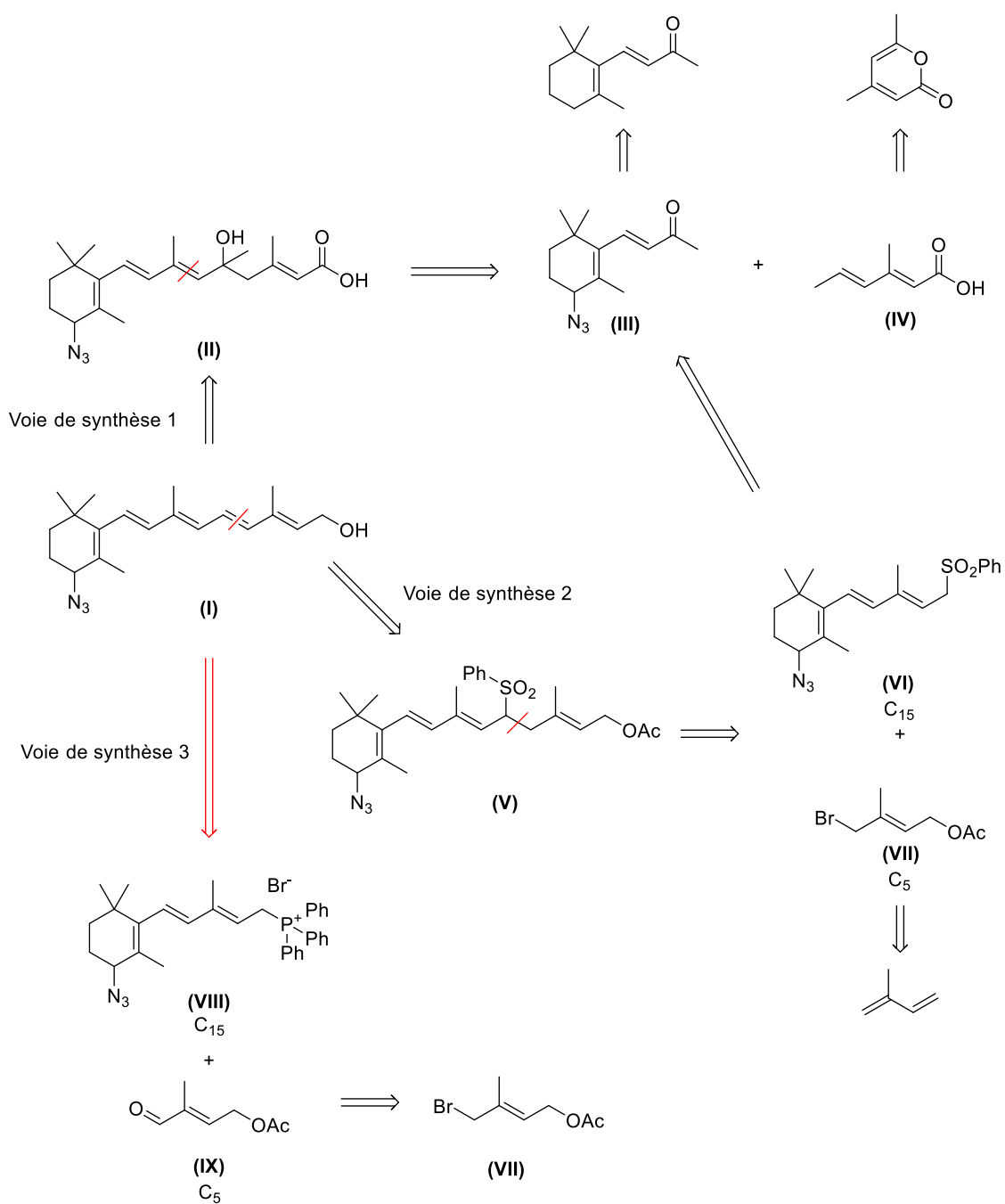


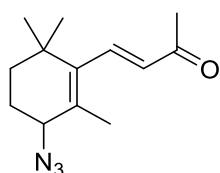
Figure 9. Analyse rétrosynthétique du 4-azidorétinol

Nous avons sélectionné trois voies de synthèse, obtenues à partir de deux fragments : Un C₁₃ et C₇, ou un C₁₅ et C₅.

La première voie de synthèse, basée sur la liaison de deux fragments C₁₃ et C₇ est décrite par Aurell⁵¹. Cette méthode repose sur la formation d'un bis-anion à partir de l'acide di-ène-oïque (**IV**) par action d'une base forte, la diéthylamidure de lithium. L'addition nucléophile de cette espèce active sur la cétone (**III**) mène au dérivé hydroxylé (**II**). Après une tosylation, cet alcool est éliminé pour mener à l'acide rétinoïque. L'acide rétinoïque serait ensuite réduit en conditions réductrices douces.

La seconde méthode de synthèse, décrite par Chabardes⁵² et Julia⁵³, repose sur un intermédiaire C₁₅ phénylsulfone (**VI**). Celui-ci peut être obtenu à partir de l'ionone (**III**) utilisée dans la voie de synthèse précédente. La phénylsulfone est alkylée par un dérivé halogéné C₅ (**VII**), permettant de générer un acétate C₂₀ (**V**). Celui-ci peut être saponifié et l'élimination de l'acide phénylsulfinique permet d'obtenir le rétinol.

La troisième approche se base sur une publication de Pommer⁵⁴, et permet d'obtenir l'acétate de rétinol à partir de l'intermédiaire phosphonium (**VIII**) via une réaction de Wittig. L'intermédiaire phosphonium (**VIII**) est également obtenu à partir de l'ionone (**III**) utilisée dans la première voie de synthèse. L'acétate est ensuite hydrolysé/saponifié pour aboutir au rétinol (**I**).



Nous pouvons observer que dans les trois voies de synthèse sélectionnées, l'ionone est un précurseur commun. Par conséquent, nos premières expériences ont été de synthétiser la 4-azido-β-ionone (Figure 10).

Figure 10.
Structure de la 4-azido-ionone

4.1.1. Synthèse de la 4-azido- β -ionone

En s'inspirant d'une publication de Ye⁵⁵ qui décrit la synthèse du 4-hydroxy-ionone à partir de l' α -ionone, nous avons proposé la voie de synthèse décrite dans la Figure 11. L' α -ionone **1**, commerciale, subit une époxydation de la double liaison non conjuguée par réaction de l'acide m-chloroperbenzoïque (mCPBA). L'époxyde **2** est ensuite ouvert par réaction du méthanolate de sodium dans le méthanol, pour donner la 4-hydroxy- β -ionone **3** avec un rendement, en deux étapes, de 60%. Puis, *in situ* dans le DMF, la fonction hydroxyle est mésylée et substituée par un azoture, avec un rendement de 62% pour obtenir la 4-azido- β -ionone **4**, soit un rendement global de 37%.

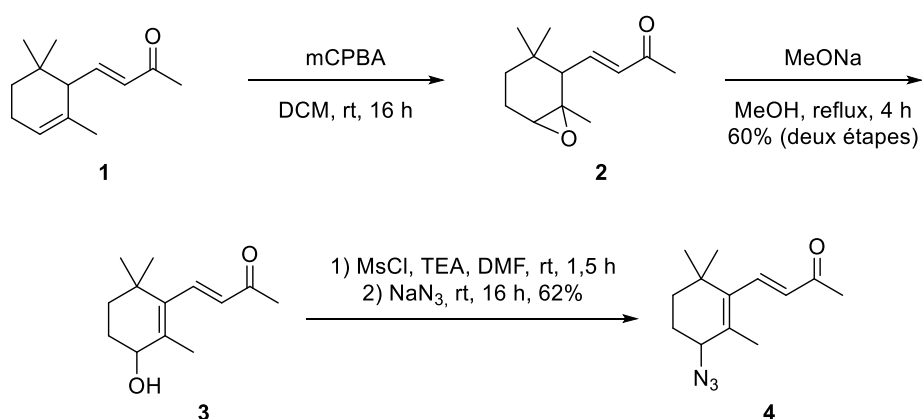


Figure 11. Voie de synthèse du 4-azido- β -ionone à partir de l' α -ionone.

Avec cette molécule en notre possession, nous avons continué nos expériences pour obtenir l'azido-rétinoïde, en commençant par l'approche décrite par Aurell⁵¹.

4.1.2. Approche d'Aurell par addition d'un acide di-ène-oïque

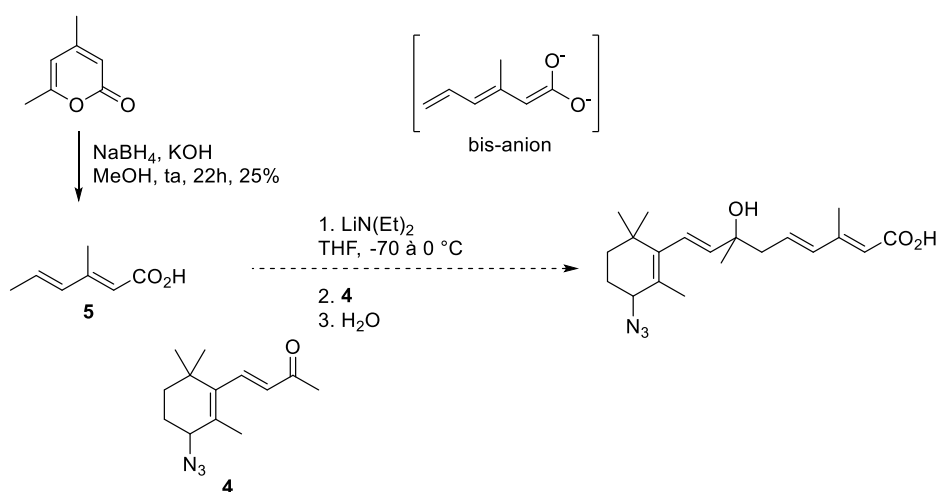


Figure 12. Synthèse de l'acide rétinoïque à partir de la β -ionone par addition d'un acide di-ène-oïque

L'acide di-ène-oïque **5** a été synthétisé à partir du 4,6-diméthyl-2H-pyran-2-one en condition réductrice dans le méthanol avec un rendement de 25% (Figure 12). Le-bis anion est formé à partir de cet acide, et réagit avec l'azido-ionone **4** afin d'obtenir un dérivé hydroxylé de l'acide rétinoïque par réaction d'une base forte sur l'acide di-ène-oïque **5** précédemment synthétisé. Lors d'une première étape, le diéthylamidure de lithium (2,2 équivalents) est préparé *in-situ* par réaction du *n*-butyllithium sur la diéthylamine à -10 °C dans le THF, pendant 30 minutes, avant que l'acide di-ène-oïque **5** ne soit additionné au mélange. Après 30 minutes, la cétone **4** est ajoutée. Après traitement du brut réactionnel, nous n'avons pas observé de réaction.

Nous avons alors décidé de vérifier s'il nous était possible de réaliser cette réaction sur une molécule plus simple en employant la 4-méthylpent-3-én-2-one comme molécule électrophile (Figure 13). En se basant sur le même mode opératoire, nous avons engagé cette cétone modèle. Les résultats sont similaires à ceux observés pour l' α -ionone, c'est-à-dire une non-conversion des réactifs de départ.

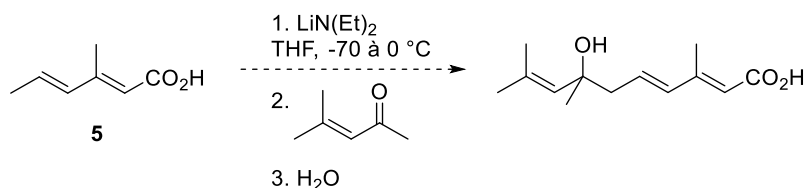


Figure 13. Réaction modèle avec l'acide di-ène-oïque

Afin de vérifier si l'absence de réaction provient de l'impossibilité de former le bis-anion, nous décidons de neutraliser l'intermédiaire bis-anion en ajoutant de l'eau deutérée (Figure 14). Si le bis-anion est formé, alors nous devrions observer un proton manquant sur le carbone terminal en RMN du proton. Les résultats indiquent qu'il n'y a pas incorporation du deutérium, et donc que le bis-anion n'est pas formé.

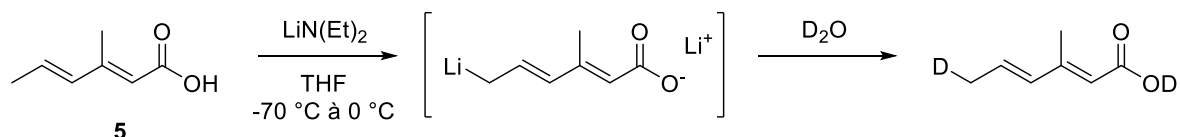


Figure 14. Vérification de la formation du bis-anion

Devant ces difficultés, nous avons pris la décision d'essayer une méthode alternative, faisant intervenir un intermédiaire phénylesulfone, qui est accessible à partir de l'ionone **4** synthétisée précédemment.

4.1.3. Approche de Julia par un intermédiaire phénylesulfone

Pour obtenir l'intermédiaire phénylesulfone, il est tout d'abord nécessaire de synthétiser l'azido-phénylesulfinate **7** qui peut être obtenu en deux étapes à partir de la 4-azido- β -ionone (Figure 15).

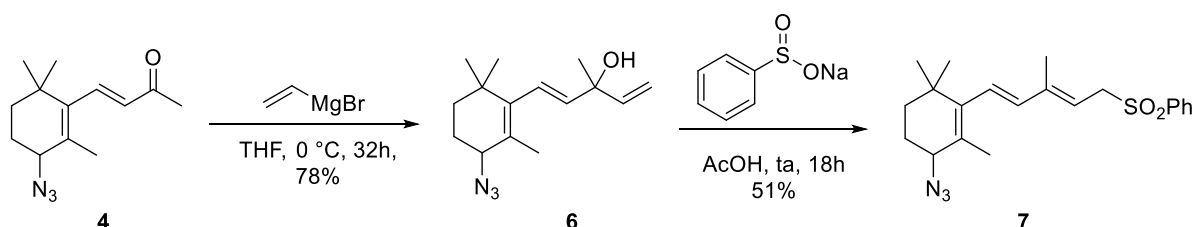


Figure 15. Synthèse du dérivé azido-phénylesulfone à partir du 4-azido- β -ionone

Un bromure de vinylmagnésium, fraîchement préparé, a été additionné sur la cétone, pour former un alcool divinyle avec un rendement de 78%. Le dérivé phénylesulfone **7** est ensuite obtenu par addition d'un équivalent de phénylesulfinate de sodium et déshydratation de l'alcool divinyle, permettant d'obtenir le produit avec un rendement de 51%.

Suite à la synthèse de ce composé, celui-ci sera engagé dans une réaction avec le produit halogéné **8** (Figure 16)

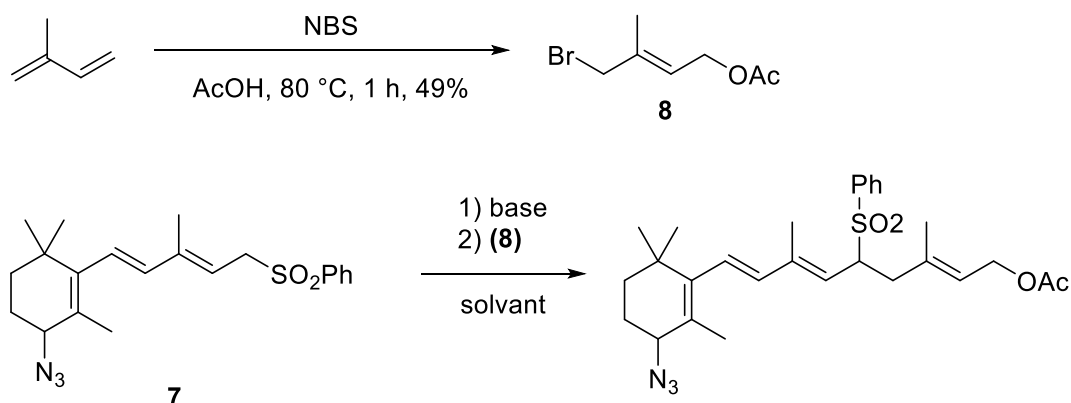


Figure 16. Tentative de synthèse du dérivé phénylsulfone

Le partenaire halogénure **8** est tout d'abord synthétisé à partir de l'isoprène en présence de *N*-bromosuccinimide (NBS) dans l'acide acétique, avec un rendement de 49%. Pour réaliser l'étape d'alkylation à partir de **7** et **8**, différentes bases et solvants (Tableau 1) ont été évalués en vue de déterminer les conditions optimales. La phénylsulfone **7** est solubilisée dans le solvant et cette solution est refroidie à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Puis, 1 équivalent de base est ajoutée. Après une heure, 1,5 équivalent d'halogénure **8** est ajouté puis la solution est agitée durant 3 heures.

Tableau 1. Couples de base/solvant testés pour la formation du dérivé phénylsulfone

Base	Solvant
<i>t</i> -BuOK	DMF
<i>t</i> -BuOK	THF
NaH	DMF
NaH	THF
LiHMDS	DMF

Indépendamment du couple de base/solvant que nous avons évalué, le brut réactionnel indique que nous avons une dégradation lors de la réaction. Devant l'impossibilité d'obtenir l'intermédiaire phénylsulfone, nous avons tenté une alternative

basée sur une réaction de Wittig, dont le phosphonium est accessible en une étape à partir de l'alcool divinyle **6**.

4.1.4. Approche par réaction de Wittig

Parce que le produit **9** est accessible plus rapidement, nous avons testé cette méthode sur l'alcool divinyle non azoté, synthétisé suivant la même méthode que le produit **6**. L'intermédiaire phosphonium **10** a été synthétisé en s'inspirant d'une publication de Pfander⁵⁶ par addition d'un équivalent d'hydrobromure de triphénylphosphine sur l'alcool divinyle **9** dans le méthanol (Figure 17) permettant d'obtenir le produit **10** avec un rendement de 24%.

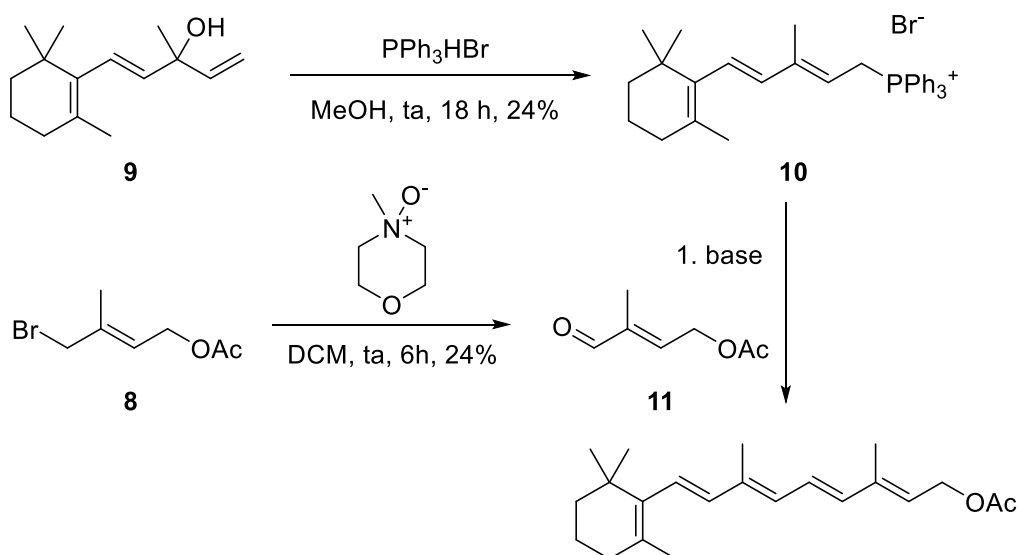


Figure 17. Tentative de synthèse de l'acétate de rétinol *via* une réaction de Wittig

Afin d'obtenir le second réactif de la réaction de Wittig, le produit halogéné **8** est impliqué dans une réaction d'oxydation de Kornblum, comprenant du bicarbonate de soude dans le DMSO afin de synthétiser l'aldéhyde **11** correspondant. Cependant, nous avons obtenu une faible masse du brut réactionnel, mais également une faible conversion. Une autre méthode, basée sur l'utilisation de N -méthylmorpholine- N -oxyde⁵⁷, a donc été employé afin d'obtenir l'aldéhyde **11** avec un rendement de 24%.

Une fois les molécules **10** et **11** obtenues, nous avons tenté de synthétiser l'azidorétinol en suivant la méthode décrite par Pommer⁵⁴. Cependant, l'utilisation de n -butyllithium pour la réaction de Wittig n'a pas permis d'obtenir l'acétate de rétinol.

Afin de valider nos conditions expérimentales, nous avons par conséquent testé la réaction de Wittig sur deux molécules modèles (Figure 18), dans différentes conditions détaillées dans le Tableau 2. Dans tous les cas, un équivalent de phosphonium **12**, d'aldéhyde et de base ont été utilisés et l'addition de l'aldéhyde a été effectué à -78 °C.

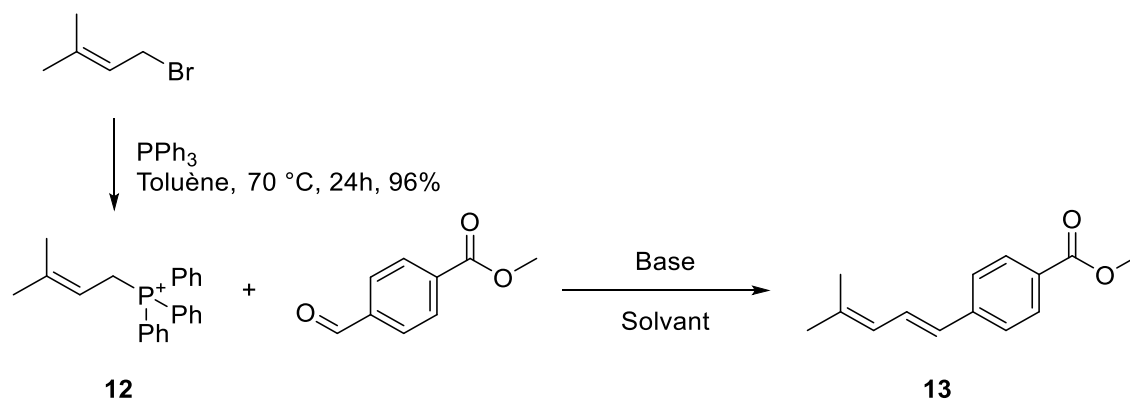


Figure 18. Test de la réaction de Wittig sur deux molécules modèles

Tableau 2. Conditions testées pour la réaction de Wittig modèle

Entrée	Base	Additif	Solvant	Rendement
1	<i>n</i> -BuLi	/	DMF	35%
2	NaOMe	/	DMF	23%
3	<i>n</i> -BuLi	/	THF	45%
4	<i>n</i> -BuLi	HMPA	THF	45%
5	LiHMDS	/	THF	24%

Dans le DMF, l'utilisation de butyllithium (entrée 1) a permis d'obtenir des rendements supérieurs au méthanolate de sodium (entrée 2). Le remplacement du DMF par du THF permet d'augmenter le rendement jusqu'à 45%. Dans le même solvant, le LiHMDS a également été testé, mais celui-ci permet d'obtenir un rendement moindre. L'ajout de hexaméthylphosphoramide (HMPA) à la réaction impliquant le butyllithium a également été évalué, d'après une expérience décrite dans la publication de Tani⁵⁸, mais il n'a pas eu d'effet sur le rendement de la réaction.

Les conditions de l'entrée 3 étant les plus optimales, nous les avons sélectionnés afin de les appliquer à notre autre réaction modèle, impliquant cette fois-ci le phosphonium **10** et l'aldéhyde utilisé précédemment (Figure 19).

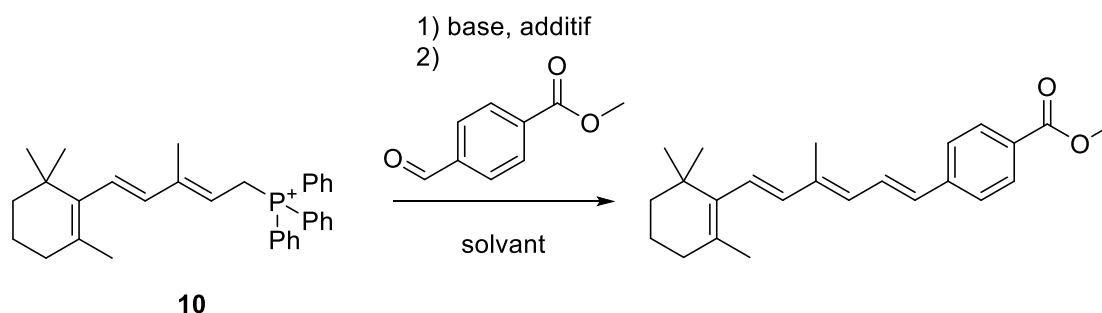


Figure 19. Tentative de synthèse via une réaction de Wittig

Dans ces conditions, le résultat obtenu a été la dégradation des produits de départ. Diverses conditions ont été testées (Tableau 3), afin de trouver des conditions permettant d'obtenir l'acétate de rétinol.

Tableau 3. Conditions testées pour la réaction de Wittig présentée en Figure 19

Entrée	Base	Additif	T (°C)	Temps (heures)	Solvant	Eq _{phosphonium}	Eq _{ald}
1	<i>n</i> -BuLi	/	-78	16h	THF	1	1
2	<i>n</i> -BuLi	/	-78	16h	THF	1	1.2
3	<i>n</i> -BuLi	/	-78	16h	THF	1.2	1
4	<i>n</i> -BuLi	/	-20	4h	THF	1.2	1
5	<i>n</i> -BuLi	/	-20	4h	DMF	1.2	1
6	<i>n</i> -BuLi	HMPA	-20	4h	DMF	1.2	1
7	Cs ₂ CO ₃	/	70	16h	DMF/dioxane	1.2	1
8	<i>n</i> -BuLi	Cs ₂ CO ₃	-20	16h	DMF	1.2	1

Nous avons fait varier le nombre d'équivalent, en ajoutant un faible excès de phosphonium ou d'aldéhyde (entrées 2 et 3), menant aux mêmes résultats. Souhaitant réduire la dégradation, nous avons essayé de réduire le temps de réaction en ne refroidissant la réaction qu'à -20 °C (entrées 4 et 5). Encore une fois, même avec des temps de réaction plus courts, aucun produit n'a pu être extrait du brut réactionnel. L'ajout de HMPA a également été testé (entrée 6), sans succès. Nous avons également utilisé le carbonate de césium (entrée 7), qui est décrit comme une base

utilisable dans des réactions de Wittig-Horner⁵⁹. Nous l'avons également utilisé comme un additif (entrée 8). Sur ces dernières expériences, les résultats ont été similaires en tout point à ceux précédemment obtenus, c'est-à-dire une dégradation totale du phosphonium.

Devant ces échecs répétés, une stratégie totalement différente de celles engagées jusqu'à présent, a été suivie. Elle repose sur une fonctionnalisation tardive du rétinaldéhyde.

4.2. Fonctionnalisation tardive du rétinaldéhyde

Cette partie a été initiée et réalisée par le Docteur Guilhem Chaubet, chargé de recherche nouvellement arrivé au laboratoire.

Cette fonctionnalisation tardive du rétinaldéhyde se base sur trois publications décrivant la synthèse du 4-hydroxy-rétinaldéhyde⁶⁰⁻⁶² à partir du rétinaldéhyde. La publication de Schreier décrit en particulier l'instabilité du brome allylique, dont il tire profit afin de générer un mélange de 4-hydroxy-rétinaldéhyde et de 4-acétoxy-rétinaldéhyde (Figure 20).

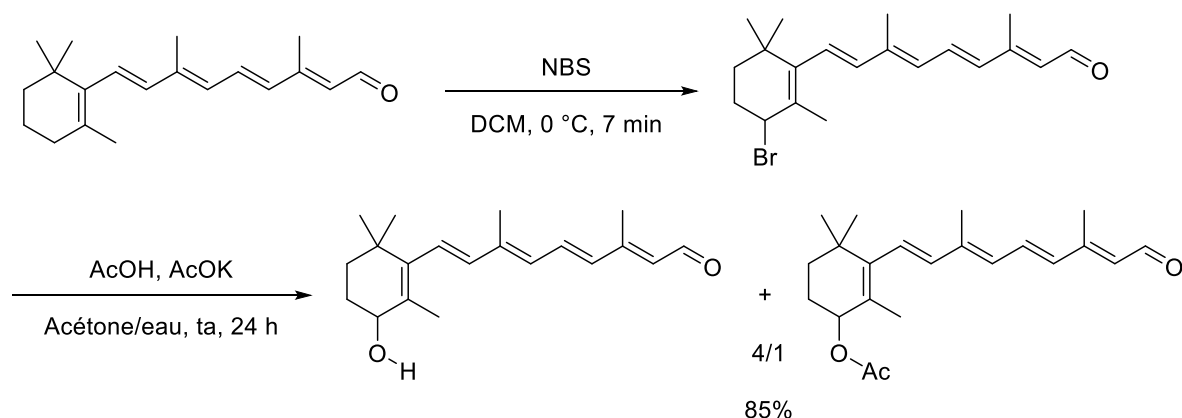


Figure 20. Hydroxylation « one-pot » en position 4 du rétinal, décrite par Schreier

Nous proposons donc de modifier cette réaction afin d'introduire, non pas un hydroxyle, mais un azoture en position 4. Pour ce faire, la réaction est établie suivant un protocole très similaire, impliquant le rétinaldéhyde, 1,1 équivalent de *N*-bromosuccinimide (NBS) et 10 équivalents d'azoture de sodium. Le rétinaldéhyde et l'azoture sont mélangés dans le dichlorométhane, puis une solution de NBS dans le DMF est ajoutée. Après purification, nous observons un produit dont les caractéristiques correspondent au 4-azido-rétinaldéhyde (azRAL) **14**. Cependant, des

impuretés, et en particulier le produit d'élimination (Figure 21), sont présentes, et ne

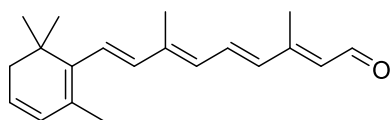


Figure 21. Structure du produit d'élimination

peuvent pas être séparées du produit.

L'ajout séquentiel du NBS puis de l'azoture de sodium (Figure 22) permet

de réduire la formation du produit d'élimination et d'obtenir le 4-azido-rétinaldéhyde (azRAL) **14** avec un rendement de 30%.

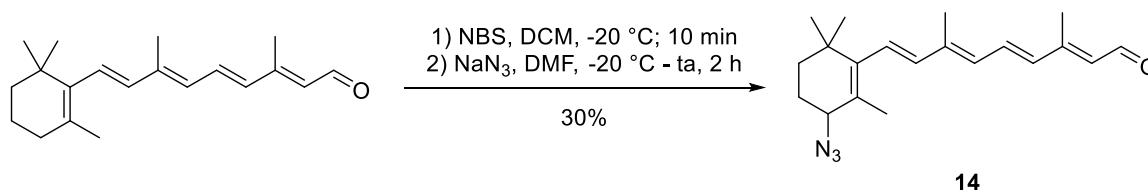


Figure 22. Synthèse du 4-azido-rétinaldéhyde (azRAL) à partir du rétinaldéhyde

5. Tests in vitro

Les expériences menées dans cette partie ont été réalisées avec le Docteur Wojciech Krezel, dans le laboratoire de Biologie du développement et cellules souches à l'Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC).

Afin de s'assurer que la fonction azoture ajoutée n'interfère pas sur l'activité biologique de l'analogue, nous avons mis en place, avec l'équipe du Dr. Krezel, des expériences permettant de vérifier si, de la même manière que le rétinaldéhyde, l'azRAL était en mesure de différencier les cellules du carcinome embryonnaire en neurones. Dans ces tests, des cellules non différenciées sont exposées à une concentration de 5 μ M de rétinaldéhyde ou d'azRAL afin d'induire une différenciation, puis l'expression de plusieurs marqueurs spécifiques des neurones a été analysée.

Pour les deux composés, nous avons obtenu 90% de cellules neuronales, caractérisées par l'expression de la protéine Tuj, un marqueur neuronal précoce. La population neuronale est homogène et est composée de 88% de neurones inhibiteurs de type GABAergique, caractérisés par l'expression du GAD67, une enzyme clé dans la synthèse du GABA. Finalement, il a été montré que ces neurones GABAergique différenciés *in vitro*, expriment la protéine DARPP32 et le récepteur dopaminergique D2 (DRD2). Ceci indique que les neurones possèdent des caractéristiques de neurones de projection faisant partie du circuit striatopallidal.

6. Conclusion et perspectives

Le 4-azidorétinaldéhyde a été synthétisé par une fonctionnalisation tardive du rétinaldéhyde, et nous avons pu démontrer qu'il avait une activité de différenciation cellulaire comparable à celle du rétinaldéhyde.

Il convient maintenant de synthétiser d'autres analogues azotures, tels que le 4-azido-rétinol et l'acide 4-azido-rétinoïque à partir du 4-azidorétinaldéhyde. Ces analogues pourraient être modifiés chimiquement, cependant, la fonction azoture étant sensible aux conditions réductrices et les rétinoïdes étant peu stables, nous avons décidé de les obtenir à partir d'une transformation enzymatique. Nous avons sélectionné des enzymes connues pour être impliquées dans la métabolisation du rétinaldéhyde, et qui devraient par conséquent être capable de modifier également l'azRAL. L'acide 4-azido-rétinoïque pourrait être produit à partir du 4-azido-rétinaldéhyde métabolisé par l'ALDH1A3⁶³ (aussi appelée RALH3), tandis que le 4-azido-rétinol pourrait être obtenu grâce à l'enzyme DHRS3⁶⁴.

Ces analogues pourront être injectés à des souris afin d'analyser leurs métabolites grâce à la réaction « Click » avec le BCN portant l'étiquette TMPP. Ceci permettra de mettre en évidence de nouveaux métabolites de la vitamine A.

Afin d'améliorer notre compréhension des métabolites de la voie des rétinoïdes, nous avons eu l'idée de développer une méthode complémentaire à la méthode de marquage métabolique, permettant l'observation du rétinaldéhyde, mais également d'autres métabolites aldéhydiques.

Chapitre 2 : Etude de l'aldéhydome par une approche métabolomique chimiospécifique

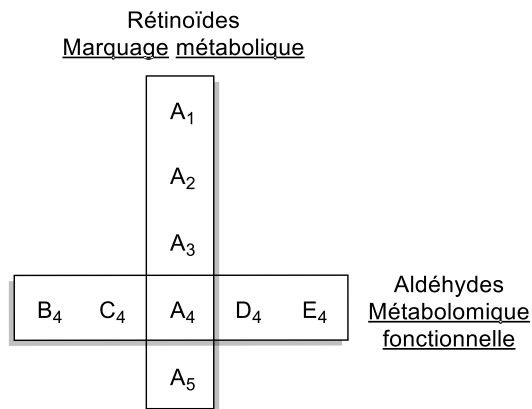


Figure 23. Représentation des deux stratégies complémentaires pour l'observation des métabolites des rétinoïdes et des métabolites aldéhydiques

Tandis qu'une première méthode permettant d'observer toute la cascade des rétinoïdes grâce au marquage métabolique a été présentée en première partie, nous proposons, dans cette seconde approche, de cibler spécifiquement les fonctions aldéhydes, et d'observer l'ensemble des métabolites possédant une fonction aldéhydique (Figure 23). Nous avons appelé cette méthode « la métabolomique chimiospécifique », car elle

repose sur l'utilisation d'une réaction chimique chimiospécifique. Pour faire un parallèle avec le métabolome, qui correspond à l'ensemble des métabolites, l'aldéhydome désigne l'ensemble des aldéhydes d'un échantillon. Le rétinaldéhyde, faisant partie des métabolites des rétinoïdes et étant un aldéhyde, pourra être observé suivant ces deux stratégies.

1. Les aldéhydes dans le vivant

La fonction aldéhyde est une fonction peu commune dans le vivant. Elle n'existe généralement que de façon transitoire, ou sous forme protégée. La famille des sucres

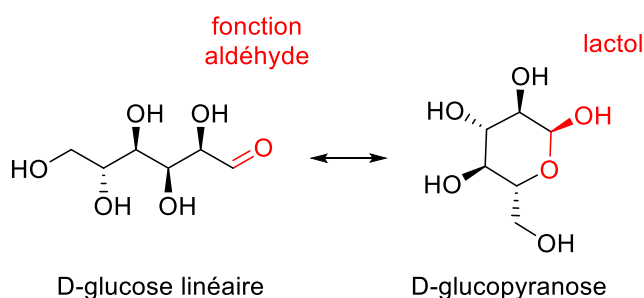


Figure 24. Structures du glucose linéaire et cyclique et représentation des fonctions aldéhyde et hémiacétal

comporte de nombreux aldéhydes, comme par exemple le glucose (Figure 24), dont la fonction aldéhydique est camouflée sous la forme d'un lactol. Différentes maladies peuvent cependant être associées à une variation ou

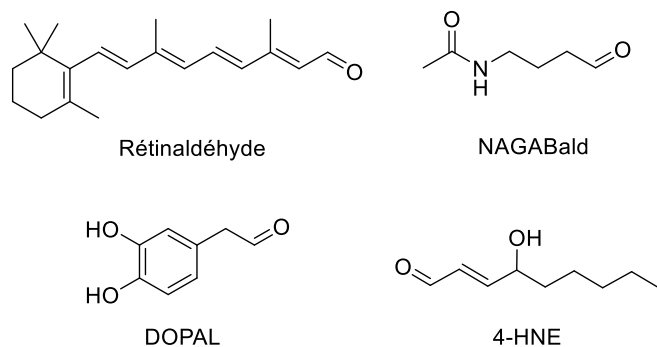


Figure 25. Structure des aldéhydes sélectionnés

de la concentration en aldéhydes, comme les molécules présentées dans la Figure 25. Le rétinaldéhyde, le NAGABald, le DOPAL et le 4-HNE sont des aldéhydes dont la variation peut être associée à différentes pathologies.

1.1. Le 4-hydroxynonéal (4-HNE)

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les sources oxydantes (les dérivés réactifs de l'oxygène, DRO) et les antioxydants. Ce stress est responsable de dommages dans différents types de tissus⁶⁵, et a été décrit comme pouvant être la cause du vieillissement⁶⁶. De ce déséquilibre résulte un excès de sources oxydantes, qui vont par exemple induire une peroxydation lipidique, un processus qui a lieu naturellement dans les organismes vivants, animaux comme végétaux⁶⁷. Des radicaux libres sont formés et peuvent attaquer des acides gras polyinsaturés, initiant une réaction en chaîne menant à la destruction des membranes lipidiques et pouvant induire une toxicité cellulaire importante⁶⁸. La peroxydation des membres lipidiques contribuent également à la formation de nombreux aldéhydes⁶⁹, eux-mêmes toxiques, qui peuvent agir comme source de toxicité secondaire et atteindre des cibles plus éloignées.

Parmi eux, le **4-HNE** est un aldéhyde α, β insaturé hautement réactif qui est responsable d'importants effets cytotoxiques. Il est capable, entre autre, d'inhiber la synthèse d'ADN et d'ARN⁷⁰. Des études indiquent que les radicaux libres pourraient être responsables de la mort neuronale dans la maladie d'Alzheimer⁷¹, faisant du 4-HNE un excellent biomarqueur de cette maladie neurodégénérative⁷²⁻⁷⁵.

1.2. Le 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde (DOPAL)

Les neurones dopaminergiques contribuent au contrôle des mouvements fins et sont impliqués dans la maladie de Parkinson, une autre maladie neurodégénérative. Des études montrent que cette maladie est caractérisée par une perte des neurones dopaminergiques. Ces neurones sont activés par la dopamine, dont le **3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde** (DOPAL) est un métabolite produit par la monoamine oxydase. Bien que le mécanisme soit méconnu, il est établi que parmi les métabolites de la dopamine, seul le DOPAL a une toxicité suffisante envers les neurones⁷⁶⁻⁷⁹. Il est donc intéressant d'étudier plus précisément l'occurrence de ce métabolite dans des modèles de maladie ou de thérapie de Parkinson, par exemple avec des biopsies de patients.

1.3. Le N-acétyl-γ-butyraldéhyde (NAGABald)

L'acide γ-aminobutyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central chez les mammifères. Des dysfonctionnements dans le système GABA peut mener à des troubles du système nerveux. Par exemple, une diminution de l'activité du système GABA est corrélée à des cas d'épilepsie ou de dépression^{80,81}, tandis qu'une augmentation de son activité peut mener à des cas de schizophrénie⁸². Ainsi, il serait intéressant de suivre le **N-acétyl-γ-butyraldéhyde** (NAGABald), qui est un intermédiaire aldéhydique lors de la biosynthèse du GABA.

Comme nous l'avons observé, les aldéhydes sont impliqués dans de nombreuses pathologies notamment neuronales. Afin de capturer ces aldéhydes, nous proposons d'exploiter leur réactivité particulière avec l'oxyamine via une réaction de ligation bien connue : la ligation oxime.

2. Stratégie de marquage des aldéhydes : la ligation oxime

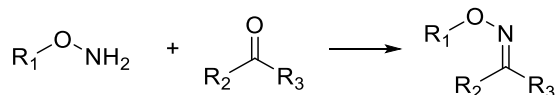


Figure 26. Ligation oxime

Cette réaction implique deux partenaires contenant une fonction aminoxy et une fonction carbonyle, qui vont réagir afin de former un éther d'oxime (Figure 26). La

ligation oxime possède plusieurs avantages : elle est chimiosélective, compatible avec les milieux aqueux et a pour seul produit secondaire une molécule d'eau.

Cette réaction est déjà utilisée pour de nombreuses applications. Elle est par exemple employée pour cycliser des peptides via une ligation intramoléculaire⁸³, mais également pour la synthèse de glycoconjugués⁸⁴.

La ligation oxime est utilisée pour détecter des produits carboxylés présents dans des échantillons environnementaux, tels que l'eau⁸⁵, la glace ou la neige⁸⁶. Une sonde fluorescente, comprenant une fonction aminooxy, est utilisée afin de capturer et de quantifier de petits aldéhydes. Il est intéressant de noter que les auteurs ont démontré que les éthers oxime sont stables en présence d'un excès de sonde, même dans des conditions favorables à leur hydrolyse.

La ligation oxime a également été appliquée *in vitro* et *in vivo*, pour une stratégie de ciblage du cancer⁸⁷. Pour ce faire, des liposomes portant un groupement oxyamine ont été injectés à des souris atteintes de cancer. Ces liposomes vont fusionner à la membrane des cellules cancéreuses, induisant l'expression en surface du groupement oxyamine. Des nanoparticules portant des fonctions aldéhydes peuvent ensuite réagir avec ces groupements oxyamine, permettant de marquer spécifiquement des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo*.

La ligation oxime est également appliquée *in vivo* à la détection de la fibrose pulmonaire⁸⁸, une lésion des poumons caractérisée par la présence d'un excès de tissu conjonctif. Au niveau de la fibrose, un certain nombre de résidus lysine sont oxydés en aldéhyde. Une sonde au gadolinium comprenant une fonction oxyamine a été injectée par voie intraveineuse chez des souris souffrant de fibrose pulmonaire. Cette sonde a permis de détecter la fibrogenèse par imagerie par résonance magnétique (IRM).

Ainsi, la réaction de ligation oxime a déjà été utilisée sur des échantillons environnementaux et sur des échantillons biologiques, *in vitro* et *in vivo*. Cette ligation est compatible avec des milieux aqueux, et peut même être exploitée dans des milieux biologiques. Ainsi, nous pourrions l'utiliser sur des échantillons de biopsies, mais également *in vivo*, si la sonde est distribuée. De plus, l'éther d'oxime formé suite à la réaction avec l'aldéhyde est stable sous certaines conditions^{86,89}. Nous avons donc estimé qu'elle serait applicable à la capture et la détection des métabolites aldéhydiques présentés précédemment. Afin de débiter ce projet, nous nous sommes tout d'abord penchés sur l'élaboration de la sonde.

3. Synthèse de la sonde ATPP

Pour pouvoir détecter et quantifier les aldéhydes, la sonde que nous avons élaborée devait comporter, en plus d'une partie aminoxy, une étiquette détectable en spectrométrie de masse. Nous proposons d'utiliser la même étiquette que celle utilisée dans la stratégie de marquage métabolique (voir Chapitre 1), le TMPP, qui possède l'avantage d'augmenter de manière significative le signal en spectrométrie de masse, mais également de déplacer le temps de rétention des molécules piégées lors d'une analyse LC.

La sonde est synthétisée en trois étapes (Figure 27).

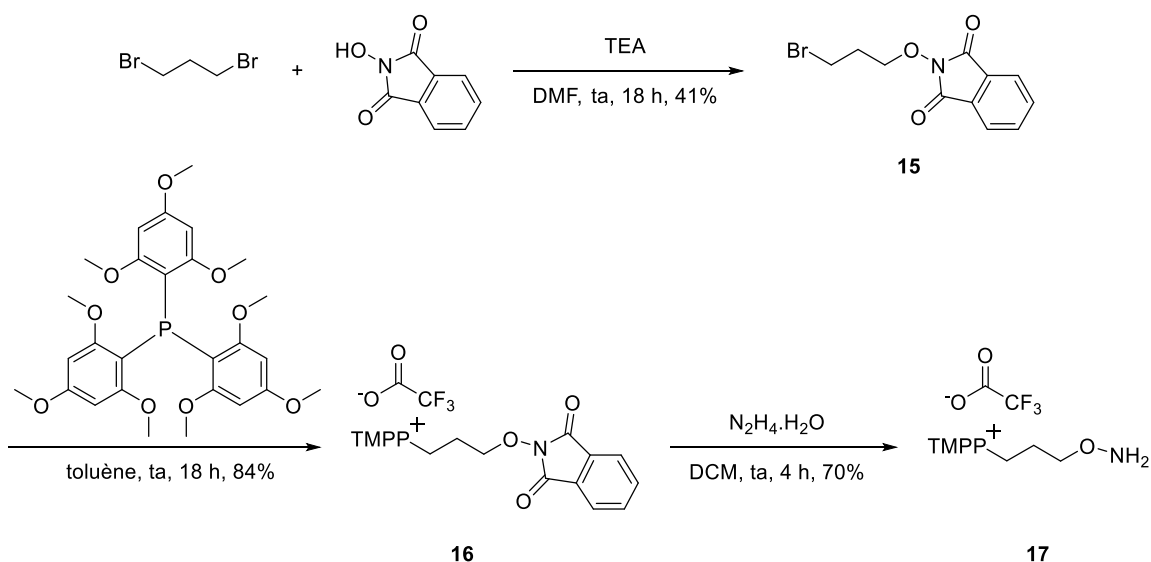


Figure 27. Synthèse de la sonde ATPP à partir du 1,3-dibromopropane

La première étape a été la monosubstitution du 1,3-dibromopropane par le *N*-hydroxyphthalimide dans le DMF, suivie de la substitution du second bromure par le TMPP dans le toluène. Enfin, le phthalimide **16** est déprotégé par action de l'hydrazine dans le DCM, menant à la sonde **17** ((3-(Aminoxy)propyl)Tris(2,4,6-triméthoxyPhényl)Phosphonium, nommée sonde ATPP) avec un rendement global de 24%.

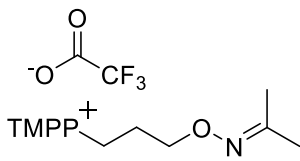


Figure 28. Structure de l'adduit de l'acétone

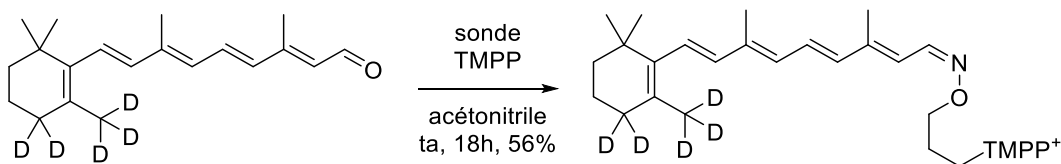
A noter que, dès l'étape de déprotection du phtalimide, la verrerie doit être exempte de traces d'acétone et la sonde ATPP doit être manipulée sous argon. En effet, les traces de cétone (dont celles présentes dans l'air), suffisent à contaminer la sonde ATPP en formant l'éther d'oxime correspondant (Figure 28).

Une fois la sonde synthétisée, nous avons tout d'abord vérifié si nous avons un gain significatif de signal en spectrométrie de masse, en mode positif, en comparant l'aldéhyde libre et son adduit après ligation oxime.

4. Evaluation du gain de sensibilité après réaction avec la sonde

Les travaux décrits ci-après résultent d'une collaboration entre notre laboratoire, le Docteur Wojciech Krezel travaillant à l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) et les Docteurs Dimitri Heintz et Julien Delecolle, travaillant à l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP).

Afin d'observer l'augmentation de signal du rétinaldéhyde dans le plasma après ligation avec la sonde ATPP, nous avons sélectionné le rétinaldéhyde-d₅, un analogue du rétinaldéhyde contenant des isotopes stables de l'hydrogène. L'utilisation d'un analogue permet de faire des mesures qui ne seront pas altérées par la présence de rétinaldéhyde endogène du plasma tout en ayant des propriétés d'ionisation très similaires au rétinaldéhyde. L'adduit du rétinaldéhyde-d₅ a été synthétisé (Figure 29). Afin d'éviter toute dégradation du rétinaldéhyde, la préparation de l'adduit est faite à l'abri de la lumière.



18

Figure 29. Structure du rétinaldéhyde-d₅ et synthèse de l'éther d'oxime correspondant

Deux gammes - de rétinaldéhyde-d₅ et de l'adduit correspondant - ont été préparées par dilution en cascade dans le plasma, à des concentrations allant du pM au mM. Les protéines dans le plasma étant incompatibles avec nos systèmes LC-MS, celles-ci sont précipitées par un ajout de 5 volumes d'acétonitrile. Après centrifugation, permettant de séparer les protéines du plasma et récupération du surnageant, les échantillons sont injectés en LC-MS. Les spectrogrammes des deux échantillons à une concentration de 100 µM sont présentés dans la Figure 30.

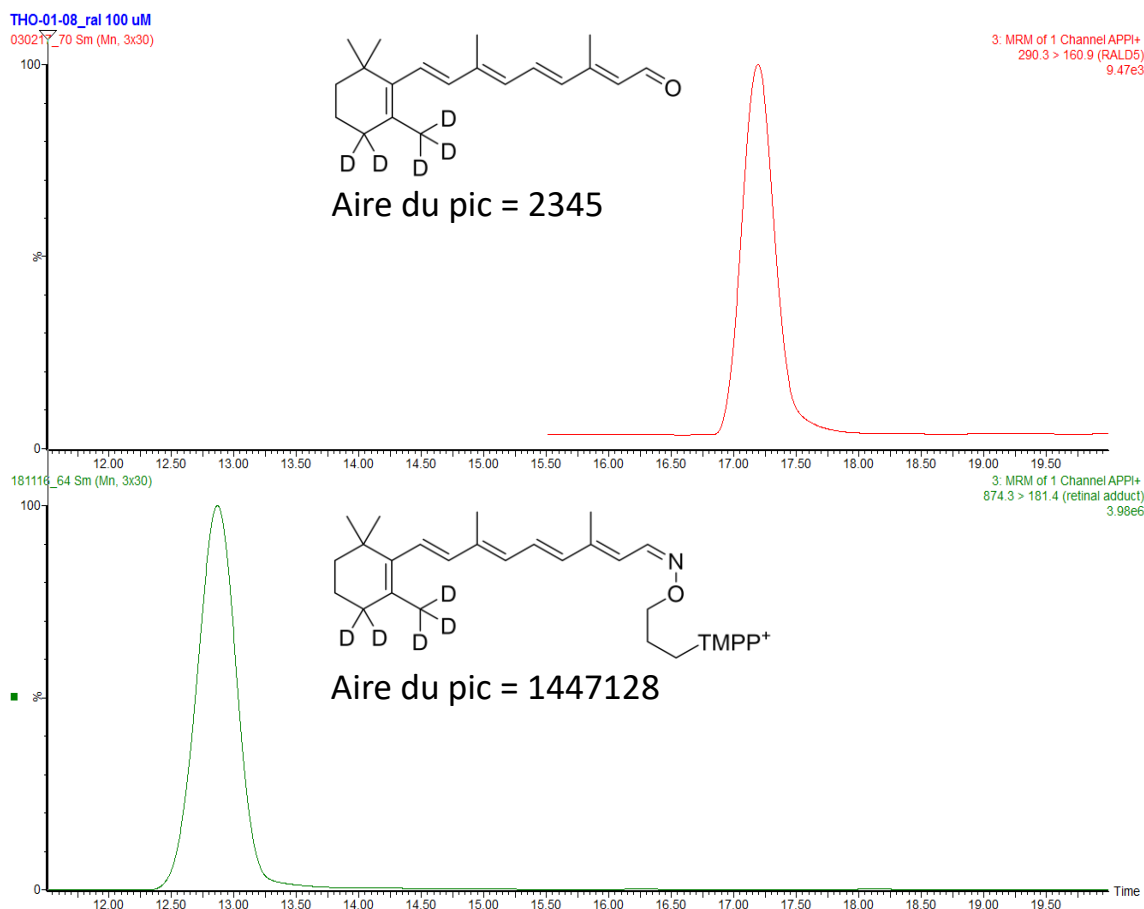


Figure 30. Spectres MS du rétinaldéhyde-d₅ (en haut) et de l'adduit correspondant (en bas) à 100 µM.

A une concentration de 100 µM, les aires du rétinaldéhyde-d₅ et de son adduit sont de 2 345 et 1 447 128 U.A. respectivement soit une augmentation du signal d'un facteur 600, confirmant l'augmentation de signal après ligation avec la sonde.

Nous avons également mesuré les limites de détection du rétinaldéhyde-d₅ et de son adduit dans le plasma, qui s'élèvent à 10 µM et 1 nM respectivement, soit une augmentation du signal d'un facteur 10.000 après ligation.

Suite à cette vérification avec le rétinaldéhyde-d₅, nous avons cherché à mettre au point une méthode analytique permettant d'observer et de discriminer les adduits des métabolites aldéhydiques cités dans l'introduction (Figure 25). Ceux-ci, en plus de leur intérêt biologique, couvrent également une vaste gamme de polarité et de taille, permettant la mise au point d'une méthode robuste et applicable à des métabolites variés.

5. Mise en place de la méthode analytique

Afin de mettre au point une méthode analytique fiable, la première étape a consisté en la synthèse des références des différents produits étalons.

5.1. Synthèse des références aldéhydiques

Afin d'obtenir une méthode suffisamment robuste, nous souhaitons être en mesure d'observer une vaste gamme d'aldéhydes, allant des composés très hydrophobes à des composés très hydrophiles. Le rétinaldéhyde, déjà présent dans notre liste de produits d'intérêt, est très hydrophobe. Afin d'avoir un aldéhyde hydrophile de petite taille qui nous permettra de calibrer notre méthode, nous avons également sélectionné le glycéraldéhyde (Figure 31).

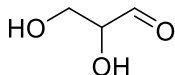


Figure 31.
Structure du
glycéraldéhyde

Les références des différents adduits permettront, d'une part, d'obtenir leur empreinte en spectrométrie de masse afin d'assurer leur identification, et d'autre part, de mettre au point la méthode utilisée en LC-MS² permettant de séparer les différents produits. En MS, la molécule ionisée, appelée ion parent, peut se fragmenter. Coupler un second spectromètre de masse, permet de mesurer la masse de ces fragments, appelés ions fils. Le couplage de ces deux spectromètres de masse est noté MS². Le couple ion parent/ion fils est semblable à une empreinte digitale et permet une identification d'autant plus fiable des analytes.

5.1.1. Synthèse de l'adduit du NAGABald

Le NAGABald n'étant pas commercial, nous avons dû le synthétiser, contrairement aux autres aldéhydes d'intérêt. Sa synthèse se base sur la stratégie établie par Rajabi et Saidi⁹⁰. A partir du 4,4-diméthoxybutan-1-amine disponible commercialement, l'amine est acétylée par l'anhydride acétique en milieu basique dans le dichlorométhane, permettant d'obtenir le précurseur du NAGABald **19** (Figure 32). Le NAGABald peut ensuite être formé en déprotégeant l'acétal.

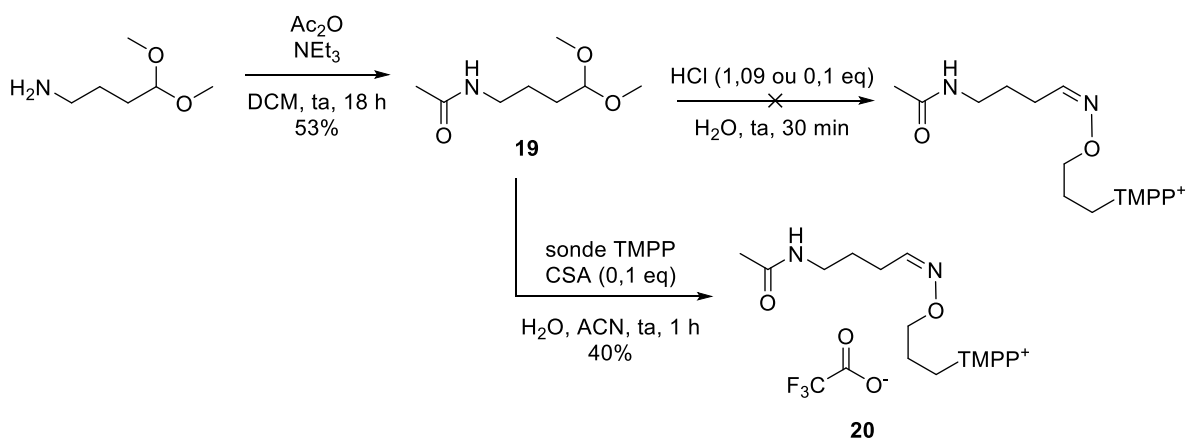


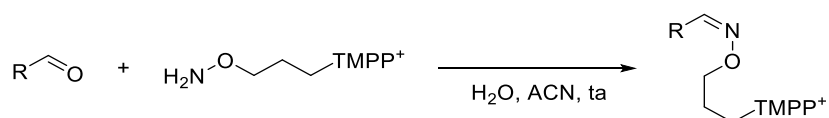
Figure 32. Synthèse de l'adduit NAGABald-sonde TMPP

La première méthode se base sur une publication de Struve et Christophersen⁹¹, et consiste en une déprotection de l'acétal en présence d'un léger excès d'acide chlorhydrique. Bien que le produit soit observé en LC-MS, celui-ci s'est dégradé lors de la lyophilisation du brut réactionnel. La réaction a alors été testée avec seulement 0,1 équivalent d'acide chlorhydrique, mais a conduit à des résultats similaires.

Finalement, plutôt que de déprotéger et d'isoler l'aldéhyde, nous proposons de le libérer *in situ*, en présence de la sonde ATPP, afin d'isoler directement l'éther d'oxime. L'acétal est ainsi mis en réaction en milieu acide (0,1 équivalent d'acide camphorsulfonique) dans un mélange eau/acétonitrile, nous permettant d'obtenir l'adduit **20** avec un rendement global de 21%.

5.1.2. Synthèse des adduits des autres aldéhydes

Concernant les autres adduits, ceux-ci ont été synthétisés en condensant l'aldéhyde commercial à la sonde (Figure 33). De manière générale, l'aldéhyde (1 équivalent) et la sonde ATPP (1.1 équivalent) sont solubilisés dans un mélange eau/acétonitrile 1/1 et sont mis à réagir à température ambiante jusqu'à réaction totale. Les adduits sont purifiés par HPLC préparative, avec des rendements allant de 49 à 65%.



Molécule	Aldéhyde	Rendement isolé (en %)
21	Rétinaldéhyde	51
22	DOPAL	57
23	Glycéraldéhyde	65
24	4-HNE	49

Figure 33. Synthèse des adduits aldéhyde-sonde TMPP et leurs rendements respectifs

5.2. Injection des différents adduits

Ayant synthétisé les différents adduits, l'objectif a ensuite été de mettre au point une méthode analytique permettant de séparer les pics lors d'une chromatographie en phase liquide en utilisant une UPLC-MS², équipée d'une colonne C₁₈. Les phases mobiles sont l'eau contenant 0,1% d'acide formique (solvant A) et le méthanol contenant 0,1% d'acide formique (solvant B). L'acide formique est classiquement utilisé afin de faciliter l'ionisation des analytes. La méthode consiste en un plateau de 1,5 minute à 95% de A, suivi d'un gradient, menant à 100% de B, en 13,5 minutes. Ce ratio est conservé pendant 2.5 minutes, avant de rincer en retournant aux conditions initiales en 1 minute. Cette méthode permet de séparer efficacement les différents produits synthétisés (Figure 34).

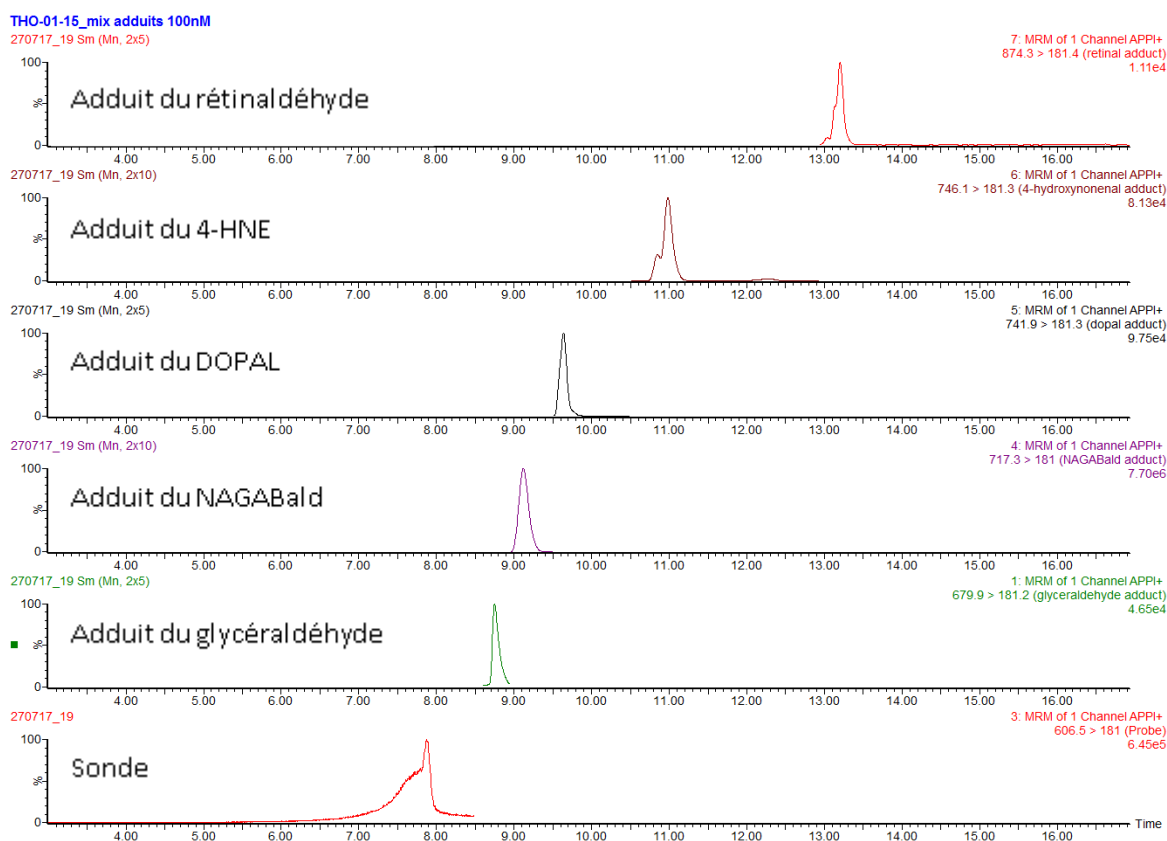


Figure 34. Spectrogrammes de la sonde et des différents adduits

Afin de connaître la sensibilité de notre méthode, nous avons mesuré la limite de quantification des différents adduits.

6. Mesure des limites de quantification et courbes de calibration

Les adduits ont été injectés suivant la méthode décrite précédemment afin de mesurer leur limite de quantification, qui est définie comme étant la concentration minimale en-dessous de laquelle il n'est plus possible de déterminer la concentration de l'analyte. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 35 et le Tableau 4. On observe que pour les quatre adduits analysés, les limites de détection sont de l'ordre de la dizaine de nanomolaire.

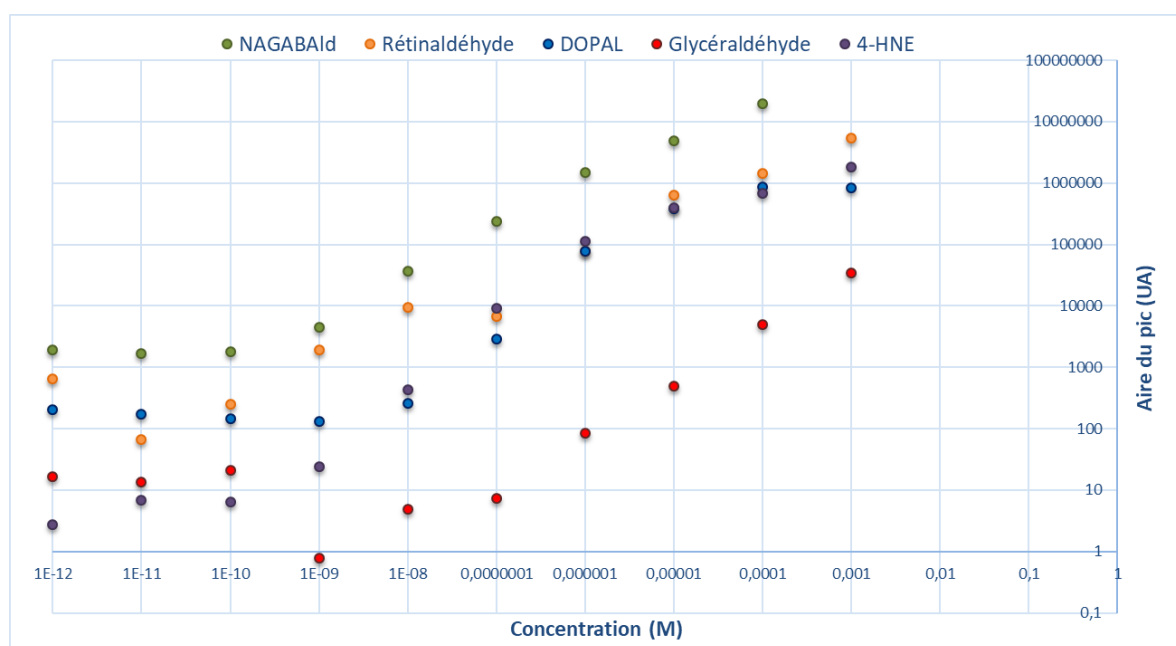


Figure 35. Aire des pics des différents adduits en fonction de leurs concentrations

Tableau 4. Limite de quantification des différents adduits

Adduits	Limite de quantification (M)	Limite de quantification (ng/mL)
NAGABald	10^{-8}	1,29
Rétinaldéhyde	10^{-9}	0,28
DOPAL	10^{-8}	1,5
Glycéraldéhyde	10^{-8}	0,9
4-HNE	10^{-9}	0,15

Suite à l'obtention de ces résultats, nous nous sommes demandés de quelle manière la sonde ATPP peut être utilisée.

La sonde peut être utilisée de différentes façons. Il est possible, soit d'extraire les organes et de traiter les échantillons biologiques *ex vivo*, soit d'injecter la sonde *in vivo* et de récupérer les organes contenant les adduits. La méthode *ex vivo* est utilisée classiquement en métabolomique et peut être utilisée sur différents types d'échantillons, tels que le foie, le cerveau ou le sang. Cependant, elle ne permet pas d'obtenir une analyse de la composition en métabolite de l'organe à un instant donné, et dans le cas de métabolites instables, ceux-ci pourraient être dégradés avant leur capture. La seconde méthode, quant à elle, pourrait permettre de capturer les métabolites aldéhydiques sur leur lieu de synthèse encore en fonctionnement. Cependant, il est nécessaire que la sonde ATPP soit transportée dans l'organisme et que celle-ci réagisse *in vivo* avec les aldéhydes endogènes.

7. Biodistribution de la sonde *in vivo*

Afin de vérifier s'il était possible d'utiliser la sonde ATPP en injection *in vivo*, nous avons mis en œuvre une expérience permettant de vérifier la biodistribution de celle-ci (Figure 36).

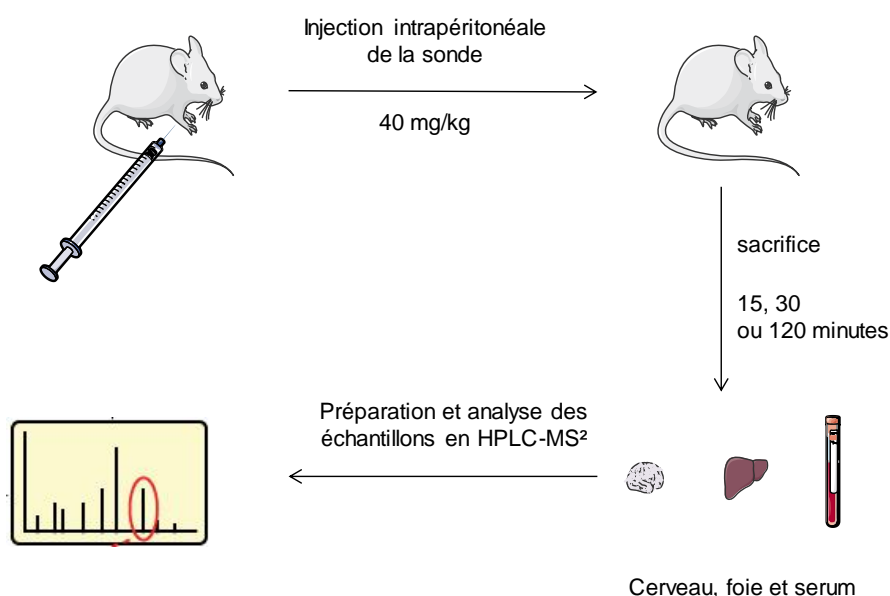


Figure 36. Mode opératoire pour l'observation de la biodistribution de la sonde *in vivo*

L'analyse de la biodistribution de la sonde ATPP a été réalisée sur des souris de souche C57Bl/6N âgées de 12 semaines au moment de l'expérience. Après injection intrapéritonéale (i.p.) de la sonde TMPP, les souris sont mises à mort à des temps

variables (15, 30 ou 120 minutes) par inhalation d'une dose mortelle de CO₂. La majorité du volume sanguin est récupéré et les organes (foie et cerveau) sont prélevés.

Les organes sont tout d'abord broyés avec un pilon, puis avec une sonde ultrason. Les organes broyés et le sérum, préparé à partir du sang mis en présence d'Héparine, sont ensuite préparés en extrayant les métabolites avec 5 volumes d'isopropanol avant de centrifuger les échantillons (5.000 tours par minute pendant 5 minutes). Les surnageants sont récupérés puis injectés en HPLC-MS².

Nous nous sommes concentrés sur la sonde libre et quelques aldéhydes qui sont présents dans les organes ciblés (le rétinaldéhyde, le glycéraldéhyde et l'acroléine avec des concentrations moyennes de 0,15 µM, 30 µM et 1,5 mM), afin d'avoir un aperçu de la biodistribution de la sonde ATPP et de ses adduits dans le plasma (Figure 37), le foie (Figure 38) et le cerveau.

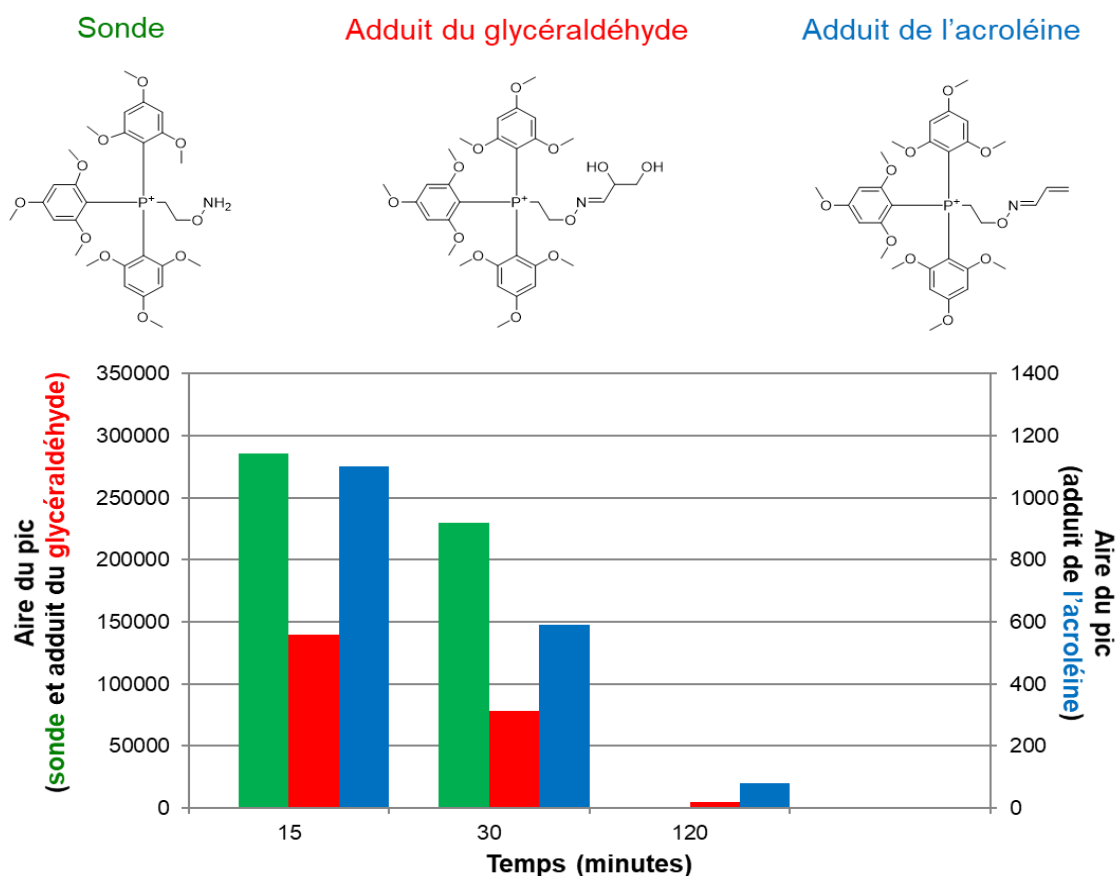
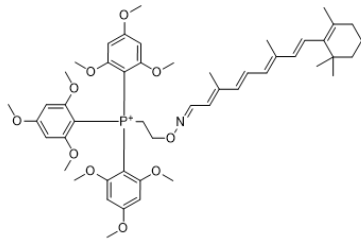


Figure 37. Evolution de la sonde et de ses adduits au cours du temps dans le plasma

Dans le plasma, la sonde ATPP et les adduits d'aldéhydes sont détectables dès quinze minutes. Leur concentration plasmatique diminue ensuite progressivement, étant probablement transportés vers le foie ou les reins ou encore excrétés. Après deux heures, seules de faibles quantités d'adduits sont encore observées.

Ainsi, nous avons pu observer que la sonde, après injection intrapéritonéale, est très rapidement distribuée dans le sérum et réagit avec des aldéhydes libres. Ceci peut s'expliquer par la haute vascularisation de la cavité péritonéale, qui permet une distribution rapide de la sonde et de ses adduits dans le plasma⁹². On peut observer que le signal correspondant à l'acroléine est environ cent trente fois plus faible que celui du glycéraldéhyde. Cet ordre de grandeur est en adéquation avec HMDB (Human Metabolome DataBase), qui indique une concentration moyenne cinquante fois plus faible pour l'acroléine, comparé au glycéraldéhyde.

Adduit du rétinaldéhyde



Adduit de l'acroléine:

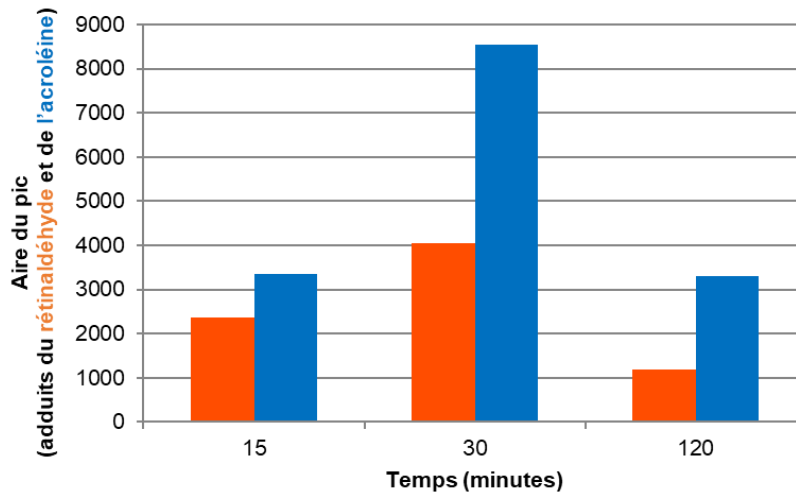
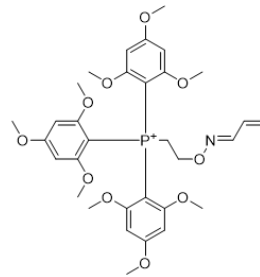


Figure 38. Evolution des adduits de métabolites au cours du temps dans le foie

Dans le foie, l'adduit du rétinaldéhyde est observé dès quinze minutes, et sa concentration augmente jusqu'à trente minutes. Après deux heures, la valeur a nettement diminué. Le foie étant un organe hautement vascularisé, il n'est pas étonnant d'y voir apparaître les adduits de la sonde qui ont dû se former dans le sang. De plus, la tendance des concentrations (un maximum étant atteint après trente minutes), peut être expliquée par la distribution de la sonde. En effet, les composés injectés en i.p. passent par la circulation hépatique avant d'être distribués à d'autres organes⁹³, pouvant expliquer un signal maximum plus tardif, par rapport au sérum. La sonde sous forme libre, quant à elle, n'est observée à aucun moment dans le foie.

Dans le cerveau, ni la sonde, ni les adduits de la réaction de ligation oxime n'ont pu être observés, ceci semblerait indiquer que la sonde ne passe pas la barrière hémato-encéphalique⁹⁴. Il a été décrit qu'un petit poids moléculaire et une haute hydrophobicité peut favoriser ce mécanisme de diffusion⁹⁵. Le poids moléculaire de la sonde est important, ce qui pourrait expliquer pourquoi on ne la retrouve pas dans le cerveau, malgré son taux de circulation dans le sang.

8. Conclusions et perspectives

En conclusion, nous avons mis au point la sonde ATPP permettant de capturer des aldéhydes en se basant sur une réaction de ligation oxime. La sonde est synthétisée à partir du 1,3-dibromopropane, en trois étapes, avec un rendement global de 24%. Il a été montré que la limite de détection du rétinaldéhyde-d₅ est 10 000 fois plus basse après la réaction de ligation oxime avec la sonde. Les adduits des aldéhydes d'intérêt ont été synthétisés et injectés afin de mettre au point une méthode permettant de les discriminer en UPLC-MS². Une analyse de la biodistribution de la sonde ATPP chez la souris a également été faite, montrant une distribution rapide de la sonde dans le sang mais également dans le foie. La méthode est fonctionnelle et nous pouvons donc espérer la valider sur une approche différente, développée ci-après.

Des expérimentations supplémentaires sont prévues afin de valider l'analyse de l'aldéhydome *in vivo* sur des échantillons pertinents pour la maladie de Huntington chez la souris. L'acide 3-nitropropionique (3NP) sera utilisé afin d'induire la maladie de Huntington chez les souris. En effet, il est responsable de l'induction d'une production anormale de dérivés réactifs de l'oxygène, qui sont responsables du stress

oxydant, provoquant une perte des neurones. Ainsi, nous essayerons d'observer les variations de l'aldéhyde entre des souris saines et des souris souffrant de la maladie de Huntington.

De plus, des expériences préliminaires ont montré la présence d'un ion fils ($m/z = 181.0859$), commun à tous les adduits synthétisés. Nous envisageons d'utiliser cet ion fils afin permettre la discrimination des adduits de la sonde ATPP parmi l'ensemble des masses analysées dans un échantillon. Pour ce faire, la masse de cet ion fils serait recherchée parmi l'ensemble des ions fils mesurés. Les masses des ions parents correspondant à cet ion fils pourraient alors être retrouvées.

Chapitre 3 : Elaboration d'un réactif de couplage

« thiol-thiol » homobifonctionnel

Les travaux présentés dans ce chapitre ont été menés dès le début de la thèse dans le cadre d'un projet secondaire. Ce chapitre est principalement composé de la traduction d'une publication à paraître très prochainement et a été complété par les différences expériences menées dans le cadre de ce projet.

1. Introduction

Les avancées récentes dans le domaine des réactifs de couplage hétérobifonctionnels ont permis la construction de biomolécules hybrides via des stratégies de couplages chimiosélectifs séquentiels.

La différence de réactivité entre les groupements sulfhydrile et amine est souvent exploitée afin de créer des réactifs de couplage « amine-thiol », comme par exemple le SMCC^{96,97} (succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate), qui permet le couplage de protéines, via leurs lysines, à des réactifs contenant des thiols. Ces réactifs ont joué un rôle déterminant dans le développement de nouvelles biothérapies, tels que des conjugués anticorps-drogue (ADC)⁹⁸⁻¹⁰⁰, des peptides marqués utilisés pour le ciblage cellulaire^{101,102}, des protéines permettant la délivrance de drogues^{8,103}, des matrices pour l'immobilisation de protéines¹⁰⁴ ou des marqueurs facilitant l'étude des protéines¹⁰⁵.

Cependant, ces réactifs de couplage « amine-thiol » montrent certaines limitations. En effet, l'abondance de lysine dans les protéines mène à un degré de conjugaison (le nombre d'attache par protéine) difficile à contrôler¹⁰⁶. Contrôler ce degré de conjugaison durant l'étape de couplage nécessite une optimisation parfois fastidieuse, car les esters activés sont instables.

Ainsi, une stratégie de couplage « thiol-thiol » semble être une stratégie bien plus fiable. En effet, les groupements sulfhydriles, bien que peu abondants, sont omniprésents dans les molécules biologiques¹⁰⁷ et peuvent facilement être introduits dans des biomolécules par mutagénèse dirigée^{108,109}, permettant de contrôler le degré et le site de conjugaison. De plus, la haute nucléophilicité des thiols permet des réactions très chimiospécifique avec des électrophiles réactifs.

Cependant, malgré ces avantages théoriques, la stratégie de couplage « thiol-thiol » a été peu exploitée. Aujourd'hui, deux molécules contenant des thiols sont le plus souvent assemblées via la formation d'un pont disulfure, dont l'un des inconvénients majeurs est l'instabilité du conjugué dans des conditions réductrices, mais également son échange avec d'autres thiols.

Afin de contrebalancer ces inconvénients et obtenir un couplage « thiol-thiol » efficace, le réactif de couplage bifonctionnel devrait remplir un certain nombre de caractéristiques. Il devrait être hautement chimiosélectif envers la fonction sulfhydryle, tout en étant suffisamment réactif pour que la réaction soit biocompatible. De plus, le réactif de couplage devrait être stable dans l'eau et former des adduits stables. Sa caractéristique la plus importante est qu'il devrait avoir une discrimination cinétique suffisamment importante entre la première et la seconde étape de couplage afin d'éviter la formation de produits indésirables, tels que des produits d'homocouplage.

Suivant ce raisonnement, le laboratoire a récemment décrit le premier réactif de couplage « thiol-thiol » cinétiquement résolu, conçu en connectant le groupement arylpropiolonitrile (APN), hautement chimiosélectif, à un groupement maléimide¹¹⁰. Bien qu'atteignant une très bonne discrimination cinétique, ce réactif est limité par certaines caractéristiques intrinsèques au maléimide, c'est-à-dire sa chimiosélectivité parfois limitée (en particulier avec un excès d'amine libre) et la faible stabilité des réactifs et de leurs adduits^{111,112}.

Nous proposons de nous affranchir du groupement maléimide dans le réactif de couplage en utilisant deux fonctions APN portées par la même structure, puis d'ajuster leur réactivité afin d'atteindre une discrimination cinétique. Ainsi, il serait possible d'obtenir une mono-addition contrôlée d'un thiol sur notre réactif de couplage. De plus, l'utilisation de la fonction APN permet un haut degré de chimiosélectivité et une bonne stabilité plasmatique des adduits.

2. Conception du réactif de couplage homobifonctionnel

Afin d'atteindre cet objectif, nous avons tout d'abord synthétisé un réactif de couplage bifonctionnel, le phényl-1,4-dipropiolonitrile (PDPN) non substitué, et nous avons évalué la discrimination cinétique obtenue en ajoutant l'équivalent d'un thiol à ce réactif.

2.1. Synthèse du PDPN et mesure de sa réactivité¹

Le PDPN a été synthétisé en deux étapes (Figure 39). La première est un couplage de Sonogashira entre le 1,4-iodobenzène et deux équivalents d'alcool propargilique. Puis, *in situ*, chaque fonction alcool a subi une oxydation par l'oxyde de manganèse activé, pour former deux aldéhydes. Ces aldéhydes ont ensuite subi une condensation avec l'ammoniac pour former les imines correspondantes, qui ont ensuite été oxydées par le manganèse activé en groupement nitrile. Le PDPN a ainsi été obtenu avec un rendement global de 12 %.

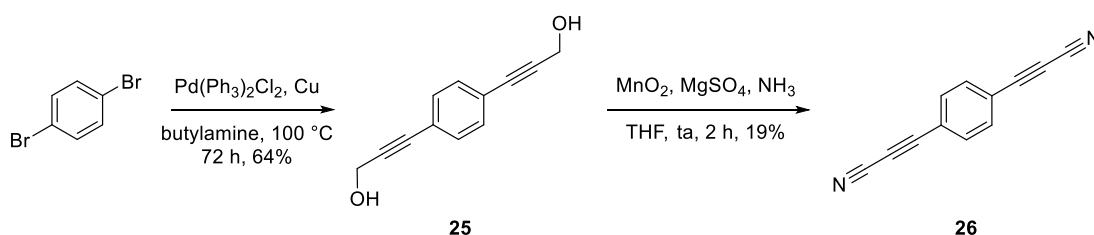


Figure 39. Synthèse du PDPN à partir du 1,4-dibromobenzène

Afin d'évaluer la discrimination cinétique obtenue lors d'une réaction d'un thiol sur le PDPN, 1 équivalent de cystéine (10 μM , 5 μL) solubilisé dans l'eau a été ajouté à 1 équivalent de PDPN (5 μM , 10 μL) dans un mélange 1/1 acétonitrile / PBS (1X, pH = 7,3). La réaction est ensuite suivie en injectant 10 μL de cette solution via un échantillonneur automatique en HPLC. La conversion a été estimée en mesurant la surface UV des pics et en calculant le rapport des pics PDPN / produit de mono-addition de la cystéine (cystéine-PDPN) / produit de la double addition de cystéine (cystéine-PDPN-cystéine). Les résultats obtenus sont de 32, 55 et 13% respectivement (Figure 40).

Ces résultats montent une addition statistique indiquant que les deux APN réagissent de manière indépendante avec le thiol, sans influencer le couplage de l'un par rapport

¹ Le PDPN a été synthétisé par le Docteur Oleksandr Koniev

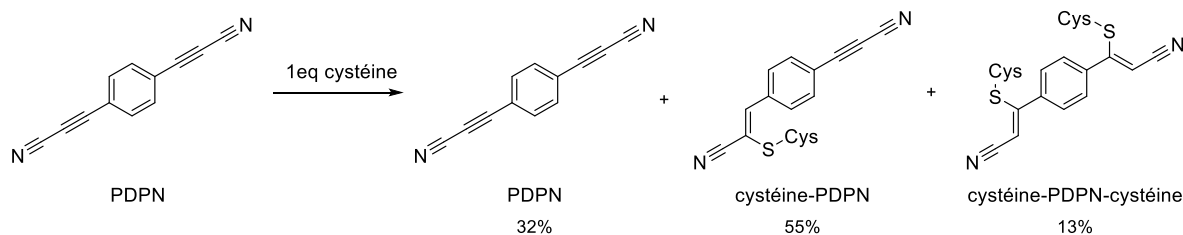


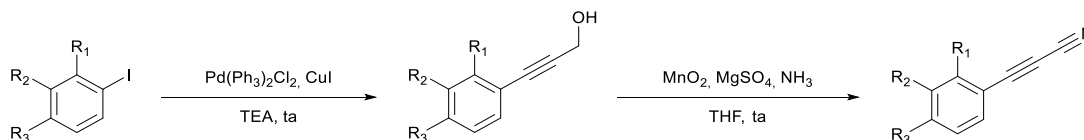
Figure 40. Addition d'un équivalent de cystéine sur le PDPN

à l'autre. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'en combinant, sur le noyau aryle, des substituants permettant d'accélérer l'addition d'un thiol d'un côté et des groupements permettant de ralentir l'addition de l'autre côté, il serait possible d'atteindre une forte discrimination cinétique. Afin de mesurer l'impact d'un substituant sur la réactivité de la fonction APN, nous avons synthétisé et évalué une série d'APN mono-substitués.

2.2. Synthèse de plusieurs APN et mesure de leur constante cinétique

Divers APN portant différents types de groupements, électrodonneurs ou électroattracteurs, ont donc été synthétisés via deux voies de synthèse distinctes (Tableau 5 et Tableau 6).

Tableau 5. Première voie de synthèse des APN via un intermédiaire alcool propargilique

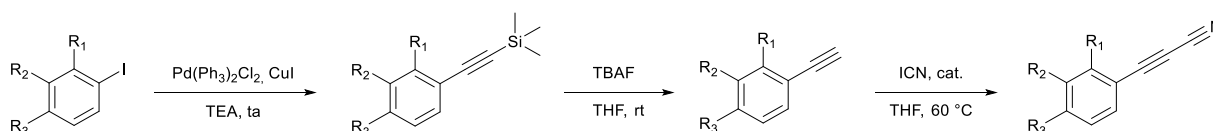


R ₁	R ₂	R ₃	Molécule intermédiaire N° (rendement)	Molécule finale N° (rendement)
F	H	H	27 (83%)	28 (31%)
Cl	H	H	29 (72%)	30 (29%)
CO ₂ Me	H	H	31 (83%)	32 (16%)
H	H	CO ₂ Me	/	33 (16%)*
NO ₂	H	H	34 (35%)	35 (21%)
NH ₂	H	H	36 (62%)	37 (47%)
OMe	H	H	38 (87%)	39 (45%)
H	OMe	H	40 (90%)	41 (31%)

*La molécule **33** a été obtenue par méthylation de l'acide 4-(cyanoéthynyl)benzoïque

Cette première voie de synthèse a été utilisée préférentiellement. Elle consiste en un couplage de Sonogashira entre un iodoaryle et l'alcool propargilique en utilisant $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ comme catalyseur avec des rendements allant de 28 à 87%. Ensuite, en *one-pot*, la fonction alcool est oxydée en aldéhyde par le dioxyde de manganèse activé, suivie d'une condensation de l'aldéhyde avec l'ammoniac et d'une deuxième oxydation de l'imine résultante avec du dioxyde de manganèse, ce qui conduit au propiolonitrile avec des rendements allant de 29 à 47%. Cependant, dans le cas de cyano-APN, la deuxième étape a toujours entraîné une dégradation. Ainsi, la voie de synthèse B a été utilisée.

Tableau 6. Seconde voie de synthèse des APN via un intermédiaire alcyne vrai



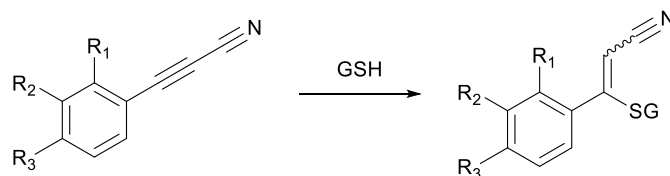
R ₁	R ₂	R ₃	Molécule intermédiaire 1 N°(rendement)	Molécule intermédiaire 2 N° (rendement)	Molécule finale N° (rendement)
CN	H	H	42 (97%)	43 (52%)	44 (67%)
H	CN	H	45 (85%)	46 (64%)	47 (17%)
H	H	CN	48 (82%)	49 (82%)	50 (85%)

La première étape est un couplage de Sonogashira entre un iodoaryle et l'éthynyltriméthylsilane, avec des rendements allant de 82 à 97%. Le groupe TMS a ensuite été retiré en utilisant du fluorure de tétrabutylammonium (TBAF). La dernière étape est une cyanation catalysée au cuivre, décrite par Ohe et al.¹¹³, en utilisant ICN comme donneur de groupement cyano, conduisant à synthèse des propiolonitriles avec des rendements de 67%, 17% et 85% pour l'ortho-, le méta- et le para-CN respectivement.

Afin de déterminer la réactivité relative des différents APN, la constante cinétique de l'addition du glutathion a été mesurée pour chaque composé. 1 équivalent de glutathion solubilisé dans du PBS a été ajouté à une solution d'APN (50 μM) solubilisé dans un mélange 1/1 acétonitrile/PBS (1X, pH = 7,3) contenant 500 μM de benzamide (utilisé comme étalon interne). Les échantillons ont été injectés en HPLC toutes les 15

minutes par un auto-échantillonneur. La conversion a été calculée en normalisant la surface du pic du produit de départ par rapport au pic de l'étalon interne. Pour chaque composé, la constante cinétique du deuxième ordre a été déterminée en mesurant la pente de la courbe $f(t) = 1/C$. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 7.

Tableau 7. Structure des APN synthétisés et leur constante cinétique d'addition du glutathion respective



Entrée	Produit n°	R ₁	R ₂	R ₃	K (M ⁻¹ .s ⁻¹)
1	51	H	H	H	1,1
2	28	F	H	H	1,6
3	30	Cl	H	H	1,45
4	32	CO ₂ Me	H	H	1,06
5	33	H	H	CO ₂ Me	5,07
6	35	NO ₂	H	H	10,9
7	44	CN	H	H	21,0
8	47	H	CN	H	11,2
9	50	H	H	CN	15,3
10	37	NH ₂	H	H	0,33
11	39	OMe	H	H	0,18
12	41	H	OMe	H	1,79

La constante cinétique du phénylpropionitrile non substitué (disponible dans le commerce) est de 1,1 M⁻¹.s⁻¹. Cette valeur a servi de référence pour évaluer l'effet du substituant.

Nous pouvons observer que les halogènes permettent d'augmenter la constante cinétique d'environ 50% (entrées 2 et 3). Un groupement ester en ortho n'a pas d'influence sur la constante cinétique, mais l'augmente d'un facteur 5 lorsqu'il est en para, indiquant que son encombrement stérique pourrait contrebalancer son effet électroattracteur (entrées 4 et 5). Pour les groupements électroattracteurs plus compacts, tels que les groupements nitro et cyano (entrées 6 et 7), nous pouvons

observer une augmentation des constantes cinétiques d'un facteur 10 et 20 respectivement. Les résultats du groupement cyano étant plus élevé sur celui du nitro, nous avons également observé son influence en position méta et para. On peut observer que le groupement cyano a une plus grande influence en ortho qu'en méta. Puis, nous avons étudié l'influence de groupements électrodonneurs, tel que l'amine ou le méthoxyle (entrées 10 et 11). Ces deux groupements ralentissent la réaction. Le groupement méthoxyle ayant la plus grande influence sur la constante cinétique. Nous avons également étudié son influence en position méta (entrée 12) et nous observons que dans cette position, le groupement méthoxyle augmente légèrement la constante cinétique d'addition du glutathion.

Suite à l'obtention de ces constantes cinétiques, nous avons souhaité vérifier s'il était possible de créer un modèle de la réaction entre un thiol et les différents APN, afin de déchiffrer son mécanisme de réaction, mais également d'évaluer l'effet d'une combinaison de ces groupements sur la réactivité d'un bis-APN.

2.3. Modélisation moléculaire

Les travaux présentés dans cette partie ont été réalisés par le Docteur Gilles Frison, chargé de recherche dans le laboratoire de Chimie Moléculaire (LCM) à l'Ecole Polytechnique (Palaiseau, France).

Il ressort clairement des données expérimentales du Tableau 7 que la vitesse de réaction est grandement influencée par les groupements portés par l'aryle, et qu'en modulant ceux-ci, il serait possible d'obtenir, sur un aryl-di-propionitrile, une sélectivité chimique élevée.

Avant de synthétiser le réactif de couplage homo-bifonctionnel substitué, une approche de modélisation moléculaire a été menée afin d'estimer la réactivité absolue et relative des deux côtés du composé ciblé. Tout d'abord, le mécanisme de réaction entre le réactif PPN **51** et le méthylthiolate **52**, utilisé comme modèle simplifié de glutathion déprotoné, a été calculé par théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) (Figure 41).

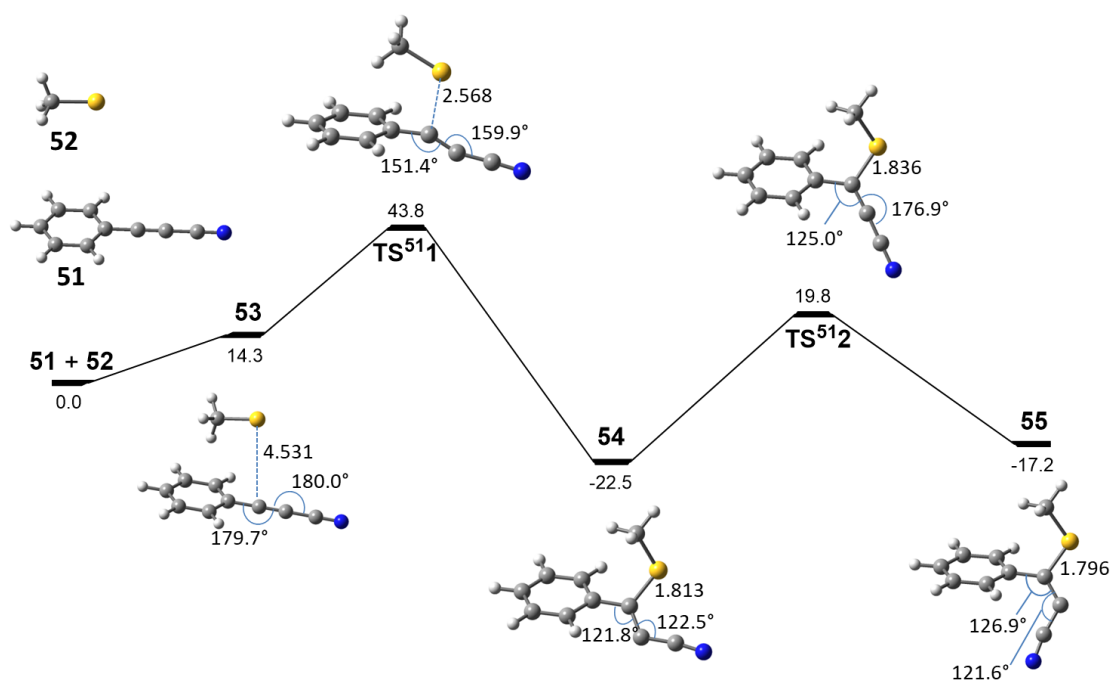


Figure 41. Mécanisme de réaction d'addition du méthylthiolate sur le PPN. Les énergies libres de Gibbs relatives sont exprimées en kJ.mol^{-1} , les longueurs de liaison en angstrœm.

Le partenaire nucléophile **52** peut potentiellement réagir en dehors ou dans le plan du système π . Seul l'état de transition TS^{511} dans lequel le thiolate est situé au-dessus du plan du groupement aryle a été démontré comme étant en accord avec la nature de la LUMO (Figure 42). TS^{511} montre une distance S – C de 2.568 Å, ce qui est

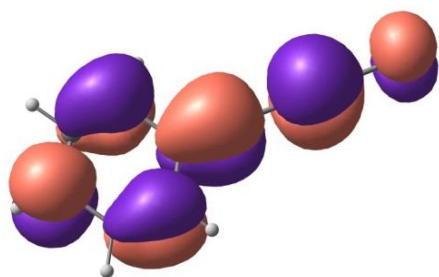


Figure 42. Orbitale moléculaire inoccupée de plus basse énergie (LUMO)

significativement plus long (+42%) que dans le produit d'addition **54** (1.813 Å), en accord avec l'exothermicité calculée de la réaction ($22,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$). La barrière d'énergie libre de Gibbs calculée est faible ($43,8 \text{ kJ.mol}^{-1}$), ce qui est en accord avec les vitesses de réaction rapides observées expérimentalement. TS^{511} conduit à l'isomère Z **54** et aucun état de transition menant à l'isomère E **55** n'a pu être trouvé à partir de **51 + 52**.

Cependant, nos calculs

indiquent qu'un équilibre entre les isomères Z **54** et E **55** peut se produire lors de l'état de transition TS⁵¹² avant la reprotonation du produit d'addition **54**. La différence d'énergie libre de Gibbs entre 16 et 17 (-22,5 - -17,2 = -5,3 kJ.mol⁻¹), à 298 K, correspond à une distribution Boltzmann de 89% pour l'isomère Z et 11% pour l'isomère E, en accord avec les résultats observés¹¹².

Nous avons ensuite étendu cette approche de calcul à l'ensemble des APNs synthétisés précédemment. Pour chacun d'entre eux, nous avons obtenu, l'état de transition pour l'addition de thiolate de méthyle et l'activation de l'énergie Gibbs libre ΔG correspondant.

Les énergies libres de Gibbs ainsi calculées ont été comparées aux constantes cinétiques obtenues expérimentalement, montrant une bonne corrélation logarithmique ($R^2 = 0,947$, Figure 43).

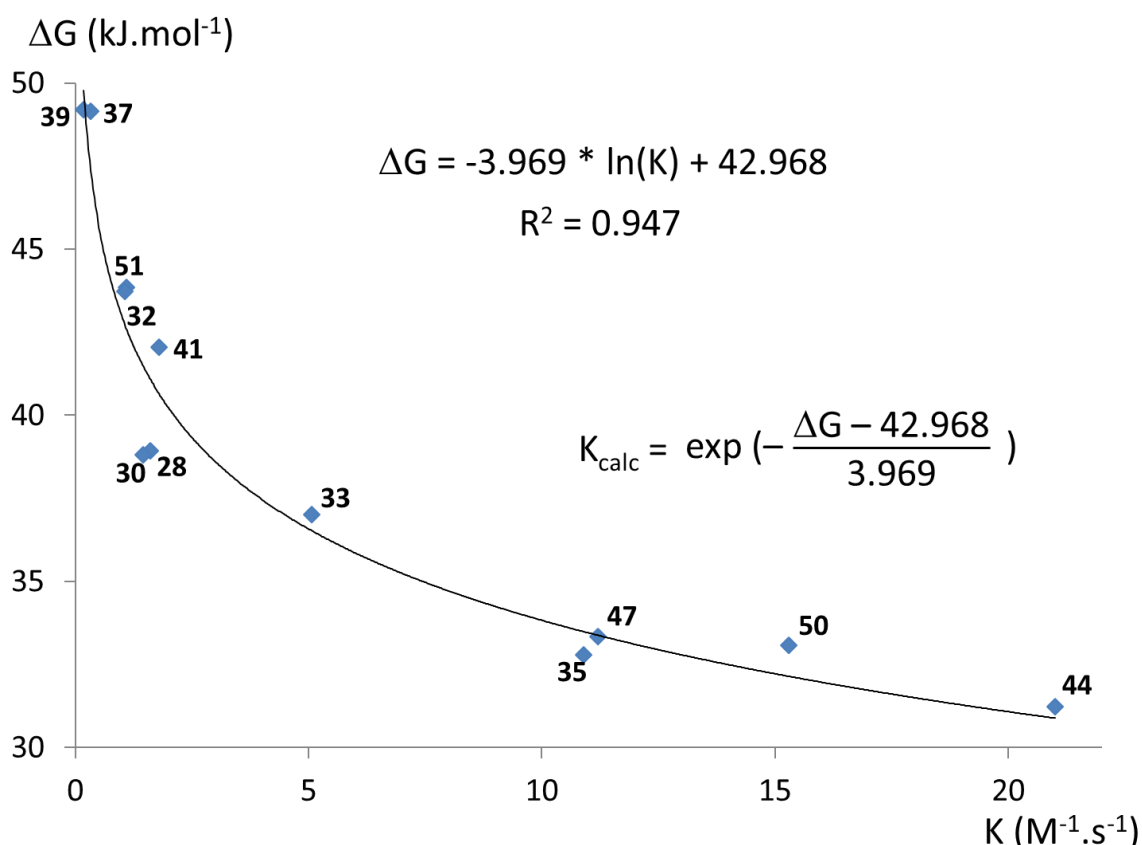


Figure 43. Constantes cinétiques d'addition du glutathion obtenues expérimentalement en fonction des énergies libres de Gibbs ΔG obtenues par modélisation

$$K_{calc} = \exp\left(-\frac{\Delta G - 42,968}{3,969}\right) \text{ Equation 1}$$

L'équation 1, obtenue à partir de la corrélation logarithmique, a été utilisée pour obtenir la constante cinétique calculée (K_{calc}) à partir de l'énergie libre d'activation de Gibbs. L'écart par rapport aux valeurs expérimentales est mesuré par le ratio K_{calc} / K , qui montre des valeurs comprises entre 0.64 (pour 11) et 1.96 (pour 3). Cela permet de définir un intervalle de confiance [$K_{calc} / 2$; $K_{calc} * 2$] dans lequel la constante cinétique estimée de l'addition du glutathion sur l'arylpropionitrile substitué peut être prédit par les calculs DFT.

La modélisation et nos expériences indiquent que **44** et **39** sont respectivement les APN qui vont réagir le plus rapidement et le plus lentement avec un thiol. A partir de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse qu'en combinant l'effet du cyano en ortho et du méthoxyle en ortho, il serait possible d'obtenir une addition de différents thiols

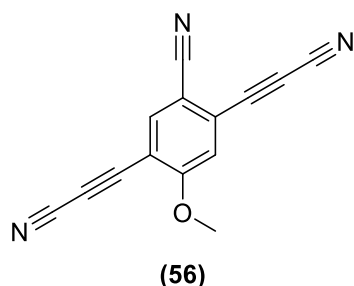


Figure 44. Structure de l'ADPN

cinétiquement résolue. De plus, l'effet des groupes cyano et méthoxyle dans la position méta semble avoir un effet plus faible sur la réactivité de l'APN par rapport aux mêmes substituants en position ortho. L'ADPN (ArylDiPropiolonitrile) **56** (Figure 44) semble donc être un bon candidat permettant un couplage thiol to thiol cinétiquement résolue.

La réactivité des deux groupement APNs de l'ADPN a été estimée par des calculs DFT pour confirmer cette hypothèse (Figure 45). Pour l'addition du premier thiolate, nous avons obtenu des barrières d'énergie beaucoup plus faibles qu'auparavant, avec des barrières d'activation de 29,6 et 21,3 kJ.mol⁻¹ pour la réaction sur le propionitrile situé à côté du groupement méthoxy et celui situé à côté du groupement cyano, respectivement.

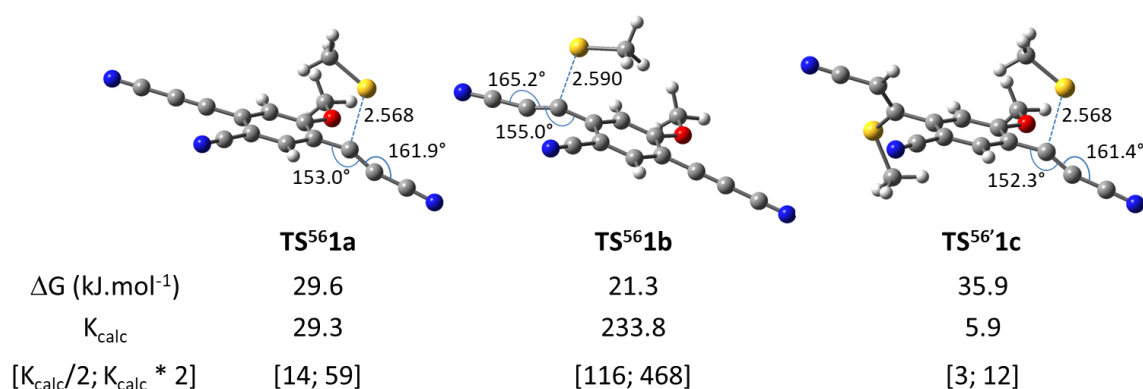


Figure 45. Etats de transition de l'addition du méthylthiolate sur l'ADPN, obtenus par modélisation

Ces valeurs conduisent à des K_{calc} de 29,3 et 233,8 M⁻¹s⁻¹, respectivement, ce qui fournit une indication sur la régiosélectivité élevée pour la première addition en ortho du groupement cyano. L'addition du deuxième groupe thiolate, via l'état de transition TS¹⁸1c, révèle une réactivité suffisante pour permettre la formation du produit de couplage, mais qui est significativement plus faible que pour la première réaction.

Ces calculs indiquent que l'ADPN **56** pourrait permettre une addition cinétiquement résolue et que l'ADPN proposé pourrait être un bon candidat comme réactif de couplage homobifonctionnel. Cependant, avant d'engager la synthèse de ce réactif homobifonctionnel, nous avons d'abord vérifié la stabilité du produit d'addition APN dans différents tampons et dans le plasma.

2.4. Stabilité de l'adduit de l'APN

Avant d'engager la synthèse du bis-APN, nous avons vérifié la stabilité dans le plasma du produit d'addition du glutathion sur le produit **44** (Figure 46). L'adduit a été

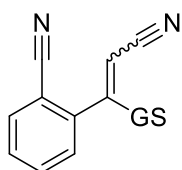


Figure 46.
Structure de
l'adduit

synthétisé en ajoutant 1 équivalent de glutathion sur l'APN **44**. 20 μL d'une solution d'APN à 200 μM a été ajoutée à 180 μL de plasma. Chaque heure, un échantillon de 20 μL a été prélevé et 180 μL d'acétonitrile ont été ajoutés. Le mélange a été centrifugé et 30 μL de surnageant ont été injectés en HPLC. Après 7 heures, le produit d'addition s'est avéré stable dans le plasma (Figure 47).

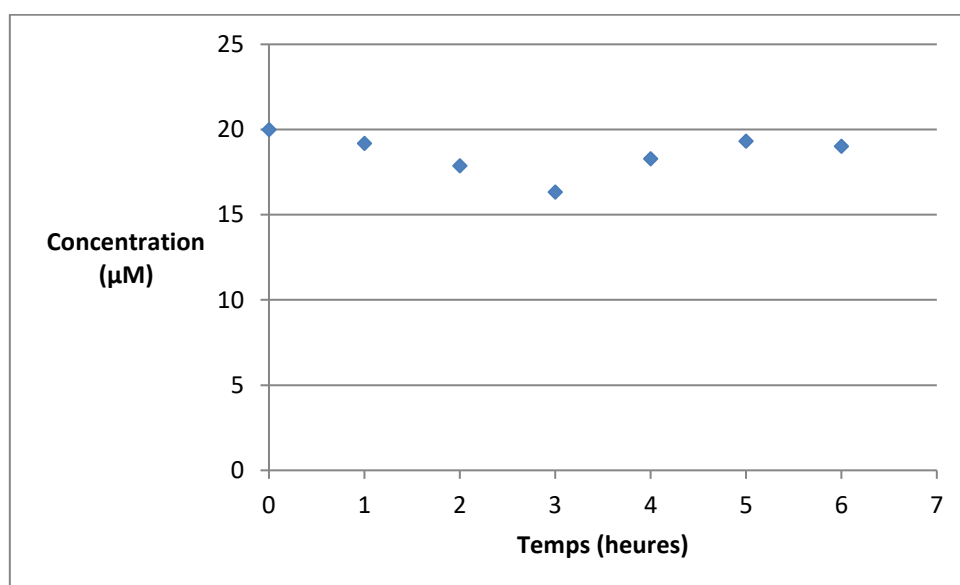


Figure 47. Concentration de l'adduit APN-glutathion dans le plasma en fonction du temps

Afin d'étudier davantage sa stabilité chimique, le produit d'addition a été soumis à des conditions de plus en plus strictes telles que des conditions acides, basiques et oxydantes. Une solution stock de l'adduit de 2-cyano-APN-glutathion (100 mM) a été préparée dans le DMSO. 1 μL de la solution stock a été ajouté à 999 μL d'une solution (contenant 1mM de benzamide comme étalon interne) pour donner une concentration finale en adduit de 100 μM . L'aire du pic de l'adduit a été normalisée en fonction de l'aire du pic de l'étalon interne. Toutes les mesures ont été effectuées à 25 °C. Après une heure, si la conversion est inférieure à 1 pour cent, le produit est considéré comme stable. Les résultats sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8. Conversion de l'adduit APN-glutathion après 1h dans différentes conditions

#	Solutions	Conversion après 1 h
A	100 mM PhSH dans le PBS/DMSO 8/2	< 1% (stable)
B	1 M H ₂ O ₂ (pH = 7)	< 1% (stable)
C	1 M HCl (pH = 0)	< 1% (stable)
D	1 M NaOH (pH = 14)	> 99%
E	1 M Imidazole dans le PBS	< 1% (stable)
F	1 M cystein dans le PBS	< 1% (stable)
G	100 mM 2-mercaptoéthanol dans le PBS/DMSO 8/2	< 1% (stable)
H	100 mM TCEP dans le PBS	< 1% (stable)
I	1M DTT dans le PBS	18.6 %

pH (PBS) = 7,4

De manière très satisfaisante, le produit d'addition s'est avéré stable dans toutes ces conditions, sauf lorsqu'il est traité dans des bases fortes ou avec des conditions réductrices.

Suite à la confirmation de la stabilité de notre liaison thiol-APN, nous avons donc commencé la synthèse de l'ADPN.

2.5. Synthèse de l'ADPN

L'analyse rétrosynthétique de l'ADPN (**I**) a été effectuée (Figure 48) et se base sur un couplage de Sonogashira à partir du 2,5-dibromo-4-méthoxybenzonitrile (**III**).

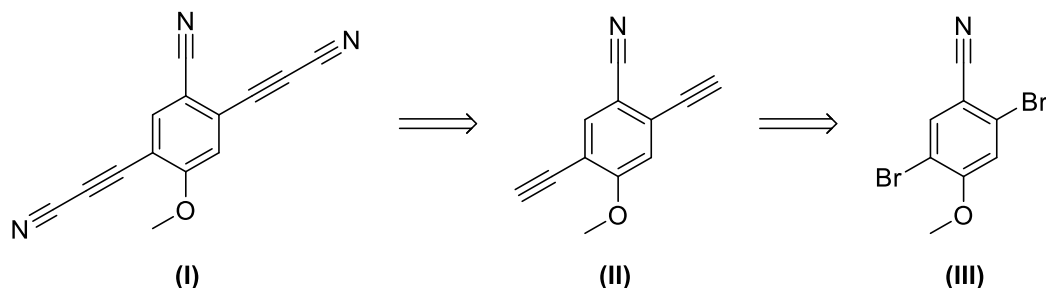


Figure 48. Analyse rétrosynthétique de l'ADPN

La première étape va être la synthèse du précurseur (**III**), puis une optimisation de la réaction de Sonogashira menant à l'intermédiaire (**II**) a été entreprise. Finalement, le produit (**II**) subit une cyanation, menant à l'ADPN (**I**).

2.5.1. Synthèse du 2,5-dibromo-4-méthoxybenzonitrile

La première étape a consisté en la synthèse d'un intermédiaire 2,5-dibromo-4-méthoxybenzonitrile **57**. Celui-ci a été obtenu à partir du 3-bromo-4-méthoxybenzonitrile, disponible dans le commerce. Basée sur la méthode décrite par Sun et Al¹¹⁴, la synthèse consiste en une bromation catalysée au palladium (Figure 49). L'acide *p*-toluènesulfonique (PTSA) étant sous forme monohydratée, pour une partie du produit, le groupement cyano est hydrolysé durant le processus. Mais l'amide ainsi obtenu peut facilement être déshydraté par action de chlorure de thionyle, permettant d'obtenir le produit **57** avec un rendement global de 58%.

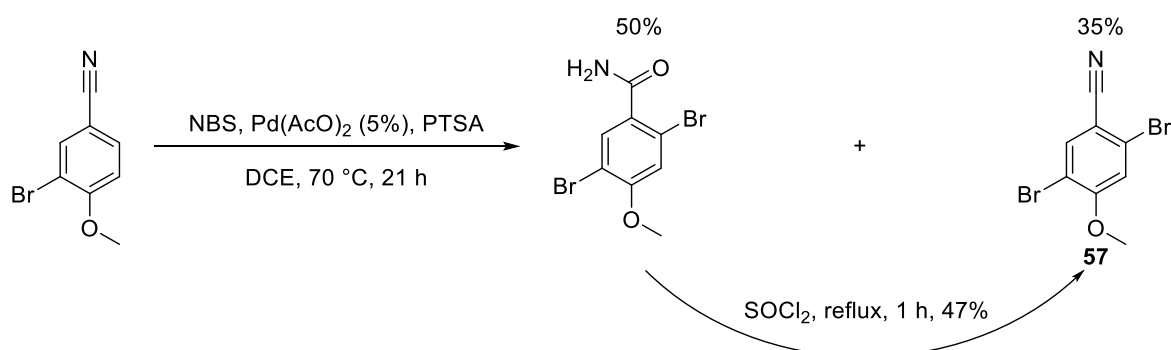


Figure 49. Synthèse du 2,5-dibromo-4-méthoxybenzonitrile

2.5.2. Réaction de Sonogashira menant au précurseur de l'ADPN

Le produit **57** a ensuite été engagé dans une réaction de Sonogashira avec le TMS-acétylène catalysée par du chlorure de bis(triphénylphosphine)palladium et de l'iodure de cuivre dans le but de synthétiser la molécule **58** (Figure 50).

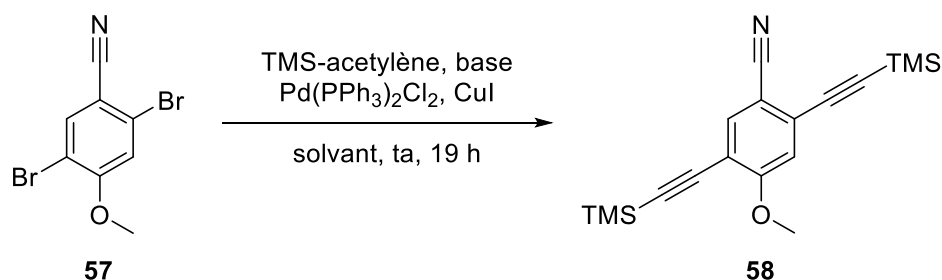


Figure 50. Synthèse du dialcyne protégé

Une optimisation de la méthode a été effectuée (Tableau 9). Les premières conditions testées ont été les mêmes que lors de la synthèse des APN précédemment synthétisés, en utilisant la triéthylamine (TEA) comme base et comme solvant. Cependant, le rendement obtenu était très faible, la majorité du produit de départ n'ayant pas réagi (entrée 1).

Tableau 9. Optimisation des conditions de synthèse du dialcyne protégé

Entrée	Base	Solvant	Rendement
1	Triéthylamine		18%
2	TEA	DMF	0%
3	Morpholine	DMF	10%
4	Pipéridine	DMF	0%
5	Triéthylamine		90% ^a

^a : le milieu réactionnel a été soumis à des ultrasons

Le problème semblant venir de la faible solubilité du produit dans la TEA, trois expériences ont donc été menées en utilisant le DMF comme solvant et en ajoutant 5 équivalents de base que nous avons fait varier (la TEA, la morpholine et la pipéridine). Malheureusement, l'utilisation de ce solvant n'a pas permis une solubilisation totale du produit, peu importe la base utilisée les rendements étaient quasi nuls ou inférieurs à celui précédemment obtenu (entrées 2-4). En reprenant les conditions de l'entrée 1, le milieu réactionnel a été soumis à un traitement aux ultrasons pendant dix minutes,

avant de laisser la réaction se faire pendant 19h. Ces conditions ont permis d'obtenir d'excellents résultats (entrée 5), nous permettant de synthétiser le dialcyne protégé **58** avec un rendement de 90%.

Les groupements TMS ont ensuite été déprotégés par traitement au TBAF dans le THF afin de synthétiser le double acétylène correspondant (Figure 51). La réaction est quantitative.

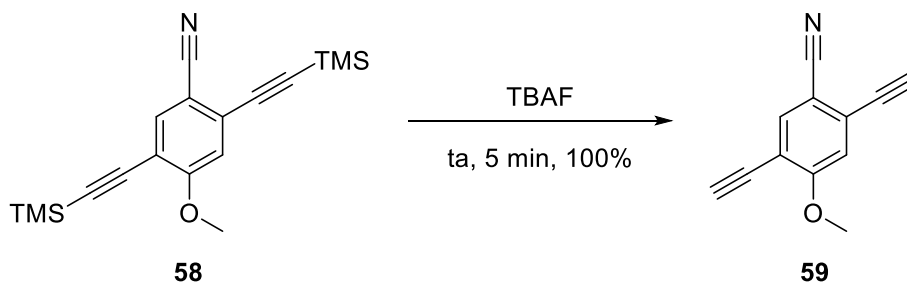


Figure 51. Déprotection des groupements TMS par action du TBAF

2.5.3. Synthèse de l'ADPN à partir du double acétylène

Suite à l'obtention de ce précurseur de l'ADPN, nous avons continué la synthèse en essayant tout d'abord une méthode utilisée classiquement pour la synthèse des cyano-APN, qui repose sur la publication de Ohe¹¹³ (Figure 52). Cependant, les conditions testées n'ont pas permis l'obtention de l'ADPN, le produit de départ étant consommé, mais le substrat obtenu n'ayant pas pu être identifié.

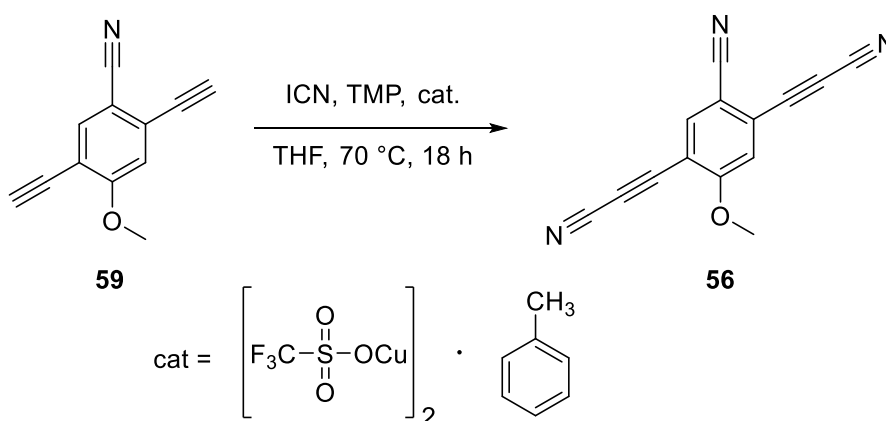


Figure 52. Tentative de synthèse de l'ADPN via la cyanation par du cyanure d'iode

Devant l'impossibilité de synthétiser la molécule suivant la voie classique, nous nous sommes intéressés à l'obtention des propiolonitriles en passant par le bromoalcyne,

basée sur la publication de Mpango¹¹⁵. Le composé bromoalcyne peut être obtenu à partir de l'alcyne (**59**), en utilisant du NBS et un activateur tel que le DBU¹¹⁶, une amidine cyclique ou le nitrate d'argent¹¹⁷ (Figure 53). Différentes conditions ont été

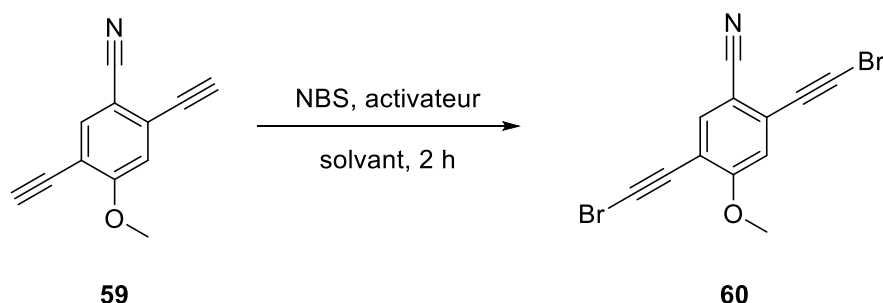


Figure 53. Synthèse du dibromoalcyne à partir du dialcyne

testées afin d'obtenir du dibromoalcyne **60** (Tableau 10). Les conditions décrites dans les publications citées précédemment ont été appliquées au dialcyne **40**, permettant d'obtenir le produit avec des rendements de 13 et 40% (entrées 1 et 2). Nous avons amélioré ces conditions en utilisant une quantité catalytique de nitrate d'argent permettant d'obtenir un rendement quasi-quantitatif (entrée 3).

Tableau 10. Optimisation de la réaction de bromation des alcynes

Entrée	Eq. NBS	Activateur	Eq. activateur	Solvant	Rendement
1	2.2	DBU	2.2	ACN	13%
2	2.2	AgNO ₃	1	Acétone	40%
3	2.2	AgNO ₃	0.2	Acétone	98%

Par la suite, différentes conditions ont été évaluées afin de former l'ADPN à partir du bromoalcyne ainsi obtenu **42** (Figure 54 et Tableau 11).

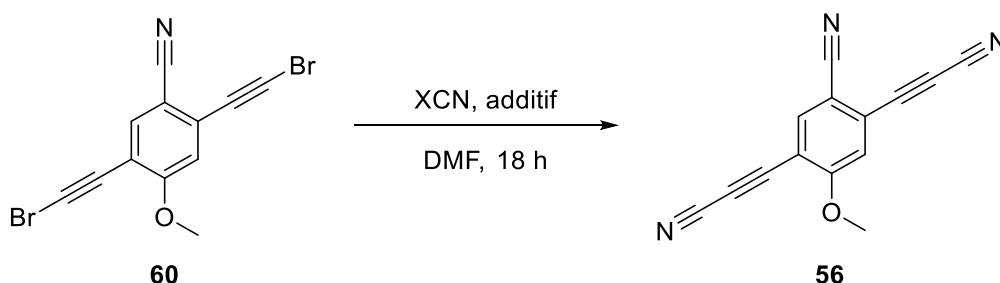


Figure 54. Tentative de synthèse de l'ADPN à partir du bromoalcyne

Tableau 11. Optimisation de la réaction de cyanation

Entrée	XCN	Equivalents	Température	Rendement
1	CuCN	2	50 °C	0%
3	CuCN	2	35 °C	1%
2	CuCN	5	35 °C	0%
4	CuCN	20	35 °C	0%
5	KCN	2	35 °C	0%

Les conditions décrites dans la publication de Mpango¹¹⁵ ont d'abord été testées. 2 équivalents de cyanure de cuivre suspendus dans le DMF sont ajoutés au produit dibromé **42** lui-aussi solubilisé dans le DMF (entrée 1). Après disparition totale du produit, le brut est traité et observé en HPLC, mais aucun produit ne semble avoir été obtenu. La même réaction a été faite en soumettant le brut réactionnel à une centrifugation et en purifiant le brut par HPLC préparative, mais une fois encore, aucun produit n'a pu être extrait.

En réduisant la température à 35 °C un rendement de 1% a pu être obtenu, mais ce résultat n'a pas pu être reproduit (entrée 2). Diverses conditions ont alors été testées, en faisant varier le nombre d'équivalent de cyanure de cuivre (I), ainsi que la source de cyanure, mais aucune n'a permis d'obtenir l'ADPN (entrées 3-5).

Finalement, nous avons réussi à obtenir l'ADPN **56** par cyanation de l'alcyne en utilisant le 2,2'-Azodi(2-méthylbutyronitrile) (AMBN) comme donneur de cyano et le nitrate de cuivre (II) comme catalyseur, conformément à la publication de Xu¹¹⁸, avec un rendement de 38% (Figure 55).

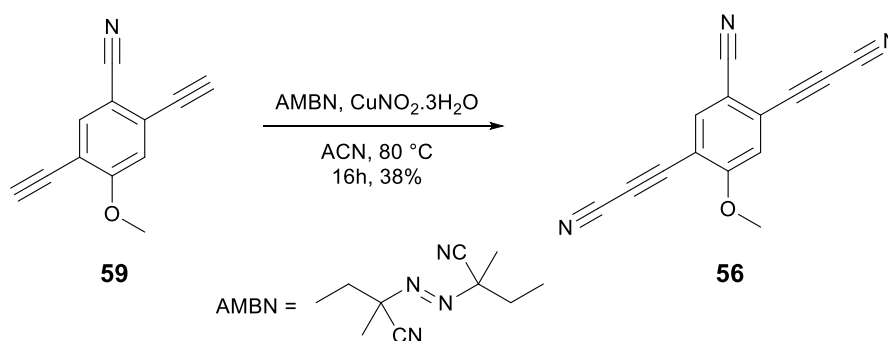


Figure 55. Synthèse de l'ADPN à partir du dialcyne

Une fois ce réactif de couplage obtenu, nous avons désiré valider l'effet combiné des groupes méthoxyle et cyano sur la vitesse de réaction de chaque fonction APN. Pour cela, nous avons mesuré les constantes cinétiques de la première et de la seconde addition d'un thiol. La différence entre ces constantes déterminera l'efficacité de la résolution cinétique tandis que leur valeur absolue déterminera l'efficacité du couplage pour la bioconjugaison dans des conditions douces et diluées.

3. Applications du réactif de couplage homobifonctionnel

3.1. Mesure des constantes cinétiques d'addition du glutathion de l'ADPN

Nous avons mesuré la cinétique de la mono-addition du glutathion sur l'ADPN. 1 équivalent de glutathion solubilisé dans du PBS a été ajouté à une solution de 5 μM d'APN dans un mélange 1/1 acétonitrile/PBS (1X, pH = 7,3) contenant 50 μM de benzamide comme étalon interne. Les échantillons ont été injectés toutes les 7 minutes en HPLC par un auto-échantillonneur. Les conversions ont été calculées en normalisant l'aire du pic du produit de départ par rapport au pic de l'étalon interne (Figure 56). La constante cinétique du second ordre a été déterminée en mesurant la pente de la courbe $f(t) = 1 / C$, conduisant à la constante cinétique du second ordre : $560 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

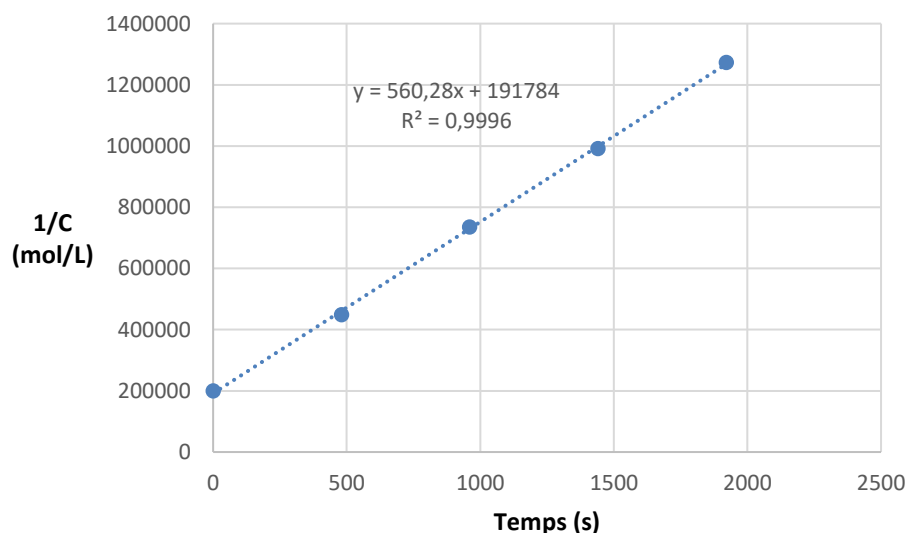


Figure 56. Inverse de la concentration en fonction du temps, dont la pente correspond à la constante cinétique du second ordre pour la première addition d'un thiol sur l'ADPN

La cinétique de la seconde addition a été évaluée en engageant l'adduit mono-glutathion-ADPN. Le même protocole a été utilisé, mais avec une solution de 50 μM d'adduit de glutathion-ADPN, ce qui nous a permis de calculer la constante cinétique du second ordre qui est de $7,00 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Figure 57).

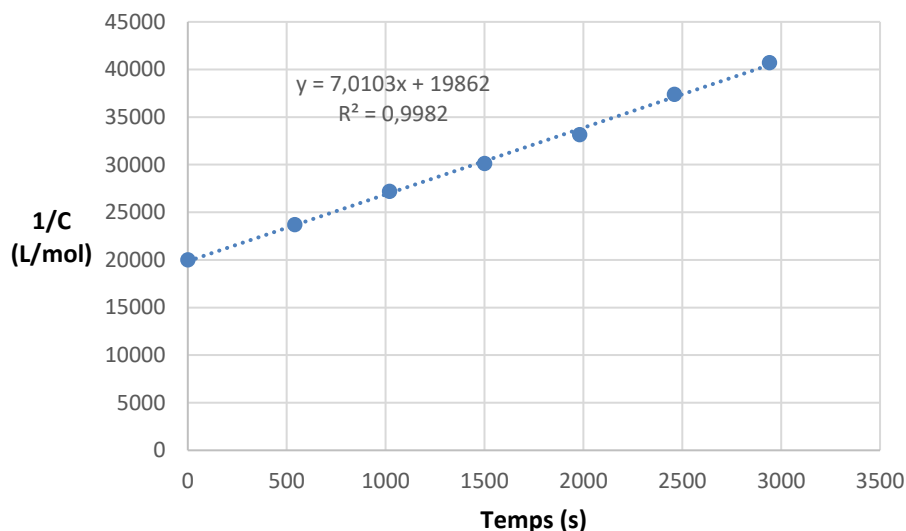


Figure 57. Inverse de la concentration en fonction du temps, dont la pente correspond à la constante cinétique du premier ordre pour la seconde addition d'un thiol sur l'ADPN

Ainsi, nous observons un facteur 80 entre les constantes cinétiques de la première et de la seconde addition, soit un facteur 10 fois plus important que les valeurs calculées par le modèle. Cette variation devrait permettre d'obtenir une résolution cinétique suffisante pour un réactif de couplage efficace.

3.2. Résolution cinétique pour le couplage de deux thiols à l'aide de l'ADPN

Afin de vérifier que la vitesse de réaction de première addition plus élevée par rapport à la seconde se traduira par une résolution cinétique suffisante, nous avons procédé à un couplage étape par étape en ajoutant séquentiellement, dans un même pot, un premier thiol, puis un second. La première étape, l'addition d'un seul équivalent de thiol, déterminera le rapport hétéroaddition / homoaddition.

1 équivalent d'un thiol (cystéine ou glutathion) dilué dans le PBS a été ajouté à 1 équivalent d'ADPN dans l'acétonitrile. Le rapport entre la mono et la double addition de cystéine ou de glutathion a été mesuré par absorption UV à 254 nm. Dans les deux cas, l'addition mono a été obtenue à hauteur de 94% et moins de 6% pour la double

addition, démontrant que les deux groupements permettent d'induire une résolution cinétique.

Ensuite, un équivalent d'un second thiol (thiophénol, benzylthiol ou phényléthylthiol) solubilisé dans le DMSO a été ajouté et le rapport final de l'hétéroaddition par rapport à l'homoaddition est présenté dans le Tableau 12. L'efficacité de cette seconde addition démontre que même à ces concentrations, la réactivité du second APN reste suffisante pour garantir un couplage efficace.

Tableau 12. Ratio d'hétéro/homoaddition après ajout successif d'un équivalent d'un thiol, puis d'un second thiol.

Thiol	PhSH	BnSH	PhC ₂ H ₄ SH
Cystéine	99/1	94/6	93/7
Glutathion	95/5	96/4	94/6

Nous pouvons observer que la résolution cinétique est très élevée, et permet d'atteindre des ratios hétéro/homoaddition importants, allant de 94/6 à 99/1 pour la cystéine et de 94/6 à 96/4 pour le glutathion. L'ADPN permet ainsi une réaction, en *one-pot*, qui ne requiert ni la séparation du premier intermédiaire, ni la nécessité d'ajouter le second thiol en excès, grâce à la bonne réactivité du second arylpropionitrile. De plus, les ratio d'hétéro/homo addition sont très élevés, soulignant la différence de réactivité entre les deux fonctions.

Avec ces résultats en main et avant d'utiliser de plus grosses biomolécules, nous avons souhaité tester la stabilité du produit d'addition avec l'ADPN dans le plasma.

3.3. Stabilité de l'adduit du ADPN

Afin de tester la stabilité du bis-adduit dans le plasma, un bis-adduit modèle a été synthétisé en ajoutant 2 équivalents de cystéine sur l'ADPN. 8 μ L d'une solution de 250 μ M de cet adduit a été ajouté à 192 μ L de plasma. Le signal UV a été mesuré toutes les heures (Figure 58).

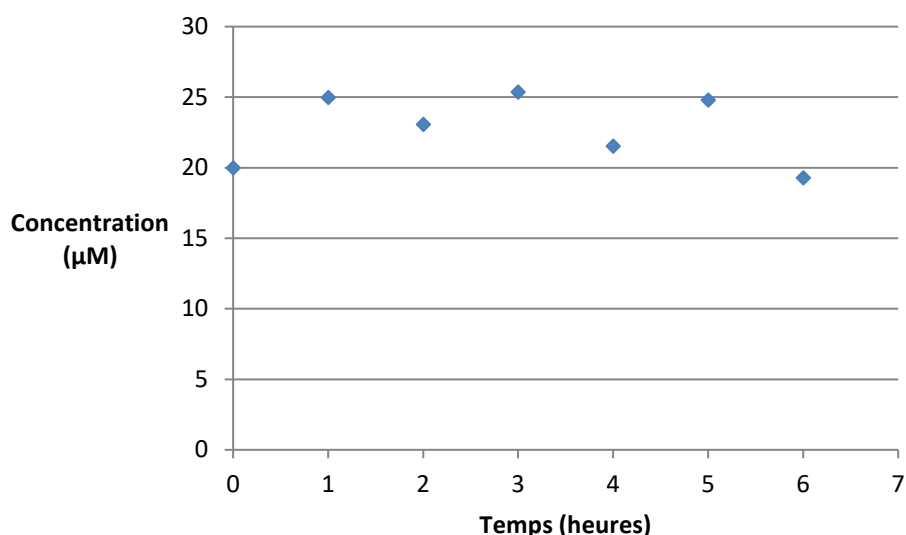


Figure 58. Concentration du bis-adduit dans le plasma au cours du temps

Nous avons observé que la concentration en adduit reste relativement stable au cours du temps.

Afin de s'assurer qu'il n'y a pas d'échange de thiol, le signal UV dans le plasma a également été mesuré en reproduisant l'expérience en ajoutant également 10 équivalents de glutathion (Figure 59). De manière satisfaisante, les résultats ont montré qu'après 7 heures, la concentration du bis-adduit de l'ADPN reste stable.

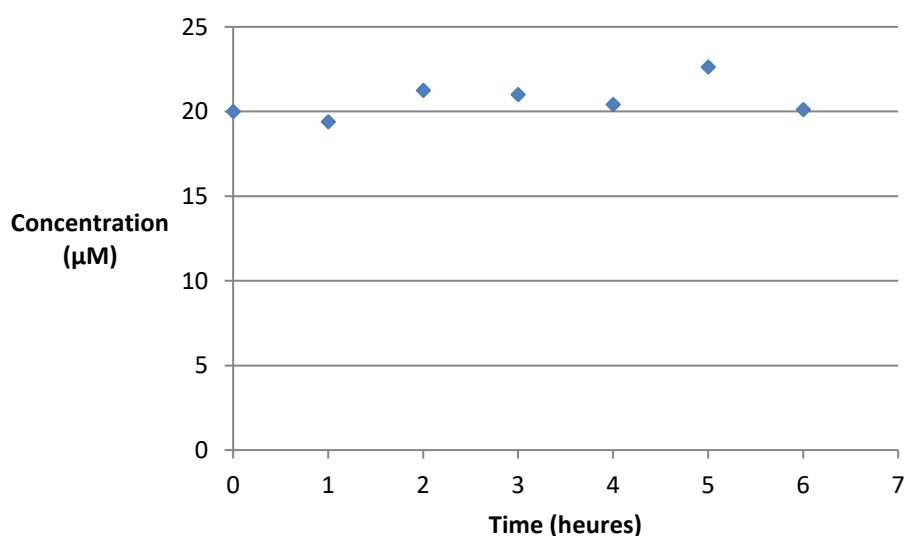


Figure 59. Concentration du bis-adduit dans le plasma au cours du temps en présence de 10 équivalents de cystéine

Ainsi, nous pouvons observer que l'adduit ne souffre pas d'échange de thiol dans le plasma au cours du temps, même en présence d'un excès de glutathion.

3.4. Application au couplage de biomolécules

L'ADPN a ensuite été utilisé pour permettre l'hétérocouplage de biomolécules contenant un thiol. Comme premier nucléophile, nous avons sélectionné un peptide composé de 17 acides aminés (CSIPPEVKFNKPFVYLI). Celui-ci a été choisi pour sa grande variété d'acides aminés (une cystéine et un ensemble d'acides aminés polaires et / ou nucléophiles, tels que l'arginine, la lysine, la serine ou la tyrosine), afin de prouver l'efficacité de l'ADPN en présence d'autres fonctions réactives. Avant d'engager le couplage, le pont disulfure ayant pu s'être formé, inter-peptide a été réduit dans des conditions décrites par Frey et al¹¹⁹. 5 équivalents de TCEP sont ajoutés, et après 2 heures, 10 équivalents d'acide azido-benzoïque sont ajoutés afin de neutraliser l'excès de TCEP, qui pourrait réagir avec la fonction propionitrile. Puis, l'ADPN a été ajouté sur le peptide. Après 18 heures, 1 équivalent de cystéine est ajouté afin permettre la formation d'un bioconjugué peptide-ADPN-cystéine (Figure 60).

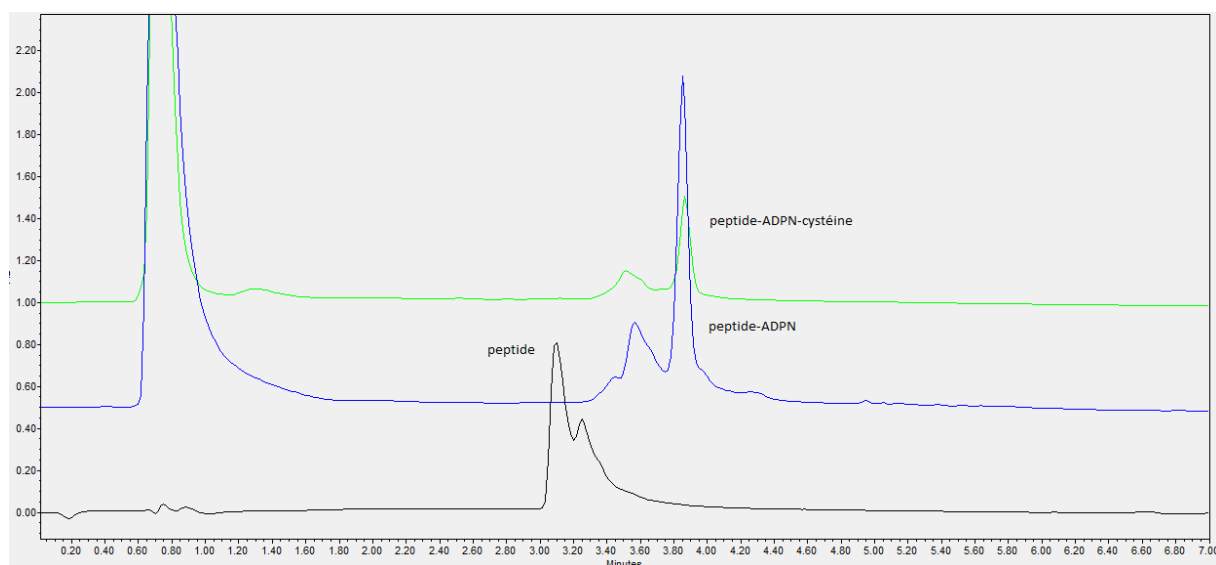


Figure 60. Spectres de masse du peptide (en noir), de son adduit après réaction avec 1 équivalent d'ADPN (en bleu), et du double adduit après ajout d'un équivalent de cystéine (en vert).

Le temps de rétention du bioconjugué peptide-ADPN et peptide-ADPN-cystéine étant identiques, la même expérience a été menée en ajoutant d'abord la cystéine et ensuite le peptide. Après la réaction entre l'ADPN et la cystéine, 1 équivalent de peptide a été ajouté, conduisant au bioconjugué cystéine-ADPN-peptide (Figure 61).

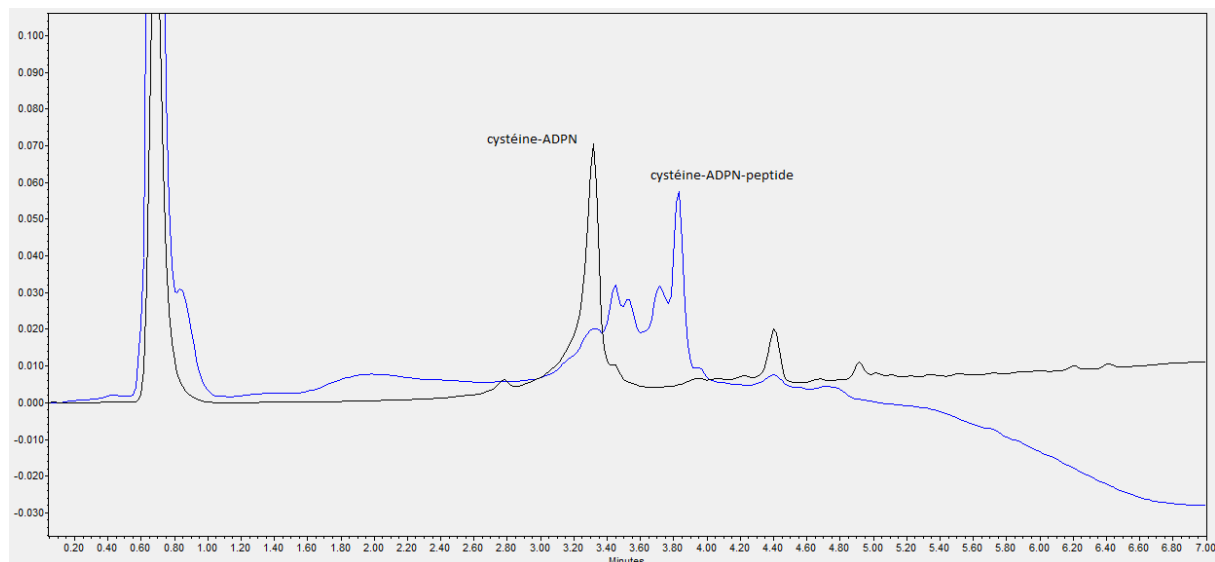


Figure 61. Spectres de masse de l'adduit cystéine-ADPN (en noir) et du double adduit après ajout d'un équivalent de peptide (en bleu)

On peut observer que le temps de rétention du bioconjugué cystéine-ADPN-peptide est identique à celui obtenu précédemment, confirmant un couplage entre la cystéine et le peptide.

Après un couplage réussi entre l'ADPN et le peptide, nous avons couplé un oligonucléotide constitué de 37 bases, contenant une modification 5' thiol C6. 5 μ L d'une solution à 1 mM dans l'eau ont été ajoutés à 95 μ L d'une solution ADPN (5 μ M dans 50/50 PBS 1X/ACN). Après formation du bioconjugué oligonucléotide-ADPN, un équivalent de cystéine a été ajouté, conduisant à la formation d'un oligonucléotide-ADPN-cystéine (Figure 62), confirmant l'efficacité de l'ADPN pour lier un oligonucléotide-modifié.

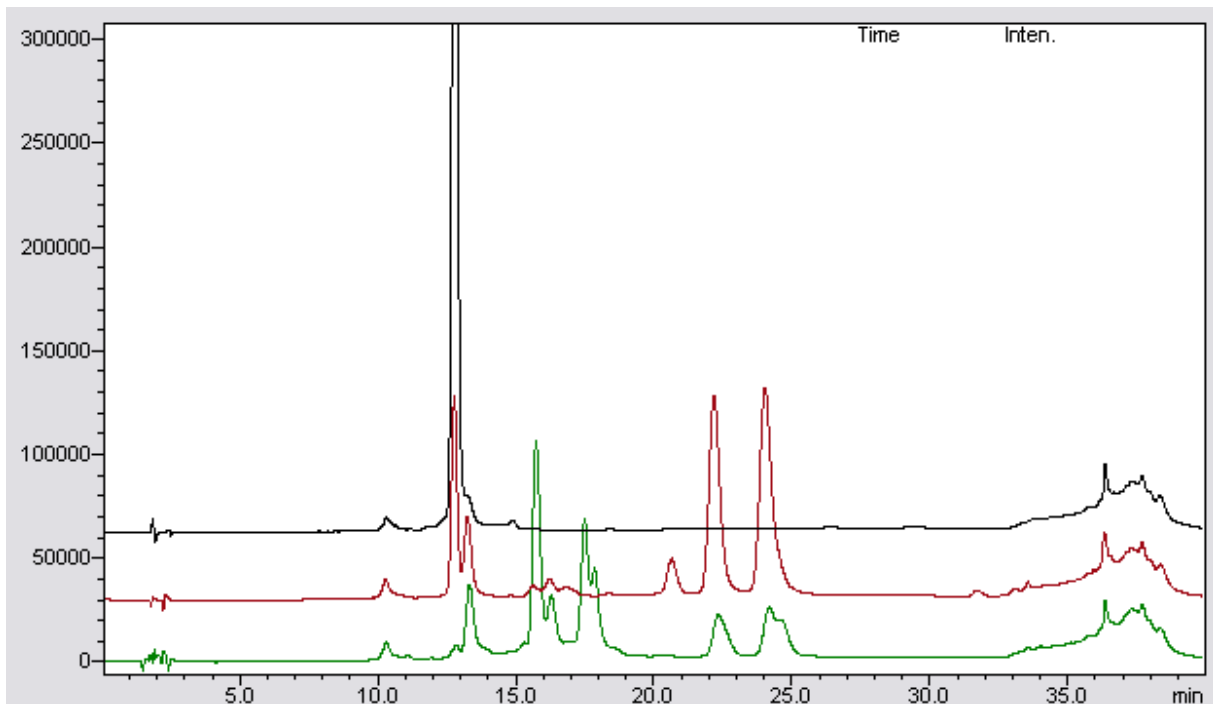


Figure 62. Spectrogrammes de l'oligonucléotide (en noir), de l'adduit de réaction oligonucléotide-ADPN après ajout d'un équivalent d'oligonucléotide (en rouge) et du double adduit oligonucléotide-ADPN-cystéine (en vert) après ajout d'un équivalent de cystéine

Sachant que l'oligonucléotide modifié et le peptide peuvent réagir avec l'ADPN, nous avons décidé de l'utiliser pour lier ces deux biomolécules de taille moyenne. Un équivalent d'ADPN réagit avec l'oligonucléotide modifié pour obtenir le produit d'addition attendu. Ensuite, un équivalent du peptide réduit réagit avec l'autre fonction de l'ADPN, conduisant à la formation du bioconjugué peptide oligonucléotide-ADPN (Figure 63).

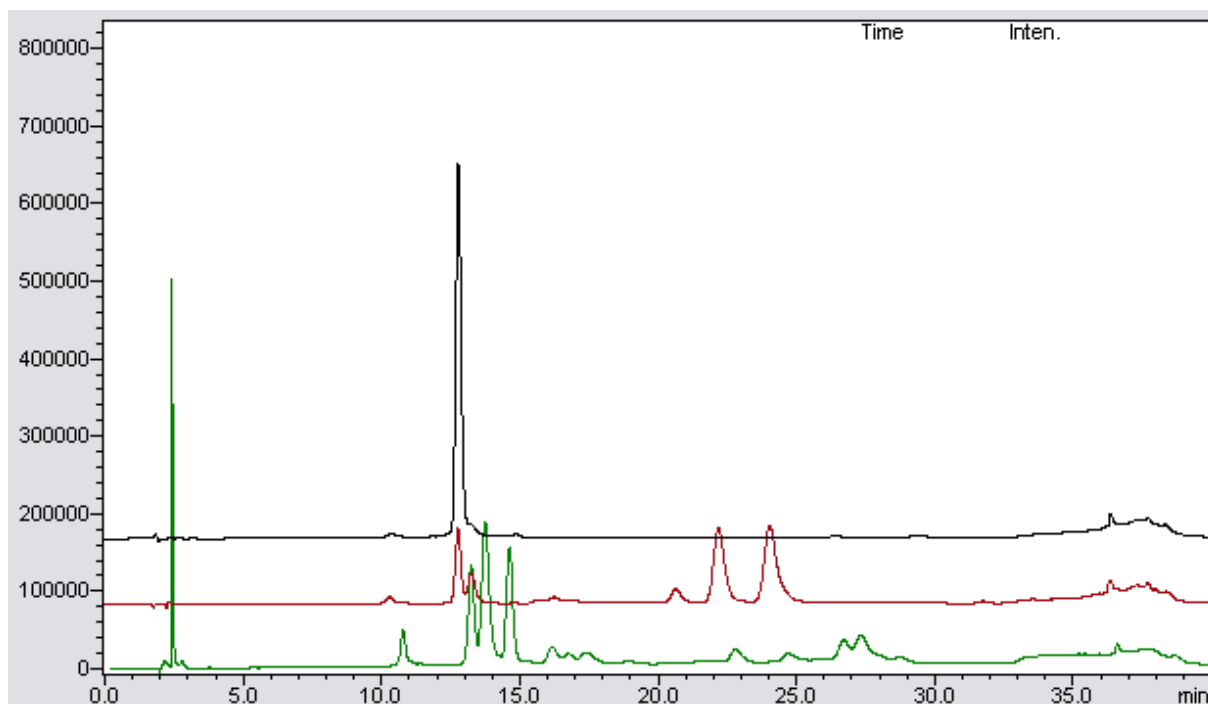


Figure 63. Spectrogrammes de l'oligonucléotide (en noir), de l'adduit de réaction oligonucléotide-ADPN après ajout d'un équivalent d'oligonucléotide (en rouge) et du double adduit oligonucléotide-ADPN-peptide après ajout d'un équivalent de peptide (en vert)

4. Conclusions et perspectives

Une étude structure-réactivité nous a conduits à la conception d'un nouveau composé bis-électrophile qui permet l'hétérocouplage cinétiquement résolu de deux molécules contenant un thiol. L'intérêt majeur de ce réactif réside dans le fait qu'il n'est pas nécessaire de purifier l'intermédiaire de mono-addition, ni d'utiliser un excès important du second nucléophile pour compenser une réactivité insuffisante. Le rapport hétéro / homoaddition est de l'ordre de 95/5 pour toutes les conditions testées. De plus, grâce à la caractéristique intrinsèque de la fonction APN, ce réactif s'est révélé stable dans le tampon, ce qui facilite sa manipulation et évite une hydrolyse prématurée, comme c'est souvent le cas avec des réactifs à base de maléimide. En outre, le bis-adduit final a montré être stable dans le plasma, ce qui permettrait de l'utiliser lors d'une éventuelle application biologique.

Les expériences de couplage de biomolécules requièrent des expériences supplémentaires afin de valider l'efficacité de notre réactif de couplage, et en particulier en confirmant la formation des adduits grâce à une analyse HRMS.

Conclusions générales et perspectives

En conclusion, cette thèse a été composée de trois projets. Le premier projet a eu pour objectif de découvrir de nouveaux métabolites de la vitamine A. Il a consisté en la synthèse d'un analogue du rétinaldéhyde, le 4-azido-rétinaldéhyde (azRA) qui a montré une activité similaire au rétinaldéhyde naturel et qui devrait être pris en charge de la même manière que celui-ci. Il conviendra maintenant de produire, par transformation enzymatique de l'azRA, les analogues de l'acide rétinoïque et du rétinol, afin de pouvoir appliquer ces trois analogues à un modèle *in vivo*.

Le second projet a consisté en l'élaboration d'une sonde permettant l'analyse de l'ensemble des métabolites aldéhydiques d'un échantillon. La sonde permet un gain de sensibilité notable en LS-MS². Différentes références pour des aldéhydes d'intérêt ont été synthétisées et une méthode LC-MS² a été mise au point afin de pouvoir l'appliquer à une vaste gamme d'aldéhydes, autant sur le point de vue de leur polarité que de leur taille. Nous avons montré que la sonde ATPP, après injection intrapéritonéale, est distribuée *in vivo*, dans le foie et le sérum, mais n'atteint pas le cerveau. De plus, la sonde est suffisamment réactive pour permettre une capture des aldéhydes *in vivo*. Des expériences vont être menées afin d'appliquer la sonde ATPP à l'observation du métabolome de souris souffrant de la maladie de Huntington, afin de comparer ces résultats à des souris saines.

Enfin, concernant le troisième projet, un réactif de couplage homobifonctionnel « thiol-thiol » ADPN a été élaboré. Les produits du couplage ont montré une excellente stabilité plasmatique, ainsi qu'une bonne stabilité dans différentes conditions drastiques, à l'exception d'un milieu fortement basique. Le réactif a d'abord été appliqué avec succès au couplage de petites molécules, permettant l'obtention de ratio hétéro/homoaddition de l'ordre de 95/5. Le réactif ADPN a permis le couplage d'un oligonucléotide modifié portant une fonction sulfhydryle, mais aussi d'un peptide composé d'une grande variété d'acides aminés. Finalement, l'oligonucléotide et le peptide ont pu être conjugués. Il convient de confirmer l'application de l'ADPN aux biomolécules par une analyse MS des conjugués obtenus.

Experimental part

General Methods

General experimental procedures: All air and moisture sensitive reactions were carried out under argon atmosphere. Organic solutions were concentrated by rotary evaporation at 25-60 °C at 10-30 torr. Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed using plates cut from aluminium sheets (silica gel Alugram 0.20 mm). Visualization was achieved by 254 or 365 nm UV light and by immersion in an appropriate revelation solution.

Materials: All reagents were obtained from commercial sources and used without further purifications. Model-peptide (CSIPPEVKFNKPFVYLI) was obtained from Synpeptide. Modified-oligonucleotide was obtained from Eurogentec (5'-Thiol Modifier C6-AAGATACGAATTCGGGTGTTCTGCTG GTAGTGGTCCG-3'). Dry solvents were obtained from Sigma-Aldrich.

Instrumentation: ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at 23 °C on a Bruker 400 or 500 MHz spectrometers. Recorded shifts are reported in parts per million (δ) and calibrated using residual undeuterated solvent signals. Data are represented as follows: Chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, m = multiplet, br = broad), coupling constant (J, Hz) and integration. High resolution mass spectra (HRMS) were obtained using an Agilent Q-TOF (time of flight) 6520 and low-resolution mass spectra using an Agilent MSD 1200 SL

(ESI/APCI) with an Agilent HPLC1200 SL. The centrifugation steps were conducted on a centrifuge VWR MEGA STAR 1.6R mobile rotor.

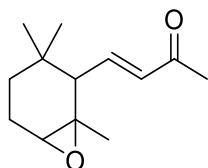
Analytical HPLC-MS method: HPLC experiments were performed on a Waters system (Pump: model Alliance 2695, UV-detector: Waters 2487, AcquityQDa) with a Sunfire C₁₈ column (50 mm \rightarrow 4.6 mm i.d., 2.7 μ m, Cortecs Waters). Flow: 1 mL/min. Injection volume 111 = 0.5-10 μ L. Eluent A/B water/ACN, with 0.05% TFA. Gradient: 5% B to 95% B in 5 min and 2 min of re-equilibration. Detection: 254 nm.

Preparative HPLC method: The semi-preparative HPLC system was performed on a Waters system (Pump: Waters 600 controller, UV-detector: Waters 2487, Collector: Waters Fraction Collector III and a 5 mL sample loop with a Sunfire C₁₈ column (150 mm \rightarrow 19 mm i.d., 5 μ m, SunFire Waters). Flow: 17 mL/min. Injection volume = 0.5-1 mL. Eluent A/B water/ACN, with 0.05% TFA. Gradient: 5% B to 95% B in 40 min and 10 min of re-equilibration. Detection: 254 nm.

Flash Chromatography: The purifications by flash chromatography were conducted on an Armen Spot 2 apparatus, using pre-packed silica gel column Chromabond Flash RS from Macherey-Nagel. The collection was done via a UV-detector at 254 nm.

Chapter 1: Metabolomic labeling

(E)-4-(3,3-dimethyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-yl)but-3-en-2-one (2)

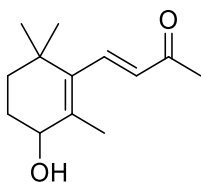


Chemical Formula: $C_{13}H_{20}O_2$
Molecular Weight: 208,30100

A solution of α -ionone (1 eq., 8.16 g, 8.78 mL, 42.4 mmol) in DCM (50 mL) was cooled to 5 °C, mCPBA (1.5 eq., 14.6 g, 63.7 mmol) was slowly added and stirred at room temperature for 16 h. The mixture was filtered. The filtrate was successively washed with aqueous sodium sulfite (10%), sodium hydroxide (5 %), water and brine. After being dried over $MgSO_4$ and filtration, the solvent was removed and **(2)** was obtained as a clear yellow oil (9.4 g). The product was used without further purification.

1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 0.74 (s, 3 H) 0.92 (s, 3 H) 1.24 (s, 3 H) 1.41 – 1.98 (m, 4 H) 2.07 (d, $J=10.5$ Hz, 1 H) 2.29 (s, 3 H) 3.09 (m, 1 H) 6.08 (d, $J=16$ Hz, 1 H) 6.71 (dd, $J=16, 10.5$ Hz, 1 H)

(E)-4-(3-hydroxy-6,6-dimethylcyclohex-2-en-1-yl)but-3-en-2-one (3)



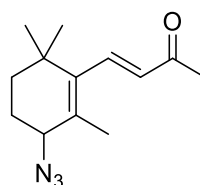
Chemical Formula: $C_{13}H_{20}O_2$
Molecular Weight: 208,30100

Freshly prepared NaOMe (0.25 eq., 0.573 g, 10.6 mmol) was added to the crude of

(2) in MeOH (40 mL). The mixture was stirred at reflux for 4 h. The mixture was cooled down to room temperature, treated with acetic acid until pH = 7. Methanol was removed under reduced pressure and water (150 mL) was added to the residue. The mixture was extracted with EtOAc (3x50 mL) and the organic layers were combined and washed with brine (50 mL), dried over $MgSO_4$. Solvent was evaporated and crude (7.0 g) was subject to a flash chromatography (100 %cyclohexane to 100% EtOAc) to give **(3)** (5495 mg, 26.4 mmol, 62 %) as a yellow oil.

1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 1.05 (s, 3H) 1.08 (s, 3 H) 1.66 – 1.75 (m, 2 H) 1.86 (s, 3 H) 1.89 – 1.94 (m, 2 H) 2.32 (s, 3 H) 4.03 (m, 1 H) 6.13 (d, $J=16.5$ Hz, 1 H) 7.20 (d, $J=16.5$, 1 H) ^{13}C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 18.39, 27.25, 27.45, 28.24, 28.73, 34.57, 34.64, 69.75, 132.94, 134.10, 139.18, 142.71, 198.40

(E)-4-(3-azido-6,6-dimethylcyclohex-2-en-1-yl)but-3-en-2-one (4)



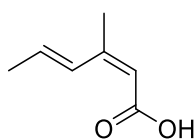
Chemical Formula: $C_{13}H_{19}N_3O$
Molecular Weight: 233,31500

In a round bottom flask, at 0 °C, were introduced **(3)** (1 eq., 5.5 g, 26.4 mmol), DMF (50 mL), TEA (2 eq., 5.34 g, 7.33 mL, 52.8 mmol) and mesylchloride (3 eq., 9.07 g, 6.13 mL, 79.1 mmol). The reaction was stirred for 1.5 h at room temperature. NaN_3 (3 eq., 5.15 g, 79.1 mmol) was added. The mixture was allowed to stir at

room temperature for 16 h. Then, water was added and extracted with EtOAc. Organics layers were washed with water, brine and dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The obtained crude (7.846 g) was subject to a flash chromatography (cyclohexane) to afford **(4)** (3.669 g, 15.73 mmol, 60 %) as a yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 1.07 (s, 3 H) 1.08 (s, 3 H) 1.50 - 1.72 (m, 2 H) 1.84 (s, 3 H) 1.88 - 1.99 (m, 2 H) 2.32 (s, 3 H) 3.73 (m Hz, 1 H) 6.14 (d, J=16.56 Hz, 1 H) 7.18 (d, J=16.56 Hz, 1 H) ¹³C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 19.60, 25.43, 27.29, 27.52, 29.11, 34.51, 34.68, 61.94, 128.95, 133.65, 141.87, 141.88, 198.08 MS: [M+H]⁺: 234.160, found 234.1602

(2Z,4E)-3-methylhexa-2,4-dienoic acid (5)

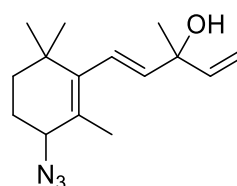


Chemical Formula: C₇H₁₀O₂
Molecular Weight: 126,15500

A mixture of 4,6-dimethyl-2-pyrone (1 eq., 1.19 g, 9.6 mmol), NaBH₄ (6 eq., 2.18 g, 57.6 mmol) and KOH (10 eq., 5.39 g, 96 mmol) in MeOH (119 mL) was stirred for 22 h under reflux. Water (50 mL) was added and the mixture heated under reflux for 5 min. The solvent was partly evaporated and the residue poured into 20% acetic acid (50 mL). Acetic acid was added up to slight acid character of the solution and extracted with EtOAc. Organic layers were washed with water and dried, the solvent was evaporated to obtain crude (850 mg). Crystallization from pentane gave **(5)** (303 mg, 2.4 mmol, 25 %) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 1.89 (dd, J=6.78, 1.25 Hz, 2 H) 2.01 (d, J=1.25 Hz 1 H) 5.62 (d, J=1.25 Hz, 1 H) 6.16 - 6.28 (dq, J=15.7, 6.78 Hz, 1 H) 7.54 (qd, J=15.7, 1.25 Hz, 1 H) ¹H NMR is consistent with the literature⁵¹

(E)-1-(3-azido-6,6-dimethylcyclohex-2-en-1-yl)-3-methylpenta-1,4-dien-3-ol (6)



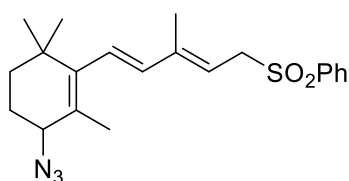
Chemical Formula: C₁₅H₂₃N₃O
Molecular Weight: 261,36900

In a 3-necked flash, equipped with a condenser and a dropping funnel was placed Mg (560 mg, 23 mmol). THF (5 mL) was added to cover the magnesium and iodine was added. Vinyl bromide (1 M, 23.1 mL, 23.1 mmol) was added dropwise, then heated to 50 °C. 5 mL of the freshly prepared solution of vinylmagnesium bromide (2 eq.) were added to **(4)** (1 eq., 500 mg, 2.14 mmol) in THF (5 mL) at 0 °C and then stirred at room temperature for 16 h. The mixture was diluted with saturated aqueous NH₄Cl. The aqueous layer was extracted with Et₂O and fractions were washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum to give 544 mg of crude (brown thick oil). The crude was subject to a flash chromatography to afford **(6)** (440 mg, 1.7 mmol, 79%) as an orange oil.

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 1.01 (s, 3 H) 1.02 (s, 3 H) 1.44 (s, 3 H) 1.47 - 1.68 (m, 2 H) 1.79 (s, 3 H) 1.87 - 1.90 (m, 2 H) 3.68 (m, 1 H) 5.11 (dd,

J=10.79, 0.88 Hz, 1 H) 5.28 (dd, J=17.32, 0.88 Hz, 1 H) 5.62 (d, J=16.31 Hz, 1 H) 6.01 (ddd, J=17.32, 10.79, 0.88 Hz, 1 H) 6.10 (d, J=16.31 Hz, 1 H) ¹³C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 19.13, 25.54, 26.89, 27.81, 28.94, 34.19, 34.38, 61.98, 73.21, 112.09, 124.15, 124.51, 140.36, 143.60, 143.77 HRMS: [M+H]⁺: 262.19639, found 262.19654

((2E,4E)-5-(3-azido-6,6-dimethylcyclohex-2-en-1-yl)-3-methylpenta-2,4-dien-1-yl)sulfonyl)benzene (7)



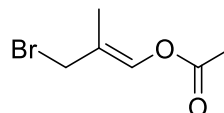
Chemical Formula: C₂₁H₂₇N₃O₂S
Molecular Weight: 385,52600

(6) (1 eq., 506 mg, 1.94 mmol) was added to a solution of sodium phenylsulfinate (1.12 eq., 357 mg, 2.18 mmol) in acetic acid (3 mL). The mixture was stirred at room temperature over week-end. The mixture was evaporated in vacuo at 50 °C. The residue was stirred with water (5mL) and ether (5mL), washed with NaHCO₃ (5%) followed by saturated brine, dried over MgSO₄ and evaporated to give crude (661 mg). The crude was submitted to an inverse phase flash chromatography (water to acetonitrile) to get **(7)** (384 mg, 0.996 mmol, 51%) as a brown oil

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 0.99 (s, 3 H) 1.01 (s, 3 H) 1.12 - 1.16 (m, 2 H) 1.46 (s, 3 H) 1.78 (s, 3 H) 1.82 - 1.87 (m, 2 H) 3.70 (m, 1 H) 3.96 (d, J=8.28 Hz, 2 H) 5.44 (t, J=8.28 Hz, 1 H) 5.74 (d, J=16.31 Hz, 1H) 6.15 (d, J=16.31 Hz, 1 H) 7.51 - 7.56 (m, 2 H) 7.62 - 7.68 (m, 1 H)

7.87 (d, J=7.53 Hz, 2 H) HRMS: [M]⁺: 385.1824, found 385.1822

(E)-3-bromo-2-methylprop-1-en-1-yl acetate (8)

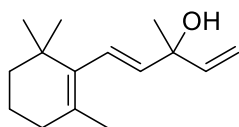


Chemical Formula: C₆H₉BrO₂
Molecular Weight: 193,04000

To a stirred solution of isoprene (1.33 eq., 1020 mg, 1.5 mL, 15 mmol) in AcOH (6 mL) was added NBS (1 eq., 2000 mg, 11.2 mmol) in cold water bath. The reaction mixture was stirred for 2 hours and p-toluenesulfonic acid monohydrate (2 %, 42.7 mg, 0.225 mmol) was added. The mixture was then heated to 80 °C for 1 h and cooled to room temperature. The reaction mixture was extracted with cyclohexane, washed with water and 1 M NaOH, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was dissolved in MeOH (4 mL) and a solution of K₂CO₃ (0.443 eq., 688 mg, 4.98 mmol) in water (1 mL) was added. The resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h and most of the solvent and the cyclized Z-isomer were removed under reduced pressure. The above residue was diluted with DCM, washed with 1 M HCl and water, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product (650 mg) was purified by flash chromatography (gradient from cyclohexane to EtOAc) to give **(8)** (411 mg, 2.49 mmol, 22 %) as a brown oil.

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 1.83 (s, 3 H) 3.97 (s, 3 H) 4.21 (d, J=6.02 Hz, 2 H) 5.81 (t, J=6.02 Hz, 1 H) ¹H NMR is consistent with the literature.

(E)-3-methyl-1-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)penta-1,4-dien-3-ol (9)

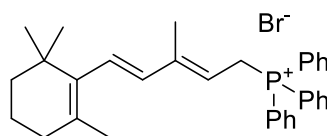


Chemical Formula: C₁₅H₂₄O
Molecular Weight: 220,35600

In a 2-necked flash, equipped with a condenser and a dropping funnel was placed Mg (3 eq., 0.961 g, 39.5 mmol). Et₂O (4 mL) was added to cover the magnesium and few crystals of iodine was added. Vinyl bromide (3 eq., 1 M, 39.5 mL, 39.5 mmol) was added dropwise. The mixture was heated at 50 °C for 30 min. 29 mL of the solution of vinylmagnesium bromide (2 eq.) were slowly added to beta-ionone (1 eq., 2.53 g, 2.68 mL, 13.2 mmol) in Et₂O (30 mL) at 0 °C and then stirred at room temperature for 3 h. The mixture was diluted with saturated aqueous NH₄Cl and diethyl ether and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with ether and the combined organic fractions were washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum to give 3.0 g of crude (yellow oil). The crude was purified by chromatography (cyclohexane to 20% EtOAc) to get **(9)** (1.786 g, 8.11 mmol, 61 %) as an orange oil.

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 0.99 (s, 6 H) 1.43 (s, 3 H) 1.42 - 1.48 (m, 4 H) 1.67 (s, 3 H) 1.96 - 2.01 (s, 3 H) 5.09 (d, J=10.54 Hz, 1 H) 5.28 (d, J=17.32 Hz, 1 H) 5.55 (d, J=16.06 Hz, 1 H) 6.02 (dd, J=17.32, 10.54 Hz, 1 H) 6.09 (d, J=16.06 Hz, 1 H) ¹H NMR is consistent with the literature.

[(2E,4E)-3-methyl-5-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)penta-2,4-dien-1-yl]triphenylphosphonium bromide (10)

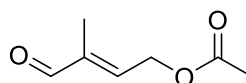


Chemical Formula: C₃₃H₃₈BrP
Molecular Weight: 545,54476

A solution of triphenylphosphine hydrobromide (1 eq., 1.292 g, 3.77 mmol) in MeOH (25 mL) was added dropwise within 2 h to a stirred solution of (4E)-3-methyl-5-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)penta-1,4-dien-3-ol (1 eq., 830 mg, 3.77 mmol) in MeOH (20 mL). After 17 h stirring at room temperature, the mixture was evaporated and a small amount of DCM was added, then Et₂O to precipitate the product. Solvent was removed. This process was repeated 4 times. The paste was dried over vacuum to get **(10)** (547 mg, 1.003 mmol, 27%) as an orange powder.

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 0.96 (s, 6 H) 1.06 - 1.19 (m, 6H) 1.51 (s, 3 H) 1.61 (s, 3 H) 4.82 (dd, J=15.44 Hz, J_{C-P}= 6.65 Hz, 2 H) 5.58 (t, J=6.65 Hz, 1 H) 6.01 - 6.11 (m, 2 H) 7.80 - 8.22 (m, 15 H)

(E)-3-methyl-4-oxobut-2-en-1-yl acetate (11)



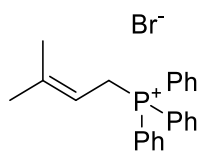
Chemical Formula: C₇H₁₀O₃
Molecular Weight: 142,15400

To a round bottom flask was added 4A molecular sieves powder (1.6g per 1g of starting material) and the flask was flamed under reduce pressure, then

argon was added. A solution of (2E)-4-bromo-3-methylbut-2-en-1-yl acetate (1 eq., 125 mg, 0.604 mmol) in DCM (2.5 mL) and NMO (4 eq., 282 mg, 2.41 mmol) were added. The resulting mixture was stirred for 6 h. The mixture was filtered on Celite and washed with DCM to get 420 mg of a brown oil. The crude was purified by manual chromatography (cyclohexane to 20% EtOAc) to get **(11)** (21 mg, 0.148 mmol, 24 %) as a colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 1.80 (s, 3 H) 2.12 (s, 3 H) 4.90 (d, J=5.55 Hz, 2 H) 6.49 (t, J=5.55 Hz, 1 H) 9.45 (s, 1 H)

(3-methylbut-2-en-1-yl)triphenyl phosphonium bromide (**12**)

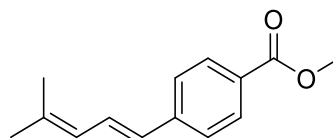


Chemical Formula: C₂₃H₂₄BrP
Molecular Weight: 411,32276

3,3-dimethylallyl bromide (1.5 eq., 666 mg, 515 μL, 4.47 mmol) and PPh₃ (1 eq., 782 mg, 2.98 mmol) were added to toluene (15 mL) and stirred at 70 °C overnight. Toluene was evaporated and the crude was washed with ether to get **(12)** (1.2 g, 2.92 mmol, 98 %) as a pale brown powder.

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 1.29 (d, J=3.76 Hz, 3 H) 1.66 (d, J=6.02 Hz, 3 H) 4.70 (dd, J=14.56, 7.78 Hz, 2 H) 5.13 (m, 1 H) 7.65 - 7.71 (m, 6 H) 7.76 - 7.81 (m, 3 H) 7.85 - 7.90 (m, 6 H)
¹H NMR is consistent with the literature¹²⁰.

(E)-1-methoxy-4-(4-methylpenta-1,3-dien-1-yl)benzene (**13**)

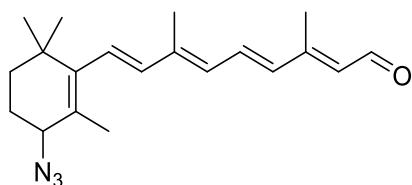


Chemical Formula: C₁₄H₁₆O₂
Molecular Weight: 216,28000

(3-methylbut-2-en-1-yl)triphenylphosphonium bromide (1 eq., 93.4 mg, 0.227 mmol) was dissolved in the appropriate solvent (1 mL), then cooled down at -20 °C. If required, the additive (3 eq.) was added. The base (1 eq., 1.6 M) was added. The mixture became brown and was stirred at -20 °C for 1 h. 4-carbomethoxybenzaldehyde (1 eq., 37.3 mg, 0.227 mmol) in the appropriate solvent (1 mL) was added and the mixture was allowed to warm up to room temperature and stirred overnight. NH₄Cl and Et₂O were added. Aqueous layer was extracted with Et₂O; then the combined organic layers were washed with water, brine and dried over MgSO₄. Solvent was evaporated under reduced pressure to get 83 mg of a brown solid. The crude was purified by flash chromatography (cyclohexane to 10% EtOAc) to get **(13)** as a colorless solid.

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 1.85 (s, 3 H), 1.86 (s, 3 H) 3.92 (s, 3H) 6.31 – 6.36 (m, 2 H) 6.49 - 6.57 (m, 2 H) 7.40 (m, 1 H) 7.44 (d, J=8.28 Hz, 2 H) 8.00 (d, J=8.28 Hz, 2 H)

(2E,4E,6E,8E)-9-(3-azido-2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)-3,7-dimethylnona-2,4,6,8-tetraenal (14)



Chemical Formula: $C_{20}H_{27}N_3O$
Molecular Weight: 325,45600

To a solution of retinaldehyde in 0.5 mL of dry DCM under a N_2 atmosphere was added a suspension of NBS in 0.5 mL of dry DCM at $-20\text{ }^\circ\text{C}$. The reaction mixture was then stirred at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ for 10 min before a solution of NaN_3 in dry DMF was added. The resulting solution was stirred for about 2 h (left slowly to warm-up in the cold bath). The crude was filtered through a short plug of silica to get rid of the insoluble chemicals. Column was rinsed with DCM, followed by Et_2O . Crude was purified by column chromatography (95:5 PE/ Et_2O) to obtain **(14)** (14.6 mg, 0.04486 mmol, 30%) as a yellow solid.

1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 1.05 (s, 3 H) 1.06 (s, 3 H) 1.43 - 1.53 (m, 2 H) 1.63 - 1.71 (m, 2 H) 1.84 (s, 3 H) 2.04 (s, 3 H) 2.34 (s, 3 H) 3.72 (m, 1 H) 6.00 (d, $J=8.28$ Hz, 1 H) 6.17 - 6.32 (m, 3 H) 6.41 (d, $J=15.30$ Hz, 1 H) 7.13 (dd, $J=15.30, 11.42$ Hz, 1 H) 10.13 (d, $J=8.28$ Hz, 1 H) ^{13}C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 12.99 13.12 19.76 25.66 27.37 29.32 29.69 34.66 62.40 125.94 127.92 129.34 130.55 132.08 135.36 138.71 140.27 144.13 154.46 191.10 HRMS: $[M]^+$: 327.2311, found

Cell differentiation

P19 EC cells were propagated undifferentiated and grown in exponential phase in T-75 culture flasks (BD Falcon) using low glucose [1 g/l] Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 5% fetal calf serum (FCS) (Sigma, ref. F-7524) and 5% delipidated fetal calf serum (dFCS), to prevent spontaneous differentiation (Undifferentiation Medium [UM]). Medium was supplemented with 2 mM glutamine and 10 $\mu\text{g/ml}$ gentamycin. After reaching 70-80% confluency, cells were used for induction of differentiation (see below), or were used for further passages. To this end, EC cells were first grown in suspension in P10 Petri dishes (Greiner) for 24 h to separate undifferentiated from differentiating adherent cells, and undifferentiated cells present in suspension were mechanically dissociated and seeded at the density of 400 000 cells per T-75 flask in 20 ml UM. To induce differentiation, cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and detached with 1 ml of 0.001% trypsin for 1 min. Immediately, 9 ml of UM was added to obtain a cell suspension, followed by 5 min of 1000 rpm centrifugation at room temperature (RT). The supernatant was discarded and the cell pellet was resuspended in α -MEM 1900 supplemented with 10% FCS (Differentiation Medium [DM]). 10^6 cells were seeded in P10 Petri dishes in 10 ml of DM, and N_3 -RAL was added immediately to obtain the following concentrations: 5 μM (N_3 -RAL). Cell cultures were placed in an incubation chamber at $37\text{ }^\circ\text{C}$ (95% O_2 , 5% CO_2) for 96 h. First aggregates were visible after 24 h of culture. After 4 days of ATRA exposure,

aggregates (embryoid bodies) were collected by sedimenting in 15 ml conical BD Falcon tubes, washed in PBS, trypsinized in 1 ml of 0,25% Trypsin for 3 min in a 37°C water bath, and mechanically dissociated using pipetting in 10 ml of DM. The cell suspension was filtered by a 40 µm nylon filter into 10 ml of DM, and after centrifugation was resuspended in Neuronal Medium (NM) consisting of DMEM (4.5 g/l glucose)-GLUTAMAX-1-Ham-F12 (1:1) medium supplemented with N2 (Gibco, ref. 17502048) and fibronectin (Sigma, ref. F1141). 10⁶ cells were seeded in 60 mm Petri dishes (BD Falcon) coated with (0.005%) poly-L-lysine (Sigma, ref. P4707). Cells attached immediately, and after 24 h the first dendrites were visible. NM was replaced every third day and at the sixth day cells were collected for analysis.

Chapter 2: Chemospecific-based metabolomic

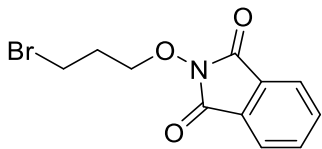
Analysis of aldehyde derived molecules using UPLC-C18- APPI+ MS/MS

Each sample was analysed on an Ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) at MS/MS mode. The analysis was performed on a Waters Quattro Premier XE (Waters, Mildorf, MA USA) equipped with an Atmospheric Pressure Photon Ionisation (APPI) source and coupled to an Acquity UPLC system (Waters) with diode array detector (DAD). Chromatographic separation was achieved using an Acquity UPLC BEH C₁₈ column (100 x 2.1 mm, 1.7µm; Waters), coupled to an Acquity UPLC BEH C₁₈ pre-

column (2.1 x 5 mm, 1.7µm; Waters). The mobile phases selected were water with 0.1% formic acid (solvent A) and methanol with 0.1% formic acid (solvent B). The separation started with 95% A maintained for 1.5 min; followed by 13.5 min gradient to reach 100% B and then maintained for 2.5 min. It was followed by a gradient to reach 95 % A in 1 min, maintained for 2.5 min. Total run time was 20 min. The column was operated at 40°C with a flow-rate of 0.3 ml min⁻¹, sample injection volume 10 µl. Both drying gas and nebulising gas was nitrogen generated from pressurized air in an N2G nitrogen generator (Mistral, Schmidlin-dbs-AG, Switzerland). The parameters involving the MS/MS detection and APPI ionization were as follow: nebulizer gas flow was set to approximately 50L.h⁻¹, and the desolvation gas flow to 500L.h⁻¹. The APPI probe temperature was set to 450°C, and the source temperature to 120 °C. The capillary voltage was set at 1.5 kV and cone voltage were optimised for each derived molecule. Mass spectra of aldehyde derived molecules were acquired with a scan range of m/z range 150-900 amu. The selected Ion recording (SIR) MS mode was used to determine parent mass transition of aldehyde derived molecules m/z mass. Daughter scan (DS) MS/MS mode was then used to determine the fragmentation pattern for each molecule. Multiple reactions monitoring (MRM), MS/MS mode with positive APPI ionization was then used based on the selection of the most abundant ions for qualitative analysis. The MRM methods used of aldehyde derived molecules are shown in the following table. Data acquisition and analysis were performed with the MassLynx software (ver.5.1) running

under Windows XP professional on a Pentium PC.

2-(3-bromopropoxy)isoindoline-1,3-dione (15)

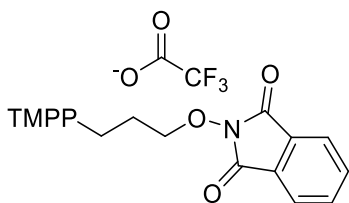


Chemical Formula: $C_{11}H_{10}BrNO_3$
Molecular Weight: 284,10900

To a solution of 1,3-dibromopropane (5.67 eq., 4129 mg, 2076 μ L, 20.5 mmol) and N-hydroxyphthalimide (1 eq., 589 mg, 3.61 mmol) in DMF (5000 μ L) was added NEt_3 (2.66 eq., 971 mg, 1335 μ L, 9.6 mmol) and the solution turned black red. The mixture was stirred overnight at room temperature and became colorless. The mixture was filtered. The filtrate was diluted water, extracted with EtOAc, and washed with cold water. The organic solvent was evaporated to give (15) (417 mg, 1.47 mmol, 41 %) as a white powder.

1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 2.31 (tt, $J=6.53, 5.77$ Hz, 2 H) 3.71 (t, $J=6.53$ Hz, 2 H) 4.37 (t, $J=5.77$ Hz, 2 H) 7.74 - 7.80 (m, 2 H) 7.83 - 7.87 (m, 2 H)

(3-((1,3-dioxoisoindolin-2-yl)oxy)prop-yl)tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium 2,2,2-trifluoroacetate (16)

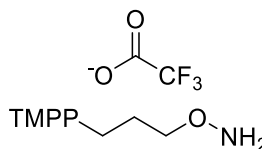


Chemical Formula: $C_{40}H_{43}F_3NO_{14}P$
Molecular Weight: 849,74597

A solution of TMPP (1 eq., 324 mg, 0.609 mmol) in toluene (4.05 mL) was refluxed to solubilized the product. 2-(3-bromopropoxy)-2,3-dihydro-1H-isoindole-1,3-dione (1.18 eq., 203 mg, 0.716 mmol) was solubilized in toluene (4 mL) and the two solutions were mixed for 30 min. The solvent was evaporated and the white solid was submit to a preparative HPLC to give (16) (395 mg, 0.484 mmol, 79 %) as a white powder.

1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 1.83 (m, 2 H) 3.28 - 3.38 (m, 2 H) 3.66 (s, 18 H) 3.91 (s, 9 H) 4.21 (m, 2H) 6.15 (m, 6 H) 7.75 - 7.85 (m, 4 H) ^{13}C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 21.34 (d, $J_{C-P}=0.62$ Hz, 1C) 23.27 (s, 1 C) 55.93 (s, 3 C) 56.09 (s, 6 C) 56.27 (s, 1 C) 91.06 (d, $J=1.04$ Hz, 3 C) 91.14 (s, 6 C) 123.50 (s, 2 C) 128.92 (s, 2 C) 134.70 (s, 2 C) 163.30 (s, 3 C) 163.68 (d, $J_{C-P}=1.24$ Hz, 6 C) 165.70 (s, 2 C)

((3-(ammoniooxy)propyl)tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium) trifluoroacetate (17)



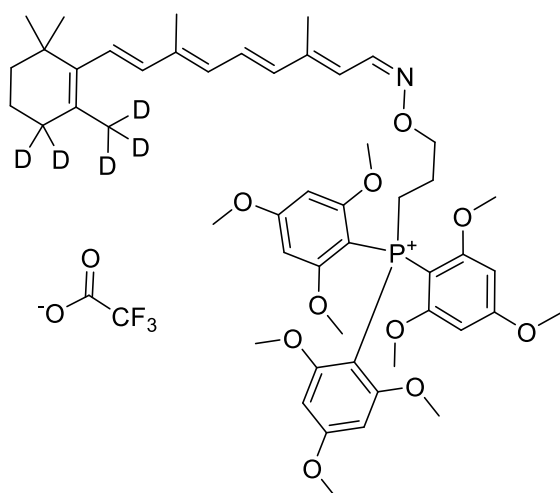
Chemical Formula: $C_{32}H_{41}F_3NO_{12}P$
Molecular Weight: 719,64397

To a solution of {3-[(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-isoindol-2-yl)oxy]propyl}tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide (1 eq., 500 mg, 0.612 mmol) in DCM (8 mL) was added hydrazine hydrate (2 eq., 63.2 mg, 61.2 μ L, 1.22 mmol). The mixture was allowed to stir at room temperature for 4 h under argon. The mixture was concentrated in vacuo and

the resulting solid was triturated with Et₂O then removed by filtration. The crude (498 mg) was submit to a preparative HPLC to give **(17)** (423 mg, 0.507 mmol, 83 %) as a white powder.

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 1.63 (m, 2 H) 3.15 (m, 2 H) 3.60 (s, 18 H) 3.87 (s, 9 H) 4.07 (m, 2 H) 6.10 (m, 6 H) MS²: [M]⁺: 606.246, found 606.5>181.0

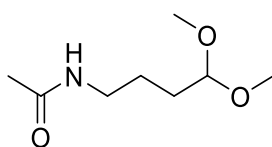
(3-(((1E,2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)nona-2,4,6,8-tetraen-1-ylidene)amino)oxy)propyl)tris(2,4,6-trimethoxyphenyl) phosphonium trifluoroacetate (18)



Chemical Formula: C₅₂H₆₂D₅F₃NO₁₂P
Molecular Weight: 991,10248

MS: [M]⁺: 877.48, found 877.43

N-(4,4-dimethoxybutyl)acetamide (19)

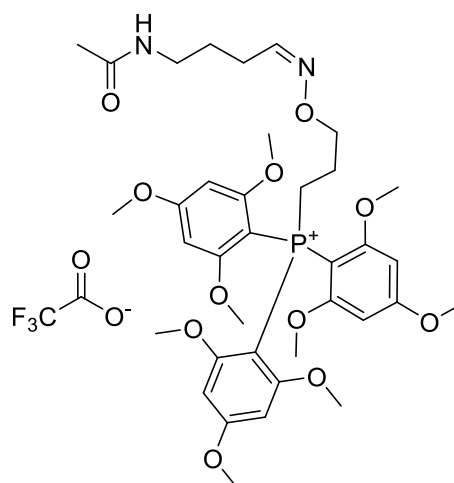


Chemical Formula: C₈H₁₇NO₃
Molecular Weight: 175,22800

To a solution of 4,4-dimethoxybutan-1-amine (1 eq., 143 mg, 154 μL, 1.08 mmol) in DCM (1.2 mL) under argon was added triethylamine (2 eq., 218 mg, 300 μL, 2.16 mmol). The mixture is cooled to 0 °C, then acetic anhydride (5 eq., 550 mg, 506 μL, 5.4 mmol) was introduced dropwise. The mixture was allowed to warm up at room temperature and stirred overnight. The mixture was quenched with a saturated aqueous solution of Na₂CO₃. Aqueous phase was extracted with DCM and the combined organic layers were combined, washed with water, brine and dried over MgSO₄ to get **(19)** (100 mg, 0.5707 mmol, 53%) as a brown oil.

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 1.21 (t, J=7.03 Hz, 6 H) 1.55 – 1.70 (m, 4 H) 1.97 (s, 3 H) 3.27 (q, J=6.36 Hz, 2 H) 3.50 (q, J=7.03 Hz, 2 H) 3.66 (q, J=7.03 Hz, 2 H) 4.49 (t, J=5.27 Hz, 1 H) 5.67 (br s, 1 H)

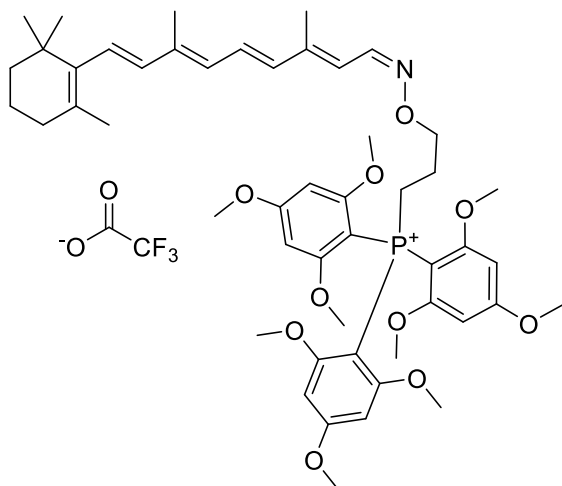
(3-(((4-acetamidobutyl)amino)oxy)propyl)tris(2,4,6-trimethoxyphenyl) phosphonium trifluoroacetate (20)



Chemical Formula: C₃₈H₅₀F₃N₂O₁₃P
Molecular Weight: 830,78797

MS: [M]⁺: 717.31, found 717.41

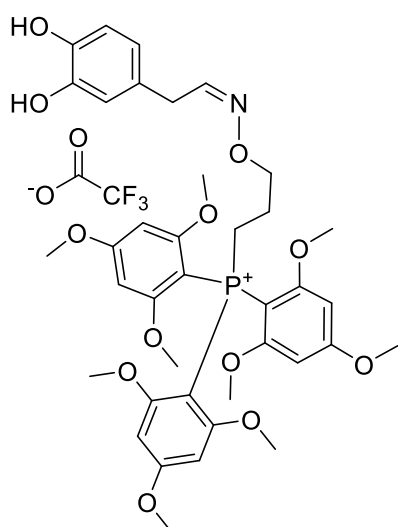
(3-(((1E,2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)nona-2,4,6,8-tetraen-1-ylidene)amino)oxy)propyl) tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium trifluoroacetate (21)



Chemical Formula: $C_{52}H_{67}F_3NO_{12}P$
Molecular Weight: 986,07197

MS: $[M]^+$: 872.44, found 872.64

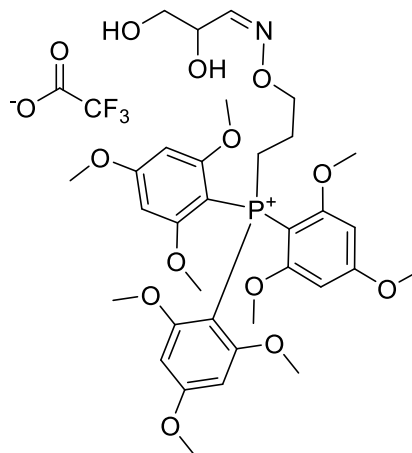
(E)-3-(((2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethylidene)amino)oxy)propyl) tris(2,4,6-trimethoxyphenyl) phosphonium trifluoroacetate (22)



Chemical Formula: $C_{40}H_{47}F_3NO_{14}P$
Molecular Weight: 853,77797

MS: $[M]^+$: 740.28, found 740.42

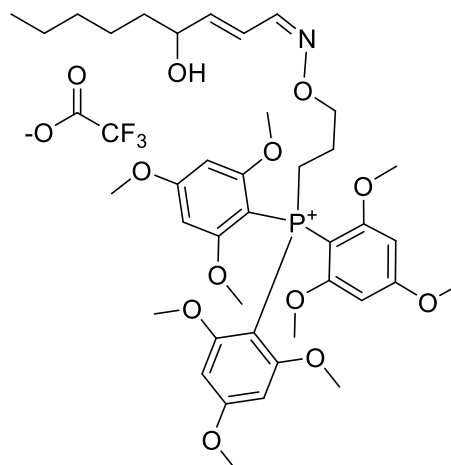
(3-(((2,3-dihydroxypropylidene) amino)oxy)propyl)tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium trifluoroacetate (23)



Chemical Formula: $C_{35}H_{45}F_3NO_{14}P$
Molecular Weight: 791,70697

MS: $[M]^+$: 678.26, found 678.38

(3-(((1Z,2E)-4-hydroxynon-2-en-1-ylidene)amino)oxy)propyl)tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium trifluoroacetate (24)



Chemical Formula: $C_{41}H_{55}F_3NO_{13}P$
Molecular Weight: 857,85397

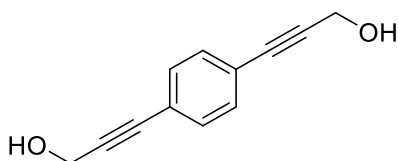
MS: $[M]^+$: 744.35, found 744.43

Biodistribution study

Experiments are done on 12 weeks-old C57Bl/6n mice. Probe (40 mg/kg) was injected in peritonea. After 15, 30 or 120 min, mice were sacrificed by CO₂ asphyxiation. Blood, liver and brain were extracted. Plasma was prepared from blood by collecting it into heparinized tubes. After 10 min, supernatant was collected in amber tubes. Brain and liver were mixed with a pestle at 0 °C, then an ultrasound sonicator was used (6 x 2 seconds). Samples were centrifuged at 13k rpm for 15 min, then collected in amber tubes and injected in LC-MS².

Chapter 3: Thiol-to-thiol coupling reagent

3,3'-(1,4-phenylene)bis(prop-2-yn-1-ol) (25)



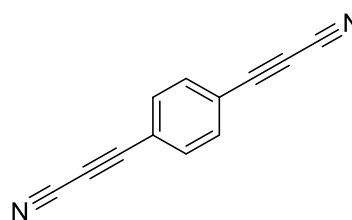
Chemical Formula: C₁₂H₁₀O₂
Molecular Weight: 186,21000

To a degassed solution of 1,2-diodobenzene (1 eq., 661 mg, 0.262 mL, 2 mmol) and propargylic alcohol (2.3 eq., 272 μL, 4.61 mmol) in butyl amine (15.8 mL), Pd(PPh₃)₄ (4%, 92.6 mg, 0.0801 mmol) was added and the resulting mixture was refluxed overnight. Solvents were evaporated and the obtained crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane to EtOAc) to give 3,3'-(1,4-phenylene)bis(prop-2-yn-

1-ol) (0.7 mmol, 40 %) as a brownish solid.

¹H NMR (400 MHz, METHANOL-d₄) δ 7.39 (s, 4H), 4.41 (s, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, METHANOL-d₄) δ 132.6, 124.3, 101.4, 90.8, 84.9, 51.2; MS: [M+H]⁺: 187.1, found 187.1.

3,3'-(1,4-phenylene)dipropiolonitrile (26)



Chemical Formula: C₁₂H₄N₂
Molecular Weight: 176,17800

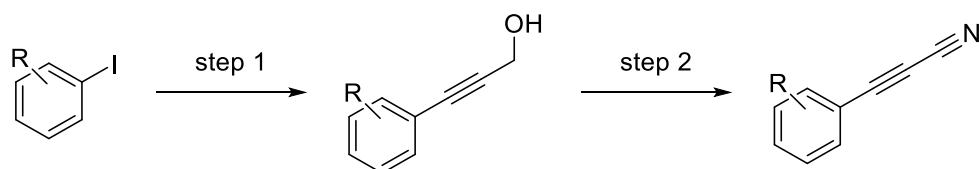
To a solution of 1,4-dibromobenzene (1 eq., 1 mmol) in THF (4.5 mL) were added MgSO₄ (15 eq., 15 mmol), highly active MnO₂ (25 eq., 25 mmol) and 2M NH₃ solution in IPA (4 eq., 4 mmol, 2 mL). The resulting mixture was vigorously stirred at 25 °C for 2 h. DCM (20 mL) was added and the crude mixture was filtered through Celite, evaporated under reduced pressure to give crude product and purified by flash chromatography to yield to 3,3'-(1,4-phenylene)dipropiolonitrile (19%) as a brown solid.

¹H NMR (400 MHz, METHANOL-d₄) δ 7.94 (s, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, METHANOL-d₄) δ 135.0, 121.6, 105.5, 82.0, 65.9; MS: [M+H]⁺: 177.0, found 177.0.

General synthesis of APN

All products synthesized thanks to method A has already been synthesized at the laboratory, and all ^1H NMR were in accordance with literature.

Method A



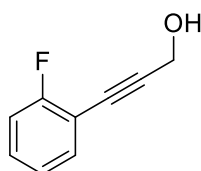
Step 1

A solution of iodoaryle (1 eq.) and 2-propyn-1-ol (1.5 eq.) in TEA (and DMF if the product was insoluble in TEA) was degassed and to this solution was added bis(triphenylphosphine)palladium chloride (2 %mol) and Copper iodide (4 %mol). After the load, the mixture was degassed and stirred at room temperature for 18 hours. The mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine solution and dried over Na_2SO_4 .

Step 2

To a solution of 3-(aryl)prop-2-yn-1-ol (1 eq.) in THF were added MnO_2 (15 eq.), MgSO_4 (15 eq.) and NH_3 (4 eq.) in IPA. The resulting mixture was stirred at room temperature. When reaction was completed, the mixture was diluted with DCM and filtered through Celite, which was washed with DCM. Organic fraction was concentrated under vacuo.

3-(2-fluorophenyl)prop-2-yn-1-ol (27)



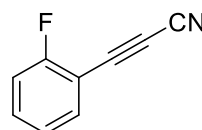
Chemical Formula: $\text{C}_9\text{H}_7\text{FO}$
Molecular Weight: 150,15240

The product was synthesized by the method A, step 1. The crude was purified by column chromatography (cyclohexane to 30% EtOAc in cyclohexane) to give 3-(2-fluorophenyl)prop-2-yn-1-ol (280 mg, 1.86 mmol, 83 %) as a brown oil.

^1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 4.52 (d, $J=6.27$ Hz, 2 H) 7.03 - 7.12

(m, 2 H) 7.26 - 7.34 (m, 1 H) 7.39 - 7.46 (m, 1 H)

(3-(2-fluorophenyl)prop-2-ynenitrile) (28)

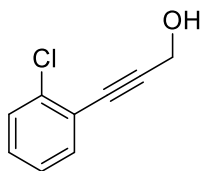


Chemical Formula: $\text{C}_9\text{H}_4\text{FN}$
Molecular Weight: 145,13640

The product was synthesized by the method A, step 2. The crude was purified by flash chromatography (cyclohexane) to give 3-(2-fluorophenyl)prop-2-ynenitrile (60 mg, 0.413 mmol, 31 %) as white crystals.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 7.12 - 7.23 (m, 2 H) 7.49 - 7.61 (m, 2 H)

3-(2-chlorophenyl)prop-2-yn-1-ol (29)

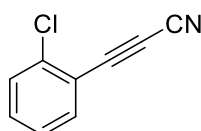


Chemical Formula: $\text{C}_9\text{H}_7\text{ClO}$
Molecular Weight: 166,60400

The product was synthesized by the method A, step 1. The crude was purified by column chromatography (10% EtOAc in cyclohexane) to give 3-(2-chlorophenyl)prop-2-yn-1-ol (253 mg, 1.519 mmol, 72%) as a brown oil.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 4.48 (d, $J=4.77$ Hz, 2 H) 7.10 - 7.23 (m, 2 H) 7.32 (dd, $J=8.03$, 1.51 Hz, 1 H) 7.40 (dd, $J=7.53$, 2.01 Hz, 1 H)

3-(2-chlorophenyl)prop-2-ynenitrile (30)

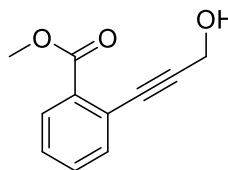


Chemical Formula: $\text{C}_9\text{H}_4\text{ClN}$
Molecular Weight: 161,58800

The product was synthesized by the method A, step 2. The crude was purified by flash chromatography (cyclohexane to EtOAc) to give 3-(2-chlorophenyl)prop-2-ynenitrile (70 mg, 0.433 mmol, 29 %) as brown orange solid.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD-d1) δ ppm 8.27 - 8.45 (m, 1 H) 8.45 - 8.56 (m, 2 H) 8.64 - 8.77 (m, 1 H)

Methyl 2-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)benzoate (31)

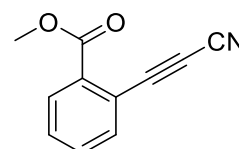


Chemical Formula: $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_3$
Molecular Weight: 190,19800

The product was synthesized by the method A, step 1. The crude was purified by column chromatography (10% EtOAc in cyclohexane) to give methyl 2-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)benzoate (602 mg, 3.17 mmol, 83 %) as an orange oil.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 2.64 (br s, 1 H) 3.90 (s, 3 H) 4.54 (s, 2 H) 7.31 - 7.38 (m, 1 H) 7.44 (td, $J=7.59$, 1.38 Hz, 1 H) 7.52 (dd, $J=7.66$, 1.13 Hz, 1 H) 7.91 (dd, $J=7.78$, 1.51 Hz, 1 H)

Methyl 2-(2-cyanoeth-1-yn-1-yl)benzoate (32)

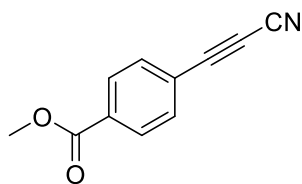


Chemical Formula: $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{NO}_2$
Molecular Weight: 185,18200

The product was synthesized by the method A, step 2. The crude was purified by column chromatography (10% EtOAc in cyclohexane) to give methyl 2-(2-cyanoeth-1-yn-1-yl)benzoate (33 mg, 0.178 mmol, 16 %) as a yellow powder.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 3.96 (s, 3 H) 7.57 - 7.60 (m, 2 H) 7.72 - 7.76 (m, 1 H) 8.06 - 8.10 (m, 1 H)

Methyl 2-(4-cyanoeth-1-yn-1-yl)benzoate (33)

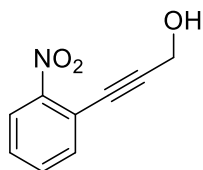


Chemical Formula: C₁₁H₇NO₂
Molecular Weight: 185,18200

The product was synthesized by the following method. 4-(2-cyanoeth-1-yn-1-yl)benzoic acid (1 eq., 48.6 mg, 0.284 mmol) was dissolved in MeOH (2 mL) and cooled down to 0 °C. SOCl₂ (10 eq., 337 mg, 205 μL, 2.84 mmol) was added dropwise. The mixture was stirred at 0 °C for 1 h, then allowed to warm up at room temperature and stirred for 3 hours. The crude was purified by column chromatography (10% EtOAc in cyclohexane) to give methyl 2-(4-cyanoeth-1-yn-1-yl)benzoate (33 mg, 0.178 mmol, 16 %) as a yellow powder.

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 3.96 (s, 3 H) 7.70 (br d, J=8.28 Hz, 2 H) 8.09 (br d, J=8.03 Hz, 2 H)

3-(2-nitrophenyl)prop-2-yn-1-ol (34)



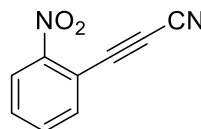
Chemical Formula: C₉H₇NO₃
Molecular Weight: 177,15900

The product was synthesized by the method A, step 1. Yield: 35%.

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 7.97 (d, J= 8.0 Hz, 1H), 7.54 - 7.60 (d, J= 8.0 Hz, 1H), 7.46 - 7.54 (t, J= 8.0

Hz, 1H), 7.36 - 7.44 (t, J= 8.0 Hz, 1H), 4.49 (s, 2H), 1.68 (br. s., 1H)

3-(2-nitrophenyl)propionitrile (35)

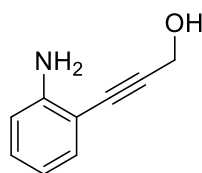


Chemical Formula: C₉H₄N₂O₂
Molecular Weight: 172,14300

The product was synthesized by the method A, step 2. Yield: 21%.

¹H NMR (400 MHz, METHANOL-d₄) δ ppm 8.28 – 8.35 (m, 1H), 7.96 – 8.06 (m, 1H), 7.81 – 7.90 (m, 2H)

3-(2-aminophenyl)prop-2-yn-1-ol (36)

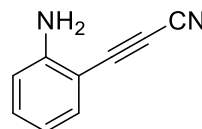


Chemical Formula: C₉H₉NO
Molecular Weight: 147,17700

The product was synthesized by the method A, step 1. Yield: 62 %.

¹H NMR (400 MHz, METHANOL-d₄) δ ppm 7.19 (dd, J= 1.25, 7.9 Hz, 1H), 7.03 - 7.12 (m, 1H), 6.75 (d, J= 7.9 Hz, 1H), 6.56 - 6.65 (m, 1H), 4.47 (s, 2H), 4.26 (s, 2H)

3-(2-aminophenyl)prop-2-ynenitrile (37)

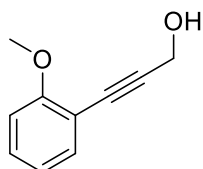


Chemical Formula: C₉H₆N₂
Molecular Weight: 142,16100

The product was synthesized by the method A, step 2. Yield: 47 %.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, METHANOL- d_4) δ ppm 4.85 (s, 3 H) 6.56 - 6.62 (m, 1 H) 6.75 (d, $J=8.53$ Hz, 1 H) 7.23 (ddd, $J=8.41$, 7.15, 1.51 Hz, 1 H) 7.32 (dd, $J=7.78$, 1.51 Hz, 1 H)

3-(2-methoxyphenyl)prop-2-yn-1-ol (38)

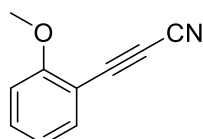


Chemical Formula: $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2$
Molecular Weight: 162,18800

The product was synthesized by the method A, step 1. Yield: 87 %.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, METHANOL- d_4) δ ppm 7.15 - 7.24 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.93 - 6.98 (m, 1H), 6.87 (dd, $J = 2.13$, 7.5 Hz, 1H), 4.41 (s, 2H), 3.73 (s, 3H)

3-(2-methoxyphenyl)prop-2-ynenitrile (39)



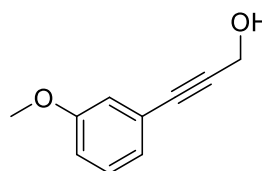
Chemical Formula: $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}$
Molecular Weight: 157,17200

The product was synthesized by the method A, step 2. Yield: 45 %.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM- d) δ ppm 3.92 (d, $J=1.00$ Hz, 3 H) 4.85 (d,

$J=1.25$ Hz, 1 H) 6.97 - 7.02 (m, 1 H) 7.10 (d, $J=8.53$ Hz, 1 H) 7.52 - 7.59 (m, 2 H)

3-(3-methoxyphenyl)prop-2-yn-1-ol (40)

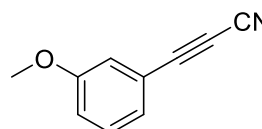


Chemical Formula: $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2$
Molecular Weight: 162,18800

The product was synthesized by the method A, step 1. Yield: 90%.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM- d) δ ppm 3.79 (s, 3 H) 4.49 (d, $J=6.27$ Hz, 2 H) 6.88 (ddd, $J=8.35$, 2.57, 0.88 Hz, 1 H) 6.96 (dd, $J=2.64$, 1.38 Hz, 1 H) 7.02 (dt, $J=7.53$, 1.13 Hz, 1 H) 7.21 (t, $J=8.30$ Hz, 1 H)

3-(3-methoxyphenyl)prop-2-ynenitrile (41)

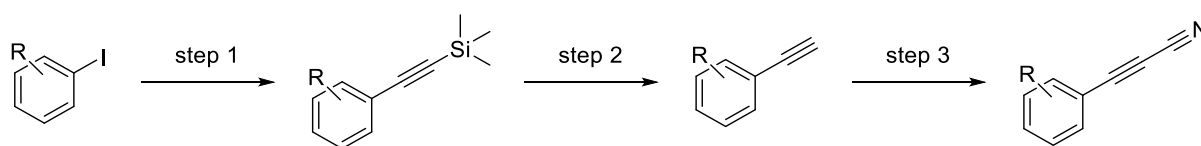


Chemical Formula: $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}$
Molecular Weight: 157,17200

The product was synthesized by the method A, step 2. Yield: 31%.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM- d) δ ppm 3.82 - 3.84 (s, 3 H) 7.06 - 7.12 (m, 2 H) 7.21 (m, 1 H) 7.30 - 7.35 (m, 1 H)

Method B



Step 1:

A mixture of iodoaryl (1 eq.) and trimethylsilylacetylene (1.5 eq.) in TEA, was degassed, then bis(triphenylphosphine)palladium dichloride (2 %mol) and, CuI (4 %mol). The mixture was degassed again and stirred at room temperature. The residue was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine solution and dried over Na₂SO₄.

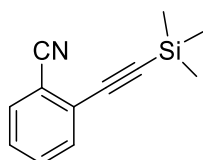
Step 2:

4-[2-(trimethylsilyl)ethynyl]aryl (1 eq.) and TBAF (1.1 eq.) were added in THF. The reaction mixture was stirred at room temperature for 10 min. The reaction mixture was quenched with NH₄Cl (double of the volume of THF) Aqueous phase extracted with EtOAc. Organic layers were washed with brine, then dried on Na₂SO₄.

Step 3:

A dry Schlenk tube was charged with copper(I) trifluoromethanesulfonate toluene complex (0.2 eq.), ICN (5 eq.), and THF under nitrogen atmosphere. 4-ethynylaryl (1 eq.) and 2,2,6,6-tetramethylpiperidine (3 eq.) were added to the solution and the resulting mixture was stirred at 60°C. The reaction was quenched by adding a saturated solution of NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with Et₂O. The combined organic extract was washed with a saturated solution of Na₂S₂O₃, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under vacuum.

2-[2-trimethylsilylethynyl] benzonitrile (42)



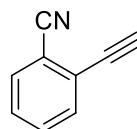
Chemical Formula: C₁₂H₁₃NSi
Molecular Weight: 199,32800

The product was synthesized by the method B, step 1. The crude was purified by column chromatography

(Cyclohexane, then 10% EtOAc in cyclohexane) to give **(42)** (420 mg, 2.107 mmol, 97 %) as a brown oil.

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 0.30 (s, 9 H) 7.38 - 7.43 (m, 1 H) 7.50 - 7.59 (m, 2 H) 7.64 (m, 1 H)

2-ethynylbenzonitrile (43)

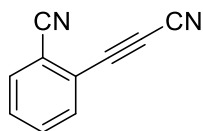


Chemical Formula: C₉H₅N
Molecular Weight: 127,14600

The product was synthesized by the method B, step 2. The crude was purified by column chromatography (cyclohexane, then 10% EtOAc in cyclohexane) to give **(43)** (138 mg, 1.09 mmol, 52 %) as a pale-yellow solid.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 3.49 (s, 1 H) 7.44 - 7.49 (m, 1 H) 7.55 - 7.59, (m, 1 H) 7.62 - 7.64 (m, 1 H) 7.66 - 7.70 (m, 1 H)

2-(2-cyanoeth-1-yn-1-yl)benzonitrile (44)

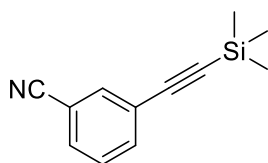


Chemical Formula: C₁₀H₄N₂
Molecular Weight: 152,15600

The product was synthesized by the method B, step 3. The crude was purified by column chromatography (10% EtOAc in cyclohexane) to give **(44)** (40 mg, 0.263 mmol, 67 %) as an orange powder.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 7.64 - 7.75 (m, 2 H) 7.76 - 7.80 (m, 2 H) $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 67.98, 77.98, 104.68, 109.34, 117.11, 121.34, 132.01, 132.65, 133.39, 134.68 MS: expect [M]⁺: 152.0375, found 152.0365

3-[2-trimethylsilylethynyl]benzonitrile (45)

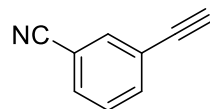


Chemical Formula: C₁₂H₁₃NSi
Molecular Weight: 199,32800

The product was synthesized by the method B, step 1. The crude was purified by column chromatography (cyclohexane) to give **(45)** (739 mg, 3.71 mmol, 85 %) as a pale brown solid.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 0.24 - 0.30 (m, 9 H) 7.39 - 7.46 (m, 1 H) 7.59 (m, 1 H) 7.67 (m, 1 H) 7.73 - 7.76 (m, 1 H) $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm -0.26, 0.03, 0.31, 97.71, 102.53, 113.07, 118.25, 125.06, 125.07, 129.40, 131.86, 135.55, 136.20,

3-ethynylbenzonitrile (46)

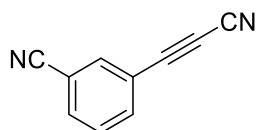


Chemical Formula: C₉H₅N
Molecular Weight: 127,14600

The product was synthesized by the method B, step 2. The crude was purified by column chromatography (cyclohexane, then 10% EtOAc in cyclohexane) to **(46)** (123 mg, 0.967 mmol, 64 %) as a pale-yellow solid.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 7.43 - 7.49 (m, 1 H) 7.64 (dt, J=7.91, 1.32 Hz, 1 H) 7.71 (dt, J=7.84, 1.47 Hz, 1 H) 7.77 (t, J=1.63 Hz, 1 H) $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 79.75, 81.16, 112.95, 117.84, 123.76, 129.26, 132.02, 135.44, 136.14

3-(2-cyanoeth-1-yn-1-yl)benzonitrile (47)

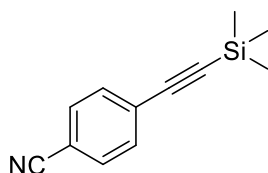


Chemical Formula: C₁₀H₄N₂
Molecular Weight: 152,15600

The product was synthesized by the method B, step 3. The crude was purified by column chromatography (10% EtOAc in hexane) to give **(47)** (20 mg, 0.131 mmol, 17 %) as an orange powder.

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 7.54 - 7.61 (m, 1 H) 7.77 - 7.85 (m, 1 H) 7.88 - 7.90 (m, 1 H) ¹³C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 64.99, 79.74, 104.76, 113.91, 167.89, 119.43, 130.00, 134.87, 136.60, 137.18 MS: expect [M]⁺: 152.0375, found 152.0429

4-[2-(trimethylsilyl)ethynyl]benzonitrile (48)

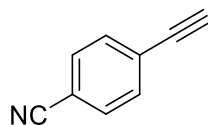


Chemical Formula: C₁₂H₁₃NSi
Molecular Weight: 199,32800

The product was synthesized by the method B, step 1. The crude was purified by column chromatography (Cyclohexane) to give **(48)** (717 mg, 3.6 mmol, 82 %) as a white powder.

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 0.23 - 0.27 (m, 9 H) 7.50 - 7.55 (m, 2 H) 7.55 - 7.60 (m, 2 H) ¹³C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm -0.29, 99.56, 102.97, 111.78, 118.38, 128.00, 131.89, 132.42

4-ethynylbenzonitrile (49)

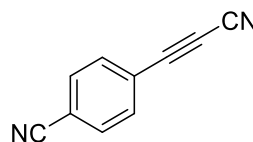


Chemical Formula: C₉H₅N
Molecular Weight: 127,14600

The product was synthesized by the method B, step 2. The crude was purified by column chromatography (Cyclohexane, then 10% EtOAc in cyclohexane) to give **(49)** (157 mg, 1.23 mmol, 82 %) as a pale-yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 3.29 (s, 1 H) 7.53 - 7.59 (m, 2 H) 7.59 - 7.63 (m, 2 H) ¹³C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 81.50, 81.86, 112.36, 118.22, 127.00, 132.01, 132.67

4-(2-cyanoeth-1-yn-1-yl)benzonitrile (50)



Chemical Formula: C₁₀H₄N₂
Molecular Weight: 152,15600

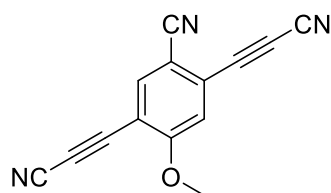
The product was synthesized by the method B, step 3. The crude was purified by column chromatography (10% EtOAc in hexane) to give **(50)** (102 mg, 0.67 mmol, 85 %) as an orange powder.

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 7.73 (s, 4 H) ¹³C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 66.17, 80.19, 104.71, 115.40, 117.33, 122.21, 132.43, 133.90

Computational details for DFT calculations: Calculations were carried out with the Gaussian09 package¹ and all structures were fully optimized without any symmetry constraints at the DFT level by means of the PBE0 (PBE1PBE keyword) functional.² The 6-311++G(d,p) basis set was applied for all atoms, and solvent effects have been included in the optimization process with the integral equation formalism version of the polarizable continuum model (IEFPCM) for water. Each stationary point has been characterized with frequency analysis and shows the correct number of negative eigenvalues (zero for a local minimum and one for a transition state). All transition states were verified by stepping along the reaction coordinate (intrinsic reaction coordinate calculations) and confirming that they transformed into the corresponding reactants/products. To get accurate geometries and energies, the SCF convergence criterion was systematically tightened to 10^{-8} au, and the force minimizations were carried out until the rms force became smaller than (at least) 1×10^{-5} au (“tight” optimization keyword in Gaussian 09). The “UltraFine” grid (99 radial shells and 590 angular points per shell) was used throughout the calculations, as recommended when using Gaussian 09. The Gibbs free energies presented in this article are IEFPCM(water)-PBE0/6-311++G(d,p) electronic energies modified with thermal and entropic corrections obtained at the same level of calculation at 298 K. Due to the well-known errors associated with entropy calculations, we apply a scaling factor of 0.5 to the entropic contributions as recommended in the literature.³⁻⁶

Synthesis of ADPN

ADPN: 3,3'-(2-cyano-5-methoxy-1,4-phenylene)dipropiolonitrile (56)



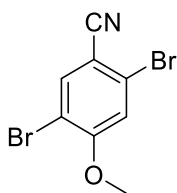
Chemical Formula: $C_{14}H_5N_3O$

Molecular Weight: 231,21400

59 (1 eq., 99.2 mg, 0.547 mmol), $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ (0.4 eq., 52.9 mg, 0.219 mmol) and AMBN (4 eq., 421 mg, 2.19 mmol) were added to acetonitrile (7 mL). The round bottom flask was charged with a refrigerant and a balloon of air and the mixture was stirred at 80 °C for 6 h. The mixture was filtered over Celite, solvent was removed and the residue (468 mg) was purified by chromatography (cyclohexane to 10% EtOAc) to get ADPN (**56**) (48 mg, 0.208 mmol, 38 %) as a pale brown powder.

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 4.04 (s, 2 H) 4.04 (s, 1 H) 7.25 (s, 1 H) 7.88 (s, 1 H) ¹³C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 57.13, 70.14, 70.59, 75.47, 76.59, 104.17, 104.63, 109.30, 111.92, 114.61, 116.65, 125.55, 139.26, 164.58. HRMS: [M-CH₃]: 216.01979, found 216.01986

2,5-dibromo-4-methoxybenzonitrile (57)

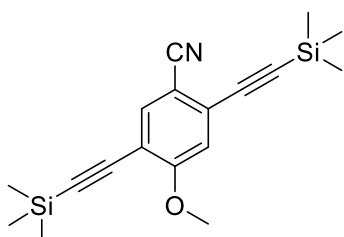


Chemical Formula: C₈H₅Br₂NO
Molecular Weight: 290,94200

3-bromo-4-methoxybenzonitrile (1 eq., 1 g, 4.72 mmol), NBS (1.1 eq., 923 mg, 5.19 mmol), diacetate palladium (5 %, 52.9 mg, 0.236 mmol), para-toluenesulfonic acid monohydrate (50 %, 448 mg, 2.36 mmol) and 1,2-dichloroethane (15 mL) were added into a sealed tube. The mixture was heated at 70 °C for 34 h. After cooling at room temperature, the mixture was filtered, washed with DCM and volatiles were removed under reduced pressure and the residue was purified by a flash column chromatography on silica gel (EtOAc in cyclohexane 1/9) to give **(57)** as a pale brown powder.

¹H NMR (400 MHz, METHANOL-d₄) δ ppm 3.98 (s, 3 H) 7.14 (s, 1 H) 7.80 (s, 1 H) ¹³C NMR (101 MHz, METHANOL-d₄) δ ppm 57.69, 109.85, 111.78, 118.18, 121.47, 150.09, 151.32 HRMS: [MH]⁺: 289.88107, found 289.87976

4-methoxy-2,5-bis[2-(trimethylsilyl)ethynyl]benzonitrile (58)

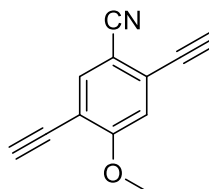


Chemical Formula: C₁₈H₂₃NOSi₂
Molecular Weight: 325,55800

57 (1 eq., 802 mg, 2.76 mmol) and bis (triphenylphosphine) palladium dichloride (5 %, 97 mg, 0.138 mmol) were mixed in TEA (30 mL) and the mixture was degassed for 10 min with argon bubbling in an ultrawaves bath. Then CuI (10 %, 52.5 mg, 0.276 mmol) and trimethylsilylacetylene (3 eq., 812 mg, 1.18 mL, 8.27 mmol) was added. The mixture was submitted to ultrawaves for 10 min then stirred for 19 h. The residue was diluted with water and extracted with Et₂O. The organic layer was washed with water, saturated NH₄Cl solution, brine solution and dried over MgSO₄. The solvent was evaporated and the crude product was purified by column chromatography to obtain **(58)** (598 mg, 1.84 mmol, 67 %) as a brown solid.

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 0.27 (s, 9 H) 0.30 (s, 9 H) 3.93 (s, 3 H) 6.98 (s, 1 H) 7.67 (s, 1 H); ¹³C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm - 0.20, 56.31, 98.26, 100.48, 102.84, 103.79, 107.82, 113.92, 114.19, 116.77, 128.20, 137.76, 162.44. HRMS: [M]⁺: 325.13182, found 325.17691

2,5-diethynyl-4-methoxybenzonitrile (59)



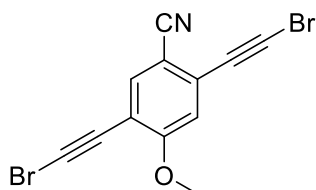
Chemical Formula: C₁₂H₇NO
Molecular Weight: 181,19400

To a cooled to 0°C solution of **58** (1 eq., 100 mg, 0.309 mmol) in THF (3000 μL) was added 1M THF solution of TBAF (2.1 eq., 1 M, 648 μL, 0.648 mmol). Stirring continued for 10 min, then the reaction

was quenched with saturated solution of NH_4Cl (6 mL), same volume of water was added, then aqueous layer was extracted with EtOAc, washed with water, brine, dried over MgSO_4 and evaporated. The product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 9/1) to give (**59**) as a pale orange powder.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 3.45 (s, 1 H) 3.57 (s, 1 H) 3.97 (s, 3 H) 7.07 (s, 1 H) 7.72 (s, 1 H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 56.37, 77.18, 79.31, 84.72, 85.17, 107.77, 109.22, 113.28, 114.79, 116.55, 127.63, 137.76, 162.73. HRMS: $[\text{M}]^+$: 181.05276, found 181.05245

2,5-bis(bromoethynyl)-4-methoxybenzonitrile (**60**)



Chemical Formula: $\text{C}_{12}\text{H}_5\text{Br}_2\text{NO}$
Molecular Weight: 338,98600

To a solution of **59** (1 eq., 40.9 mg, 0.226 mmol) in ACN (2 mL) at 80°C was added NBS (2.2 eq., 88.4 mg, 0.497 mmol) and then AgNO_3 (0.2 eq., 7.67 mg, 0.0451 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 30 min and became orange. The reaction mixture was poured into water and then extracted with DCM. The combined organic phase was washed with water, brine, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The orange crude (75 mg) was purified by flash chromatography (cyclohexane to cyclohexane/EtOAc 1/1) to give (**60**) (75 mg, 0.221 mmol, 98 %) as an orange powder.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 3.94 (s, 3 H) 7.00 (s, 1 H) 7.65 (s, 1 H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 56.41, 58.00, 59.76, 74.04, 76.46, 107.79, 113.87, 114.81, 116.60, 128.03, 137.73, 162.93. MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 337.881, found 337.806

Measurement of kinetic constants of ADPN

First addition: To an HPLC vial containing 985 μL of a 1/1 ACN/PBS (1x, pH 7.3) mixture, were subsequently added 5 μL of the stock solution of benzamide (100 mM in water), 5 μL of the stock solution of ADPN (10 mM in DMSO) and 5 μL of stock solution of GSH (10 mM in PBS) to give final concentration of 5 μM for each reagent and 500 μM for internal standard). The autosampler injected the mixture every 7 min in HPLC. Areas under the peaks of the starting materials were normalized according to the area of the peak of the internal standard. Second order rate constant for the first addition was determined by plotting the $1/[\text{ADPN}]$ versus time and analyzing by linear regression. The constant corresponds to the absolute value of determined slope: 566.71 $\text{L}\cdot\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$.

Second addition: To an HPLC vial containing 985 μL of a 1/1 ACN/PBS (1x, pH 7.3) mixture, were subsequently added 0.5 μL of the stock solution of benzamide (100 mM in water), 0.5 μL of the stock solution of ADPN-GSH adduct (10 mM in DMSO) and 0.5

μL of stock solution of GSH (10 mM in PBS) to give final concentration of 0.5 μM for each reagent and 50 μM for internal standard). The autosampler injected the mixture every 7 min in HPLC. Areas under the peaks of the starting materials were normalized according to the area of the peak of the internal standard. Second order rate constant for the second addition was determined by plotting the $1/[\text{ADPN}]$ versus time and analyzing by linear regression. The constant corresponds to the value of determined slope: 6.9505 $\text{L}\cdot\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$.

Validation of kinetic resolutions

To 980 μL of 1/1 ACN/PBS 1X was added 10 μL of a stock solution of ADPN (10 mM in DMSO) and 10 μL of a stock solution of a first thiol (glutathione or cysteine, 10 mM in water). The mixture reacted for 1 hour and was analyzed by LC. Then, 10 μL of a stock solution of a second thiol (thiophenol, benzylthiol or phenylethanethiol, 10 mM in acetonitrile). The experiment is monitored by LC.

The ratio of mono/di-addition are recorded in the following table

	Ratio of mono/double addition	Ratio of hetero/homo addition after addition of thiophenol	Ratio of hetero/homo addition after addition of benzylthiol	Ratio of hetero/homo addition after addition of phenylethanethiol
Cysteine	94/6	94 / 6	95 / 5	93 / 7
Glutathione	94/6	90 / 10	84 / 16	92 / 8

Stability of ADPN-bis-adduct in plasma

ADPN (1 eq., 7.65 μmol) was dissolved in 0.5 mL of DMSO and 0.5 mL of PBS 1X cysteine (2.2 eq., 16.8 μmol) was added. After completion of the reaction, the product was purified by semi-preparative HPLC. A 100 μM stock solution in DMSO was made. To 180 μL of plasma were added 20 μL of the solution of ADPN-bis-adduct. Each hour, 20 μL of plasma was taken and 180 μL of acetonitrile was added and the suspension was centrifuged at 5.000 G for 5 min. 30 μL of the supernatant were injected in LC.

Addition of model peptide on ADPN, then cysteine

To 1 equivalent of model peptide (10 μL , 0.5 mM, black line) was added the solution of TCEP (5 eq., 5 μL , 5 mM, containing the same amount of EDTA). The mixture was stirred for 2 hours, then N_3 -benzoic acid were added (20 eq., 4 μL , 25 mM) and stirred for 2 hours. 40 μL of PBS 1X and 40 μL of ACN were added, then 1 equivalent of ADPN (1 eq., 0.5 μL , 10 mM), stirred for 2 hours and injected in LC. Then, 1 μL (1 eq.) of cysteine was added, stirred overnight and injected in LC.

Addition of cysteine on ADPN, then model peptide

To 1 μ L of ADPN (1 eq., 0.5 μ L, 10 mM) were added 40 μ L of PBS 1X and 40 μ L of ACN, then 1 μ L (1 eq.) of cysteine was added and stirred for 2 hours and injected in LC (black line). To 1 equivalent of model peptide (10 μ L, 0.5 mM) was added the solution of TCEP (5 eq., 5 μ L, 5mM, containing the same amount of EDTA). The mixture was stirred for 2 hours, then N₃-benzoic acid were added (20 eq., 4 μ L, 25 mM) and stirred for 2 hours. Then, the two solutions were mixed and stirred overnight and injected in LC.

Addition of oligonucleotide on ADPN, then glutathion

0.5 μ L of the ADPN stock solution was added to 47 μ L PBS 1X and 47 μ L of ACN. 5 μ L (1 eq.) of the modified oligonucleotide stock solution was slowly added. The mixture was stirred overnight at 25 °C and injected in LC. 0.1 μ L of glutathione was solubilized in 20 μ L of a 1/1 PBS 1X/ACN mixture. Then, 20 μ L of the oligonucleotide-ADPN solution was added. The mixture was stirred overnight at 25 °C and injected in LC.

Addition of oligonucleotide on ADPN, then model peptide

0.5 μ L of the ADPN stock solution was added to 47 μ L PBS 1X and 47 μ L of ACN. 5 μ L (1 eq.) of the modified oligonucleotide stock solution was slowly added. The mixture was stirred overnight at 25 °C and injected in LC. 2 μ L of reduced model peptide was solubilized in 20 μ L of a 1/1 PBS 1X/ACN mixture. Then, 20 μ L of the oligonucleotide-ADPN solution previously described was added. The mixture was stirred overnight at 25 °C and injected in LC.

Références

- (1) Klupczyńska, A.; Dereziński, P.; Kokot, Z. J. *Acta Pol. Pharm.* **72** (4), 629.
- (2) Scalbert, A.; Brennan, L.; Fiehn, O.; Hankemeier, T.; Kristal, B. S.; van Ommen, B.; Pujos-Guillot, E.; Verheij, E.; Wishart, D.; Wopereis, S. *Metabolomics* **2009**, *5* (4), 435.
- (3) Dona, A. C.; Kyriakides, M.; Scott, F.; Shephard, E. A.; Varshavi, D.; Veselkov, K.; Everett, J. R. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2016**, *14*, 135.
- (4) Alonso, A.; Marsal, S.; Julià, A. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2015**, *3*, 23.
- (5) Wen, X.; Li, W.; Liu, B. J. *Postgenomics Drug Biomark. Dev.* **2012**, *2* (4).
- (6) Odunsi, K.; Wollman, R. M.; Ambrosone, C. B.; Hutson, A.; McCann, S. E.; Tammela, J.; Geisler, J. P.; Miller, G.; Sellers, T.; Cliby, W.; Qian, F.; Keitz, B.; Intengan, M.; Lele, S.; Alderfer, J. L. *Int. J. Cancer* **2005**, *113* (5), 782.
- (7) Xiaohui Fan, X.; Jingqing Bai, J.; Peng Shen, P. *IEEE Eng. Med. Biol. 27th Annu. Conf.* **2005**, *6*, 6081.
- (8) Yu, X.; Song, Y.; Di, Y.; He, H.; Fu, D.; Jin, C. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 31539.
- (9) Morvan, D.; Demidem, A. *Cancer Res.* **2007**, *67* (5), 2150.
- (10) Bathen, T. F.; Jensen, L. R.; Sitter, B.; Fjøsne, H. E.; Halgunset, J.; Axelson, D. E.; Gribbestad, I. S.; Lundgren, S. *Breast Cancer Res. Treat.* **2007**, *104* (2), 181.
- (11) Gribbestad, I. S.; Sitter, B.; Lundgren, S.; Krane, J.; Axelson, D. *Anticancer Res.* **19** (3A), 1737.
- (12) Sitter, B.; Lundgren, S.; Bathen, T. F.; Halgunset, J.; Fjosne, H. E.; Gribbestad, I. S. *NMR Biomed.* **2006**, *19* (1), 30.
- (13) Glunde, K.; Jie, C.; Bhujwala, Z. M. *Cancer Res.* **2004**, *64* (12).
- (14) Bartella, L.; Huang, W. *RadioGraphics* **2007**, *27* (suppl_1), S241.
- (15) Katz-Brull, R.; Lavin, P. T.; Lenkinski, R. E. *CancerSpectrum Knowl. Environ.* **2002**, *94* (16), 1197.
- (16) Rozen, S.; Cudkowicz, M. E.; Bogdanov, M.; Matson, W. R.; Kristal, B. S.; Beecher, C.; Harrison, S.; Vouros, P.; Flarakos, J.; Vigneau-Callahan, K.; Matson, T. D.; Newhall, K. M.; Beal, M. F.; Brown, R. H.; Kaddurah-Daouk, R. *Metabolomics* **2005**, *1* (2), 101.
- (17) Del Boccio, P.; Rossi, C.; di Ioia, M.; Cicalini, I.; Sacchetta, P.; Pieragostino, D. *PROTEOMICS - Clin. Appl.* **2016**, *10* (4), 470.
- (18) Reinke, S.; Broadhurst, D.; Sykes, B.; Baker, G.; Catz, I.; Warren, K.; Power, C. *Mult. Scler. J.* **2014**, *20* (10), 1396.
- (19) Mathur, D.; López-Rodas, G.; Casanova, B.; Marti, M. B. *Front. Neurol.* **2014**, *5*, 250.

- (20) Paige, L. A.; Mitchell, M. W.; Krishnan, K. R. R.; Kaddurah-Daouk, R.; Steffens, D. C. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **2007**, *22* (5), 418.
- (21) *Vitamins and Hormones*; Gerald Litwack, C., Ed.; Elsevier, 2007; Vol. 75.
- (22) Alvarez, R.; Vaz, B.; Gronemeyer, H.; de Lera, ?ngel R. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (1), 1.
- (23) Tang, G. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *91* (5), 1468S.
- (24) Blomhoff, R.; Blomhoff, H. K. *J. Neurobiol.* **2006**, *66* (7), 606.
- (25) Chambon, P. *FASEB J.* **1996**, *10* (9), 940.
- (26) Huang, P.; Chandra, V.; Rastinejad, F. *Annu. Rev. Physiol.* **2010**, *72* (1), 247.
- (27) Ahmad, J. I. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2000**, *35* (3), 359.
- (28) Niederreither, K.; Subbarayan, V.; Dollé, P.; Chambon, P. *Nat. Genet.* **1999**, *21* (4), 444.
- (29) Wilson, J. G.; Roth, C. B.; Warkany, J. *Am. J. Anat.* **1953**, *92* (2), 189.
- (30) Kamm, J. J. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1982**, *6*, 652.
- (31) Kam, R. K. T.; Deng, Y.; Chen, Y.; Zhao, H. *Cell Biosci.* **2012**, *2* (1), 11.
- (32) Rhinn, M.; Schuhbaur, B.; Niederreither, K.; Dollé, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (40), 16687.
- (33) De Braekeleer, E.; Douet-Guilbert, N.; De Braekeleer, M. *Expert Rev. Hematol.* **2014**, *7* (3), 347.
- (34) Lallemand-Breitenbach, V.; Zhu, J.; Chen, Z.; de Thé, H. *Trends Mol. Med.* **2012**, *18* (1), 36.
- (35) Srour, M.; Caron, V.; Pearson, T.; Nielsen, S. B.; Lévesque, S.; Delrue, M.-A.; Becker, T. A.; Hamdan, F. F.; Kibar, Z.; Sattler, S. G.; Schneider, M. C.; Bitoun, P.; Chassaing, N.; Rosenfeld, J. A.; Xia, F.; Desai, S.; Roeder, E.; Kimonis, V.; Schneider, A.; Littlejohn, R. O.; Douzgou, S.; Tremblay, A.; Michaud, J. L. *Hum. Mutat.* **2016**, *37* (8), 786.
- (36) Rinaldi, P.; Polidori, M. C.; Metastasio, A.; Mariani, E.; Mattioli, P.; Cherubini, A.; Catani, M.; Cecchetti, R.; Senin, U.; Mecocci, P. *Neurobiol. Aging* **2003**, *24* (7), 915.
- (37) Jarvis, C. I.; Goncalves, M. B.; Clarke, E.; Dogruel, M.; Kalindjian, S. B.; Thomas, S. A.; Maden, M.; Corcoran, J. P. T. *Eur. J. Neurosci.* **2010**, *32* (8), 1246.
- (38) Ono, K.; Yamada, M. *Geriatr. Gerontol. Int.* **2012**, *12* (2), 180.
- (39) Goncalves, M. B.; Clarke, E.; Hobbs, C.; Malmqvist, T.; Deacon, R.; Jack, J.; Corcoran, J. P. T. *Eur. J. Neurosci.* **2013**, *37* (7), 1182.
- (40) Huang, J. K.; Jarjour, A. A.; Oumesmar, B. N.; Kerninon, C.; Williams, A.; Krezel, W.; Kagechika, H.; Bauer, J.; Zhao, C.; Evercooren, A. B.-V.; Chambon, P.; ffrench-Constant, C.; Franklin, R. J. M. *Nat. Neurosci.* **2011**, *14* (1), 45.
- (41) Corcoran, J.; So, P. L.; Maden, M. *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 4735.

- (42) Bitarafan, S.; Saboor-Yaraghi, A.; Sahraian, M.-A.; Nafissi, S.; Togha, M.; Beladi Moghadam, N.; Roostaei, T.; Siassi, F.; Eshraghian, M.-R.; Ghanaati, H.; Jafarirad, S.; Rafiei, B.; Harirchian, M.-H. *Arch. Iran. Med.* **2015**, *18* (7), 435.
- (43) Luthi-Carter, R.; Strand, A.; Peters, N. L.; Solano, S. M.; Hollingsworth, Z. R.; Menon, A. S.; Frey, A. S.; Spektor, B. S.; Penney, E. B.; Schilling, G.; Ross, C. A.; Borchelt, D. R.; Tapscott, S. J.; Young, A. B.; Cha, J. H.; Olson, J. M. *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9* (9), 1259.
- (44) Niewiadomska-Cimicka, A.; Krzyżosiak, A.; Ye, T.; Podleśny-Drabiniok, A.; Dembélé, D.; Dollé, P.; Krężel, W. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *54* (5), 3859.
- (45) Chee, L. C. Y.; Hendy, J.; Purton, L. E.; McArthur, G. A. *Leukemia* **2013**, *27* (6), 1369.
- (46) Altucci, L.; Leibowitz, M. D.; Ogilvie, K. M.; de Lera, A. R.; Gronemeyer, H. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6* (10), 793.
- (47) Rhinn, M.; Schuhbauer, B.; Niederreither, K.; Dollé, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (40), 16687.
- (48) Rühl, R.; Krzyżosiak, A.; Niewiadomska-Cimicka, A.; Rochel, N.; Szeles, L.; Vaz, B.; Wietzych-Schindler, M.; Álvarez, S.; Szklenar, M.; Nagy, L.; de Lera, A. R.; Krężel, W. *PLOS Genet.* **2015**, *11* (6), e1005213.
- (49) Osz, J.; Brelivet, Y.; Peluso-Iltis, C.; Cura, V.; Eiler, S.; Ruff, M.; Bourguet, W.; Rochel, N.; Moras, D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (10), E588.
- (50) Renaud, J.-P.; Rochel, N.; Ruff, M.; Vivat, V.; Chambon, P.; Gronemeyer, H.; Moras, D. *Nature* **1995**, *378* (6558), 681.
- (51) Aurell, M. J.; Ceita, L.; Mestres, R.; Parra, M.; Tortajada, A. *Tetrahedron* **1995**, *51* (13), 3915.
- (52) Chabardes, P.; Decor, J. P.; Varagnat, J. *Tetrahedron* **1977**, *33* (21), 2799.
- (53) Julia, M.; Arnould, D. *Bull. Chem. Soc. Fr.* **1973**, *110*, 746.
- (54) Pommer, H. *Angew. Chemie* **1960**, *72* (22), 811.
- (55) Ye, H.; Deng, G.; Liu, J.; Qiu, F. G. *Org. Lett.* **2009**, *11* (23), 5442.
- (56) Lakomy, I.; Sarbach, D.; Traber, B.; Arm, C.; Zuber, D.; Pfander, H.; Noack, K. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80* (2), 472.
- (57) *Synth. Commun.* **1992**, *22* (13), 1967.
- (58) Kunishima, M.; Hioki, K.; Nakata, D.; Nogawa, S.; Tani, S. *Chem. Lett.* **1999**, *28* (7), 683.
- (59) Sinisterra, J. V.; Barrios, J.; Mouloungui, Z.; Delmas, M.; Gaset, A. *Bull. des Sociétés Chim. Belges* **2010**, *100* (3), 267.
- (60) Singh, A. K. *Synth. Commun.* **1983**, *13* (11), 919.
- (61) Hashimoto, M.; Fujimoto, Y. *Synth. Commun.* **1999**, *29* (21), 3793.
- (62) Waldmann, D.; König, T.; Schreier, P. *Zeitschrift für Naturforsch. B* **1995**, *50* (4).
- (63) Mic, F. A.; Molotkov, A.; Fan, X.; Cuenca, A. E.; Duester, G. *Mech. Dev.* **2000**, *97* (1), 227.

- (64) Haeseleer, F.; Huang, J.; Lebioda, L.; Saari, J. C.; Palczewski, K. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (34), 21790.
- (65) Thorin-Trescases, N.; Voghel, G.; Farhat, N.; Drouin, A.; Gendron, M.-È.; Thorin, E. *Med. Sci. (Paris)*. **2010**, *26* (10), 875.
- (66) HARMAN, D. *J. Gerontol.* **1956**, *11* (3), 298.
- (67) EL-BELTAGI, H. S.; MOHAMED, H. I. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* **2013**, *41* (1), 44.
- (68) Mylonas, C.; Kouretas, D. *In Vivo (Brooklyn)*. **1999**, *13* (3), 295.
- (69) Hill, B. G.; Bhatnagar, A. *Circ. Res.* **2009**, *105* (11), 1044.
- (70) Esterbauer, H.; Schaur, R. J.; Zollner, H. *Free Radic. Biol. Med.* **1991**, *11* (1), 81.
- (71) Markesbery, W. R. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *23* (1), 134.
- (72) Siegel, S. J.; Bieschke, J.; Powers, E. T.; Kelly, J. W. *Biochemistry* **2007**, *46* (6), 1503.
- (73) Skoumalová, A.; Hort, J. *J. Cell. Mol. Med.* **2012**, *16* (10), 2291.
- (74) Ayala, A.; Muñoz, M. F.; Argüelles, S. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*, 360438.
- (75) Hogard, M. L.; Lunte, C. E.; Lunte, S. M. *Anal. Methods* **2017**, *9* (12), 1848.
- (76) Burke, W. J.; Kumar, V. B.; Pandey, N.; Panneton, W. M.; Gan, Q.; Franko, M. W.; O'Dell, M.; Li, S. W.; Pan, Y.; Chung, H. D.; Galvin, J. E. *Acta Neuropathol.* **2008**, *115* (2), 193.
- (77) Goldstein, D. S. *Adv Phamarcol.* **2013**, *68*, 235.
- (78) Panneton, W. M.; Kumar, V. B.; Gan, Q.; Burke, W. J.; Galvin, J. E. *PLoS One* **2010**, *5* (12), e15251.
- (79) Wey, M. C.-Y.; Fernandez, E.; Martinez, P. A.; Sullivan, P.; Goldstein, D. S.; Strong, R. *PLoS One* **2012**, *7* (2), e31522.
- (80) Bettler, B.; Kaupmann, K.; Mosbacher, J.; Gassmann, M. *Physiol. Rev.* **2004**, *84* (3), 835.
- (81) Kalueff, A. V.; Nutt, D. J. *Depress. Anxiety* **2007**, *24* (7), 495.
- (82) Benes, F.; Berretta, S. *Neuropsychopharmacology* **2001**, *25* (1), 1.
- (83) Roberts, K. D.; Lambert, J. N.; Ede, N. J.; Bray, A. M. *J. Pept. Sci.* **2004**, *10* (11), 659.
- (84) Munneke, S.; Dangerfield, E. M.; Stocker, B. L.; Timmer, M. S. M. *Glycoconj. J.* **2017**, 1.
- (85) Houdier, S.; Legrand, M.; Boturyn, D.; Croze, S.; Defrancq, E.; Lhomme, J. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *382* (3), 253.
- (86) Houdier, S.; Perrier, S.; Defrancq, E.; Legrand, M. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *412* (1–2), 221.
- (87) Tang, L.; Yin, Q.; Xu, Y.; Zhou, Q.; Cai, K.; Yen, J.; Dobrucki, L. W.; Cheng, J. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (4), 2182.
- (88) Waghorn, P. A.; Jones, C. M.; Ratile, N. J.; Koerner, S. K.; Ferreira, D. S.; Chen, H. H.; Probst, C. K.; Tager, A. M.; Caravan, P. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2017**, *56* (33), 9825.
- (89) Kalia, J.; Raines, R. T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47* (39), 7523.

- (90) Rajabi, F.; Saidi, M. R. *Synth. Commun.* **2005**, 35 (3), 483.
- (91) Christophersen, C.; Struve, C. *Heterocycles* **2003**, 60 (8), 1907.
- (92) Turner, P. V; Brabb, T.; Pekow, C.; Vasbinder, M. A. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **2011**, 50 (5), 600.
- (93) *The laboratory rat*, Suckow, M. A., Weisbroth, S. H., Franklin, C. L., Eds.; Elsevier, 2006.
- (94) Oldendorf, W. H. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1974**, 147 (3), 813.
- (95) Banks, W. A. *BMC Neurol.* **2009**, 9.
- (96) Christiaansen, J. E.; Gallardo, D.; Burnside, S. S.; Nelson, A. A.; Sears, D. W. *J. Immunol. Methods* **1984**, 74 (2), 229.
- (97) Ballantyne, A.; Dhillon, S. *Drugs* **2013**, 73 (7), 755.
- (98) Conjugation, M. A.; Modification, C. *BioPharm Int.* **2015**, 16 (Equation 1), 1.
- (99) Lewis Phillips, G. D.; Li, G.; Dugger, D. L.; Crocker, L. M.; Parsons, K. L.; Mai, E.; Blättler, W. A.; Lambert, J. M.; Chari, R. V. J.; Lutz, R. J.; Wong, W. L. T.; Jacobson, F. S.; Koeppen, H.; Schwall, R. H.; Kenkare-Mitra, S. R.; Spencer, S. D.; Sliwkowski, M. X. *Cancer Res.* **2008**, 68 (22), 9280.
- (100) Kolodych, S.; Koniev, O.; Baatarkhuu, Z.; Bonnefoy, J.-Y.; Debaene, F.; Cianfèrani, S.; Van Dorsselaer, A.; Wagner, A. *Bioconjug. Chem.* **2015**, 26 (2), 197.
- (101) Talvitie, E.; Leppiniemi, J.; Mikhailov, A.; Hytönen, V. P.; Kellomäki, M. *Carbohydr. Polym.* **2012**, 89 (3), 948.
- (102) Yeh, C.-Y.; Hsiao, J.-K.; Wang, Y.-P.; Lan, C.-H.; Wu, H.-C. *Biomaterials* **2016**, 99, 1.
- (103) Temming, K.; Meyer, D. L.; Zabinski, R.; Senter, P. D.; Poelstra, K.; Molema, G.; Kok, R. *J. Mol. Pharm.* **2007**, 4 (5), 686.
- (104) Ba, O. M.; Hindie, M.; Marmey, P.; Gallet, O.; Anselme, K.; Ponche, A.; Duncan, A. C. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2015**, 134, 73.
- (105) Aslam, M.; Dent, A. *Bioconjugation : protein coupling techniques for the biomedical sciences*; Macmillan Reference, 1998.
- (106) Veronese, F. M.; Pasut, G. *Drug Discov. Today* **2005**, 10 (21), 1451.
- (107) Fodje, M. N.; Al-Karadaghi, S. *Protein Eng.* **2002**, 15 (5), 353.
- (108) Chou, W. Y.; Matthews, K. S. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264 (31), 18314.
- (109) Lee, E. M.; Lee, S. S.; Tripathi, B. N.; Jung, H. S.; Cao, G. P.; Lee, Y.; Singh, S.; Hong, S. H.; Lee, K. W.; Lee, S. Y.; Cho, J.-Y.; Chung, B. Y. *Ann. Bot.* **2015**, 116 (4), 713.
- (110) Koniev, O.; Kolodych, S.; Baatarkhuu, Z.; Stojko, J.; Eberova, J.; Bonnefoy, J.-Y.; Cianfèrani, S.; Van Dorsselaer, A.; Wagner, A. *Bioconjug. Chem.* **2015**, 26 (9), 1863.

- (111) Shen, B.-Q.; Xu, K.; Liu, L.; Raab, H.; Bhakta, S.; Kenrick, M.; Parsons-Reponde, K. L.; Tien, J.; Yu, S.-F.; Mai, E.; Li, D.; Tibbitts, J.; Baudys, J.; Saad, O. M.; Scales, S. J.; McDonald, P. J.; Hass, P. E.; Eigenbrot, C.; Nguyen, T.; Solis, W. A.; Fuji, R. N.; Flagella, K. M.; Patel, D.; Spencer, S. D.; Khawli, L. A.; Ebens, A.; Wong, W. L.; Vandlen, R.; Kaur, S.; Sliwkowski, M. X.; Scheller, R. H.; Polakis, P.; Junutula, J. R. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30* (2), 184.
- (112) Koniev, O.; Leriche, G.; Nothisen, M.; Remy, J.-S.; Strub, J.-M.; Schaeffer-Reiss, C.; Van Dorsselaer, A.; Baati, R.; Wagner, A. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (2), 202.
- (113) Okamoto, K.; Watanabe, M.; Sakata, N.; Murai, M.; Ohe, K. *Org. Lett.* **2013**, *15* (22), 5810.
- (114) Du, B.; Jiang, X.; Sun, P. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (6), 2786.
- (115) Landor, S. R.; Landor, P. D.; Fomum, Z. T.; Mpango, G. W. B. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1979**, 2289.
- (116) Li, M.; Li, Y.; Zhao, B.; Liang, F.; Jin, L.-Y. *RSC Adv.* **2014**, *4* (57), 30046.
- (117) Chinta, B. S.; Baire, B. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (20), 10208.
- (118) Rong, G.; Mao, J.; Zheng, Y.; Yao, R.; Xu, X. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (72), 13822.
- (119) Henkel, M.; Röckendorf, N.; Frey, A. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (10), 2260.
- (120) Alberti, M. N.; Orfanopoulos, M. *Org. Lett.* **2009**, *11* (7), 1659.
- (121) Newcomer, M. E.; Pappas, R. S.; Ong, D. E. *Bioanalysis* **1993**, *90* (19), 9223.

Stratégies de marquage chimiospécifique et bioorthogonale pour l'analyse métabolomique des rétinoïdes

Résumé

Ce travail est composé de trois projets. Le premier projet a pour objectif de découvrir de nouveaux métabolites de la vitamine A. Il a consisté en la synthèse d'un analogue du rétinaldéhyde, portant une fonction azoture et permettant de suivre son devenir *in vivo*. Le second projet a consisté en l'élaboration de la sonde ATPP permettant l'analyse de l'ensemble des métabolites aldéhydiques d'un échantillon. La sonde permet un gain de sensibilité en LS-MS². Une analyse de sa biodistribution a été faite, et montre que la sonde ATPP, après injection intrapéritonéale, est distribuée *in vivo*. Concernant le troisième projet, un réactif de couplage homobifonctionnel « thiol-thiol » a été élaboré. Les produits du couplage ont montré une excellente stabilité plasmatique. Le réactif a d'abord été appliqué avec succès au couplage de petites molécules, puis au couplage d'un oligonucléotide modifié et d'un peptide.

Mots-clés : métabolomique – rétinoïdes – chimie bioorthogonale –

Summary

This work consists of three projects. The first project aims to discover new metabolites of vitamin A. An analog of retinaldehyde, carrying an azide function was synthesized. It would allow to follow its fate *in vivo*. The second project consisted in the development of a probe allowing the analysis of all the aldehyde metabolites in a sample. The probe provides sensitivity gain in LS-MS². An analysis of its biodistribution has been done, and showed the ATPP probe is distributed after an intraperitoneal injection. Concerning the third project, a homobifunctional coupling reagent "thiol-to-thiol" has been developed. The coupling products showed excellent plasma stability. The reagent was first successfully applied to the coupling of small molecules and then to the coupling of a modified oligonucleotide and a peptide.

Keywords: metabolomic – retinoids – bioorthogonal chemistry –