



**HAL**  
open science

# Molécules photoactivables pour le contrôle spatio-temporel du cytosquelette d'actine : synthèse et applications biologiques

Benjamin Joyeux

► **To cite this version:**

Benjamin Joyeux. Molécules photoactivables pour le contrôle spatio-temporel du cytosquelette d'actine : synthèse et applications biologiques. Chimie organique. Institut Polytechnique de Paris, 2022. Français. NNT : 2022IPPAX117 . tel-04304245

**HAL Id: tel-04304245**

**<https://hal.science/tel-04304245v1>**

Submitted on 2 Dec 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Molécules photoactivables pour le contrôle spatio-temporel du cytosquelette d'actine : synthèse et applications biologiques

Thèse de doctorat de l'Institut Polytechnique de Paris  
préparée à l'École Polytechnique

École doctorale n°626 de l'Institut Polytechnique de Paris  
Spécialité de doctorat : Chimie

Thèse présentée et soutenue à Palaiseau, le 28 Novembre 2022, par

**Benjamin Joyeux**

Composition du Jury :

Prof. Cyrille Kouklovsky Professeur, Université Paris-Saclay (–UMR 8182, ICMMO)	Président
Dr. Florence Mahuteau-Betzer Directrice de Recherche, Institut Curie (– UMR 9187, CMBC)	Rapporteuse
Prof. Philippe Belmont Professeur, Université de Paris-Cité (– UMR 8038, CITCOM)	Rapporteur
Prof. Joanne Xie Professeur, ENS Paris-Saclay (–UMR 8531, PPSM)	Examinatrice
Dr. Christophe Le Clainche Directeur de Recherche, Université Paris-Saclay (– UMR 9198, I2BC)	Examineur
Dr. Bastien Nay Directeur de Recherche, Ecole Polytechnique (– UMR 7652, LSO)	Directeur de thèse



## Remerciements :

Je vais commencer par remercier Bastien Nay, mon directeur de thèse, tout d'abord pour la confiance sans faille qu'il m'a accordée. Pendant nos entretiens, j'insistais sur vouloir travailler à la fois sur un projet de synthèse totale et sur la partie biologie associée, bien que je fusse inexpérimenté pour la seconde. Malgré cela, Bastien m'a tout de même accordé ce projet, pariant sur ma capacité à m'adapter, et m'a d'ailleurs toujours encouragé dans ma volonté à faire moi-même ces expériences de biologie. Bastien a également toujours laissé place à mes initiatives, me laissant faire évoluer le projet. Je pense notamment à la fin du confinement, avec l'addition du CK666 aux cibles d'intérêt, composé avec lequel j'ai pu rapidement me tourner vers les tests biologiques. Je tiens également à le remercier pour son encadrement. Je me connais difficile, d'accès et de caractère, mais il a su à la fois me guider, tout en me laissant l'indépendance dont j'ai besoin. Bastien a toujours cherché à me faire prendre du recul sur le projet mais aussi sur le métier de chercheur, et bien que nous ayons eu des différents, je ne peux que le remercier pour m'avoir partagé sa vision. Finalement, je ne comprends pas pourquoi on ne félicite que l'étudiant à la fin d'une thèse alors qu'il s'agit toujours d'un travail d'équipe. Je le ferai ici. Félicitation Bastien pour le lancement de ce projet ainsi que pour l'ANR qui en garantit la poursuite et je te souhaite, même si je n'en doute pas un instant, de le porter loin.

Je tiens ensuite à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail. J'ai eu la chance d'avoir en face de moi lors de la soutenance des experts dans chaque domaine de ce projet, ce qui a rendu la discussion particulièrement enrichissante.

Un grand merci également à Christophe Le Clainche pour son accueil au sein de l'I2BC et pour ses conseils. C'est grâce à son expérience précieuse que l'on a pu arriver très rapidement à des moyens de caractériser les activités biologiques de nos composés, pourtant inhabituels. Merci aussi à son équipe, notamment à Julien, à Rayan et à Aurélie, pour avoir pris le temps de me former et de m'encadrer. Ça a été un grand plaisir de pouvoir réaliser moi-même ces expériences de biologie *in vitro*, qui m'ont permis de voir mes composés en action.

Je remercie également Alexis Gautreau du BIOC pour cette collaboration et Stéphane Romero pour tout le temps qu'il a dédié à ce projet, bien que je sache qu'il avait bien d'autres choses à faire. Je suis conscient de toute la mise en place qui a été nécessaire pour adapter les expériences cellulaires à nos nouveaux composés.



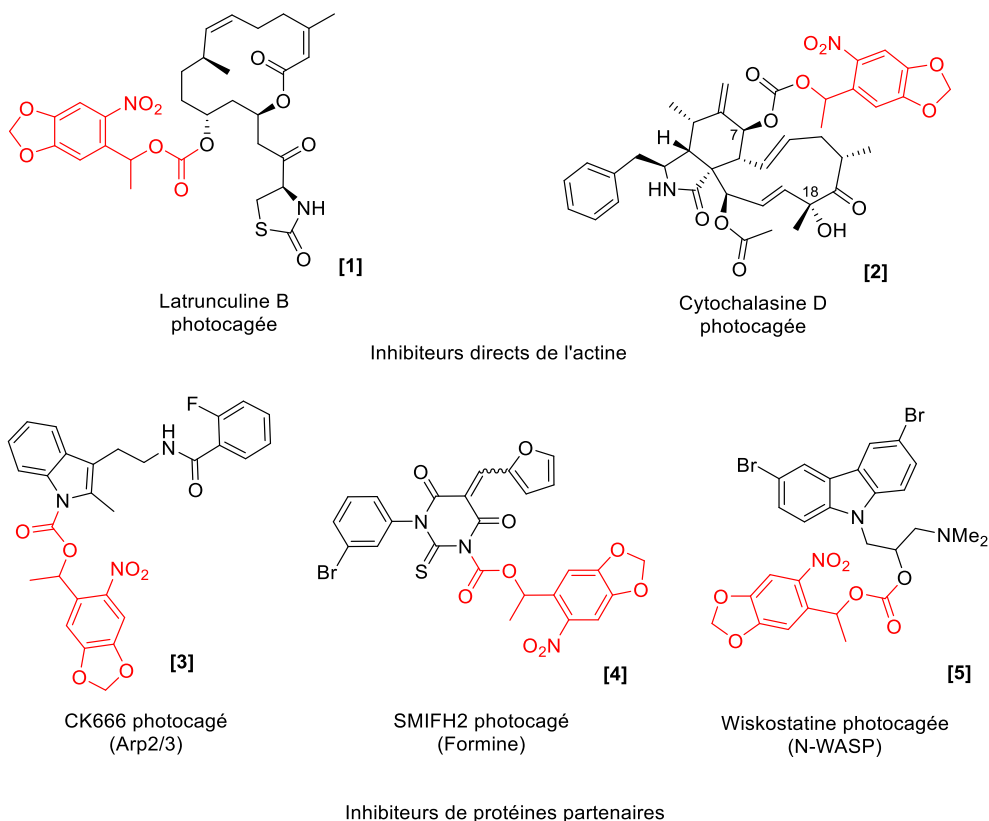
Je remercie ensuite mes camarades du laboratoire. Merci tout d'abord à Manue, ma première camarade de labo pendant cette thèse. C'est grâce à son enthousiasme et son humour loufoque que j'ai pu garder le moral pendant ces premiers mois compliqués en labo 3. Merci ensuite à Jean et à Valentin, mes voisins de bureau, pour leur bonne humeur bienvenue lors des pauses au bureau et pour avoir supporté mes taps taps de pieds incessants. Un grand merci à Quentin, mon mentor en quelque sorte, pour avoir montré l'exemple sur tous les plans. Ça a été un plaisir de râler à tes côtés pendant ces trois ans ! Thank you Anda for the wonderful atmosphere you created in the lab. Your cheerful singing brightened everyone's day! (it still echoes in the corridor) Thanks to you Bruce, it was awesome having you around. I won't hide it, I really enjoyed letting myself get distracted and discussing about your rather unusual projets. Merci aussi à Anaïs et à Antoine R., du bureau des plaintes du labo 3. Blagues à part, c'est vous qui imposiez le rythme au labo, les premiers arrivés, les pauses sur la passerelle, le départ Magnan et les derniers à partir. Merci aussi à la suite et succession de la team Nay. Merci Agathe et Simon, on ne vous voyait pas tous les jours mais ça brisait la routine et faisait d'autant plus de choses à se raconter à chaque fois. Thanks Guanghui, it was interesting chatting on the project and seeing you progress over the years. Merci aussi à toi Antoine G., pour ton sérieux et ton enthousiasme sans faille. Ça a été un plaisir de t'encadrer et je laisse le projet entre tes bonnes mains. Je suis curieux de voir vers quoi tu vas le porter. Je remercie aussi mes autres stagiaires et étudiants, notamment Laurence pour sa contribution majeure et pour avoir démarré ce nouveau projet sur les photocommutateurs. C'est beaucoup de plaisir et toujours très enrichissant d'encadrer et d'enseigner. Je remercie aussi tous les autres membres du laboratoire, pour avoir contribué à cette bonne ambiance générale et pour les discussions, scientifiques ou pas, pendant lesquelles j'ai tant appris. Merci à vous tous Alexis P., Antoine E, Hui, Chongze, Xuan, Yvan, Alexine, Daeun, Xiang, Shanshan, Vincent, Julien et Pascal. Merci également à Laurence Grimaux et à Samir Zard pour vos cours passionnants lors de ma scolarité à l'École Polytechnique à travers lesquelles s'est formée ma vocation pour la chimie.

Un grand merci aussi à Odile, pour sa patience et son précieux soutien au quotidien. Et finalement, merci à ma famille pour leur soutien également et pour avoir été là pendant la soutenance. Votre confiance absolue en ma réussite m'a poussé pendant ces trois années.

## Résumé :

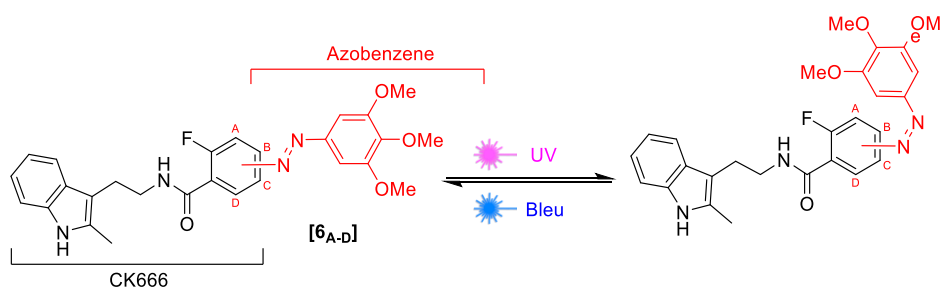
L'actine est un constituant essentiel du cytosquelette et forme des réseaux de filaments dynamiques avec des structures très hétérogènes dans les cellules. Cette architecture particulière est responsable d'un grand nombre de leurs propriétés mécaniques. Pour une étude précise de ce type de système biologique, le développement d'outils pouvant agir localement et sur demande apparaît comme nécessaire. La maîtrise de la manipulation de la lumière, représentée par les superbes résolutions d'imagerie microscopique désormais accessibles, montre le potentiel de l'utilisation de la lumière comme vecteur de précision. Les molécules bioactives photoactivables font le pont entre la lumière et le contrôle de l'activité biologique et apparaissent donc comme des outils de choix. Ce projet de thèse s'articule autour de la synthèse et la caractérisation d'inhibiteurs photocontrôlables comme outils moléculaires pour l'étude des réseaux d'actine.

Ce projet s'est concentré d'une part sur la préparation d'inhibiteurs photocagés touchant l'actine ou certaines de ses protéines partenaires, l'objectif étant de mettre au point une bibliothèque d'outils capables d'éteindre localement et à un instant voulu l'activité des protéines en question. Une majeure partie du travail a été consacrée à la synthèse totale d'une forme photocagée de la latrunculine B **[1]** (Figure 1), un produit naturel et puissant inhibiteur de la polymérisation de l'actine. Cette nouvelle synthèse totale poursuit les travaux précédents de développement d'une synthèse efficace du produit naturel et permet d'étendre ses applications au photocontrôle. En parallèle, des formes photocagées des produits de synthèse plus simples touchant des partenaires de l'actine ont été visées. Concrètement, le CK666 **[14]**, le SMIFH2 **[18]** et la wiskostatine **[16]** ont été préparés et des formes photocagées ont pu être envisagées (Figure 1). Ces molécules touchent directement ou indirectement des promoteurs de la polymérisation de l'actine. L'objectif a été de proposer des synthèses courtes de ces différentes molécules couramment utilisées puis d'y greffer un groupement photolabile. Enfin, l'hémisynthèse d'une forme photocagée de la cytochalasine D **[2]**, un autre produit naturel et inhibiteur de la polymérisation de l'actine, a été réalisée (Figure 1). Cette molécule est d'un intérêt particulier car inhibe la polymérisation à travers un mécanisme orthogonal à la latrunculine B, les rendant complémentaires.



**Figure 1 :** Versions photocagées d'inhibiteurs de l'actine ou de ses protéines partenaires

D'autre part, ce projet a été étendu sur la préparation de variants photocommuteurs du CK666 [14]. Ce composé est un inhibiteur synthétique du complexe protéique Arp2/3, le promoteur des réseaux branchés de l'actine. Des azobenzènes ont été greffés sur différentes positions du noyau phényle du CK666 pour finalement obtenir quatre variants en vue d'un candidat adéquat pour le photocontrôle réversible d'Arp2/3 (Figure 2).



**Figure 2 :** Design des photocommuteurs basés sur le CK666

La réponse à la lumière ainsi que les propriétés biologiques des différents composés obtenus ont été étudiées. Des tests d'activité biologique *in vitro* sur les protéines isolées ainsi que des tests *in vivo* sur cellules ont pu être réalisés dans deux laboratoires partenaires, respectivement à l'I2BC de l'Université Paris-Saclay à Gif-sur-Yvette et le BIOC de l'École Polytechnique à Palaiseau.

# Table des matières

Résumé : .....	1
Abréviations : .....	5
1 <sup>ère</sup> Partie : Introduction Générale.....	7
1.1 Structure et rôle de l'actine dans le cytosquelette.....	9
1.1.1 Cytosquelette et propriétés de l'actine.....	9
1.1.2 L'actine filamentaire, propriétés et mécanisme.....	11
1.1.3 Protéines partenaires de l'actine .....	13
1.2 L'Inhibition de l'actine et de ses protéines partenaires.....	17
1.2.1 L'inhibition pour l'étude des mécanismes d'action.....	17
1.2.2 Inhibiteurs de l'actine et de ces protéines partenaires.....	18
1.2.3 Applications sur des échelles cellulaires ou supérieures.....	21
1.3 Le photocontrôle pour l'étude locale des mécanismes d'action.....	23
1.3.1 Contrôler les processus biologiques avec la précision de la lumière .....	23
1.3.2 La stratégie par photocageage .....	25
1.3.3 La stratégie par photocommutation .....	29
1.4 Exemples de photocontrôle de phénomènes biologiques.....	32
1.4.1 Diversité des applications du photocontrôle en biologie .....	32
1.4.2 Applications du photocontrôle sur le cytosquelette .....	36
1.5 Objectif du projet de thèse .....	40
2 <sup>ème</sup> Partie : Vers la synthèse totale d'une latrunculine B photocagée .....	43
2.1 Introduction .....	45
2.1.1 Les produits naturels, source de molécules biologiquement actives.....	45
2.1.2 Découverte et identification des latrunculines .....	46
2.1.3 Synthèse totale de Smith (1986).....	48
2.1.4 Synthèse totale de Fürstner (2003).....	51
2.1.5 Étude de la métathèse cyclisante d'alcènes par Watson (2009).....	56
2.1.6 Introduction du projet.....	58
2.2 Première stratégie de synthèse .....	60
2.2.1 Rétrosynthèse .....	60
2.2.2 Synthèse du fragment A.....	63
2.2.3 Synthèse du fragment B.....	73
2.2.4 Synthèse du fragment C.....	80
2.2.5 Tentatives d'estérification des fragments A et B .....	88
2.2.6 Tentatives d'addition umpolung .....	92

2.3 Adaptation de la stratégie de synthèse .....	95
2.3.1 Adaptation de la rétrosynthèse.....	95
2.3.2 Synthèse des fragments modifiés .....	96
2.3.3 Combinaison des fragments.....	101
2.4 Conclusion.....	112
3 <sup>ème</sup> Partie : Synthèse d'autres inhibiteurs photocagés.....	115
3.1 Synthèse et caractérisation d'un CK666 Photocagé .....	115
3.1.1 Introduction .....	115
3.1.2 Synthèse du CK666.....	118
3.1.3 Choix et synthèse du groupement photolabile .....	120
3.1.4 Synthèse et caractérisation .....	124
3.2 Hémisynthèse d'une cytochalasine D photocagée .....	130
3.2.1 Inhibition orthogonale aux latrunculines de la polymérisation de l'actine .....	130
3.2.2 Hémisynthèse et caractérisation.....	131
3.3 Tentative de développement d'une wiskostatine photocagée .....	137
3.3.1 N-WASP, un activateur d'Arp2/3 et son inhibition par la wiskostatine.....	137
3.3.2 Synthèse de la wiskostatine photocagée .....	139
3.3.3 Propriétés biologiques et problèmes de photoclivage.....	142
3.4 Conclusion.....	146
4 <sup>ème</sup> Partie : Synthèse de variants photocommutateurs du CK666 .....	149
4.1 Design des photocommutateurs.....	149
4.2 Synthèse et caractérisation.....	150
4.3 Applications biologiques .....	156
4.4 Perspectives de variation des substituants sur l'azobenzène .....	162
4.5 Conclusion.....	166
Conclusion générale et perspectives : .....	167
Annexe 1 : Tentatives d'addition umpolung avec un dérivé nitro et une sulfone .....	171
Annexe 2 : Synthèse de variants N-substitués du CK666.....	175
Annexe 3 : Tentative de développement d'un SMIFH2 photocagée : .....	179
Références .....	187
Partie expérimentale .....	193
Materials and Methods:.....	195
Experimental procedures and characterization of the prepared compounds .....	197
Photo-uncaging experiments .....	261
<i>In vitro</i> biological activity measurement assays.....	265
Cellular experiments .....	267

## Abréviations :

### Mesures et technologies

$\mu\text{M}$	Micomolaire	LED	Diode électroluminescente
$\mu\text{m}$	Micromètre	M	Molaire
ATR	Réflectance totale atténuée	m	Mètre
CCM / TLC	Chromatographie sur couche mince	mm	Millimètre
COSY	Correlated spectroscopy	MS	Spectrométrie de masse
ESI	Ionization par électronébuliseur	nM	Nanomolaire
HPLC	Chromatographie liquide haute pression	nm	Nanomètre
HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution	NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
$\text{IC}_{50}$	Concentration d'inhibition à 50 %	PDB	Protein Database
IR	Infra-rouge	pM	Picomolaire
kD	Constante de dissociation	pm	Picomètre
kDa	Kilo Dalton	PSS	État photostationnaire
$\lambda_{\text{max}}$	Longueur d'onde maximale	RMN / NMR	Résonance magnétique nucléaire
LCMS	Chromatographie en phase liquide – spectrométrie de masse	UV	Ultra-violet

### Protéines et biomolécules

ADN	Acide désoxyribonucléique	FH1 & FH2	Formin homology 1 & 2
ADP	Adenosine diphosphate	FKBP	FK506 binding protein
ARN	Acide ribonucléique	FRB	FKBP12-rapamycin binding
Arp	Actin related protein	G-actine	Actine globulaire
ATP	Adenosine triphosphate	GBD	GTPase-binding domain
BSA	Albumine de sérum bovin	GTP	Guanosine triphosphate
CapZ	Capping protein Z	N-WASP	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog	PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
COX-2	Cyclooxygenase-2	pen/strep	Pénicilline Streptomycine
EGF	Facteur de croissance épidermique	VCA	Verproline, cofiline, acide
F-actine	Actine filamentaire		

### Réactifs, solvants et groupement fonctionnels

Ac	Acétyle	Et	Éthyle
acac	Acétylacétonate	HATU	Hexafluorophosphate de (diméthylamino)- <i>N,N</i> -diméthyl (3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy) méthaniminium
ACN	Acétonitrile	HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
Ar	Aryle	HMDS	Bis(triméthylsilyl)amine
Bu	Butyle	HOBT	1-hydroxybenzotriazole
CAN	Nitrate de cérium et d'ammonium	lpc	Isopinocampheyle
CDI	Carbonyldiimidazole	iPr	Isopropyle
COD	1,5-Cyclooctadiène	mCPBA	Acide <i>mé</i> ta-chloroperbenzoïque
CSA	Acide camphosulfonique	Me	Méthyle
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide	NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
DCM	Dichlorométhane	PFA	Paraformaldéhyde
DEAD	Azodicarboxylate de diéthyle	Ph	Phényle
DIAD	Azodicarboxylate de diisopropyle	PMB	<i>para</i> -méthoxybenzyle
DiBALH	Hydruure de diisobutylaluminium	PTSA	Acide <i>para</i> -toluènesulfonique
DiPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine	pyr	Pyridine
DMA	<i>N,N</i> -Diméthylacétamide	SMIFH2	Small molécule inhibitor of formin homology 2
DMAP	4-Diméthylaminopyridine	TBS	<i>tert</i> -butyldiméthylsilyle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	TES	Triéthylesilyle
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide	Tf	Trifluoromethanesulfonyle
DMP	Periodinane de Dess-Martin	TFA	Acide trifluoroacétique
DTT	Dithiothréitol	THF	Tétrahydrofurane
EDC	1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide	TMS	Triméthylsilyle
EGTA	Acide éthylèneglycol bis-(amino-2-éthyléter) <i>N,N,N',N'</i> -tétraacétique	TRIS	2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol
EP	Ether de pétrole	Ts	Tosyle

---

1<sup>ère</sup> Partie :

Introduction Générale

---





# 1<sup>ère</sup> Partie : Introduction Générale

## 1.1 Structure et rôle de l'actine dans le cytosquelette

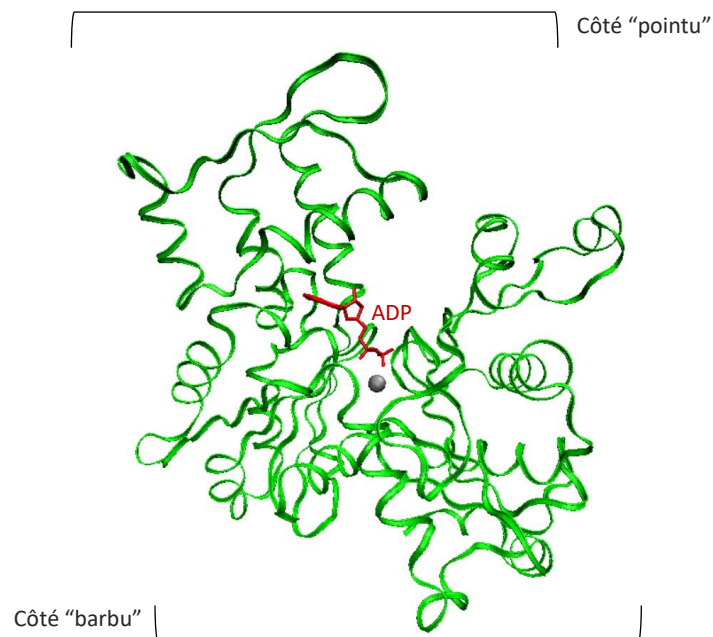
### 1.1.1 Cytosquelette et propriétés de l'actine

Le cytosquelette cellulaire est un ensemble de filaments protéiques rigides et dynamiques. Il est responsable des propriétés mécaniques des cellules, c'est-à-dire la forme, la rigidité et le mouvement. Il a aussi un rôle de matrice pour l'organisation interne, le transport intracellulaire, et pour l'adhérence entre cellules.<sup>1-6</sup> Ces propriétés découlent principalement du comportement de deux protéines, la tubuline et l'actine, toutes deux capables de polymériser de manière réversible.<sup>1,2,7</sup> De manière générale, on distingue les filaments du cytosquelette en fonction de leur taille.<sup>1</sup>

- Les microtubules sont les polymères de la tubuline et les plus larges filaments, formant des cylindres de 11 à 16 monomères de tubuline de large en fonction des espèces.<sup>8,9</sup>
- Les filaments intermédiaires sont des filaments complexes formés de différentes protéines fibrillaires. Ils ne sont présents que dans un nombre plus restreint d'espèces et de type cellulaires.<sup>1</sup>
- Les microfilaments sont les structures du cytosquelette les plus fines, formés des polymères de l'actine.<sup>1,7</sup> C'est à ces microfilaments que l'on portera notre intérêt ici.

- 
- (1) Bershadsky, A. D., Vasiliev, J. M. *Cytoskeleton*, Springer Science & Business Media, 2012.
- (2) Fletcher, D. A., Mullins, R. D. Cell Mechanics and the Cytoskeleton. *Nature* **2010**, *463* (7280), 485–492.
- (3) Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., Plastino, J. Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility. *Physiol. Rev.* **2014**, *94* (1), 235–263
- (4) Gardel, M. L., Schneider, I. C., Aratyn-Schaus, Y., Waterman, C. M. Mechanical Integration of Actin and Adhesion Dynamics in Cell Migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, *26*, 315–333.
- (5) Pantaloni, D., Clainche, C. L., Carlier, M.-F. Mechanism of Actin-Based Motility. *Science* **2001**, *292* (5521), 1502-1506.
- (6) Vicente-Manzanares, M., Choi, C. K., Horwitz, A. R. Integrins in Cell Migration – the Actin Connection. *J. Cell Sci.* **2009**, *122* (2), 199–206.
- (7) Dominguez, R., Holmes, K. C. Actin Structure and Function. *Annu. Rev. Biophys.* **2011**, *40*, 169-186.
- (8) Heald, R., Nogales, E. Microtubule Dynamics. *J. Cell Sci.* **2002**, *115* (1), 3–4.
- (9) Sui H., Downing K. H. Structural Basis of Interprotofilament Interaction and Lateral Deformation of Microtubules. *Structure* **2010**, *18* (8), 1022–1031.

L'actine elle-même est une protéine présente et extrêmement bien conservée chez tous les eucaryotes. C'est une des protéines les plus abondantes dans la quasi-totalité de leurs types cellulaires, pouvant dépasser la centaine de micromolaires en concentration. C'est une protéine globulaire d'environ 42 kDa présentant plusieurs domaines d'intérêt. En particulier, l'actine est orientée par un côté dit « barbu » et un côté dit « pointu », présente une poche pour coordonner une molécule d'ATP ou d'ADP ainsi qu'un métal divalent ( $Mg^{2+}$  en milieu physiologique mais pouvant être  $Ca^{2+}$  dans certains tampons) (Figure 3).<sup>7,10</sup>



**Figure 3** : Structure obtenue par diffraction des rayons X du complexe G-actine ADP. La sphère grise représente ici un atome de calcium coordonné à l'ADP (Identifiant PDB : 1J6Z )<sup>11</sup>

(10) Kabsch W., Vandekerckhove J. Structure and Function of Actin. *Struct. Funct. Action* **1992**, 21, 49–76.

(11) Otterbein, L. R., Graceffa, P., Dominguez, R. The Crystal Structure of Uncomplexed Actin in the ADP State. *Science* **2001**, 293 (5530), 708-711.

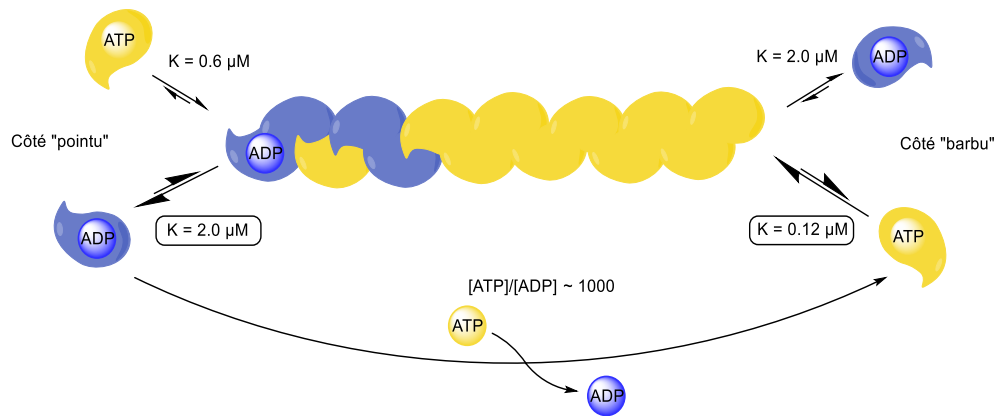
### 1.1.2 L'actine filamentaire, propriétés et mécanisme

Ces différents domaines sont cruciaux pour le caractère orienté de la polymérisation de l'actine. Il s'explique par une combinaison de plusieurs propriétés. Tout d'abord, le côté barbu d'un monomère peut interagir avec un côté pointu d'un autre monomère. En plus, l'actine a une activité ATPase, hydrolysant son ATP en ADP mais ne peut échanger ces ligands avec le milieu extérieur que sous forme monomérique. Et finalement, il y a des différences de vitesses de polymérisation et de dépolymérisation entre les formes ATP-actine et ADP-actine à chaque extrémité du filament, donnant huit constantes de vitesse à prendre en compte en théorie. Il est plus simple de regarder le rapport entre la vitesse de dépolymérisation et la vitesse de polymérisation, qui donne la concentration critique à dépasser pour observer la croissance à une extrémité. Cela réduit le nombre de valeurs d'intérêt à quatre et permet une comparaison plus simple (Figure 4). La plus petite concentration correspond à la situation de polymérisation la plus rapide du filament et la plus grande à la meilleure situation de dépolymérisation. Concrètement on voit que l'ATP-actine va polymériser principalement sur le côté barbu d'un filament mais également un peu sur le côté pointu et l'ADP-actine dépolymérise de chaque côté. Ces valeurs donnent l'impression que l'ADP-actine ne devrait pas s'associer et que le polymère aurait une croissance forte dans un sens, formé exclusivement d'ATP-actine. La présence de l'activité ATP-ase va définir le comportement observé. En effet, l'ATP-actine d'un filament va également progressivement hydrolyser son ATP en ADP, créant au cours du temps un gradient d'ADP-actine le long du filament, les monomères les plus anciens ayant une plus grande probabilité d'être des ADP-actine. Au final, on obtient un filament qui ajoute de l'ATP-actine principalement au côté barbu, voit progressivement ses monomères devenir ADP-actine qui vont donc dépolymériser au côté pointu. Les ADP-actine libérées vont pouvoir échanger leurs ADP pour des ATP, diffuser au côté barbu du filament et pouvoir s'ajouter à nouveau. Ce phénomène est connu sous le nom de « treadmilling » (tapis roulant) de l'actine et décrit la croissance dirigée des filaments d'actine.<sup>7,12,13</sup>

---

(12) Neuhaus, J. M., Wanger, M., Keiser, T., Wegner, A. Treadmilling of Actin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **1983**, 4 (5), 507–527.

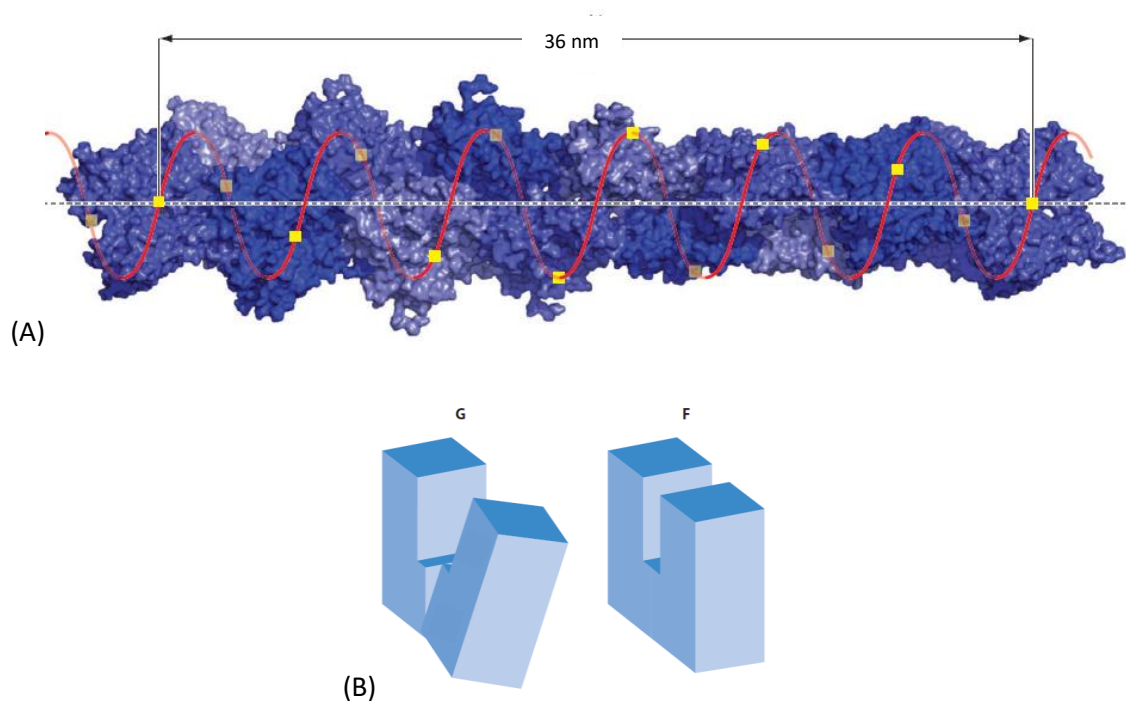
(13) Pollard, T. D. Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, 8 (8), a018226.



**Figure 4** : Représentation du treadmilling de l'actine. Les constantes indiquées sont les ratios entre les vitesses de dissociation et d'association du monomère d'actine. Le ratio de concentrations en ATP par rapport à l'ADP est un ordre de grandeur usuel dans le cytoplasme. Adaptée avec autorisation à partir de Pollard, T. D. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. **2016**, 8 (8), a018226. Copyright 2022, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.

L'imagerie par cryo-microscopie électronique a permis de révéler la structure exacte du polymère qui prend l'apparence d'une double hélice avec une légère rotation entre chaque unité. Cette impression vient du fait qu'il y a un angle de  $166.6^\circ$  entre chaque monomère, donnant l'illusion d'un tour complet accompagné d'une faible rotation de l'ensemble (Figure 5 A).<sup>7</sup>

La nucléation est également une étape cruciale. En effet, la formation du premier trimère d'actine est fortement défavorisée.<sup>13</sup> En plus du caractère entropique défavorable présent pour la formation de n'importe quel polymère, cela est dû au fait que pour polymériser, l'actine va changer de géométrie et passer d'une forme « pliée » à une forme « plate » non native et donc moins stable (Figure 5 B).<sup>7</sup> En termes d'énergie, à la différence de la croissance d'un filament pour lequel il suffit de tordre le nouveau monomère arrivant (le reste du polymère étant déjà dans cette configuration), il faut tordre trois monomères simultanément pour former le premier trimère, ce qui est fortement défavorable. De ce fait, la nucléation est cinétiquement lente et est toujours considérée comme l'étape limitante dans la polymérisation de l'actine. Cela explique aussi le caractère fortement non-linéaire observé dans la cinétique de polymérisation.<sup>13</sup>



**Figure 5** : Géométries de la F-actine. (A) Structure de la F-actine dérivée de cryo-microscopie électronique. (B) Représentation du changement de géométrie entre la G et F-actine. Retranscrit avec autorisation à partir de Dominguez, R.; Holmes, K. C. *Annu. Rev. Biophys.* **2011**, *40*, 169.

Copyright 2022, Annual Reviews.

Pour simplifier le langage, on utilisera pour la suite les dénominations usuelles de G-actine pour l'actine monomérique globulaire et de F-actine pour l'actine polymérisée filamentaire.

### 1.1.3 Protéines partenaires de l'actine

Un grand nombre de protéines interagissent avec l'actine et vont être la source des différentes fonctions du réseau de microfilaments.<sup>7,13</sup> En premier lieu, la gestion de la polymérisation est cruciale car les cellules ne se contentent pas d'un réseau homogène de filaments.<sup>14</sup> De plus, la dynamique de polymérisation et dépolymérisation de l'actine est relativement lente par rapport aux mécanismes dans lesquels elle est impliquée. Un certain nombre de protéines servent à réguler les paramètres de polymérisation de l'actine (Figure 6).<sup>7</sup>

(14) Svitkina T. M. Actin Cell Cortex: Structure and Molecular Organization. *Trends Cell Biol.* **2020**, *30* (7), 556–565.

En pratique, les formines sont des promoteurs de la nucléation et de la croissance des filaments. Elles peuvent interagir avec l'actine par deux domaines, leur permettant de forcer le rapprochement de plusieurs unités d'actine. En se liant en même temps à différentes unités de G-actine, elles accélèrent la formation et stabilisent le trimère initial, favorisant donc la nucléation. En se liant d'une part à l'extrémité barbue d'un filament et d'autre part à une unité de G-actine avoisinante, elles permettent aussi de favoriser le rapprochement du nouveau monomère et donc d'accélérer la croissance du filament.<sup>15</sup> Les formines sont donc des promoteurs de la polymérisation à la fois à travers la nucléation et la croissance des filaments. Inversement, la dépolymérisation est régulée par, entre autres, la cofiline. Cette protéine se lie à l'extrémité pointue du filament et déstabilise le dernier monomère, accélérant son départ.<sup>16</sup> Les cellules peuvent même figer des filaments assemblés grâce à des protéines de coiffe. Par exemple, CapZ se lie sur l'extrémité barbue et arrête totalement la polymérisation.<sup>17</sup> Les cellules contournent les cinétiques de polymérisation natives de l'actine grâce à ces différents systèmes de régulation.

Des protéines peuvent aussi jouer sur d'importants paramètres intensifs liés au réseau d'actine. Le complexe Arp2/3 est un promoteur particulier de la nucléation car il densifie le réseau d'actine en initiant des ramifications. Quand il est activé par N-WASP, Arp2/3 peut se lier à un filament pour en initier un nouveau à partir de celui-ci. En croissant, ce filament peut servir de support pour une nouvelle unité d'Arp2/3, qui peut initier une nouvelle branche et ainsi de suite. Cela va engendrer une croissance exponentielle locale du réseau d'actine et donc une densification.<sup>18</sup> Ce phénomène induit une très forte hétérogénéité du réseau d'actine et est un facteur majeur des effets locaux observés. La quantité de G-actine disponible est également régulée pour ne pas simplement atteindre la valeur d'équilibre. En effet, sans régulation, la polymérisation atteint un équilibre donnant une concentration d'environ 0.1  $\mu\text{M}$  de G-actine dans le milieu.<sup>13</sup> La profiline se lie à la G-actine et l'empêche de polymériser. Les complexes G-actine/profiline formés constituent un stock dormant de G-actine et maintiennent environ la moitié de l'actine cellulaire sous une forme non polymérisée mais disponible.<sup>19</sup> La profiline catalyse par ailleurs l'échange ADP vers ATP de l'actine, régénérant les ADP-G-actine libérées par la dépolymérisation. Ce sont les formines qui vont rompre les complexes G-actine/profiline pour permettre la nucléation ou l'extension de filaments.<sup>20</sup>

---

(15) Paul, A. S., Pollard, T. D. Review of the Mechanism of Processive Actin Filament Elongation by Formins. *Cell Motil.* **2009**, 66 (8), 606–617.

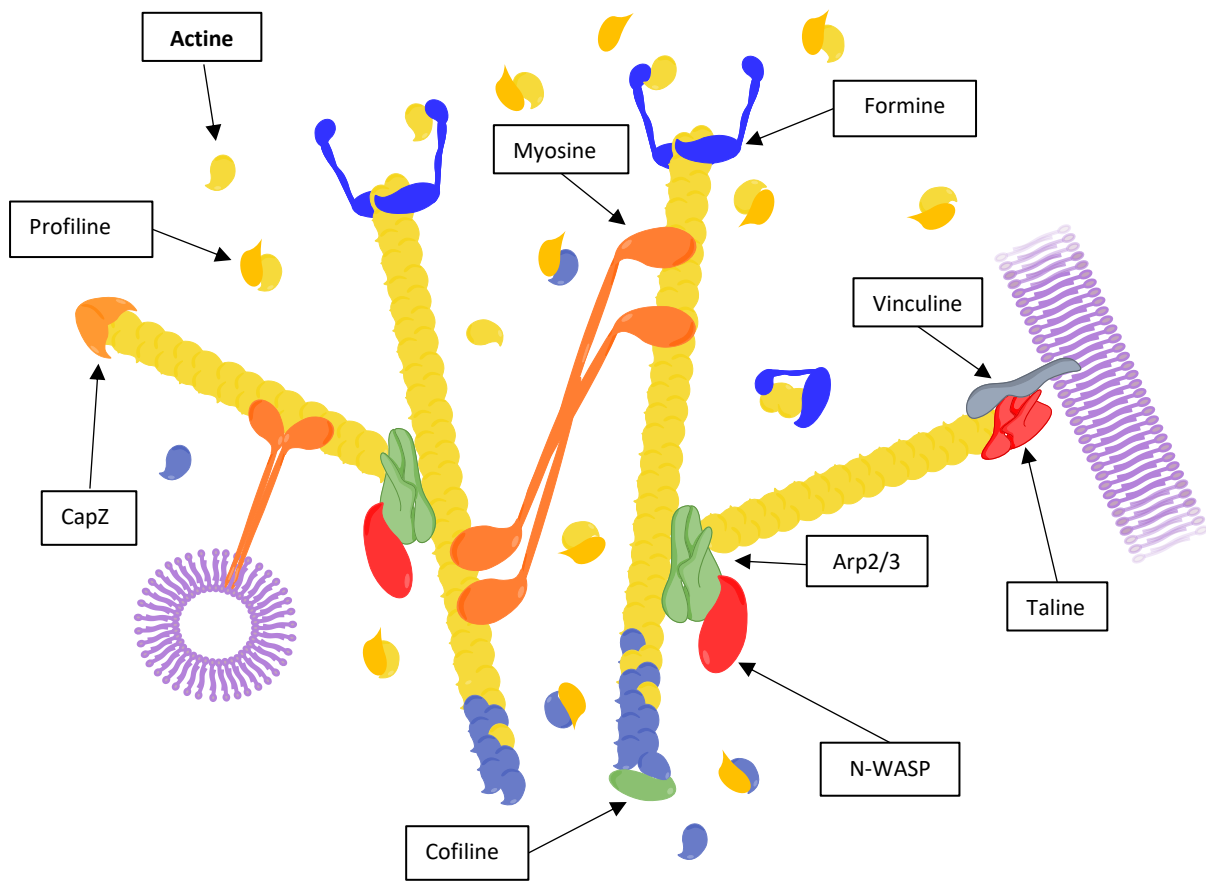
(16) Bamburg, J. R. Proteins of the ADF/Cofilin Family: Essential Regulators of Actin Dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1999**, 15 (1), 185–230.

(17) Yamashita A., Maeda K., Maeda Y. Crystal Structure of CapZ: Structural Basis for Actin Filament Barbed End Capping. *EMBO J.* **2003**, 22 (7), 1529–1538.

(18) Goley, E. D., Welch, M. D. The ARP2/3 Complex: An Actin Nucleator Comes of Age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, 7 (10), 713–726.

(19) Witke, W. The Role of Profilin Complexes in Cell Motility and Other Cellular Processes. *Trends Cell Biol.* **2004**, 14 (8), 461–469.

(20) Romero, S., Clainche, L. C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D., Carlier M.F. Formin Is a Processive Motor That Requires Profilin to Accelerate Actin Assembly and Associated ATP Hydrolysis. *Cell* **2004**, 119 (3), 419–429.



**Figure 6** : Représentation des réseaux d'actine et des rôles de différentes protéines partenaires

En second lieu, un grand nombre de protéines s'appuient sur le réseau d'actine pour transmettre ses propriétés mécaniques et structurales à d'autres éléments de la cellule. Ce dernier est tout d'abord lié aux membranes à travers la combinaison de plusieurs protéines dont les vinculines et talines. En effet, ces dernières forment un complexe avec les intégrines membranaires et la F-actine liant ainsi le réseau aux membranes.<sup>21,22</sup> D'une part, cela lui permet de transmettre sa rigidité et sa géométrie à la membrane, permettant des déformations et protrusions. D'autre part, cela forme une interaction indirecte entre les réseaux d'actine des cellules adhérees à travers leurs membranes respectives. L'interaction F-actine/membrane est cruciale pour tous les mécanismes de mouvement cellulaire car ils impliquent toujours des déformations de la membrane.<sup>4</sup>

(21) Golji, J., Mofrad, M. R. K. The Interaction of Vinculin with Actin. *PLoS Comput. Biol.* **2013**, 9 (4), e1002995.

(22) Hirata, H., Tatsumi, H., Lim, C. T., Sokabe, M. Force-Dependent Vinculin Binding to Talin in Live Cells: A Crucial Step in Anchoring the Actin Cytoskeleton to Focal Adhesions. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2014**, 306 (6), C607–C620.



La rigidité du réseau d'actine est également exploitée par les myosines. Les myosines II sont des protéines divisées en deux domaines d'intérêt : la tête et la queue. Les têtes de myosine II interagissent avec la F-actine et les queues interagissent entre-elles. Cela va lier indirectement les filaments entre eux et donc rigidifier le réseau. En plus, en réponse à un signal, les myosines II peuvent se rétracter par flexion de leurs têtes, entraînant ainsi les différents filaments auxquels elles sont liées.<sup>23</sup> Par conséquent, de par l'interaction F-actine/membrane, cela va rétracter l'ensemble de la cellule en tirant sur les membranes. Ce phénomène est à l'origine de la contraction musculaire et témoigne de la vitesse et de l'ampleur des mécanismes liés à l'actine.<sup>24</sup> Les myosines V, quant à elles, varient dans leurs structures et fonctionnent en dimère. Les deux têtes interagissent avec l'actine alors que les queues peuvent se lier à des vésicules. Par cycles de flexion/rotation, les têtes peuvent « marcher » le long d'un filament d'actine et donc trainer la vésicule.<sup>24</sup> C'est un mécanisme de transport important qui est complémentaire à celui de la dynéine le long des microtubules.<sup>2</sup>

---

(23) Adelstein, R., Eisenberg E. Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction. *Ann. Rev. Biochem.* **1980**, 49, 921-956.

(24) Koubassova, N. A., Tsaturyan, A. K. Molecular Mechanism of Actin-Myosin Motor in Muscle. *Biochem. Mosc.* **2011**, 76 (13), 1484-1506.

## 1.2 L’Inhibition de l’actine et de ses protéines partenaires

### 1.2.1 L’inhibition pour l’étude des mécanismes d’action

Les exemples de mécanismes du réseau d’actine décrits précédemment illustrent la complexité de ce système. Pour étudier ce type de système, les biologistes empruntent souvent une approche qui consiste à éliminer l’élément étudié du milieu pour observer la réponse de l’organisme ou de la cellule à son absence. Cela met souvent en lumière son rôle même dans un environnement complexe ou dans le cas d’interactions multiples. Pour ce faire, il y a deux principales techniques : le *knock out* qui consiste, par ingénierie génétique, à supprimer le gène codant pour la protéine cible de manière à ce qu’elle ne soit jamais produite par la cellule, et l’inhibition qui consiste à mettre dans le milieu un antagoniste de la cible (protéine ou autre) qui la rend inactive.<sup>25–27</sup> Ces deux méthodes ont des avantages et des inconvénients. Le *knock out* est une technique dont la méthode est bien décrite mais assez longue et complexe à mettre en œuvre. Elle nécessite la connaissance du gène codant pour la cible puis l’utilisation d’une méthode souvent complexe pour supprimer ce gène (en général une recombinaison homologe mais des nucléases spécifiques peuvent être utilisées si le placement du gène y est propice).<sup>25</sup> En revanche, l’inhibition est simple à mettre en œuvre car elle nécessite la simple mise en contact de l’organisme ou des cellules cibles avec l’inhibiteur.<sup>26,27</sup> La partie difficile est en amont car il faut trouver ou avoir connaissance d’un inhibiteur adéquat et spécifique pour la cible, et de pouvoir en disposer facilement.

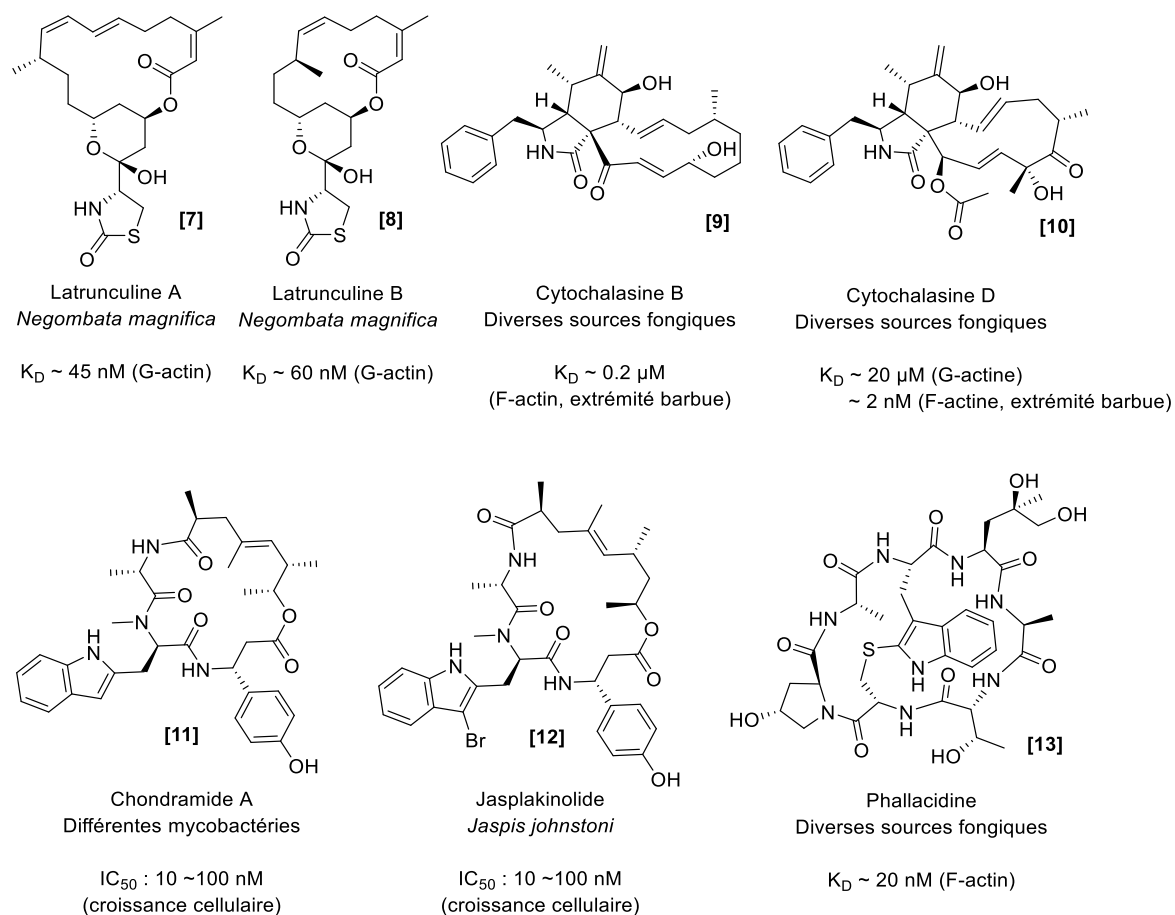
La puissance des méthodes d’inhibition vient donc de la connaissance de bibliothèques d’antagonistes spécifiques pour un grand nombre de cibles. Dans cette optique, les petites molécules sont apparues comme une source d’inhibiteurs potentiels. En particulier, les produits naturels sont des candidats de choix. Leur production par des organismes témoigne d’une utilité dans un processus biologique : si ce ne sont pas de simples métabolites, ils interagissent potentiellement avec une cible. Des produits de synthèse peuvent également être conçus pour servir d’inhibiteurs mais c’est souvent un procédé d’optimisation assez long et le risque d’activité secondaire hors cible est important.<sup>26,27</sup>

- 
- (25) Galli-Taliadoros, L. A., Sedgwick, J. D., Wood, S. A., Körner, H. Gene Knock-out Technology: A Methodological Overview for the Interested Novice. *J. Immunol. Methods* **1995**, *181* (1), 1–15.
- (26) Toogood, P. L. Inhibition of Protein–Protein Association by Small Molecules: Approaches and Progress. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (8), 1543–1558.
- (27) Sheng, C., Dong, G., Miao, Z., Zhang, W., Wang, W. State-of-the-Art Strategies for Targeting Protein–Protein Interactions by Small-Molecule Inhibitors. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (22), 8238–8259.

## 1.2.2 Inhibiteurs de l'actine et de ces protéines partenaires

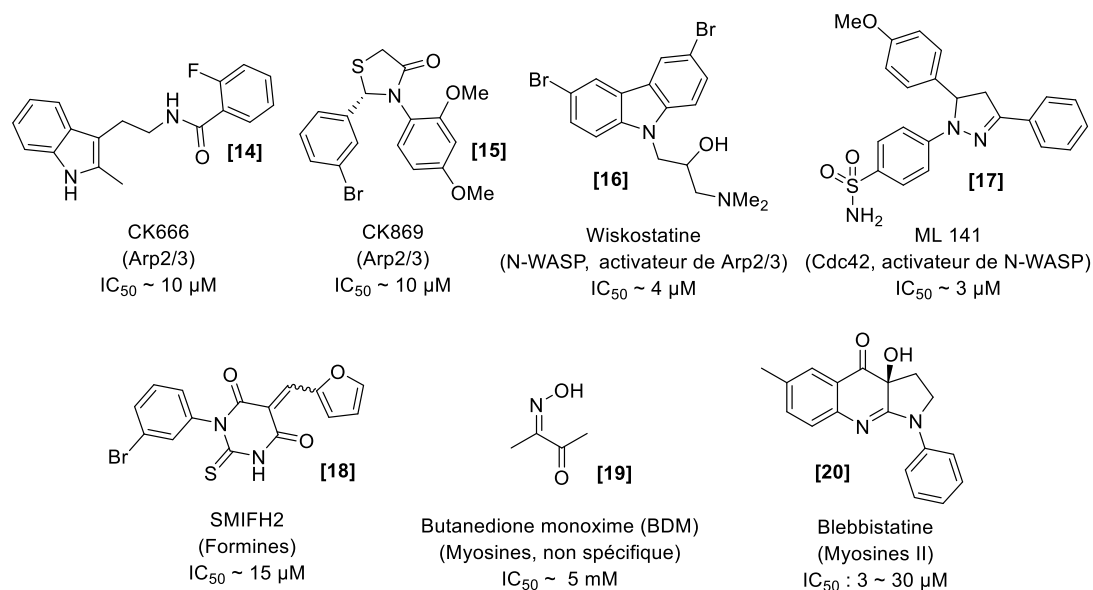
Dans le cadre de l'actine et de ses protéines partenaires, beaucoup de petites molécules inhibitrices ont été découvertes ou développées. Beaucoup de produits naturels interagissent avec l'actine et interfèrent avec les mécanismes de polymérisation/dépolymérisation. On en trouve dans différents types d'organismes : bactéries, champignons ou éponges marines. En particulier, les latrunculines A **[7]** et B **[8]** vont stabiliser la G-actine et donc inhiber totalement la polymérisation. Ces molécules agissent de manière très similaire à la profiline mais ont une association très forte avec la G-actine qu'ils piègent.<sup>28</sup> Les cytochalasines B **[9]** et D **[10]** inhibent aussi la polymérisation mais le font en se plaçant à l'extrémité barbue des filaments et en empêchant l'élongation, agissant comme les protéines de coiffe. Cette activité va ralentir drastiquement la polymérisation, pouvant même rendre la dépolymérisation plus rapide et donc induire le désassemblage des filaments.<sup>29,30</sup> Les chondramides **[11]**, le jasplakinolide **[12]** et la phalloïdine **[13]** vont au contraire stabiliser la F-actine et inhiber la dépolymérisation. Cela entraîne la formation de filaments statiques et arrête le mécanisme de treadmilling.<sup>31-33</sup> Ces molécules représentent donc différentes manières de perturber le réseau d'actine et ont des activités très fortes qui se traduisent par leurs faibles constantes de dissociation ou d' $IC_{50}$  de l'ordre de 10 ~ 200 nM (Figure 7).<sup>28,31,33,34</sup>

- 
- (28) Spector, I., Shochet, N. R., Blasberger, D., Kashman, Y. Latrunculins—Novel Marine Macrolides That Disrupt Microfilament Organization and Affect Cell Growth: I. Comparison with Cytochalasin D. *Cell Motil.* **1989**, *13* (3), 127–144.
- (29) Brown, S. S., Spudich, J. A. Mechanism of Action of Cytochalasin: Evidence That It Binds to Actin Filament Ends. *J. Cell Biol.* **1981**, *88* (3), 487–491.
- (30) Wakatsuki, T., Schwab, B., Thompson, N. C., Elson, E. L. Effects of Cytochalasin D and Latrunculin B on Mechanical Properties of Cells. *J. Cell Sci.* **2001**, *114* (5), 1025–1036.
- (31) Sasse, F., Kunze, B., Gronewold, T. M. A., Reichenbach, H. The Chondramides: Cytostatic Agents From Myxobacteria Acting on the Actin Cytoskeleton. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90* (20), 1559–1563.
- (32) Bubb, M. R., Spector, I., Beyer, B. B., Fosen, K. M. Effects of Jasplakinolide on the Kinetics of Actin Polymerization: An explanation for certain in vivo observations. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (7), 5163–5170.
- (33) Cooper, J. A. Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin. *J. Cell Biol.* **1987**, *105* (4), 1473–1478.
- (34) MacLean-Fletcher, S., Pollard, T. D. Mechanism of Action of Cytochalasin B on Actin. *Cell* **1980**, *20* (2), 329–341.



**Figure 7** : Principales petites molécules inhibitrices de l'actine, origines et activités<sup>28,31,33,34</sup>

Des inhibiteurs pour un grand nombre de partenaires de l'actine ont également été découverts. Pour donner quelques exemples, des molécules de synthèse ont été développées pour l'inhibition des principaux promoteurs de la polymérisation. Le SMIFH2 [18] était connu comme inhibiteur des formines alors que les deux composés CK666 [14] et CK869 [15] ciblent le complexe Arp2/3.<sup>35,36</sup> La wiskostatine [16] est une autre molécule permettant de cibler indirectement Arp2/3 en inhibant N-WASP, un de ses activateurs.<sup>37,38</sup> Il est même possible de remonter encore le long de la chaîne d'activation en inhibant Cdc42, un activateur de N-WASP, avec le ML 141 [17].<sup>37,39</sup> Il y a aussi des manières de cibler les myosines. En particulier la blebbistatine [20] va inhiber sélectivement les myosines II alors que le BDM (butanedione monoxime) [19] va non-spécifiquement cibler toutes les myosines.<sup>40,41</sup> Ces composés synthétiques sont bien moins efficaces avec des affinités plutôt de l'ordre de grandeur de  $1 \sim 30 \mu\text{M}$  (Figure 8), montrant la difficulté qu'est la conception *de novo* d'une molécule active.



**Figure 8 :** Molécules synthétiques inhibitrices de certaines protéines partenaires de l'actine et leur activité<sup>35,36,38–41</sup>

- (35) Rizvi, S. A., Neidt, E. M., Cui, J., Feiger, Z., Skau, C. T., Gardel, M. L., Kozmin, S. A., Kovar, D. R. Identification and Characterization of a Small Molecule Inhibitor of Formin-Mediated Actin Assembly. *Chem. Biol.* **2009**, *16* (11), 1158–1168.
- (36) Nolen, B. J., Tomasevic, N., Russell, A., Pierce, D. W., Jia, Z., McCormick, C. D., Hartman, J., Sakowicz, R., Pollard, T. D. Characterization of Two Classes of Small Molecule Inhibitors of Arp2/3 Complex. *Nature* **2009**, *460* (7258), 1031–1034.
- (37) Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., Kirschner, M. W. The Interaction between N-WASP and the Arp2/3 Complex Links Cdc42-Dependent Signals to Actin Assembly. *Cell* **1999**, *97* (2), 221–231.
- (38) Peterson, J. R., Bickford, L. C., Morgan, D., Kim, A. S., Ouerfelli, O., Kirschner, M. W., Rosen, M. K. Chemical Inhibition of N-WASP by Stabilization of a Native Autoinhibited Conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11* (8), 747–755.
- (39) Surviladze, Z., Waller, A., Strouse, J. J., Bologa, C., Ursu, O., Salas, V., Parkinson, J. F., Phillips, G. K., Romero, E., Wandinger-Ness, A., Sklar, L. A., Schroeder, C., Simpson, D., Nöth, J., Wang, J., Golden, J., Aubé, J. A Potent and Selective Inhibitor of Cdc42 GTPase. In *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*, National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD), 2010.
- (40) Komatsu, H., Koseki, Y., Kanno, T., Aoki, S., Kodama, T. 2,3-Butandione 2-Monoxime Inhibits Skeletal Myosin II by Accelerating ATP Cleavage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *490* (3), 849–854.
- (41) Kovács, M., Tóth, J., Hetényi, C., Málnási-Csizmadia, A., Sellers, J. R. Mechanism of Blebbistatin Inhibition of Myosin II \*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (34), 35557–35563.

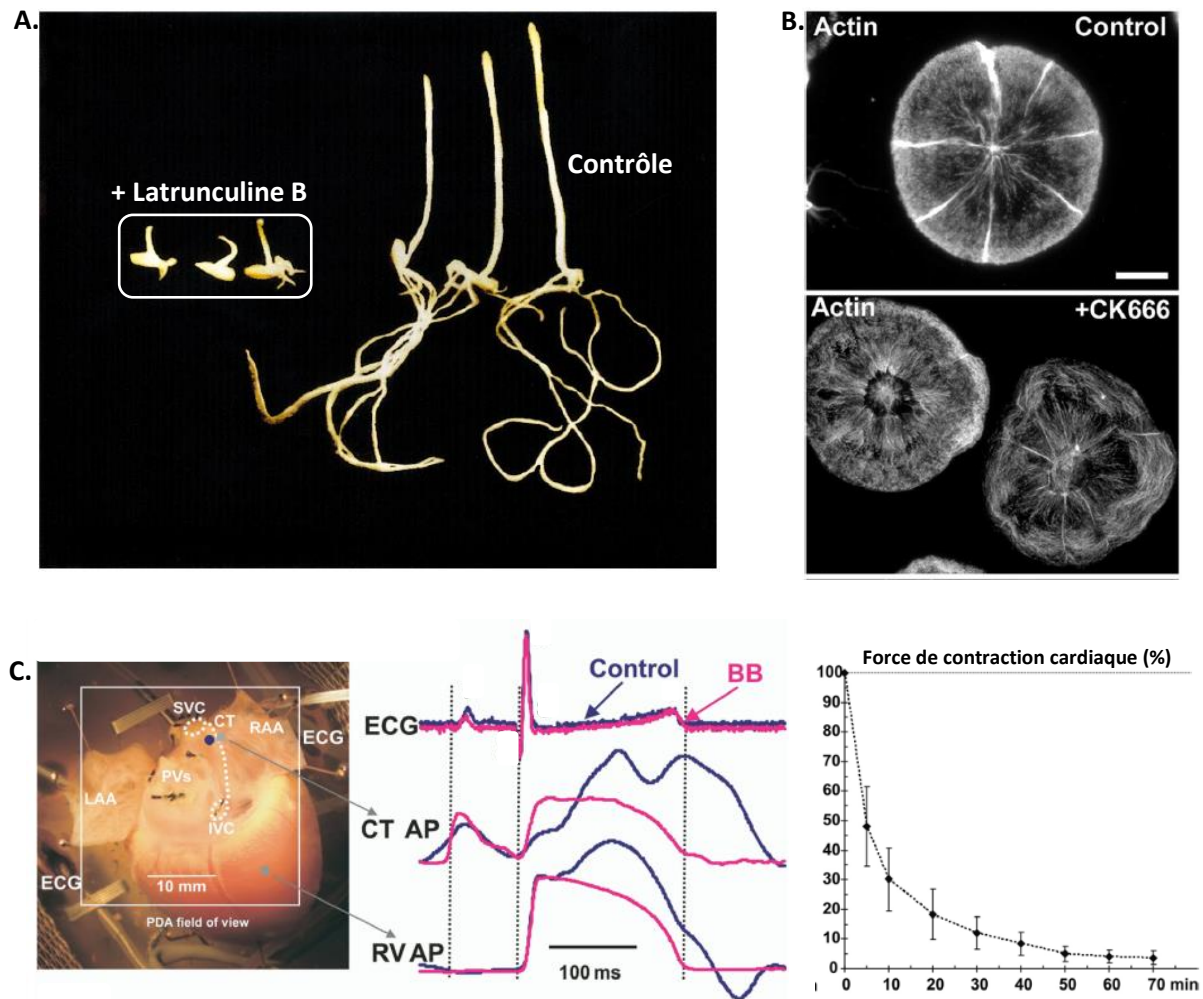
### 1.2.3 Applications sur des échelles cellulaires ou supérieures

Ces inhibiteurs ont déjà été utilisés à différentes échelles pour inhiber la polymérisation de l'actine ou l'action des protéines partenaires, causant la perte de rigidité, d'organisation et de mobilité des cellules. Dans une expérience sur des pousses de seigle, l'inhibition totale de la polymérisation de l'actine par la latrunculine B **[8]** conduit à l'échelle de l'organisme entier à l'arrêt de la croissance. Les plantules incubées avec la molécule restent à l'état de germe sans mourir (Figure 9 A).<sup>42</sup> Privés du réseau d'actine, les cellules sont incapables de se mouvoir, de se diviser ou de croître, révélant le rôle essentiel de l'actine dans les fonctions de base des cellules.

Des expériences sur des cœurs de lapins montrent l'inhibition de l'activité musculaire par la blebbistatine **[20]**. L'activité cardiaque d'un cœur isolé est mesurée avant et après injection de blebbistatine **[20]**. Les mesures d'électrocardiographie et de potentiel d'activité restent inchangés mais la force de contraction chute après l'injection de la blebbistatine **[20]** (Figure 9 C). L'inhibition des myosines II fait cesser les propriétés de contraction des réseaux d'actine et donc l'activité musculaire à l'échelle de l'organe.<sup>43</sup>

Sur des expériences à l'échelle cellulaire, l'incubation de leucocytes avec le CK666 **[14]** cause de sévères déformations par rapport à leur forme native. La capacité à s'étendre de ces types de cellules est également ralentie par la molécule (Figure 9 B).<sup>44</sup> Cela donne une idée du rôle dans l'organisation et la morphologie cellulaire des réseaux branchés induits par Arp2/3.

- 
- (42) Baluška, F., Jasik, J., Edelmann, H. G., Salajová, T., Volkmann, D. Latrunculin B-Induced Plant Dwarfism: Plant Cell Elongation Is F-Actin-Dependent. *Dev. Biol.* **2001**, 231 (1), 113–124.
- (43) Fedorov, V. V., Lozinsky, I. T., Sosunov, E. A., Anyukhovskiy, E. P., Rosen, M. R., Balke, C. W., Efimov, I. R. Application of Blebbistatin as an Excitation–Contraction Uncoupler for Electrophysiologic Study of Rat and Rabbit Hearts. *Heart Rhythm* **2007**, 4 (5), 619–626.
- (44) Henson, J. H., Yeterian, M., Weeks, R. M., Medrano, A. E., Brown, B. L., Geist, H. L., Pais, M. D., Oldenbourg, R., Shuster, C. B. Arp2/3 Complex Inhibition Radically Alters Lamellipodial Actin Architecture, Suspended Cell Shape, and the Cell Spreading Process. *Mol. Biol. Cell* **2015**, 26 (5), 887–900.



**Figure 9** : Exemple d’inhibition de la polymérisation de l’actine à différentes échelles. (A) Photos de plantules de seigle traitées par 1  $\mu$ M de latrunculine B par rapport à un contrôle non traité après 2 semaines. Retranscrit avec autorisation à partir de Baluška, F *et al.* *Dev. Biol.* **2001**, 231 (1), 113–124.

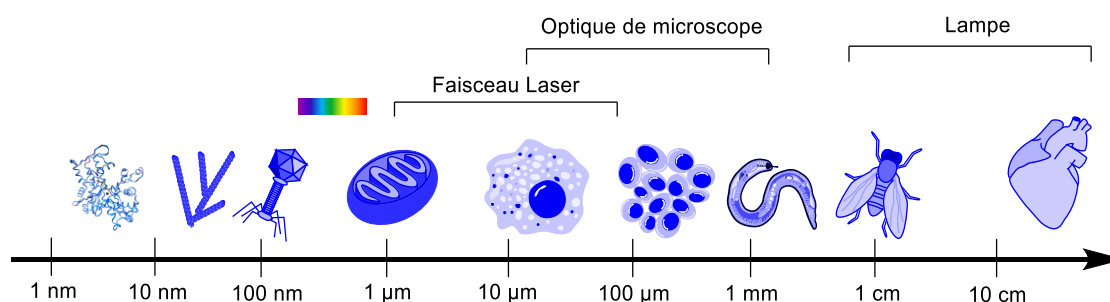
Copyright 2022, Elsevier. (B) : Image de microscopie de fluorescence révélant l’actine de coelomocytes par immunofluorescence traités ou non avec 100  $\mu$ M de CK666. Retranscrit avec autorisation à partir de Henson, J. H. *et al.* *Mol. Biol. Cell* **2015**, 26 (5), 887–900. Copyright 2022, American Society for Cell Biology (C) : Photo d’un cœur de lapin isolé par technique de Langendorff (CT : Crista terminalis ; RV : ventricule droit) ; Électrocardiogramme (ECG) et potentiel d’action (AP) mesurés en différents points. BB correspond au moment d’injection de la blebbistatine ; Force de contraction cardiaque après injection de 2,5  $\mu$ M de blebbistatine. Adapté avec autorisation à partir de Fedorov, V. V *et al.* *Heart Rhythm* **2007**, 4 (5), 619–626. Copyright 2022, Elsevier

### 1.3 Le photocontrôle pour l'étude locale des mécanismes d'action

#### 1.3.1 Contrôler les processus biologiques avec la précision de la lumière

A ces échelles, des observations générales sur le comportement du réseau d'actine et sur le rôle des différentes protéines partenaires est possible. Si l'on veut gagner en précision pour étudier les mécanismes locaux, il est nécessaire d'améliorer les outils à notre disposition pour leur permettre des actions locales et contrôlées dans le temps. La maîtrise de la lumière à travers les technologies optiques modernes d'imagerie ont permis d'obtenir des précisions d'observation impressionnantes. Il est même aisément possible de voir les filaments individuels d'actine par fluorescence.<sup>45,46</sup> L'utilisation de la lumière semble donc un choix particulièrement intéressant pour aller chercher de la précision et cela d'autant plus que l'interaction lumière/molécule peut être exploitée de plusieurs manières. Il serait donc astucieux de pouvoir transférer la précision de la lumière sur des outils moléculaires pour leur donner une capacité d'action locale. La molécule devra donc associer une activité biologique et un caractère photosensible.

En termes de précision, les technologies optiques modernes permettent d'irradier par LED des zones de l'ordre de grandeur d'un optique de microscope, c'est-à-dire entre 10  $\mu\text{m}$  et 1 mm (une cellule seule ou un groupe de cellules) ou d'irradier au laser à des précisions bien meilleures, entre 1 et 100  $\mu\text{m}$  (une cellule ou une partie de cellule) (Figure 10). Ces moyens semblent parfaitement adaptés à une action locale souhaitée pour étudier un système impliquant les réseaux d'actine.



**Figure 10** : Échelle de précision d'irradiation lumineuse et éléments biologiques associés

(45) Lichtman, J. W., Conchello, J.-A. Fluorescence Microscopy. *Nat. Methods* **2005**, 2 (12), 910–919.

(46) Leung, B. O., Chou, K. C. Review of Super-Resolution Fluorescence Microscopy for Biology. *Appl. Spectrosc.* **2011**, 65 (9), 967–980.



En termes de réponse de la molécule à l'irradiation, il faut la diriger vers quelque chose d'exploitable. Lorsqu'une molécule absorbe un photon, elle passe à un état excité. Cet état excité a plusieurs manières de libérer l'excès d'énergie en fonction de la structure de la molécule :<sup>47</sup>

- Il peut se relaxer thermiquement, ce qui n'est pas particulièrement exploitable
- Il peut émettre un nouveau photon, ce qui est la base de l'imagerie par fluorescence mais qui serait très difficilement exploitable dans ce nouveau contexte
- Il peut déclencher une réaction chimique, ce qui est particulièrement intéressant ici.

Il reste encore une dernière contrainte qui est la compatibilité des conditions de la réaction déclenchée par irradiation avec le milieu biologique. L'irradiation doit tout d'abord pouvoir pénétrer les tissus sans causer trop de dégâts. Des irradiations UV trop énergétiques peuvent en effet dégrader les multiples noyaux aromatiques de l'ADN, de l'ARN ou des protéines et des longueurs d'onde trop grandes sont absorbées par l'eau. Cela limite les longueurs d'onde utilisables à une gamme allant du proche UV au rouge. La réponse de la molécule à la lumière doit également être suffisamment efficace pour ne pas avoir besoin d'irradiations trop intenses ou prolongées, c'est-à-dire qu'elle doit avoir un haut rendement quantique. La réaction elle-même doit finalement être suffisamment rapide par rapport aux mécanismes biologiques cibles.<sup>48,49</sup>

---

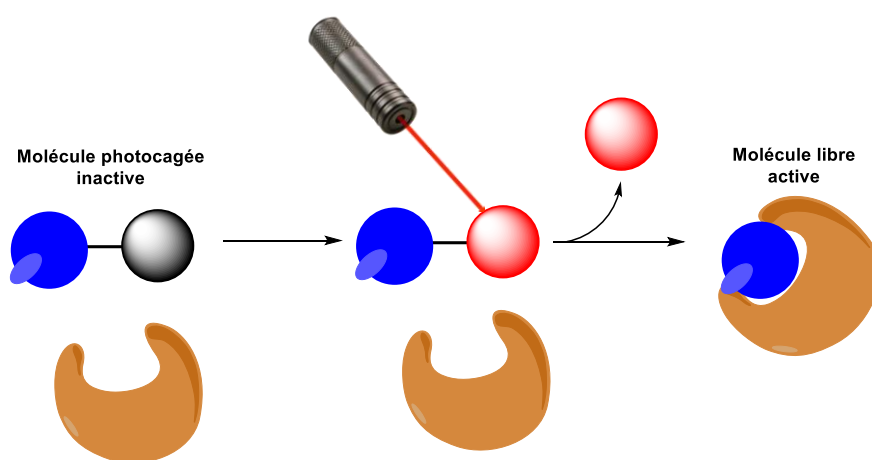
(47) Lasorne, B., Worth, G. A., Robb, M. A. Excited-State Dynamics. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2011**, *1* (3), 460–475.

(48) Klán, P., Šolomek, T., Bochet, C. G., Blanc, A., Givens, R., Rubina, M., Popik, V., Kostikov, A., Wirz, J. Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (1), 119–191.

(49) Szymański, W., Beierle, J. M., Kistemaker, H. A. V., Velema, W. A., Feringa, B. L. Reversible Photocontrol of Biological Systems by the Incorporation of Molecular Photoswitches. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (8), 6114–6178.

## 1.3.2 La stratégie par photocageage

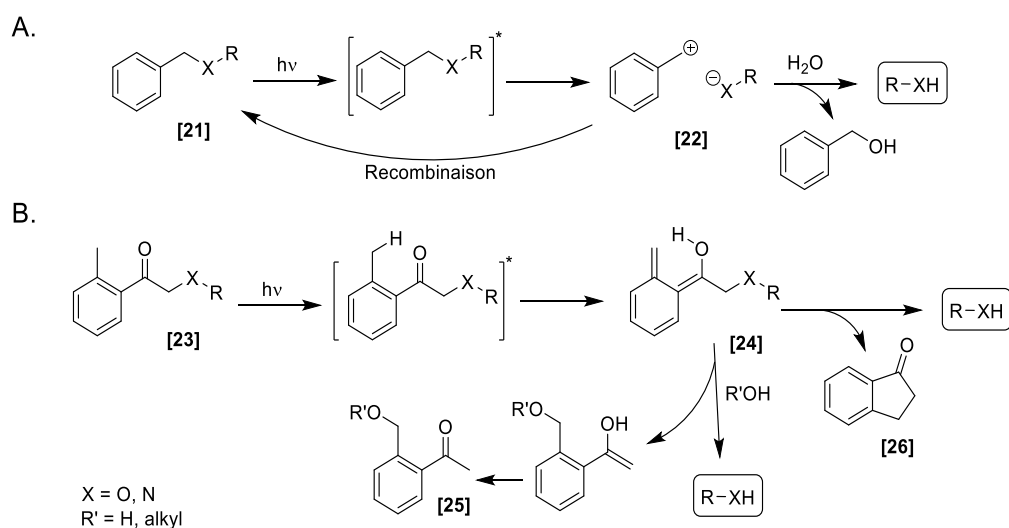
Ces contraintes prises en compte, deux grands types de réactions ont été étudiés pour ces applications. La première est la réaction de fragmentation qui va être à l'origine de la stratégie dite par photocageage. Le principe est l'introduction d'un groupement photosensible particulier à un endroit crucial pour l'activité native de l'inhibiteur, le rendant inactif. Cette nouvelle molécule photocagée pourra être mise au contact de l'organisme ou des cellules de l'expérience sans en altérer le fonctionnement. Sous irradiation, la partie photosensible va réagir et fragmenter pour libérer l'inhibiteur d'origine juste à l'endroit irradié, permettant donc une inhibition locale (Figure 11).<sup>48</sup> Cette stratégie profite d'un design simple car il suffit de greffer le groupement dit photolabile à un endroit important pour l'activité de l'inhibiteur natif. Historiquement, les groupements photolabiles ont été découverts et réfléchis comme groupements protecteurs pour la synthèse car déprotégeables de manière orthogonale aux réactions usuelles.<sup>50</sup> Ce n'est que plus tard que la stratégie a été exportée pour des applications biologiques.



**Figure 11** : La stratégie par photocageage

(50) Pillai, V. N. R. Photoremovable Protecting Groups in Organic Synthesis. *Synthesis* **1980**, 1980 (1), 1–26.

Les premiers exemples de molécules photocagées ont été obtenus en plaçant la molécule d'intérêt en position benzylique d'un dérivé aromatique ou en  $\alpha$  d'un ortho-acétyltoluène (Figure 12). A ce stade, les groupements étaient relativement inefficaces et non-compatibles avec les contraintes liées au milieu biologique discutées précédemment. En particulier, les irradiations nécessaires étaient dans l'UV trop lointain.<sup>48</sup> Ces deux groupements ont été néanmoins à l'origine des deux mécanismes usuels de photocageage. En effet, un groupement oxygéné ou azoté en position benzylique d'un dérivé aromatique **[21]** peut, sous irradiation, se fragmenter sous forme d'une paire d'ions **[22]** (carbocation en position benzylique et anion correspondant sur l'oxygène ou l'azote du groupement). Cette paire d'ions peut se recombiner ou être piégée par un nucléophile, usuellement l'eau, donnant un dérivé d'alcool benzylique et le groupement hydroxy ou amine libre (Figure 12 A). Le second mécanisme de photoclivage des ortho-acétyltoluènes avec un groupement oxygéné ou azoté en  $\alpha$  **[23]** est plus complexe. Sous irradiation, on peut avoir une réaction de Norrish type II. L'état excité peut causer un transfert d'hydrogène du méthyle à la cétone, résultant en un dérivé énol  $\beta, \gamma$  insaturé **[24]** ayant perdu l'aromaticité. Cet intermédiaire obtenu peut réagir de deux manières. Il peut être attaqué par un nucléophile, usuellement l'eau ou le méthanol en solvant, conduisant à l'élimination du groupement d'intérêt et à la formation d'un dérivé ortho-hydroxyméthyle ou méthoxyméthyl-acétyltoluène **[25]**. Il peut aussi éliminer directement le groupement d'intérêt et donner un dérivé d'indanone **[26]** (Figure 12 B).<sup>51</sup>



**Figure 12** : Mécanisme de photoclivage des benzyles (A) et o-acétyltoluènes (B) <sup>51</sup>

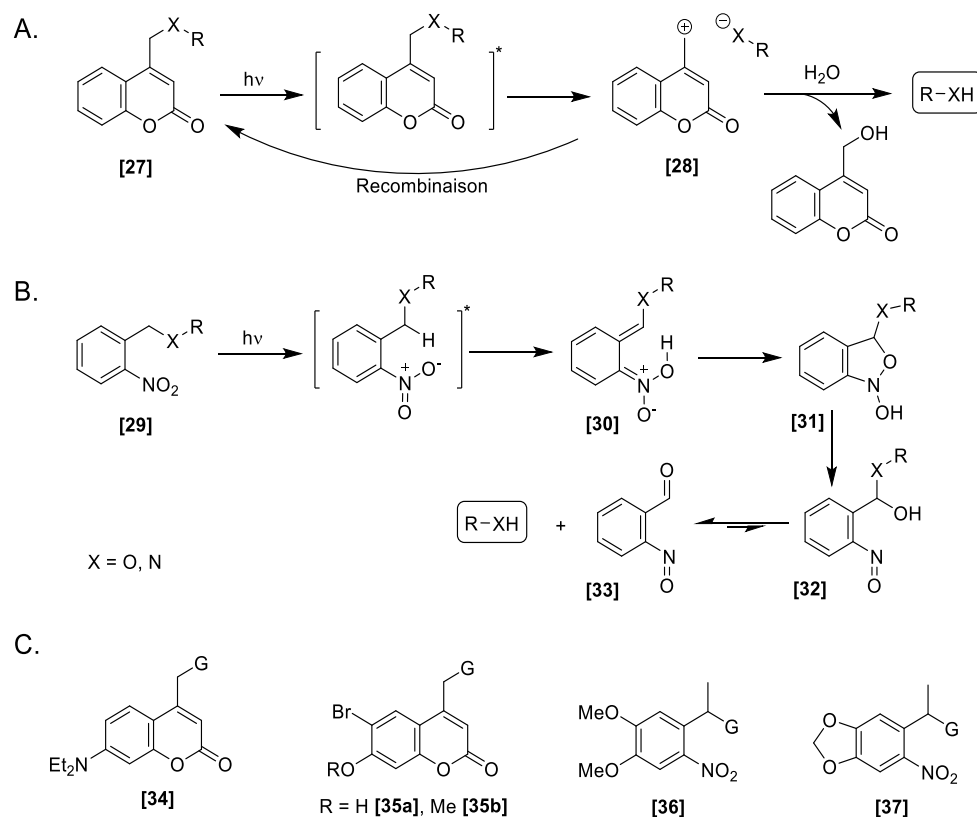
Après un effort d'optimisation des structures, des candidats robustes ont été étudiés mis en avant, avec des propriétés et réactivités adaptées pour l'utilisation en biologie. En particulier, les ortho-nitrobenzyles **[29]** substitués et les 4-méthylcoumarines **[27]** ont montré des plages d'absorbance lumineuse, et des rendements quantiques des cinétiques de fragmentation acceptables.<sup>48</sup>

Les 4-méthylcoumarines **[27]** suivent le même mécanisme de photoclivage que les benzyles simples mais sont bien plus performants. Le groupement d'intérêt placé sur le méthyle va sous irradiation être également libéré sous forme de paires d'ions **[28]**, piégé par l'eau du milieu (Figure 13 A). La synthèse des 4-méthyl-coumarines n'est néanmoins pas triviale et leur fluorescence est d'utilité ambiguë car pratique pour localiser le composé, mais perturbante pour faire de l'imagerie de fluorescence en général.<sup>52</sup> Un travail d'optimisation a permis d'améliorer grandement les propriétés d'absorbance et de rendements quantiques. La dernière génération inclut la 7-diéthylamino-4-méthylcoumarine **[34]** et les 8-bromo-7-hydroxy **[35a]** ou méthoxy-4-méthylcoumarines **[35b]** (Figure 13 C).<sup>48</sup>

Les ortho-nitrobenzyles **[29]** suivent eux un mécanisme proche de celui des *ortho*-acétyltoluènes car impliquant aussi un transfert d'hydrogène. Le groupement d'intérêt est néanmoins placé en position benzylique. L'état excité va ici causer le transfert d'hydrogène de la position benzylique à un oxygène du nitro, résultant là-encore en une perte de l'aromatisation et à la formation d'un acide azinique **[30]**. Ce dérivé va restaurer l'aromaticité par l'addition d'un oxygène de l'acide azinique sur la position benzylique, formant un dérivé bicyclique **[31]**. L'ouverture de ce cycle par élimination au niveau de l'azote va donner d'un côté un nitroso et de l'autre placer un groupement hydroxy en position benzylique. L'hémiacétal ou aminal **[32]** obtenu peut ensuite éliminer le groupement d'intérêt pour former l'aldéhyde ou la cétone correspondante **[33]** (Figure 13 B). On comprend à cette dernière étape que la nature du groupe partant va être cruciale dans la cinétique de déprotection. Pour pallier ce problème, la cinétique peut être améliorée par monométhylation de la position benzylique pour favoriser le transfert d'hydrogène à cette position et en utilisant un linker auto-immolable,  $-(CO)O-$  sous forme de carbonate ou carbamate en fonction du groupement d'intérêt pour accélérer l'élimination finale. Les nitrobenzyles actuels les plus performants portent ces améliorations ainsi que des groupements méthoxy **[36]** ou méthylènedioxy **[37]** en positions 4 et 5, présents pour leur effet sur l'absorbance et le rendement quantique.<sup>48</sup>

---

(52) Vekariya, R. H., Patel, H. D. Recent Advances in the Synthesis of Coumarin Derivatives via Knoevenagel Condensation: A Review. *Synth. Commun.* **2014**, *44* (19), 2756–2788.

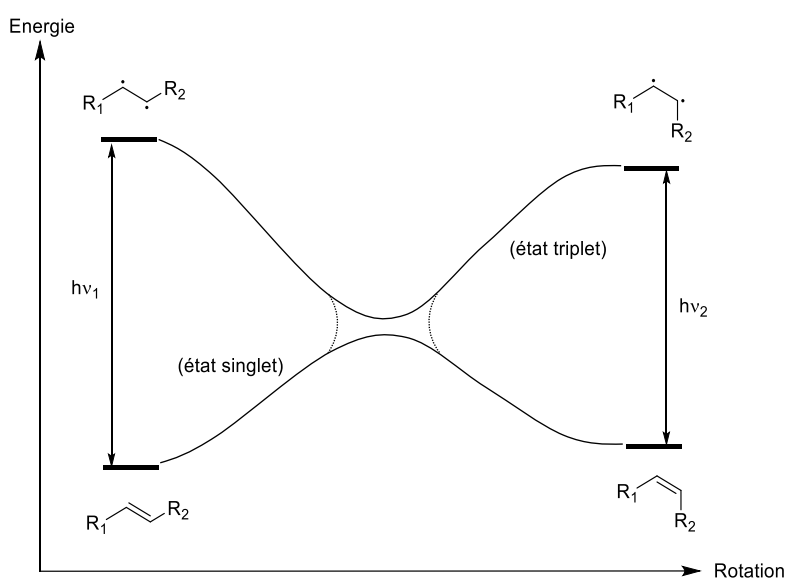


**Figure 13** : Mécanisme de photoclivage des coumarines (A) et nitrobenzyles (B) et exemples de groupements photocages récents (C) <sup>48,51</sup>

Cette stratégie a néanmoins un certain nombre de contraintes inévitables. Elle ne peut être utilisée qu'une seule fois et l'inhibition déclenchée ne peut pas être arrêtée. Les applications à des mécanismes cycliques ou réversibles sont donc exclues. De plus, la diffusion des composés dans le milieu va progressivement faire perdre en précision, les inhibiteurs libérés allant se répandre autour de la zone irradiée, engendrant un gradient d'inhibition. Le phénomène à observer doit donc être rapide par rapport à la diffusion. Néanmoins, cela reste un moyen d'inhiber localement et sur demande un phénomène biologique.

## 1.3.3 La stratégie par photocommutation

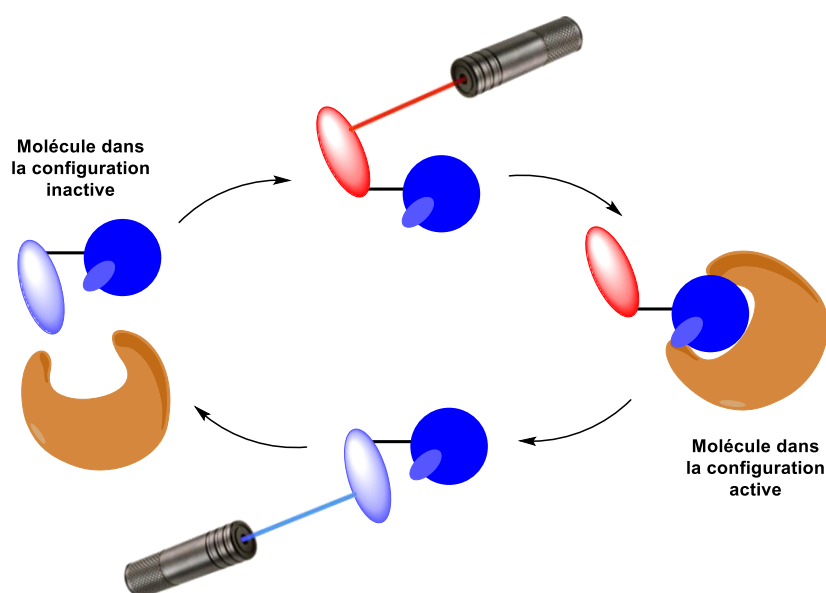
La seconde stratégie est basée sur la réaction de photoisomérisation. En effet, il est possible d'exciter une double liaison pour la faire passer dans un état triplet. Après rotation, cet état triplet peut retomber dans un état singlet de configuration différente, donnant le produit isomérisé.<sup>53</sup> Un point intéressant ici est la différence d'énergie à apporter, visible par la différence des longueurs d'onde d'excitation nécessaires, pour passer d'une géométrie *E* à *Z* ou inversement. Cela s'explique par la différence de stabilité des différentes doubles liaisons ainsi que celle de leurs états triplets respectifs (Figure 14).<sup>53</sup> La capacité à pouvoir basculer d'une géométrie à l'autre par simple choix de longueur d'onde d'irradiation apparaît comme un choix particulièrement prometteur pour le développement d'outils photocontrôlables sachant l'importance cruciale de la géométrie des molécules vis-à-vis de leurs activités biologiques.



**Figure 14** : Diagramme d'énergie de la réaction de photoisomérisation<sup>53</sup>

(53) Weiss, R. M., Warshel, A. A New View of the Dynamics of Singlet Cis-Trans Photoisomerization. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101* (20), 6131–6133.

La stratégie ici est donc le greffage d'un motif capable de photoisomérisation sur l'inhibiteur de manière à obtenir des différences d'activités entre les deux isomères. Avec un peu de chance, un isomère ne sera pas ou sera peu actif et l'autre le sera bien plus. Cela permettra de contrôler par irradiation, l'état de la molécule et donc son activité sur le système biologique à l'endroit de l'irradiation (Figure 15). Le design est ici subtil car il faut placer le groupement dit photocommutateur de manière à encombrer l'inhibiteur natif mais pas trop car il faut maintenir l'activité d'un des isomères. En pratique, cela demande beaucoup d'essais pour trouver une position adéquate et des linkers sont souvent utilisés.<sup>49</sup> Néanmoins, cette stratégie permet une activation/désactivation réversible de la molécule et donc un contrôle total en théorie.



S

**Figure 15** : La stratégie par photocommutation

Du fait des contraintes sur les longueurs d'onde utilisables en biologie, la plupart des doubles liaisons ne peuvent pas être utilisées car demanderaient des irradiations dans l'UV lointain. On trouve dans la littérature des exemples avec des dérivés de stilbènes **[38]** mais l'énorme majorité des applications sont faites avec les très performants azobenzènes **[39]** (Figure 16).<sup>49</sup> Sans substituant, le stilbène a des longueurs d'onde d'absorbance très proches entre ses formes cis et trans, rendant l'isomérisation difficile à contrôler.<sup>54</sup> Il peut aussi subir une réaction parasite d'électrocyclisation (Figure 16 A).<sup>55</sup> Les azobenzènes sont, eux, connus historiquement pour leur vive couleur et ont une capacité de photoisomérisation réversible avec des longueurs d'onde biocompatibles.<sup>56</sup> En effet, une irradiation dans le proche UV va favoriser la conversion de la forme E à la forme Z, alors qu'une irradiation dans le bleu engendre la réaction inverse (Figure 16 B). En termes de géométrie, la forme E est plane alors que la forme Z est fortement repliée, les deux noyaux phényles se faisant presque

face. En pratique, de par l'étendue des bandes d'absorption, les formes *E* et *Z* obtenues par irradiation ne sont jamais parfaitement pures. Il y a toujours une absorption partielle du photoisomère qui implique la présence de la réaction inverse. Un équilibre se forme et est nommé équilibre photostationnaire (PSS). De plus, la forme *E* étant la forme thermodynamiquement la plus stable, des conditions thermiques douces (en général à température ambiante) suffisent également pour l'obtenir.<sup>49</sup> De ce fait, la demi-vie de la forme *Z* ou du PSS correspondant est une donnée importante car elle va définir la fréquence des irradiations nécessaires pour la maintenir dans le milieu.

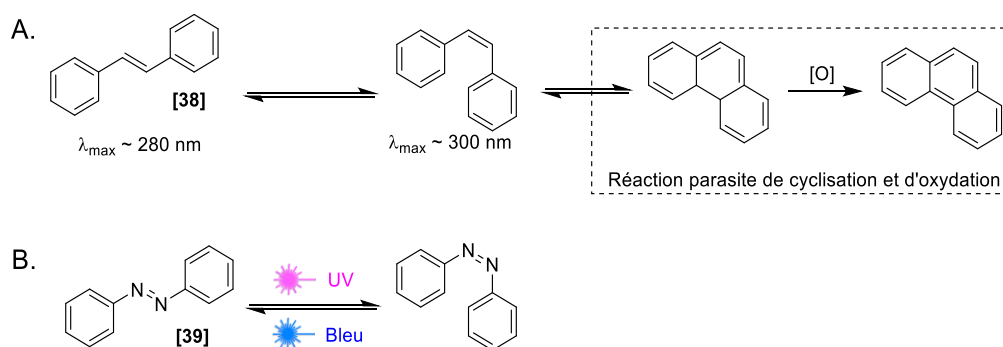


Figure 16 : Photoisomérisation du stilbène (A) et de l'azobenzène (B)<sup>49,54,55</sup>

(54) Yamashita, S. Photochemical Cis-Trans Isomerization of Stilbene. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1961**, *34* (4), 490–493.

(55) Mallory, F. B., Wood, C. S., Gordon, J. T. Photochemistry of stilbenes. III. Some aspects of the mechanism of photocyclization to phenanthrenes. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (15), 3094–3102.

(56) Griffiths, J. II. Photochemistry of Azobenzene and Its Derivatives. *Chem. Soc. Rev.* **1972**, *1* (4), 481.



## 1.4 Exemples de photocontrôle de phénomènes biologiques

## 1.4.1 Diversité des applications du photocontrôle en biologie

Ces stratégies de photocontrôle ont trouvé du succès dans le contrôle de phénomènes biologiques. Le premier exemple date de 1978. Le groupe de Hoffman a synthétisé un dérivé d'ATP photocagé et a démontré son utilisation dans des globules rouges.<sup>57</sup> Un nitrobenzyle simplement méthylé en position benzylique a été placé sur le phosphate terminal de l'ATP pour former un adduit inactif d'ATP cagé **[42]** (Figure 17). En termes de synthèse, la sélectivité de la protection sur le phosphate terminal est assurée en ajoutant un phosphate de nitrobenzyle **[41]** sur un dérivé d'ADP. L'ADP réagit avec le DCC et la morpholine pour former un dérivé morpholinophosphonate **[40]** sur lequel la substitution de la morpholine par le phosphate de nitrobenzyle **[41]** peut se produire. La déprotection sous irradiation par une lampe à mercure de l'ATP cagé **[42]** obtenu a été démontrée et atteint un palier autour de 80 % d'efficacité au bout d'environ 60 secondes (Figure 17).

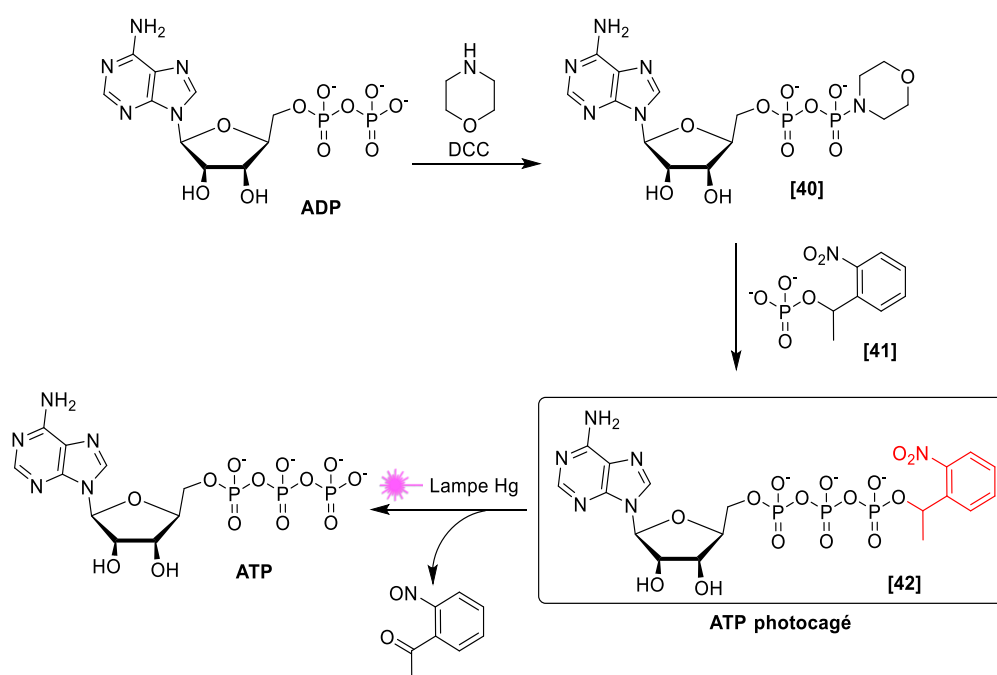


Figure 17 : Synthèse et décaageage de l'ATP photocagé<sup>57</sup>

(57) Kaplan, J. H., Forbush, B., Hoffman, J. F. Rapid Photolytic Release of Adenosine 5'-Triphosphate from a Protected Analog: Utilization by the Sodium:Potassium Pump of Human Red Blood Cell Ghosts. *Biochemistry* **1978**, *17* (10), 1929–1935.

Le nitrobenzyle non substitué ayant un maximum d'absorption autour de 270 nm, le type d'irradiation nécessaire présente des risques de lésions de l'ADN et de l'ARN. Pour pallier à cela, l'ATP photocagé a été testé biologiquement sur des globules rouges, qui étant démunis de noyau ne présentent pas ce risque. Après traitement pour éliminer l'ATP des cellules, l'ATP photocagé a été introduit. L'activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , un complexe protéique nécessitant l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie pour transporter des ions sodium et potassium à travers la membrane, a été mesurée et ce complexe protéique s'est montré inactif en présence d'ATP photocagé. Après photolyse, l'activité de la pompe et du flux de sodium ont été rétablis, montrant la libération de l'ATP dans les cellules.<sup>57</sup> Dans cet exemple, il ne s'agit pas d'une inhibition mais au contraire d'une activation par apport de substrat, les stratégies de photocontrôle n'étant pas limitées aux inhibiteurs.

Depuis ce premier exemple historique, de nombreux variants photocontrôlables de petites molécules ont été développés sur d'autres métabolites comme des acides aminés, des lipides ou des bases nucléiques, des peptides et, ce qui est d'intérêt ici, des petites molécules actives dont des produits naturels.<sup>49,58–66</sup>

- 
- (58) Goard, M., Aakalu, G., Fedoryak, O. D., Quinonez, C., St. Julien, J., Poteet, S. J., Schuman, E. M., Dore, T. M. Light-Mediated Inhibition of Protein Synthesis. *Chem. Biol.* **2005**, *12* (6), 685–693.
- (59) Anstaett, P., Pierroz, V., Ferrari, S., Gasser, G. Two-Photon Uncageable Enzyme Inhibitors Bearing Targeting Vectors. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14* (10), 1821–1825.
- (60) Karginov, A. V., Zou, Y., Shirvanyants, D., Kota, P., Dokholyan, N. V., Young, D. D., Hahn, K. M., Deiters, A. Light Regulation of Protein Dimerization and Kinase Activity in Living Cells Using Photocaged Rapamycin and Engineered FKBP. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (3), 420–423.
- (61) Arkhipova, V., Fu, H., Hoorens, M. W. H., Trinco, G., Lameijer, L. N., Marin, E., Feringa, B. L., Poelarends, G. J., Szymanski, W., Slotboom, D. J., Guskov, A. Structural Aspects of Photopharmacology: Insight into the Binding of Photoswitchable and Photocaged Inhibitors to the Glutamate Transporter Homologue. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (3), 1513–1520.
- (62) Bourbon, P., Peng, Q., Ferraudi, G., Stauffacher, C., Wiest, O., Helquist, P. Synthesis and Photochemical Behavior of Coumarin-Caged Cholesterol. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (7), 2162–2165.
- (63) Ieda, N., Yamada, S., Kawaguchi, M., Miyata, N., Nakagawa, H. (7-Diethylaminocoumarin-4-Yl)Methyl Ester of Suberoylanilide Hydroxamic Acid as a Caged Inhibitor for Photocontrol of Histone Deacetylase Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24* (12), 2789–2793.
- (64) Lemke, E. A., Summerer, D., Geierstanger, B. H., Brittain, S. M., Schultz, P. G. Control of Protein Phosphorylation with a Genetically Encoded Photocaged Amino Acid. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3* (12), 769–772.
- (65) Shao, Q., Xing, B. Photoactive Molecules for Applications in Molecular Imaging and Cell Biology. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (8), 2835.
- (66) Umeda, N., Ueno, T., Pohlmeier, C., Nagano, T., Inoue, T. A Photocleavable Rapamycin Conjugate for Spatiotemporal Control of Small GTPase Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (1), 12–14.

En 2005, les groupes de Schuman et Dore ont préparé une version photocagée de l'anisomycine **[46]**, un produit naturel inhibiteur de la peptidyl transférase, une protéine essentielle à la synthèse peptidique (Figure 18). Plusieurs groupements photolabiles ont été testés, placés sur l'azote de l'amine secondaire, et dans ce cas, c'est la coumarine **[35a]** liée par un pont carbamate qui s'est avérée la plus performante (Figure 13 C). Le photocontrôle de cette protéine a permis d'arrêter artificiellement la synthèse de protéines localement dans différents types cellulaires.<sup>58</sup>

En 2015, le groupe de Gasser a préparé des formes photocagées du lumiracoxib **[50]** et du celecoxib **[49]**, deux molécules aux propriétés anti-inflammatoires et inhibitrices de COX-2. Ces composés ont été photocagés avec des groupements nitrobenzyles particuliers car déprotégeables par irradiation à deux photons à 800 nm (Figure 18).<sup>59</sup> Cette technique ouvre la possibilité d'applications thérapeutiques car cette longueur d'onde d'irradiation peut pénétrer profondément dans les tissus sans causer de dégâts.<sup>65</sup> De plus, le caractère non linéaire de la réponse à l'irradiation à deux photons fait que l'on peut cibler plus précisément une zone dans l'espace en croisant les faisceaux de deux lasers dessus. Il a été montré dans des expériences in vitro que ces deux composés photocagés n'ont bien plus d'activité sur COX-2 et la récupèrent après irradiation par laser pulsé à 800 nm, montrant le décaage efficace à deux photons.<sup>59</sup>

Les groupes de Karginov et d'Inoue ont tous deux synthétisés deux différentes rapamycines photocagées avec des groupements nitrobenzyles substitués. La rapamycine est un produit naturel complexe qui stimule l'hétérodimérisation des protéines FKBP et FRB.<sup>60,66</sup> Cette interaction peut être exploitée pour déclencher ou arrêter différents mécanismes biologiques. Le groupe de Karginov a préparé une protéine de fusion avec FKBP et la kinase FAK, placée de manière à ce que cette kinase perde son activité mais à ce que celle-ci soit restaurée lorsque la partie FKBP est complexée à FRB. Cette construction astucieuse permet de réguler l'activité de la kinase à travers la complexation entre FKBP et FRB, complexation elle-même régulée par la présence de la rapamycine. La rapamycine photocagée **[47]** (Figure 18) a pu être utilisée pour activer l'activité de la kinase FAK dans des cellules humaines HEK293T, visible par l'apparition de protrusions à leur surface.<sup>60</sup> Le groupe d'Inoue a, quant à lui, préparé des protéines de fusion entre FKBP et différentes Rho GTPases de manière à ce que chaque partie de la protéine maintienne son activité native, ainsi qu'une variante de FRB allant se localiser sur les membranes. La rapamycine va ici favoriser l'assemblage entre les parties FKBP et FRB et donc accumuler les Rho GTPases au niveau des membranes. En utilisant la rapamycine photocagée, il a été possible d'accumuler les Rho GTPases au niveau de parties de la membrane de cellules HeLa grâce à une irradiation locale avec des LEDs 365 nm. Cette activité est visible par la formation de plissements au niveau des zones irradiées.<sup>66</sup>

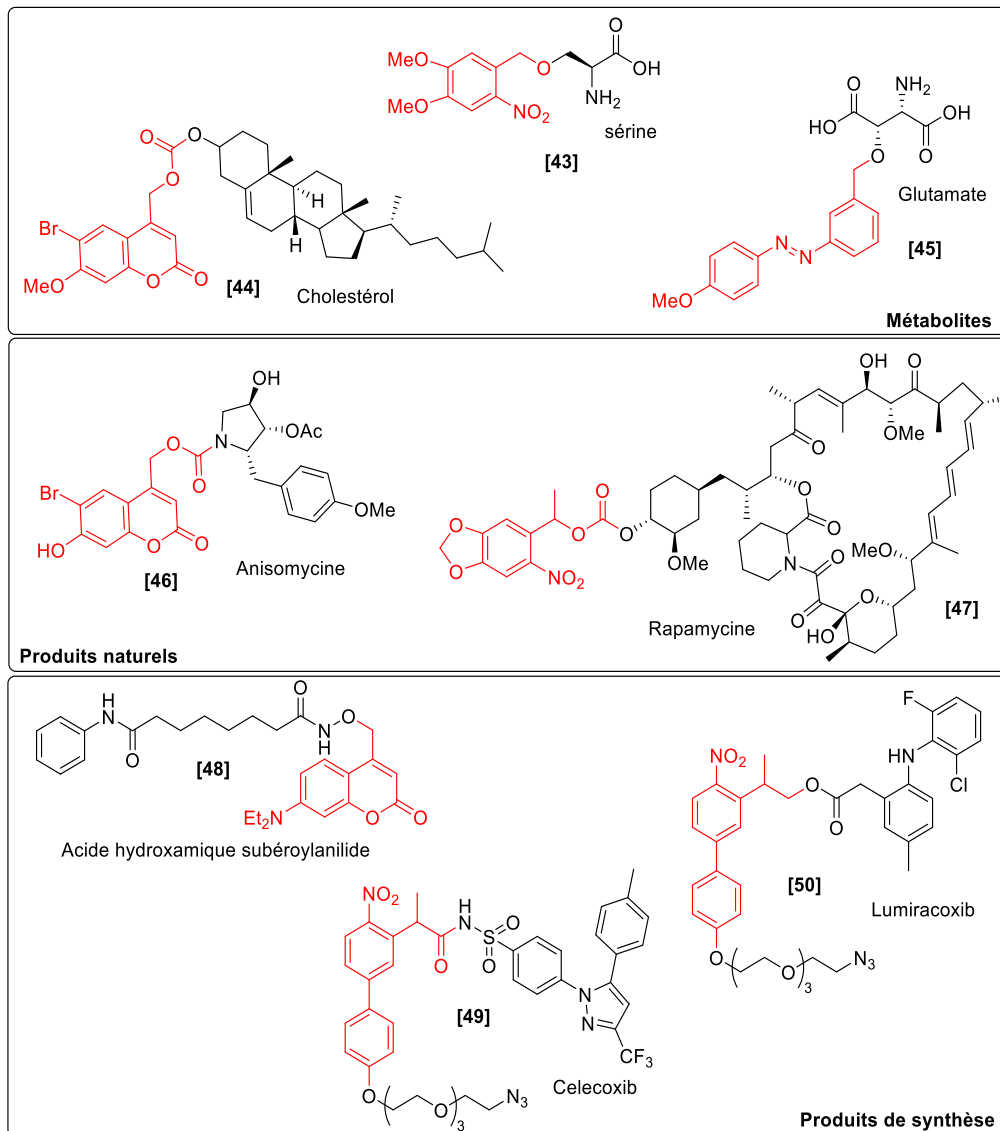


Figure 18 : Exemples de dérivés photocontrôlables<sup>58-64</sup>

#### 1.4.2 Applications du photocontrôle sur le cytosquelette

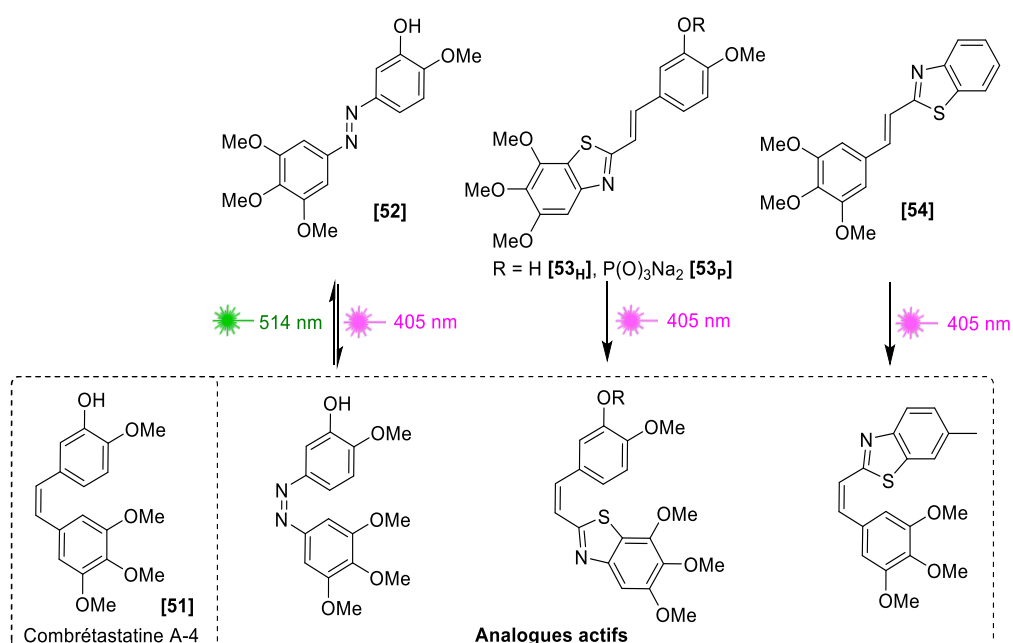
En ce qui concerne le cytosquelette, les stratégies de photocontrôle ont récemment été utilisées pour en réguler certains aspects. Les groupes de Trauner et de Thorn-Seshold ont notamment développé plusieurs molécules photocommutatrices pour contrôler les réseaux d'actine et de microtubules.

Les premiers travaux en 2015 se basent sur une coïncidence intéressante qu'est la structure de la combretastatine A-4 [51], un inhibiteur de la polymérisation de la tubuline (Figure 19). En effet, cette molécule est un stilbène Z substitué et apparaît donc comme un candidat idéal pour préparer un inhibiteur photocommutateur. Une première forme a été faite en remplaçant simplement le pont éthylène du stilbène par un pont diazo pour former une variante azobenzène [52], conservant les substituants à leurs emplacements natifs (Figure 19). Cette variation a permis une capacité de photoisomérisation par irradiation dans le visible. En plus, l'activité biologique de la forme Z est ici environ 80 fois meilleure que celle de la forme E. La possibilité d'utiliser ce composé pour le photocontrôle des réseaux de microtubules a été montrée sur des cellules de cancer du sein. Dans le noir, le réseau de microtubules de cellules incubées avec le composé dans sa forme native E reste intact, montrant l'inactivité mais sous irradiation violette, on peut observer la désagrégation des filaments, effet résultant de l'isomérisation en la forme Z active. Une expérience in vivo sur des embryons de *Caenorhabditis elegans* a montré la possibilité de contrôler le cycle cellulaire, étant donné le rôle crucial des microtubules dans ce processus. Après incubation avec la combretastatine photocommutatrice [52], l'irradiation en lumière violette d'une cellule entrant en métaphase la fige dans cet état. Cela résulte de la disparition des filaments de microtubules, nécessaires pour la faire passer dans l'anaphase, par l'action de la molécule sous la forme Z active. En irradiant ensuite cette même cellule en lumière verte, la cellule reprend sa division. La molécule repassant en forme E inactive à cette concentration, les réseaux de microtubules peuvent se reformer et faire progresser la division cellulaire.<sup>67</sup>

---

(67) Borowiak, M., Nahaboo, W., Reynders, M., Nekolla, K., Jalinet, P., Hasserodt, J., Rehberg, M., Delattre, M., Zahler, S., Vollmar, A., Trauner, D., Thorn-Seshold, O. Photoswitchable Inhibitors of Microtubule Dynamics Optically Control Mitosis and Cell Death. *Cell* **2015**, *162* (2), 403–411.

En 2022, d'autres analogues de la combrétastatine basés sur des stilbènes portant un thiazole ont été préparés. Ces groupements ont été introduits pour pallier un problème intrinsèque des azobenzènes qu'est leur dégradation progressive en milieu biologique. En effet, les azobenzènes subissent différentes formes de dégradation dont la réduction par le glutathion en milieu biologique, fermant la possibilité de les utiliser pour des applications thérapeutiques.<sup>68</sup> Ils restent néanmoins parfaitement adéquats pour des applications académiques. Ces stilbènes particuliers sont parfaitement stables en milieu biologique et ont montré des propriétés de photoisomérisation particuliers car l'isomérisation *E* vers *Z* est faisable sous irradiation dans le proche UV ou en lumière violette mais l'isomérisation inverse n'est pas faisable en pratique par irradiation en raison du recouvrement des bandes d'absorption. Ces groupements ouvrent donc la possibilité d'une activation non réversible par la lumière, stratégie ressemblant à un photocageage mais s'affranchissant du sous-produit. Une grande quantité de variantes de la combrétastatine A-4 [51] ont été préparées pour finalement trouver deux candidats [53<sub>H</sub>] & [54] avec des différences d'activité exploitables (respectivement 31 et 200 fois plus efficaces sous irradiation que sous la forme *E* native) (Figure 19). Après incubation de cellules HeLa avec une forme hydrosoluble d'un de ces composés [53<sub>p</sub>], une irradiation locale a permis d'observer le désassemblage des réseaux de microtubules dans la zone irradiée (Figure 19).<sup>68</sup>



**Figure 19** : Analogues photocontrôlables de la combrétastatine A-4<sup>67,68</sup>

(68) Gao, L., Meiring, J. C. M., Varady, A., Ruider, I. E., Heise, C., Wranik, M., Velasco, C. D., Taylor, J. A., Terni, B., Cabernard, C. C., Llobet, A., Steinmetz, M. O., Distel, M., Thorn-Seshold, J., Akhmanova, A., Thorn, O. In Vivo Photocontrol of Microtubule Dynamics and Integrity, Migration and Mitosis, by the Potent GFP-Imaging-Compatible Photoswitchable Reagents SBTubA4P and SBTub2M. **2022**, *114* (12), 5614-5628.

Une stratégie plus classique de photocommutateurs a également été réalisée pour le contrôle des microtubules. Des groupements photocommutateurs ont été ajoutés sur le paclitaxel [55] et sur l'épothilone [56], deux stabilisateurs des microtubules (Figure 20).<sup>69,70</sup>

Le paclitaxel [55] porte un phényle à une extrémité, position propice pour l'attachement d'un azobenzène. Après synthèse de différents variants avec des orientations ortho, méta ou para de l'azobenzène ainsi que différents substituants, les activités biologiques des formes *E* natives et des formes *Z* induites par irradiation dans le proche UV ont été mesurées. Le meilleur résultat donne un facteur 5.8 d'activité entre les deux formes, la forme *Z* étant ici la forme active. Cette valeur est modeste mais toutefois utilisable. Le paclitaxel photocommutateur choisi [57] a été utilisé pour contrôler les dynamiques des microtubules (Figure 20). Sur des cellules HeLa incubées avec le composé, la polymérisation des microtubules cesse après irradiation à 405 nm. Sous l'effet du composé actif, la stabilisation des microtubules arrête le phénomène de treadmilling présent également avec la tubuline en empêchant la dépolymérisation. L'absence de monomères disponibles va arrêter la polymérisation. L'isomérisation *Z* vers *E* par voie thermique étant de l'ordre de la centaine de secondes donc rapide pour ce composé, plusieurs cycles d'interruption des dynamiques des microtubules ont pu être réalisés sur les mêmes cellules en répétant irradiation puis redémarrage progressif du treadmilling. Ce composé a également été utilisé pour contrôler les microtubules avec une précision subcellulaire en irradiant des segments d'axone de neurones de rats, montrant la possibilité d'observer les dynamiques du cytosquelette à cette précision.<sup>69</sup>

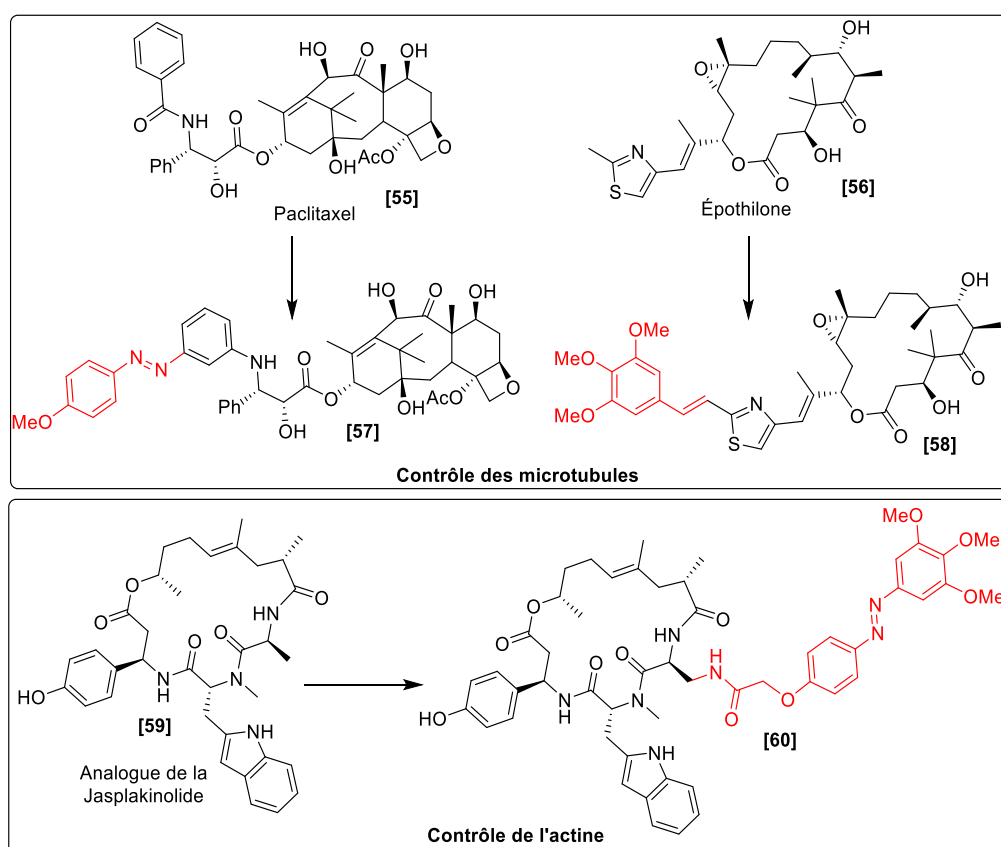
L'épothilone porte quant à elle un thiazole à une extrémité, emplacement très propice pour le placement d'un stilbène. Le composé photoactivable [58] résultant a été caractérisé et la forme *Z* est significativement plus active que la *E* (Figure 20). De manière similaire à l'exemple précédent, les dynamiques de la tubuline ont pu être interrompues dans des cellules HeLa préalablement incubées avec le composé [58] par une irradiation à 405 nm.<sup>70</sup> Ces exemples montrent la capacité de contrôler avec une excellente précision les dynamiques des microtubules dans les cellules.

---

(69) Müller-Deku, A., Meiring, J. C. M., Loy, K., Kraus, Y., Heise, C., Bingham, R., Jansen, K. I., Qu, X., Bartolini, F., Kapitein, L. C., Akhmanova, A., Ahlfeld, J., Trauner, D., Thorn-Seshold, O. Photoswitchable Paclitaxel-Based Microtubule Stabilisers Allow Optical Control over the Microtubule Cytoskeleton. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 4640.

(70) Gao, L., Meiring, J. C. M., Heise, C., Rai, A., Müller-Deku, A., Akhmanova, A., Thorn-Seshold, J., Thorn-Seshold, O. Photoswitchable Epothilone-Based Microtubule Stabilisers Allow GFP-Imaging-Compatible, Optical Control over the Microtubule Cytoskeleton\*\*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61* (10), e202114614.

La stratégie photocommutateur a également été mise en œuvre pour le contrôle des dynamiques du réseau d'actine à partir d'un analogue de la jasplakinolide [59]. Ce produit a une activité de stabilisation de filaments d'actine et va donc interférer avec les dynamiques de treadmilling de ces derniers. Un azobenzène est cette fois-ci attaché par l'intermédiaire d'un linker à une position connue pour ne pas trop perturber l'activité biologique. Après caractérisation de huit variantes synthétisées, deux d'entre elles ont une différence d'activité exploitable et l'une de ces deux a une demi-vie de retour à la forme *E* par voie thermique bien trop courte en conditions physiologiques. Le composé photocommutateur [60] finalement retenu a été utilisé pour contrôler les réseaux d'actine au niveau cellulaire. Ici encore, c'est la forme *Z* qui est la plus active. Des cellules HeLa ont été incubées avec le composé et montrent des réseaux d'actine intacts. Après irradiation à 390 nm, on observe une dénaturation des réseaux d'actine par l'isomère *Z* formé. Ces mêmes cellules sont ensuite irradiées à 475 nm, reformant l'isomère *E* et engendrant la reformation des réseaux d'actine. Cela montre la réversibilité du photocontrôle.<sup>71</sup>



**Figure 20 :** Exemples de molécules photocommutatrices pour le contrôle du cytosquelette<sup>68,69,71</sup>

(71) Borowiak, M., Küllmer, F., Gegenfurtner, F., Peil, S., Nasufovic, V., Zahler, S., Thorn-Seshold, O., Trauner, D., Arndt, H.-D. Optical Manipulation of F-Actin with Photoswitchable Small Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (20), 9240–9249

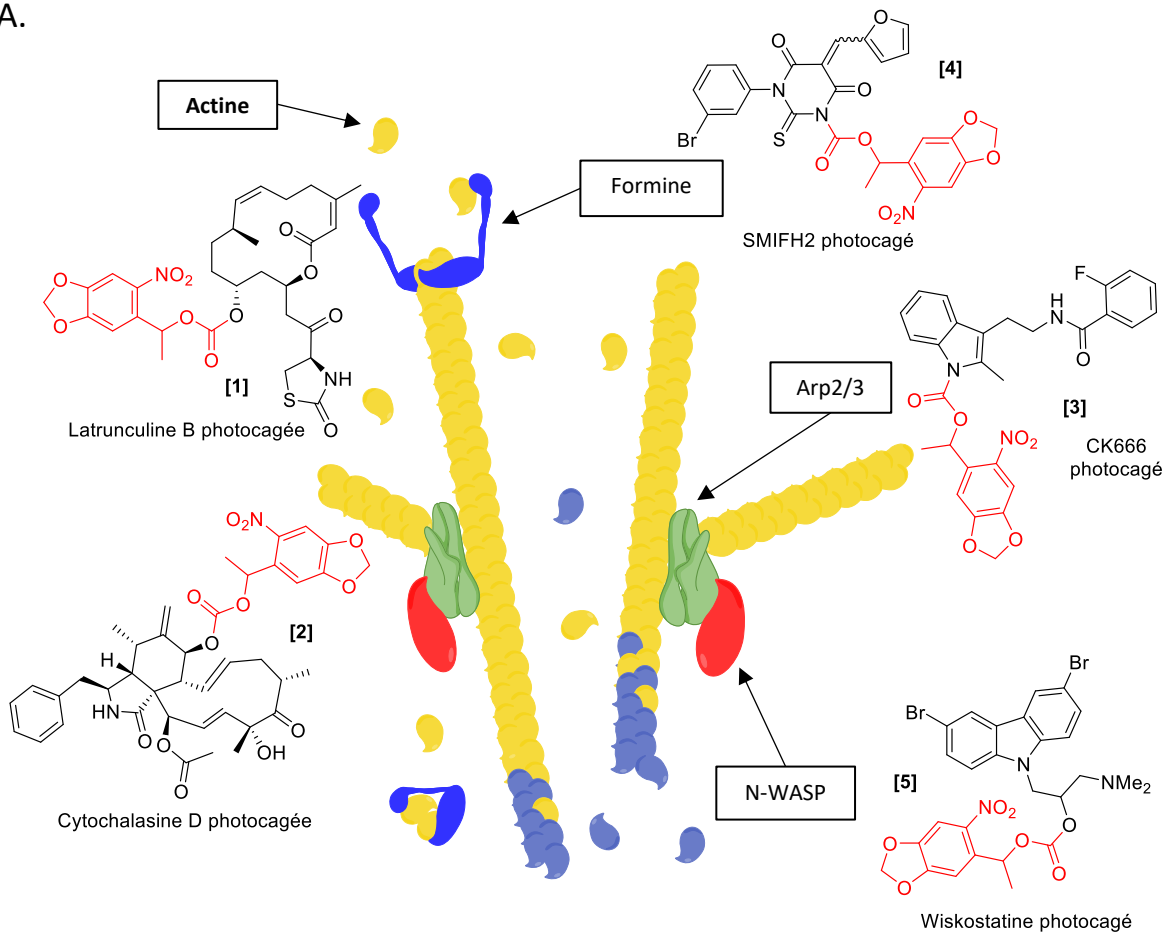


### 1.5 Objectif du projet de thèse

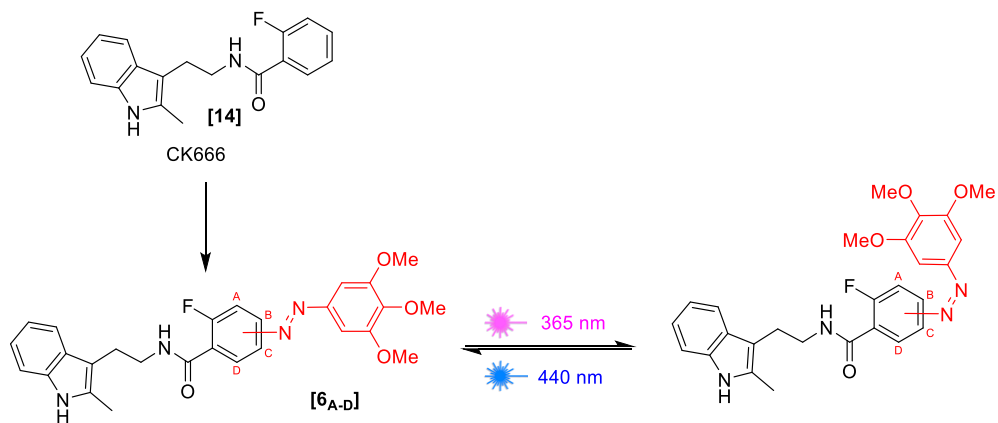
Ce projet de thèse s'inscrit dans la continuité de ces travaux sur le contrôle du cytosquelette en explorant la possibilité de créer de nouveaux inhibiteurs photocagés et photocommutateurs pour le contrôle des dynamiques de l'actine. En particulier, l'objectif est de mettre en place une bibliothèque d'inhibiteurs photocontrôlables de l'actine mais aussi de ses protéines partenaires, de manière à obtenir un contrôle précis sur chaque aspect des mécanismes liés à l'actine (Figure 21 A). Une sélection de cibles intéressantes parmi de nombreux produits naturels ou produits de synthèse inhibiteurs de l'actine ou de ses protéines partenaires a été faite et des formes photocagées correspondantes ont été envisagées. Du fait de l'intérêt particulier pour les mécanismes liés à Arp2/3, le promoteur de ramifications, un travail plus fourni a été porté sur un de ses inhibiteurs : le CK666 [14]. Des formes photocommutatrices de cette molécule ont été envisagées (Figure 21 B).

Ce manuscrit présente l'avancée de cette bibliothèque d'inhibiteurs photocagés ainsi que le développement des variants photocommutateurs du CK666 [14]. En première partie, l'avancée de la synthèse totale d'une latrunculine B photocagée [1] pour le contrôle direct sur la polymérisation de l'actine est présentée. En seconde partie, le travail réalisé sur CK666 est décrit. La synthèse des variants photocagés et photocommutateurs de cet inhibiteur ainsi que leurs applications en biologie sont détaillées. En dernière partie, les synthèses de variants photocagés d'autres inhibiteurs sont également présentés. Cette partie regroupe le travail portant sur le SMIFH2 [18], inhibiteur des formines responsables de la croissance des filaments, sur la wiskostatine [16], inhibiteur de N-WASP (activateur de Arp2/3) et sur la cytochalasine D [10], un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, orthogonal à la latrunculine B [8].

A.



B.



**Figure 21 :** (A) Bibliothèque d'inhibiteurs photocagés envisagée (B) Stratégie par photocommution appliquée au CK666



---

2<sup>ème</sup> Partie :  
Vers la synthèse totale d'une  
latrunculine B photocagée

---



## 2<sup>ème</sup> Partie : Vers la synthèse totale d'une latrunculine B photocagée

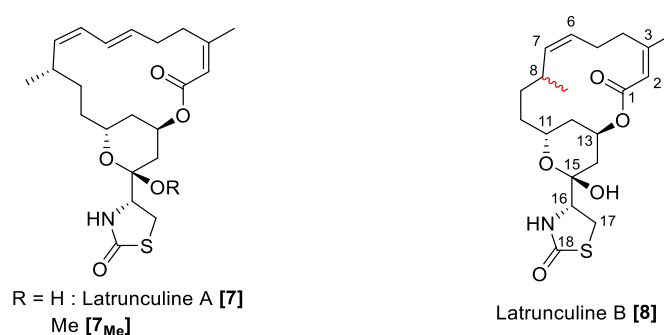
### 2.1 Introduction

#### 2.1.1 Les produits naturels, source de molécules biologiquement actives

L'optimisation par l'évolution fait que les produits actifs trouvés dans la nature sont en général très performants et sélectifs de leurs cibles, rendant particulièrement prometteuses leurs applications. A la première difficulté qu'est l'extraction de ces produits complexes, s'ajoute celle de leur identification et leur caractérisation. En effet, les produits naturels complexes sont souvent présents en quantités infimes (< 1% en masse sèche), mettant au défi la précision des méthodes d'analyse. C'est face à ce problème que la synthèse totale trouve son intérêt. La synthèse, c'est produire de manière fiable des composés de structure connue. Cela permet dans un premier temps d'identifier des produits naturels isolés en comparant leurs données analytiques avec celles des produits synthétisés de structure connue. La synthèse totale, c'est aussi après optimisation, la possibilité de préparer des quantités suffisantes de matière pour permettre des applications à plus grande échelle. En particulier, des tests biologiques ou de toxicologie sur cellules requièrent quelques milligrammes en général alors que sur des organismes entiers (souris, plantes,...), il faut plutôt quelques centaines de milligrammes. Toute application de type pharmacologique nécessitera aussi d'accroître ces quantités de plusieurs ordres de grandeur. Finalement, développer la synthèse totale d'une molécule c'est aussi obtenir une expertise de sa préparation à travers la connaissance des propriétés et de la réactivité de chaque intermédiaire. On peut s'appuyer sur cette connaissance pour préparer des variétés d'analogues et de ce fait explorer des activités biologiques annexes au composé d'origine ou pour l'adapter sous forme d'outil moléculaire plus complexe. Pour résumer, la synthèse totale de produits naturels remplit trois rôles : d'abord aider à identifier, puis rendre disponible et finalement faire varier la structure pour aller plus loin dans les applications.

## 2.1.2 Découverte et identification des latrunculines

L'histoire de la latrunculine B illustre parfaitement cette démarche. En 1980, le groupe de Kashman identifie deux molécules à partir de l'éponge marine *Negombata magnifica*, qui furent nommées latrunculines A [7] et B [8].<sup>72</sup> Une attention particulière avait déjà été portée à cette espèce car il avait été observé qu'elle n'était jamais prédatée par les poissons. Quand pressée, elle libérait une huile rouge qui les faisait fuir immédiatement. Un contact prolongé avec cette huile engendre de graves effets sur les organismes. En particulier, il a été observé que lorsque l'on presse cette éponge dans un aquarium, ses poissons y meurent en quelques minutes.<sup>72</sup> Le groupe de Kashman a purifié des extraits de *Negombata* pour isoler les deux latrunculines, des huiles, dont une bonne partie des structures ont pu être déterminées par l'interprétation des spectres RMN, de masse et d'infrarouge. Après méthylation de la latrunculine A, un solide [7<sub>Me</sub>] a pu être cristallisé, permettant d'obtenir la structure exacte par diffraction des rayons X (Figure 22).<sup>72</sup> Il a pu être déterminé que les latrunculines portent trois cycles : un hétérocycle 2-thiazolidinone, un hémiacétal cyclique central et une macrolactone. La taille du macrocycle est à 16 chaînons pour la latrunculine A et 14 pour la B. Les deux latrunculines présentent également deux alcènes Z dans le macrocycle dont un en  $\alpha,\beta$  de l'ester. Cinq centres chiraux sont présents : en  $\alpha$  de l'azote dans l'hétérocycle, 3 dans le cycle de l'hémiacétal et un méthyle dans le macrocycle. En raison des similarités dans les données RMN, la quasi-totalité de ces centres ont pu être attribués également sur la latrunculine B (Figure 22). Néanmoins, la configuration du méthyle reste incertaine et il manque une preuve concrète pour pouvoir la confirmer. Elle sera établie grâce à la première synthèse totale réalisée par l'équipe de Smith en 1986.<sup>73</sup>



**Figure 22** : Structure de la latrunculine A et structure incomplète de la latrunculine B<sup>72</sup>

(72) Kashman, Y., Groweiss, A., Shmueli, U. Latrunculin, a New 2-Thiazolidinone Macrolide from the Marine Sponge *Latrunculia Magnifica*. *Tetrahedron Lett.* **1980**, 21 (37), 3629–3632.

(73) Zibuck, Regina., Liverton, N. J., Smith, A. B. Total Synthesis of (+)-Latrunculin B. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108 (9), 2451–2453.

Les latrunculines étaient déjà connues pour leur capacité à altérer les microfilaments mais ce n'est que plus tard en 1987 que l'activité précise de la latrunculine A a été démontrée.<sup>74,75</sup> Le groupe de Korn a mesuré l'inhibition directe de la polymérisation de l'actine in vitro sur de l'actine purifiée, ne laissant plus aucun doute sur la cible de la molécule. Il montra aussi l'existence de complexes 1:1 entre la latrunculine A et la G-actine, ce qui laisse penser que l'inhibition de la polymérisation se fait par séquestration des monomères d'actine, ces complexes ne pouvant pas polymériser.<sup>75</sup> Une étude comparative entre les deux latrunculines et la cytochalasine D, un autre inhibiteur de la polymérisation de l'actine déjà bien connu à l'époque, a montré que les latrunculines A et B avaient des activités similaires, toutes deux plus performantes que la cytochalasine D sur les cellules.<sup>28</sup> Il était difficile à cette époque de rationaliser la forte activité des latrunculines dans les cellules même à des concentrations faibles d'environ 0.5  $\mu\text{M}$ .<sup>28</sup> En effet, il était connu que l'actine y était présente à des concentrations atteignant les 100  $\mu\text{M}$ . Les latrunculines formant des complexes 1:1 avec la G-actine, à 0.5  $\mu\text{M}$  de concentration, elles pouvaient former au plus 0.5  $\mu\text{M}$  de complexes inactifs, ce qui ne devrait pas a priori avoir un effet significatif.<sup>75</sup> Le rôle de protéines partenaires comme la profiline qui rendent inaccessibles une immense majorité de la G-actine en solution n'a été compris que plus tard.<sup>19</sup> C'est en raison de la présence effective de très peu de G-actine libre dans les cellules que l'activité drastique des latrunculines s'explique. La très forte affinité des latrunculines pour la G-actine fait qu'elles peuvent séquestrer le peu d'actine libre qu'il reste en solution dans les cellules.

---

(74) Spector, I., Shochet, N. R., Kashman, Y., Groweiss, A. Latrunculins: Novel Marine Toxins That Disrupt Microfilament Organization in Cultured Cells. *Science* **1983**, *219* (4584), 493–495.

(75) Coué, M., Brenner, S. L., Spector, I., Korn, E. D. Inhibition of Actin Polymerization by Latrunculin A. *FEBS Lett.* **1987**, *213* (2), 316–318.



## 2.1.3 Synthèse totale de Smith (1986)

Seulement six ans après la découverte des latrunculines, le groupe de Smith publie la première synthèse totale de la latrunculine B.<sup>73</sup> Cette synthèse a permis de finalement valider la structure et confirme que toutes les configurations des centres chiraux sont bien les mêmes que sur la latrunculine A. En termes de stratégie, la synthèse de Smith s'articule autour de trois étapes clefs. La partie thiazolidinone a d'abord été déconnectée du reste de la molécule. En effet, le degré d'oxydation en C15, équivalent à la cétone, et la présence d'un alcool chiral en C13 laissent envisager la formation de la liaison C13 – C14 par réaction d'aldolisation. Cela fait apparaître un premier fragment **[62]** portant cet hétérocycle et une méthylcétone en C15 (Figure 23). Le reste de la molécule consiste en le macrocycle allant des carbones C1 à C13. Ce dernier a été fragmenté en deux points. D'une part, l'alcène Z en C6 – C7 pourra être formé par réaction de Wittig, la sélectivité Z sera assurée par l'absence de stabilisation de l'ylure de phosphonium. D'autre part, l'ester en C1 est une position propice pour effectuer une déconnection grâce à la flexibilité des possibilités de sa formation. En effet, cela permet de s'affranchir du contrôle de la configuration absolue de l'alcool en C13, l'estérification pouvant se faire avec rétention de cette dernière ou avec inversion par une réaction de substitution nucléophile S<sub>N</sub>2. Ces deux dernières déconnections font apparaître deux fragments : **[65<sub>o</sub>]** portant la chaîne C7 – C13 et **[72]** portant la chaîne C1 à C6 (Figure 23).

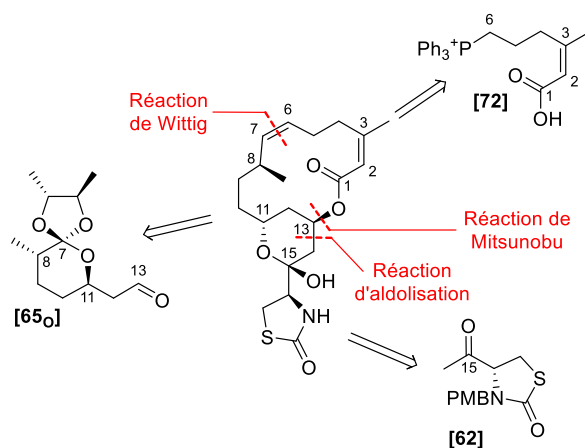


Figure 23 : Principales déconnections de la synthèse de Smith<sup>73</sup>

La partie hétérocyclique est préparée rapidement à partir d'une thiazolidinone **[61]** dérivée de la L-cystéine, profitant ainsi du pool chiral pour apporter ce premier centre asymétrique. Après protection de l'azote avec un groupement PMB, une séquence d'hydrolyse de l'ester et d'addition d'une combinaison de méthyllithium et de bromure de méthylmagnesium permet d'obtenir la méthylcétone **[62]** avec un rendement global de 30 % (Figure 24).

La chaîne C7 – C13 porte deux centres chiraux et va être préparée à partir de la 2-allylcyclopentanone **[63]**. Après une oxydation de Bayer-Villiger et la méthylation en  $\alpha$  de la lactone formée **[64]**, un dérivé cyclique portant le méthyle en C8 et un allyle dérivatisable en C11 est obtenu sous forme de mélange racémique de deux diastéréoisomères *cis* et *trans*. En synthétisant l'orthoester à partir du (+)-(2R, 3R)-2,3 butanediol, le diastéréoisomère souhaité **[65<sub>CH2</sub>]** parmi les quatre obtenus a pu être séparé. L'ozonolyse de l'allyle donne quantitativement l'aldéhyde **[65<sub>O</sub>]**, le second fragment étant obtenu avec un rendement global de 42 % (Figure 24).

Ces deux premiers fragments ont été couplés par la réaction d'aldolisation, donnant la  $\beta$ -hydroxy cétone **[66]**. En simples conditions basiques avec plusieurs équivalents de LiHMDS, un rapport diastéréoisomérique de 4:1 est obtenu. Cela a pu être amélioré en 3:1 en formant intermédiairement l'énolate de zinc mais aucun effort supplémentaire n'a été fait pour améliorer la sélectivité. En effet, le mélange de diastéréoisomères **[66]** a été engagé directement dans une méthanolyse acide. Dans cette étape, l'orthoester est rompu, le cycle tetrahydrogénéopyrane est formé sous forme d'acétal de méthyle et le carbone C13 est isomérisé en configuration (S), palliant au problème de sélectivité de l'étape précédente. Cette configuration en C13 est inverse à celle voulue sur la latrunculine B **[8]** mais pourra être inversée à l'étape de macrolactonisation par une réaction de Mitsunobu. Après protection de l'alcool avec un groupement TBS, l'ester en C7 **[67<sub>TBS</sub>]** est réduit en l'aldéhyde **[68]** avec le DiBALH en préparation de la réaction de Wittig avec le dernier fragment (Figure 24).

Ce dernier fragment **[72]** portant les carbones 1 à 6 est préparé en 5 étapes à partir du 5-chloropentyne **[71]**. Cette courte synthèse forme l'ester  $\alpha,\beta$  insaturé de configuration Z par une séquence d'addition de l'alcyne sur le chloroformiate de méthyle pour obtenir l'ester en C1 suivie d'une addition 1,4 d'un cuprate de méthyle pour donner l'alcène Z en C2 – C3. Le fragment **[72]** est finalement obtenu après hydrolyse de l'ester et substitution du chlorure en C6 par la triphénylphosphine (par l'intermédiaire de l'iodure) avec un rendement global de 54 % (Figure 24).

La réaction de Wittig entre ce dernier fragment **[72]** et l'aldéhyde précédent **[68]** s'avère effectivement Z-sélective, résultat prévu par l'absence de stabilisation de l'ylure de phosphonium, et fournit l'alcène **[69<sub>TBS</sub>]** avec un rendement de 81 % (Figure 24). Après déprotection du groupement TBS, la fermeture du macrocycle par lactonisation de Mitsunobu permet l'inversion du centre chiral en C13

et la finalisation de la construction du squelette de la latrunculine B. L'intermédiaire protégé **[70]** est un solide cristallin, permettant à ce stade la réalisation d'une analyse de diffraction des rayons X pour confirmer la structure exacte du produit synthétisé. La latrunculine B **[8]** est finalement obtenue après la déprotection du groupement PMB et l'hydrolyse de l'acétal de méthyle. Ces analyses correspondent à celles du produit naturel extrait et en confirment sa structure.<sup>73</sup>

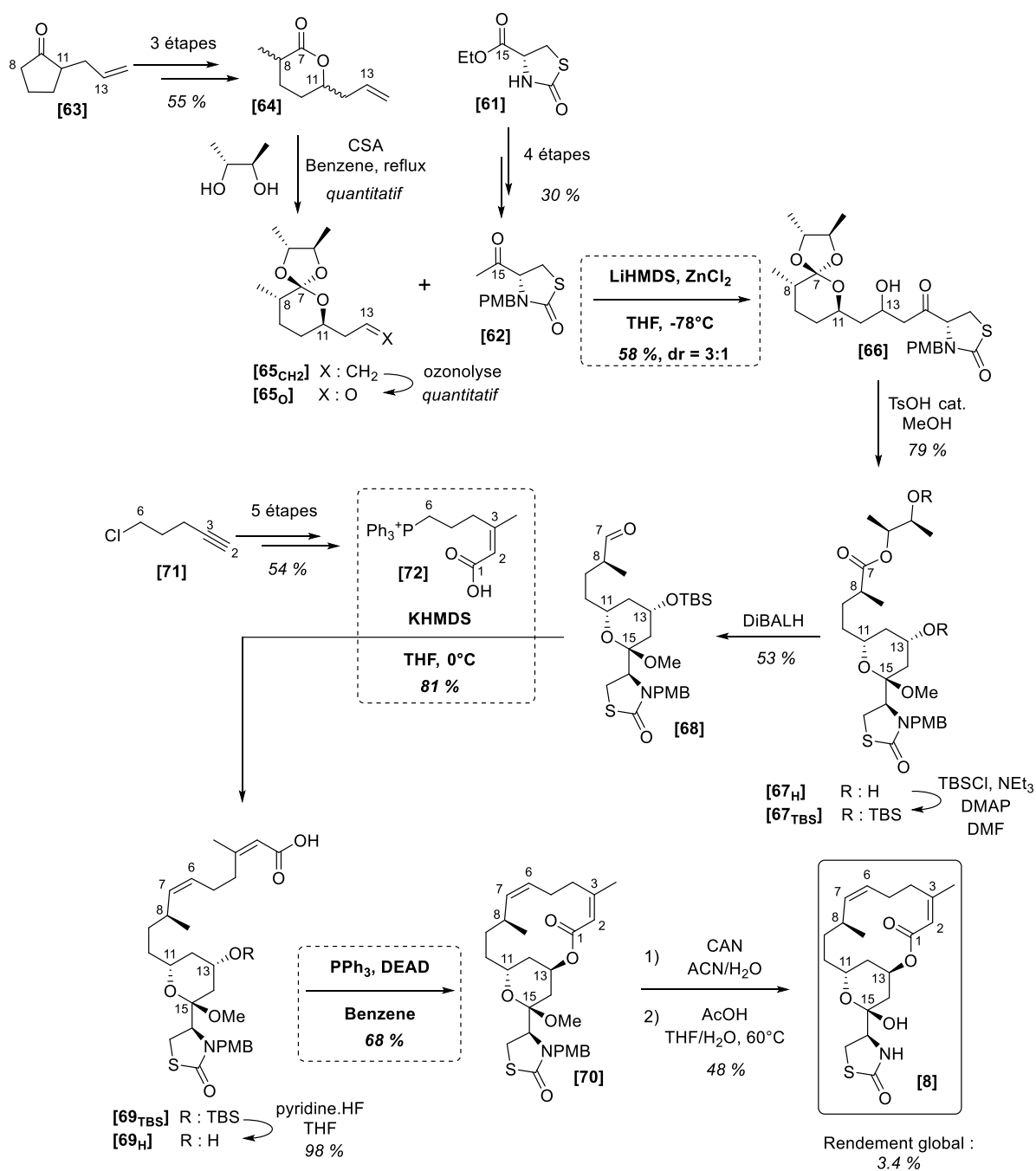
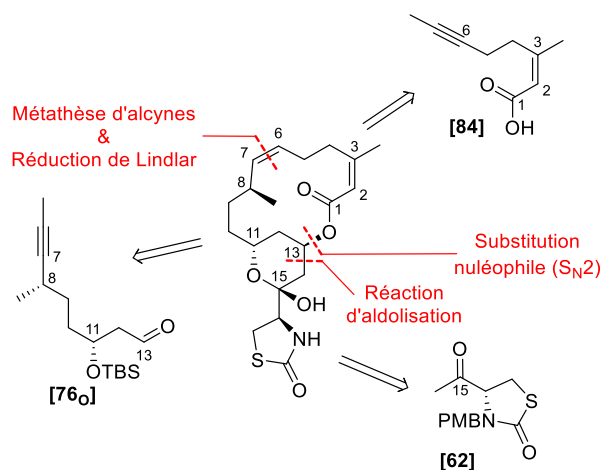


Figure 24 : Principales déconnexions de la synthèse de Smith<sup>73</sup>

## 2.1.4 Synthèse totale de Fürstner (2003)

Désormais considéré comme un nouvel outil fiable pour inhiber la polymérisation de l'actine dans les cellules, les latrunculines gagnent en intérêt. Les latrunculines peuvent toujours être isolées à partir de *Negombata* mais ce procédé reste complexe et cela se traduit par le prix très élevé des molécules chez les fournisseurs : 100 – 400 € pour 0.1 mg de latrunculine A ou pour 1 mg de latrunculine B (gamme de prix comparant Merck, Tocris Bioscience et Enzo Life Science en 2022). Il y a donc un besoin d'obtenir une synthèse efficace pour les latrunculines. En 2003, l'équipe de Fürstner publie une nouvelle synthèse totale de la latrunculine B.<sup>76</sup> Cette nouvelle synthèse s'articule de manière générale autour des mêmes déconnexions que celle de Smith mais propose des méthodes plus récentes et efficaces pour préparer et assembler les trois fragments. En particulier, la formation de l'alcène Z en C6 - C7 est prévue par métathèse cyclisante d'alcynes suivie de réduction de Lindlar pour remplacer la réaction de Wittig. Cela va faire apparaître deux nouveaux fragments **[76<sub>o</sub>]** et **[84]** portant respectivement les chaînes C7 – C13 et C1 – C6 avec un alcyne respectivement en C7 et C6. La préparation de la partie thiazolidinone étant prévue de la même manière que précédemment, le même fragment **[62]** a été utilisé et lié au reste de la molécule par une réaction d'aldolisation (Figure 25).



**Figure 25** : Principales déconnexions de la synthèse de Fürstner<sup>76</sup>

(76) Fürstner, A., De Souza, D., Parra-Rapado, L., Jensen, J. T. Catalysis-Based Total Synthesis of Latrunculin B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42 (43), 5358–5360.

La synthèse du fragment **[62]** portant l'hétérocycle a été optimisée par rapport à celle précédente. La formation initiale de la thiazolidinone **[61]** est décrite ici en une étape à partir d'un ester de la L-cystéine **[73]**. Le carbamothionate est formé par double addition de l'amine et du thiol sur le CDI. Après protection par un groupement PMB de l'azote, l'ester est hydrolysé et converti en chlorure d'acyle. Une addition de bromure de méthylmagnésium catalysée au fer va fournir la méthyle cétone **[62]** avec un rendement global de 42 % (Figure 26). Smith faisait l'addition directement sur l'acide carboxylique correspondant, une méthode décrite comme peu fiable par Fürstner.<sup>76</sup>

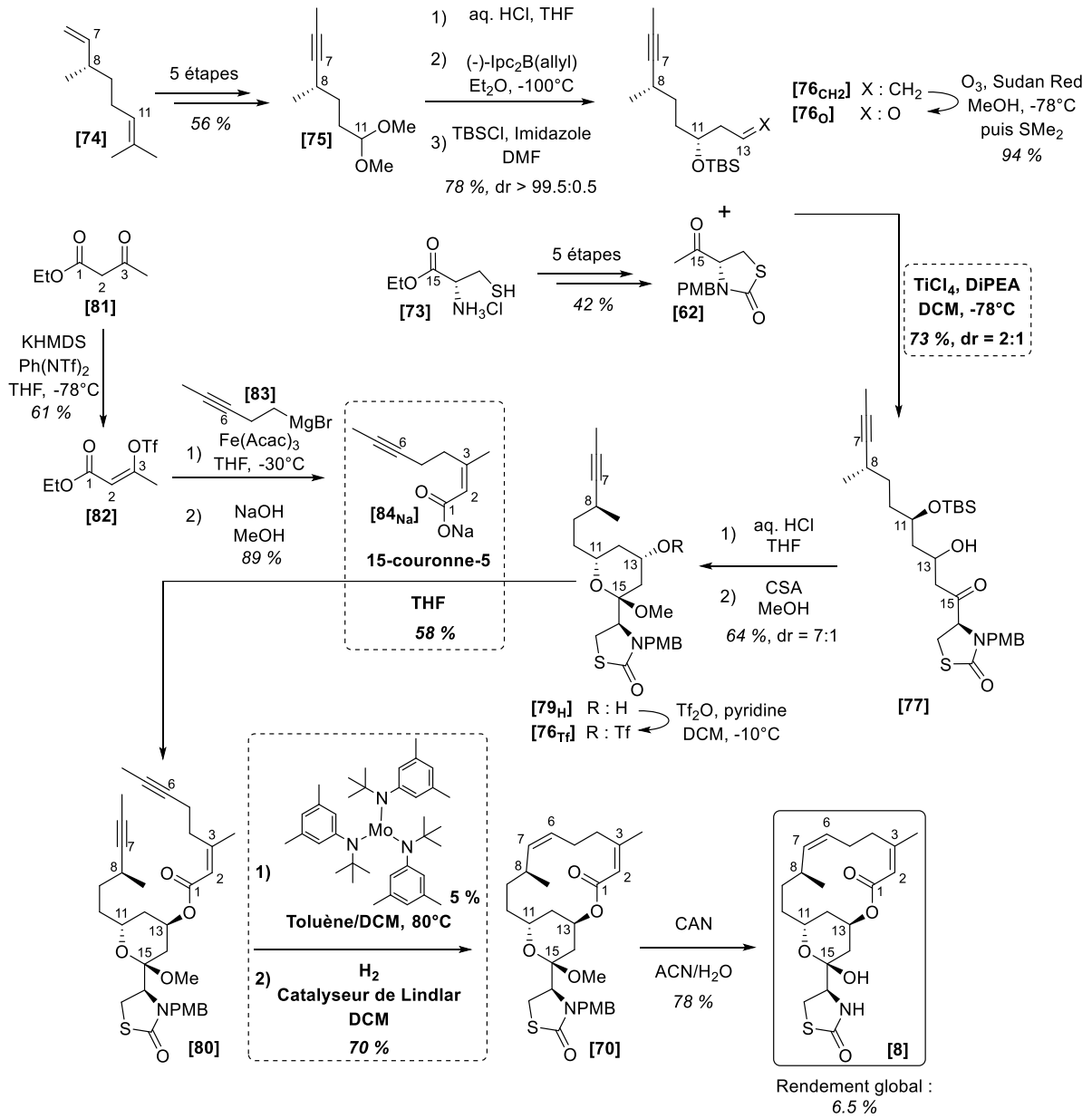
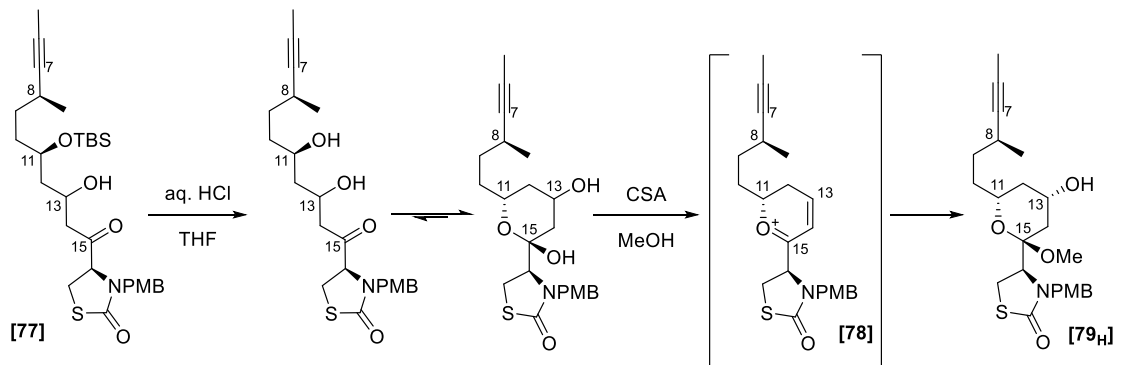
Le nouveau fragment portant la chaîne C7 - C13 est préparée ici à partir du (+)- $\beta$ -citronellène **[74]**, profitant de cette molécule du pool chiral pour obtenir le méthyle avec la bonne configuration en C8. L'alcène le plus substitué est sélectivement clivé en aldéhyde par ozonolyse et est protégé sous forme d'acétal de diméthyle. L'alcène terminal est ensuite converti en alcyne par dibromation suivie de double élimination, avant d'être méthylé en position terminale pour donner l'intermédiaire **[75]**. Cet intermédiaire **[75]** est obtenu avec un rendement de 56 % sur les cinq premières étapes et porte un alcyne en C7 et une fonction oxygénée en C11, position du second centre chiral. L'aldéhyde est déprotégé en milieu acide et une allylation asymétrique par addition d'un allylborane chiral permet de mettre en place l'alcool asymétrique en C11 avec une diastéréosélectivité quasi parfaite. Après protection de cet alcool avec un TBS et ozonolyse de l'alcène, l'aldéhyde en C13 **[76<sub>o</sub>]** est obtenu avec un rendement global de 41 %.<sup>76</sup>

Ces deux premiers fragments **[76<sub>o</sub>]** et **[62]** sont couplés par une réaction d'aldolisation. Cette fois-ci, la réaction est catalysée par  $TiCl_4$  et fournit le produit **[77]** avec un meilleur rendement de 73 % mais quasiment pas de sélectivité comme traduit par le rapport diastéréoisomérique obtenu de 2:1. Étant donné la possibilité d'effectuer la même méthanolyse acide que Smith pour isomériser le centre chiral formé, aucun effort n'a été fait pour améliorer cette sélectivité. Le groupement TBS a été déprotégé en milieu acide, formant spontanément l'hémiacétal en C15 et la méthanolyse acide a été réalisée. Comme dans la synthèse de Smith, cette réaction permet ici aussi de faire isomériser le groupement hydroxyle en C13 et de l'obtenir finalement avec une configuration (S) avec un bon rapport diastéréoisomérique sur l'intermédiaire **[79<sub>H</sub>]** de 7:1 (Figure 26). Il est postulé que la méthanolyse acide passe par un intermédiaire oxonium cyclique **[78]**, venant de la double élimination des groupements hydroxy en C13 et C15. L'addition de l'hydroxy en C13 se refait sur la face favorable, redonnant la configuration (S) (Figure 27).

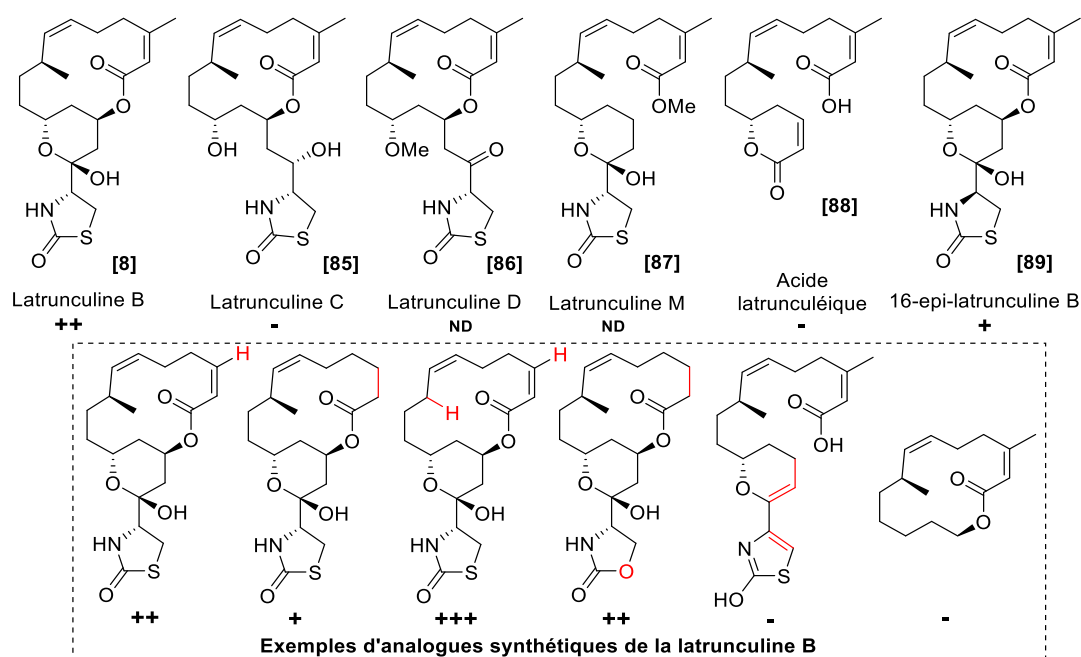
Le dernier fragment **[84]** portant la chaîne C1 - C6 est similaire à celui de Smith mais porte un alcyne en C6 à la place du triphénylphosphonium. La voie de synthèse choisie est néanmoins complètement différente. Sa préparation commence par la formation d'un triflate d'énol Z **[82]** à partir de l'acétylacétate d'éthyle **[81]**. Cette réaction permet de mettre en place l'alcène Z en C2 – C3 et d'avoir déjà l'ester en C1 et le méthyle en C3. Un couplage catalysé au fer avec un réactif de Grignard **[83]** portant la chaîne C4 – C6 et l'alcyne en C6 a ensuite été réalisé. Cette réaction de couplage développée dans l'équipe de Fürstner se fait avec rétention de configuration et complète le squelette de ce fragment.<sup>77</sup> Il est intéressant de remarquer ici que cette stratégie est différente de celle de la synthèse de Smith. Dans cette dernière, une addition de cuprate de méthyle sur l'alcyne correspondant était réalisée et donnait une sélectivité *trans* pour le groupement méthyle ajouté par rapport à l'ester. Ici c'est l'addition de la chaîne qui se fait avec une sélectivité *cis* par rapport à l'ester, le méthyle étant déjà en place. Le fragment **[84]** est finalement obtenu par hydrolyse basique de l'ester avec un rendement global de 54 % (Figure 26).

Ce dernier fragment est couplé au reste de la molécule par une réaction de substitution nucléophile S<sub>N</sub>2 en C13 pour en inverser la configuration. Les conditions ici sont particulières, un triflate est formé en C13 et est substitué par le carboxylate de sodium du dernier fragment **[84<sub>Na</sub>]** en présence d'un éther couronne, donnant l'ester **[80]** avec un rendement de 58 %. Ce choix par rapport à une réaction de Mitsunobu comme celle employée par Smith n'est pas argumenté dans la publication. Finalement, la métathèse cyclisante d'alcyne catalysée suivie de réduction de Lindlar est réalisée pour obtenir le macrocycle **[70]** avec un bon rendement de 70 % et la double liaison en configuration Z. L'étape finale de déprotection du groupement PMB au CAN va également hydrolyser l'acétal de méthyle, achevant cette synthèse de la latrunculine B **[8]** (Figure 26).<sup>76</sup>

(77) Scheiper, B., Bonnekessel, M., Krause, H., Fürstner, A. Selective Iron-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Grignard Reagents with Enol Triflates, Acid Chlorides, and Dichloroarenes. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (11), 3943–3949.

Figure 26 : Synthèse de Fürstner<sup>76</sup>Figure 27 : Intermédiaire postulé lors de la méthanolyse acide<sup>76</sup>

En 2005, l'équipe de Fürstner va également appliquer cette stratégie de synthèse avec des optimisations mineures pour préparer la latrunculine A [7].<sup>78</sup> Fort de l'expérience accumulée lors de ces deux synthèses, le travail a été étendu à l'ensemble de la famille des latrunculines. En effet, depuis l'isolement des latrunculines A et B, d'autres variantes ont été isolées à partir des éponges marines et en 2007, Fürstner publie la synthèse des latrunculines A [7], C [85], D [86], M [87], S et epi-B [89] (Figure 28).<sup>79</sup> Ce papier va présenter une méthode générale pour la préparation des molécules de cette famille. En particulier, cette connaissance a permis d'aller plus loin dans la préparation d'analogues en faisant varier des parties sur les différents fragments.<sup>80</sup> Les activités biologiques de ces analogues ont été évaluées et l'analyse des résultats a permis d'établir une relation structure/activité et d'observer certaines améliorations par rapport aux produits naturels.<sup>80</sup> En particulier, les deux groupements méthyle en C3 et C8 ne s'avèrent pas nécessaires et l'atome de soufre peut être remplacé par un atome d'oxygène sans affecter drastiquement l'activité. On remarque également que la latrunculine C, ne possédant plus le cycle tetrahydropyrane, est inactive (Figure 28). Ce cycle central est donc essentiel à l'activité biologique.



**Figure 28** : Analogues de la latrunculine B naturels ou synthétisés par l'équipe de Fürstner et activité biologique relative à la latrunculine B (quand disponible)<sup>79-81</sup>

- (78) Fürstner, A., Turet, L. Concise and Practical Synthesis of Latrunculin A by Ring-Closing Enyne-Yne Metathesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (22), 3462–3466.
- (79) Fürstner, A., De Souza, D., Turet, L., Fenster, M. D. B., Parra-Rapado, L., Wirtz, C., Mynott, R., Lehmann, C. W. Total Syntheses of the Actin-Binding Macrolides Latrunculin A, B, C, M, S and 16-*Epi*-Latrunculin B. *Chem. - Eur. J.* **2007**, *13* (1), 115–134.
- (80) Fürstner, A., Kirk, D., Fenster, M. D. B., Aïssa, C., De Souza, D., Nevado, C., Tuttle, T., Thiel, W., Müller, O. Latrunculin Analogues with Improved Biological Profiles by "Diverted Total Synthesis": Preparation, Evaluation, and Computational Analysis. *Chem. - Eur. J.* **2007**, *13* (1), 135–149.
- (81) Amagata, T., Johnson, T. A., Cichewicz, R. H., Tenney, K., Mooberry, S. L., Media, J., Edelstein, M., Valeriote, F. A., Crews, P. Interrogating the Bioactive Pharmacophore of the Latrunculin Chemotype by Investigating the Metabolites of Two Taxonomically Unrelated Sponges. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (22), 7234–7242



## 2.1.5 Étude de la métathèse cyclisante d'alcènes par Watson (2009)

Malgré ces nouvelles possibilités offertes par la méthode de synthèse du groupe de Fürstner, l'extraction reste encore aujourd'hui la meilleure méthode pour obtenir la latrunculine B. Il y a encore un besoin d'optimisation de la synthèse. L'équipe de Watson va en 2009 essayer de rendre extrêmement concise la synthèse de la latrunculine B en essayant la métathèse d'alcènes au lieu de celle d'alcynes utilisée précédemment.<sup>82</sup> Ce seul changement simplifie et fait gagner un bon nombre d'étapes au niveau de la préparation des différents fragments. En particulier, l'alcène terminal du (+)- $\beta$ -citronellène **[74]** peut être conservé sur son fragment, permettant d'éviter les étapes de dibromation, de double élimination et de méthylation nécessaires pour préparer l'alcyne. Le fragment portant la chaîne C1 à C7 est également simplifié.

Le premier fragment **[90<sub>H</sub>]** portant la chaîne C6 – C13 peut désormais être préparé en 6 étapes à partir du (+)- $\beta$ -citronellène **[74]**. Cette synthèse suit la même stratégie que celle de Fürstner en omettant la formation de l'alcyne qui n'est pas. L'aldéhyde en C11 est obtenu ici par une séquence d'époxydation, d'hydrolyse de l'époxyde et de clivage oxydant du diol formé. Cette séquence a un rendement global de 54 %, moins efficace que l'ozonolyse sélective utilisée précédemment. La formation de l'alcool chiral en C11 est réalisée par une réaction d'aldol avec le (R)-4-benzyl-N-acétyl thiazolidine-2-thione. Cette copule d'Evans permet un contrôle correct de la stéréosélectivité de l'addition, donnant un rapport diastéréoisomérique au-dessus de 7:1. Après protection de l'alcool en C11 avec un groupement TES, l'aldéhyde **[90<sub>H</sub>]** en C13 est obtenu par réduction au DiBALH de la copule d'Evans. Globalement, ce fragment est obtenu avec un rendement de 37 % mais aurait pu être bien meilleur si l'ozonolyse était utilisée pour la formation de l'aldéhyde en C11 initial (Figure 29).

Le fragment **[95]** portant la chaîne C1 – C6 peut désormais être fait en 3 étapes. Après addition de bromure d'allylmagnésium sur le 3-chloropropyne **[93]**, l'alcyne terminal va être déprotoné et le chlorure substitué par un groupement allyle. L'anion peut ensuite être piégé par le chloroformiate d'éthyle, permettant d'obtenir directement la chaîne principale **[94]**. Le fragment **[95]** est finalement obtenu après addition d'un cuprate de méthyle et hydrolyse de l'ester, comme réalisé dans la synthèse de Smith. Cette séquence est très efficace et fournit le fragment **[95]** avec un rendement global de 92 % (Figure 29).

Le dernier fragment **[62]** portant la thiazolidinone est identique aux synthèses précédentes.

---

(82) She, J., Lampe, J. W., Polianski, A. B., Watson, P. S. Examination of the Olefin–Olefin Ring Closing Metathesis to Prepare Latrunculin B. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50 (3), 298–301.

Les deux étapes de couplage des trois fragments sont ensuite réalisées dans des conditions très similaires à celles de Fürstner. La réaction d'aldolisation entre l'aldéhyde **[90<sub>H</sub>]** et la méthylcétone **[62]** va également causer la déprotection du groupement TES et de ce fait la formation spontanée de l'hémiacétal en C15. Après la réaction de méthanolyse acide formant l'acétal de méthyle en C15, l'alcool en C13 est converti en triflate et substitué par le sel de sodium, formé *in situ*, de l'acide carboxylique du dernier fragment **[95]**. Cette séquence donne l'intermédiaire **[92<sub>Me,PMB</sub>]** portant les deux alcènes terminaux en C6 et C7 en vue de la métathèse cyclisante. Différents catalyseurs de Grubbs ont été essayés. Une réaction est observée avec les catalyseurs de première génération mais ils ne donnent pas de produit cyclisé. Le catalyseur de seconde génération a permis d'obtenir des produits cyclisés avec des rendements jusqu'à 60 % mais avec mauvaise une sélectivité *E/Z* en faveur de l'isomère *E* non souhaité. La métathèse a également été testée sur les variants partiellement ou totalement déprotégés **[92<sub>Me,H</sub>]**, **[92<sub>H,PMB</sub>]** et **[92<sub>H,H</sub>]** mais la sélectivité ne s'est retrouvée inversée dans aucun cas (Figure 29).<sup>82</sup>

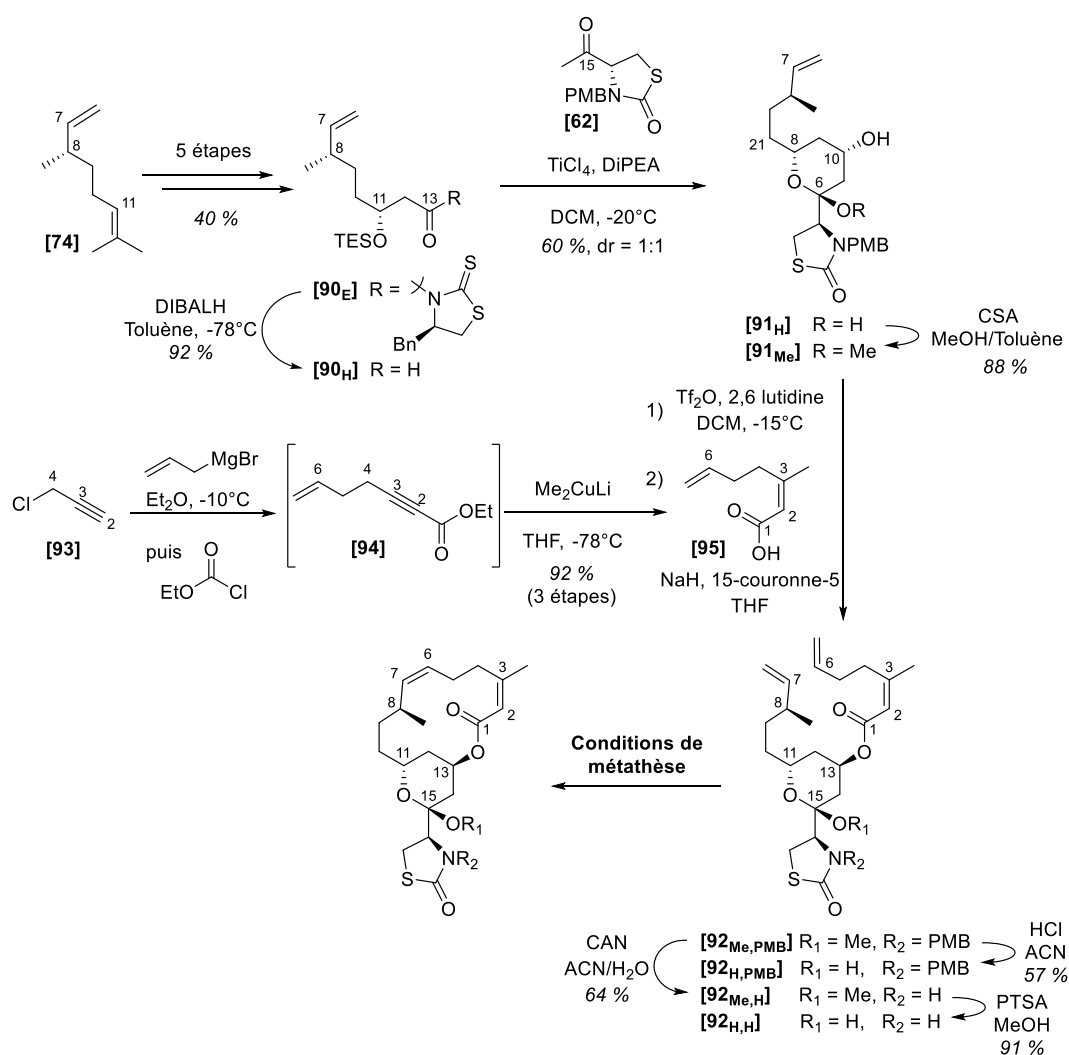
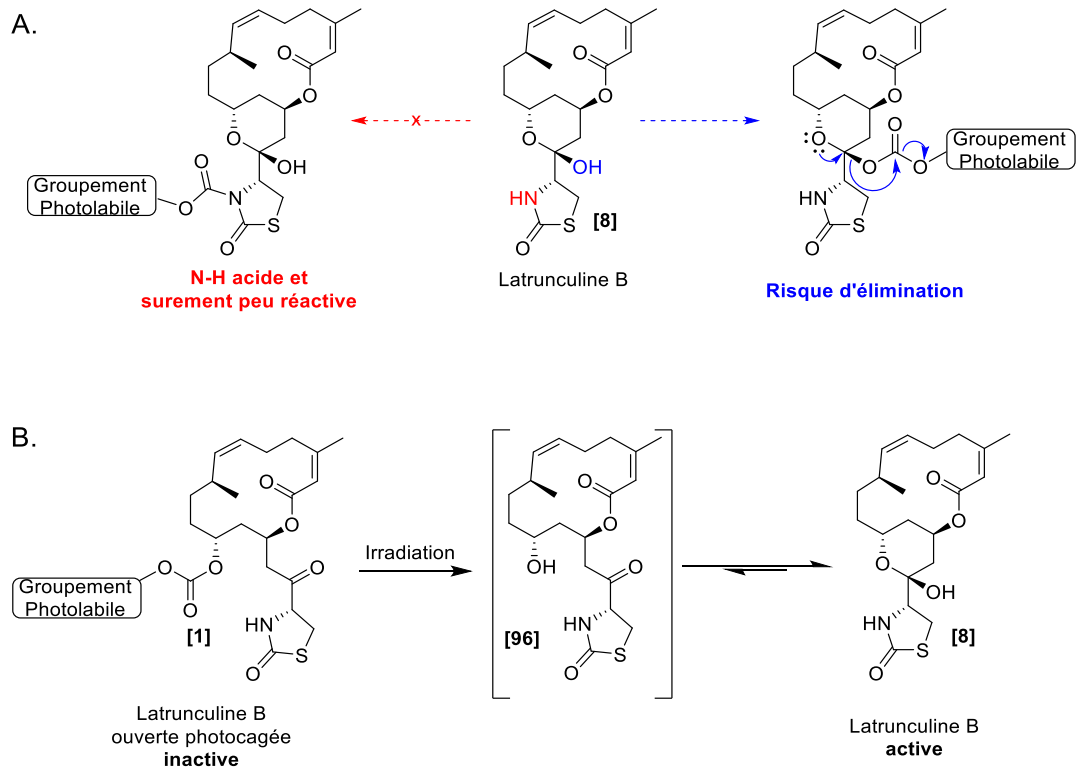


Figure 29 : Synthèse de Watson jusqu'aux tentatives de métathèse d'alcènes<sup>82</sup>

## 2.1.6 Introduction du projet

C'est dans la suite de ces travaux que s'inscrit ce projet de thèse qu'est la synthèse totale d'une latrunculine B photocagée. En particulier, ce projet a pour objectif de faire progresser deux aspects. Tout d'abord, les nouvelles méthodologies découvertes depuis les travaux précédents apportent de nouvelles possibilités pour l'amélioration de la synthèse totale de la latrunculine B. Ensuite, l'introduction d'une photocage permettrait d'aller plus loin dans les applications de la molécule en l'élargissant au photocontrôle.

Fondamentalement, la stratégie photocage est relativement simple à mettre en œuvre mais la latrunculine B reste une molécule complexe et la synthèse, même optimisée, ne sera pas anodine. Il était donc important de penser en amont à éviter le plus possible de potentielles complications. En particulier, il fallait garantir l'inactivité de la forme photocagée et s'assurer qu'il n'y aurait pas de problème au niveau du photoclivage. Le placement du groupement photolabile peut se faire ici a priori sur deux hétéroatomes : l'oxygène de l'hémiacétal et l'azote de la thiazolidinone.<sup>11,13</sup> Ces deux positions semblent inadéquates du fait de la potentielle instabilité des groupements à ces positions ou la difficulté de leur introduction. En effet, les dernières générations de groupements photocages portent, pour améliorer les cinétiques de déprotection, un pont  $-(CO)O-$  sous forme de carbonate ou carbamate. Ces groupements sont relativement sensibles à l'hydrolyse et peuvent également s'éliminer en fonction de la réactivité des hétéroatomes sur lesquelles ils sont placés. La liaison N-H de la thiazolidinone est particulièrement acide et l'azote faiblement nucléophile, rendant a priori difficile la formation du carbamate. L'oxygène de l'hémiacétal pose, lui, un autre problème qu'est la potentielle élimination d'un carbonate qui lui serait lié. Les synthèses précédentes ont montré la possibilité d'éliminer le groupement hydroxyde, moins bon groupe partant que le carbonate, à cette position en milieu acide (Figure 30 A).<sup>73,78</sup> La solution envisagée a été de synthétiser une forme ouverte de la latrunculine B **[1]**, sur laquelle l'hémiacétal n'aurait pas encore cyclisé et sur laquelle le groupement photolabile serait placé sur l'alcool libre en C11. Cette solution permet d'avoir le groupement photolabile attaché à un alcool secondaire, ce qui fait des carbonates plutôt stables et, de par l'absence d'un des cycles, d'avoir une géométrie fortement altérée et donc une activité biologique très certainement perdue. On peut notamment penser, par analogie, à la latrunculine C **[85]** qui ne possède également plus ce cycle et qui est effectivement inactive (Figure 28).<sup>81</sup> Cette solution profite du fait que les hémiacétals cycliques comme ceux de la latrunculine se forment spontanément dès lors que l'alcool et la cétone sont libres, permettant donc après irradiation de régénérer directement la latrunculine B **[8]** à partir de la forme ouverte **[96]** (Figure 30 B).



**Figure 30 :** (A) Potentiels problèmes associés au photocageage direct des hétéroatomes de la latrunculine B (B) Stratégie de photocageage d'une latrunculine B ouverte

## 2.2 Première stratégie de synthèse

### 2.2.1 Rétrosynthèse

Par rapport aux synthèses précédentes de la latrunculine B, la préparation d'une forme photocagée ouverte va impacter la stratégie. Le squelette reste identique et on pourra s'inspirer voire réutiliser des éléments des synthèses précédentes mais il n'est désormais plus possible de passer par l'hémiacétal fermé, car l'ouvrir à nouveau serait coûteux en termes d'étapes. En particulier, la méthanolyse acide employée précédemment pour isomériser l'alcool en C13 ne peut pas être utilisée. Il faudra donc trouver une manière de contrôler la sélectivité lors de la formation de ce centre chiral. En pratique, cela revient à trouver une alternative à la réaction d'aldol peu sélective employée jusqu'à maintenant. Un autre point méritant une amélioration est la métathèse cyclisante d'alcènes pour former le macrocycle. En particulier, Watson a montré que si on peut l'utiliser, cela simplifie significativement la préparation des fragments.<sup>82</sup> En 2018, l'équipe de Mauduit a développé une méthode de métathèse d'alcènes stéréorétentive, combinant un alcène terminal et un alcène 1,2 disubstitué pour former le produit de métathèse conservant la stéréochimie du second alcène.<sup>83</sup> Cette méthodologie permettrait de pallier le problème de sélectivité rencontré par Watson en imposant la géométrie *Z* sur un des fragments tout en profitant de la simplification qu'apporte la métathèse d'alcènes sur la synthèse en général. De plus, depuis les travaux de Watson, de nouveaux catalyseurs *Z* sélectifs ont été développés, notamment par Grubbs.<sup>84</sup> De ces réflexions préliminaires a été pensée une nouvelle voie de synthèse.

Les principales déconnexions sont similaires à celles des synthèses précédentes. Le macrocycle serait formé d'une part par estérification ou réaction de Mitsunobu en fonction de la configuration de l'alcool en C13 et d'autre part par une métathèse stéréorétentive. Ces deux déconnexions font apparaître un fragment **[98]** portant la chaîne C1 à C6 très similaire à celui de Fürstner, portant un alcène *Z* à la place de l'alcyne (Figure 32). Cela permettra de réutiliser la méthode de préparation de Fürstner qui est efficace. La déconnexion entre la chaîne restante et la partie hétérocycle est moins évidente. Afin d'éviter une réaction d'aldol potentiellement peu sélective, il serait astucieux de décaler la déconnexion d'un carbone le long de la chaîne. De cette manière, il ne se pose pas de question de sélectivité, le centre résultant n'étant pas chiral. Parmi les deux sens de

- 
- (83) Müller, D. S.; Curbet, I.; Raoul, Y.; Le Nôtre, J.; Baslé, O.; Mauduit, M. Stereoretentive Olefin Metathesis Made Easy: In Situ Generation of Highly Selective Ruthenium Catalysts from Commercial Starting Materials. *Org. Lett.* **2018**, *20* (21), 6822–6826.
- (84) Keitz, B. K.; Endo, K.; Patel, P. R.; Herbert, M. B.; Grubbs, R. H. Improved Ruthenium Catalysts *Z*-Selective Olefin Metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (1), 693–699.

découpage possible, placer la déconnexion plus proche de l'hétérocycle semble une meilleure option. En effet, on peut penser transférer la chiralité du carbone C11 au C13 afin de former ce centre important et indépendamment créer la liaison C14 - C15 entre les deux fragments. La formation de cette liaison peut être envisagée de manière ionique dans les deux sens, les réactions radicalaires étant risquées à cause de la présence de l'alcène terminal. On peut donc penser, selon la polarité naturelle, faire l'addition d'un anion en C14 sur un électrophile en C15 (aldéhyde qui sera réoxydé, chlorure d'acyle, amide de Weinreb...), la sélectivité n'ayant aucune importance car ce centre sera plan ( $sp^2$ ) à la fin. On peut également envisager, selon une polarité umpolung, une addition d'un anion en C15 sur un électrophile en C14, centre non chiral. Préparer un anion en C14 est problématique à cause de la présence d'une fonction oxygénée en C13. Il y a un risque d'élimination. Dans l'autre sens en revanche, on peut reconnaître deux éléments pratiques. En premier, si l'on veut un électrophile en C14 et un groupement oxygénée en C13, on peut utiliser un époxyde. L'époxyde est particulièrement intéressant ici car son ouverture par un nucléophile se fera sélectivement en position terminale, c'est-à-dire comme souhaité en C14, et il est possible de le former sélectivement par catalyse asymétrique ou diastéréosélective par transfert de chiralité du carbone C11, résolvant le problème de sélectivité de ce centre. Deuxièmement, il y a plusieurs possibilités pour former un anion en C15 et en particulier, on peut utiliser les réactions umpolung à partir d'un aldéhyde (Figure 31). Cette déconnexion a été retenue et donne deux fragments simples. D'un côté, il faut synthétiser la thiazolidinone avec un aldéhyde en C15 [97], qui pourra être préparée de manière similaire aux synthèses précédentes. De l'autre, le fragment souhaité [96] ressemble également beaucoup à celui des synthèses précédentes et sa préparation pourra être faite en s'inspirant des travaux de Fürstner (Figure 32).

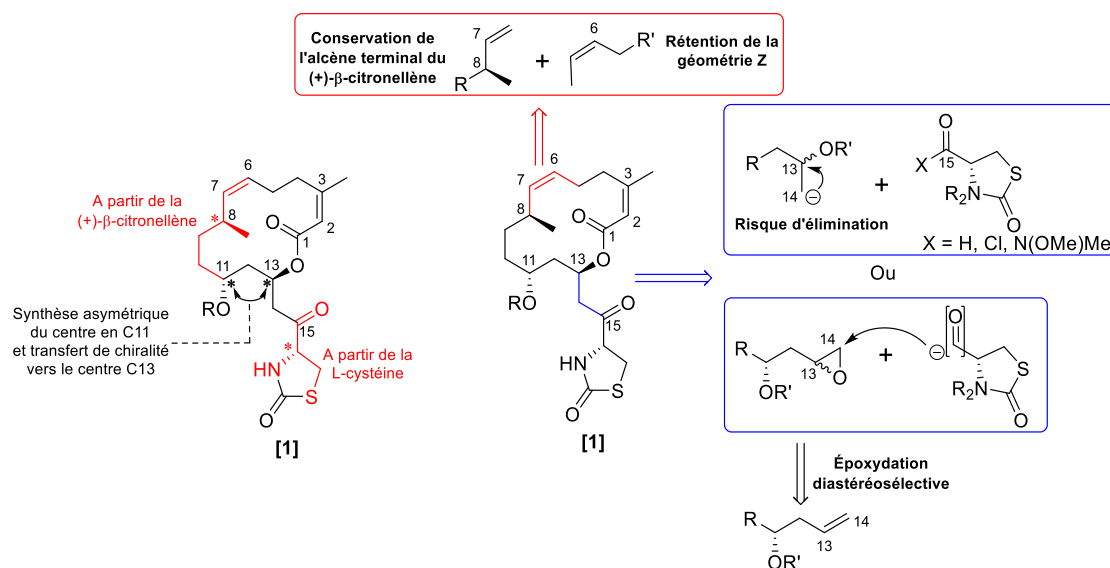


Figure 31 : Schématisation du raisonnement rétrosynthétique

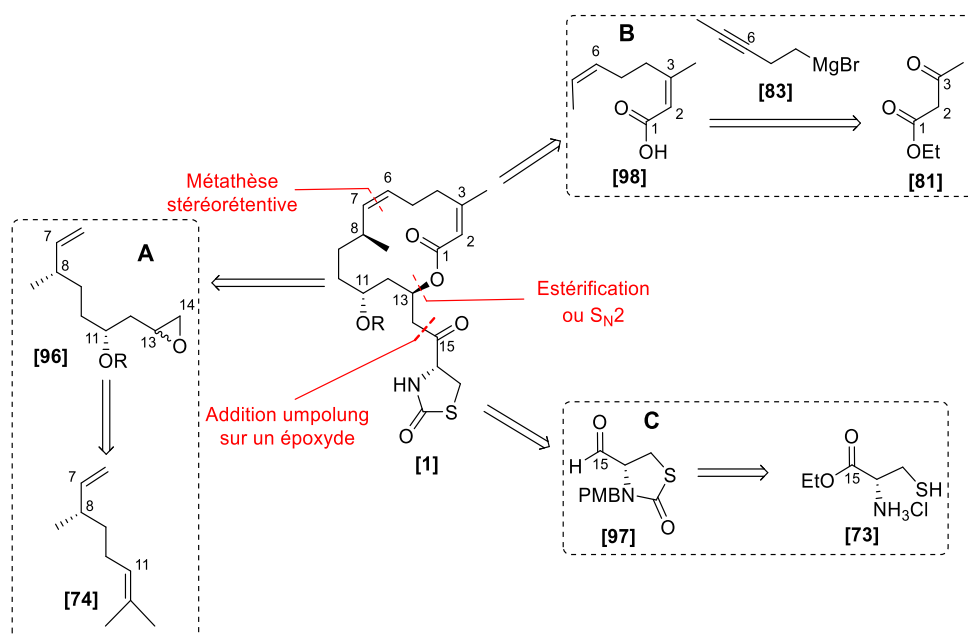
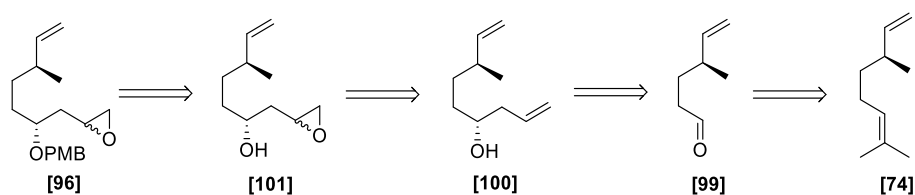


Figure 32 : Rétrosynthèse envisagée

Pour simplifier le discours, le fragment [96] portant la chaîne C6 – C13 sera nommé fragment A, celui portant la chaîne C1 – C6 [98] sera nommé fragment B et celui portant l'hétérocycle [97] sera nommé fragment C (Figure 32).

## 2.2.2 Synthèse du fragment A

En raison des similarités avec le fragment de Watson, le (+)- $\beta$ -citronellène **[74]** a également été utilisé comme produit de départ pour ce fragment. En effet, l'intégralité de la chaîne avant le carbone C11 est présente sur le fragment souhaité, comprenant le groupement méthyle sur le carbone chiral en C8 avec la bonne configuration. Pour la préparation de ce fragment, il faut mettre en place l'alcool chiral en C11 et l'époxyde en C13 et C14. Ne pouvant pas transférer la chiralité du méthyle en C8, ces centres vont devoir être induits par synthèse asymétrique. Les synthèses précédentes font une ozonolyse sélective de l'alcène trisubstitué pour former l'aldéhyde en C11 **[99]**, suivie d'une allylation asymétrique.<sup>73,76</sup> Cette stratégie serait bénéfique ici aussi sachant que l'alcène formé **[100]** pourra être utilisé pour l'époxydation. L'alcool **[101]** sera ensuite protégé mais pas directement par le groupement photocage. Ce dernier est relativement fragile et imposerait des conditions de travail dans l'obscurité pour toute la suite de la synthèse. En attendant un moment plus propice à son installation, un groupement PMB sera mis à sa place. Ce groupement a été choisi pour sa compatibilité avec un grand nombre de réactions ainsi que pour sa déprotection au CAN, inerte face aux autres groupements fonctionnels sur la latrunculine B. De par la présence d'un autre groupement PMB au niveau de l'hétérocycle, il n'y aura pas besoin d'une étape supplémentaire pour la déprotection. La synthèse de ce fragment **[96]** s'articule donc autour de la voie suivante : (1) ozonolyse de l'alcène substitué, (2) allylation asymétrique, (3) époxydation régio et diastéréosélective de l'alcène formé et (4) protection de l'alcool (Figure 33).

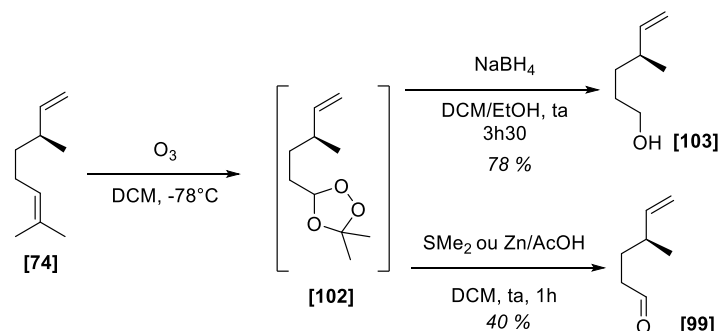


**Figure 33** : Rétrosynthèse du fragment A

L'ozonolyse sélective de l'alcène trisubstitué du (+)- $\beta$ -citronellène **[74]** est conduite dans les mêmes conditions que Fürstner et Waston, c'est-à-dire à  $-78^{\circ}\text{C}$  dilué dans le DCM sous flux régulier d'ozone. La difficulté ici est d'éviter la seconde ozonolyse de l'alcène terminal du citronellène. La progression de la réaction peut être suivie par CCM mais les produits ne répondant pas en UV et marquant intensément au  $\text{KMnO}_4$ , il est souvent difficile de trouver le bon moment pour arrêter la réaction. En effet, la formation du produit de double ozonolyse commençant alors qu'il reste encore un peu de produit de départ, le moment optimal pour arrêter la réaction est quand il reste encore un peu de produit de départ mais qu'encore très peu de produit de double ozonolyse s'est formé.



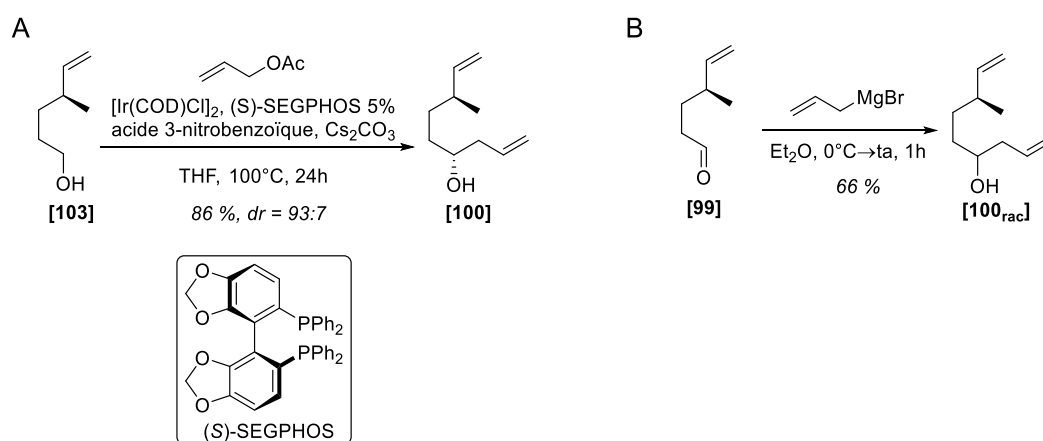
L'ozonure **[102]** peut être réduit avec divers réducteurs. Notamment, le sulfure de diméthyle utilisé par Fürstner peut très bien être remplacé par la combinaison de zinc et d'acide acétique. Dans ces conditions l'aldéhyde **[99]** peut être obtenu et purifié aisément par chromatographie sur colonne. Cet aldéhyde est malheureusement souvent isolé avec des rendements assez faibles malgré le fait que la réaction semble efficace par CCM (Figure 34). Cela est dû au fait qu'il est volatile et semble co-évaporer avec les solvants de la réaction et de la purification. Malgré l'utilisation de mélanges pentane/éther diéthylique, une partie du produit est perdu. La découverte d'une nouvelle méthodologie a permis de contourner ce problème. En 2008, l'équipe de Krische publie une allylation asymétrique à partir d'alcools primaires très diversifiés et avec des sélectivités remarquables.<sup>85,86</sup> Utiliser cette méthode pour l'étape suivante permettrait de passer par l'alcool **[103]** a priori beaucoup moins volatile que l'aldéhyde **[97]**. Le traitement réducteur a donc été adapté pour réduire l'ozonure **[102]** jusqu'à l'alcool **[103]** en utilisant NaBH<sub>4</sub> et en ajoutant 10% d'éthanol en co-solvant. Dans ces conditions et après purification par chromatographie sur colonne, l'alcool **[103]** a été isolé avec un rendement de 78% (Figure 34). La réaction n'ayant jamais été réalisée sur une échelle suffisamment grande, une purification par distillation n'a pas été testée mais serait particulièrement adaptée sur des grandes quantités pour remplacer la chromatographie sur colonne.



**Figure 34** : Ozonolyse et différentes réductions du (+)-β-citronellène

- (85) Kim, I. S., Ngai, M.-Y., Krische, M. J. Enantioselective Iridium-Catalyzed Carbonyl Allylation from the Alcohol or Aldehyde Oxidation Level via Transfer Hydrogenative Coupling of Allyl Acetate: Departure from Chirally Modified Allyl Metal Reagents in Carbonyl Addition. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (44), 14891–14899.
- (86) Kim, I. S., Ngai, M.-Y., Krische, M. J. Enantioselective Iridium-Catalyzed Carbonyl Allylation from the Alcohol or Aldehyde Oxidation Level Using Allyl Acetate as an Allyl Metal Surrogate. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (20), 6340–6341.

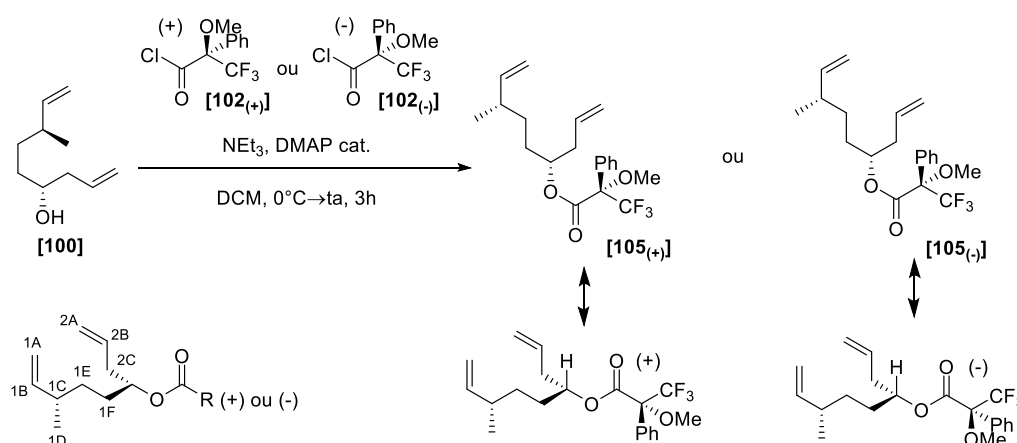
L'allylation asymétrique a ensuite été faite selon la méthode de Krische<sup>85</sup>. Cette réaction emploie la catalyse à l'iridium pour effectuer une réaction de transfert d'hydrogène entre l'acétate d'allyle et un alcool terminal pour une addition énantiosélective d'un allyliridium sur l'aldéhyde formé in situ. Cette méthode catalytique demande un soin particulier d'environnement anhydre et d'atmosphère inerte mais remplace l'utilisation des boranes chiraux en quantités stœchiométriques. La réaction se fait dans le THF en tube scellé car chauffé à 100°C, en présence de 10 équivalents d'acétate d'allyle, de 2.5 % de précurseur d'iridium dimérique  $[\text{Ir}(\text{COD})\text{Cl}]_2$ , de 5 % de (S)-SEGPHOS comme ligand chiral, de carbonate de césium comme base et d'acide *meta*-nitrobenzoïque comme additif intervenant dans la formation du catalyseur actif (voir le mécanisme plus loin). Après 24 h, le produit **[100]** peut être obtenu mais doit être purifié par chromatographie sur colonne après le traitement pour éliminer les restes d'acétate d'allyle et les quelques sous-produits. La chromatographie sur colonne pose ici un problème d'échelle car il va toujours rester une quantité importante d'acétate d'allyle dans le mélange brut. Le produit **[100]** n'est pas si volatile mais évaporer l'intégralité de l'acétate d'allyle demanderait un chauffage ou un vide un peu plus fort qu'il n'est confortable avec ce produit. De ce fait il faut toujours surestimer la taille de la colonne à prendre et la démarrer dans des conditions extrêmement apolaires. Néanmoins, le produit **[100]** a été isolé pur avec un rendement de 86% (Figure 35 A).



**Figure 35 :** (A) Allylation de Krische du produit d'ozonolyse (B) Allylation racémique de l'aldéhyde

La diastéréosélectivité n'a ici pas pu être mesurée par HPLC car la réponse en UV du produit est trop faible. C'est ici le shift RMN des protons du méthyle en C8 qui a été utilisé. Dans le méthanol deutéré, les doublets associés aux protons de ce méthyle sont suffisamment écartés pour voir une différence entre les deux diastéréoisomères. Le mélange de diastéréoisomères de référence **[100<sub>rac</sub>]** a été synthétisé par traitement au bromure d'allylmagnésium de l'aldéhyde **[99]** venant des premières

ozonolyses (Figure 35 B). Par superposition des deux spectres RMN, les signaux du méthyle ont pu être identifiés et un rapport diastéréoisomérique d'au moins 97:3 a été mesuré. La configuration absolue de l'alcool formé **[100]** devait encore être déterminée. D'après les publications de Krische, le (S)-SEGPHOS devrait donner l'alcool (R).<sup>85</sup> Cette confirmation a été obtenue par la méthode de Mosher. Les deux esters de Mosher **[105<sub>(+)</sub>]** et **[105<sub>(-)</sub>]** ont été préparés et les déplacements chimiques en RMN des protons ont été mesurés. La différence entre les déplacements d'un même proton sur chaque ester donne une information sur les effets de blindage du phényle sur ces derniers et permet donc de savoir quelle chaîne est de quel côté de l'ester dans la configuration la plus stable. En effet, la configuration prédominante est celle dans laquelle le proton au pied de l'ester, l'ester et le CF<sub>3</sub> sont dans le même plan.<sup>87</sup> Les protons de la chaîne C6 à C11 sont plus blindés sur l'ester (+) **[105<sub>(+)</sub>]** que sur l'ester (-) **[105<sub>(-)</sub>]**, indiquant que cette chaîne est du côté du phényle dans l'ester (+) et inversement pour l'autre chaîne. Cela confirme que la réaction donne la configuration (R) souhaitée (Figure 36). Une montée en échelle de la réaction de Krische sur presque 2 grammes a été possible avec un tube scellé de volume adéquat. Comme avec la réaction précédente, une purification par distillation serait la bienvenue sur de plus grandes échelles.

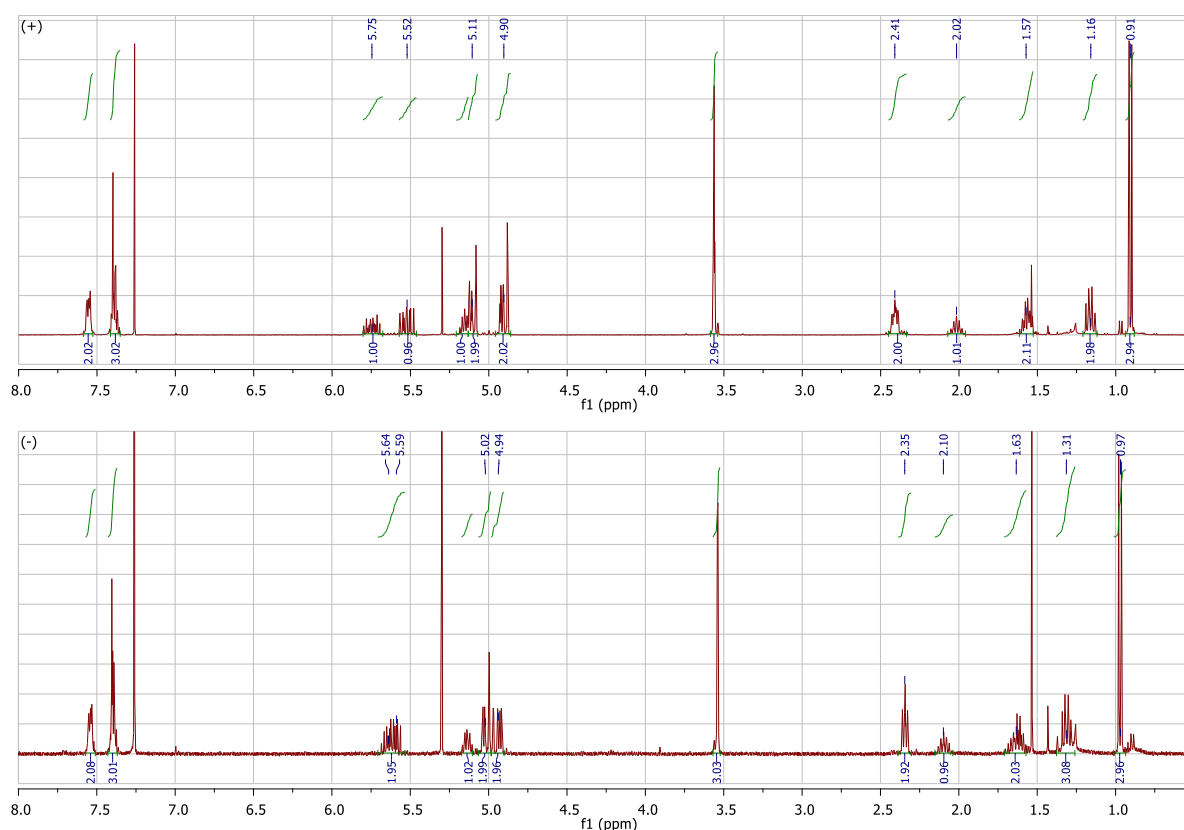


Déplacements chimiques des protons des esters **[105<sub>(+)</sub>]** et **[105<sub>(-)</sub>]**

Signal	1A	1B	1C	1D	1E	1F	2A	2B	2C
Ester <b>[150<sub>(+)</sub>]</b>	4.90	5.52	2.02	0.91	1.16	1.57	5.11	5.75	2.41
Ester <b>[150<sub>(-)</sub>]</b>	4.94	5.59	2.10	0.97	1.31	1.63	5.02	5.64	2.35
$\Delta_{(+)(-)}$	-0.04	-0.07	-0.08	-0.06	-0.15	-0.06	+0.09	+0.09	+0.06

**Figure 36** : Analyse de Mosher du produit d'allylation de Krische. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm et calibrés selon le pic résiduel du chloroforme à 7.26 ppm.

(87) Hoyer, T. R., Jeffrey, C. S., Shao, F. Mosher Ester Analysis for the Determination of Absolute Configuration of Stereogenic (Chiral) Carbinol Carbons. *Nat. Protoc.* **2007**, 2 (10), 2451–2458.

Spectre RMN <sup>1</sup>H des esters [105<sub>+</sub>] (en haut) et [105<sub>-</sub>] (en bas)

**Figure 36 (suite)** : Analyse de Mosher du produit d'allylation de Krische et spectres RMN <sup>1</sup>H des esters de Mosher [105<sub>+</sub>] et [105<sub>-</sub>] correspondants. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm et calibrés selon le pic résiduel du chloroforme à 7.26 ppm.

Le mécanisme de la réaction de Krische est complexe et pas encore totalement certain. On sait néanmoins qu'il implique un transfert d'hydrogène entre l'alcool primaire et l'acétate d'allyle pour former l'aldéhyde correspondant et un allyliridium nucléophile. Après formation initiale du complexe *mé*ta-nitrobenzoate d'iridium(I) diphosphine [106<sub>i</sub>], il y a deux mécanismes possibles. Un premier commence par l'insertion oxydante dans l'acétate d'allyle pour former le complexe d'iridium(III) [107] qui peut de manière concertée faire la C-H activation dans le *m*-nitrobenzoate et l'élimination d'acide acétique. Il se peut aussi que le carbonate de césium participe à cette étape comme base extérieure et que l'on élimine simplement ensuite un acétate. Cela donne un complexe d'allyliridium(III) [111<sub>pi</sub>]. Le second mécanisme proposé fait d'abord l'insertion oxydante dans la liaison C-H du *mé*ta-nitrobenzoate pour former un complexe d'iridium(III) [106<sub>iii</sub>]. Après déprotonation, un complexe d'iridium (I) anionique [109] est régénéré. Ce complexe particulièrement riche en électrons peut faire

une nouvelle insertion oxydante dans l'acétate d'allyle et donner après élimination de l'acétate, le complexe allyliridium(III) **[111<sub>pi</sub>]**. Ce groupement allyle est nucléophile et basique et peut réagir avec un électrophile dans le milieu. Au début, lorsqu'il n'y en a pas encore, l'initialisation peut simplement se faire en déprotonant l'alcool du produit de départ pour former du propène et l'alcoolate d'iridium(III) **[113]**. C'est à ce moment que commence le transfert d'hydrogène. Ce complexe peut abstraire un hydrogène à l'alcool primaire pour former l'hydrure d'iridium **[106<sub>iii</sub>]** et libérer l'aldéhyde correspondant. Cet hydrure d'iridium **[106<sub>iii</sub>]** correspond au complexe initialement formé et peut donc refaire toutes les étapes amenant au complexe d'allyliridium(III) **[111<sub>pi</sub>]**. Cette fois-ci, il y a un aldéhyde dans le milieu et une addition énantiosélective de l'allyliridium peut se faire pour former le nouvel alcoolate d'iridium **[112]**. La beauté de cette réaction réside dans le fait que ce complexe **[112]** coordonné au produit est saturé à 18 électrons et n'a aucun site de coordination vacant de par la coordination de l'alcène du produit. Il ne va donc pas pouvoir abstraire un hydrogène à l'alcool homoallylique pour former une cétone qui aurait perdu l'information chirale. Il ne peut qu'échanger avec un autre alcool du milieu et même si ce n'est pas favorable, le produit de départ va finir par se coordonner pour redonner son alcoolate d'iridium correspondant **[113]**, à partir duquel peut recommencer le cycle catalytique (Figure 37).

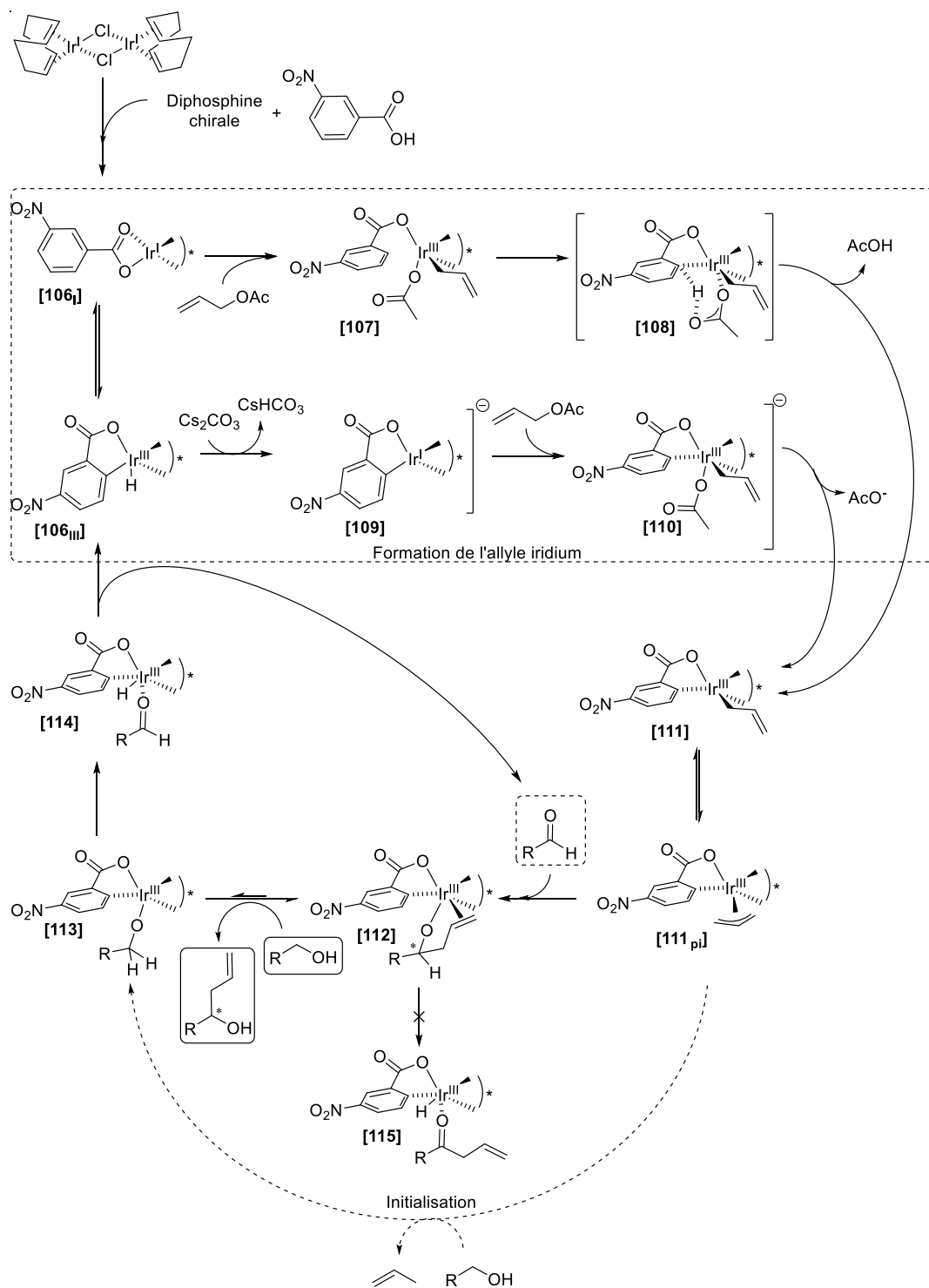
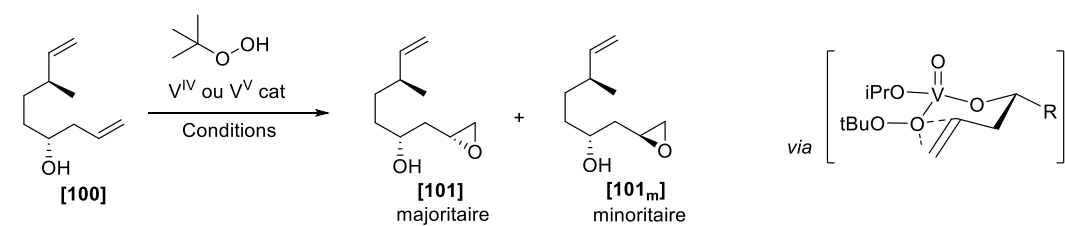


Figure 37 : Mécanismes de la réaction de Krische<sup>85</sup>

L'étape suivante de la synthèse est l'époxydation de l'alcène qui vient d'être installé. Il se pose ici deux questions de sélectivité qui sont la régiosélectivité vis-à-vis du second alcène terminal et la diastéréosélectivité. Tant que la sélectivité est bonne, la configuration absolue de l'époxyde n'a que peu d'importance car le centre chiral en C13 pourra être inversé lors de l'étape d'estérification si besoin. L'utilisation de la catalyse au vanadium est une méthode de choix car robuste pour faire des époxydations régio et diastéréosélectives d'alcool homoallyliques.<sup>88</sup> C'était certainement aussi la seule réaction capable de discriminer entre deux alcènes terminaux non encombrés et de réactivités a priori très similaires. La réaction peut se faire avec différents catalyseurs et au début, le V(O)(acac)<sub>2</sub> a été utilisé car il est disponible et stable à l'air. L'oxydant utilisé est le l'hydroperoxyde de *tert*-butyle qui est commercialement disponible sous différentes formulations. La solution dans le décane a été préférée aux solutions quasi pures (en mélange avec le peroxyde de *tert*-butyle) pour assurer l'absence d'eau dans le milieu, le vanadium y étant particulièrement sensible. La réaction est efficace à température ambiante mais fournit le produit sous forme d'un mélange de diastéréoisomères **[101]** et **[101<sub>m</sub>]** avec un ratio plutôt décevant de 77:23. La réaction devient particulièrement lente à 0°C et ne donne pas une meilleure sélectivité. Pour pallier ce problème, le V(O)(OiPr)<sub>3</sub>, connu comme plus performant, a été utilisé comme catalyseur. A température ambiante, la réaction donne une sélectivité identiquement décevante mais en refroidissant, la réaction ralentit mais progresse encore et la sélectivité s'améliore. Finalement, à -30°C en 10 jours, la réaction donne 82% du produit **[101]** avec un meilleur ratio diastéréoisomérique de 82/18 (Tableau 1). La purification ne pose pas de problème particulier ici si ce n'est le fait que les deux diastéréoisomères **[101]** et **[101<sub>m</sub>]** sont inséparables. Un grand nombre de solvants ont été essayés pour voir une séparation sur CCM et même une chromatographie sur colonne particulièrement prolongée n'a pas donné de signe de séparation. La question de la séparation a donc été laissée à plus tard. Cette réaction a néanmoins permis le transfert de chiralité du centre C11 au C13. La configuration absolue du diastéréoisomère majoritaire est prévue d'après la méthodologie comme étant (R).<sup>88</sup>

---

(88) Mihelich, E. D., Daniels, K., Eickhoff, D. J. Vanadium-Catalyzed Epoxidations. 2. Highly Stereoselective Epoxidations of Acyclic Homoallylic Alcohols Predicted by a Detailed Transition-State Model. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103* (25), 7690–7692.

**Tableau 1** : Stéréosélectivité de l'époxydation catalysée au vanadium


Catalyseur	Température	Durée	Rendement	dr**
V(O)(acac) <sub>2</sub>	rt	16 h	70 %	77:23
V(O)(acac) <sub>2</sub>	0°C	2 jours	ND*	75:25
V(O)(OiPr) <sub>3</sub> 10 %	ta	5h30	86 %	75:25
V(O)(OiPr) <sub>3</sub> 10 %	0°C	4 jours	ND*	75:25
V(O)(OiPr) <sub>3</sub> 15 %	-30°C	6 jours	61 %	84:16
<b>V(O)(OiPr)<sub>3</sub> 20 %</b>	<b>-30°C</b>	<b>10 jours</b>	<b>82 %</b>	<b>82:18</b>

\* Test sur petite échelle, le rendement n'a pas été mesuré

\*\* Rapport diastéréoisomérique mesuré par RMN <sup>1</sup>H

La protection de l'alcool **[101]** avec un groupement PMB est faite en conditions standards, c'est-à-dire avec le PMB-Br et NaH comme base dans le DMF. La réaction est efficace à condition que le PMB-Br ait été préparé récemment. En effet, s'il est conservé longtemps au congélateur, même s'il ne change pas d'aspect et que la RMN n'indique pas de dégradation, la réaction devient beaucoup plus lente et s'arrête prématurément. On pourrait penser que la dégradation du PMB-Br générerait du HBr qui viendrait neutraliser la base mais rajouter du NaH dans la réaction ne pallie pas ce problème. Le PMB-Br doit être préparé le moins longtemps possible avant son utilisation. Cela n'est néanmoins qu'une contrainte mineure étant donnée la facilité de la procédure. En effet, le PMB-Br peut être préparé à partir de PMB-OH en l'ajoutant lentement dans une solution aqueuse d'HBr à 48%. Le produit est pur et utilisable directement après le traitement. Avec un PMB-Br fraîchement préparé, la réaction de protection peut atteindre 78% de rendement en moins d'une heure et demi (Figure 38). Le diastéréoisomère majoritaire obtenu **[96]** n'est toujours pas à ce stade séparable du minoritaire. La réaction secondaire d'ouverture de l'époxyde n'a jamais été observée de manière sûre mais des sous-produits pouvant s'y apparenter apparaissent en faible quantité si la réaction est laissée plusieurs jours.



A ce stade de la synthèse, deux problèmes sont présents. D'une part, les deux diastéréoisomères de l'époxyde ne sont toujours pas séparés. Cela serait une perte de matière et globalement un manque d'optimisation si la séparation était repoussée après le couplage des fragments, sur des produits plus complexes. D'autre part, le travail effectué en parallèle sur les autres fragments a montré qu'il y avait peu de chance que l'addition umpolung du fragment C puisse se faire directement sur l'époxyde (voir le chapitre 1.2.6). Le choix a donc été fait d'ouvrir de manière prématurée l'époxyde **[96]** pour former un dérivé bromé plus réactif. L'ouverture de l'époxyde pour former la bromohydrine **[116]** peut se faire aisément par traitement de l'époxyde **[96]** avec un mélange de LiBr et d'AcOH dans le THF. Malgré le caractère légèrement acide de ces conditions réactionnelles, l'ouverture de l'époxyde par les bromures de métaux alcalins se fait par un mécanisme de type S<sub>N</sub>2 et donc selon une sélectivité pour la position terminale.<sup>89</sup> La bromohydrine **[116]** peut être obtenue ici avec un rendement de 81% et la régiosélectivité de l'ouverture est parfaite, le mauvais régioisomère n'ayant jamais été observé (Figure 38). Par chance, les deux diastéréoisomères sont désormais séparables par chromatographie sur colonne et le produit est étonnement stable, la fermeture de l'époxyde n'étant pas observée même après avoir été conservé des mois au congélateur.

Ce fragment A a été préparé en 5 étapes avec un rendement global de 28% (Figure 38).

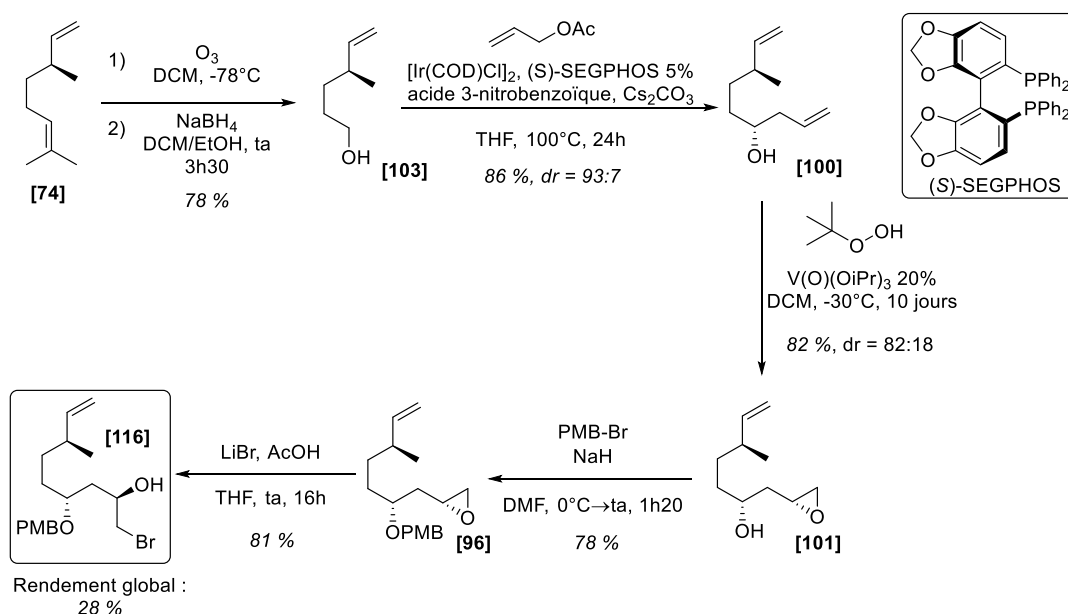
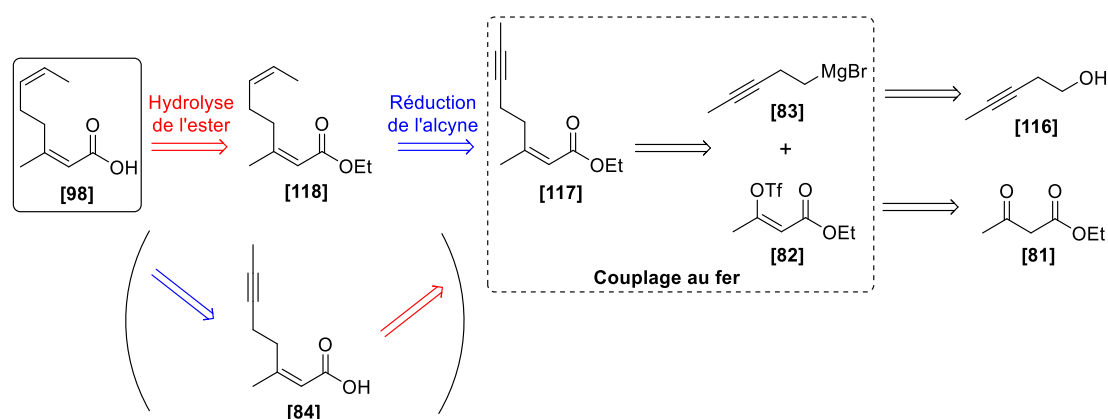


Figure 38 : Synthèse du fragment A

(89) Bajwa, J. S., Anderson, R. C. A Highly Regioselective Conversion of Epoxides to Halohydrins by Lithium Halides. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32 (26), 3021–3024.

## 2.2.3 Synthèse du fragment B

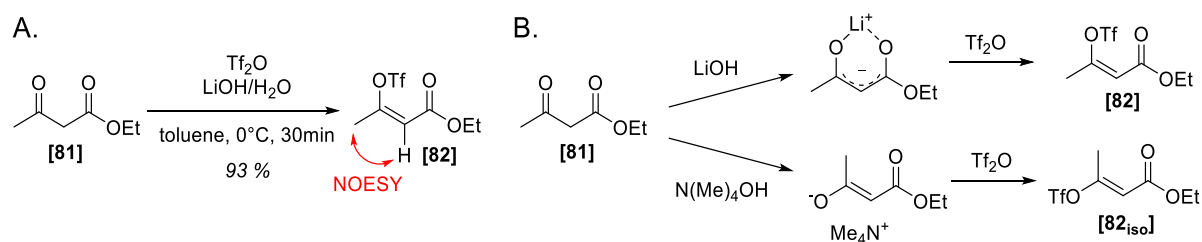
Le fragment B **[98]** ressemblant beaucoup à celui de Fürstner, une majeure partie des étapes ont été reproduites. La seule différence est la présence d'un alcène Z à la place de l'alcyne. Une étape de réduction est donc à rajouter à un moment propice. L'étape clef de ce fragment reste le couplage au fer, il est donc préférable d'effectuer l'étape de réduction après afin de rester dans les conditions décrites par Fürstner et éviter des potentielles complications. La rétrosynthèse ne laisse alors le doute que sur l'ordre des deux dernières étapes de réduction de l'alcyne et d'hydrolyse de l'ester. Bien que théoriquement possible dans l'autre sens, seule la séquence de réduction suivi d'hydrolyse a été étudiée ici (Figure 39).



**Figure 39** : Rétrosynthèse du fragment B

Une publication de 2008 décrit une manière plus robuste pour former le triflate d'énol Z de l'acétylacétate d'éthyle **[82]**. Cette méthodologie utilise une réaction biphasique et montre que la nature de la solution aqueuse basique permet de contrôler la configuration de la double liaison formée.<sup>90</sup> En traitant une solution d'acétylacétate d'éthyle **[81]** dans le toluène avec une solution aqueuse saturée de LiOH, on forme l'énol Z par chélation du lithium entre les deux oxygènes. Cet énol peut être piégé *in situ* par de l'anhydride triflique pour former le produit **[82]** souhaité. Le produit est obtenu pur directement après traitement avec un rendement de 93 %. La configuration a pu être vérifiée par NOESY, une tache de corrélation étant visible entre le proton en C2 et ceux du méthyle en C3. L'isomère *E* n'est pas observé ici (Figure 40).

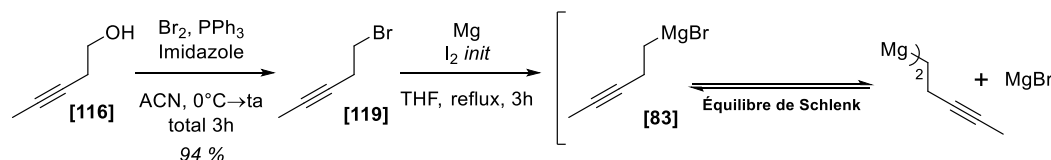
(90) Babinski, D., Soltani, O., Frantz, D. E. Stereoselective Synthesis of Acetoacetate-Derived Enol Triflates. *Org. Lett.* **2008**, *10* (13), 2901–2904.



**Figure 40** : Formation du triflate d'énol : Conditions utilisées (A) et sélectivité décrite en fonction de la base utilisée (B).<sup>90</sup>

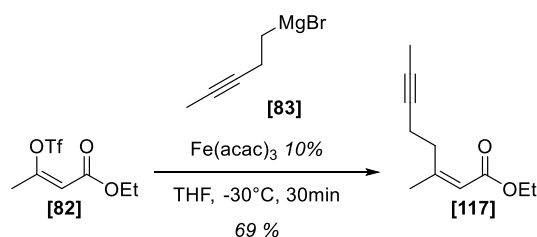
Le réactif de Grignard **[83]**, second partenaire du couplage, n'est pas disponible commercialement et doit être préparé. Il peut être fait par la séquence usuelle de formation d'alkylmagnésiens à partir des alcools correspondant en passant par les dérivés bromés. Le 3-pentyn-1-ol **[116]** peut être engagé dans une réaction d'Appel pour former le dérivé bromé **[119]**.  $\text{CBr}_4$  a d'abord été utilisé comme source de brome pour la formation du sel de triphénylphosphonium et dans ces conditions la transformation semble quantitative d'après la CCM. La purification a posé problème car il n'a pas été possible de séparer le bromoforme issu de la réaction et le produit. En effet, le produit étant volatil et apolaire, le bromoforme n'a pas pu être simplement évaporé ni séparé par chromatographie sur colonne. Les quantités utilisées à ce stade ne permettaient pas de faire une distillation qui aurait pu résoudre ce problème. La source de brome a donc été remplacée par le dibrome et l'imidazole a été ajouté comme base. Dans ces nouvelles conditions, la réaction paraît également quantitative et la quasi-totalité des sous-produits peuvent être retirés au traitement ou par précipitation. Les restes d'oxyde de triphénylphosphine sont éliminés par chromatographie sur colonne dans un mélange pentane/éther diéthylique. En portant un soin particulier à ne pas perdre le produit pendant l'évaporation, il peut être obtenu pur avec un rendement pouvant monter jusqu'à 94 % (Figure 41). Pendant la montée en échelle, la chromatographie devient de plus en plus délicate. Il est néanmoins possible de purifier le produit par distillation même si de nombreuses précautions doivent être prises. Le produit étant sensible à la chaleur et se décomposant au-dessus d'environ  $100^\circ\text{C}$ , la distillation doit être réalisée sous pression réduite mais pas trop faible pour ne pas le perdre. A  $80^\circ\text{C}$  et 100 mBar, le produit peut être séparé sans que la dégradation ne soit observée.

La formation de l'organomagnésien **[83]** se fait dans les conditions standards. Le produit bromé **[119]** est ajouté lentement dans une suspension de copeaux de magnésium dans du THF à reflux. La solution de réactif de Grignard obtenue est utilisée en général sans attente pour la réaction de couplage. Il est important de noter qu'après retour à température ambiante, un précipité blanc peut être observé dans la solution. Ce précipité n'a pas été caractérisé mais se ressolubilise si l'on chauffe à nouveau la solution, indiquant qu'il s'agit sûrement de bromure de magnésium provenant de l'équilibre de Schlenk (Figure 41). Il peut être ajouté sans risque dans la réaction de couplage.



**Figure 41** : Réaction d'Appel et formation de l'organomagnésien

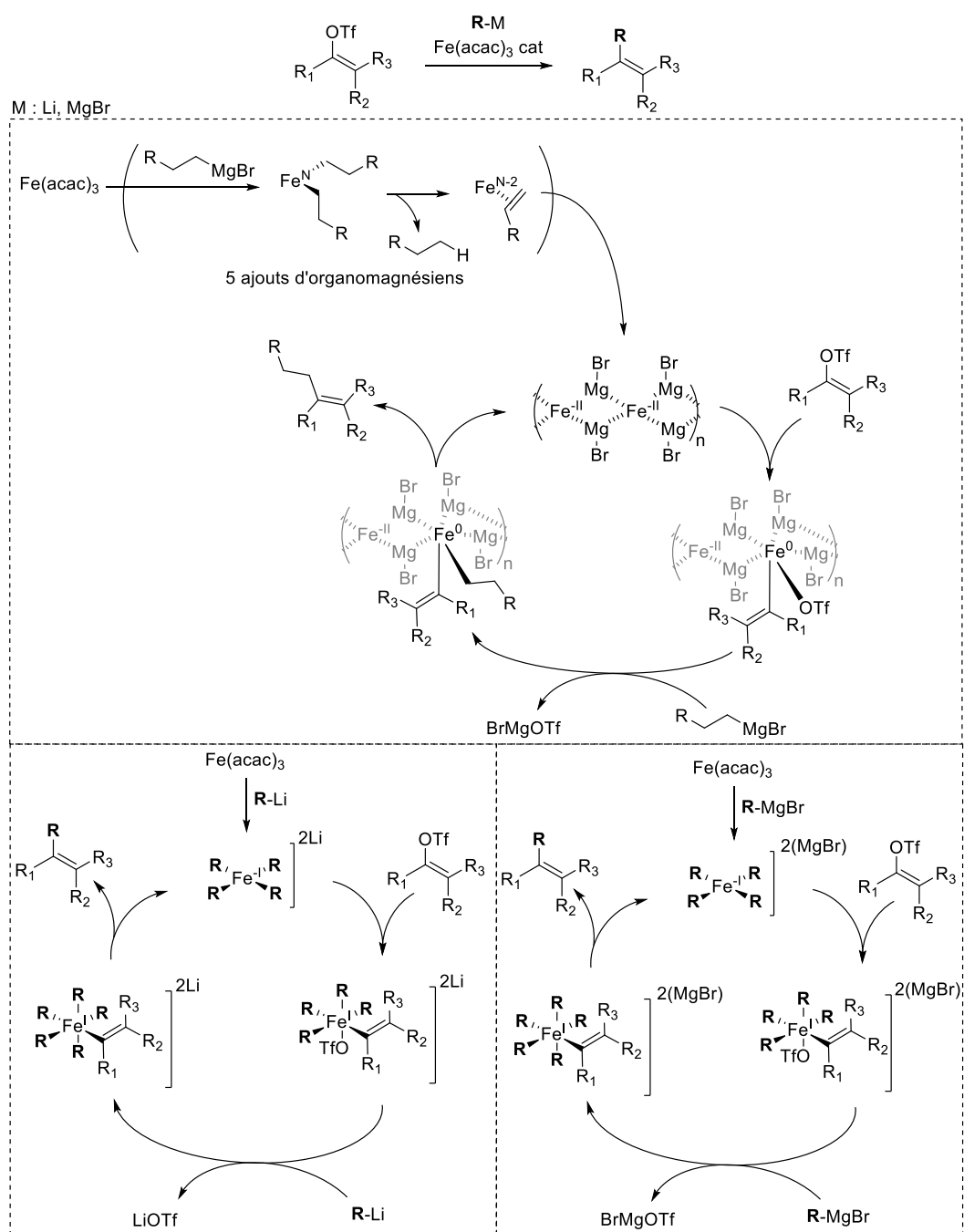
La réaction de couplage au fer entre le triflate d'énol **[82]** et l'organomagnésien **[83]** est réalisée dans les mêmes conditions que décrites par Fürstner.<sup>76</sup> La réaction se fait à  $-30^{\circ}\text{C}$  dans le THF anhydre, 10 % de  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  est utilisé comme catalyseur et il y a besoin d'un large excès de réactif de Grignard (entre 2 et 3 équivalents). Les rendements obtenus au laboratoire étaient toujours légèrement inférieurs à ceux décrits par Fürstner, atteignant au plus 69 % (Figure 42). Le changement de la charge catalytique ainsi que du nombre d'équivalents d'organomagnésien ne semblent pas avoir une influence significative. En revanche le rendement chute lorsqu'il reste des traces d'oxyde de triphénylphosphine dans le réactif bromé **[119]** engagé dans la formation de l'organomagnésien. Cela n'est pas surprenant étant donné qu'il peut réagir avec ces derniers.<sup>91</sup> En ce qui concerne le produit de couplage **[117]**, la purification par chromatographie est également assez délicate mais réalisable car le produit et les sous-produits principaux sont tous très apolaires et proches en CCM.



**Figure 42** : Couplage au fer pour la formation de l'intermédiaire **[117]**

L'espèce catalytique active de la réaction de couplage est postulée comme étant un cluster de fer  $(\text{Fe}^{-II}(\text{MgBr})_2)_n$  au degré d'oxydation  $-II$ .<sup>77</sup> Cette espèce n'a néanmoins pas été caractérisée et a été postulée sur la base de sa solubilité dans les éthers et de la couleur sombre de la solution. La formation de ces clusters se produirait par succession de transmétalations d'organomagnésiens sur le fer suivies de  $\beta$ -éliminations pour réduire progressivement le fer jusqu'au degré  $-II$ . Cependant, la réaction fonctionne également avec le bromure de méthylmagnésium, qui ne peut pas faire de  $\beta$ -élimination. La réaction est également décrite avec des réactifs organolithiens et dans ce cas, les intermédiaires sont connus comme étant de la forme  $(\text{R}_4\text{Fe}^{-I})\text{Li}_2$ .<sup>92</sup> Sans nier l'existence des clusters  $(\text{Fe}^{-II}(\text{MgBr})_2)_n$ , il n'est pas déraisonnable de penser l'existence d'espèces de la forme  $(\text{R}_4\text{Fe}^{-I})_2(\text{MgBr})_2$  qui expliqueraient le fait que la même réactivité est observée dans toutes ces situations. Ces espèces de fer  $(-I)$ ,  $(\text{R}_4\text{Fe}^{-I})\text{Li}_2$  ou  $(\text{R}_4\text{Fe}^{-I})(\text{MgBr})_2$ , sont particulièrement enrichies électroniquement et ont encore deux sites de coordination vacants. Cela leur permettrait l'insertion oxydante dans la liaison C-O du triflate d'énol.

Après substitution du triflate par un autre dérivé organolithien ou organomagnésien, le complexe saturé à 18 électrons pourrait faire l'élimination réductrice donnant le produit de couplage et régénérant l'espèce de fer(-I) initiale. La réactivité du cluster  $(\text{Fe}^{\text{II}}(\text{MgBr})_2)_n$  pourrait suivre la même voie mais basculerait entre les degrés d'oxydation -II et 0 au lieu de -I et I (Figure 43).



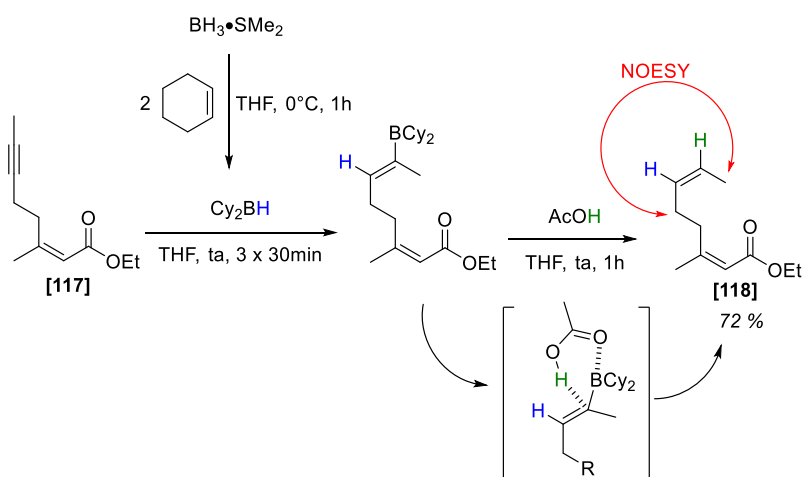
**Figure 43 :** Mécanismes proposés pour le couplage au fer en passant par des intermédiaires de type  $(\text{R}_4\text{Fe})\text{Li}_2$ ,  $(\text{R}_4\text{Fe})(\text{MgBr})_2$  ou  $(\text{Fe}(\text{MgBr})_2)_n$

- (91) Seyferth, Dietmar., Welch, D. E., Heeren, J. K. The Reaction of Triphenylphosphine Oxide with Alkyl lithium and Grignard Reagents. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (6), 1100–1105.
- (92) Spiegl, H. J., Groh, G., Berthold, H. J. Über die Darstellung von Lithiumtetramethylferrat(II)  $\text{Li}_2[\text{Fe}(\text{CH}_3)_4]$ . *Z. Für Anorg. Allg. Chem.* **1973**, *398* (3), 225–230.

Les étapes suivantes consistent en la réduction de l'alcyne et l'hydrolyse de l'ester. La réduction d'alcyne en alcène Z se fait habituellement par hydrogénation de Lindlar. Les deux catalyseurs de palladium usuels qui sont le palladium sur carbonate de calcium, empoisonné au plomb et le palladium sur sulfate de baryum, empoisonné par la quinoline, ont été utilisés sous une atmosphère d'hydrogène. Dans ces conditions, la réaction ne progresse pas. Le changement de solvant (éthanol ou acétate d'éthyle) ou le chauffage de la réaction pendant plusieurs jours n'ont pas permis d'observer plus que des traces de produit. N'ayant pas l'équipement nécessaire pour travailler sous pression d'hydrogène, une autre méthodologie a été envisagée. Il est également possible de réduire les alcynes en alcènes Z en passant par des dérivés borés. En effet, les vinylboranes peuvent être clivés par protodéboration et cela avec rétention de configuration, permettant d'obtenir l'alcène Z.<sup>93</sup> En pratique, des alkylboranes encombrés sont utilisés. La cinétique de protodéboration ralentissant de manière drastique pour chaque groupement clivé, il est important pour avoir une bonne sélectivité que le premier groupe à être clivé soit celui d'intérêt. Le groupement vinyle est clivé plus rapidement que les alkyles et d'autant plus rapidement que les alkyles sont encombrés, faisant du dicyclohexylborane un réactif de choix. La protodéboration peut être faite par des acides forts ou par des acides carboxyliques qui réagissent rapidement malgré leur faible acidité. Cela est sûrement dû à l'assistance du doublet de l'oxygène du carbonyle qui peut agir comme base de Lewis sur le borane, facilitant la rupture de la liaison carbone-bore. Le dicyclohexylborane peut être préparé par hydroboration de cyclohexène. En pratique, les solutions de BH<sub>3</sub> dans le THF semblent ne pas réagir mais en ajoutant deux équivalents de cyclohexène sur une solution de BH<sub>3</sub>•SMe<sub>2</sub> dans le THF à 0°C, un solide blanc précipite après une heure de réaction. Ce solide correspond bien à la description du dicyclohexylborane. En milieu suffisamment dilué, il peut être prélevé sous argon sous forme de suspension. Le dicyclohexylborane est ajouté par portions dans une solution de l'alcyne **[117]** tant que ce dernier est visible par CCM. Cette précaution est prise pour ne pas ajouter trop de borane qui pourrait faire une seconde hydroboration. Après consommation de tout le produit de départ **[117]**, de l'acide acétique est ajouté pour faire la protodéboration. La réaction est rapide et le produit souhaité peut être purifié et isolé par chromatographie sur colonne avec un rendement de 72%. La configuration de l'alcène formé **[118]** a été vérifiée par RMN NOESY (Figure 44).

---

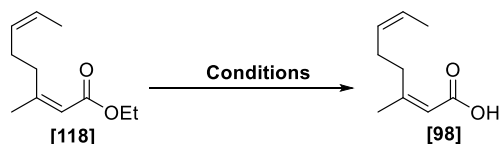
(93) Zweifel, G., Clark, G. M., Polston, N. L. Directive Effects in the Monohydroboration of Alkynes and Enynes. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93* (14), 3395–3399.



**Figure 44** : Séquence d'hydroboration et de protodéboration

L'étape finale d'hydrolyse de l'ester **[118]** s'est avérée plus délicate qu'attendue. Füstner décrit l'hydrolyse de son ester par NaOH dans le MeOH.<sup>76</sup> Malgré la différence minime entre son fragment et celui de cette synthèse, la réaction ne progresse pas ici avec NaOH dans l'éthanol avec 10% d'eau. LiOH a alors été utilisé dans les mêmes conditions de solvant et dans ce cas, la réaction se fait, l'acidité de Lewis de cation lithium semble ici activer suffisamment l'ester. Néanmoins, une isomérisation de la double liaison en  $\alpha,\beta$  de l'acide carboxylique **[98]** est observée. Cela est sûrement dû à une réaction parasite d'addition 1,4 de l'hydroxyde de lithium. Après rotation de la liaison puis élimination, le produit isomérisé **[98<sub>E</sub>]** peut être formé. En diluant avec plus d'eau et en passant dans le méthanol, cette isomérisation a pu être maîtrisée. Dans un mélange 50:50 de méthanol et d'eau, la réaction est lente mais l'isomérisation n'est plus observée. Chauffer la réaction, même modérément (40°C) pour l'accélérer va faire réapparaître l'isomérisation. Dans les conditions optimales, le produit pur a pu être obtenu avec un rendement de 82% (Tableau 2).

**Tableau 2** : Conditions d'hydrolyse de l'ester **[118]**



Base	Solvant	Température	Durée	Rendement	[98]:[98 <sub>E</sub> ]
NaOH	EtOH	rt	16 h	Pas de réaction	
NaOH	EtOH	60°C	10 h	Dégradation	
KOH	MeOH	60°C	24 h	Dégradation	
LiOH	EtOH/H <sub>2</sub> O 6:1	50°C	16h	40 %	84:16
LiOH	EtOH/H <sub>2</sub> O 5:1	40°C	2 jours	67 %	86:14
<b>LiOH</b>	<b>MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1</b>	<b>ta</b>	<b>64h</b>	<b>82 %</b>	<b>98:2</b>

Cette réaction conclut la formation de ce fragment qui est obtenu en 4 étapes linéaires avec un rendement global de 36% (Figure 45).

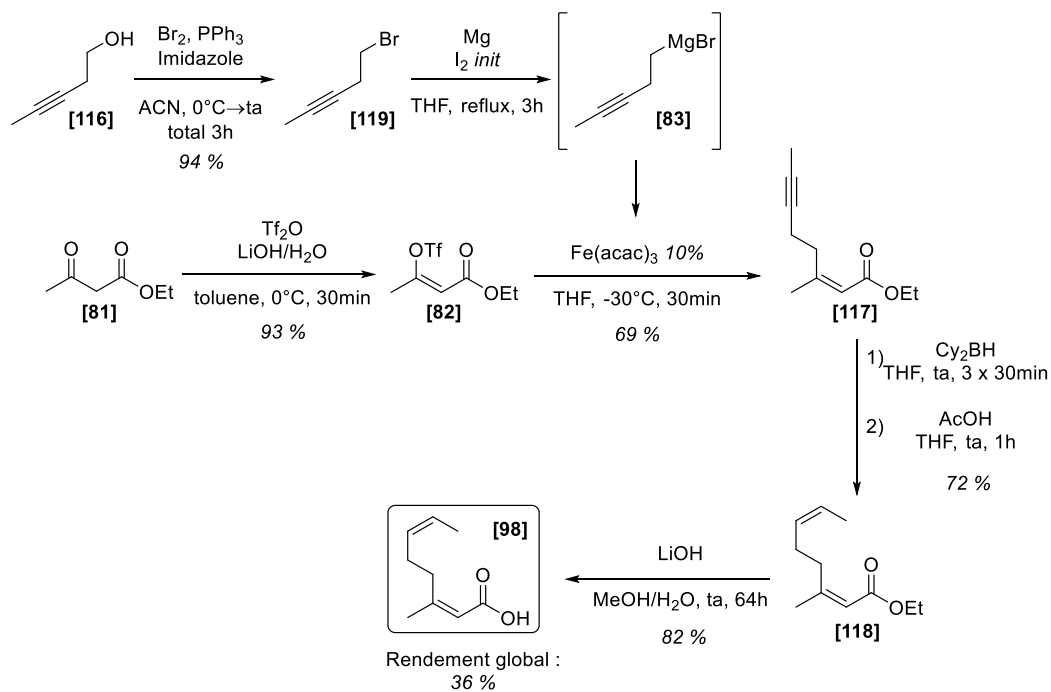
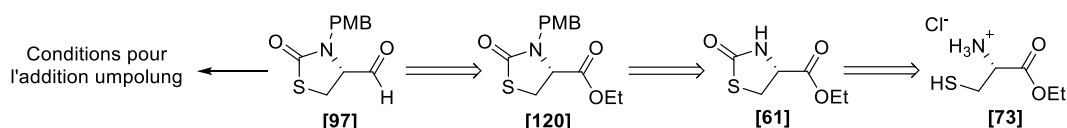


Figure 45 : Synthèse du fragment B



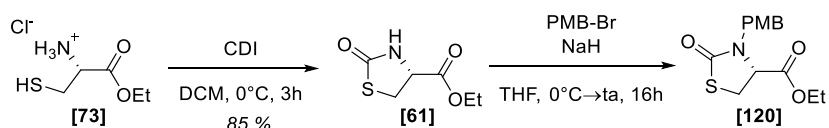
## 2.2.4 Synthèse du fragment C

Le dernier fragment porte le même hétérocycle que celui des synthèses précédentes, la différence ici est simplement la présence d'un aldéhyde à la place de la méthylcétone. Comme pour les autres synthèses, l'azote de la thiazolidinone doit être protégé car trop réactif (le proton est particulièrement acide). L'utilisation d'un PMB pour cette protection est également adaptée ici, ce groupement pourra être déprotégé en même temps que celui de l'alcool en C11 du fragment A. Après la formation de l'intermédiaire thiazolidinone protégée commun avec les synthèses précédentes, il ne restera que la formation de l'aldéhyde à partir de l'ester et la mise au point de l'addition umpolung sur le fragment A (Figure 46).



**Figure 46** : Rétrosynthèse du fragment C

La formation de l'hétérocycle a été réalisée ici dans les mêmes conditions que Fürstner.<sup>76</sup> La double addition de l'amine et du thiol de l'ester d'éthyle de la L-cystéine **[73]** sur le CDI permet en une étape de former la thiazolidinone. Le solvant de la réaction peut être changé du THF vers le DCM sans conséquence notable sur petites et moyennes échelles. Dans ces conditions, un rendement d'au mieux 85 % a pu être obtenu (Figure 47). Le produit de départ est disponible sous forme du sel de chlorhydrate et sur plusieurs grammes, il tend à former des agglomérats lents à se dissoudre. On observe un plus grand nombre de produits secondaires, d'apparence oligomériques par RMN (bosses mal définies au niveau des pics attendus du produit), et de ce fait une baisse de rendement. L'ajout d'une base supplémentaire pour neutraliser le chlorhydrate ou l'attente de la solubilisation complète avant l'addition du CDI devrait pallier ce problème.



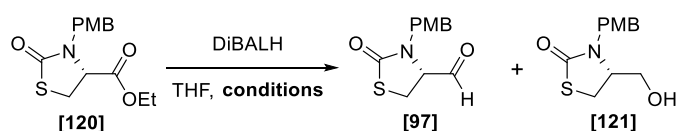
**Figure 47** : Préparation de la thiazolidinone protégée

La protection de l'azote de l'hétérocycle **[61]** a été réalisée dans les conditions de Fürstner, c'est-à-dire avec NaH comme base et PMB-Br dans le THF.<sup>76</sup> La réaction a donné le produit avec un rendement de 72 % sans poser de problème particulier de purification (Figure 47). Comme avec le fragment A, le PMB-Br doit être préparé peu avant la réaction. On observe aussi dans cette protection, un arrêt de la réaction qui ne peut être redémarrée ni par ajout de base ni de PMB-Br lorsque ce dernier a été conservé longtemps. En pratique, il est judicieux d'effectuer les réactions de protection des deux fragments le même jour, en ayant préparé un excès de PMB-Br juste avant. Les rendements étant bons, cette étape n'a pas été optimisée mais pourrait l'être en utilisant une base moins forte par exemple. Dans une synthèse de la (+)-biotine, l'azote de la thiazolidinone a été benzylé en utilisant des hydroxydes ou des carbonates comme base, montrant qu'une déprotonation par NaH n'est pas forcément nécessaire.<sup>94</sup> Cette étape pose un risque de racémisation du centre chiral à cause de l'acidité du proton en  $\alpha$  de l'ester. La réaction a toujours été faite avec un léger défaut (0.95 équivalents) de NaH pour éviter cette racémisation. Le pouvoir rotatoire observé sur le produit étant quasiment identique à celui décrit par Fürstner (-92.5° mesuré pour -96.7° décrit dans l'éthanol<sup>79</sup>), il n'y a sûrement pas ou très peu de racémisation.

La thiazolidinone **[120]** protégée en main, la formation de l'aldéhyde à partir de l'ester a d'abord été envisagée par réduction ménagée avec le DiBALH. En effet, il est parfois possible de contrôler la réduction de l'ester avec cet hydrure pour s'arrêter à l'aldéhyde grâce à la stabilité particulière de l'adduit obtenu après la première addition. Les conditions de température adéquates ont été explorées. A -78°C, la réaction ne progresse pas alors qu'à -40°C, 13 % de l'aldéhyde **[97]** est obtenue après une heure de réaction avec un équivalent de DiBALH. A la même température mais avec cette-fois-ci 2 équivalents de DiBALH, la conversion augmente et environ 33 % d'aldéhyde est formé. Des traces d'alcool apparaissent néanmoins, indiquant que cette température est encore peut-être un peu trop haute. A 2.5 équivalents de DiBALH, la conversion est complète mais l'on observe principalement de la dégradation. La thiazolidinone est sûrement touchée par l'excès d'hydrure. Les réactions étant laissées jusqu'à maintenant seulement quelques heures, une tentative prolongée sur 3 jours à -70°C et avec 2 équivalents de DiBALH a été testée. Un mélange propre de 85 % d'ester **[120]** et 15 % d'aldéhyde **[97]** est obtenu (Tableau 3). La réaction semble progresser correctement mais est extrêmement lente et il faudrait la maintenir en conditions cryogéniques pendant plusieurs jours voire semaines. Pour ces raisons, cette stratégie a été abandonnée et une séquence de réduction complète suivie de réoxydation a été envisagée.

---

(94) Seki, M., Hatsuda, M., Mori, Y., Yoshida, S., Yamada, S., Shimizu, T. A Practical Synthesis of (+)-Biotin From L-Cysteine. *Chem. - Eur. J.* **2004**, *10* (23), 6102–6110.

**Tableau 3** : Tentatives de réduction de l'ester au DiBALH

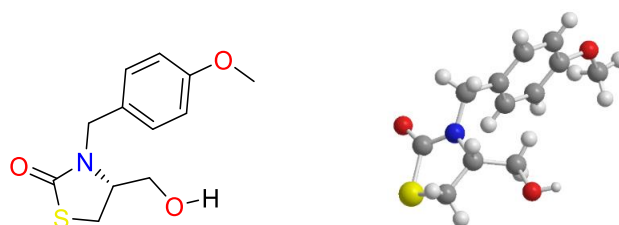
DiBALH	Température	Durée	Ester [120] restant	Aldéhyde [97] formé	Alcool [121] formé
1 eq	-78°C	2 h	> 98 %	trace	∅
1 eq	-40°C	1 h	> 80 %	13 %	traces
2 eq	-40°C	2 h	28 %	46 %	traces
2.5 eq	-40°C	4 h		dégradation	
2.1 eq	-70°C	3 jours	85 %	15 %	∅

La réduction de l'ester **[120]** à l'alcool **[121]** peut être faite par de nombreux réducteurs puissants comme le  $\text{LiAlH}_4$  ou de DiBALH mais ces derniers risquent de dégrader la thiazolidinone. Une option moins habituelle est l'utilisation de  $\text{LiBH}_4$ , un hydrure plus faible mais capable néanmoins de réduire les esters. La différence de réactivité avec  $\text{NaBH}_4$ , connu pour justement ne pas réagir avec les esters, vient de l'activation acide du carbonyle par le cation lithium. Comme pour  $\text{NaBH}_4$ , ce réactif est souvent utilisé avec un alcool comme solvant ou co-solvant. La réaction a été portée ici dans un mélange THF/EtOH avec un excès de  $\text{LiBH}_4$ . La réaction progresse mais la prise en masse de la solution par les sels de lithium formés va l'arrêter prématurément. Les proportions de solvants et la concentration globale ont été optimisées pour éviter ce problème. Augmenter la proportion d'éthanol du solvant ou globalement diluer la réaction ralentit voire évite cette prise en masse mais il semble également qu'augmenter la proportion d'éthanol diminue le rendement. Après optimisation des conditions, on obtient à une concentration de 0.15 M, avec un ratio THF/EtOH de 5 pour 1 comme solvant et avec un ajout par portions de  $\text{LiBH}_4$ , l'alcool **[121]** avec un rendement de 90 % (Tableau 4).

**Tableau 4** : Optimisation des conditions de solvant pour la réduction avec  $\text{LiBH}_4$ 

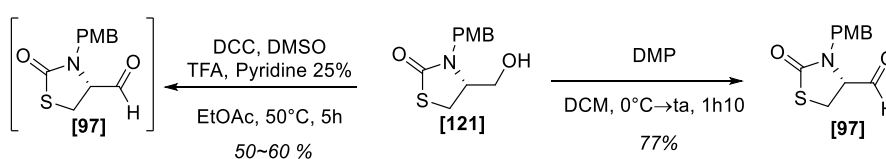
$\text{LiBH}_4$	THF:EtOH	Concentration globale	Durée	Rendement
2.5 eq	7:1	0.35 M	16h	43 %
2.5 eq	6:1	0.3 M	24h	68 %
3 eq	4:1	0.2 M	16h	65 %
3 eq	1:1	0.1 M	16h	64 %
3 + 1 eq	5:1	0.1 M	2 x 1h	70 %
2 x 2.0 eq	6:1	0.25 M	10h + 20h	77 %
<b>2 X 1.0 eq</b>	<b>5:1</b>	<b>0.15 M</b>	<b>2 x 30min</b>	<b>90 %</b>

A la différence de tous les produits obtenus jusqu'à maintenant qui sont des huiles plus ou moins visqueuses, ce produit est un solide lorsqu'il est parfaitement pur. En particulier, à la sortie de la purification par colonne, il peut être laissé sous vide pour évaporer les restes d'acétate d'éthyle et va cristalliser spontanément dans ces conditions. La structure par diffraction des rayons X a été obtenue et permet d'observer la configuration du centre chiral (Figure 48).

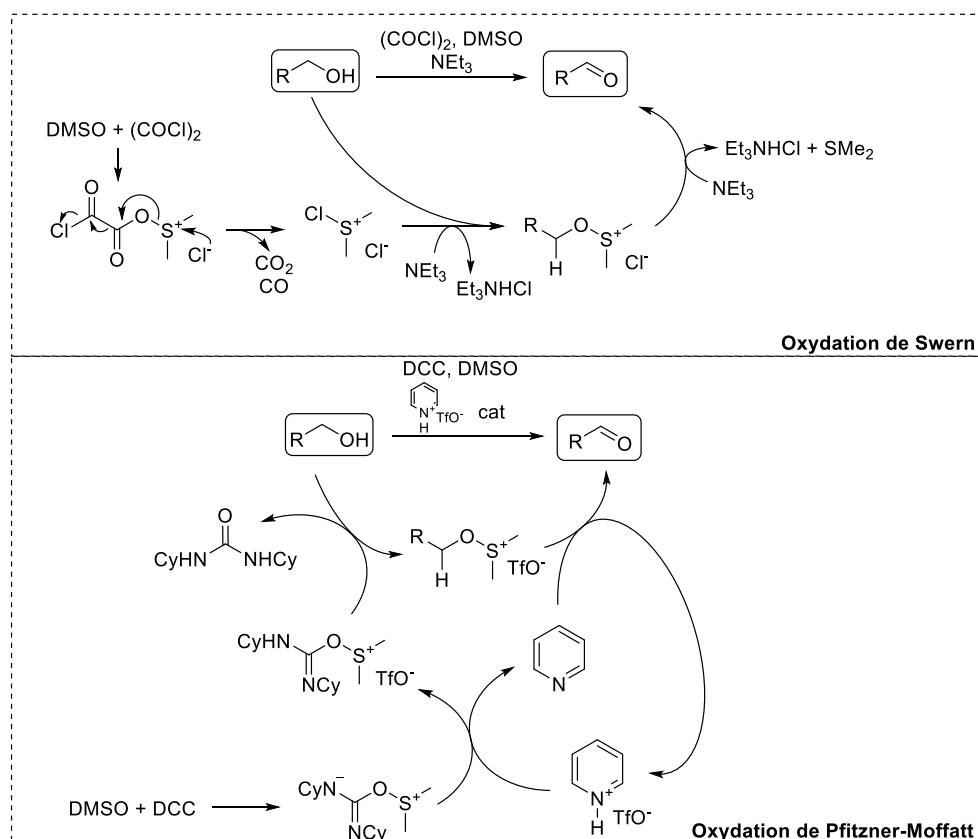


**Figure 48** : Représentation de la structure de diffraction des rayons X de **[121]**, déterminée par Nicolas Casaretto du Laboratoire de Chimie Moléculaire de l'École Polytechnique

Il existe beaucoup de conditions pour l'oxydation d'un alcool en aldéhyde mais la présence du centre chiral en  $\alpha$  de l'aldéhyde souhaité **[97]** va proscrire toute méthode en conditions basiques. Cela va notamment exclure la très commune oxydation de Swern. Le variant *N*-benzyle, à la différence du *N*-PMB présent sur le produit ici, a déjà été oxydé sous une variété de conditions et en effet, les réactions de Swern causent une isomérisation. En revanche, l'oxydation de Pfitzner–Moffatt, réaction similaire mais plus ancienne que l'oxydation de Swern, se réalisant en milieu acide, se montre efficace et ne cause pas de racémisation.<sup>94</sup> Cette réaction utilise la combinaison du DMSO comme oxydant, du DCC comme agent déshydratant et du triflate de pyridinium en quantité catalytique. Dans ces conditions, la conversion est complète et un produit peut être isolé par chromatographie sur colonne. En RMN du proton, on observe un produit ressemblant à l'aldéhyde souhaité **[97]** mais le pic du proton au pied de l'aldéhyde a une intégration assez faible et les autres signaux sont assez mal définis. Cela fait penser à une espèce oligo ou polymérique comme cela s'observe occasionnellement avec les aldéhydes peu encombrés. Cette méthode donne un rendement peu fiable entre 50 et 60 % (Figure 49). L'oxydation de Dess-Martin a également été envisagée car se déroulant également en conditions douces et légèrement acides. L'alcool de départ **[121]** et le DMP réagissent rapidement et après précipitation et filtration d'une majeure partie des dérivés iodés résultants, un produit peut être purifié par chromatographie sur colonne. L'aldéhyde obtenu **[97]** présente cette fois-ci des signaux bien définis en RMN et est isolé avec un rendement de 77 % (Figure 49).



**Figure 49** : Différentes oxydations de l'alcool **[121]** en aldéhyde **[97]**

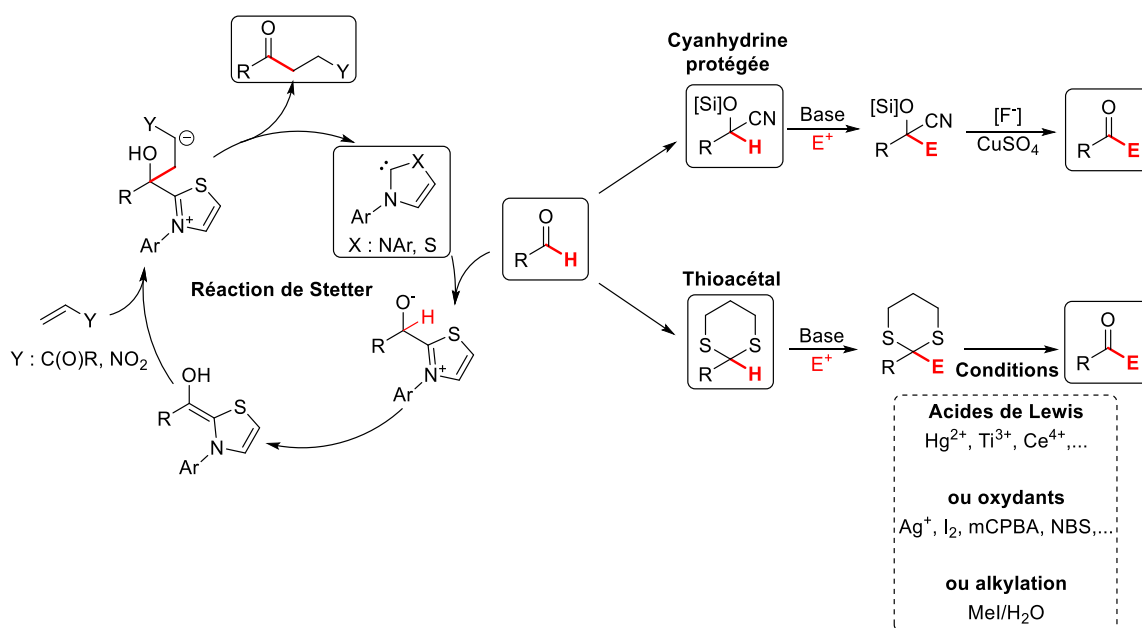


**Figure 50** : Comparaison mécanistique entre les oxydations de Pfitzner–Moffatt et de Swern

L'aldéhyde obtenu, la question de la nature de la réaction umpolung la plus judicieuse se pose. La réaction de Stetter est un moyen pratique pour faire une addition umpolung car elle utilise directement l'aldéhyde, en catalysant la réaction avec un carbène, usuellement un NHC. Cette réaction est très performante mais est malheureusement limitée au niveau des partenaires électrophiles. En effet, la réaction ne marche que sur de systèmes insaturés de types carbonyles  $\alpha,\beta$  insaturés ou nitros vinyliques.<sup>95</sup> Cette méthode ne peut donc pas être adaptée ici. La manière plus générale de faire une addition umpolung est de transformer l'aldéhyde en un groupement rendant acide le proton aldéhydique et ensuite de le déprotomer pour former un anion nucléophile. Pour cela, on peut passer par différents groupements. Le thioacétal est efficace car l'anion formé à son pied peut être ajouté sur une grande variété d'électrophiles et peut aussi substituer différents groupes partants. Le problème des thioacétals est la déprotection. Les conditions pour reformer le carbonyle correspondant sont en général assez dures (oxydation forte ou puissants acides de Lewis) et la molécule hautement fonctionnalisée qui résultera de l'addition umpolung n'y sera sûrement pas

(95) Heravi, M. M., Zadsirjan, V., Kafshdarzadeh, K., Amiri, Z. Recent Advances in Stetter Reaction and Related Chemistry: An Update. *Asian J. Org. Chem.* **2020**, *9* (12), 1999–2034.

compatible.<sup>96</sup> L'attention a été portée sur la cyanhydrine, un autre groupement utilisable pour les additions umpolung.<sup>97,98</sup> La cyanhydrine peut être formée directement à partir d'un aldéhyde et après protection de l'alcool résultant, le proton en  $\alpha$  du nitrile devient le seul proton acide. La déprotection peut se faire en conditions relativement douces car après déprotection de l'alcool au pied de la cyanhydrine, l'utilisation de sulfate de cuivre permet de retirer le nitrile en profitant de l'affinité particulière entre le cyanure et le cuivre (Figure 51).<sup>99</sup> La synthèse de ce fragment a donc été prolongée à la formation de la cyanhydrine protégée [123]. En particulier, la synthèse d'une cyanhydrine protégée par un groupement silylé a été visée.



**Figure 51** : Différentes voies usuelles pour l'utilisation de la réactivité umpolung d'un aldéhyde<sup>96-99</sup>

- (96) Burghardt, T. E. Developments in the Deprotection of Thioacetals. *J. Sulfur Chem.* **2005**, *26* (4-5), 411-427.
- (97) Deuchert, K., Hertenstein, U., Hünig, S. Nucleophile Acylierung mit verkappten Acylanionen. *Synthesis* **1973**, *1973* (12), 777-779.
- (98) Majhi, J., Turnbull, B. W. H., Ryu, H., Park, J., Baik, M.-H., Evans, P. A. Dynamic Kinetic Resolution of Alkenyl Cyanohydrins Derived from  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Aldehydes: Stereoselective Synthesis of *E*-Tetrasubstituted Olefins. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (30), 11770-11774.
- (99) Liu, C.-Y., Ren, H., Knochel, P. Magnesiated Unsaturated Silylated Cyanohydrins as Synthetic Equivalents of Aromatic and Heterocyclic Grignard Reagents Bearing a Ketone or an Aldehyde. *Org. Lett.* **2006**, *8* (4), 617-619.

La première tentative a été d'utiliser TMS-CN, un réactif qui permet de former la cyanhydrine protégée par un TMS en une étape. En traitant l'aldéhyde avec ce réactif et en présence de quantité catalytique de  $ZnI_2$ , on observe la formation d'un unique produit par CCM. Après purification par chromatographie sur colonne, ce produit est néanmoins isolé avec un faible rendement de 14 %. (Figure 52 Voie A). Il semblerait donc que ce produit ne soit pas stable sur silice. Il a été en effet remarqué qu'en repassant ce produit sur une colonne de silice, on peut isoler la cyanhydrine non protégée **[122]** en prolongeant la chromatographie avec un éluant plus polaire. Le groupement TMS ne s'avère donc pas stable et l'utilisation d'un TBS, beaucoup plus encombré mais nécessitant deux étapes de synthèse, a été envisagée. La cyanhydrine **[122]** a été préparée et ensuite protégée avec le groupement TBS.

La formation de la cyanhydrine **[122]** peut d'abord être faite par traitement de l'aldéhyde **[97]** par un mélange de KCN et d'AcOH. Cette combinaison permet de générer HCN *in situ* qui réagit sur l'aldéhyde pour former la cyanhydrine. Un grand soin doit être porté à basifier l'ensemble des solutions ayant été en contact avec le mélange réactionnel pour éviter toute émanation de HCN gazeux. Cette réaction a été faite à partir des différents lots d'aldéhyde **[97]** préparés par les deux différentes méthodes. Étonnement, les réactions faites à partir de l'aldéhyde préparée par oxydation de Dess-Martin ou celle à partir de l'aldéhyde d'apparence oligo ou polymérique préparée par oxydation de Pfitzner–Moffatt ont toutes deux donné des rendements identiques, aux variations expérimentales près, de respectivement 74 et 76 %. La cyanhydrine obtenue **[122]** est présente sous forme d'une paire de diastéréoisomères dans des proportions d'environ 60:40 (Figure 52 Voie B).

La protection de la cyanhydrine **[122]** par un TBS peut se faire dans les mêmes conditions qu'avec un alcool classique. Avec TBS-Cl et l'imidazole comme base, la conversion est relativement lente mais le produit **[123]** est obtenu avec un rendement de 68 % (Figure 52 Voie B). Le produit est stable sur silice et peut être purifié par chromatographie sur colonne.

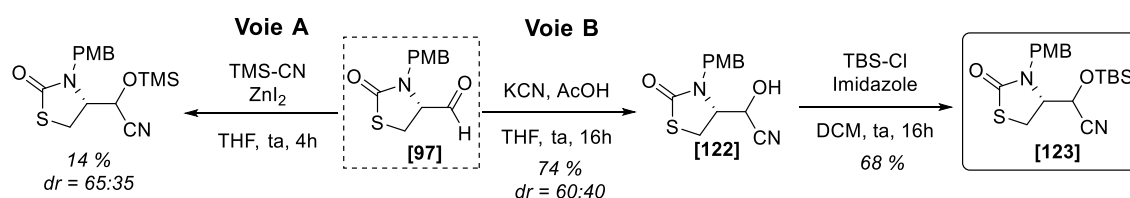


Figure 52 : Formation de la cyanhydrine protégée

L'obtention de la cyanhydrine protégée **[123]** conclut la synthèse de ce dernier fragment qui a été obtenu en 6 étapes avec un rendement global de 22 % (Figure 52).

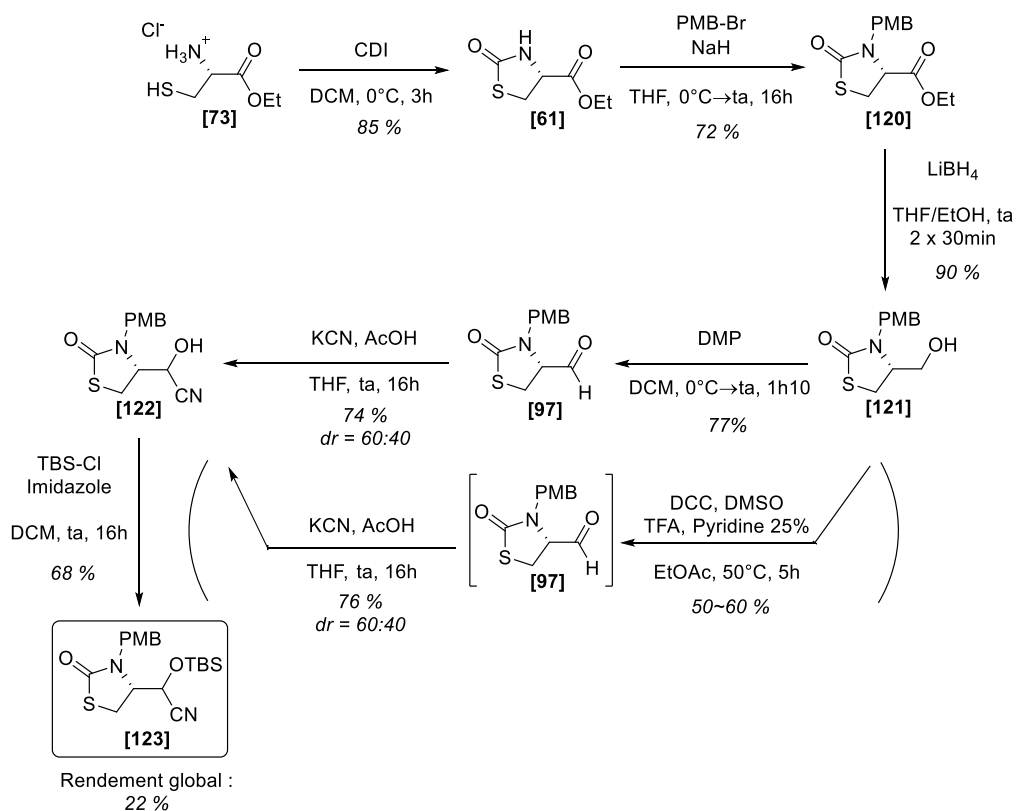


Figure 53 : Synthèse du fragment C



## 2.2.5 Tentatives d'estérification des fragments A et B

On trouve dans la littérature des exemples de substitution d'halogènes par les cyanhydrines protégées mais très peu d'ouverture d'époxydes.<sup>97</sup> La stratégie de synthèse a donc été d'ouvrir l'époxyde du fragment A en bromohydrine, donnant accès à un dérivé bromé plus réactif. La bromohydrine **[116]** ne peut néanmoins pas être utilisée comme partenaire électrophile étant donnée la présence de l'alcool. La stratégie de synthèse a donc été pensée pour d'abord combiner les fragments A **[116]** et B **[98]** par estérification avant l'addition de la cyanhydrine protégée du dernier fragment C. Cela permet de protéger l'alcool tout en faisant progresser la synthèse sans ajouter d'étape. La métathèse cyclisante peut être envisagée avant ou après l'addition du dernier fragment (Figure 54).

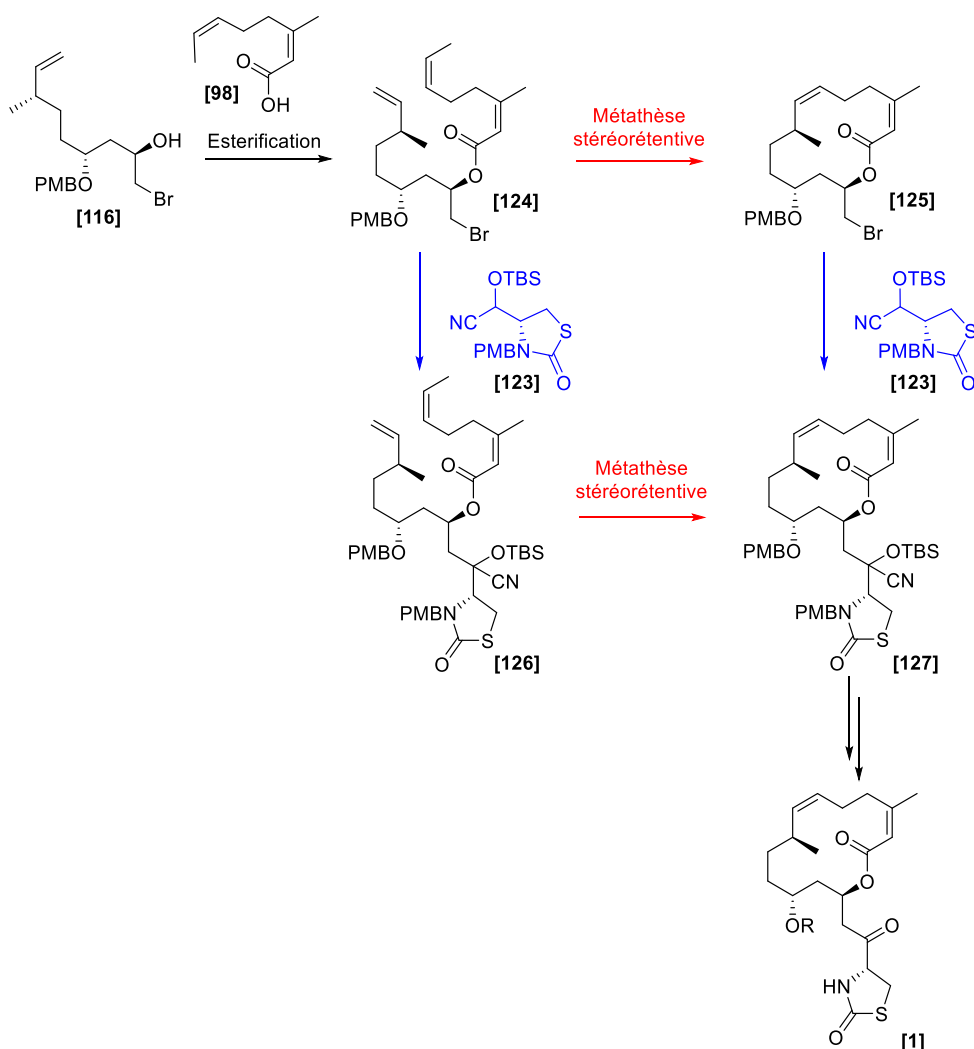
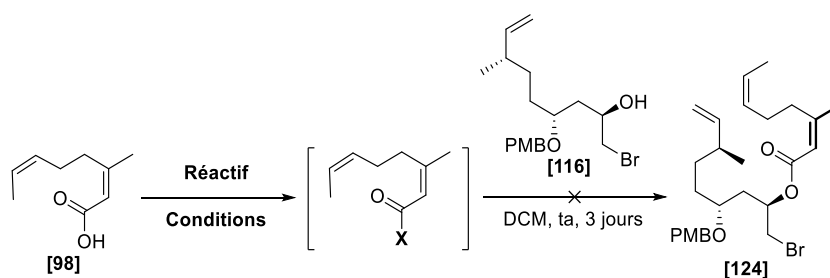
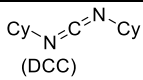
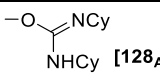
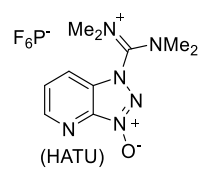
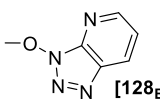
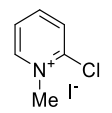
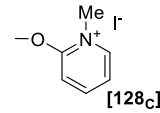
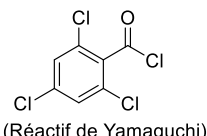
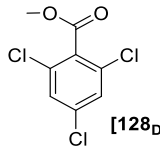


Figure 54 : Stratégies d'assemblage des fragments

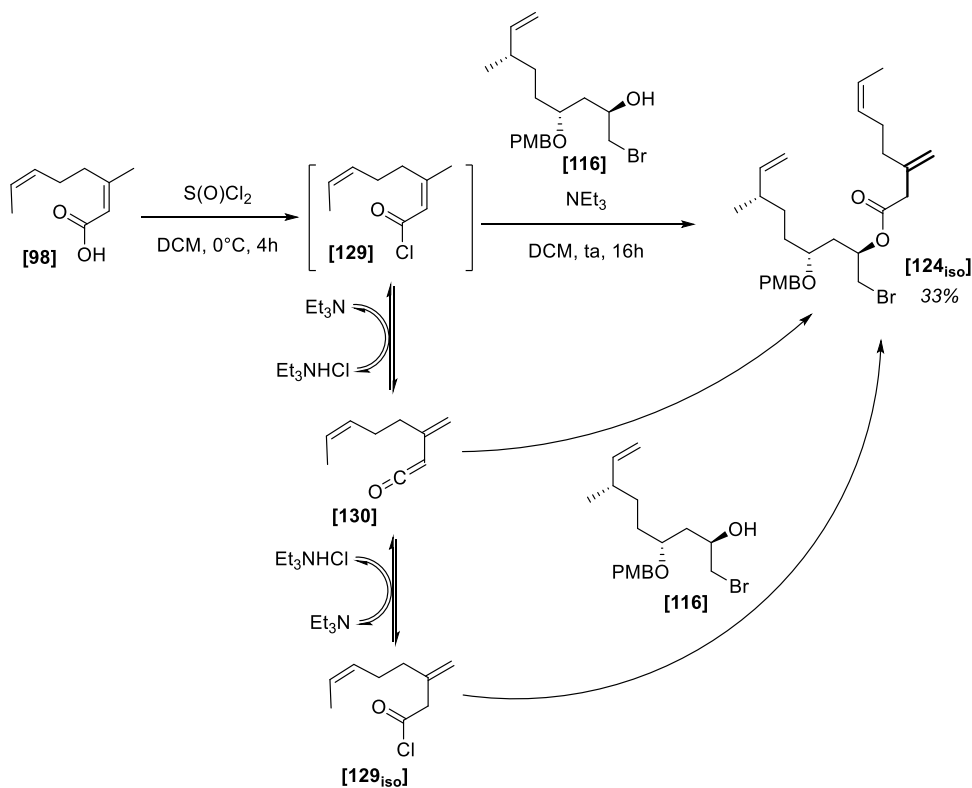
En raison de la configuration du carbone C13 sur le fragment A **[116]**, la formation de l'ester doit se faire par estérification sans inversion de configuration. Les premiers essais ont porté sur les conditions standards d'estérification avec le DCC comme agent de couplage. Dans le DCM ou le DMF en présence de  $\text{NEt}_3$  et de DMAP en quantités stœchiométriques ou catalytique, l'adduit entre l'acide carboxylique du fragment B **[98]** et le DCC est observé mais l'estérification ne se produit pas. Un chauffage jusqu'à  $70^\circ\text{C}$  n'a pas permis de faire démarrer la conversion. Au-delà de  $50^\circ\text{C}$ , on commence à observer la fermeture de la bromohydrine du fragment A **[116]** pour redonner l'époxyde **[96]**. Cette température a donc été considérée comme la limite pour les réactions d'estérification. D'autres agents de couplage ont été testés. Le réactif de Yamaguchi, le HATU et l'iodure de *N*-méthyl-2-chloropyridinium ont tous réagi avec l'acide carboxylique en conditions basiques mais aucun des adduits formés **[128<sub>A-D</sub>]** n'est attaqué par l'alcool du fragment A (Tableau 5). L'alcool du fragment A semble extrêmement peu réactif, sûrement à cause des effets attracteurs du brome en  $\alpha$ .

**Tableau 5** : Tentatives d'estérification avec des agents de couplage



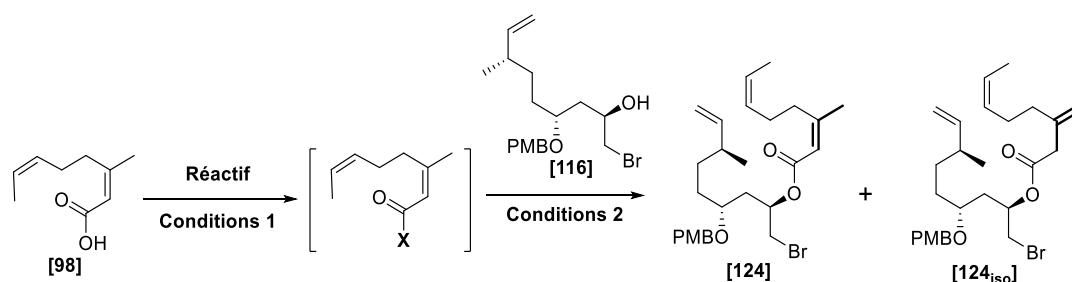
Réactif	Conditions	X	Résultat
 (DCC)	$\text{NEt}_3$ DCM, ta, 1h	 <b>[128<sub>A</sub>]</b>	Pas de réaction
 (HATU)	$\text{NEt}_3$ DCM, ta, 1h	 <b>[128<sub>B</sub>]</b>	Pas de réaction
 	$\text{NEt}_3$ DCM, ta, 1h	 <b>[128<sub>C</sub>]</b>	Pas de réaction
 (Réactif de Yamaguchi)	$\text{NEt}_3$ DCM, ta, 1h	 <b>[128<sub>D</sub>]</b>	Pas de réaction


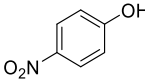
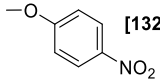
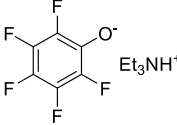
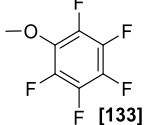
La transformation de l'acide carboxylique **[98]** en une espèce suffisamment électrophile pour être attaquée par cet alcool particulièrement peu réactif a été envisagée. L'utilisation d'un chlorure d'acyle est une option usuelle et celui correspondant **[129]** a été préparé directement en traitant l'acide carboxylique **[98]** avec du chlorure de thionyle. Le produit n'est pas purifié mais l'excès de chlorure de thionyle peut être évaporé et le mélange brut réactionnel engagé directement pour l'estérification. Toujours dans le DCM avec  $\text{NEt}_3$  comme base, la réaction progresse et un produit ressemblant à l'ester attendu a pu être isolé par chromatographie sur colonne avec un rendement modeste de 33 %. Après une analyse attentive de la RMN du proton, on a remarqué qu'il s'agissait d'un isomère du produit attendu **[124<sub>iso</sub>]**, la double liaison en  $\alpha,\beta$  de l'ester ayant migré sur le méthyle. Une explication possible pour cette réactivité inattendue est une isomérisation de la double liaison du chlorure d'acyle **[129]** par déprotonation en  $\gamma$  du méthyle suivie de la formation du cétène **[130]** par élimination du chlorure. Après retour du chlorure, le nouvel anion peut être formé en  $\alpha$  ou en  $\gamma$ , redonnant après protonation respectivement le chlorure d'acyle isomérisé **[129<sub>iso</sub>]** et le produit de départ **[129]**. Si l'équilibre est rapide et tend vers le produit isomérisé **[129<sub>iso</sub>]**, alors l'isomérisation aura lieu avant l'addition de l'alcool pour former l'ester. Il se peut aussi que l'espèce électrophile attaquée par l'alcool ne soit que le cétène **[130]**, expliquant aussi la sélectivité pour le produit isomérisé **[124<sub>iso</sub>]** (Figure 55).



**Figure 55** : Isomérisation lors de l'estérification par le chlorure d'acyle

Face à la faible réactivité de l'alcool du fragment A **[116]**, la limite à 50°C pour éviter la fermeture de la bromohydrine en époxyde et le problème d'isomérisation du fragment B, il semble délicat de trouver des conditions dans laquelle l'estérification peut se faire de manière souhaitée. Des activations moins fortes que l'utilisation du chlorure d'acyle ont été testées pour essayer de trouver une plage dans laquelle l'estérification sans l'isomérisation arriverait. Les fluorures d'acyles sont moins utilisés que les chlorures mais sont également intéressants car ils donnent des espèces plus stables mais toutefois réactives. En particulier, les fluorures d'acyle sont stables à l'hydrolyse sur silice. Le fluorure d'acyle **[131]** a pu être formé en traitant l'acide carboxylique **[98]** avec l'agent fluorant DAST, a été purifié par chromatographie sur colonne et engagé directement dans la réaction d'estérification avec l'alcool du fragment A **[116]**. Dans le DCM avec la DiPEA comme base, la réaction a donné cette fois-ci peu de conversion mais un mélange de l'ester isomérisé **[124<sub>iso</sub>]** et de l'ester attendu **[124]** en proportions 57:43 a pu être isolé. Cette activation est donc encore un peu trop forte car l'isomérisation reste majoritaire. La formation d'esters avec d'autres bons groupements partants a été essayée pour former des espèces un peu moins activées. Des esters de *para*-nitrophénol **[132]** et de pentafluorophénol **[133]** ont pu être préparés par estérification des phénols respectifs avec l'acide carboxylique **[98]** en utilisant le DCC comme agent de couplage (le sel de triéthylamine du pentafluorophénol a été préparé et utilisé ici car c'est une poudre plus facile à manipuler que le pentafluorophénol qui est un solide amorphe et collant). Ces esters **[132]** et **[133]** ont pu être séparés par chromatographie sur colonne et engagés directement dans la transestérification avec l'alcool du fragment A **[116]**. Dans les deux cas, aucune conversion n'est observée (Tableau 6). L'activation est cette fois-ci trop faible.

**Tableau 6** : Formation d'espèces activés de l'acide carboxylique pour l'estérification

Réactif	Conditions 1	X	Conditions 2	Rendement	[124]:[124 <sub>iso</sub> ]
S(O)Cl <sub>2</sub>	DCM, 0°C, 4h	-Cl <b>[129]</b>	NEt <sub>3</sub> DCM, ta, 16h	33 %	0:100
 (DAST)	DCM, -78°C, 30min	-F <b>[131]</b>	DiPEA DCM, ta, 24h	ND*	43:57
	DCC, NEt <sub>3</sub> DCM, 50°C, 2h	 <b>[132]</b>	NEt <sub>3</sub> DCM, 40°C, 16h	Pas de réaction	
	DCC, NEt <sub>3</sub> DCM, ta, 16h	 <b>[133]</b>	NEt <sub>3</sub> DCM, 40°C, 16h	Pas de réaction	

\* réaction sur petite échelle, le rendement n'a pas été mesuré

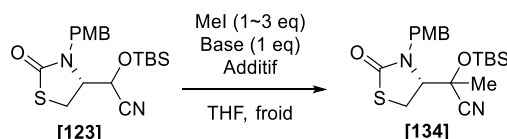
### 2.2.6 Tentatives d'addition umpolung

En parallèle des tentatives d'estérification, des conditions pour l'addition umpolung ont été recherchées. Dans un premier temps, la réactivité simple de la cyanhydrine du fragment C **[123]** a été explorée. Comme électrophile modèle, l'iodométhane a été utilisé et différentes conditions basiques ont été testées. Le proton de la cyanhydrine protégée requiert des bases assez fortes pour la déprotonation. En général, des amidures sont utilisés. Comme pour beaucoup d'addition d'espèces organométalliques, des additifs chélatant comme le HMPA ou le TMEDA peuvent être ajoutés pour stabiliser l'anion formé, briser des agrégats et de manière générale améliorer les cinétiques d'addition. Plusieurs jeux de conditions ont été testés et dans tous les cas, on observe un changement de couleur vers l'orange plus ou moins net, indiquant la formation de l'anion. On observe qu'avec les bases encombrées, il n'y a aucune conversion. Le produit de départ **[123]** a pu être récupéré et un

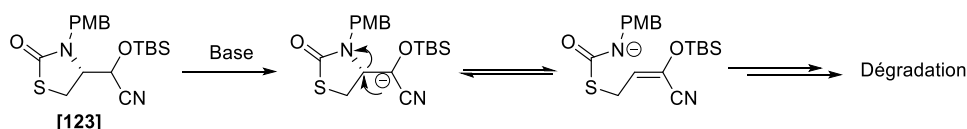
changement du rapport diastéréoisomérique peut être remarqué. Cela indique que la déprotonation a bien lieu, au moins partiellement. La cyanhydrine protégée ayant été formée en deux temps, le rapport diastéréoisomérique initial est celui dicté par l'addition de HCN sur l'aldéhyde [97]. Si ce centre a la possibilité de s'isomériser, on peut comprendre qu'il ne se reforme pas dans les mêmes proportions étant donné l'encombrement stérique supplémentaire du groupement TBS désormais présent. A part cette différence, il n'y a pas de réaction. Avec le diméthylamidure de lithium ou le n-butyllithium, des conversions respectivement complète et partielle sont observées.

Les produits obtenus n'ont pas pu être identifiés mais on a pu voir par RMN qu'avec le n-butyllithium, il s'agissait majoritairement de produits résultants de l'addition d'un groupement butyle, une réactivité différente de celle souhaitée. Avec le diméthylamidure de lithium, aucun produit ressemblant à celui attendu n'est observé (Tableau 7). On ne voit en RMN aucun méthyle ressemblant à celui du produit attendu [134] et on ne retrouve pas l'intégralité du squelette. La présence du groupement PMB et la polarité des produits observés laisse penser que le produit se dégrade, sûrement par élimination de l'azote du cycle conduisant à un thiocarbamate (Figure 56). Une explication possible est l'encombrement stérique du TBS et de l'hétérocycle qui ne rend pas l'anion formé accessible, laissant donc le temps à des réactions secondaires d'apparaître.

**Tableau 7** : Réactivité de la cyanhydrine protégée en fonction de la base



Base	Additif	Température	Conversion	Produits observés
LDA	∅	-78°C	Aucune	∅
LDA	HMPA	-78°C	Aucune	∅
Et <sub>2</sub> NLi	TMEDA	-95°C	Aucune	∅
<b>Me<sub>2</sub>NLi</b>	<b>TMEDA</b>	<b>-95°C</b>	<b>Complète</b>	<b>Dégradation</b>
nBuLi	TMEDA	-95°C	Partielle	Dégradation



**Figure 56** : Potentielle réaction secondaire d'élimination

Étant donné que cette réaction échoue avec l'iodométhane comme électrophile, il y a peu d'espoir sur un dérivé complexe comme celui prévu. Cette addition de cyanhydrine protégée a donc été abandonnée.

L'utilisation d'autres groupements électroattracteurs pour permettre la déprotonation de cette position a toutefois été envisagée. En effet, il existe plusieurs autres groupements stables capables de rendre acide un proton en  $\alpha$ . La formation d'un dérivé nitro **[136]** et d'une sulfone **[139]** à partir de l'alcool **[121]** a été réalisé mais ces deux dérivés n'ont malheureusement pas permis d'effectuer la substitution en  $\alpha$  sur l'iodométhane (Figure 57). Le travail portant sur ces composés est détaillé dans l'Annexe 1.

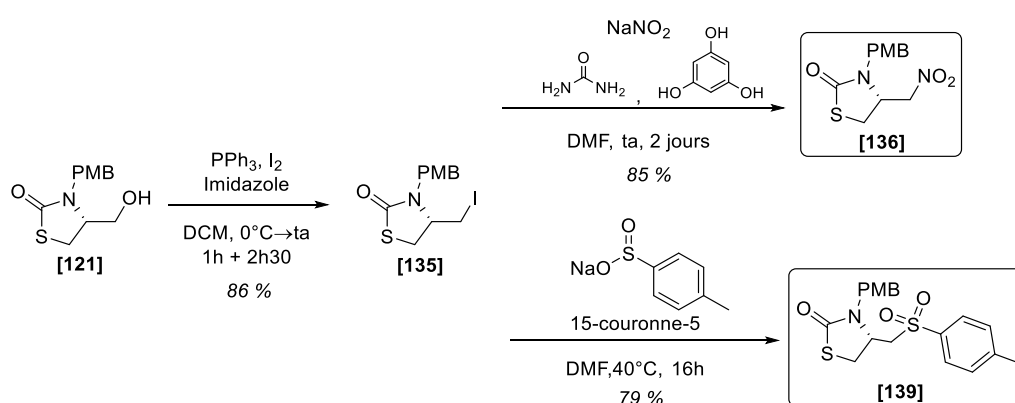


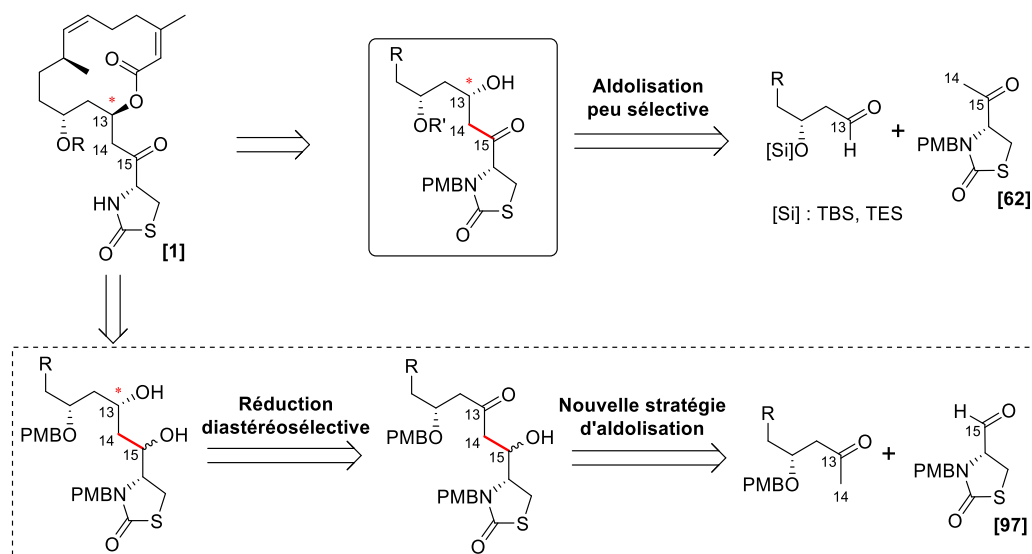
Figure 57 : Synthèse du dérivé nitro **[136]** et de la sulfone **[139]**

À ce stade, les deux étapes clés de combinaison des fragments n'ayant pas abouti, le choix d'abandonner cette stratégie de synthèse et de repartir sur une nouvelle approche a été décidée.

## 2.3 Adaptation de la stratégie de synthèse

## 2.3.1 Adaptation de la rétrosynthèse

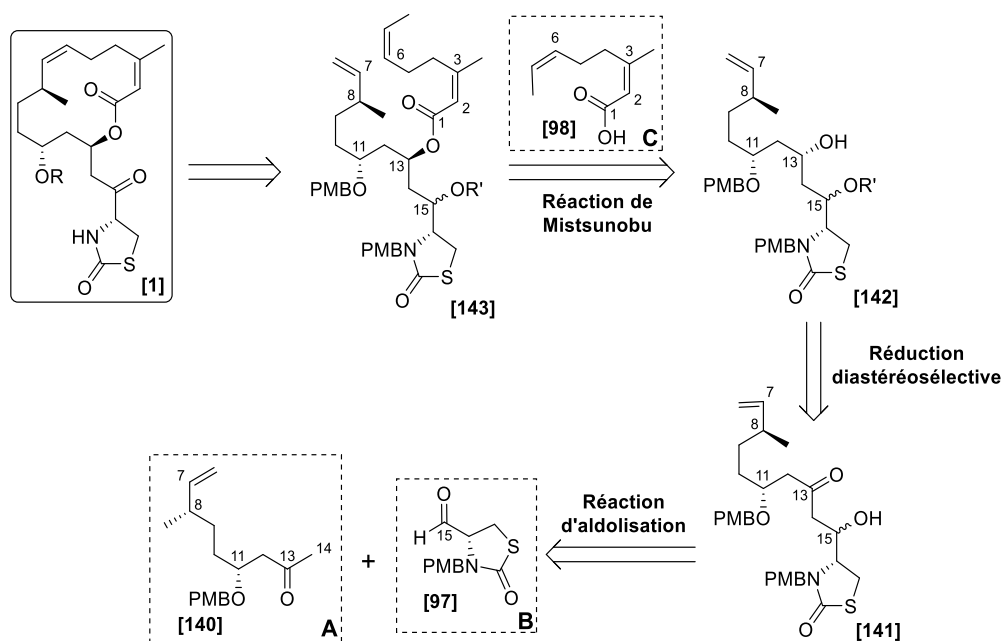
Les deux étapes clefs de couplage des fragments ayant échoué, une nouvelle stratégie a été pensée. En particulier, il fallait revoir la formation de la liaison entre les fragments A et C. On sait de la littérature que l'aldolisation de la cétone en C15 sur l'aldéhyde en C13 est peu sélective mais dans l'autre sens, à cause de la présence de l'hétérocycle, une réaction d'aldolisation d'une cétone en C13 vers un aldéhyde en C15 n'a jamais été décrite et pourrait avoir une meilleure sélectivité (Figure 58).<sup>73,76,82</sup> Cette option est intéressante car elle est basée sur une réaction a priori fiable et avec un haut potentiel d'optimisation. En effet, on devrait trouver dans l'immense littérature décrivant les réactions d'aldol des conditions donnant une stéréosélectivité convenable pour cette réaction. Cette nouvelle option présente néanmoins un désavantage, et c'est pour cela qu'elle n'avait pas été abordée initialement, qu'est l'utilisation d'une cétone en C13 et de ce fait l'absence de chiralité à ce centre. En revanche, la réaction fournira un alcool chiral en C15 et grâce aux nombreuses méthodes disponibles pour réduire les  $\beta$ -hydroxy cétones comme celle que l'on devrait obtenir, il est possible de transférer la chiralité du centre en C15 au centre en C13. Des conditions pour fournir sélectivement l'alcool en C13 *syn* ou *anti* pourront être choisies en fonction de la configuration obtenue en C15 lors de la réaction d'aldolisation. Ceci est particulièrement important ici étant donnée l'apparente difficulté qu'il y a de faire l'estérification entre l'alcool en C13 et l'acide carboxylique du fragment B. En formant le centre C13 de configuration (S) inverse à celle souhaitée sur la molécule finale, une réaction de ou de type Mitsunobu pourra être utilisée pour l'inverser. On pourra même se baser sur des méthodes décrites dans les synthèses précédentes de la littérature.



**Figure 58** : Déconnexions possibles par réaction d'aldolisation de la liaison C14 – C15



Cette nouvelle stratégie nécessite de réaliser des adaptations fonctionnelles sur les fragments. Un nouveau fragment A **[140]** portant une méthylcétone en C13 sera couplée par réaction d'aldolisation à un aldéhyde en C15 porté par le fragment C **[97]**, aldéhyde déjà synthétisé précédemment. L'alcool chiral en C15 résultant **[141]** pourra être utilisé pour transférer la chiralité au carbone en C13 par réduction diastéréosélective de la cétone. Une réaction de substitution nucléophile S<sub>N</sub>2 pourra être réalisée à partir du nouvel alcool de configuration (S) en C13 **[142]** et un fragment B **[98]** identique au précédent. La synthèse pourra se conclure de la même manière que la stratégie précédente avec la métathèse cyclisante, le placement du groupement photolabile mais inclura une étape supplémentaire de réoxydation de l'alcool en C15 pour faire la cétone (Figure 59).



**Figure 59** : Rétrosynthèse de la nouvelle stratégie

### 2.3.2 Synthèse des fragments modifiés

En pratique, seul le fragment A est à modifier, le fragment C s'arrêtant désormais simplement à l'aldéhyde et le fragment B étant identique.

Le nouveau fragment A diffère du précédent par la présence de la méthylcétone en C13 à la place de l'époxyde (ouvert sous forme de bromohydrine **[116]** ou fermé **[96]**) en C13 et C14. Cette variation n'affecte pas le début de la synthèse car elle est placée sur une partie de la molécule qui n'est fonctionnalisée que dans les étapes plus tardives. On peut réutiliser les premières étapes d'ozonolyse et d'allylation pour assurer la formation de l'alcool chiral en C11 et avoir un alcène en C13 et C14 sur lequel pourra se porter la fonctionnalisation.

A ce stade, plusieurs options ont été explorées. La double liaison en C13 et C14 peut être directement oxydée en cétone par une oxydation de Wacker, mais il y a un risque en termes de régiosélectivité à cause de l'autre alcène. L'époxyde **[101]** en C13 et C14 peut également être utilisé comme précurseur, la cétone souhaitée pouvant être ensuite obtenue par réarrangement de l'époxyde. En effet, il existe des conditions pour permettre une migration d'hydrure [1,2] donnant la cétone à partir de l'époxyde. Une autre méthode en deux temps consisterait à réduire l'époxyde en alcool, suivie d'une oxydation en cétone (Figure 60).

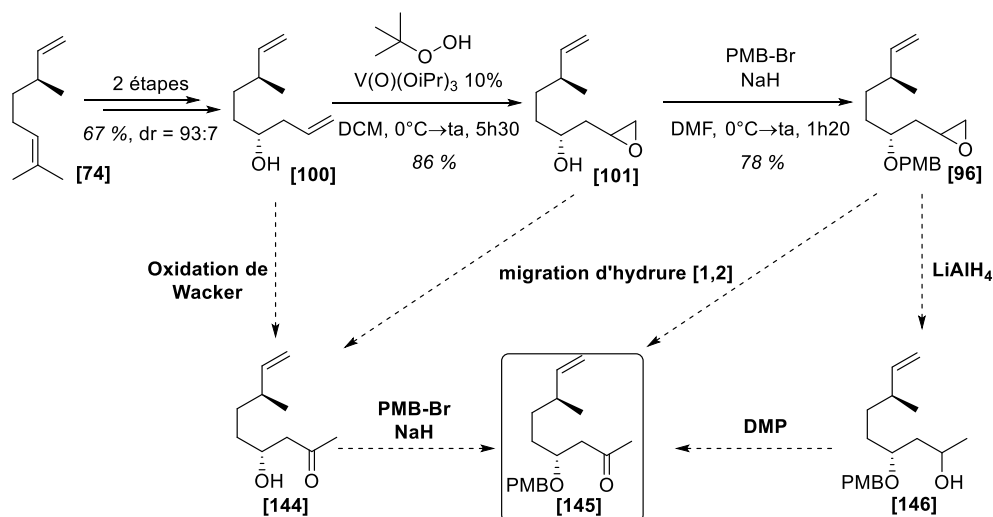


Figure 60 : Voies de synthèses envisagées pour le nouveau fragment A

L'oxydation de Wacker permet de transformer un alcène en cétone. La réaction est catalysée au palladium en présence d'un oxydant extérieur.<sup>100</sup> La combinaison  $\text{Cu}(\text{OAc})_2/\text{O}_2$  et le  $\text{CrO}_3$  ont été testés comme oxydants en présence de  $\text{PdCl}_2$ . Dans les deux cas, le substrat **[100]** est transformé en un mélange de différents produits d'oxydation en proportions similaires, résultant des oxydations non sélectives sur les deux différents alcènes (Figure 61). L'alcool ne semblant pas diriger la sélectivité, il a été décidé de passer par l'époxyde afin de profiter de la régiosélectivité obtenue précédemment.

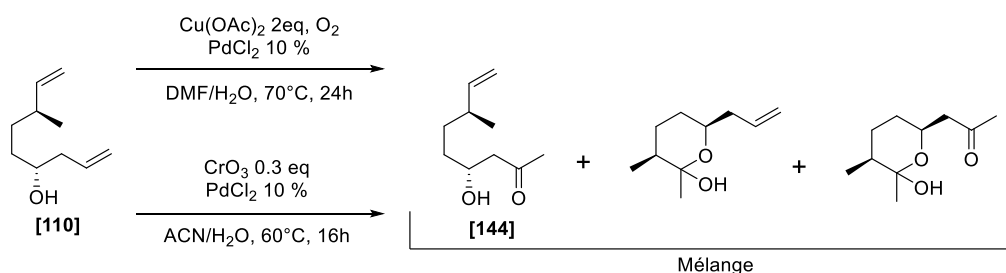


Figure 61 : Oxydations de Wacker essayées

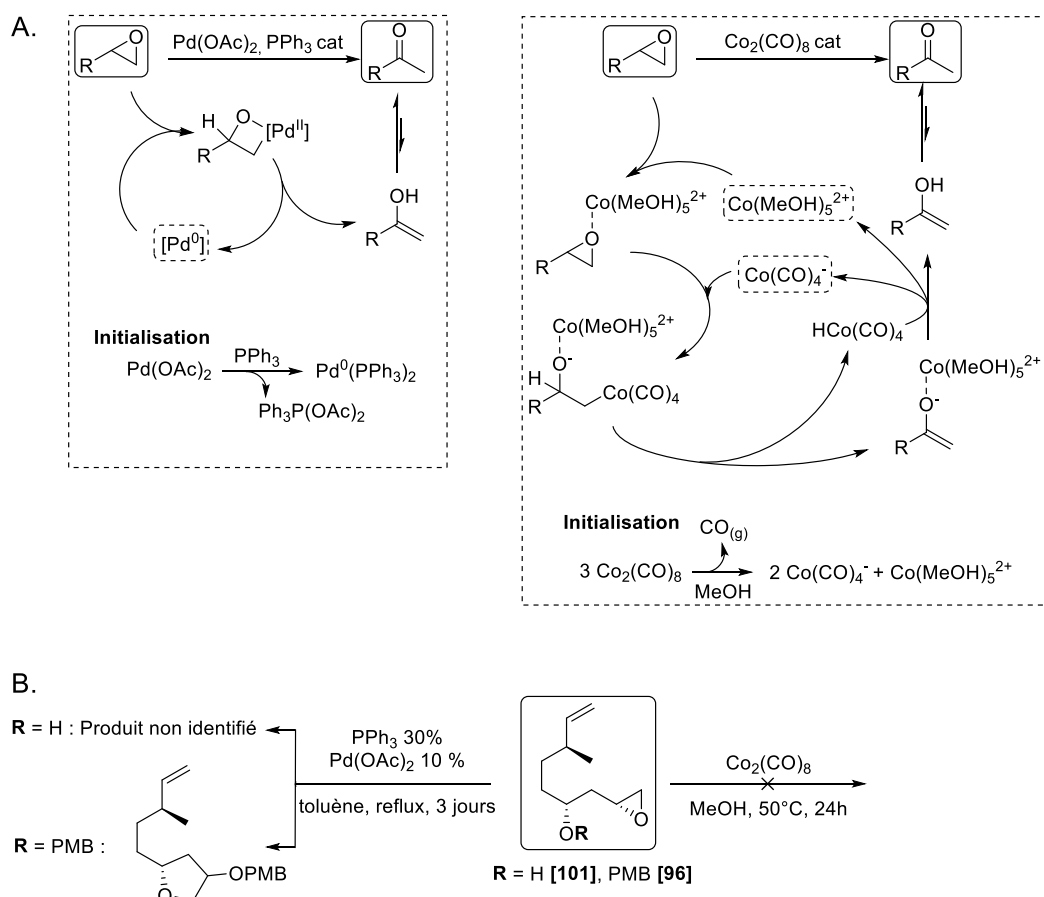
Étant donné que cette nouvelle stratégie de synthèse ne vise pas à former maintenant le centre chiral en C13, la diastéréoisomérisation de l'époxydation n'a plus d'importance. On peut revenir en arrière dans l'optimisation réalisée précédemment et simplement se concentrer sur le rendement. En restant à température ambiante, on peut baisser la charge catalytique à 10% et atteindre des rendements légèrement meilleurs que précédemment en seulement quelques heures. L'époxyde **[101]** peut être obtenu avec un rendement de 86 % en quelques heures (Tableau 1).

Le réarrangement de l'époxyde en méthylcétone a ensuite été tenté après protection par un PMB pour éviter une potentielle interférence de l'alcool libre de **[101]**. Cette transformation peut se faire de plusieurs manières. L'insertion d'un palladium(0) dans la liaison C-O suivi d'une  $\beta$ -élimination donne un énol qui fournit la cétone par tautomérie. Avec  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  et trois équivalents de triphénylphosphine, on peut générer un complexe de palladium(0) diphosphine nécessaire à la réaction *in situ* (Figure 62 A).<sup>101</sup> L'époxyde **[96]** a été placé dans ces conditions et chauffé à reflux dans le toluène. On n'observe que la formation d'un produit inattendu. L'analyse de la RMN semble indiquer qu'il y a eu ouverture de l'époxyde et transfert du groupement PMB (Figure 62 B). On n'obtient en tout cas pas la réactivité de transfert d'hydrure espérée. Cette réaction a été essayée avec l'alcool libre **[101]** au cas où le PMB poserait un problème. Dans les mêmes conditions, un nouveau produit inattendu a été obtenu mais n'a pas pu être identifié (Figure 62 B). Il ne correspond en tout cas pas à celui attendu.

Il est également possible d'utiliser le complexe dicobalt octacarbonyle dans le méthanol pour faire cette transformation. En effet, ce complexe dimérique peut être brisé par le méthanol pour former une espèce nucléophile  $\text{Co}(\text{CO})_4^-$  et une espèce acide de Lewis  $\text{Co}(\text{MeOH})_5^{2+}$  (de stœchiométrie respective 2/3 et 1/3). L'espèce cationique va activer l'oxygène de l'époxyde alors que l'espèce nucléophile va attaquer la position terminale. Après  $\beta$ -élimination de  $\text{HCo}(\text{CO})_4$ , l'énol est formé qui donnera ensuite la cétone par tautomérie (Figure 62 A).<sup>102</sup> Cette réaction ne donnera néanmoins rien sur l'époxyde **[96]** de ce fragment. La solution devient jaune/marron après addition du complexe de cobalt mais aucune conversion n'est observée par CCM malgré un chauffage à 50°C pendant un jour. Ici aussi, la réaction a été essayée avec l'alcool libre **[101]** mais là encore, aucune conversion n'est observée (Figure 62 B).

(100) Michel, B. W.; Steffens, L. D.; Sigman, M. S. Wacker Oxidation, The. In *Organic Reactions*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, **2014**, 75–414.

(101) Kulasegaram, S., Kulawiec, R. J. Chemo- and Regioselective Isomerization of Epoxides to Carbonyl Compounds via Palladium Catalysis. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (24), 7195–7196.

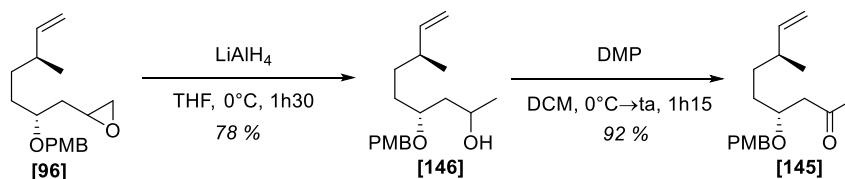


**Figure 62 :** (A) Mécanismes de migrations d'hydrures [1,2] par différentes espèces métalliques<sup>101,102</sup>  
 (B) Résultats obtenus dans ces conditions

Le réarrangement n'ayant pas abouti, une méthode moins élégante mais plus fiable en deux temps a été réalisée pour former la cétone **[145]** à partir de l'époxyde **[96]**. La réduction de l'époxyde en alcool suivie d'une réoxydation permet également de former la cétone avec la bonne régiosélectivité. La réduction de l'époxyde **[96]** en alcool a été faite en conditions standard, c'est-à-dire avec un excès de  $\text{LiAlH}_4$  dans le THF à 0°C. La réaction progresse sans soucis et après une soigneuse hydrolyse de l'excès d'hydrure, le produit **[146]** a été purifié par chromatographie sur colonne et isolé avec un rendement de 78 %. Le mauvais régioisomère n'est pas observé ici. La réoxydation a été ensuite réalisée par oxydation de Dess-Martin dans les mêmes conditions que celles employées pour l'oxydation de l'alcool du fragment C **[121]** en aldéhyde. Même si d'autres méthodes comme des réactions de Swern doivent également être possibles ici, la simplicité et la fiabilité de cette réaction ont poussé à son utilisation. Avec un léger excès de DMP dans le DCM, l'alcool **[146]** est converti en

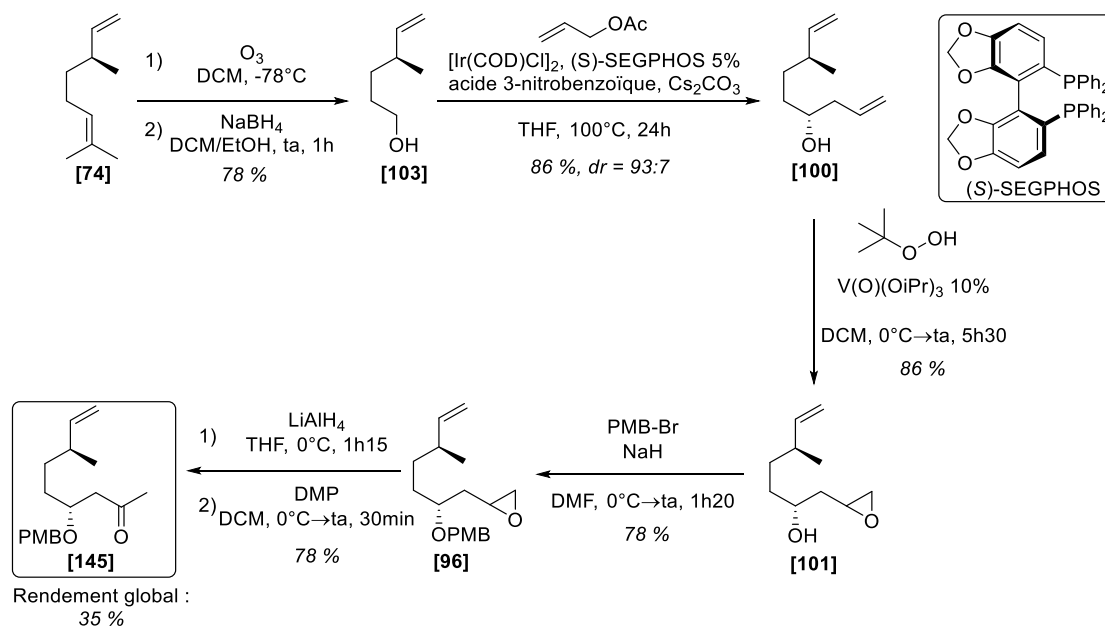
(102) Prandi, J., Namy, J. L., Menoret, G., Kagan, H. B. Selective Catalyzed-Rearrangement of Terminal Epoxides to Methyl Ketones. *J. Organomet. Chem.* **1985**, 285 (1-3), 449-460.

cétone en un peu plus d'une heure à température ambiante. Après purification par chromatographie sur colonne, le produit **[145]** pur a été obtenu avec un rendement de 92 % (Figure 63). Ces deux étapes ayant de très bons rendements et donnant des produits bruts de réaction relativement purs, elles ont été enchainées sans purification intermédiaire. Après la réaction de réduction, le produit brut peut être engagé directement dans la réoxydation. Après purification à la seconde étape, le produit pur peut être obtenu avec un rendement légèrement meilleur pour les deux étapes de 78 % (au lieu de 72 %) (Figure 64).



**Figure 63** : Synthèse de la méthylcétone en deux étapes

Ces étapes concluent la formation du nouveau fragment A **[145]**, obtenu avec un rendement global de 35 % (Figure 64).



**Figure 64** : Synthèse du nouveau fragment A

## 2.3.3 Combinaison des fragments

La combinaison des fragments commence par la réaction d'aldol entre la méthyl cétone du fragment A [145] et l'aldéhyde du fragment C [97]. Il existe une immense littérature sur les réactions d'aldolisation et un très grand nombre de conditions en découlent mais on retrouve néanmoins quelques stratégies phares. On peut soit mettre en présence la cétone et l'aldéhyde en conditions acides ou basiques, soit préparer l'énol de la cétone et l'ajouter sur l'aldéhyde, ces conditions étant dérivées de réactifs stœchiométriques ou issues de catalyse (Figure 65).<sup>103</sup> La première option est plus simple mais risquée ici à cause de la présence du centre chiral en  $\alpha$  de l'aldéhyde du fragment C [97], centre risquant de racémiser dans ces conditions. La seconde option a été préférée. L'énol nucléophile est usuellement généré sous forme d'un énol métallique ou pseudo-métallique (principalement des silanes ou boranes). Un énol métallique reste basique et pourrait engendrer la racémisation mais un éther d'énol boré ou silylé serait convenable ici. Ces énols ont été utilisés pour des réactions d'aldolisation de Mukaiyama.<sup>104</sup>

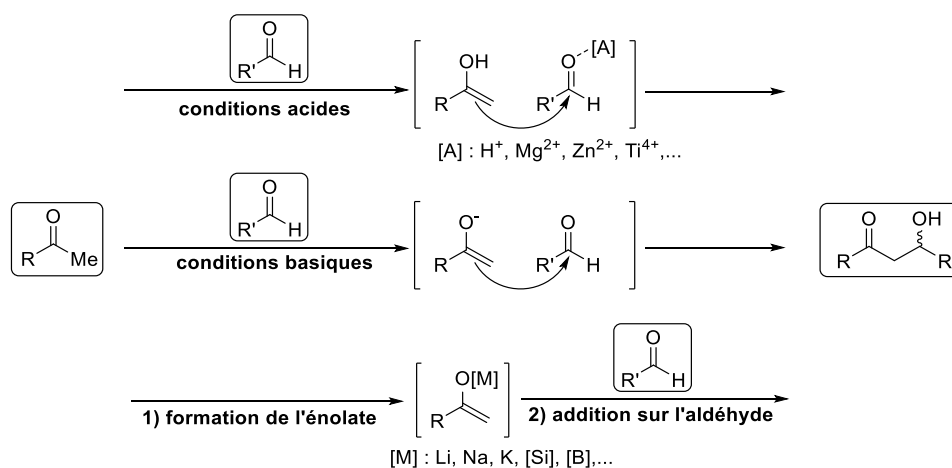


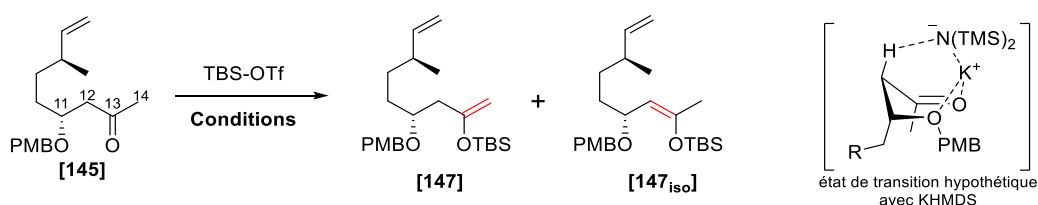
Figure 65 : Stratégies générales de réactions d'aldolisation<sup>103,104</sup>

(103) Nielsen, A. T., Houlihan, W. J. The Aldol Condensation. *Org. React.* **2004**, *16*, 1–438.

(104) Matsuo, J., Murakami, M. The Mukaiyama Aldol Reaction: 40 Years of Continuous Development. *Angew Chem Int Ed* **2013**, *52*, 1-11.

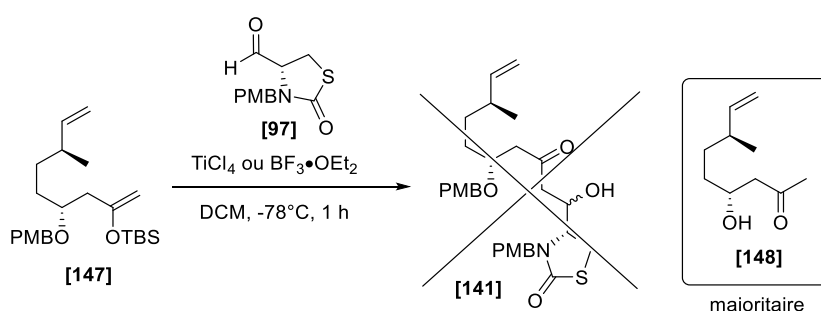
Les premiers essais ont porté sur la formation des éthers d'énol silylés. En particulier, la formation d'un énolate de TMS a été d'abord essayée. La cétone du fragment A **[145]** ayant des protons acides du côté du méthyle mais aussi de l'autre côté de la chaîne, l'utilisation d'une base forte et encombrée a d'abord été testée pour obtenir l'énol cinétique du côté du méthyle. Après traitement de la cétone **[145]** par un équivalent de KHMDS à  $-78^{\circ}\text{C}$ , l'énol obtenu a été piégé par TMS-OTf. Le produit semblant majoritaire sur CCM a été isolé avec un rendement de seulement 30% par chromatographie sur colonne, indiquant qu'il semble se dégrader sur la silice. Ici encore, l'utilisation d'un TBS a été envisagée pour pallier au problème. Dans les mêmes conditions mais cette fois-ci avec TBS-OTf, un éther d'énol silylé peut être isolé avec un rendement convenable. L'analyse de la RMN de ce produit a néanmoins montré qu'il ne s'agissait pas de l'énol attendu mais du produit thermodynamique **[147<sub>iso</sub>]**, avec la double liaison sur les carbones 12 et 13. Cette sélectivité particulière peut être expliquée par la stabilisation du cation potassium par coordination de l'oxygène en C11, dirigeant la formation de l'énol en C12 et C13. L'utilisation de bases encombrées non anioniques a donc été préférée pour éviter cette potentielle coordination du cation. Avec  $\text{NEt}_3$ , un mélange d'isomères déjà largement en faveur du produit espéré **[147]** est obtenu et avec la DiPEA, une sélectivité quasi parfaite est observée. L'éther d'énol silylé souhaité **[147]** a pu être obtenu de cette manière avec un rendement de 58 % (Tableau 8).

**Tableau 8** : Formation de l'éther d'énol silylé



Base	Conditions	Rendement	<b>[147]</b> : <b>[147<sub>iso</sub>]</b>
KHMDS	1) THF, $-78^{\circ}\text{C}$ , 1h 2) TBS-OTf, THF, $-78^{\circ}\text{C} \rightarrow 0^{\circ}\text{C}$ , 2h	46 %	< 1 : 99
$\text{NEt}_3$	DCM, $-78^{\circ}\text{C} \rightarrow 0^{\circ}\text{C}$ , 1h	43 %	93 : 7
DiPEA	DCM, $-78^{\circ}\text{C}$ , 2h	58 %	> 99 : 1

L'énol **[147]** en main, la réaction de Mukaiyama-aldol avec l'aldéhyde **[97]** a été testée. Deux catalyseurs usuels  $\text{TiCl}_4$  et  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  ont été essayés mais dans aucun des deux cas, le produit d'aldolisation attendu **[141]** n'est observé. Un produit dérivé de l'énol **[147]** a été isolé, et l'analyse RMN montre qu'il s'agit du produit pleinement déprotégé **[148]** portant un alcool libre en C11 et la cétone en C13 (Figure 66). Ici encore, un effet de coordination de l'oxygène en C11 pourrait expliquer partiellement la réactivité observée. En effet l'activation de cette position peut expliquer au moins le départ du groupement PMB. L'absence de réactivité de l'énol reste assez surprenante. Néanmoins, il semblerait que ces conditions ne soient pas adaptées à ce substrat.

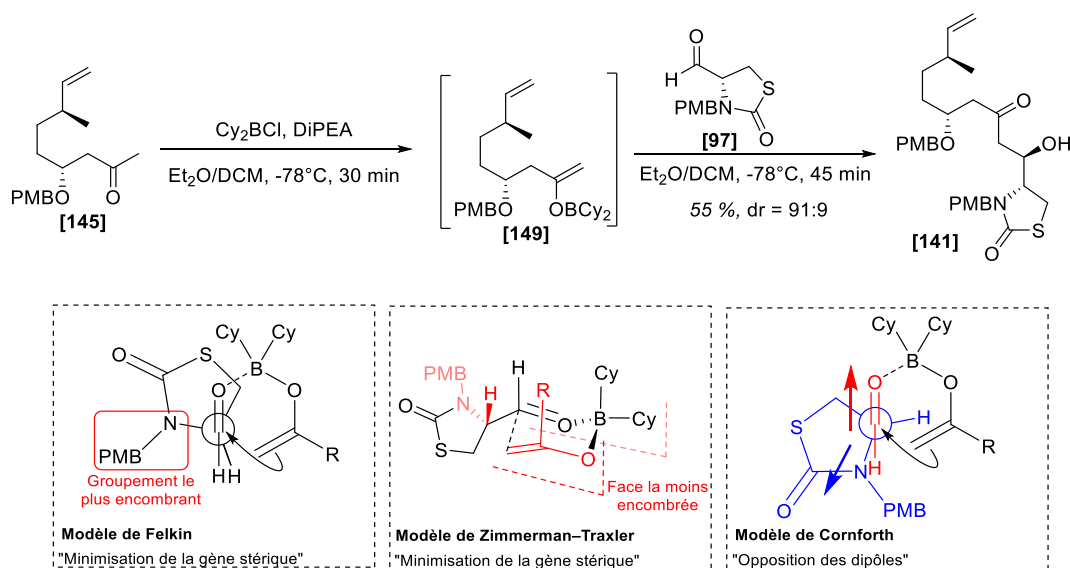


**Figure 66** : Essais de réaction de Mukaiyama-aldol à partir d'un éther d'énol silylé

Le travail s'est ensuite porté vers les conditions d'aldolisations avec les énolates de bore. La réaction se déroule ici sans catalyseur, l'énolate de bore s'ajoutant directement sur l'aldéhyde. Parmi les boranes commerciaux, le dicyclohexylborane a été choisi pour l'encombrement stérique important qu'il apporterait en vue d'une sélectivité de l'addition. La réaction d'aldolisation se fait sans isoler l'énolate de bore qui est ici trop sensible à l'eau et à l'air pour être purifié de manière classique. A  $-78^\circ\text{C}$  dans l'éther diéthylique, le chlorure de dicyclohexylborane est ajouté sur la cétone **[145]** en présence de DiPEA. Une base est nécessaire ici et étant données les sélectivités de formation de l'énol silylé observées précédemment, la DiPEA a été choisie pour espérer ne former que l'énol terminal **[149]**. On observe la formation de grumeaux blancs dans la solution lors de la formation de l'énol de bore mais ces derniers disparaissent lors de l'addition de la solution de l'aldéhyde **[97]** dans le DCM. On voit sur CCM l'apparition de deux différents produits mais également des restes d'aldéhyde **[97]** et de cétone **[145]** n'ayant pas réagi. Les nouveaux produits ont été séparés par chromatographie sur colonne (séparation particulièrement délicate, les deux étant très proches sur CCM) mais l'aldéhyde **[97]** semble aussi trainer inévitablement avec les produits, nécessitant un lavage au bisulfite de sodium après la colonne pour le retirer. Après ces efforts de purification, les produits obtenus ont pu



être identifiés comme étant bien les produits d'aldolisation attendus par l'analyse de leurs spectres RMN. Un rendement de 52% est obtenu avec un rapport diastéréoisomérique de 91:9. Un léger travail d'optimisation a été fait pour essayer d'améliorer le rendement. En effet la présence de grumeaux insolubles lors de la formation du borane d'énol a été arrangée en diluant la réaction dans un mélange Et<sub>2</sub>O/DCM. Dans ce mélange, le problème de solubilité n'est pas totalement résolu mais le précipité est présent sous forme de suspension fine. Cela a également permis d'inverser le sens d'ajout en prélevant cette solution de borane d'énol et en l'ajoutant sur l'aldéhyde. Dans ces nouvelles conditions, le rendement augmente légèrement à 55 % et conserve la même sélectivité (Figure 67).



**Figure 67 :** Réaction aldolisation et différents modèles prédictifs de la sélectivité

Une tentative de détermination de la configuration absolue du centre chiral en C15 formé sur le diastéréoisomère majoritaire par la méthode de Mosher a été essayée mais n'a pas été concluante. En effet, les esters de Mosher correspondants se sont montrés difficiles à synthétiser à cause d'une réaction parasite d'élimination donnant la cétone  $\alpha,\beta$  insaturée en C14 et C15. Les esters ont néanmoins pu être obtenus mais l'analyse des déplacements chimiques des pics en RMN ne donne pas de tendance claire comme celle obtenue pour l'alcool **[100]**. La détermination de la configuration de ce centre n'a donc pas pu être réalisée. Les différents modèles prédictifs sont néanmoins en accord d'une sélectivité pour la configuration (R) (Figure 67). Les effets stériques et d'opposition de dipôles liés à l'hétérocycle vont tous deux dans le même sens. Cette configuration a été postulée dans l'attente d'une confirmation à une étape ultérieure de la synthèse.

C'est à ce moment de la synthèse que la dégradation progressive de l'aldéhyde **[97]** a été remarquée. En effet, les rendements de la réaction d'aldolisation chutent lorsque l'aldéhyde n'est pas fraîchement préparé. Après conservation au congélateur et sous argon pendant quelques jours, on remarque que l'aldéhyde **[97]** jaunit légèrement et l'analyse RMN montre l'élargissement et la perte de résolution des pics, indiquant la formation de produits de dégradation. L'aldéhyde **[97]** doit donc être préparé juste avant chaque réaction d'aldolisation, mais cela est facilement réalisable **[121]**.

Étant donnée la configuration (R) obtenue pour la réaction d'aldolisation, le transfert de chiralité vers le centre C13 doit se faire de manière *anti* si l'on veut un alcool (S) en vue d'une estérification par substitution  $S_N2$ . Il existe deux principales méthodes pour effectuer la réduction de la  $\beta$ -hydroxy cétone avec une sélectivité *anti*. La première est la réduction d'Evans-Saksena, utilisant le borohydrure particulier  $Me_4NHB(OAc)_3$  qui se coordine sur l'alcool en  $\beta$  de la cétone pour y transférer l'hydrure de manière intramoléculaire, donnant le diol *anti*. La seconde est la réaction d'Evans-Tishchenko. En présence d'un aldéhyde, un hémiacétal peut se former par addition de l'alcool en  $\beta$  de la cétone. Le catalyseur, usuellement  $Sml_2$ , va déclencher un transfert d'hydrure intramoléculaire de l'hémiacétal vers la cétone, donnant le  $\beta$ -hydroxy ester *anti* correspondant (Figure 68). Cette seconde option est particulièrement intéressante ici car elle permettrait de discriminer directement les deux alcools en protégeant un des deux avec un ester de notre choix. En prenant un ester particulièrement facile à hydrolyser, comme un *para*-nitrobenzoate, on pourra le déprotéger sélectivement sans risque pour l'ester du macrocycle. Cette réaction combinerait la formation de l'alcool en C13 avec transfert de la chiralité et protection de la position en C15. La synthèse se dessine donc de la manière suivante. Après la réaction d'Evans-Tishchenko, l'estérification avec le fragment B sur l'alcool formé **[142]** peut avoir lieu. Le macrocycle peut ensuite être fermé par la métathèse cyclisante. Après déprotection des deux groupements PMB et attachement du groupement photolabile, l'ester **[151]** peut être hydrolysé puis l'alcool oxydé pour donner la cétone du produit final **[1]** (Figure 69).

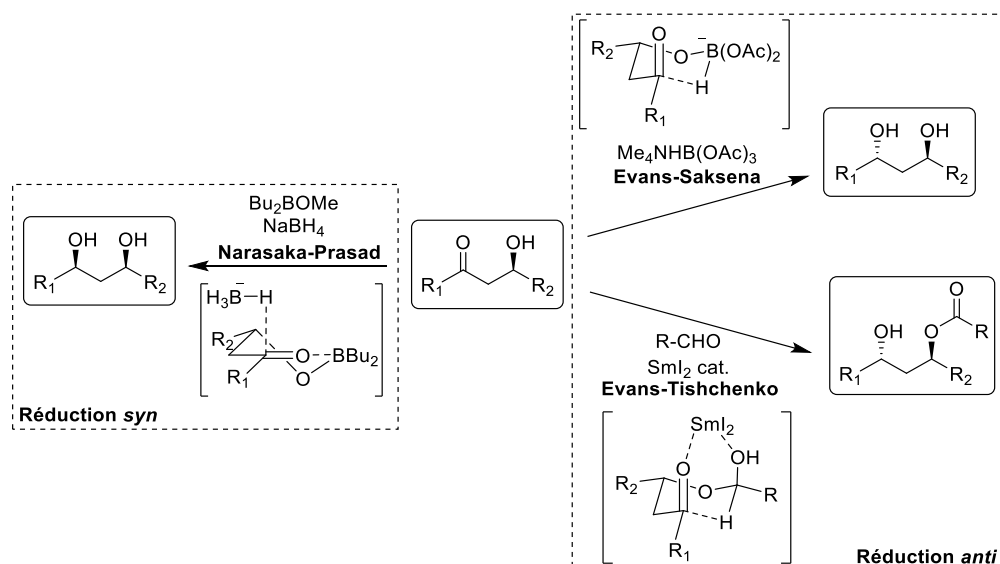
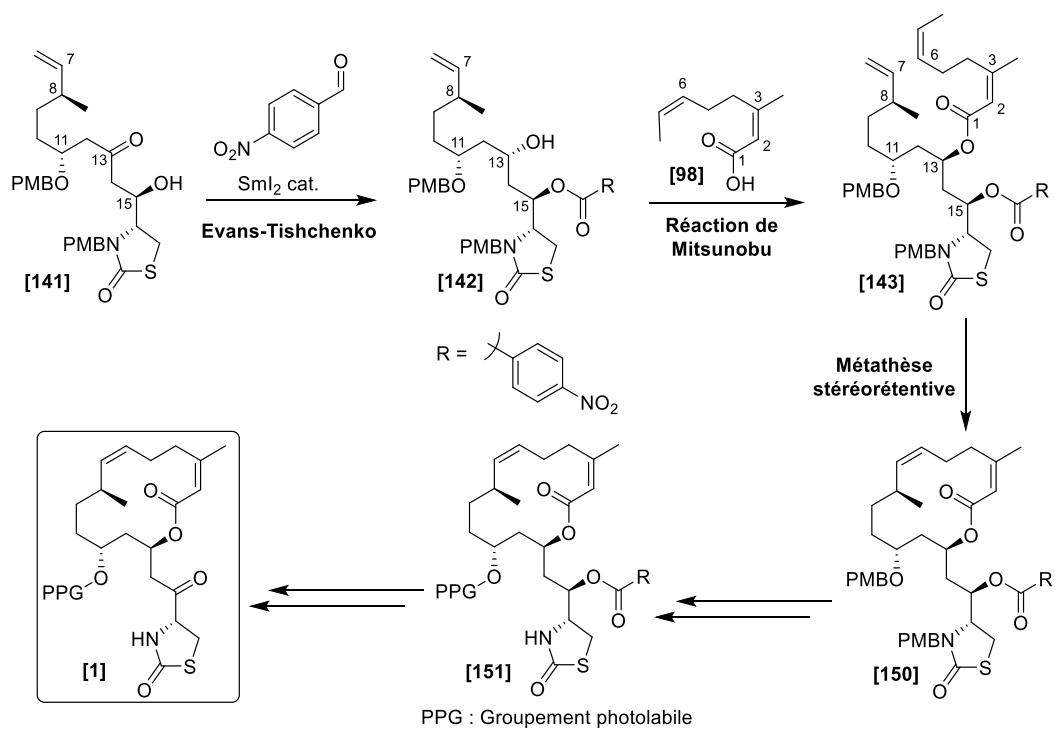
Figure 68 : Réductions diastéréosélectives de  $\beta$ -hydroxy cétones

Figure 69 : Fin de la synthèse envisagée à partir de l'intermédiaire d'aldol [141]

La réaction d'Evans-Tishchenko utilise  $\text{SmI}_2$  comme catalyseur. Ce composé est particulièrement sensible à l'oxygène et à l'eau et demande une manipulation très précautionneuse. Il est donc préférable de le préparer avant chaque utilisation.  $\text{SmI}_2$  peut être formé par oxydation du samarium avec différents réactifs iodés comme le diiode, le diiodoéthane ou le diiodométhane. Les premières préparations ont été faites avec le diiode. Un équivalent est ajouté le plus rapidement possible dans une suspension de samarium métal (en léger excès) dans du THF distillé sur sodium/benzophénone (il est important de noter que le THF de la machine de purification de solvant contient trop de traces d'eau ou d'air pour cette réaction). La solution brunit immédiatement et devient progressivement verte puis bleu nuit. Il y a ici une très grande variabilité dans la durée de la réaction et dans sa réussite (entre 45 min et 24 h). Dans certains cas, la solution ne verdit d'ailleurs jamais et devient jaune opaque, indiquant la formation en majorité d'espèces de samarium (III). Cette grande variabilité vient de l'ajout de l'iode qui demande d'ouvrir le ballon même si ce n'est que pour un très court instant. L'utilisation du diiodométhane, un liquide, a donc été préférée pour la possibilité d'une injection sans ouverture. Avec ce réactif, la solution devient bleu nuit en à peine 15 min et cela de manière reproductible.

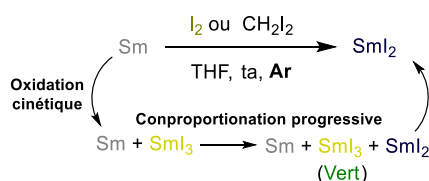
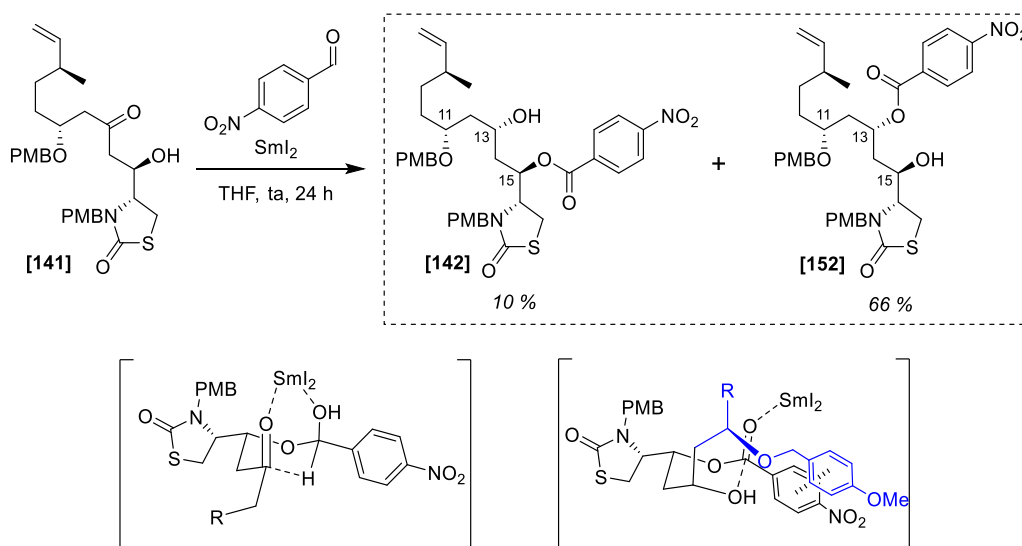


Figure 70 : Synthèse de  $\text{SmI}_2$

Une solution de  $\text{SmI}_2$  en main, la réaction d'Evans-Tishchenko a été réalisée sur le produit d'aldol **[141]**. La réaction se fait usuellement à froid avec un large excès de l'aldéhyde. Une solution du produit **[141]** et de cinq équivalents de *para*-nitrobenzaldéhyde dans le THF distillé a été traitée avec 10 % de  $\text{SmI}_2$  à  $-10^\circ\text{C}$ . Aucune conversion n'est observée. En ajoutant en tout un équivalent de  $\text{SmI}_2$  et en laissant la réaction à température ambiante pendant deux heures, on obtient un mélange de produit de départ (30 %) et de deux produits inséparables, en proportions respectives 52 % et 18 %. En traitant ce mélange avec un nouvel équivalent de  $\text{SmI}_2$  et en laissant la réaction une heure supplémentaire, les proportions évoluent en 18 % de produit de départ et respectivement 44 % et 36 % des deux produits. On remarque donc la conversion progressive d'un des produits vers l'autre. La réaction a donc été relancée avec un équivalent de  $\text{SmI}_2$  mais laissée pendant 24 h. Cette fois-ci, les deux produits inséparables ont été isolés avec un rendement de 76 % et un rapport de 13:87 (Figure 71). L'analyse des spectres RMN a permis de montrer qu'il s'agissait du produit attendu **[142]** et d'un produit résultant de la transposition de l'ester sur alcool en C13 **[152]**. Il semblerait que  $\text{SmI}_2$  catalyse

également cette transposition d'ester en plus de la réaction d'Evans-Tishchenko. Cette transposition peut s'expliquer par l'empilement  $\pi$ - $\pi$  entre l'éther de PMB en C11, un noyau aromatique riche, et l'ester de *para*-nitrobenzoate, un noyau aromatique quant à lui très appauvri en électrons. La diastéréosélectivité de la réaction est néanmoins parfaite, aucun isomère minoritaire n'étant observé. La sélectivité *anti* par rapport à l'alcool en C15 n'a néanmoins pas pu être vérifiée.

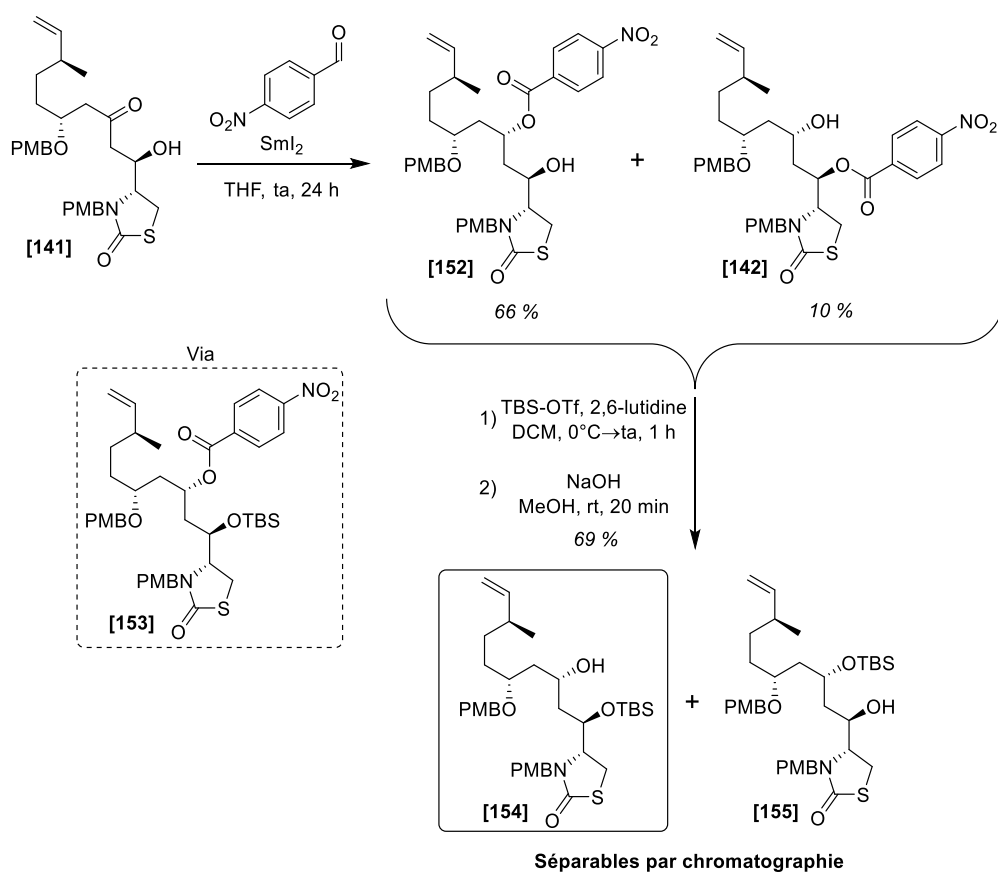


**Figure 71** : Réaction d'Evans-Tishchenko, transposition de l'ester et états de transitions postulés pour chaque étape

Le fait qu'il y ait besoin d'au moins un équivalent pour faire progresser la réaction vient d'une autre réaction secondaire qu'est la réduction du *para*-nitrobenzaldéhyde. En effet, la réaction d'Evans Tishchenko utilise usuellement des aldéhydes aliphatiques et non des aldéhydes aromatiques appauvris. Dans ce cas, le *para*-nitrobenzaldéhyde est partiellement réduit par  $Sml_2$  et l'on observe la formation d'une quantité non négligeable d'alcool *para*-nitrobenzylique.

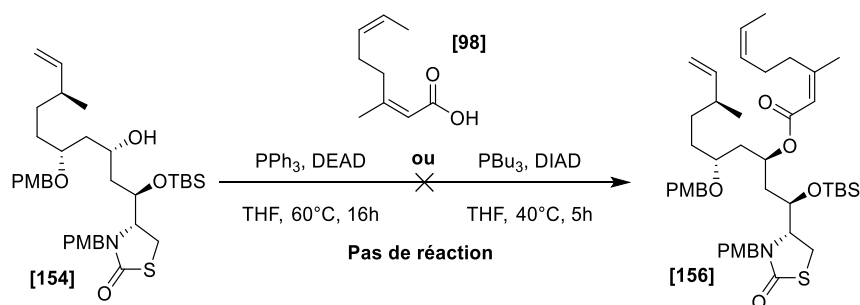
Cette réaction secondaire de transposition n'est pas particulièrement impactante en termes de stratégie de synthèse car les deux objectifs de cette réaction restent accomplis : transférer la chiralité au centre C13 dans la configuration (S) et discriminer les deux alcools en protégeant un des deux avec un ester. L'alcool protégé n'est pas celui attendu mais on peut aisément inverser cette protection. Une courte séquence a été mise en place pour effectuer cette inversion. Un groupement TBS a été placé sur l'alcool en C15 et l'ester a été hydrolysé. La protection de l'alcool a été faite en conditions standards pour des alcools encombrés, en utilisant TBS-OTf et la 2,6-lutidine comme base. Dans ces conditions, l'alcool protégé [153] a été obtenu avec un rendement de 73 % après purification par chromatographie sur colonne. L'hydrolyse de l'ester ne nécessite ici aucune précaution, l'ester du

macrocycle n'étant pas encore présent et le centre chiral en C15 ne pouvant plus racémiser. Avec un large excès de NaOH dans le méthanol, l'hydrolyse semble quantitative. Ces deux étapes pour l'inversion de la protection des alcools ont été réalisées sans purification intermédiaire. En effet, après l'installation du groupement TBS, le solvant du mélange brut réactionnel est évaporé et le méthanol suivi du NaOH sont ajoutés directement. Après une purification finale, le nouvel alcool en C13 obtenu **[154]** est isolé avec un rendement de 69 % sur les deux étapes (Figure 72). Les produits obtenus lors de la réaction d'Evans-Tishchenko **[142]** et **[152]** étant inséparables, ces deux étapes vont donc donner majoritairement le produit **[154]** accompagné de l'isomère **[155]** portant un groupement TBS en C13 et un alcool libre en C15. Ces deux produits sont désormais séparables par chromatographie sur colonne.



**Figure 72** : Inversion de la protection entre les alcools en C13 et C15

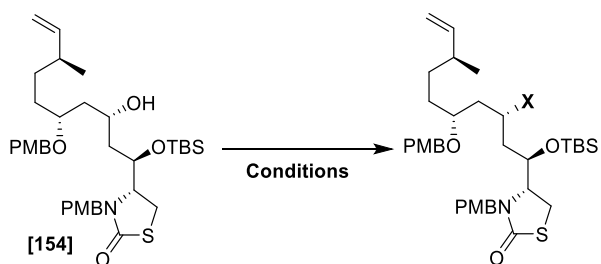
L'alcool en C13 **[154]** en main, il était temps de coupler le dernier fragment par une estérification avec inversion de la configuration. Les premiers essais ont été faits dans des conditions de Mitsunobu classiques, c'est-à-dire en faisant réagir l'alcool et l'acide en présence d'un azodicarboxylate et d'une phosphine. La triphénylphosphine et le DEAD ont d'abord été testés. Dans ces conditions et même après un chauffage prononcé, on n'a observé aucune conversion. La tributylphosphine, plus nucléophile, et le DIAD, un azodicarboxylate plus stable ont également été testés mais là encore aucune conversion n'a été observée (Figure 73). Ces réactions ne donnant rien, la formation d'un groupement partant à partir de l'alcool, suivie d'une substitution par le carboxylate du fragment B, comme cela avait été fait dans la synthèse de Fürstner, a été essayée.<sup>76</sup>



**Figure 73** : Tentatives de réactions de Mitsunobu

Le sel de sodium de l'acide carboxylique **[98]** a d'abord été rapidement préparé par déprotonation directe de l'acide carboxylique **[98]** par un léger défaut de NaH dans le THF. Après agitation pendant 15 min, la solution a été diluée dans le pentane et le produit a précipité sous forme d'une fine suspension blanche. Ce solide **[156]** a pu être collecté par décantation ou centrifugation.

Comme avec l'estérification de la synthèse de Fürstner, la formation du triflate a été essayée.<sup>76</sup> Dans les mêmes conditions, c'est-à-dire avec Tf<sub>2</sub>O et la pyridine comme base, on observe la dégradation du produit. Un réactif moins puissant a donc été essayé. PhNTf<sub>2</sub> a été testé dans les mêmes conditions et cette fois-ci il n'y a pas eu de réaction. L'alcool n'étant apparemment pas suffisamment nucléophile pour ce réactif, l'alcoolate a d'abord été formé avec NaH. Ici encore, il n'y a pas eu de réaction. La formation du triflate se montrant plus complexe que prévue, l'attention a été tournée vers la formation d'un mésylate. Des essais avec différentes bases ont été réalisés et aucune réactivité n'a été observée (Tableau 9).

**Tableau 9** : Tentatives d'introduction des groupements partants en C13

	X	Conditions	Résultat
<b>Formation du triflate</b>	- OTf	Tf <sub>2</sub> O, pyridine, DCM, 0°C→ta, 4h	Dégradation
		PhNTf <sub>2</sub> , pyridine, THF, 0°C→ta, 3h	Pas de réaction
		1) NaH, THF, 0°C, 10 min 2) Tf <sub>2</sub> O, THF, 0°C, 1h	Dégradation
		1) NaH, THF, 0°C, 10 min 2) PHNTf <sub>2</sub> , THF, 0°C, 1h	Pas de réaction
<b>Formation du mésylate</b>	- OMs	MsCl, pyridine, DMAP 20%, DCM, 0°C→ta, 3h	Pas de réaction
		MsCl, NEt <sub>3</sub> , DMAP 20%, THF, 60°C, 65 h	Pas de réaction
		1) LiHMDS, THF, 0°C, 10 min 2) MsCl, THF, 0°C→ta, 30min	Pas de réaction
		1) NaHMDS, THF, 0°C, 30 min 2) MsCl, THF, 0°C→ta, 2h30	Pas de réaction

D'autres conditions doivent être essayées pour réussir cette réaction d'estérification avec inversion de configuration. En particulier, il existe d'autres réactifs pour former le triflate, comme le réactif de Comins, qui peuvent encore être essayés.

Par ailleurs, la configuration absolue de l'alcool [154] devrait pouvoir être confirmée par la méthode de Mosher. Cela permettrait d'également de confirmer les sélectivités postulées pour les étapes de réactions d'Evans-Tishchenko et d'aldolisation.



## 2.4 Conclusion

La synthèse totale d'une latrunculine B photocagée n'a pas abouti mais une majeure partie du travail a néanmoins été réalisée. La molécule a été rétrosynthétiquement découpée en trois fragments dont les synthèses ont été réalisées et optimisées. Les deux premiers fragments ont été couplés et l'ensemble des centres chiraux du squelette ont été préparés. Le travail s'arrête ici au couplage du troisième fragment. Il ne restera ensuite que la fermeture du macrocycle par métathèse d'alcènes stéréorétentive, la dernière étape clef, puis des étapes triviales de déprotection et de mise en place du groupement photolabile. L'installation de ce dernier a été testée en parallèle sur d'autres composés et s'est montrée simple à installer sur des alcools (voir dans la partie suivante avec le but-3-èn-2-ol et avec la wiskostatine [16]). La molécule photocagée terminée, la déprotection par irradiation UV pourra être évaluée et des tests biologiques pourront être réalisés pour inhiber localement les réseaux d'actine dans les cellules.

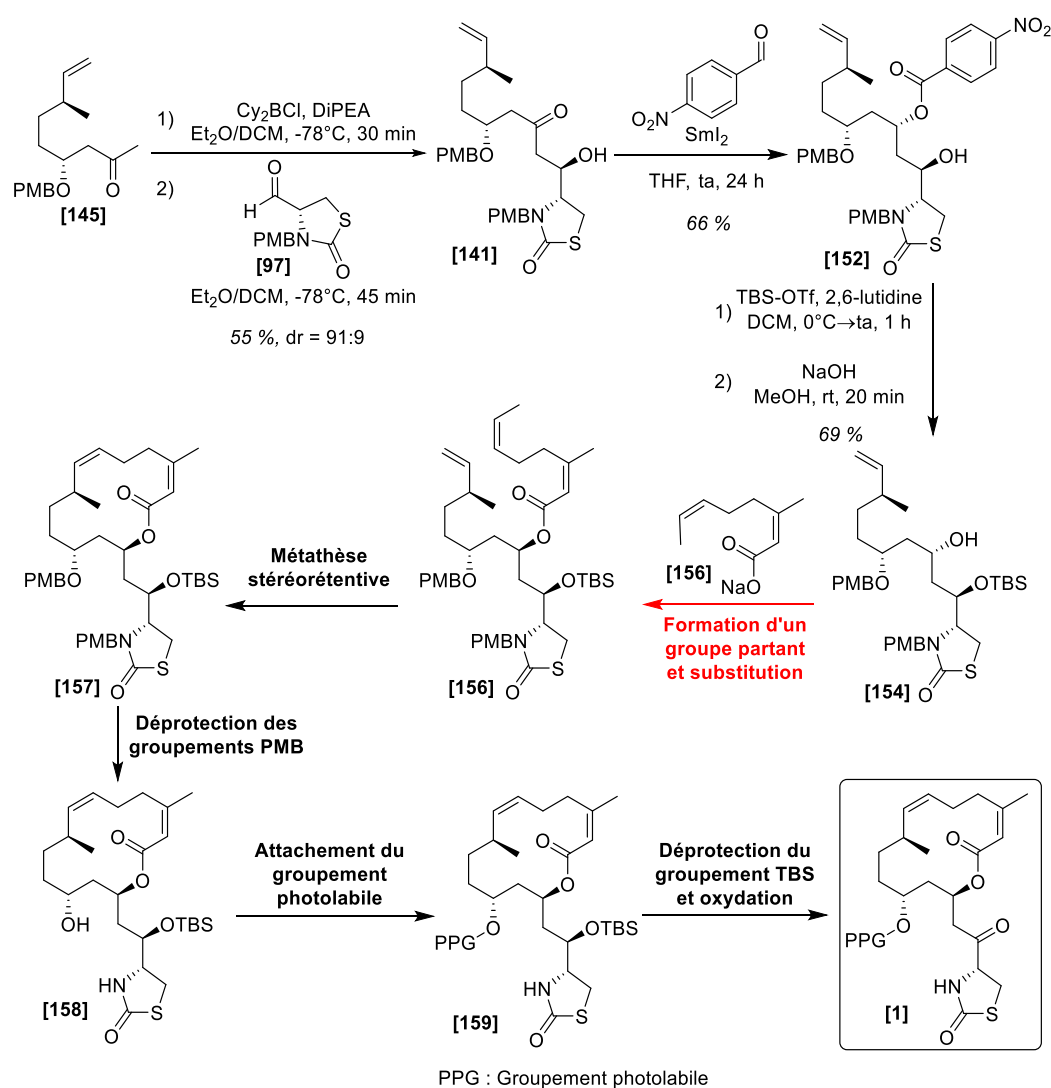


Figure 74 : Fin envisagée de la synthèse de la latrunculine B photocagée

---

3<sup>ème</sup> Partie :  
Synthèse d'autres inhibiteurs  
photocagés

---

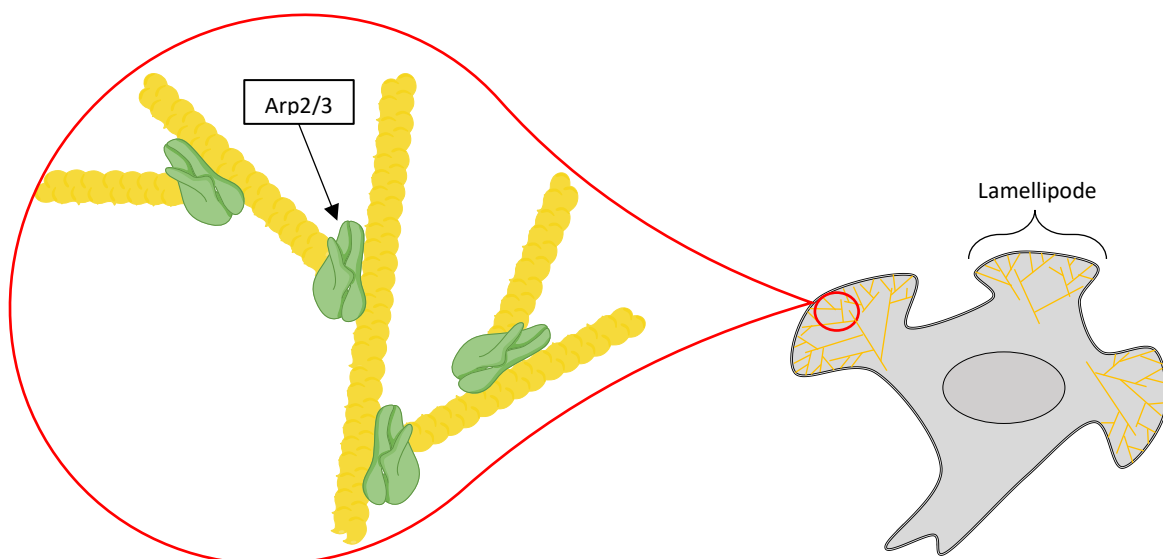


## 3<sup>ème</sup> Partie : Synthèse d'autres inhibiteurs photocagés

### 3.1 Synthèse et caractérisation d'un CK666 Photocagé

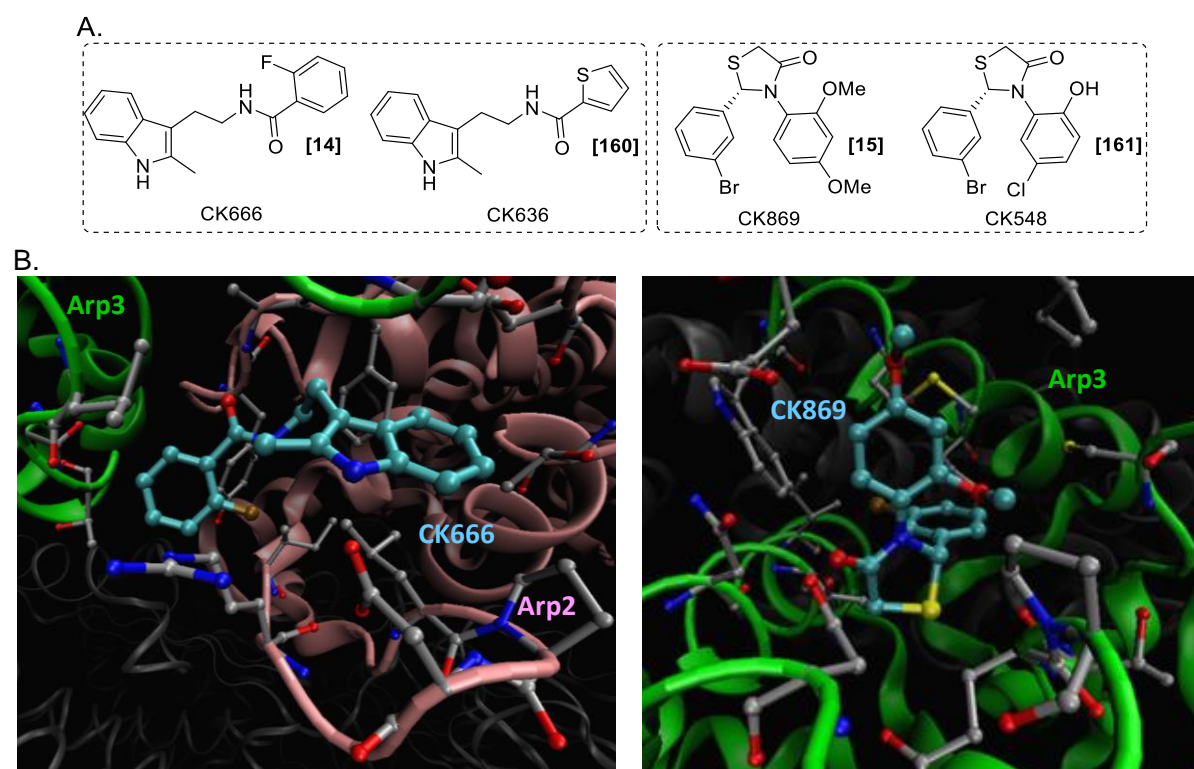
#### 3.1.1 Introduction

Arp2/3 est un complexe de 7 protéines (Arp2, Arp3 et ArpC1 à ArpC5) responsable de la formation des réseaux branchés de l'actine.<sup>18</sup> Bien qu'il ne possède pas vraiment d'activité à lui seul, dès lors que certains activateurs sont présents, ce complexe peut se lier à des filaments d'actine et initier une nouvelle branche. Cette nouvelle branche est orientée avec un angle d'environ 70° par rapport à l'extrémité barbue.<sup>18</sup> Cet effet va causer une croissance exponentielle des filaments car chaque nouvelle branche initiée va avoir la possibilité de recruter un nouveau complexe Arp2/3 qui va à son tour former une nouvelle branche. Cette croissance couplée à la forte densification des filaments cause de puissants effets locaux à cause de la rigidité supplémentaire. Ces effets engendrent les mécanismes de mobilité et d'adhésions cellulaires et les déformations membranaires nécessaires à l'endocytose, à la phagocytose, à la formation de pseudopodes ou à celle de lamellipodes.<sup>18</sup> L'intégralité de ces mécanismes font intervenir la membrane et c'est effectivement au niveau de cette dernière qu'Arp2/3 est le plus présent.



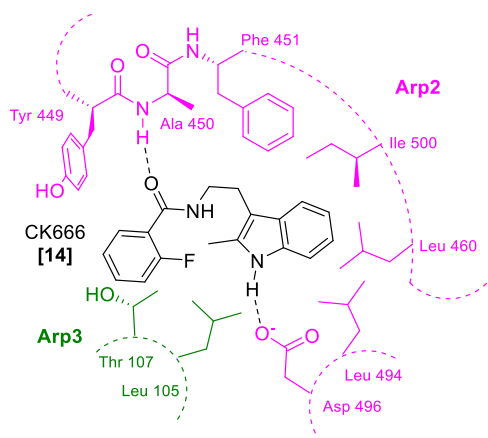
**Figure 75** : Représentation des réseaux branchés d'actine et de la structure d'un lamellipode

Étant donné le grand nombre de mécanismes dans lesquelles Arp2/3 est impliqué, une attention particulière a été portée sur ce complexe et sur la compréhension de ses interactions avec l'actine et d'autres protéines. Des inhibiteurs ont également été recherchés pour pouvoir observer les conséquences de l'inactivation de ce complexe. Plusieurs produits de synthèse ont été découverts en 2009 par le groupe de Nolen.<sup>36</sup> Après un screening de plus de 400 000 petites molécules, deux paires de composés se sont montrées actives. Le CK666 [14] et le CK636 [160] sont deux inhibiteurs basés sur un squelette 2-méthylindole lié à un amide aromatique par un pont éthylène. Le CK869 [15] et le CK548 [161] sont eux basés sur un squelette 2-*meta*-bromophényl-3-aryl-thiazolidin-4-one avec différents substituants sur l'aryle (Figure 76 A). Les efficacités de ces composés ont pu être évaluées sur cellules et donnent des IC<sub>50</sub> différents en fonction des types cellulaires, variant dans une gamme de 0.5 à 50 µM. Arp2/3 a pu être cristallisé en présence de ces différents inhibiteurs, indiquant le site de coordination et expliquant les mécanismes d'action. Le CK666 [14] et le CK636 [160] se placent entre les sous-unités Arp2 et Arp3 et imposent une conformation inactive au complexe. Le CK869 [15] et le CK548 [161], eux, vont aller dans une cavité de Arp3 et vont modifier sa configuration, impliquant une perte d'activité de tout le complexe (Figure 76 B).<sup>36</sup>



**Figure 76** : (A) Inhibiteurs d'Arp2/3 (B) Structure de diffraction aux rayons X d'Arp 2/3 en présence de CK666 (Identifiant PDB : 3UKR) ou CK869 (Identifiant PDB : 3UKU)<sup>36</sup>

Dans l'optique de faire une bibliothèque d'inhibiteurs photocagés pour un grand nombre de protéines interagissant avec l'actine, le CK666 [14] a été choisi comme inhibiteur d'Arp2/3. Ce choix a été motivé d'une part par le fait que cette molécule commerciale est couramment utilisée par les biologistes étudiant les mécanismes liés à Arp2/3 et en particulier par un des laboratoires partenaires pour ce projet, et d'autre part pour des raisons structurales. En effet, le CK666 [14] possède deux hétéroatomes nucléophiles : les azotes de l'indole et de l'amide. Ces deux positions sont propices au placement du groupement photolabile. En regardant la structure de diffraction des rayons X d'Arp2/3 complexé au CK666 [14], on remarque que l'hydrogène de la liaison N-H de l'indole est impliqué dans une liaison hydrogène avec la protéine alors que celle de l'amide ne l'est pas. Ce dernier fait également une liaison hydrogène mais en tant qu'accepteur à partir du carbonyle (Figure 77). Placer le groupement photolabile sur l'azote de l'indole va, en plus d'apporter la gêne stérique de l'encombrant groupement, retirer cette liaison hydrogène, ce qui fera très probablement perdre à la forme photocagée son activité biologique. Cette position est a priori également plus nucléophile que l'amide, rendant possible l'attachement du groupement photolabile possible directement à partir du CK666. Cette stratégie de photocageage du CK666 a été retenue.



**Figure 77** : Représentation schématique du CK666 coordonné dans Arp2/3

## 3.1.2 Synthèse du CK666

La stratégie étant ici de placer le groupement photolabile directement sur le CK666 **[14]**, la synthèse de ce dernier a été réalisée. On peut remarquer que malgré la relative simplicité de la molécule, cette dernière est plutôt onéreuse chez les fournisseurs usuels, rendant d'autant plus intéressant d'en préparer des grandes quantités au laboratoire. En termes de rétrosynthèse, le CK666 **[14]** se divise de manière logique en deux parties : un dérivé de tryptamine **[162]**, méthylé en position 2 et portant une amine terminale, et un benzoyle fluoré en position 2 **[163]**. La 2-méthyltryptamine **[162]** et le chlorure de 2-fluorobenzoyle **[163]** étant tous deux disponibles commercialement, la synthèse peut être faite simplement par amidation de ces deux composés. Le dérivé indolique **[162]** étant relativement onéreux, il peut être envisagé également de le synthétiser. On peut penser naturellement démarrer la synthèse à partir de la tryptamine **[166]** mais on se retrouverait rapidement limité par la difficulté qu'est la fonctionnalisation en position 2 des indoles non *N*-protégés. Il est plus judicieux ici de former l'indole directement avec le méthyle en position 2 en suivant une méthode de Fischer décrite dans la littérature (Figure 78).<sup>105</sup> Dans cette réaction, une réaction de Fischer est réalisée entre la phénylhydrazine **[164]** et la 5-chloropentan-2-one **[165]**, conduisant à la formation du noyau 2-méthylindole mais aussi à la formation de l'amine terminale soit par substitution du chlorure par soit l'ammoniac libéré, soit par l'intermédiaire méthylènediamine avant l'élimination pour rétablir l'aromaticité de l'indole (Figure 79). Cette réaction a pu être reproduite mais une grande partie du produit **[162]** a été perdu lors de la purification du fait de son instabilité aux acides, lors de la tentative de la formation du chlorhydrate.

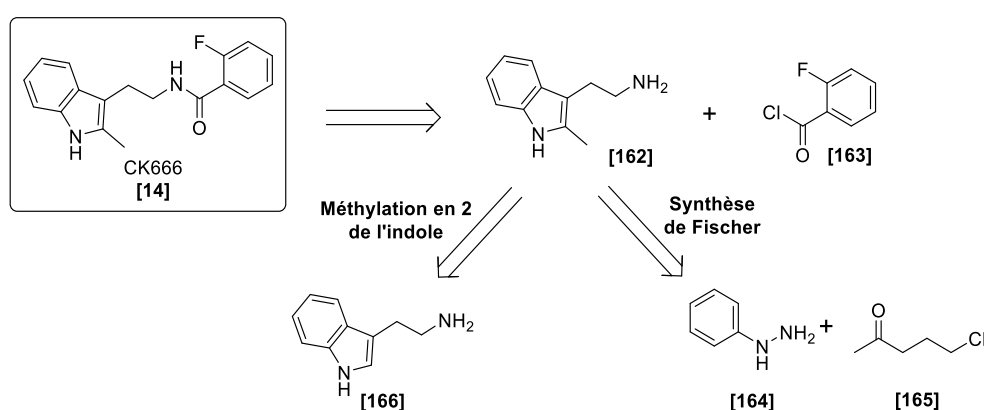


Figure 78 : Rétrosynthèse du CK666

(105) Slade, J., Parker, D., Girgis, M., Wu, R., Joseph, S., Repič, O. Optimization and Scale-Up of the Grandberg Synthesis of 2-Methyltryptamine. *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11* (4), 721–725.

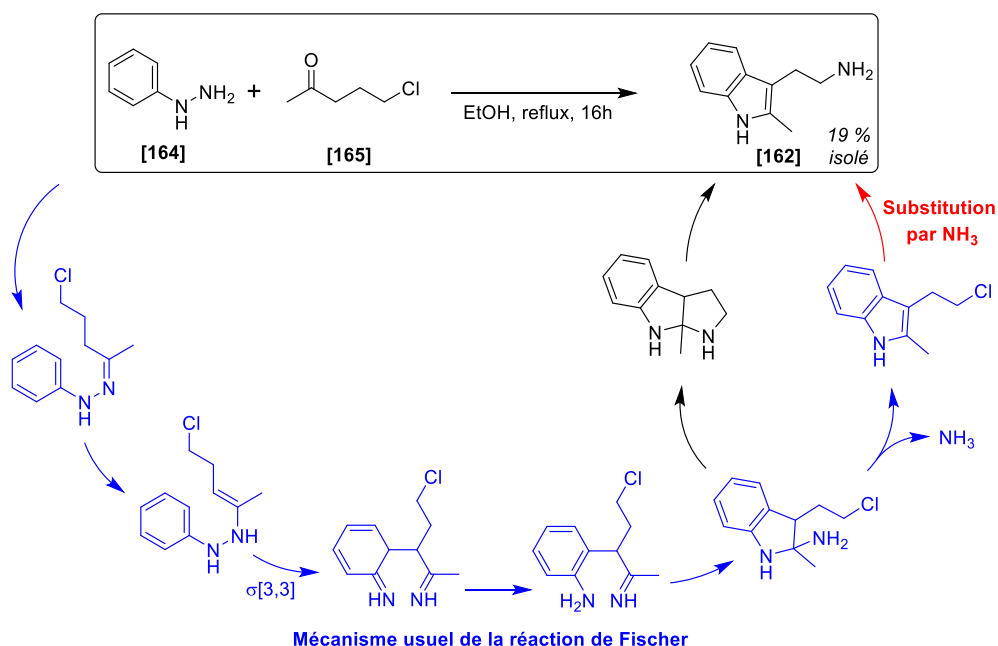


Figure 79 : Mécanisme envisagé pour la réaction de Fischer

L'amidation entre l'amine terminale [162] (commercial ou synthétisé ici, la réaction a été répétée plusieurs fois) et le chlorure de 2-fluorobenzyle [163] a été réalisée dans des conditions standards, c'est-à-dire avec NEt<sub>3</sub> comme base et une quantité catalytique de DMAP pour activer le chlorure d'acyle. Cette réaction est très efficace et le produit peut être isolé avec un rendement de 94 % après purification par chromatographie sur colonne (Figure 80). Le produit obtenu correspond bien à la description qui est faite du CK666 [14].<sup>106</sup>

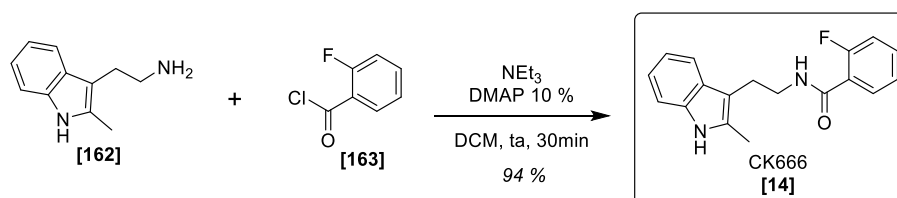


Figure 80 : Synthèse du CK666

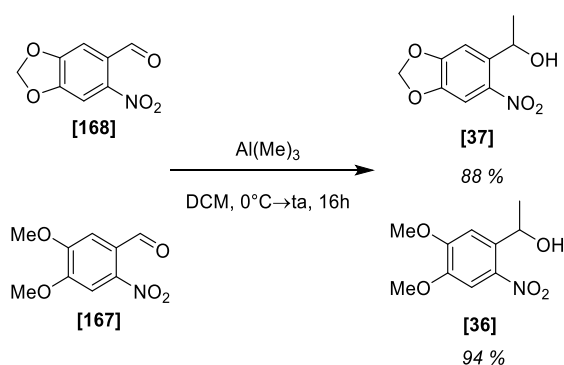
(106) Baggett, A. W.; Cournia, Z.; Han, M. S.; Patargias, G.; Glass, A. C.; Liu, S.-Y.; Nolen, B. J. Structural Characterization and Computer-Aided Optimization of a Small-Molecule Inhibitor of the Arp2/3 Complex, a Key Regulator of the Actin Cytoskeleton. *ChemMedChem* **2012**, 7 (7), 1286–1294.



## 3.1.3 Choix et synthèse du groupement photolabile

Le CK666 [14] en main, il était temps de sélectionner un groupement photolabile pour préparer le variant photocagé. Parmi les groupements photolabiles les plus récents, deux familles sont principalement utilisées : les nitrobenzyles [29] et les 4-méthylcoumarines [27]. L'actine étant principalement visualisée par fluorescence (immunomarquage ou marquage avec des dérivés fluorescents de phalloïdine), la fluorescence des coumarines (usuellement une absorption dans le proche UV pour une émission dans le bleu) peut venir ici brouiller les images. Le choix a donc été porté plutôt vers les nitrobenzyles. Il a été choisi aussi de prendre en compte les optimisations en termes de substituants présentés en introduction et présents dans des exemples récents. Le choix s'est limité aux deux nitrobenzyles [36] et [37] portant un méthyle en position benzylique et respectivement deux groupements méthoxy ou un pont méthylènedioxy en positions 4 et 5. Ces groupements doivent être liés à l'indole du CK666 [14] par un pont carbamate, étant donné que l'indole n'est pas particulièrement un bon groupe partant.

La synthèse de ces deux groupements à partir des 6-nitrobenzaldehydes correspondants, tous deux disponibles commercialement, a été réalisée par méthylation des aldéhydes avec  $\text{Al}(\text{Me})_3$ .<sup>107</sup> Ce réactif est préféré ici à  $\text{MeLi}$  ou  $\text{MeMgBr}$  à cause de leur tendance à réagir avec les groupements nitro. Les alcools [36] et [37] sont tous deux obtenus purs directement après traitement avec d'excellents rendements (Figure 81). On peut noter ici que l'intégralité des réactions faisant intervenir ces composés sont faites dans le noir, en enrobant la verrerie dans du papier aluminium.



**Figure 81** : Synthèse des groupements photolabiles

(107) Anderson, E., Brown, T., Picken, D. Novel Photocleavable Universal Support for Oligonucleotide Synthesis. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, 22 (5–8), 1403–1406.

Ces deux groupements sont décrits comme très similaires en termes d'efficacité de photoclivage. Ces alcools pouvant être vus comme des molécules d'eau photocagées, la réaction de photoclivage peut être testée directement sur ces produits. N'ayant pas encore de lampe UV convenable à ce stade de la thèse, un test un peu rudimentaire consistant à laisser simplement les deux produits au soleil dans un tube RMN a été réalisé. La conversion a été suivie par RMN et on constate en effet une très légère différence de réactivité, le produit **[37]** portant le pont méthylènedioxy étant à peine plus rapide (Figure 82). Ce groupement sera utilisé comme groupement photolabile dans l'intégralité de la suite du projet.

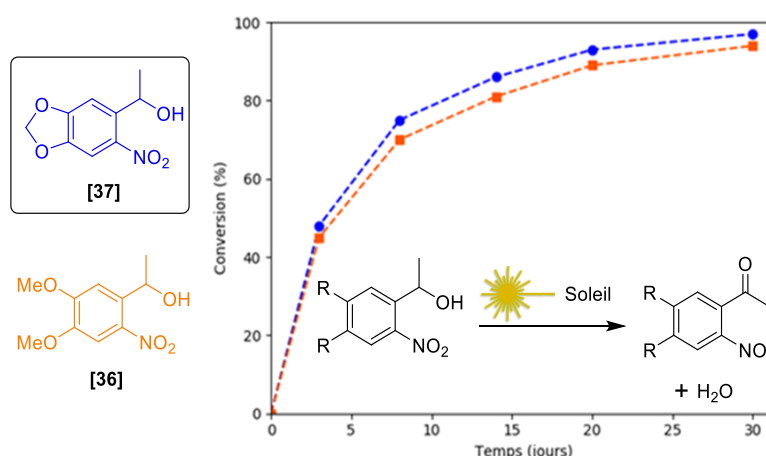
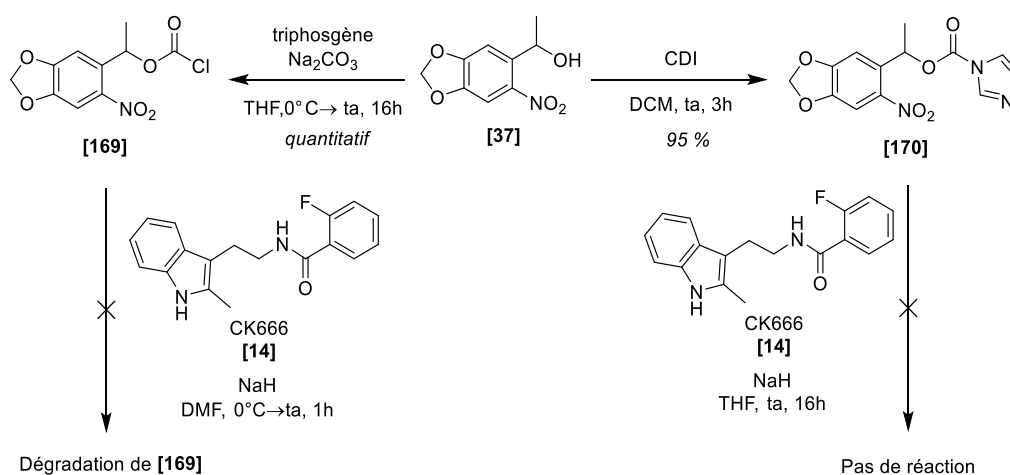


Figure 82 : Tests de photoclivage de **[36]** et **[37]**

Dans l'optique de pouvoir réutiliser le même groupement photolabile avec le pont  $-(CO)O-$  sur l'ensemble des molécules photocagées envisagées, il serait pratique de préparer un réactif capable de former des carbonates ou carbamates avec le groupement photolabile directement sur nos différentes molécules. L'idée naturelle est de synthétiser un chloroformiate **[169]** à partir de l'alcool du groupement photolabile **[37]**. Ce groupement serait utilisable pour former des carbonates ou carbamates à partir des différents inhibiteurs. La préparation de chloroformiates se fait usuellement avec la combinaison de phosgène et de  $NEt_3$  pour activer le phosgène et capter l'acide chlorhydrique libéré. Le phosgène est un gaz toxique mais il est disponible commercialement sous forme de solutions dans le toluène. Dans ces conditions, un seul produit est formé mais ce produit ne semble pas correspondre au chloroformiate **[169]**. En particulier, ce produit est stable sur silice et à un traitement aqueux à la soude. Une autre manière de former le chloroformiate est d'utiliser le triphosgène, un réactif qui se décompose lentement en phosgène et permet donc une réaction plus douce. L'alcool **[37]** a été traité avec du triphosgène et  $Na_2CO_3$  comme base. Le choix d'une base insoluble a été fait d'une part pour permettre de l'éliminer facilement à la fin de la réaction par simple filtration et d'autre

part pour éviter toute réaction avec le produit, son rôle ici n'étant que de capter l'acide chlorhydrique libéré. Dans ces nouvelles conditions, un produit différent peut être isolé par filtration des sels et évaporation du solvant et de l'excès de phosgène sous flux d'argon. Le flux est fait ici dans un ballon fermé et s'évacue dans une garde remplie d'une solution aqueuse de soude pour éliminer les vapeurs de phosgène. L'analyse des spectres RMN et IR (en particulier le pic du carbonyle à  $1698\text{ cm}^{-1}$ ) de ce produit ont confirmé qu'il s'agit bien du chloroformiate **[169]** (Figure 83).

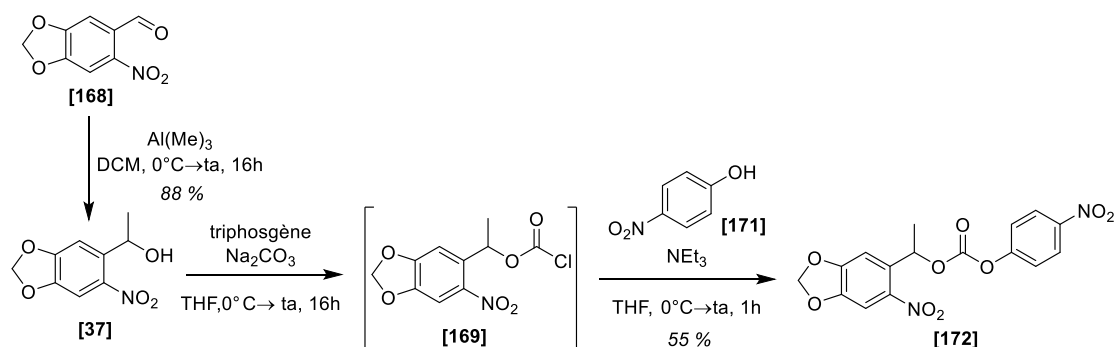


**Figure 83** : Formations du chloroformiate et du carbamate d'imidazole

Ce chloroformiate **[169]** en main, le greffage du groupement photolabile sur le CK666 **[14]** a été testé (Figure 83). Après déprotonation de l'indole avec NaH, le chloroformiate **[169]** est ajouté. On constate ici que le CK666 **[14]** n'est pas consommé et que différents sous-produits apparaissent. Après séparation de différentes fractions par chromatographie sur colonne, on peut voir que ces sous-produits sont dérivés du groupement photolabile **[37]**. En particulier, le dérivé de styrène correspondant, résultant de l'élimination du chlorure et de  $\text{CO}_2$  a été identifié. Ce chloroformiate **[169]** n'est apparemment pas stable dans les conditions basiques nécessaires.

L'attention a été portée vers d'autres groupements plus stables permettant, comme le chloroformiate, de greffer le groupement photolabile **[37]** avec le pont  $\text{-(CO)O-}$ . Le CDI est un réactif usuel pour former les carbonates ou carbamates mixtes en raison de la grande différence de réactivité entre la première et la seconde addition. L'alcool **[37]** a été traité avec un équivalent de CDI et on observe la conversion vers un seul produit. Après purification par chromatographie sur colonne, le carbamate d'imidazole **[170]** peut être isolé avec un rendement de 95 % (Figure 83). Le couplage sur le CK666 **[14]** a été également testé sur ce nouveau réactif **[170]**. Cette fois-ci, il n'y a eu aucune réaction, le carbamate d'imidazole **[170]** semblant extrêmement stable (Figure 83). Il ne se dégrade d'ailleurs pas par traitement aqueux.

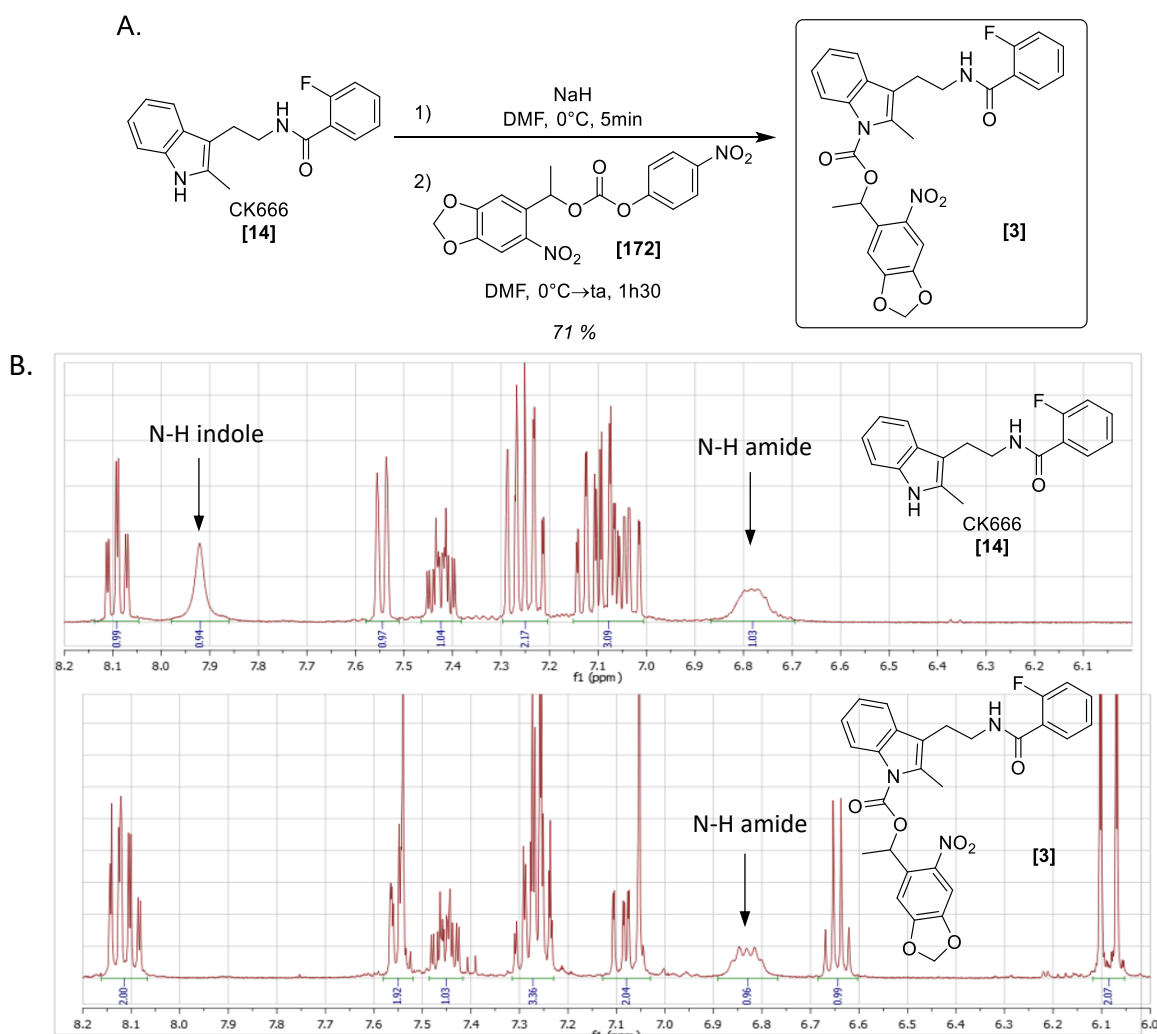
Une troisième option est l'utilisation d'un chloroformiate d'aryle. Cela permet de former le carbonate mixte avec l'alcool souhaité et un phénol. Ce dernier étant un meilleur nucléofuge que les alcools usuels, il peut être déplacé facilement par transestérification pour placer un autre alcool ou une amine de notre choix. Pour démarquer davantage cette différence de réactivité, il a été décidé de former le carbonate mixte **[172]** entre l'alcool du groupement photolabile **[37]** et le *para*-nitrophénol **[171]**, un meilleur groupe partant. Le chloroformiate de *para*-nitrophényle est disponible commercialement mais n'était pas en stock au laboratoire à ce moment du projet, un test a été fait pour voir s'il était possible de préparer tout de même le carbonate mixte à partir du chloroformiate du groupement photolabile **[169]** et du *para*-nitro **[171]**. De manière surprenante, le chloroformiate **[169]** ne se dégrade pas en présence de NEt<sub>3</sub> et de *para*-nitrophénol **[171]** et carbonate mixte **[172]** est formé. Ce produit s'avère instable sur silice et aux traitements aqueux basiques. Il a néanmoins pu être isolé grâce à son insolubilité dans l'acétate d'éthyle, pouvant être collecté après précipitation. Cette séquence permet d'obtenir ce réactif **[172]** sans purification par chromatographie et peut être montée en échelle sur plus d'un gramme (Figure 84).



**Figure 84** : Formation du carbonate mixte du groupement photolabile et du *para*-nitrophénol

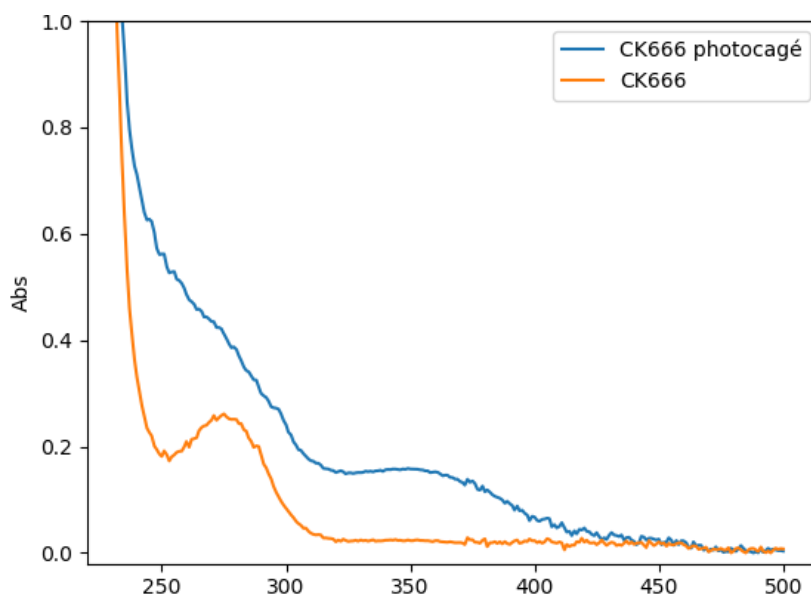
## 3.1.4 Synthèse et caractérisation

Le greffage du groupement photolabile sur le CK666 [14] a pu être testé sur ce nouveau réactif. Après déprotonation du CK666 [14] par NaH, le carbonate mixte du groupement photolabile [172] est ajouté. La solution jaunit de manière intense indiquant la libération de l'anion *para*-nitrophénolate. La formation d'un produit est observée et après séparation par chromatographie sur colonne, l'analyse des spectres RMN indique qu'il s'agit bien du CK666 photocagé [3] (Figure 85 A). Le placement du groupement sur l'azote de l'indole a pu être vérifié sur la RMN grâce à la distinction qui peut être faite entre les deux protons liés à des azotes. En effet, les déplacements chimiques des protons des liaisons N-H de l'indole et de l'amide sont très différents et se retrouvent ici à des valeurs usuelles d'environ 7.9 et 6.8 ppm respectivement. Pour confirmer, on peut aussi remarquer un couplage COSY entre le proton de l'amide et le -CH<sub>2</sub>- voisin. On voit bien ici que le signal du proton de l'azote de l'indole a disparu et que celui de l'amide est encore présent (Figure 85 B).



**Figure 85 :** (A) Synthèse du CK666 photocagé (B) Zoom des spectres RMN <sup>1</sup>H du CK666 et du CK666 photocagé indiquant la régiosélectivité de la réaction

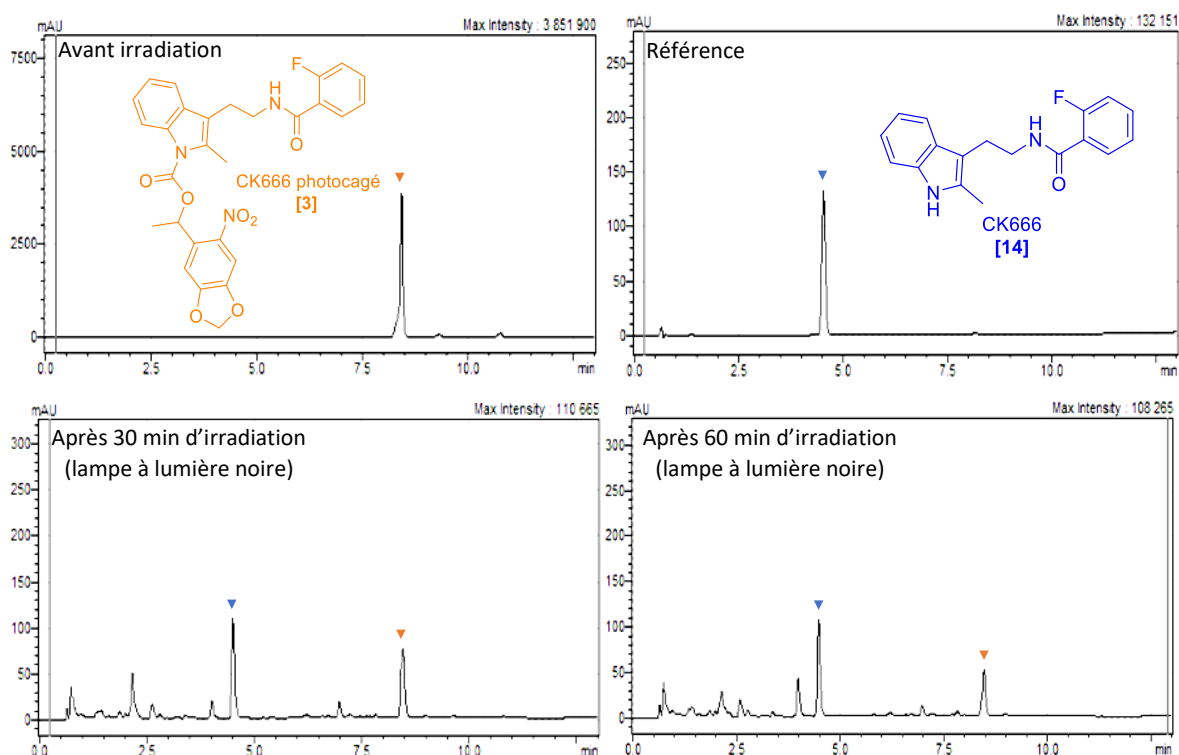
La capacité de photoclivage de ce CK666 photocagé **[3]** devait encore être évaluée avant de potentiels tests biologiques. Même si l'on sait que ce groupement photolabile absorbe dans le proche UV, les spectres UV-visibles du CK666 **[14]** et du CK666 photocagé **[3]** ont été réalisés pour déterminer le maximum d'absorption du groupement photolabile sur ce composé. On voit la présence d'une bande supplémentaire vers 360 nm sur le produit photocagé, correspondant bien au groupement photolabile. Les bandes d'absorption des autres noyaux aromatiques sont tous en dessous de 300 nm et ne seront donc pas affectés par l'irradiation dans le proche UV lors du photoclivage (Figure 86).



**Figure 86** : Spectres UV-visibles du CK666 et de son variant photocagé

A ce stade du projet, une lampe UV (lampe à lumière noire)\* de relativement faible puissance avait été mise en service pour évaluer le photoclivage des composés photocagés préparés. Les effets de solvants étant importants pour ces réactions, le test de photoclivage a été fait dans l'eau. Une solution concentrée de CK666 photocagé **[3]** dans le DMSO a été diluée dans l'eau (en dessous de 2% de DMSO final) et a été irradiée avec cette lampe à lumière noire. La réaction a été suivie par HPLC sur une colonne de C<sub>18</sub>, éluant avec un gradient d'eau et d'ACN. Les temps de rétention pour le CK666 **[14]** et le CK666 photocagé **[3]** ont été mesurés et le milieu brut réactionnel a été injecté et élué avec la même méthode. On peut voir une conversion progressive du CK666 photocagé **[3]** en CK666 **[14]** avec l'apparition de sous-produits polaires, sûrement des produits de dégradation du groupement photolabile libéré (Figure 87). La lampe n'étant pas ici très adaptée, les temps de réaction sont beaucoup plus longs que ce qu'ils devraient être pour des applications en biologie. Néanmoins, la réaction de photoclivage semble fonctionner. ▼

\* Il s'agit d'une combinaison de quatre blocks de deux tubes FL15 Blacklight Blue Tube (15 Watts chacun), des lampes à spectre large centré sur 450 nm mais dont la partie visible est filtrée. On parlera de lampe à lumière noire pour désigner ce montage par la suite.



**Figure 87** : Suivi HPLC de la réaction de photoclivage du CK666 photocagé **[3]**. Les produits sont injectés sur une colonne de C<sub>18</sub> et élués avec un gradient d'eau et d'ACN (1 % d'acide formique) allant de respectivement 70/30 à 20/80 sur 10 minutes avec un flux de 0.5 mL/min. Les chromatogrammes sont mesurés à 275 nm.

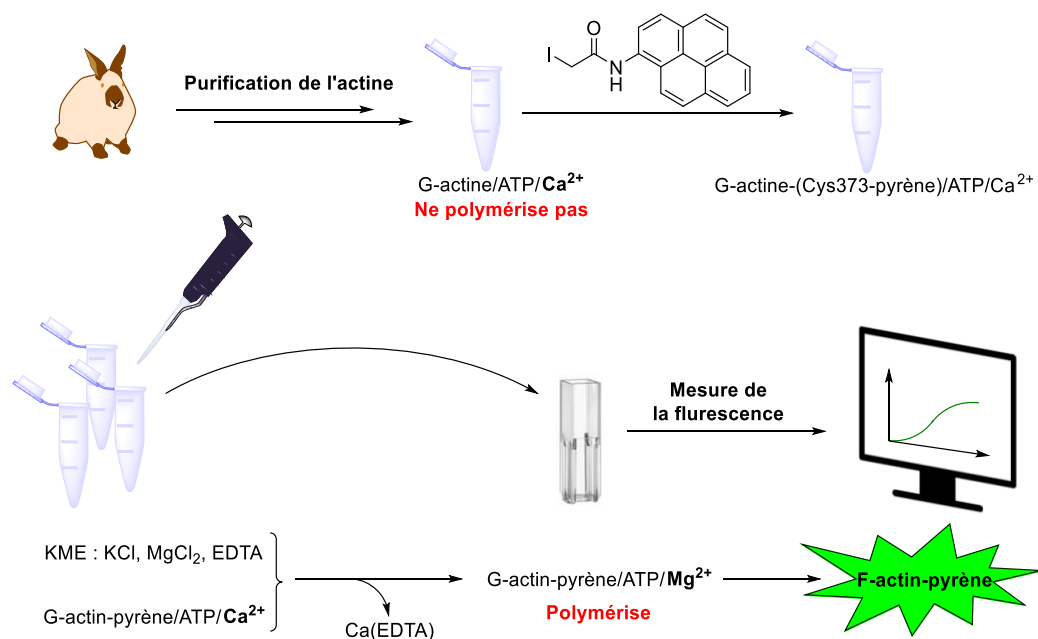
Le photoclivage fonctionnant, il ne restait plus qu'à vérifier que la forme photocagée était effectivement biologiquement inactive. De manière très générale, la démonstration d'une activité ou de l'absence d'une activité biologique peut se faire de deux manières, *in vivo* ou *in vitro*. On peut tester le composé sur des cellules et mesurer leur efficacité à faire un mécanisme connu comme étant liée à la cible du composé. Ces tests sont simples mais il y a toujours une part d'incertitude car on ne peut jamais être totalement certain que le produit agit bien et uniquement sur la cible. Une autre manière de faire est de passer par des systèmes artificiels dans lesquels on fait agir uniquement les protéines d'intérêt. Il faut pour cela que ces protéines puissent fonctionner seules sans l'environnement cellulaire, ce qui est rarement possible. Néanmoins c'est le cas de l'actine et d'un grand nombre de ses protéines partenaires. Ces systèmes permettent d'ôter tout doute sur la nature de la cible, les protéines présentes n'étant que celles d'intérêt. En revanche, cette méthode n'exclut pas la possibilité d'avoir une activité hors-cible avec une protéine inattendue et par conséquent qui n'aurait pas été testée. Voulant ici montrer l'absence d'activité du composé photolabile, il a été décidé d'utiliser les systèmes artificiels pour leur facilité de mise en œuvre.

L'équipe de Christophe Le Clainche de l'I2BC (Institute for Integrative Biology of the Cell) de l'Université Paris-Saclay est spécialisée dans l'étude des mécanismes de l'actine et de ses protéines associées et a un savoir-faire remarquable sur leur purification et leur utilisation dans des systèmes *in vitro*. Une méthode générale et de routine y est mise en œuvre pour mesurer la cinétique de polymérisation de l'actine en présence de protéines partenaires ou de composés à tester. Cette méthode est basée sur la mesure de la fluorescence de l'adduit actine-pyrène. Quand lié à la G-actine, ce composé voit sa fluorescence affaiblie mais cette dernière s'intensifie considérablement lorsque l'actine polymérise sous forme de F-actine. Cette différence permet de visualiser directement la polymérisation de l'actine par simple mesure de la fluorescence. En pratique, après purification de l'actine à partir de tissus musculaires, une étape de bioconjugaison permet de placer le pyrène sur une des cystéines.<sup>108</sup> L'actine est conservée sous forme de G-actine coordonnant de l'ATP mais aussi un atome de calcium, ce qui évite la polymérisation spontanée. Usuellement, une solution de G-actine 10 % pyrène est utilisée et suffisamment fluorescente. L'ajout de cette actine dans un mélange dit « KME » contenant du KCl, du MgCl<sub>2</sub> et de l'EGTA, un chélateur de calcium, permet de créer un niveau de salinité convenable pour la polymérisation en plus de remplacer le calcium dans l'actine par du magnésium, rendant à l'actine son comportement natif et initiant la polymérisation spontanée. La fluorescence du pyrène est ensuite mesurée pour observer la polymérisation. D'autres protéines purifiées et des composés à tester peuvent être mis dans le milieu pour mesurer leur activité sur la polymérisation (Figure 88).

---

(108) Kouyama, T., Mihashi, K. Fluorimetry Study of N-(1-Pyrenyl)Iodoacetamide-Labelled F-Actin. *Eur. J. Biochem.* **1981**, *114* (1), 33–38.





**Figure 88** : Représentation schématique du protocole de mesure *in vitro* de la polymérisation de l'actine par mesure de la fluorescence de l'actine-pyrène<sup>108</sup>

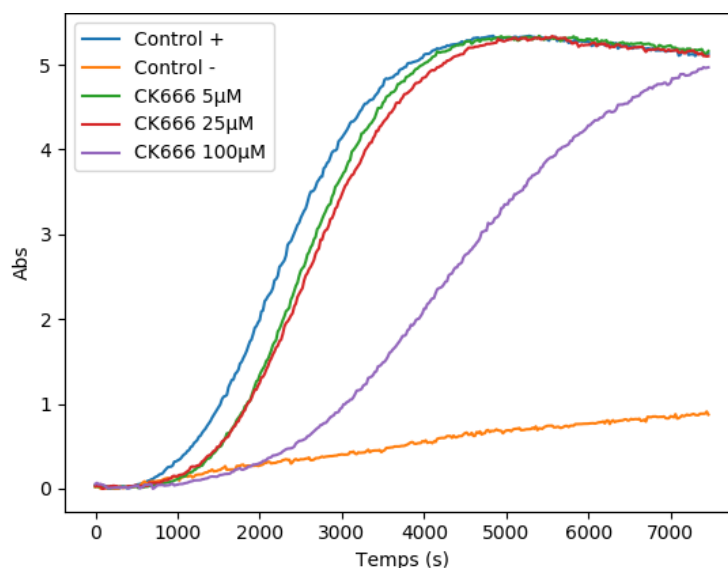
Les courbes de polymérisation de l'actine suivent en général la même allure. La courbe est quasiment plate au début, traduisant la fluorescence faible du G-actine-pyrène. La nucléation étant lente, la courbe met un peu de temps à décoller. Après la phase de nucléation, l'élongation des filaments va la faire croître suivant un modèle de cinétique linéaire d'ordre un par rapport à la concentration en G-actine, la nucléation devenant rapidement négligeable dès que la concentration en G-actine diminue. La courbe va finalement atteindre un plateau représentant l'équilibre entre les vitesses de polymérisation et de dépolymérisation à la concentration critique d'environ 0.1  $\mu\text{M}$  en G-actine. Les interprétations se basent sur les vitesses d'arrivée au plateau ainsi que sur les pentes maximales atteintes.

En ce qui concerne Arp2/3, le promoteur des réseaux branchés d'actine et la cible du CK666 [14], ce complexe a également été isolé mais n'est pas constitutivement actif. Il faut ajouter un de ses activateurs au milieu pour que ce complexe agisse. En pratique, on peut simplement ajouter VCA, un petit peptide portant le domaine terminal de N-WASP, un activateur d'Arp2/3, et suffisant pour en déclencher l'activité (Figure 89).



**Figure 89** : Représentation d'une ramification d'actine faisant intervenir Arp2/3 et VCA, le domaine terminal d'un activateur N-WASP<sup>18</sup>

Ce protocole a été appliqué aux composés obtenus. Pour connaître la plage de concentration dans laquelle les expériences devront se faire, l'activité du CK666 [14] a d'abord été redémontrée. La G-actine-pyrène a été ajoutée à un mélange d'Arp2/3, de VCA et de doses croissantes de CK666 [14]. Les courbes de fluorescence ont été mesurées et montrent une diminution de la vitesse de polymérisation liée à la présence du CK666 [14]. L'activité du CK666 [14] n'apparaît vraiment qu'à haute concentration et l'expérience montre le besoin d'en utiliser au moins 100  $\mu\text{M}$  pour inhiber efficacement Arp2/3 (Figure 90).



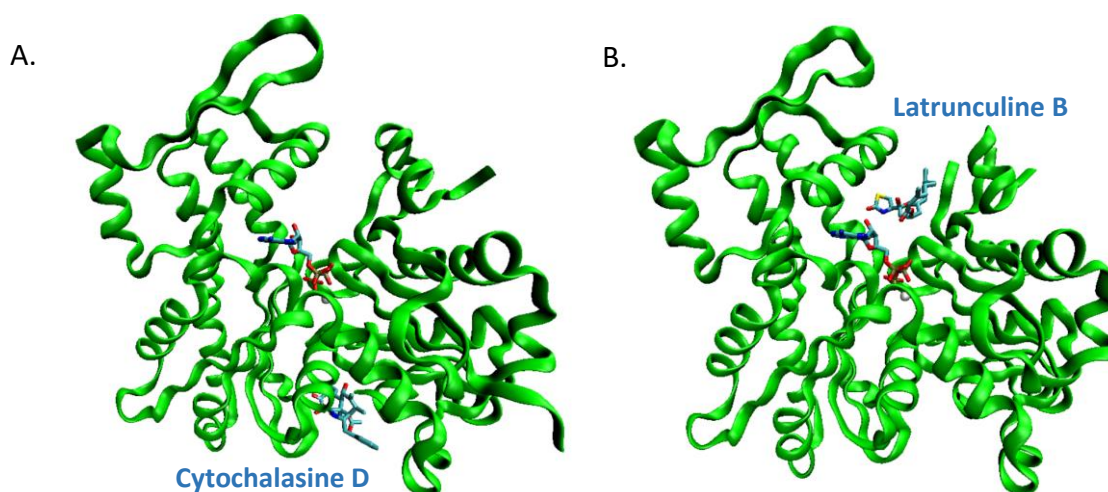
**Figure 90** : Fluorescence de l'actine-pyrène mesurée en présence d'Arp2/3, de VCA et de doses croissantes de CK666. Les contrôles + et - représentent respectivement les réactions sans CK666 et celle sans Arp2/3 ni VCA. Les courbes ont été translattées horizontalement à l'origine.

L'activité du CK666 photocagé [3] a été testée de la même manière. A 100  $\mu\text{M}$ , la courbe obtenue se superpose quasiment avec celle du contrôle -. Cela a laissé penser que le CK666 photocagé [3] était en fait bien plus actif que le CK666 [14], inhibant quasiment totalement Arp2/3. L'expérience a été répétée et la même courbe a été obtenue. Ce résultat inattendu devait être confirmé et pour se faire, d'autres variants du CK666, portant différents substituants sur l'azote de l'indole, ont été préparés pour observer leur influence sur l'activité biologique. Il s'avère finalement que l'allure de la courbe obtenue s'explique plutôt par des problèmes expérimentaux liés aux propriétés physiques du composé que par une activité biologique. Cette étude est détaillée dans l'Annexe 2. Ces résultats complémentaires laissent au contraire suggérer l'inactivité du CK666 photocagé [3] et de ce fait sa possible utilisation comme outil biologique.

## 3.2 Hémisynthèse d'une cytochalasine D photocagée

### 3.2.1 Inhibition orthogonale aux latrunculines de la polymérisation de l'actine

La cytochalasine D **[10]** est connue depuis bien plus longtemps que les latrunculines pour son activité sur l'actine. Découverte en 1967, ce produit naturel peut être isolé à partir de différents champignons filamenteux.<sup>109</sup> D'abord connu simplement pour sa capacité à perturber les microfilaments, il a été démontré en 1981 qu'il se fixait sur l'extrémité croissante des filaments d'actine et y inhibait la polymérisation.<sup>29</sup> Ce mécanisme est très différent de celui démontré pour les latrunculines, qui séquestrent la G-actine du cytosol.<sup>75</sup> Cette différence d'activité se comprend en regardant l'emplacement où le produit se coordine sur l'actine. La cytochalasine D **[10]** va se fixer sur le côté « barbu » de l'actine et on comprend donc comment elle va empêcher aux nouveaux monomères l'accès à ce côté polymérisant (Figure 91 A).<sup>110</sup> La latrunculine B **[8]** se place, elle, dans une cavité de l'extrémité pointue (Figure 91 B).<sup>111</sup> Cela va empêcher cette unité de se fixer sur l'extrémité barbue et polymérisante du filament. Finalement ces deux composés vont inhiber la polymérisation, mais la différence dans le mode d'action pourrait se traduire par des différences de comportement cellulaire.



**Figure 91** : Structure de diffraction aux rayons X de la G-actine-ATP-Ca<sup>2+</sup> complexée avec la (A) cytochalasine D (Identifiant PDB : 3EKU)<sup>110</sup> (B) latrunculine B (Identifiant PDB : 2Q0U)<sup>111</sup>

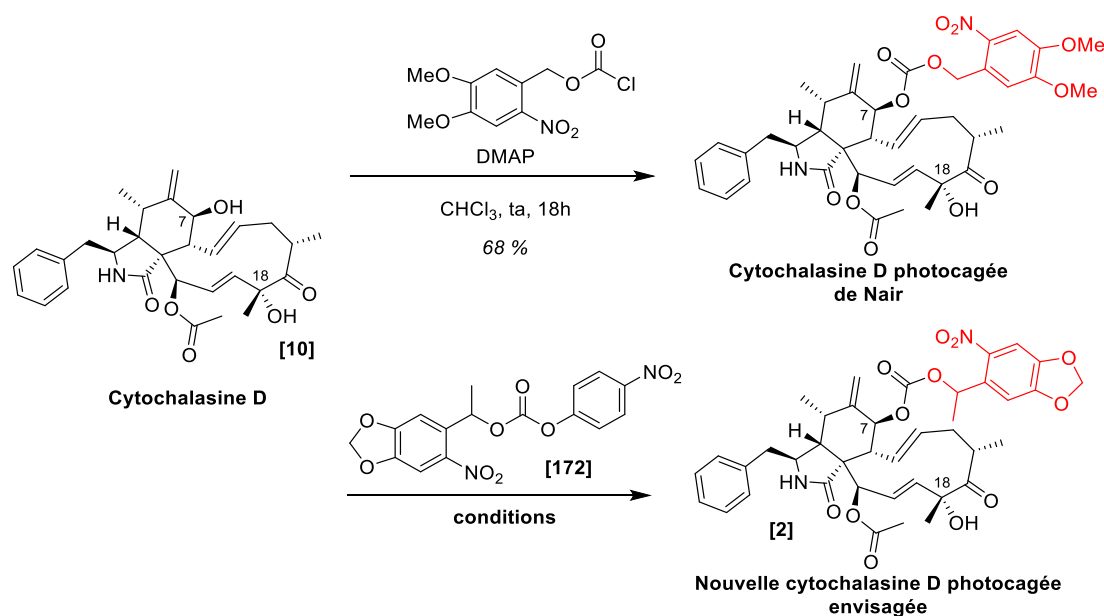
(109) Aldridge, D. C., Armstrong, J. J., Speake, R. N., Turner, W. B. The Cytochalasins, a New Class of Biologically Active Mould Metabolites. *Chem. Commun. Lond.* **1967**, 1, 26-27.

(110) Nair, U. B., Joel, P. B., Wan, Q., Lowey, S., Rould, M. A., Trybus, K. M. Crystal Structures of Monomeric Actin Bound to Cytochalasin D. *J. Mol. Biol.* **2008**, 384 (4), 848–864.

(111) Allingham, J. S., Miles, C. O., Rayment, I. A Structural Basis for Regulation of Actin Polymerization by Pectenotoxins. *J. Mol. Biol.* **2007**, 371 (4), 959–970.

## 3.2.2 Hémisynthèse et caractérisation

La cytochalasine D **[10]** apparaît donc comme une cible intéressante car inhibant la polymérisation de l'actine de manière orthogonale à la latrunculine B **[8]**. Il a été décidé de préparer également une forme photocagée de ce composé. Ce produit naturel présente deux alcools tous deux propices au placement d'un groupement photolabile, permettant d'envisager une hémisynthèse à partir de la cytochalasine D **[10]** commerciale. En effet, bien que la synthèse totale de ce composé soit possible, sa préparation représenterait un travail conséquent.<sup>112</sup> Cette démarche d'hémisynthèse d'une cytochalasine D photocagée a déjà été réalisée en 2020 par le groupe de Nair. Le groupement photolabile 4,5-diméthoxy-2-nitrobenzyle a été lié à l'alcool en C7 par un pont carbonate et ce composé photocagé a pu être utilisé pour inhiber très localement la croissance des réseaux d'actine au niveau des membranes (Figure 92).<sup>113</sup> Dans la logique de préparation de la bibliothèque d'inhibiteurs photocagés, il serait bienvenu de préparer une nouvelle version de la cytochalasine D photocagée portant le même groupement photolabile **[37]** que le CK666 photocagé **[3]** préparé précédemment. Cette nouvelle version photocagée portera un méthyle en position benzylique du groupement photolabile, groupement améliorant la cinétique de photoclivage.<sup>48</sup> Sa préparation s'appuierait sur la même stratégie d'hémisynthèse, en utilisant le réactif **[172]** développé précédemment.

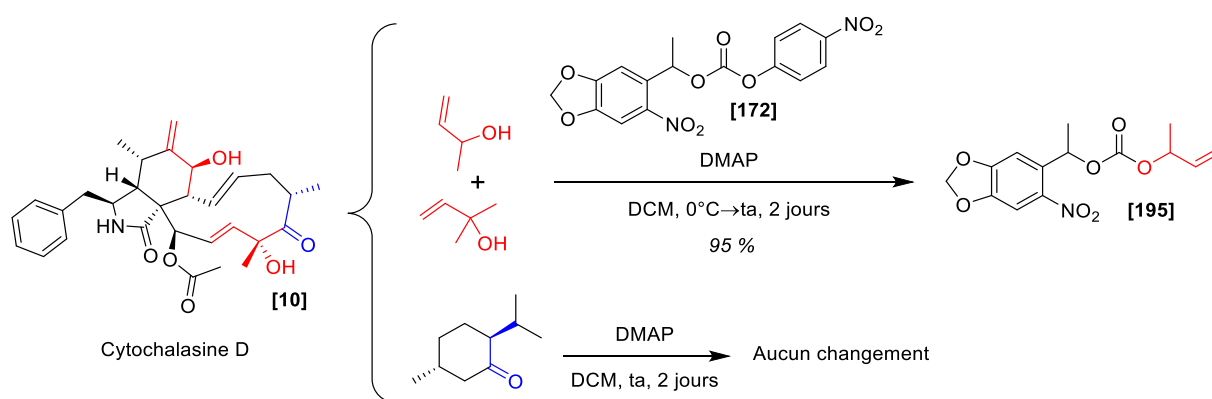


**Figure 92** : Synthèse de la cytochalasine D photocagée de Nair et synthèse envisagée d'une nouvelle cytochalasine D photocagée

(112) Merifield, E., Thomas, E. J. Total Synthesis of Cytochalasin D: Total Synthesis and Full Structural Assignment of Cytochalasin O. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1999**, No. 22, 3269–3283.

(113) Nair, R. V., Zhao, S., Terriac, E., Lautenschläger, F., Hetmanski, J. H. R., Caswell, P. T., Campo, A. del. Possibilities and Limitations of Photoactivatable Cytochalasin D for the Spatiotemporal Regulation of Actin Dynamics. *ChemRxiv*. **2020**.

La cytochalasine D étant commercialement particulièrement onéreuse, un travail en amont de préparation au placement du groupement photolabile a été réalisé. En particulier, la cytochalasine portant deux alcools nucléophiles, la sélectivité a été évaluée sur des modèles simples. Ses deux alcools sont tous deux allyliques et placés dans un cycle. Celui en C18 est tertiaire à cause d'un méthyle à son pied et on peut donc s'attendre à ce que la réaction se fasse préférentiellement avec l'autre alcool secondaire en C7. Bien que l'on ne puisse prévoir les effets de conformation de la molécule complète, cette différence de réactivité a tout de même été testée en faisant réagir le carbonate de *para*-nitrophénol portant le groupement photolabile [172] avec un mélange équimolaire de but-3-èn-2-ol et de 2-méthylbut-3-èn-2-ol. En présence de DMAP comme base et à température ambiante, on obtient 95 % du carbonate de l'alcool secondaire attendu et la RMN révèle moins de 1 % du produit de l'alcool tertiaire (Figure 93). La sélectivité est donc a priori excellente entre ces deux alcools. La cytochalasine D [10] présente également des groupements sensibles aux conditions basiques. La DMAP n'est pas une base forte et ne devrait pas promouvoir de réaction de type aldol avec la cétone ou l'acétate de la molécule. Elle risque néanmoins de racémiser le centre chiral en  $\alpha$  de la cétone. Parmi les cétones portant des centres chiraux en  $\alpha$  disponibles au laboratoire, la (-)-menthone apparait comme un candidat adapté car la racémisation du groupement isopropyle pourra s'observer par RMN étant donné que l'on formerait des diastéréoisomères. Ce composé a été mis en présence d'un équivalent de DMAP pendant deux jours et aucune racémisation n'a été observée (Figure 93). Cela laisse penser que la DMAP ne cause pas la racémisation en  $\alpha$  de cétones à cette température en tout cas.



Ces tests préliminaires laissant penser que la réaction se déroulera comme prévu, la cytochalasine D **[10]** a été achetée et engagée dans la réaction de photocageage. La réaction ayant été lancée sur 2.5 mg, un suivi par HPLC-MS a été réalisé pour permettre d'identifier plus aisément que par CCM les produits observés. La réaction progresse lentement mais l'on observe la formation significative d'un seul produit, sous forme deux diastéréoisomères à cause du méthyle en position benzylique du groupement photolabile qui a été préparé de manière racémique. Après 6 jours, la conversion étant quasi-complète, la réaction a été arrêtée et le produit isolé par chromatographie sur colonne (Figure 94). Le rendement a été difficile à évaluer précisément à cause de la faible quantité de matière mais semble dépasser les 80 %. Le produit a été caractérisé au mieux par LCMS et RMN. La RMN du proton a été interprétée et comparée à celle du produit naturel.<sup>114</sup> On peut remarquer, malgré le dédoublement lié à la présence des deux diastéréoisomères, que l'on a effectivement greffé qu'un seul groupement photolabile, que ce dernier a été placé sur l'alcool en C7 et que le pont carbamate a bien été formé. En effet, le signal du proton de l'alcool en C7 a disparu et seuls les déplacements chimiques des signaux du protons en C7 et de son voisin en C8 varient significativement. On retrouve l'intégralité des autres signaux aux positions attendues. Le signal du proton en C7 passe de 3.81 ppm à 4.90 ppm, un déplacement important mais usuel lors de la formation d'esters ou de carbonates (Tableau 10). Ces interprétations laissent penser que l'on a effectivement obtenu la cytochalasine D photocagée prévue **[2]** (Figure 94).

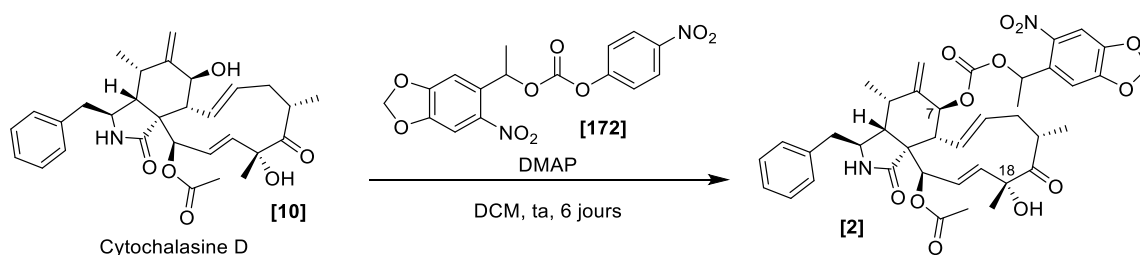
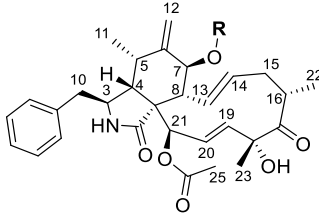
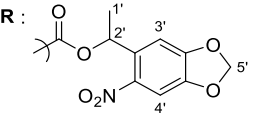


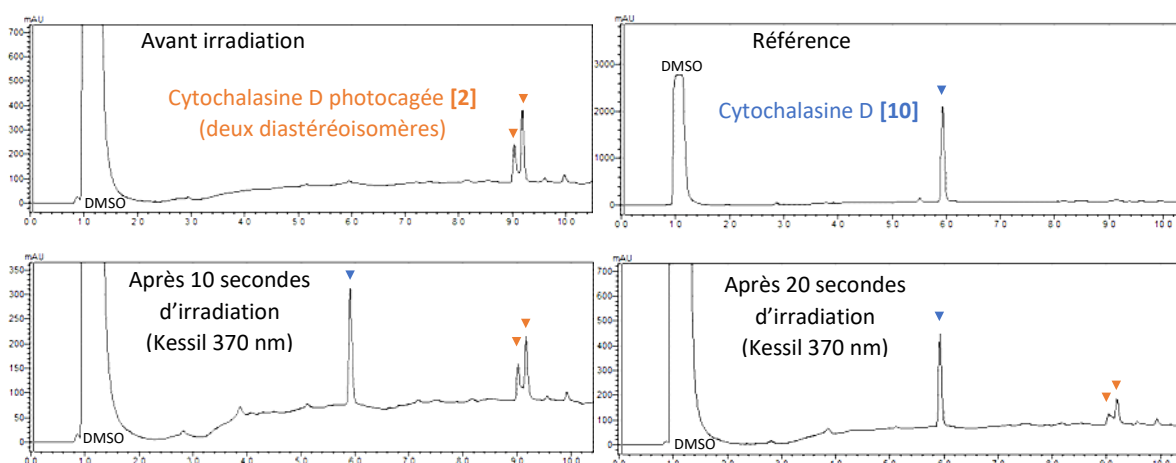
Figure 94 : Synthèse de la cytochalasine photocagée

(114) Fathoni, A., Agusta, A. Bioproduction of Cytochalasin D by Endophytic Fungus *Xylaria* Sp. DAP KRI-5. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2019**, 9 (3), 105–110.

**Tableau 10** : Comparaison des déplacements chimiques décrits des protons de la cytochalasine D et observés de la cytochalasine D photocagée synthétisée (en ppm)<sup>114</sup> Les distinctions sont marquées par un saut de ligne pour protons non équivalents par un symbole « & » pour les diastéréoisomères.

	 <b>R : H</b> Cytochalasine D [10]	 <b>R :</b> Cytochalasine D photocagée [2]
3	3.23 (m)	3.23 – 3.17 (m)
4	2.14 (dd, J = 4.4, 3.9 Hz)	2.18 – 2.12 (m)
5	2.72 (m)	2.82 – 2.63 (m) (avec H <sub>10</sub> et H <sub>16</sub> )
7	<b>3.81 (d, J = 10.4 Hz)</b>	<b>4.90 (d, J = 10.7 Hz) &amp; 4.89 (d, J = 10.7 Hz)</b>
8	<b>2.85 (t, J = 10.4, 9.1 Hz)</b>	<b>3.17 – 3.06 (m)</b>
10	2.67 (dd, J = 13.3, 9.1 Hz) 2.82 (dd, J = 13.6, 5.2 Hz)	2.82 – 2.63 (m) (avec H <sub>5</sub> et H <sub>16</sub> )
11	0.96 (d, J = 6.5 Hz)	0.90 (d, J = 6.5 Hz) & 0.87 (d, J = 6.9 Hz)
12	5.09 (s) 5.29 (s)	5.05 (s) & 5.03 (s) 5.34 – 5.20 (m) (avec H <sub>19</sub> )
13	5.14 (dd, J = 15.6, 2.6 Hz)	5.11 (dd, J = 15.8, 2.4 Hz) & 5.11 (dd, J = 15.8, 2.5 Hz)
14	5.69 (dd, J = 15.6, 9.8 Hz)	5.61 (dd, J = 15.7, 9.8 Hz) & 5.54 (dd, J = 15.8, 9.7 Hz)
15	2.02 (dd, J = 12.9, 5.2 Hz) 2.51 (dd, J = 12.95, 11.05 Hz)	1.95 (dd, J = 13.0, 5.5 Hz) & 1.87 (dd, J = 12.8, 5.3 Hz) 2.43 (dd, J = 12.6, 10.8 Hz) & 2.34 (dd, J = 12.9, 11.1 Hz)
16	2.74 (m)	2.82 – 2.63 (m) (avec H <sub>5</sub> et H <sub>10</sub> )
19	5.34 (ddd, J = 15.5, 10.5, 5.2 Hz)	5.34 – 5.20 (m) (avec H <sub>12</sub> )
20	6.11 (dd, J = 15.6, 2.6 Hz)	6.07 (dd, J = 15.7, 2.6 Hz) & 6.05 (dd, J = 15.8, 2.6 Hz)
21	5.63 (t, J = 2.6 Hz)	5.66 (t, J = 2.6 Hz)
22	1.19 (d, J = 7.2 Hz)	1.17 (d, J = 6.7 Hz)
23	1.51 (s)	1.49 (s)
25	2.26 (s)	2.29 (s) & 2.28 (s)
NH	5.43 (s)	5.41 (s) & 5.39 (s)
7-OH	<b>1.91 (s)</b>	<b>∅</b>
18-OH	4.65 (s)	4.62 (s) & 4.59 (s)
1'	∅	1.58 (d, J = 6.5 Hz) & 1.57 (d, J = 6.5 Hz)
2'	∅	6.19 (q, J = 6.5 Hz) & 6.15 – 6.09 (superposé)
3'	∅	7.00 (s) & 6.87 (s)
4'	∅	7.50 (s) & 7.49 (s)
5'	∅	6.13 (d, J = 1.2 Hz) & 6.11 (2d, J = 1.1, Hz) 6.10 (d, J = 1.2 Hz)

La capacité de photoclivage de cette nouvelle cytochalasine D photocagée **[2]** a été évaluée par une expérience similaire à celle employée pour l'étude précédente du CK666 photocagé **[3]**. A ce stade, une lampe UV adapté à 370 nm (lampes Kessil)\* avait été achetée et mise en place dans le laboratoire. Des solutions diluées de cytochalasine D **[10]** et de cytochalasine D photocagée **[2]** ont été préparées dans l'eau avec 1 % de DMSO et les temps de rétention de ces deux composés ont été mesurés par HPLC sur colonne C<sub>18</sub> éluant avec un gradient d'eau et d'ACN. La cytochalasine D photocagée **[10]** a ensuite été irradiée avec la lampe UV Kessil à 370 nm et la réaction a été suivie par HPLC avec la même méthode. On observe en quelques dizaines de secondes la disparition progressive de la cytochalasine D photocagée **[2]** et l'apparition de la cytochalasine D **[10]** (Figure 95). Le photoclivage est efficace et l'on n'observe pas de produit secondaire comme précédemment avec le CK666 photocagé **[3]**. Cela est sûrement dû au spectre fin de la nouvelle lampe UV utilisée qui est plus sélective et adaptée à cette réaction de photoclivage.



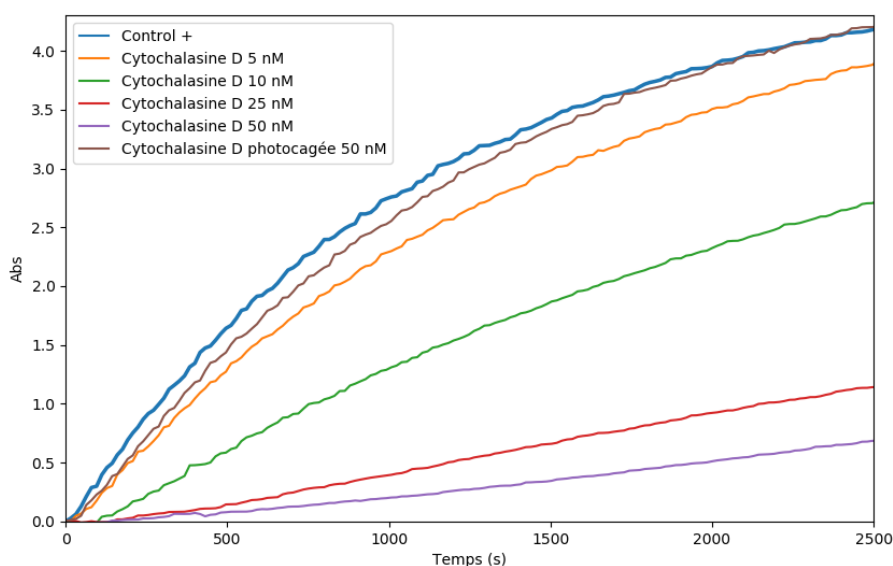
**Figure 95** : Suivi HPLC de la réaction de photoclivage de la cytochalasine D photocagée **[2]**. Les produits sont injectés sur une colonne de C<sub>18</sub> et élués avec un gradient d'eau et d'ACN (1 % d'acide formique) allant de respectivement 80/20 à 10/90 sur 10 minutes avec un flux de 0.5 mL/min. Les chromatogrammes sont mesurés à 200 nm.

L'activité biologique de ce composé a également pu être évaluée dans la même série de tests *in vitro* effectués précédemment avec le CK666 photocagé **[3]** et la wiskostatine photocagée **[5]**. Comme avec les exemples précédents, l'activité de la cytochalasine D **[10]** a d'abord été observée pour évaluer une concentration d'utilisation du composé photolabile. La cytochalasine D **[10]** agissant directement sur l'actine, on pourrait observer simplement la polymérisation de l'actine-pyrène par

\* Il s'agit d'une lampe Kessil PR160 à spectre fin centré sur 370nm (43 Watts). Le même modèle avec un spectre centré sur 440 nm (45 Watts) a également été acheté et a été utilisé dans des expériences dans la 4<sup>ème</sup> partie. Elles seront désignées par lampes Kessil avec leurs longueurs d'onde respectives par la suite.



fluorescence sans avoir besoin d'ajouter d'autres protéines. Néanmoins, la polymérisation de l'actine seule est lente à cause de la phase de nucléation mais on peut l'éviter en ajoutant des « amorces » de F-actine stabilisées par de la spectrine. La spectrine est une protéine qui va se fixer sur les filaments d'actine et les maintenir dans leur état, empêchant dépolymérisation ou rupture. Les assemblages F-actine/spectrine peuvent être fragmentés et isolés pour servir d'« amorces » sur lesquelles peuvent croître des filaments d'actine. Utiliser ces « amorces » permet d'observer directement la phase de croissance des filaments et de s'épargner la phase lente de nucléation. La cytochalasine D **[10]** inhibant la croissance des filaments, la phase de nucléation n'est que peu significative vis-à-vis de son activité. La polymérisation de l'actine-pyrène a donc été mesurée en présence de quantités infimes (150 pM) d'« amorces » et de doses croissantes de cytochalasine D **[10]**. L'activité de la cytochalasine D **[10]** a pu être observée et est active avec un  $IC_{50}$  de l'ordre de 10 nM. L'activité de la cytochalasine D photocagée **[2]** a été testée à 50 nM et s'avère bien inactive à cette concentration. On n'observe pas ici de déformation des courbes comme avec les expériences sur les composés photocagés précédemment testés (Figure 96). Cela est sûrement dû à la bien plus faible concentration utilisée ici, rendant négligeables les phénomènes d'absorption lumineuse du composé.



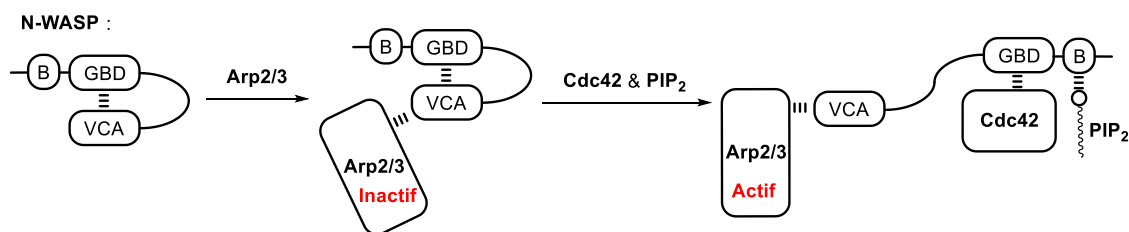
**Figure 96** : Fluorescence de l'actine-pyrène mesurée en présence de « amorces » de F-actine stabilisées par de la spectrine, de cytochalasine D ou de cytochalasine D photocagée. Le contrôle + représente la réaction sans ajout de composé

L'ensemble de ces caractérisations montrent que cette cytochalasine D photocagée **[2]** semble tout à fait adaptée au photocontrôle de la polymérisation de l'actine et pourra être utilisée dans le futur sur cellules. Pour aller plus loin, une étude comparative du photocontrôle avec cette nouvelle cytochalasine B photocagée par rapport à celui avec la latrunculine B photocagée **[1]** serait particulièrement intéressante, lorsque la synthèse de cette dernière aura abouti.

### 3.3 Tentative de développement d'une wiskostatine photocagée

#### 3.3.1 N-WASP, un activateur d'Arp2/3 et son inhibition par la wiskostatine

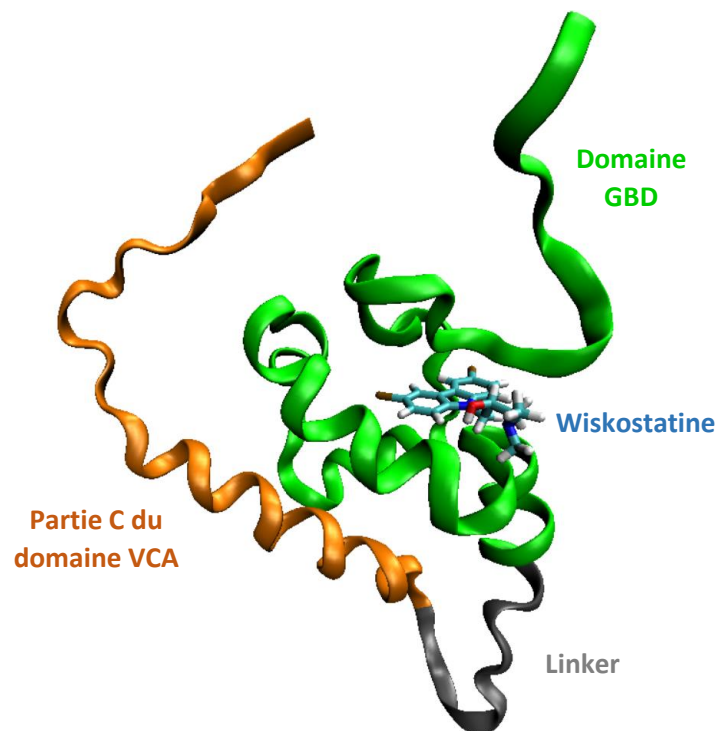
N-WASP est une protéine de la famille de WASP, connue historiquement pour son implication dans le syndrome de Wiskott–Aldrich. Cette protéine est impliquée dans la chaîne d'activation d'Arp2/3. En effet, N-WASP possède plusieurs domaines d'intérêt lui permettant d'interagir avec Arp2/3 et d'autres protéines. En particulier, le domaine VCA peut se lier à Arp2/3 et le domaine B-GBD peut se lier à des protéines de la famille Rho comme Cdc42 et au lipide PIP<sub>2</sub>. Ces deux domaines peuvent aussi se lier entre eux, repliant N-WASP sur elle-même. L'interaction entre le domaine VCA et Arp2/3 dans la configuration repliée d'N-WASP ne permet pas son activation. Il faut que le domaine VCA soit libéré pour qu'il puisse activer Arp2/3. Pour cela l'occupation du domaine B-GBD par Cdc42 ou par PIP<sub>2</sub> doit se faire, dépliant N-WASP et permettant au domaine VCA d'activer Arp2/3 (Figure 97).<sup>37,115</sup> On comprend ici qu'N-WASP permet de réguler l'activité d'Arp2/3 de deux manières, en jouant sur les protéines Rho et en localisant Arp2/3 à la membrane par PIP<sub>2</sub>.



**Figure 97** : Représentation schématique de N-WASP et de la chaîne d'activation d'Arp2/3<sup>102</sup>

(115) Prehoda, K. E., Scott, J. A., Mullins, R. D., Lim, W. A. Integration of Multiple Signals Through Cooperative Regulation of the N-WASP-Arp2/3 Complex. *Science* **2000**, 290 (5492), 801–806

L'inhibition de N-WASP offre une manière indirecte d'inhiber le complexe Arp2/3 en agissant plus en amont dans la chaîne d'activation. Pour cette raison, le groupe de Kirschner a effectué un screening de 16 320 composés pour chercher des potentiels inhibiteurs. La wiskostatine [16] a été identifiée comme agissant sur N-WASP avec un  $EC_{50}$  d'environ 4  $\mu$ M. Le mécanisme d'action de cette molécule a été recherché et il a été montré qu'elle agit en stabilisant la conformation repliée inactive de N-WASP. En effet, N-WASP étant inactive dans sa conformation native, il faut la présence de Cdc42 ou  $PIP_2$  pour induire son activité sur Arp2/3. Des expériences de compétition entre la wiskostatine [16] et ces deux activateurs ont montré que la molécule va aller s'opposer à l'induction de l'activité par Cdc42 et  $PIP_2$ . Plus précisément, une étude RMN sur un analogue simplifié de N-WASP a montré que la wiskostatine [16] se coordine dans le domaine GBD et va favoriser son interaction avec le domaine VCA et de ce fait favoriser la configuration repliée (Figure 98).<sup>38</sup> On parlera tout de même d'inhibition de N-WASP par la suite même si il ne s'agit pas techniquement d'inhibition étant donné que la protéine est nativement inactive. La wiskostatine [16] empêche l'interaction de la protéine avec ses activateurs et la maintient dans son état inactif. En présence de ses activateurs, on peut considérer la forme dépliée d'N-WASP comme la configuration de référence et parler d'inhibition de cette forme ouverte active en forçant son repliement.



**Figure 98** : Structure par RMN de mini-WASP, un analogue simplifié de N-WASP, complexé à la (S)-wiskostatine (Identifiant PDB : 1T84)<sup>38</sup>

## 3.3.2 Synthèse de la wiskostatine photocagée

Comme avec le CK666, un variant photocagé de la wiskostatine permettrait de contrôler localement Arp2/3 de manière indirecte. En termes de structure, la wiskostatine **[16]** possède un noyau carbazole, bromé aux positions 3 et 6 et portant sur l'azote une chaîne hydrophile. Cette courte chaîne de trois carbones porte un alcool secondaire et se termine par une diméthylamine. Cet alcool secondaire est un candidat de choix pour le placement du groupement photolabile, les carbonates d'alcools secondaires étant relativement stables et cet alcool étant placé proche de la protéine d'après la structure calculée.<sup>38</sup> Comme avec le CK666, l'attachement du groupement photolabile pourra donc se faire directement sur la wiskostatine **[16]**. En plus, les deux énantiomères ayant des activités biologiques quasi identiques, on pourra se permettre d'utiliser un mélange racémique.

La préparation de la wiskostatine **[16]** n'étant pas décrite, une courte voie de synthèse a été développée. La wiskostatine **[16]** est une molécule assez simple ne laissant pas beaucoup d'options en termes de rétrosynthèse. La position des bromes sur le carbazole, tous deux en *para* de l'azote, fait qu'ils pourront tous deux être introduits par bromation électrophile du carbazole **[188]**. Lorsque l'on regarde la chaîne, on remarque que chaque carbone est substitué par un hétéroatome, le premier par le carbazole, le second par un groupement hydroxyle et le dernier par la diméthylamine. Il faut donc une chaîne à trois carbones électrophiles à chaque position. La présence de l'oxygène central simplifie le problème car il permet d'envisager l'utilisation d'un époxyde qui est électrophile à la position terminale et fournit un alcool sur la position centrale après ouverture, comme voulu sur le produit. L'épichlorhydrine sera un réactif de choix pour permettre la formation de cette chaîne, portant un époxyde et un chlorure sur le troisième carbone, remplissant tous les critères. A cause de la faible nucléophilicité du carbazole dibromé, il sera judicieux de l'ajouter en premier sur l'épichlorhydrine et d'ajouter ensuite la diméthylamine pour compléter la chaîne (Figure 99).

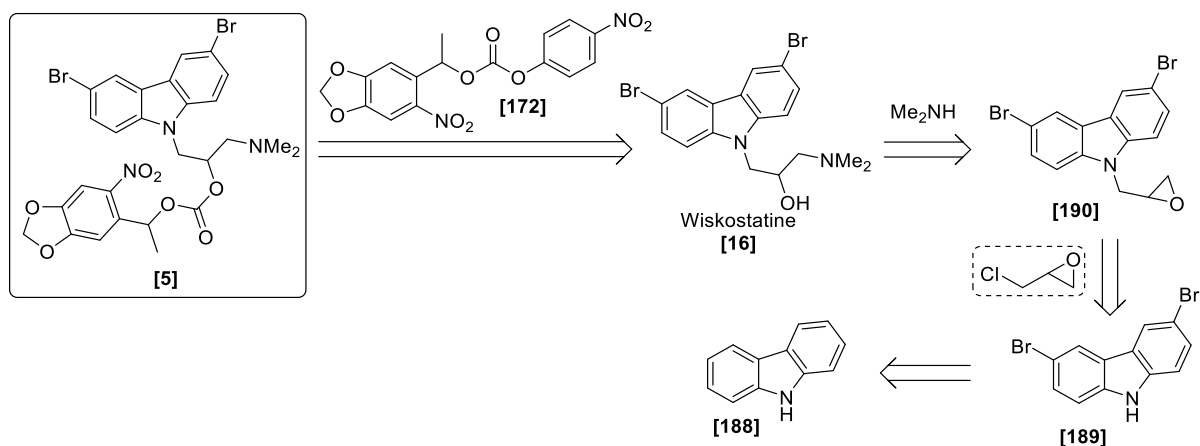
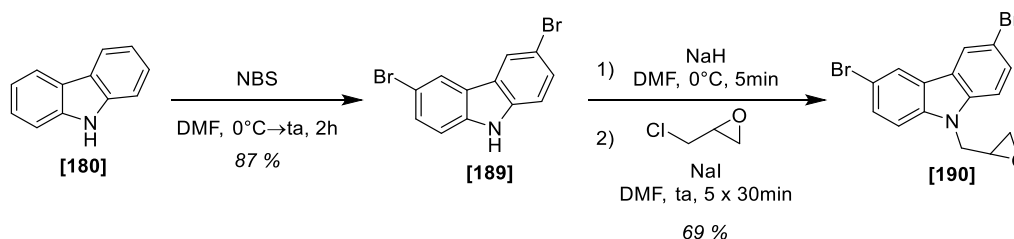


Figure 99 : Rétrosynthèse de la wiskostatine photocagée **[5]**

La première étape de dibromation du carbazole **[188]** est décrite dans la littérature.<sup>116</sup> Le carbazole est traité avec deux équivalents de NBS dans le DMF. Le produit dibromé est isolé des traces de produits mono et tribromés par chromatographie sur colonne et est obtenu avec un rendement de 87 % (Figure 100). La sélectivité des bromations est ici comme prévu en *para* de l'azote, on n'observe pas de produits *ortho*.

Ce carbazole **[189]** en main, l'ajout de la chaîne par substitution sur l'épichlorhydrine a été réalisé. Le carbazole dibromé **[189]** étant un nucléophile relativement faible, un excès d'épichlorhydrine a été convertie en épiiodohydrine par échange d'halogène avec NaI (réaction de Finkelstein). Le carbazole **[189]** a été déprotoné totalement par NaH et l'épiiodohydrine a été ajoutée. On observe la formation d'un produit mais la réaction ne sera pas complète. Après purification, seulement 27 % du produit **[190]** a été obtenu. Des ajouts successifs d'épichlorhydrine ont donc été réalisés pour espérer pousser la réaction à conversion totale. Le carbazole **[188]** a été déprotoné avec NaH en présence d'un excès de NaI et des ajouts successifs d'épichlorhydrine ont été réalisés. Après cinq ajouts, la réaction semble complète et le produit a été isolé avec un bien meilleur rendement de 69 % (Figure 100).



**Figure 100** : Dibromation du carbazole et substitution sur l'épichlorohydrine

L'étape finale pour la formation de la wiskostatine **[16]** est l'ouverture de l'époxyde par la diméthylamine. La diméthylamine est un gaz en conditions ambiantes mais on peut utiliser le chlorhydrate pour simplifier les procédures. Un premier essai a été fait en préparant le diméthylamidure de lithium et en ajoutant ce puissant nucléophile sur l'époxyde. Le sel de diméthylamine est traité avec deux équivalents de *n*-butyllithium et la solution obtenue est ajoutée à 0°C sur l'époxyde **[190]**. Dans ces conditions, des produits sont formés et ont été séparés par chromatographie sur colonne. On reconnaît sur ces produits des signaux provenant du dibromocarbazole et de la chaîne alkyle mais aucun de ces produits semblent contenir le motif diméthylamine. Des conditions similaires à celles utilisées pour l'ouverture de l'époxyde **[96]** en bromohydrine ont également été testées. Avec une combinaison de LiBr, du sel de déméthylamine et de triéthylamine, on pouvait espérer ouvrir l'époxyde en bromohydrine et substituer le bromure par

(116) Gong, W.-L., Zhong, F., Aldred, Matthew. P., Fu, Q., Chen, T., Huang, D.-K., Shen, Y., Qiao, X.-F., Ma, D., Zhu, M.-Q. Carbazole Oligomers Revisited: New Additions at the Carbazole 1- and 8-Positions. *RSC Adv.* **2012**, 2 (29), 10821.

la diméthylamine. Ici encore, on observe la conversion de l'époxyde **[190]** en différents produits qui ne correspondent pas au produit attendu. Un dernier jeu de conditions plus douces a été recherché et la catalyse avec un acide de Lewis a finalement permis d'obtenir la wiskostatine **[16]**. En effet, le triflate d'ytterbium est un catalyseur connu pour activer les époxydes.<sup>117</sup> En présence de ce dernier, l'ouverture de l'époxyde **[190]** par la diméthylamine a été réalisée. Le produit est obtenu et purifié aisément par chromatographie sur colonne. Jusque-là, les purifications avaient été compliquées, les produits étant proches sur CCM, mais ici, la différence de polarité est flagrante à cause de l'alcool et de l'amine supplémentaire. La wiskostatine **[16]** a finalement été obtenue avec un rendement de 79 % (Figure 101).

L'ajout du groupement photolabile peut se faire directement sur l'alcool de la wiskostatine **[16]**. En utilisant le réactif **[172]** préparé précédemment, la formation du carbonate mixte a été réalisée et la wiskostatine photocagée **[5]** a été isolée avec un rendement quasi quantitatif de 95 % sous forme d'un mélange de diastéréoisomères en proportions quasi égales de 55:45 (rapport déterminé par RMN). Globalement, la wiskostatine photocagée **[5]** a été préparée en 4 étapes avec un rendement global de 45 % (Figure 101).

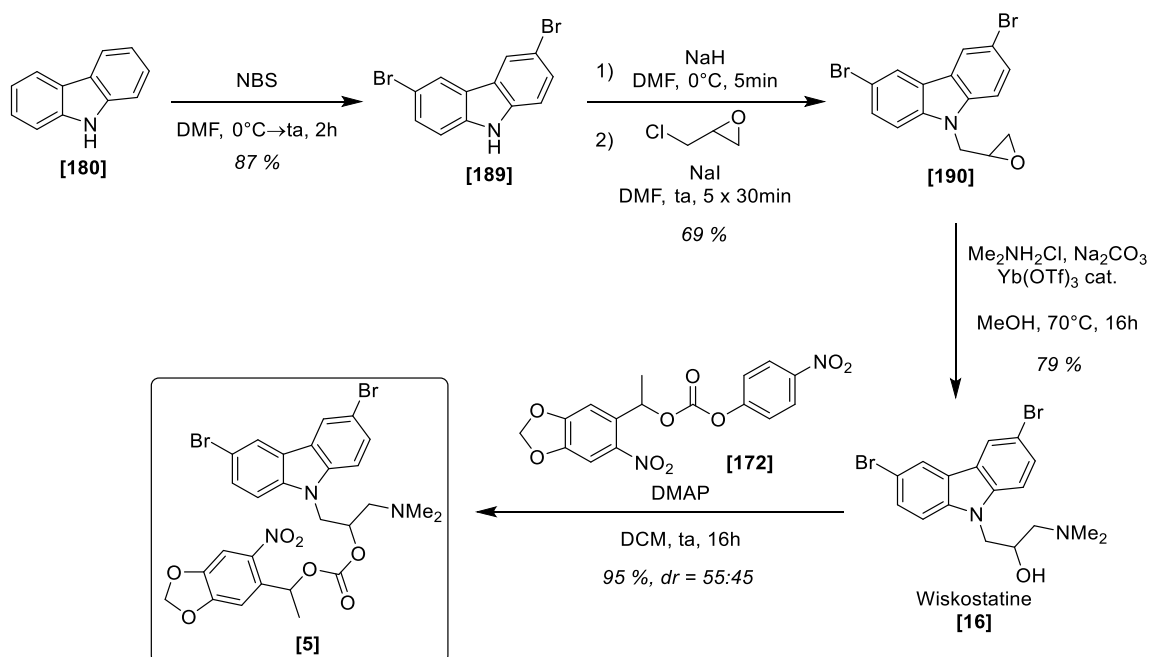
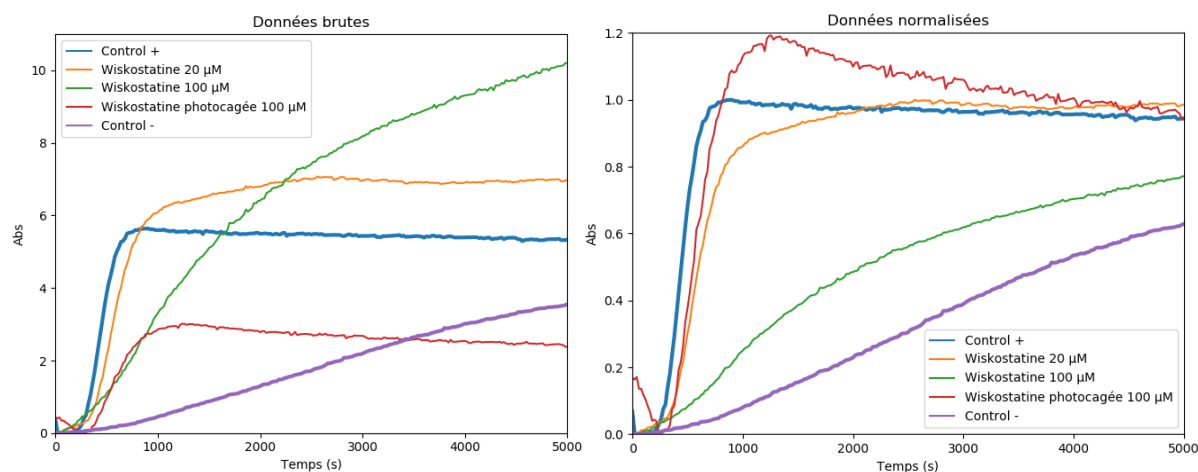


Figure 101 : Synthèse de la wiskostatine photocagée

(117) Meguro, M., Asao, N., Yamamoto, Y. Ytterbium Triflate and High Pressure-Mediated Ring Opening of Epoxides with Amines. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1994**, No. 18, 2597–2601.

## 3.3.3 Propriétés biologiques et problèmes de photoclivage

L'activité biologique de cette wiskostatine photocagée **[5]** ainsi que sa capacité de photoclivage ont été évaluées. Les activités biologiques sur N-WASP ont été évaluées *in vitro* en mesurant la polymérisation de l'actine-pyrène par fluorescence. Le système est ici plus complexe car il faut mettre en présence l'actine avec Arp2/3, N-WASP et un activateur de N-WASP, cette dernière étant nativement inactive. En pratique, quand N-WASP est purifiée, une partie de ses activateurs restent fixés et ne sont pas éliminés. Les lots de N-WASP sont donc partiellement actifs. Il n'y a pas forcément besoin d'ajouter un activateur de N-WASP pour les expériences et on s'est contenté d'observer l'inhibition de la fraction active de N-WASP. Comme pour les expériences précédentes avec le CK666, l'activité de la wiskostatine a d'abord été redémontrée en mettant les protéines en présence de doses croissantes du composé. On observe ici également un problème de dilatation des courbes de fluorescence obtenues mais cette fois-ci sans saut à l'origine (Figure 102). Les solutions étaient également limpides. Le problème pourrait simplement provenir de l'absorbance du composé dans l'UV, absorbant partiellement le faisceau entrant du spectromètre. Si cet effet est le seul élément perturbant le système, il devrait être linéaire et pourrait être corrigé en normalisant les courbes. Les courbes ont donc été normalisées en utilisant la valeur du plateau comme référence et on obtient des courbes ressemblant à celles attendues (Figure 102). On remarque néanmoins qu'il faut ici aussi environ 100  $\mu\text{M}$  de wiskostatine **[16]** pour obtenir une inhibition significative. De ce fait, la wiskostatine photocagée a également été testée à 100  $\mu\text{M}$  et ici encore, on obtient une courbe écrasée mais pas translatée. En appliquant la même correction, on voit qu'il n'y a pas d'activité notable (Figure 102). Ces expériences semblent montrer que l'on retrouve bien l'activité de la wiskostatine **[16]** et que la forme photocagée **[5]** synthétisée n'a effectivement pas d'activité. Il faudra néanmoins une confirmation sur cellules.

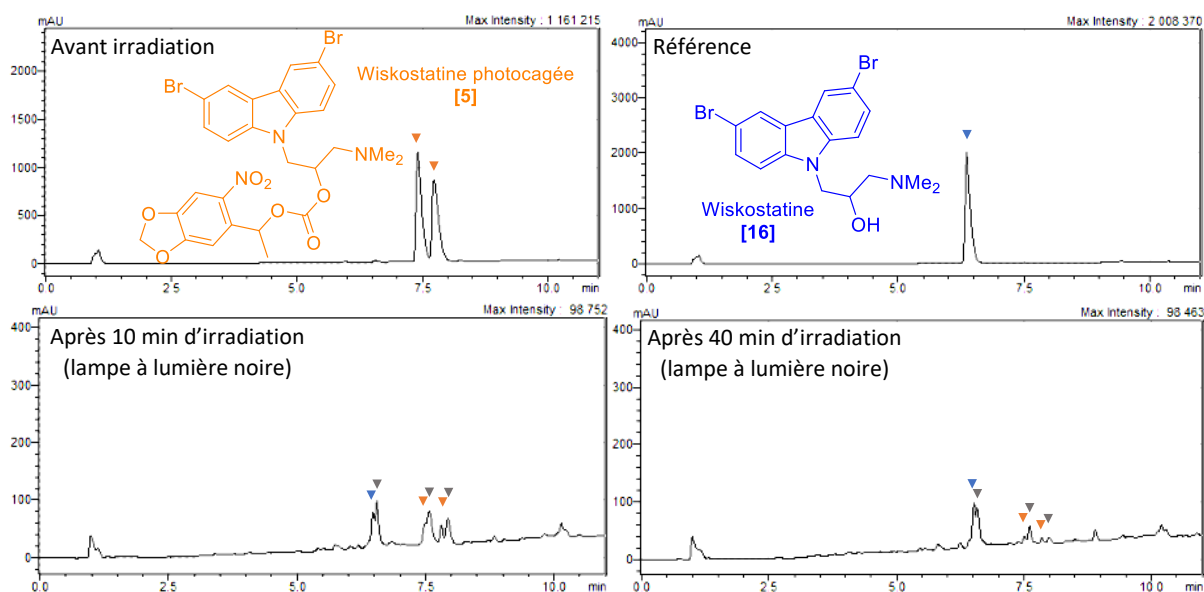


**Figure 102** : Fluorescence de l'actine-pyrène mesurée en présence d'Arp2/3, de N-WASP et wiskostatine ou de wiskostatine photocagée. Les contrôles + et - représentent respectivement les réactions sans ajout de composé et celle sans N-WASP. Les courbes ont été translâtées horizontalement à l'origine. Les courbes du second graphe ont été normalisées afin de placer le plateau à 1.0.

On peut remarquer un détail intéressant sur la courbe obtenue en présence de la wiskostatine photocagée [5]. La courbe croit plus haut que le plateau puis va progressivement redescendre pour l'atteindre. Ce phénomène peut arriver avec des réseaux branchés lorsque la polymérisation de l'actine est particulièrement rapide (dû ici au fait que la fraction active de N-WASP utilisée est à elle seule bien plus efficace pour activer Arp2/3 que le peptide VCA utilisé dans les expériences précédentes, résultant en une nucléation très rapide par Arp2/3). Si la quantité d'extrémités polymérisantes croît très rapidement, on peut dépasser la valeur d'équilibre habituelle entre polymérisation et dépolymérisation, résultant en ce dépassement du plateau. Les branchements initiés par Arp2/3 ne peuvent pas dépolymériser par l'extrémité pointue, il faut d'abord que la branche mère dépolymérise, que Arp2/3 se détache avant que cette extrémité soit libre. S'il y a énormément de branchement, l'équilibre entre polymérisation et dépolymérisation ne dépend presque plus que des extrémités barbues, diminuant la valeur critique de concentration d'actine à l'équilibre.

La réaction de photoclivage a également été testée. Comme pour le CK666 photocagé, la wiskostatine photocagée [5] a été mise en solution dans l'eau avec 5 % de DMSO et a été irradié avec la lampe UV à lumière noire (chronologiquement, ce travail a été réalisé avant celui sur la cytochalasine D et l'arrivée des lampes Kessil). La réaction a été suivie par HPLC sur colonne C<sub>18</sub>, éluant avec un gradient d'eau et d'ACN. La wiskostatine photocagée [5] est bien consommée mais le pic correspondant à la wiskostatine [16] n'est pas clair (il y a une légère différence de temps de rétention et un dédoublement, il s'agit sûrement de deux produits, la wiskostatine n'étant potentiellement aucun des deux). On remarque aussi des pics de nombreux produits secondaires (Figure 103).





**Figure 103** : Suivi HPLC de la réaction de photoclivage de la wiskostatine photocagée. Les produits sont injectés sur une colonne de C<sub>18</sub> et élués avec un gradient d'eau et d'ACN (1 % d'acide formique) allant de respectivement 95/05 à 10/90 sur 10 minutes avec un flux de 0.5 mL/min. Les chromatogrammes sont mesurés à 250 nm.

Un suivi RMN a été fait pour essayer de déterminer la nature des produits secondaires. La wiskostatine photocagée [5] a été mise en solution dans le méthanol-d<sub>4</sub> et non dans l'eau pour avoir une concentration visible en RMN. La solution a ensuite été irradiée avec la lampe Kessil à 370 nm et la réaction a été suivie par RMN. Comme en HPLC, on observe bien la consommation de la wiskostatine photocagée [5], mais parmi les nombreux produits apparaissant, on ne voit pas la wiskostatine [16], qui devrait être facilement identifiable par le grand singulet des deux groupements méthyles de l'amine. Le produit semble donc se dégrader. Il reste à savoir si le problème vient du photoclivage ou d'une potentielle instabilité de la wiskostatine [16] aux UV proches. En effet, la wiskostatine [16] absorbe dans le proche UV avec une large bande vers 340 nm (Figure 104). Sa stabilité à l'irradiation à 370 nm a donc été testée. La wiskostatine [16] a également été solubilisée dans le méthanol deutéré et irradiée avec la même lampe UV. On voit sur les spectres qu'au niveau des aromatiques, des pics supplémentaires apparaissent alors que ceux de la wiskostatine [16] perdent en intensité, ce qui indique bien de la décomposition. Les pics aliphatiques ont, eux, un comportement très étrange, on observe une déformation et un déblindage progressif (Figure 105). Dans tous les cas, le problème semble venir directement de la wiskostatine [16] qui serait incompatible avec l'irradiation dans le proche UV nécessaire au photoclivage du groupement photolabile choisi ici.

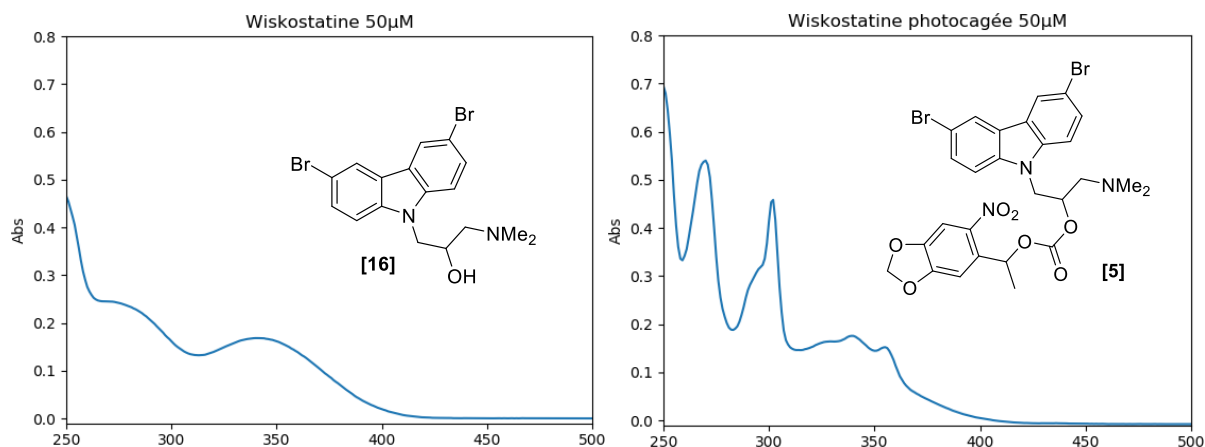


Figure 104 : Spectres UV de la wiskostatine et de la wiskostatine photocagée à 50  $\mu\text{M}$  dans le MeOH

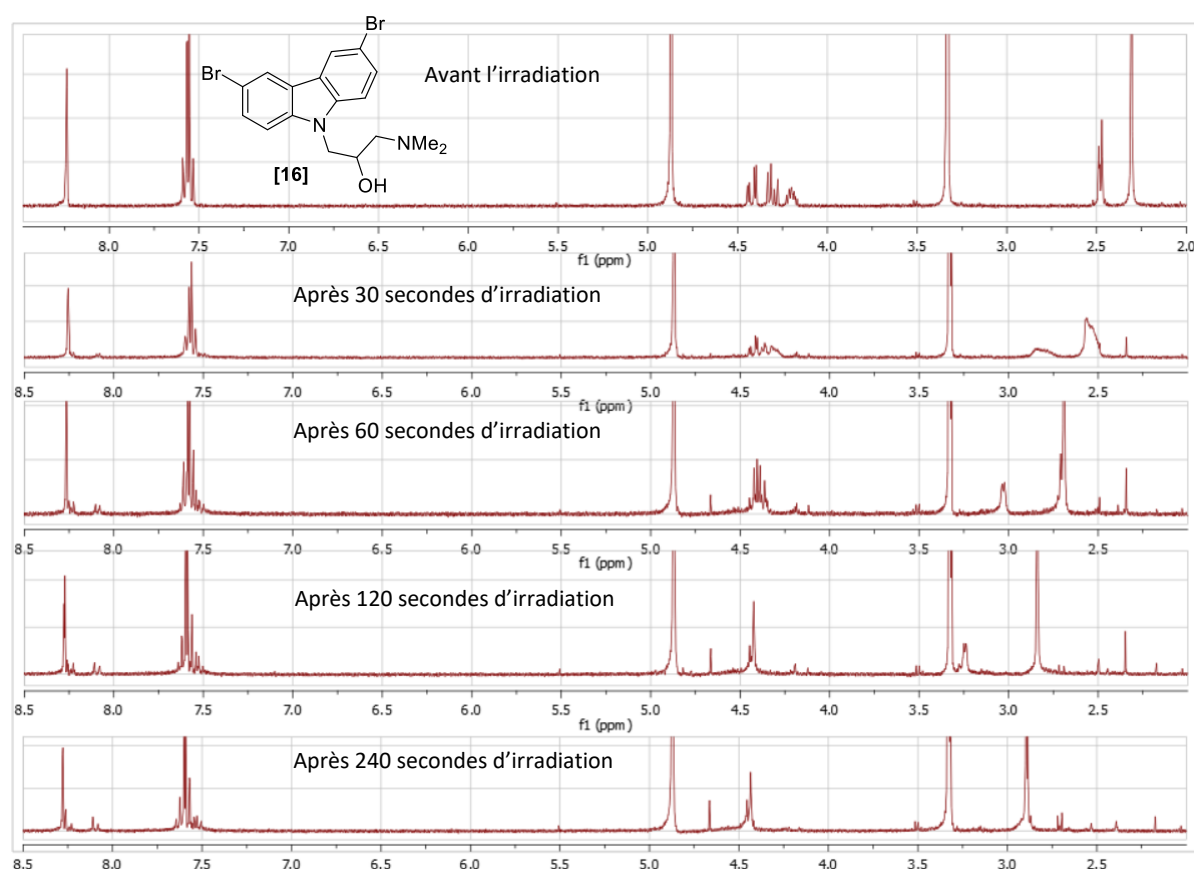


Figure 105 : Suivi RMN de la dégradation de la wiskostatine sous irradiation UV

La synthèse de la wiskostatine [16] a été aboutie et le placement d'un groupement photolabile a été réalisé. La wiskostatine photocagée [5] obtenue s'avère effectivement inactive mais le photoclivage de ce composé n'a pas pu être réussi à cause de l'instabilité imprévue de la wiskostatine [16] à l'irradiation dans le proche UV. L'utilisation d'un groupement photolabile absorbant dans le visible ou en utilisant une photoactivation à deux photons dans le visible permettrait de résoudre ce problème de stabilité et de pouvoir utiliser ce produit photocagé en biologie.

### 3.4 Conclusion

Le développement d'une bibliothèque d'inhibiteurs photocagés pour le contrôle des réseaux d'actine à partir de petites molécules naturelles ou synthétiques a continué après l'étude du CK666 [14] avec celle de la cytochalasine D [10] et de la wiskostatine [16]. La préparation d'une forme photocagée du SMIFH2 [18], un inhibiteur malheureusement non sélectif des formines a également été abordé mais cette étude a été avortée. Ce travail est détaillé dans l'Annexe 3.

Pour le contrôle des réseaux branchés d'actine à travers l'inhibition d'Arp2/3, un CK666 photocagé [3] a été synthétisé. Le CK666 [14] a d'abord été préparé en une étape à partir de réactifs commerciaux. Un nouveau réactif [172] a été développé pour l'introduction du groupement photolabile et a été utilisé avec succès pour photocager le CK666 [14]. Le CK666 photocagé obtenu [3] a montré une capacité de photoclivage par irradiation UV mais son absence d'activité biologique n'a pas pu être vérifié avec certitude. Une première série d'expériences *in vitro* laissent suggérer cette inactivité mais il faudra des résultats complémentaires pour la confirmer. Néanmoins, ce composé est prometteur et si son inactivité est avérée, pourra être utilisé sur cellules pour le photocontrôle d'Arp2/3.

La préparation d'une cytochalasine D photocagée [3] a été réalisée en vue d'un contrôle de la polymérisation de l'actine de manière orthogonale à la l'utilisation de la latrunculine B [8]. Le photocageage de la cytochalasine D [8] commerciale a été réalisé par le même réactif [172]. Le composé photocagé obtenu [3] s'est bien avéré biologiquement inactif et a montré une capacité de photoclivage pour libérer la cytochalasine D [10] sous irradiation UV. Par manque de matière, ce composé n'a pas été pleinement caractérisé mais pourrait être refait en plus grande quantité en vue d'applications biologiques sur cellules.

La synthèse d'une wiskostatine photocagée [5] a également été réalisée. Après la synthèse en trois étapes de la wiskostatine [16], le réactif [172] a de nouveau pu être utilisé pour photocager l'inhibiteur. Malgré la prometteuse inactivité biologique de la forme photocagée obtenue [5], l'utilisation de ce composé ne s'est pas avérée possible à cause de l'instabilité de la wiskostatine au rayonnement UV nécessaire au photoclivage. Ce problème pourrait être résolu en utilisant un groupement photolabile différent activable dans le visible ou en faisant de l'activation à deux photons. La synthèse étant efficace et l'attachement du groupement photolabile simple, cette solution pourra aisément être mise en œuvre. Cette molécule permettrait un contrôle indirect d'Arp2/3 et de ses réseaux branchés, complémentaire à l'utilisation du CK666 photocagé [3].

---

4<sup>ème</sup> Partie :

Synthèse de variants  
photocommutateurs du  
CK666

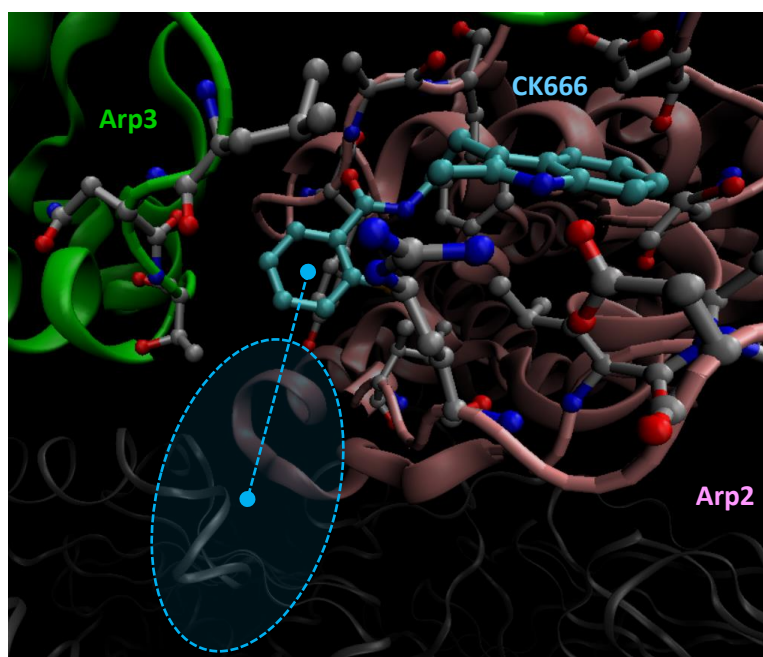
---



## 4<sup>ème</sup> Partie : Synthèse de variants photocommutateurs du CK666

### 4.1 Design des photocommutateurs

Une seconde partie du travail sur le CK666 [14] a été consacrée à la formation de variants photocommutateurs. La stratégie ici a été particulière. Usuellement, l'azobenzène est lié à la molécule d'intérêt par un linker de taille variable. Cette stratégie demande un grand effort de synthèse à cause du nombre souvent important d'analogues à préparer mais permet de jouer finement sur l'influence de l'azobenzène sur l'activité biologique. A cause de la nature particulière du CK666 [14], le choix a été porté ici vers une structure différente, sans linker et rigide. En effet, le CK666 [14] étant composé de deux noyaux aromatiques, on pouvait penser lier directement l'azobenzène à un de ces noyaux. La rigidité de la structure va amplifier l'importance de la configuration de l'azobenzène. La position précise de l'azobenzène devient cruciale car la gêne stérique à cette position sera importante quelle que soit la configuration de l'azobenzène. Le choix a été guidé par la structure de diffraction aux rayons X du CK666 coordonné dans Arp2/3. En regardant l'orientation du CK666 [14] dans la cavité, on peut remarquer que la partie fluorobenzoyl n'est pas complètement enfouie dans la protéine. Il y a une zone vide dans laquelle le placement d'un groupement ne devrait pas avoir une influence majeure (Figure 106). De cette observation a été décidé le fait de placer un azobenzène aux quatre positions disponibles sur le fluorobenzoyl. Elles seront notées A, B, C et D pour respectivement les positions 3, 4, 5 et 6 sur l'arylamide.



**Figure 106** : Différent angle de vue sur la structure de diffraction aux rayons X d'Arp 2/3 en présence de CK666 montrant la zone libre (Identifiant PDB : 3UKR)

## 4.2 Synthèse et caractérisation

En termes de synthèse, il y a plusieurs manières de former un azobenzène. Les méthodes les plus simples concernent les azobenzènes symétriques qui peuvent être formés efficacement par couplage oxydant d'une aniline avec elle-même, ou réducteur d'un dérivé nitro sur lui-même. Pour les azobenzènes non-symétriques comme le seront ceux des composés d'intérêt ici, il existe deux principales méthodes. On peut soit faire la condensation d'une aniline sur un dérivé nitroso (réaction de Mills), soit faire l'addition d'un phénol sur un sel de diazonium (diazocopulation) (Figure 107).<sup>118</sup> La seconde option est couramment utilisée dans la préparation de photocommutateurs, la présence de groupements méthoxy sur le second aryle étant commune. En plus, les quatre acides 2-fluoro-*N*-aminobenzoïques [174<sub>A-D</sub>], à partir desquels les intermédiaires diazonium peuvent être préparés, sont disponibles commercialement. Cette stratégie a donc été choisie pour la préparation des variants photocommutateurs du CK666.

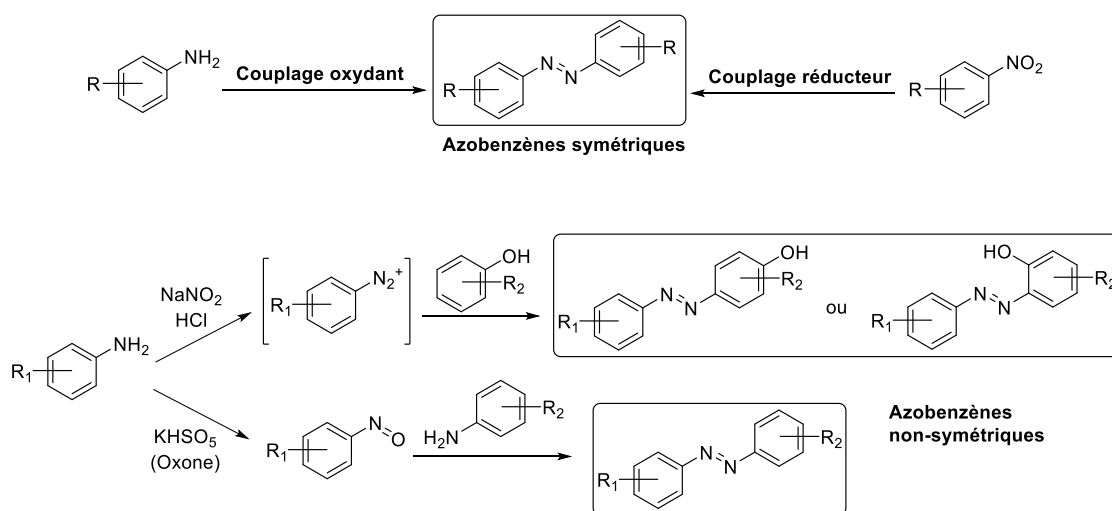
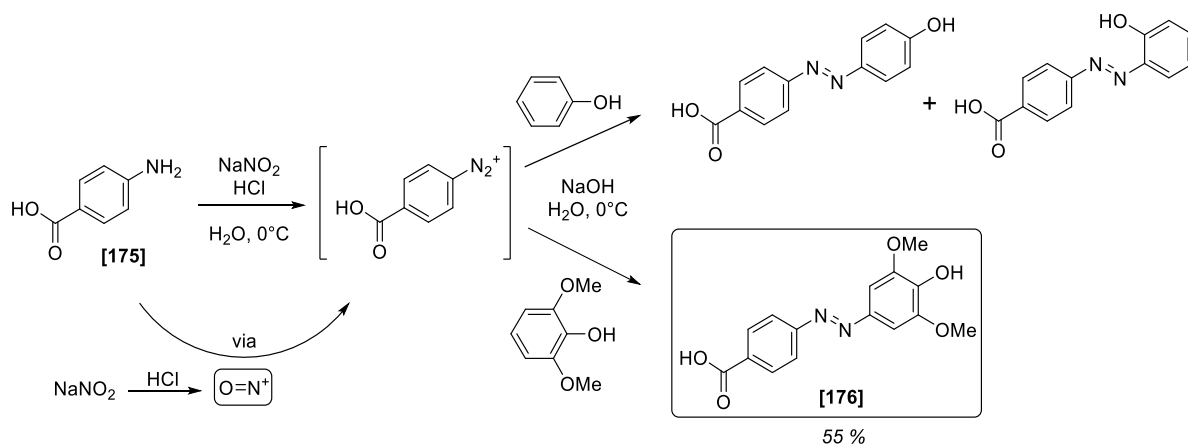


Figure 107 : Différentes méthodes de synthèse des azobenzènes<sup>118</sup>

Un premier test de cette réaction sur l'acide *para*-aminobenzoïque [175] non fluoré a été réalisé. Dans cette réaction, le sel de diazonium est formé à partir de l'aniline par une combinaison de nitrite de sodium et d'acide chlorhydrique. Cela génère in situ le cation nitrosonium sur lequel se condense l'aniline. Le sel de diazonium réagit ensuite avec les aromatiques enrichis et en particulier les phénols pour former des azobenzènes. Avec un simple phénol, la réaction va donner un mélange inséparable de azobenzènes *ortho* et *para* par rapport au phénol en proportions similaires (Figure 108). Sans aucun groupement supplémentaire, il n'est pas possible de contrôler la régiosélectivité.

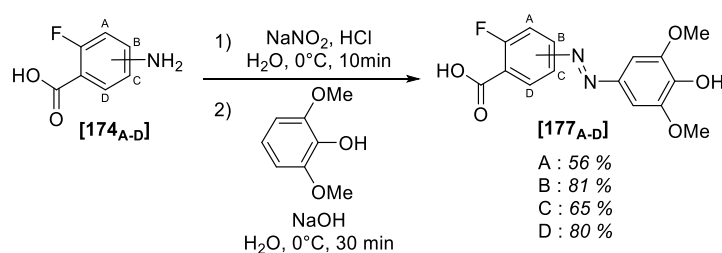
(118) Merino, E. Synthesis of Azobenzenes: The Coloured Pieces of Molecular Materials. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (7), 3835–3853.

La présence de plusieurs groupements méthoxy n'étant pas un problème lors de la conception de photocommutateurs, le 2,6-diméthoxyphénol a été utilisé pour pallier ce problème de sélectivité en bloquant les positions *ortho* du produit.<sup>67,69,70</sup> Avec ce phénol substitué, seul l'azobenzène souhaité **[176]** est obtenu. Comme cette réaction fonctionne, le choix de former l'azobenzène portant trois groupements méthoxy a été fait pour faciliter la synthèse (Figure 108).



**Figure 108** : Régiosélectivité de l'addition de phénols sur le sel de diazonium de l'acide *para*-aminobenzoïque

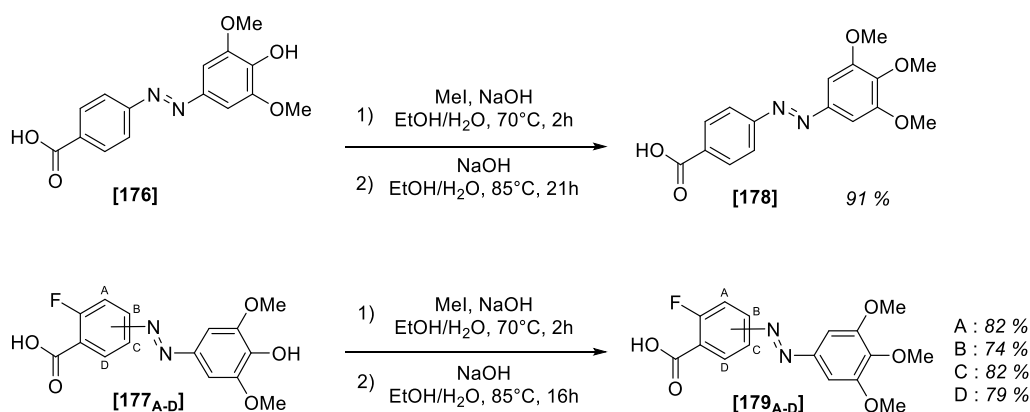
Cette réaction de formation de l'azobenzène a donc été réalisée sur les dérivés fluorés. D'aspects très différents, les acides 2-fluoro-*N*-aminobenzoïques **[174<sub>A-D</sub>]** ont été convertis en 3',5'-diméthoxy-4'-hydroxy azobenzènes **[177<sub>A-D</sub>]** correspondants avec des rendements convenables (Figure 109). Ces composés sont particulièrement insolubles et peuvent être isolés par filtration du mélange brut réactionnel. Les azobenzènes obtenus sont facilement reconnaissables par leur couleur rouge/marron intense mais il a néanmoins été difficile de les caractériser à cause de cette insolubilité. En particulier, seuls des spectres RMN du proton de mauvaise qualité ont pu être obtenus du fait de la faible solubilité même dans le DMSO. La caractérisation complète a été laissée à plus tard dans la synthèse quand les produits seront plus solubles. Il est surprenant que le composé **[177<sub>D</sub>]** ait pu être obtenu, étant donné que le diazonium est formé ici en  $\alpha$  du carboxylate. Cette configuration permet la décarboxylation et libération de diazote, une méthode usuelle pour former des benzynes. Il semble néanmoins ici qu'à  $0^\circ\text{C}$ , cette réaction ait été évitée.





**Figure 109** : Formation des azobenzènes [177<sub>A-D</sub>]

La méthylation du phénol est essentielle pour la stabilité des formes Z des azobenzènes. Si le phénol est libre, la conjugaison va faciliter le retour thermique de la forme Z vers la forme E.<sup>49</sup> Il est possible mais difficile de sélectivement méthyler le phénol sans méthyler l'acide carboxylique à cause de la déprotonation de ce dernier en milieu même faiblement basique. Le choix de méthyler les deux positions puis d'hydrolyser l'ester de méthyle obtenu est une alternative simple à ce problème. Cette séquence a été testée sur le dérivé non fluoré [176]. Après méthylation aux deux positions par un excès d'iodométhane, un excès de soude a ensuite été ajouté et l'azobenzène 3',4',5'-triméthoxy [178] a été obtenu. Cette séquence a ensuite été appliquée aux quatre dérivés fluorés [177<sub>A-D</sub>], donnant avec des bons rendements les quatre dérivés triméthoxy [179<sub>A-D</sub>] (Figure 110).

**Figure 110** : Méthylation des azobenzènes [176] et [177<sub>A-D</sub>]

Ces azobenzènes en main, il ne restait plus qu'à faire l'amidation avec la partie indole [162] du CK666 pour former les CK666 photocommutateurs [6<sub>A-D</sub>]. Dans la synthèse du CK666 [14], cette étape est réalisée en utilisant le chlorure d'acyle. Comme précédemment, la réaction a d'abord été testée avec le dérivé non fluoré [178]. La formation du chlorure d'acyle a été essayée avec le chlorure de thionyle. En présence de ce dernier, le produit se dégrade (Figure 111 A). L'utilisation d'agents de couplage avec l'acide carboxylique a donc été préférée. Ayant une plus grande quantité du produit [177<sub>B</sub>], ce dernier a été utilisé pour les tests. L'amidation entre l'acide carboxylique [177<sub>B</sub>] et l'amine [162] a été essayée avec le DCC et HATU. Aucune réaction n'est observée avec le DCC et un rendement de 38% est obtenu avec HATU (Figure 111 B & C). Cet agent de couplage a donc été utilisé avec les trois autres dérivés [177<sub>A, C & D</sub>]. Des rendements inférieurs ou égaux ont été obtenus avec les positions A et C mais le produit D s'est dégradé. L'activation par HATU est sûrement trop forte et des réactions secondaires comme l'attaque du noyau triméthoxyphényle pourrait entraîner de la dégradation (Figure 111 C). La combinaison de l'EDC et de HOBT a permis d'améliorer les rendements et d'éviter

cette dégradation. Dans ces dernières conditions, les CK666 photocommutateurs [6<sub>A-D</sub>] peuvent être obtenus avec des rendements relativement faibles allant de 29 à 46 % (Figure 111 D).

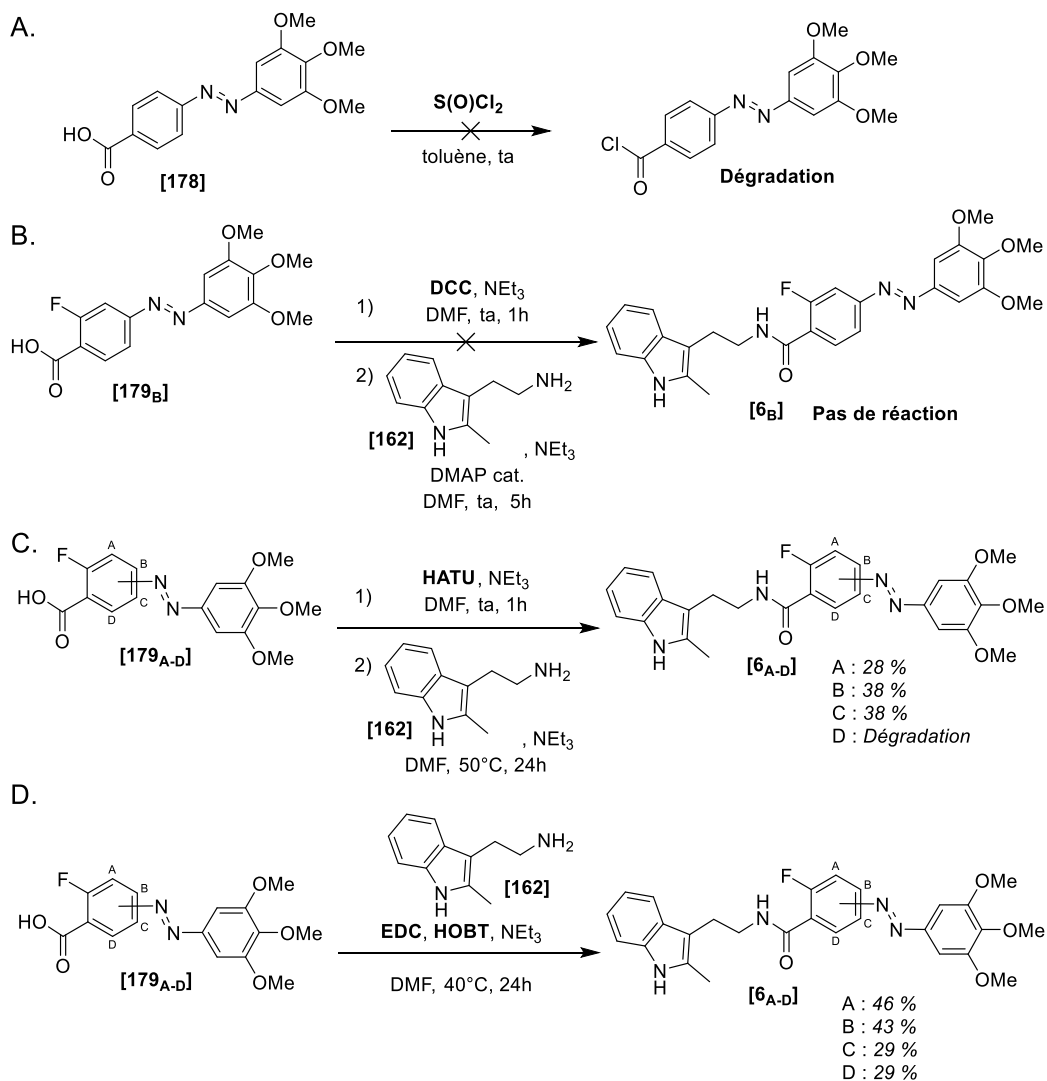
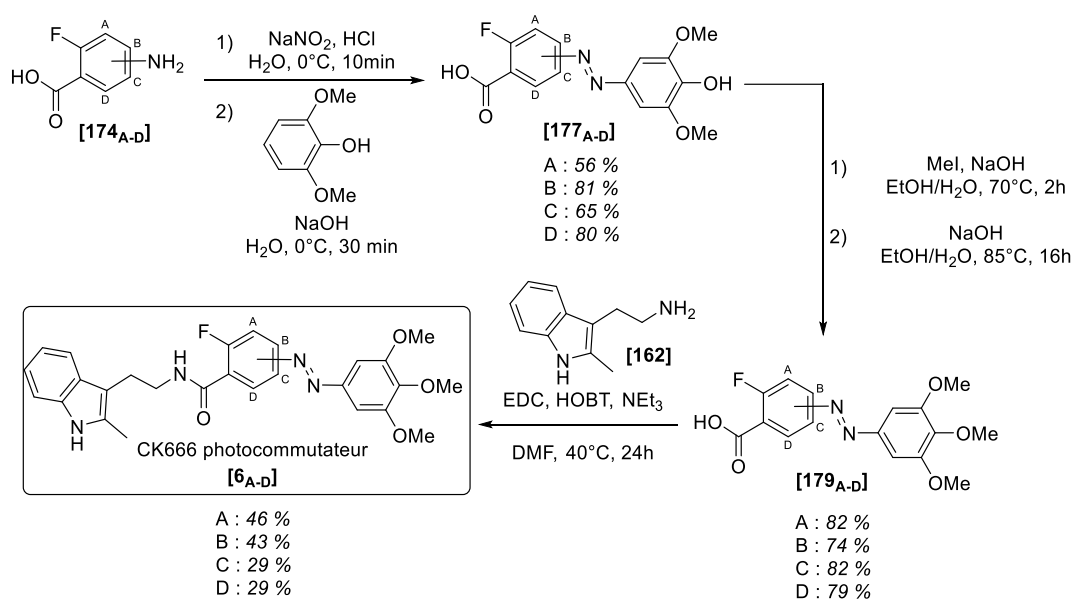
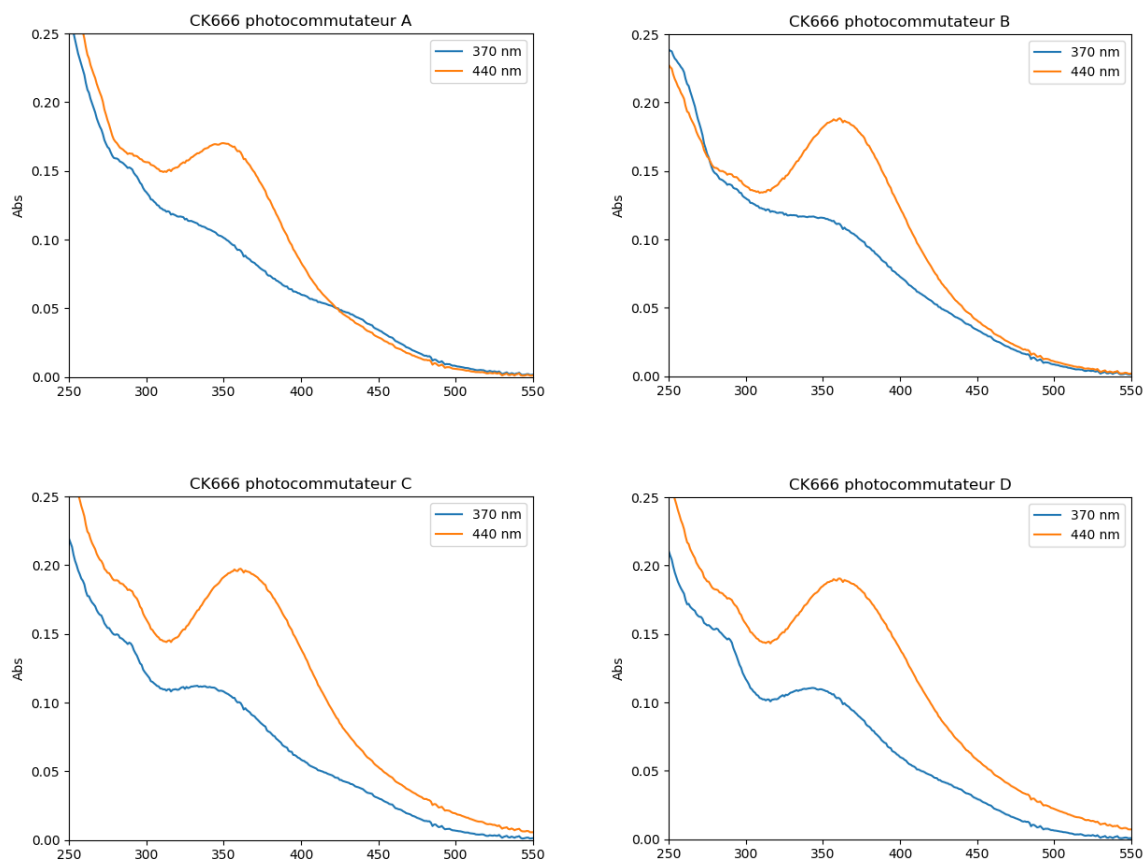


Figure 111 : Mise au point du couplage peptidique pour former les CK666 photocommutateurs



**Figure 112 :** Synthèse des CK666 photocommutateurs [6<sub>A-D</sub>]

Ces produits en main, la capacité de photoisomérisation a été évaluée. Les produits ont été irradiés à 370 nm ou 440 nm avec les lampes Kessil correspondantes et les états PSS associés ont pu être caractérisés. Les spectres UV-visibles ont été mesurés pour les différentes formes après irradiation. En plus d'une différence marquée entre les deux spectres d'un même produit en fonction de l'irradiation, on retrouve bien les bandes d'absorbances vers 360 ~ 370 nm des produits *E*, obtenus par irradiation en bleu et celle vers 430 ~ 440 nm des produits *Z*, obtenus par irradiation UV. Ces caractéristiques sont typiques de la photoisomérisation des azobenzènes.<sup>56</sup> La bande d'absorbance dans le bleu est néanmoins globalement bien moins intense et presque invisible sur le produit [6<sub>B</sub>] (Figure 113).



**Figure 113** : Spectres UV-visibles des CK666 photocommutateurs effectués sur des solutions à 20  $\mu\text{M}$  dans l'eau et irradiés à 370 nm ou 440 nm par les lampes Kessil

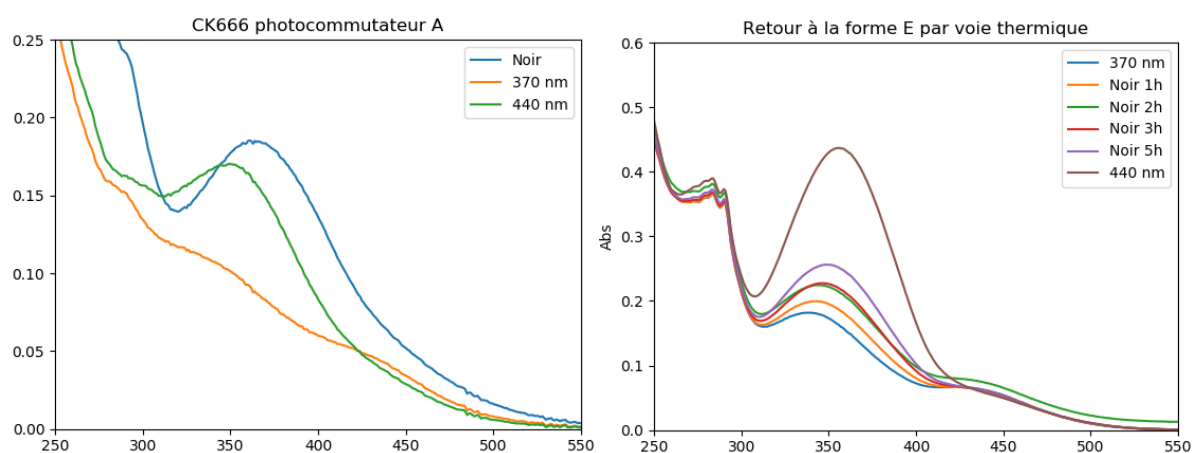
Les états PSS observés ont été davantage caractérisés. En particulier, les proportions des isomères dans leurs différents PSS ont été évaluées. En effet, on sait que le PSS n'est jamais composé d'un seul isomère pur et qu'il y a toujours une proportion du second photoisomère. Ces proportions ont été évaluées par RMN, les deux isomères ayant des déplacements chimiques différents. On remarque ici que ces composés donnent des états PSS contenant des quantités relativement importantes des seconds photoisomères. L'état PSS à 370 nm ne contient qu'environ 60 à 80 % de produit Z et l'état PSS à 440 nm contient environ 70 à 90 % de produit E (Tableau 11). Ces différences sont sûrement suffisantes pour des applications biologiques à condition que les différences d'activités entre les deux formes soient très marquées. On peut noter qu'il est possible d'obtenir la forme E pure par voie thermique en chauffant le mélange d'isomères dans le noir à 50°C pendant quelques heures ou en le laissant à température ambiante dans le noir pendant un ou deux jours. Cela a notamment permis d'obtenir des spectres RMN et les spectres UV-visibles des formes E pures (on voit par exemple sur le produit **[6<sub>A</sub>]** la différence entre le PSS à 440 nm et la forme E pure sur la figure 114). Comme

dernier élément de caractérisation, la demi-vie de la forme Z par voie thermique a été mesurée. Après irradiation du produit en UV, celui-ci est laissé dans le noir pendant plusieurs heures. La conversion est suivie par spectrographie UV-visible (exemple des courbes obtenues avec le produit **[6<sub>A</sub>]** dans la figure 114). On constate un retour lent vers la forme E, avec une demi-vie de l'ordre de 7~8 h en fonction de la position de l'azobenzène (Tableau 11).

**Tableau 11** : Composition des PSS et demi-vie de la forme Z des CK666 photocommutateurs **[6<sub>A-D</sub>]**

	Proportions E:Z dans le PSS à 370 nm	Proportions E:Z dans le PSS à 440 nm	Demi-vie de la forme Z à température ambiante
<b>[6<sub>A</sub>]</b>	13:87	62:38	~8h
<b>[6<sub>B</sub>]</b>	22:78	71:29	~7h
<b>[6<sub>C</sub>]</b>	15:85	70:30	~8h
<b>[6<sub>D</sub>]</b>	32:68	80:20	ND*

\* valeur non mesurée pour le composé **[6<sub>D</sub>]** qui a été préparé plus tardivement que les 3 autres

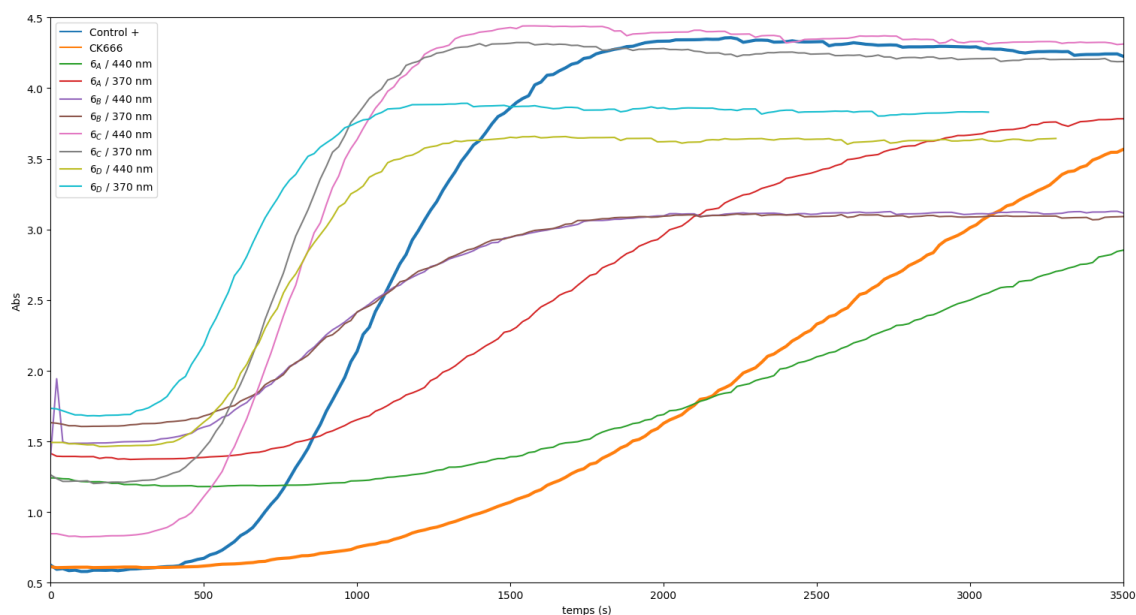


**Figure 114** : (A) Spectre UV-visible du CK666 photocommutateurs **[6<sub>A</sub>]** en solution à 20 µM dans l'eau (B) Spectre UV-visible du CK666 photocommutateurs **[6<sub>A</sub>]** en solution à 40 µM dans l'éthanol irradié à 370 nm puis laissé dans le noir.

### 4.3 Applications biologiques

La photoisomérisation des différents CK666 photocommutateurs **[6<sub>A-D</sub>]** ayant été caractérisée, il était temps d'évaluer les activités biologiques de leurs différentes formes. Dans l'espoir d'une réponse rapide, des tests *in vitro* comme ceux effectués pour le CK666 **[14]** et le CK666 photocagé **[3]** ont été réalisés. Les expériences étant courtes, une irradiation au préalable des composés était suffisante pour les garder dans un état très proche du PSS. Comme avec le CK666, 100 µM de chaque composé sous leurs différents PSS respectifs ont été mis en présence d'Arp2/3, de VCA son activateur,

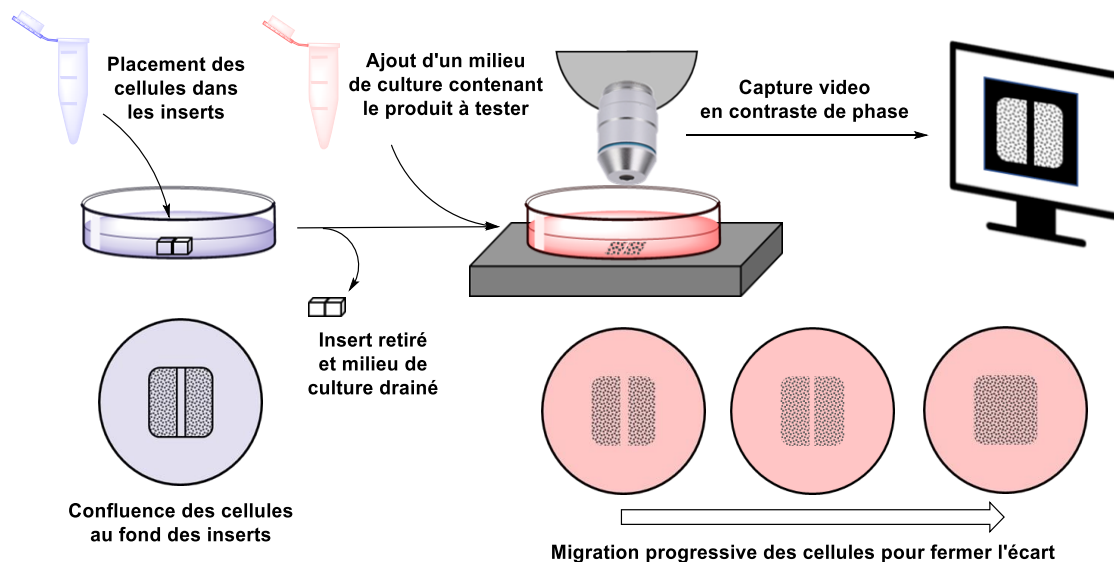
et d'actine-pyrène. Les courbes de fluorescence ont été mesurées et ici encore, on observe une forte déformation par rapport aux contrôles (Figure 115). Les solutions étaient également un peu opaques mais surtout très colorées. On retrouve ici les problèmes de solubilité et d'absorbance du faisceau émis par le spectromètre pour exciter le pyrène. Il y a sûrement également un second effet perturbateur qui est l'absorbance du rayonnement émis par fluorescence du pyrène. Ces perturbations empêchent à nouveau l'interprétation des courbes. Même les temps d'arrivée au plateau n'apportent rien de significatif.



**Figure 115** : Fluorescence de l'actine-pyrène mesurée en présence d'Arp2/3, de VCA et de 100 µM de CK666 photocommutateur [6A-D], irradiés à 440 nm ou 370 nm. Les contrôles + et CK666 représentent respectivement les réactions sans ajout de composé et celui avec 100 µM de CK666

Les expériences *in vitro* n'étant pas concluantes, les activités biologiques ont été mesurées directement sur cellules. Ces expériences ont été réalisées par le Dr. Stéphane Romero et Maurine Marteau de l'équipe d'Alexis Gautreau du Laboratoire de Biologie Structurale de la Cellule à l'École Polytechnique. Cette équipe de biologie cellulaire est spécialisée dans les mécanismes de remodelage des membranes cellulaires impliquant le cytosquelette d'actine et est accoutumée à l'utilisation du CK666 [14]. Elle maîtrise notamment différentes méthodes pour caractériser l'activité de composés sur le complexe Arp2/3.

L'expérience de « wound healing » (cicatrisation), vise à mesurer la capacité de migration des cellules, mécanisme lié à l'activité du complexe Arp2/3. Des cellules sont placées au fond d'un insert, un double puits rectangulaire. Après confluence des cellules au fond des deux puits, le puit est retiré et le milieu de culture est drainé, ne laissant que deux monocouches de cellules séparées par une fine zone vide. Cette zone va simuler une plaie que les cellules vont essayer de combler. Après avoir ajouté un nouveau milieu de culture contenant cette fois-ci le composé à tester, la fermeture de la zone vide va être filmée par microscopie en contraste de phase (Figure 116). On peut ensuite mesurer l'aire de la zone vide au cours du temps pour en déduire la vitesse de migration de chaque front de cellules. Cette expérience permet d'évaluer l'efficacité d'un inhibiteur d'Arp2/3 car son inhibition va causer un ralentissement du front de cellules, de par la disparition des mécanismes de migration liés aux réseaux branchés.



**Figure 116** : Représentation schématique du protocole de « wound healing » pour la mesure de la vitesse de migration des cellules liée à l'activité d'Arp2/3

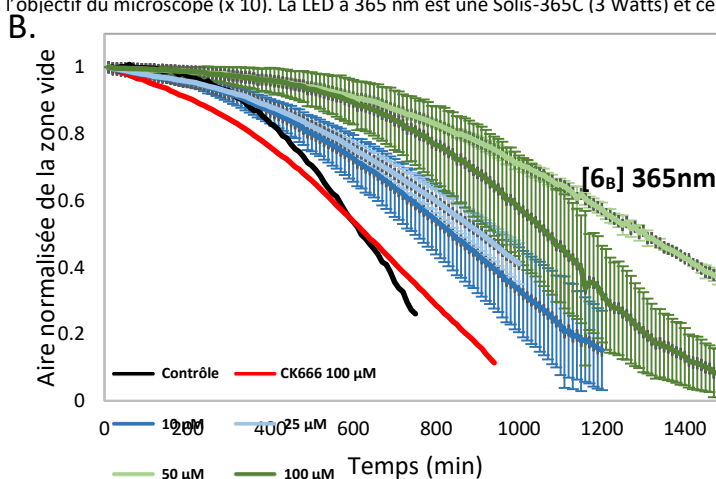
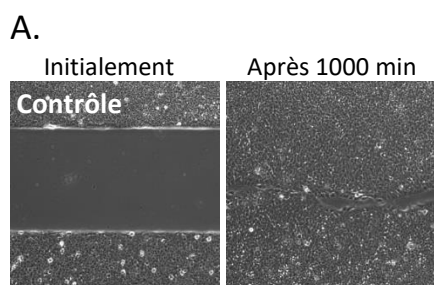
Des cellules MCF10A (issues de carcinome mammaire humain) ont été utilisées dans ces expériences de « wound healing » pour caractériser l'efficacité des CK666 photocommutateurs [6A-D]. Ces cellules ont été déposées dans des inserts et laissées jusqu'à confluence. L'insert a été retiré et les cellules ont été mises en présence d'un milieu de culture contenant l'un des quatre CK666 photocommutateurs [6A,B,C ou D], préalablement irradié par la lampe Kessil UV à 370 nm ou bleue à 440 nm. Les expériences étant longues (plus de 12 h), les échantillons ont également été irradiés par tranche de 30 sec toutes les deux heures par des LEDs\* aux longueurs d'onde quasi-identiques à travers l'optique du microscope (365 nm en UV et 450 nm en bleu). Il avait été vérifié au préalable

que ces quantités d'irradiation n'affectaient que non-significativement le comportement cellulaire. Des expériences de contrôles positif en absence de composé et de contrôles négatifs avec 100  $\mu\text{M}$  de CK666 [14] ont également été réalisées. La migration des cellules a été filmée et la vitesse de migration des fronts de cellules a été calculée.

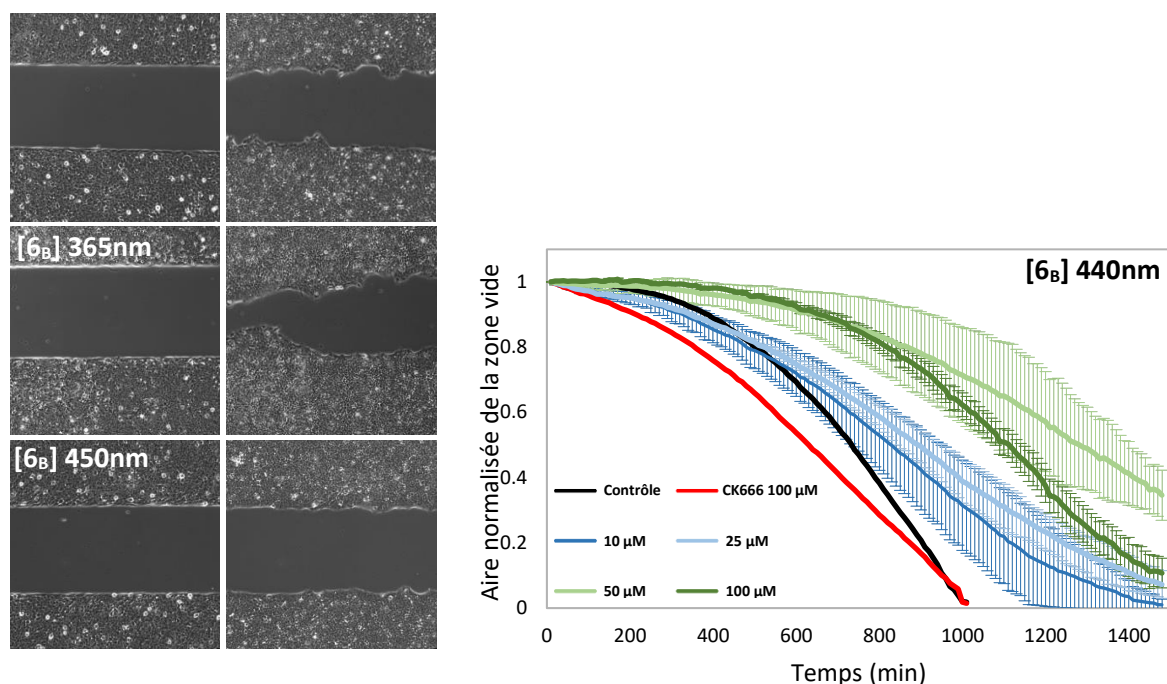
Les observations des expériences avec [6<sub>B</sub>] sont détaillées à titre d'exemple : On peut voir la fermeture rapide de la zone vide (en environ 1000 min) sur l'expérience de contrôle en l'absence de composé. A ce même temps, une fermeture partielle est observée sur les expériences avec 100  $\mu\text{M}$  de CK666 [14] (l'expérience donne des résultats similaires avec le composé de source commerciale et celui synthétisé, l'image en Figure 117 correspond à l'expérience avec le composé de source commerciale) et celle avec 100  $\mu\text{M}$  de [6<sub>B</sub>] irradié à 365 nm. En revanche, l'expérience avec 100  $\mu\text{M}$  de [6<sub>B</sub>] irradié à 450 nm n'a que très faiblement migré (Figure 117 A). Ces expériences ont été répétées à différentes concentrations de composé [6<sub>B</sub>] et l'aire de la zone vide a été mesurée au cours du temps (Figure 117 B).

Le temps de fermeture indique qualitativement l'inhibition mais bien qu'il soit lié à la vitesse de migration, il dépend également d'une phase initiale de signalisation des cellules qui doivent ressentir la présence de la zone vide. Ce n'est donc pas un paramètre judicieux pour quantifier l'activité des composés. On s'intéressera ici pour l'interprétation de ces courbes plutôt aux vitesses maximales de migration. En effet, ces dernières traduisant la quantité maximale de réseaux branchés formés aux membranes qui engendrent le mouvement et donc se lient directement à l'activité d'Arp2/3. Ces vitesses maximales de migration ont été calculées, regroupées pour chaque composé [6<sub>A</sub>], [6<sub>B</sub>], [6<sub>C</sub>] ou [6<sub>D</sub>] et tracées pour les deux PSS 365 nm ou 450 nm en fonction de la concentration (Figure 118).

\* Il s'agit de LEDs irradiant l'échantillon à travers l'objectif du microscope (x 10). La LED à 365 nm est une Solis-365C (3 Watts) et celle à 450 nm est une M450LP (1,85 Watts).







**FIGURE 117 :** (A) Images de microscopie en contraste de phase des expériences de « wound healing » pour le composé **[6<sub>b</sub>]** prises initialement et après 1000 min de migration. L'expérience Contrôle correspond aux cellules non traitées, CK666 à celles traitées avec 100 μM de CK666 **[14]** (de source commerciale), **[6<sub>b</sub>]** 365 nm à celles traitées avec 100 μM de **[6<sub>b</sub>]** et irradiées à 365 nm et **[6<sub>b</sub>]** à celles traitées avec 100 μM de **[6<sub>b</sub>]** et irradiées à 450 nm; (B) Aire normalisée de la zone vide au cours du temps pour les différentes concentrations de **[6<sub>b</sub>]**, pour le contrôle positif et pour le contrôle avec 100 μM de CK666 **[14]** (de source commerciale). Les échantillons, y compris ceux des contrôles, ont été irradiés à 365 nm ou à 440 nm avec le dispositif LED couplé au microscope.

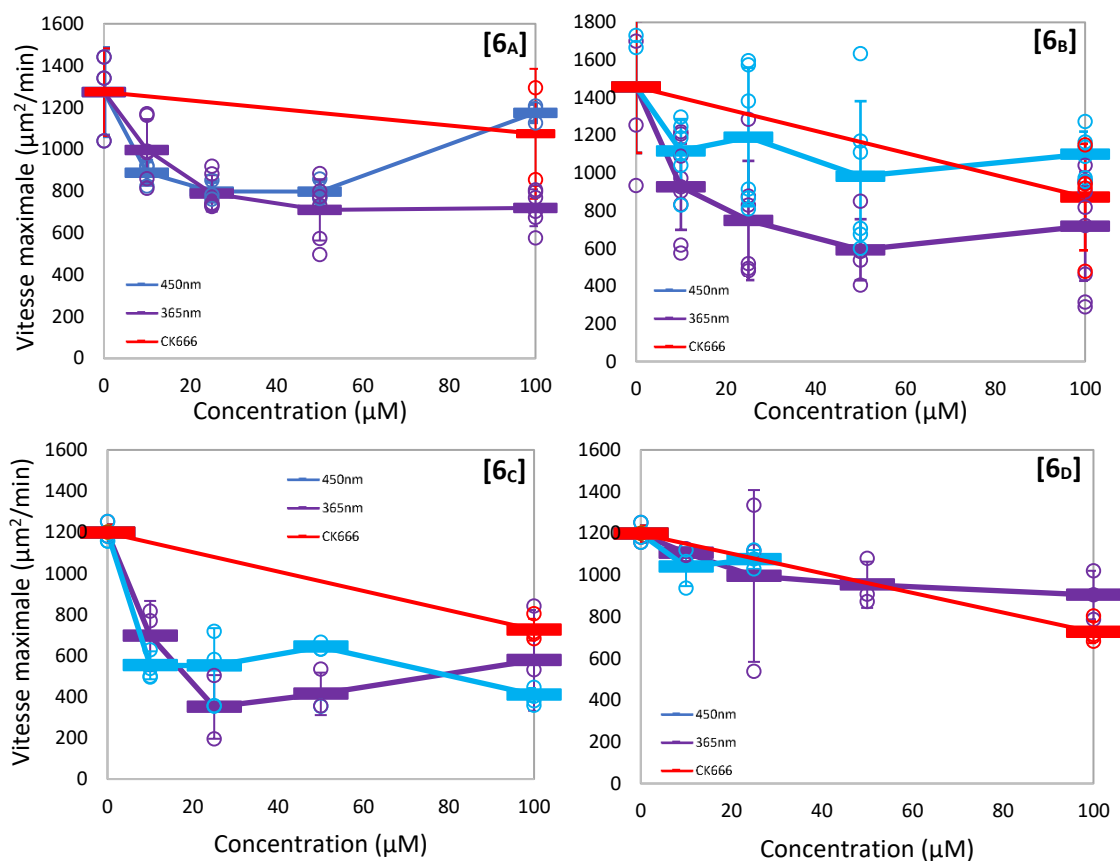
Toutes les expériences ont été répétées trois fois.

On peut interpréter la différence d'activité des deux PSS pour chaque composé en regardant la différence entre leurs deux courbes (Figure 118). On remarque que parmi les quatre composés testés, le CK666 photocommutateur **[6<sub>b</sub>]** présente la meilleure différence d'activité entre ses formes PSS à 365 nm et 450 nm. En effet, la courbe correspondant au PSS à 365 nm est significativement en dessous de celle du PSS à 450 nm et cela à toutes concentrations. La forme *Z* inhibe donc plus efficacement la migration des cellules que la *E*. Cette différence devrait être exploitable pour effectuer du photocontrôle réversible d'Arp2/3 avec ce composé.

On voit aussi que les deux formes des photocommutateurs **[6<sub>c</sub>]** et **[6<sub>d</sub>]** ne présentent pas de différence d'activité notable entre leurs deux PSS. Le composé **[6<sub>c</sub>]** est très actif dans ses deux formes et le composé **[6<sub>d</sub>]** semble avoir une activité légèrement inférieure à celle du CK666 **[14]**. On peut

remarquer par ailleurs que dans la plupart des expériences, les CK666 photocommutateurs [6A-c] sont plus actifs que le CK666 [14].

Les deux PSS du composé [6A] n'ont pas une différence d'activité marquée sauf à partir de 50  $\mu\text{M}$  où l'activité du PSS à 450 nm chute. Cette perte d'activité à haute concentration est difficile à rationaliser mais elle ouvre la possibilité d'exploiter la différence d'activité importante des deux PSS du composé [6A] à 100  $\mu\text{M}$ .



**FIGURE 118** : Vitesses maximales du front de cellules calculées pour les expériences de « wound healing » (calculées comme le maximum de la moitié de la variation de l'aire par rapport au temps à partir des courbes non-normalisées de l'aire vide par rapport au temps). Les valeurs sont regroupées par composés et sont tracées pour chaque PSS en fonction de la concentration. Les valeurs à 0  $\mu\text{M}$  correspondent aux contrôles positifs et celles du CK666 aux expériences avec le CK666 à 100  $\mu\text{M}$ .

Mis à part la chute d'activité du PSS à 450 nm du composé [6A] à haute concentration, on peut observer que l'activité ne semble pas augmenter significativement à partir de 20~50  $\mu\text{M}$  pour l'ensemble des composés. Le problème de solubilité observé précédemment dans les expériences *in vitro* est également présent ici. On peut voir des structures solides (agrégats ou cristaux) sur les images lors des expériences. Bien que les cellules ne soient pas affectées par ces objets (seuls les composés solubilisés peuvent diffuser à travers les membranes), on arrive rapidement à un effet de seuil en

termes d'activité liée à la limite de solubilité des composés, la concentration effective dans les expériences ne varient sûrement que très peu à partir de 20~50  $\mu\text{M}$ .

Ce screening de quatre positions a fourni le CK666 photocommutateur **[6<sub>B</sub>]** qui apparaît au vu de ces expériences sur cellules comme un candidat adéquat, même s'il reste de l'optimisation à faire, pour effectuer du photocontrôle réversible d'Arp2/3. La position d'attache de l'azobenzène donnant une différence satisfaisante d'activité ayant été trouvée, des modifications de la structure pour permettre de meilleures propriétés physiques, en particulier de solubilité, seraient désormais bienvenues pour simplifier son utilisation.

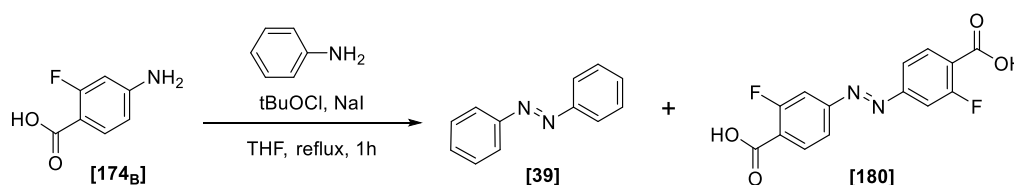
### 4.4 Perspectives de variation des substituants sur l'azobenzène

Dans une optique d'optimisation des performances des CK666 photocommutateurs, faire varier les substituants sur l'azobenzène peut moduler ses propriétés. En particulier, la solubilité, les longueurs d'onde d'absorption, les pourcentages de chaque isomère dans les PSS ou les vitesses de photoisomérisation peuvent être améliorées. Le choix des trois groupements méthoxy sur les CK666 photocommutateurs **[6<sub>A-D</sub>]** avait été fait pour faciliter la synthèse. En effet, cela permettait de préparer l'azobenzène par addition d'un phénol sur un sel de diazonium. Si l'on veut une méthode plus générale ne nécessitant pas un phénol, il faut utiliser une autre méthode de synthèse d'azobenzènes.

Il y a encore deux stratégies générales de préparation d'azobenzènes non-symétriques. Il existe d'une part une méthode pour effectuer un couplage oxydant non-symétrique de deux anilines.<sup>119</sup> D'autre part, la synthèse de Mills permet de coupler une aniline et un dérivé nitroso, préparé au préalable à partir de l'aniline correspondante.<sup>118</sup> Ces deux méthodes ont été essayées.

En exploitant la différence de réactivité de deux différentes anilines, il a été montré qu'il est possible d'oxyder sélectivement l'une d'entre elles *in situ* et de condenser la seconde sur l'adduit formé, ce qui donne ultimement l'azobenzène non-symétrique. Ces conditions particulières utilisent tBuOCl comme oxydant en présence de NaI et des deux anilines.<sup>119</sup> Cet oxydant particulier peut être préparé facilement en traitant du *tert*-butanol avec de l'eau de Javel en présence d'acide acétique.<sup>120</sup> Ces conditions ont été essayées sur l'acide 4-amino-2-fluorobenzoïque **[174<sub>B</sub>]** et l'aniline non

substituée (Figure 119). La réaction est rapide mais donne deux produits. Le premier a été identifié comme étant de l'azobenzène **[39]**, résultant du couplage symétrique de l'aniline sur elle-même. Le second, très polaire, a les mêmes signaux aromatiques que le produit de départ **[174<sub>B</sub>]** en RMN du proton, indiquant qu'il s'agit sûrement du produit de couplage symétrique de ce dernier. Cette réaction ne permettant pas de couplage non-symétrique, il a été décidé de se focaliser sur la réaction de Mills.



**Figure 119** : Tentative de couplage oxydant

La réaction de Mills peut se faire théoriquement dans les deux sens. On peut condenser la première aniline sur le nitrosobenzène issu de la seconde ou inversement. Les deux options ont été explorées. La formation de certains nitrosobenzènes à partir d'anilines simples étant décrite, il a été décidé de d'abord en préparer et essayer de faire condenser l'aniline **[174<sub>B</sub>]** sur ces derniers.<sup>121</sup> En effet, l'oxydation d'anilines est délicate car plusieurs réactions secondaires peuvent arriver entre les différents intermédiaires. L'aniline doit être oxydée en hydroxylamine **[181]** puis en nitroso **[182]** mais pas jusqu'au nitro. En même temps, différentes réactions de condensation peuvent arriver. L'aniline ou l'hydroxylamine **[181]** peuvent se condenser sur le nitrosobenzène **[182]** pour former respectivement l'azobenzène **[39]** ou l'azoxybenzène **[183]**. L'azobenzène peut être oxydé en azoxybenzène **[183]** puis en dioxyde d'azobenzène **[182<sub>2</sub>]**. Cette dernière espèce est intéressante car en équilibre avec le nitrosobenzène **[182]** (en fonction de la température et de la concentration) et formellement un dimère de ce dernier (Figure 120). Cette dernière oxydation permet donc d'obtenir tout de même le nitrosobenzène **[182]**. Malgré les différences de cinétiques de toutes ces réactions, on comprend qu'il suffit en fait d'avoir un oxydant assez puissant pour oxyder toutes ces espèces mais qui n'oxyderait pas le nitrosobenzène **[182]** en nitrobenzène.

(119) Takeda, Y., Okumura, S., Minakata, S. A Practical Synthesis of Azobenzenes through Oxidative Dimerization of Aromatic Amines Using Tert-Butyl Hypoiodite. *Synthesis* **2013**, 45 (08), 1029–1033.

(120) t-butyl hypochlorite. *Org. Synth.* **1969**, 49, 9.

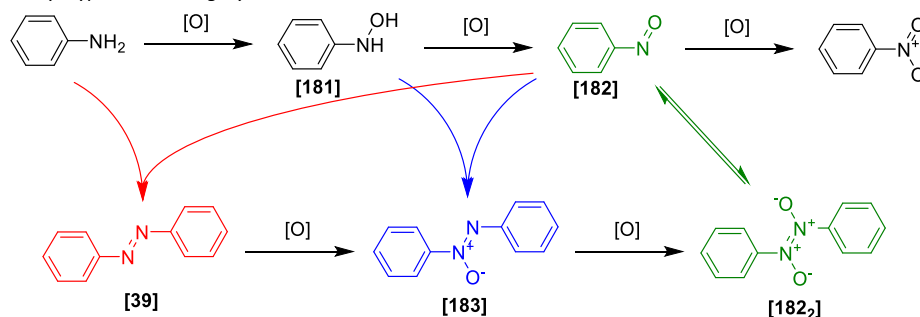


Figure 120 : Oxydation des anilines

En pratique, l'hydrogénopersulfate de potassium ou oxone<sup>®</sup> est utilisé pour réaliser l'oxydation des anilines en nitrosobenzènes. Le nitrosobenzène [182] a été préparé selon la procédure décrite et a été isolé sous forme d'un solide brun correspondant au dimère [182<sub>2</sub>].<sup>121</sup> La condensation de l'aniline [174<sub>B</sub>] avec ce nitrosobenzène [182] a été essayée dans différentes conditions acides. Dans l'acide acétique ou dans le toluène en présence d'acide acétique ou sulfurique, on n'observe aucune réaction même en chauffant fortement la réaction (Figure 121). L'aniline [174<sub>B</sub>] est manifestement extrêmement peu nucléophile, sûrement à cause des différents substituants électroattracteurs sur l'aryle.

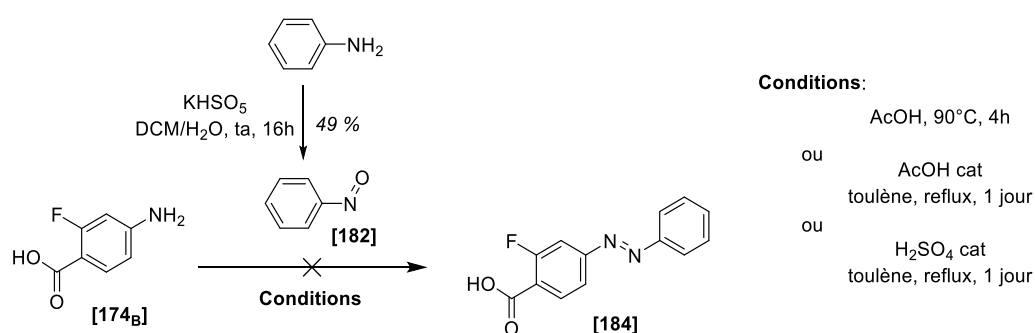
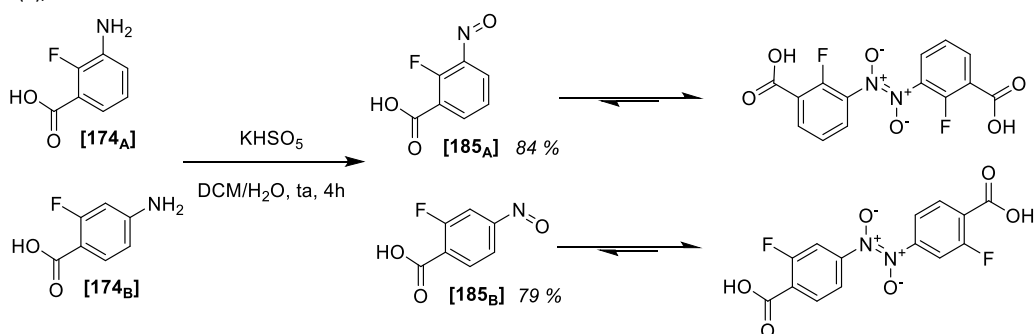


Figure 121 : Premières tentatives de réaction de Mills

La réaction de Mills a donc été envisagée dans l'autre sens. La formation de nitrosobenzènes à partir des anilines [174<sub>A</sub>] et [174<sub>B</sub>] a été réalisée dans les mêmes conditions. Après traitement par l'oxone<sup>®</sup> de ces anilines, les dimères de nitrosobenzènes [185<sub>A2</sub>] et [185<sub>B2</sub>] précipitent sous forme de poudres brunes et peuvent être collectés par filtration. On obtient les produits avec des bons rendements de respectivement 84 % et 79 % (Figure 122). Ces produits s'avèrent très peu solubles dans l'ensemble des solvants essayés mais on peut tout de même retrouver la teinte verte typique des nitrosobenzènes lorsqu'ils sont dissous dans le méthanol, cela même si la solubilité reste faible.

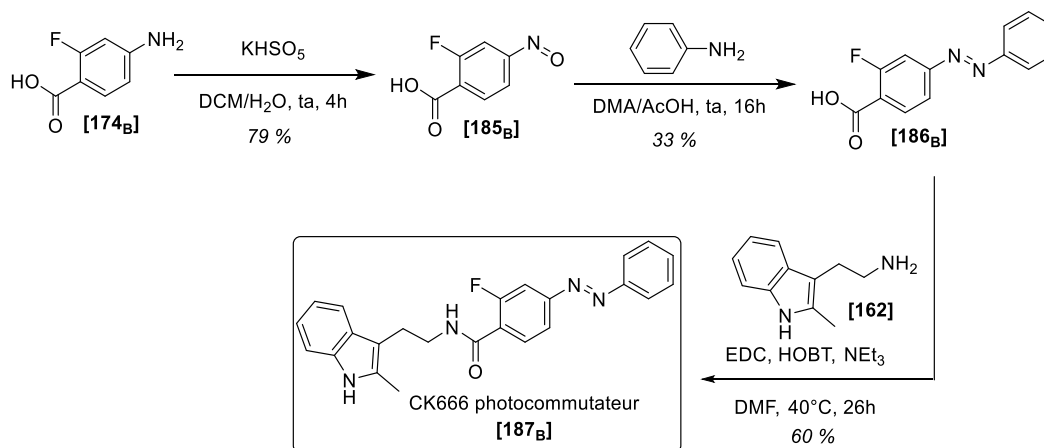
(121) Priewisch, B., Rück-Braun, K. Efficient Preparation of Nitrosoarenes for the Synthesis of Azobenzenes. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (6), 2350–2352.



**Figure 122** : Formation des nitrosobenzènes en vue de la réaction de Mills

Ces nitrosobenzènes en main, la réaction de Mills a été essayée sur diverses anilines pour former les azobenzènes. La condensation de l'aniline sur le nitrosobenzène **[185<sub>B</sub>]** a d'abord été essayée dans les conditions acides classiques. A reflux dans l'acide acétique, on observe cette fois-ci la formation d'un produit qui après purification s'avère être l'azobenzène attendu **[186<sub>B</sub>]**. La réaction est néanmoins lente et le produit n'est obtenu qu'avec un rendement de 14 %. On pouvait remarquer que le produit de départ **[185<sub>B</sub>]** était insoluble dans l'acide acétique et que même à chaud, une très grande quantité de solide restait en suspension. Après avoir testé différents solvants polaires, le DMF et le DMA semblent solubiliser relativement bien le nitrosobenzène **[185<sub>B</sub>]** et la réaction a été retentée dans un mélange DMA/AcOH. Cette fois-ci, le mélange réactionnel est presque limpide à température ambiante et le produit a été obtenu avec un meilleur rendement de 33 % (Figure 123). Cela reste néanmoins faible, la mauvaise solubilité n'est donc pas le seul problème ici.

L'azobenzène en main, la synthèse a été terminée par le couplage peptidique avec l'amine portant la partie indole du CK666 **[162]**. La réaction a été réalisée dans les mêmes conditions que pour la formation des CK666 photocommutateurs **[6<sub>A-D</sub>]**, c'est à dire avec l'EDC comme agent de couplage, HOBT comme additif et NEt<sub>3</sub> comme base. La réaction progresse comme prévu et le nouveau CK666 photocommutateur **[187<sub>B</sub>]** a été obtenu avec un rendement de 60 % (Figure 123).

**Figure 123** : Synthèse d'un CK666 photocommutateur sans substituant sur l'azobenzène

Par faute de temps, ce nouveau CK666 photocommutateur **[187<sub>B</sub>]** n'a pas été particulièrement caractérisé pour ses propriétés de photoisomérisation ni pour ses propriétés biologiques. La synthèse reste encore à optimiser en particulier pour la réaction de Mills. Cette nouvelle synthèse ouvre néanmoins des possibilités de variation des substituants sur l'azobenzène et de ce fait la modulation des propriétés de photoisomérisation.

## 4.5 Conclusion

Des formes photocommutatrices du CK666 [**6<sub>A-D</sub>**] ont également été préparées et caractérisées. Ces composés ont montré une capacité de photoisomérisation et leurs activités biologiques sous leurs différents PSS ont été évalués sur cellule. Une différence d'activité satisfaisante entre les deux formes PSS du composé [**6<sub>B</sub>**] a été observée sur des expériences de « wound healing » et permet d'envisager des applications de photocontrôle réversible d'Arp2/3 avec ce composé.

Malgré les problèmes de solubilité et d'absorbance de ces CK666 photocommutateurs [**6<sub>A-D</sub>**], rendant impossible l'observation des filaments d'actine par fluorescence de l'actine-pyrène, des expériences *in vitro* observées en contraste de phase restent envisageables. En particulier, la mesure par observation directe par microscopie de la densité de branchement de filaments ou la vitesse de migration de microbilles enrobées de recruteurs d'Arp2/3 pourraient être quantifiées en présence des composés et être liées à leurs activités sur Arp2/3.<sup>122</sup>

Le développement d'une nouvelle voie de synthèse générale pour la préparation de CK666 photocommutateurs a été réalisée. Cette dernière nécessitera encore de l'optimisation, notamment sur l'étape de formation de l'azobenzène par réaction de Mills. Cette voie de synthèse ouvre de nouvelles possibilités d'optimisation structurales des CK666 photocommutateurs en vue d'améliorer ses propriétés physiques et leurs réponses à l'irradiation.

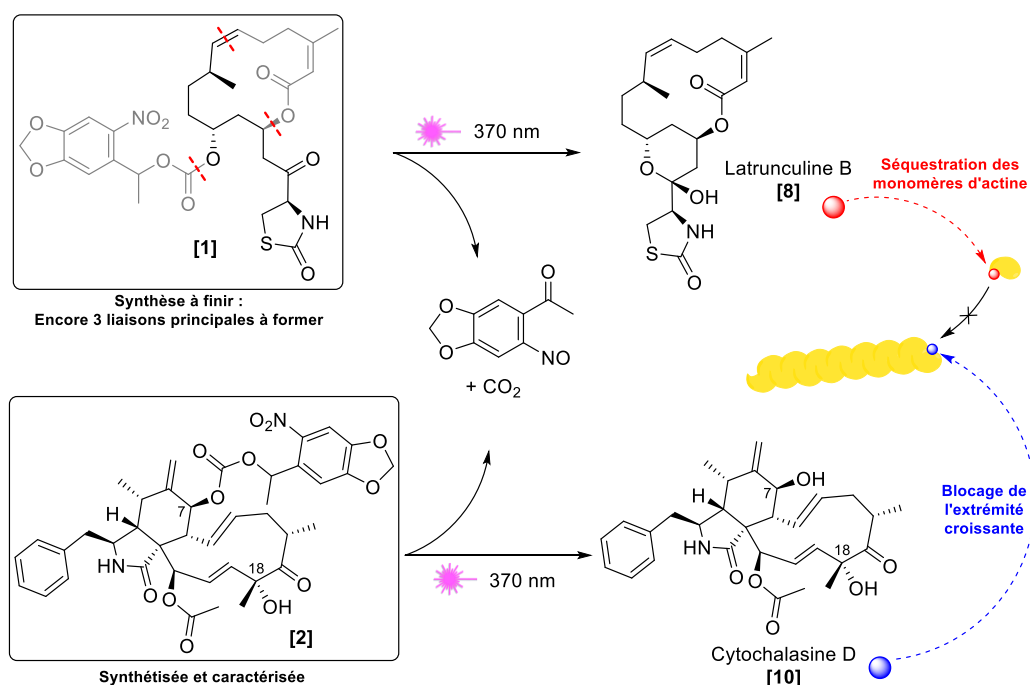
---

(122) Boujemaa-Paterski, R.; Gouin, E.; Hansen, G.; Samarin, S.; Le Clainche, C.; Didry, D.; Dehoux, P.; Cossart, P.; Kocks, C.; Carlier, M.-F.; Pantaloni, D. *Listeria* Protein ActA Mimics WASP Family Proteins: It Activates Filament Barbed End Branching by Arp2/3 Complex. *Biochemistry* **2001**, *40* (38), 11390–11404.

## Conclusion générale et perspectives :

Le développement d'une bibliothèque d'inhibiteurs photocagés pour le contrôle des réseaux d'actine a été commencée avec ce projet de thèse. La synthèse totale d'une latrunculine B photocagée **[1]**, a constitué la majeure partie du travail, bien que cette synthèse n'ait pas pu être achevée. Après les dernières étapes pour terminer cette synthèse, ce composé devra être caractérisé pour vérifier la possibilité de photoclivage avant d'être utilisé pour le photocontrôle de la polymérisation de l'actine. La synthèse étant modulaire, la possibilité d'étendre cette voie de synthèse à une forme photocommutative de la latrunculine B permettrait d'ajouter un caractère réversible à ce photocontrôle.

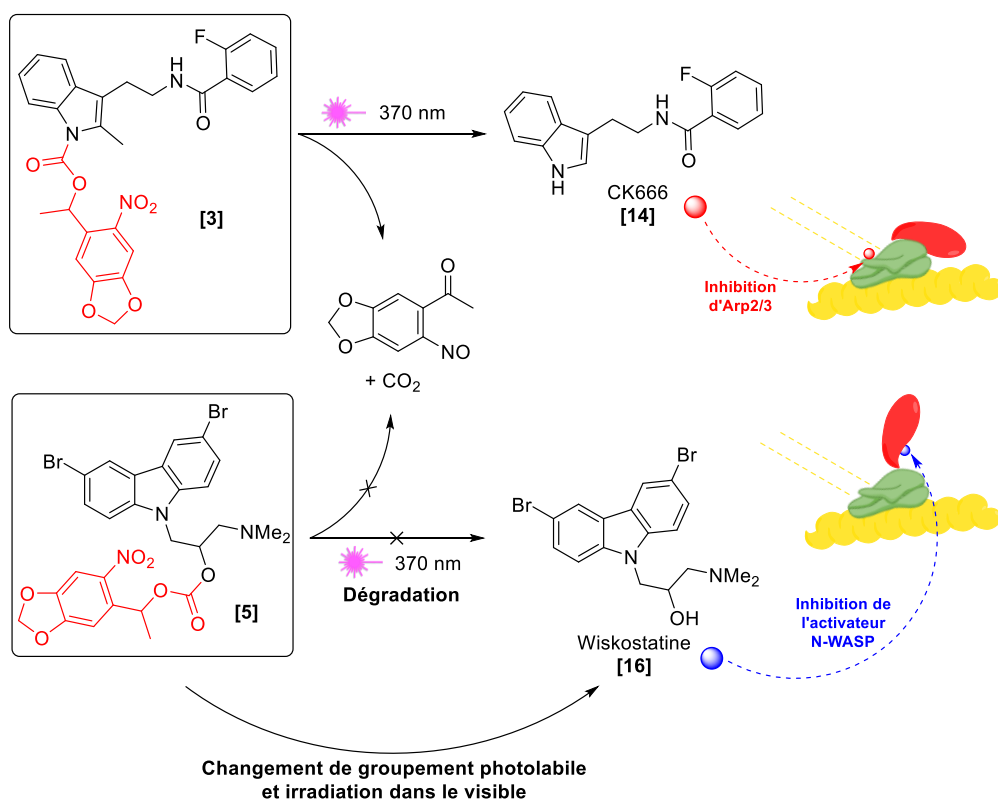
D'autres composés intéressants ont été ciblés pour étendre cette bibliothèque de composés photocagés. Une forme photocagée de la cytochalasine D **[2]** a été obtenue par hémisynthèse à partir du produit naturel. Ce composé a été caractérisé et montre une capacité de photoclivage ainsi qu'aucune activité biologique sur l'actine. Ce produit pourra être utilisé sur cellules pour le photocontrôle de la polymérisation de l'actine et pourra, en particulier, être comparé dans un futur proche à la latrunculine B photocagée **[1]**, ces composés inhibant tous deux la polymérisation de l'actine mais à travers deux mécanismes différents.



**Figure 124 :** Développement du photocontrôle de la polymérisation de l'actine par les formes photocagées de la latrunculine B et de la cytochalasine D

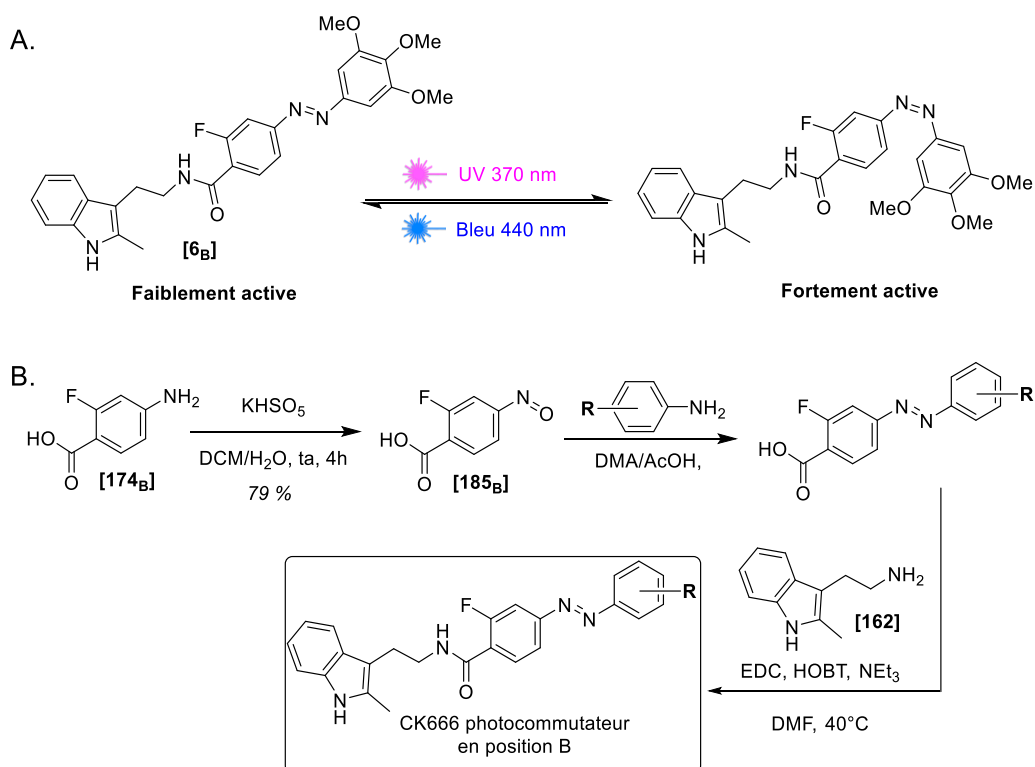


Le photocontrôle des réseaux branchés d'actine a également été ciblé. En particulier, des formes photocagées du CK666 [14], inhibiteur d'Arp2/3, et de la wiskostatine [16], inhibitrice de N-WASP un de ses activateurs, représenteraient des manières directes et indirectes de contrôler ces réseaux branchés. D'un côté, un CK666 photocagé [3] a été préparé et a montré une capacité de photoclivage. L'absence d'activité biologique de ce composé photocagé n'a néanmoins pas pu clairement être démontrée *in vitro*. Elle devra être testée directement sur cellules et si elle est avérée, ce composé pourra être utilisé pour le photocontrôle direct d'Arp2/3. De l'autre, une wiskostatine photocagée [5] a été synthétisée et s'avère effectivement biologiquement inactive. Ce composé se dégrade malheureusement sous l'irradiation UV nécessaire au photoclivage. En changeant le groupement photolabile sur cette molécule pour un groupement permettant un photoclivage dans le visible (par un ou deux photons), on pourrait palier ce problème et utiliser ce nouveau composé pour le photocontrôle indirect d'Arp2/3.



**Figure 125 :** Développement du photocontrôle des réseaux branchés de l'actine par le CK666 et la wiskostatine photocagée

Finalement, ce projet a été étendu à la synthèse de variants photocommutateurs du CK666 pour un contrôle réversible des réseaux branchés de l'actine. Plusieurs formes photocommutatrices du CK666 [**6A-D**] ont été préparées en faisant varier la position de l'azobenzène et elles ont toutes montré une capacité de photoisomérisation. Les activités biologiques des différentes photoisomères ont été testées sur cellules et une position a montré une différence d'activité exploitable. Ce composé [**6B**] pourra être utilisé pour le photocontrôle d'Arp2/3 mais on pourra aussi faire varier les groupements sur l'azobenzène, grâce à la nouvelle voie de synthèse développée, pour optimiser ses propriétés de photoisomérisation ou de solubilité.



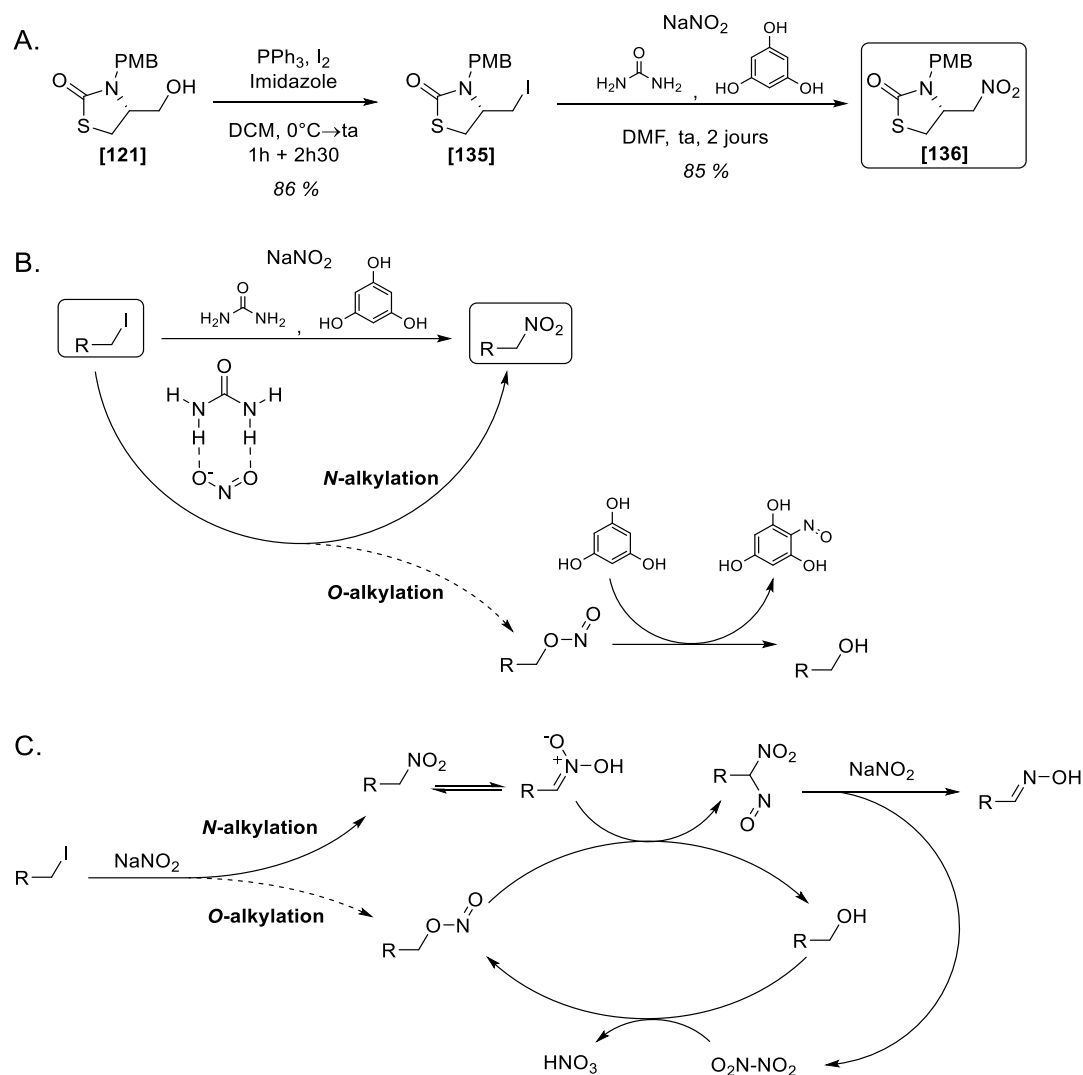
**Figure 126** : Photoisomérisation du CK666 photocommutateur [**6B**] (A) et possibilité de modification des groupements sur l'azobenzène (B)



## Annexe 1 : Tentatives d'addition umpolung avec un dérivé nitro et une sulfone

L'utilisation d'autres groupements électroattracteurs sur le fragment C a été exploré pour remplacer l'addition umpolung de la cyanhydrine **[123]** sans changer la stratégie globale de synthèse. Différents groupements permettant la déprotonation en  $\alpha$  ont été préparés. En particulier, les dérivés nitro ainsi que les sulfones ont été explorés. La différence ici est le degré d'oxydation du carbone. La cyanhydrine, formée à partir de l'aldéhyde, a le degré d'oxydation que ce carbone aura sur la molécule finale, la déprotection redonnant la cétone. Les dérivés nitro ou sulfones requièrent une oxydation ou une réaction de Nef (pour le nitro) pour former cette cétone. Néanmoins, ces groupements seraient intéressants si une addition en  $\alpha$  s'avérait possible.

Le premier groupement exploré a été le nitro. La synthèse de nitroalcanes peut se faire par plusieurs voies. Les deux plus évidentes sont l'oxydation de l'amine correspondante, qui est risquée ici du fait de la présence du soufre de l'hétérocycle, ou la substitution d'un dérivé halogéné par un nitrite minéral. Cette seconde option a été choisie. Pour réutiliser au mieux le travail précédent, la synthèse a démarré à partir de l'alcool **[121]**. La formation du dérivé iodé **[135]** a été faite par réaction d'Appel en utilisant le diiode, la triphénylphosphine et l'imidazole comme base. Après purification par chromatographie sur colonne, le dérivé iodé **[135]** a été isolé avec un rendement de 86 % (Figure 127). La substitution de l'iodure par un sel de nitrite pour donner le dérivé nitro n'est pas triviale car en plus des problèmes de solubilité des sels de nitrite, il y a toujours une compétition entre la *N* ou la *O* alkylation. Cette compétition est particulièrement problématique car les esters de nitrite résultant de la *O* alkylation même si cette dernière est mineure, réagissent avec les dérivés nitro, résultants de la *N* alkylation, et en présence de sels de nitrite vont causer une réaction en chaîne donnant ultimement l'hydroxyoxime (Figure 127 C). Pour palier ces problèmes, une combinaison d'urée et de phloroglucinol est utilisée.<sup>123</sup> L'urée forme un complexe avec l'anion nitrite et favorise sa solubilisation alors que le phloroglucinol va éliminer les esters de nitrite formés par *O*-alkylation, évitant la réaction secondaire (Figure 127 B). Dans ces conditions, le dérivé iodé **[135]** est converti lentement mais permet d'obtenir le produit nitro souhaité **[136]** avec un rendement de 85 % après purification (Figure 127 A).



**Figure 127** : Synthèse du dérivé nitro (A), mécanisme de la substitution de l'iodure par le nitrite (B), et réaction secondaire catalysée par l'ester de nitrite en absence de phloroglucinol (C)<sup>123,124</sup>

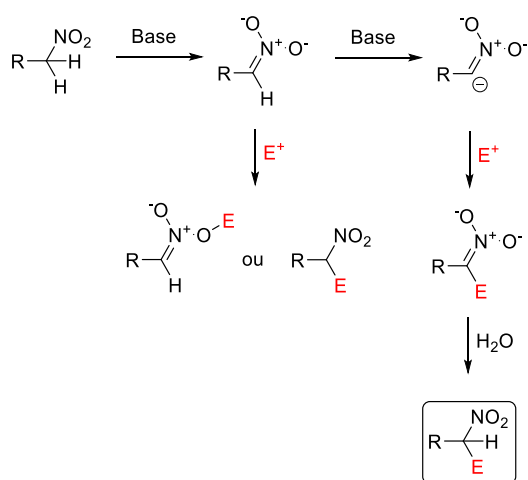
Les protons au pied du nitro sont acides ( $pK_a \sim 17$ ) et peuvent être déprotonés pour donner un dérivé nucléophile. Il y a néanmoins une compétition entre la réactivité au niveau du carbone et celle au niveau des oxygènes du nitro. Pour assurer la nucléophilicité au carbone, il faut effectuer une double déprotonation (Figure 128).<sup>125</sup> Cette réactivité a été testée sur le composé nitro [136] en utilisant toujours l'iodométhane comme électrophile modèle et deux équivalents de *n*-butyllithium en présence de HMPA. On observe ici un changement de couleur, la solution devenant jaune vif. La

(123) Kornblum, N., Larson, H. O., Blackwood, R. K., Mooberry, D. D., Oliveto, E. P., Graham, G. E. A New Method for the Synthesis of Aliphatic Nitro Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78* (7), 1497–1501.

(124) Kornblum, N.; Blackwood, R. K.; Mooberry, D. D. The Reaction of Aliphatic Nitro Compounds with Nitrite Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78* (7), 1501–1504.

(125) Seebach, D., Lehr, F. Lithium- und Kupfer-Derivate von  $\alpha, \alpha$ -doppeldeprotonierten Nitroalkanen. – Erzeugung, Eigenschaften und Umsetzungen mit Alkyl- und Allylhalogeniden. *Helv. Chim. Acta* **1979**, *62* (7), 2239–2257.

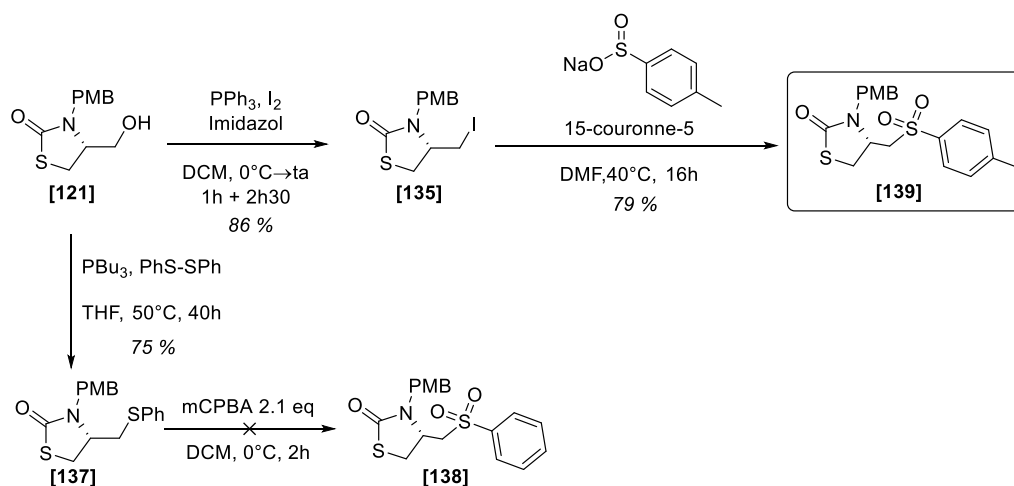
réaction a été démarrée à  $-78^{\circ}\text{C}$  et a été laissée remonter progressivement jusqu'à  $-30^{\circ}\text{C}$  mais aucune conversion n'est observée par CCM. Le produit est effectivement retrouvé intact après hydrolyse. La plupart des exemples d'addition de dérivés nitro au carbone se faisant sur des systèmes insaturés, pas plus d'effort n'a donc été investi dans cette réaction.



**Figure 128** : Réactivité des dérivés nitroalcanes<sup>125</sup>

Le travail a été orienté vers l'utilisation de sulfones comme groupement électroattracteur pour la déprotonation en  $\alpha$ . Là encore, il y a plusieurs voies de synthèse possibles. La formation d'un thioéther suivie d'oxydation et la substitution d'un halogène par un sulfite minéral ont toutes deux été essayées. La première stratégie peut se faire rapidement grâce au fait que des réactions de type Appel avec des dérivés soufrés sont possibles. En effet, on peut former un sel de phosphonium en oxydant une trialkylphosphine avec le disulfure de diphenyle. Ce dernier peut réagir avec un alcool pour former directement le thioéther de phényle. En utilisant la tributylphosphine, il a été possible de convertir en une étape l'alcool du fragment C **[121]** en thioéther de phényle **[137]**. Le produit **[137]** a été isolé avec un rendement de 75 % (Figure 129). L'oxydation du thioéther en sulfone se fait usuellement avec un léger excès de mCPBA. Ici, du fait de la présence du soufre de l'hétérocycle, précisément 2.1 équivalents ont été utilisés. A cause de la conjugaison avec le carbonyle, le soufre de la thiazolidinone semblerait moins réactif que celui du thioéther. Néanmoins, l'oxydation a fourni de nombreux produits. Ces produits présentent tous les mêmes jeux de signaux en RMN du proton et ne diffèrent que par leurs déplacements chimiques. En particulier, les signaux des protons en  $\alpha$  des deux atomes de soufre se retrouvent significativement déplacés. L'oxydation n'est donc sûrement pas sélective de chaque soufre.

La seconde voie de synthèse a donc été préférée. La formation d'un dérivé iodé ayant déjà été montrée possible, la substitution de l'iode par un sel de sulfite a été réalisée. Le *para*-toluène-sulfinate de sodium s'est montré particulièrement insoluble et la réaction de substitution du produit iodé **[135]** ne se réalisait pas même dans le DMF chaud. L'utilisation de l'éther 15-couronne-5 a permis de dissoudre ce sel dans le DMF sans chauffage excessif. Après une nuit à 40°C, le produit de substitution **[139]** a pu être isolé avec un rendement de 79 % (Figure 129).



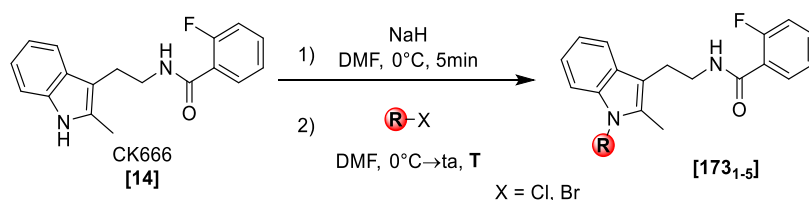
**Figure 129** : Synthèse de la sulfone **[139]**

La sulfone **[139]** en main, la déprotonation et l'alkylation ont pu être testées. La déprotonation seule a d'abord été vérifiée par traitement du produit avec un équivalent de *n*-butyllithium. La solution s'est colorée pour devenir orange, indiquant la formation de l'anion. Après protonation par ajout de  $\text{D}_2\text{O}$ , l'intégration des protons en  $\alpha$  de la sulfone a été mesurée par RMN. Le signal ayant chuté à 0.70 (0.23 + 0.47 pour les deux protons non équivalents) pour a priori deux protons, l'incorporation d'un atome de deutérium a bien été réalisée (la valeur inférieure à 1.0 indique que plus d'un équivalent de *n*-butyllithium a dû être ajouté, sûrement à cause de l'imprécision de la concentration des solutions commerciales, la bouteille n'ayant pas été titrée pour ce type de test). La formation de l'anion confirmée, la réaction de substitution sur l'iodométhane a été testée dans les mêmes conditions que précédemment, c'est-à-dire à -78°C avec un léger excès d'iodométhane et en présence de HMPA. On observe par CCM que la réaction ne progresse que peu, et que même après avoir été laissée revenir à température ambiante pendant plusieurs jours, seule une légère formation de produits polaires de dégradation est observée. Il semblerait que parmi les groupements testés, il n'y ait pas de possibilité d'avoir un anion à la fois suffisamment réactif pour faire la substitution sur l'iodométhane mais également suffisamment stable pour ne pas déclencher de dégradation sur le reste de la molécule.

## Annexe 2 : Synthèse de variants *N*-substitués du CK666

Après les expériences *in vitro* visant à déterminer l'activité biologique du CK666 photocagé **[3]**, les courbes obtenues donnaient l'impression d'une très forte inhibition de la polymérisation. Pour vérifier la provenance de cet effet et explorer l'influence d'un groupement placé sur l'azote de l'indole du CK666 **[14]** sur l'activité biologique, différents variants *N*-substitués du CK666 ont été préparés. Différents groupements ont été choisis pour représenter les différents éléments du groupement photolabile et ont été greffés au CK666 **[14]** dans les mêmes conditions de synthèse que le groupement photolabile. Les produits obtenus **[173<sub>1-5</sub>]** sont regroupés dans le Tableau 12.

**Tableau 12** : Synthèse des variants indole-*N* substitués du CK666

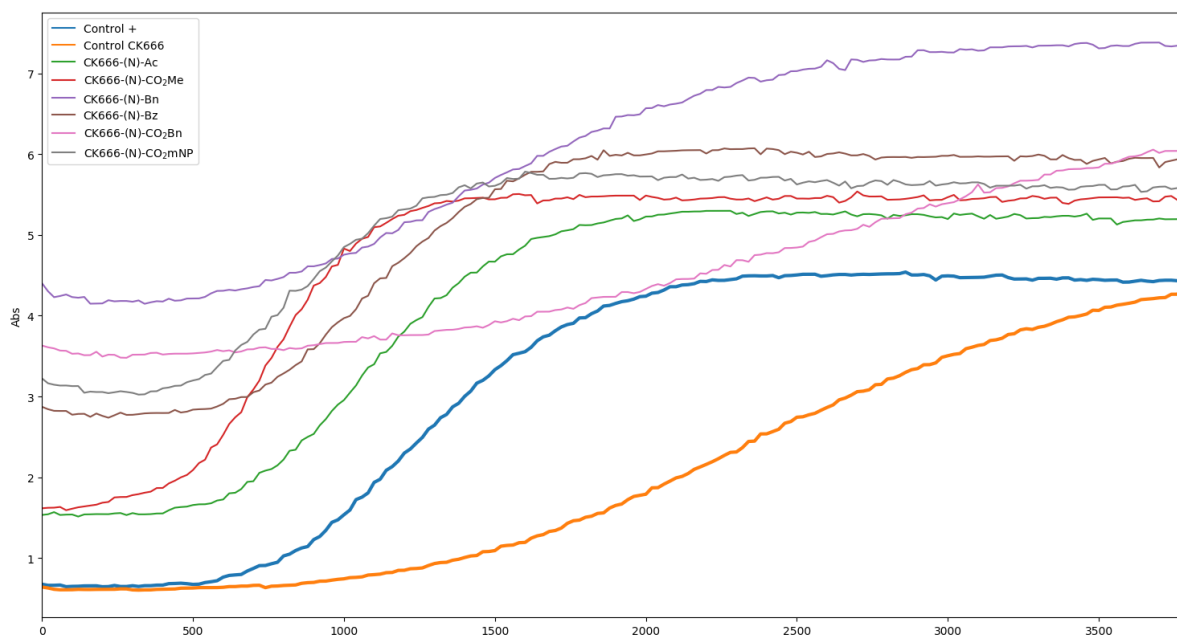


Réactif R-X	Élément modélisé	T	Rendement	Produit
	Carbonyle	30min	53 %	<b>[173<sub>1</sub>]</b>
	Carbonate	30min	50 %	<b>[173<sub>2</sub>]</b>
	Noyau aromatique	2h	66 %	<b>[173<sub>3</sub>]</b>
	Carbonyle & noyau aromatique	2h	20 %	<b>[173<sub>4</sub>]</b>
	Carbonate & noyau aromatique	3h	Quantitatif	<b>[173<sub>5</sub>]</b>

Ces différents composés ont été testés pour leur activité biologique dans les mêmes conditions que précédemment pour voir l'influence de chaque groupement ajouté au CK666 **[14]**. Ces composés **[173<sub>1-5</sub>]** ont été dilués davantage dans le DMSO à cause de leur insolubilité dans l'eau même après dilution. Le CK666 photocagé **[3]** a été testé à nouveau dans ces conditions de dilution. Les composés testés ont donné des courbes de fluorescence très surprenantes car conservant l'allure usuelle mais étant fortement déformées. Un saut à l'origine important et inégal est observé ainsi



qu'un écrasement global de la courbe (la différence entre le point de départ et le plateau est plus faible que d'habitude). Dans ces conditions, la courbe du CK666 photocagé [3] est différente de la fois précédente et ressemble à celle des autres composés (Figure 130). Cela indique que l'observation précédente était sûrement liée à un problème de solubilité et non à une activité biologique. De manière générale, ces courbes ne peuvent pas être simplement superposées pour une interprétation immédiate comme c'était le cas précédemment.



**Figure 130** : Fluorescence de l'actine-pyrène mesurée en présence d'Arp2/3, de VCA et de 100 µM de dérivés *N*-substitués du CK666. Les contrôles + et CK666 représentent respectivement les réactions sans ajout de composé et celui avec 100µM de CK666

L'explication de cette déformation n'est pas triviale mais doit venir d'une combinaison de l'insolubilité des composés et de leur absorption des faisceaux du spectromètre. Le pyrène est excité dans le proche UV et à une concentration de 100 µM, l'absorbance des produits semble ne pas être négligeable. La présence d'agrégats ou de précipités peut aussi altérer la mesure voire l'activité des protéines. De ce fait, l'interprétation des courbes ne peut pas être concluante.

Malgré le fait que ces courbes ne peuvent être exploitées, les temps d'arrivée au plateau ont tout de même été mesurés à titre indicatif. On peut remarquer que la plupart des composés ont un temps d'arrivée au plateau similaire au contrôle, indiquant sûrement l'absence d'activité. Cela est également vrai pour le CK666 photocagé **[3]**. Seuls le dérivés *N*-benzyle **[173<sub>3</sub>]** et *N*-carbamate de benzyle **[173<sub>5</sub>]** ont eu des temps significativement plus importants et se rapprochant du CK666 **[14]** (Tableau 13). Ces deux composés étaient particulièrement insolubles et leurs solutions étaient troubles, ce qui est en général mauvais pour l'activité des protéines et l'interprétation des résultats.

**Tableau 13** : Temps approximatifs d'arrivée au plateau pour les dérivés *N*-substitués du CK666

	Control +	CK666	[173 <sub>1</sub> ]	[173 <sub>2</sub> ]	[173 <sub>3</sub> ]	[173 <sub>4</sub> ]	[173 <sub>5</sub> ]	CK666 photocagé
<b>Substituant</b>	∅	H	Ac	CO <sub>2</sub> Me	Bn	Bz	CO <sub>2</sub> Bn	CO <sub>2</sub> mNP
<b>Temps au plateau (s)</b>	~ 2400	~ 4100	~ 2300	~ 1600	~ 3000*	~ 2400	~ 3900*	~ 1600

\*particulièrement insolubles, les solutions étaient troubles

Ces expériences *in vitro* ne sont pas concluantes mais laissent suggérer que le CK666 photocagé **[3]** est effectivement inactif ou bien moins actif que le CK666 **[14]**. Cela devra être confirmé par des expériences sur cellules. Les cellules supportant en général une plus grande quantité de DMSO que les protéines purifiées, on peut espérer que ces problèmes de solubilité pourront être résolus.



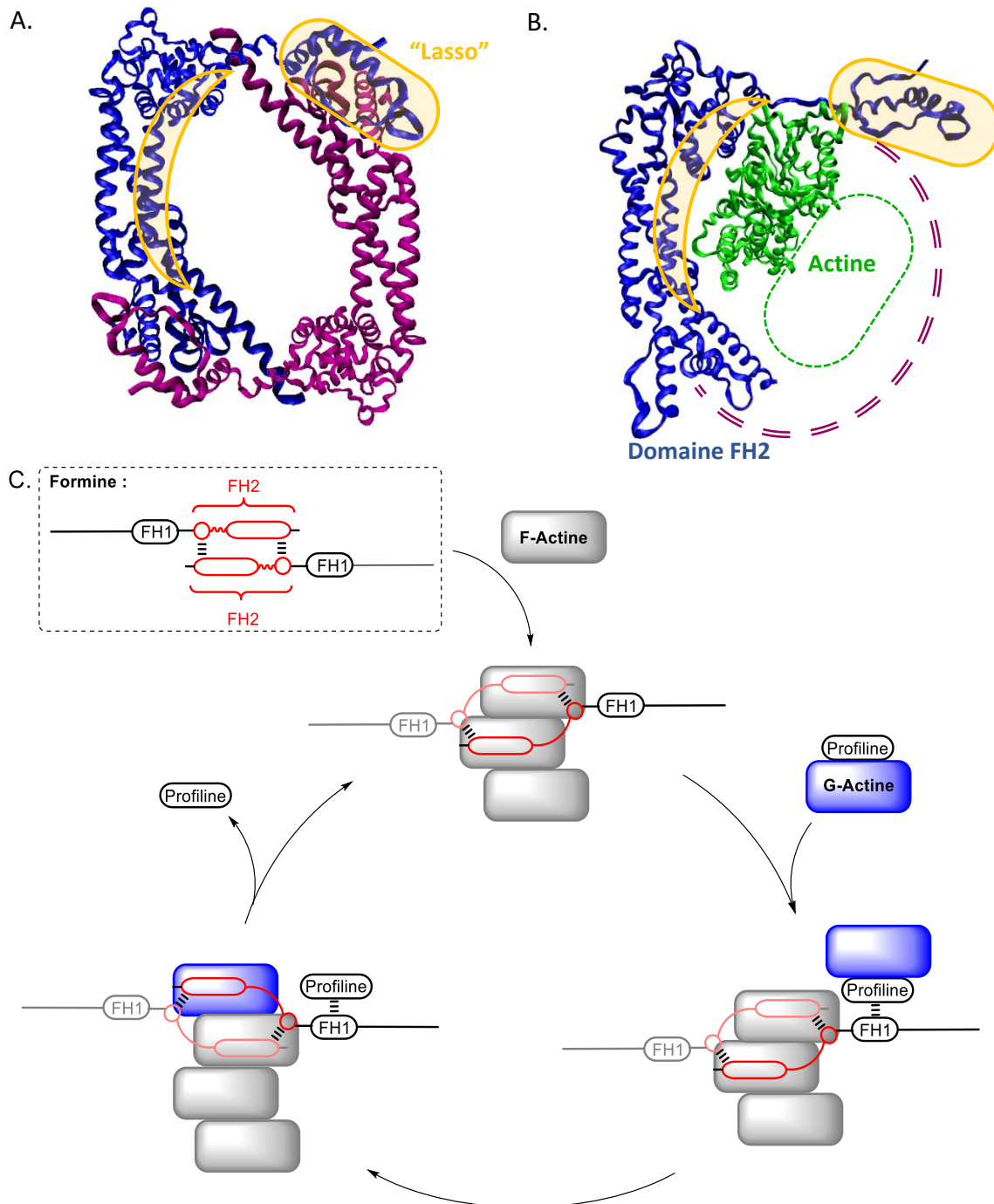
## Annexe 3 : Tentative de développement d'un SMIFH2 photocagée :

### A3.1 Les formines, les promoteurs de la polymérisation

Les formines sont des protéines responsables de la formation des réseaux linéaires du cytosquelette d'actine. Ce sont des promoteurs de la nucléation et de la croissance des filaments. Cette activité s'explique par les interactions de ces différents domaines. En particulier, elles possèdent toutes un domaine FH2 crucial à l'activité et la plupart également un second domaine d'intérêt FH1. La majeure partie de l'activité s'explique par les interactions du domaine FH2. Ce domaine se divise en trois parties d'intérêt : une zone centrale interagissant avec l'actine avec d'un côté un « lasso » interagissant avec un autre petit domaine de l'autre côté. Le domaine dit « lasso » est lié au reste de la protéine par une longue chaîne désorganisée et déformable (Figure 131 A). Cette structure particulière permet au domaines FH2 de s'organiser sous forme d'un homodimère circulaire, creux et déformable. Ce dimère va exposer ses domaines interagissant avec d'actine vers l'intérieur. En s'élargissant, ce dimère peut faire la place à deux unités d'actine, interagissant avec chacune d'entre elle par un des domaines FH2 (Figure 131 B). Cette capacité à enlacer un dimère d'actine est à l'origine des mécanismes d'élongation et de nucléation (Figure 131 C).<sup>15,20</sup>

Elle permet en premier lieu aux formines de se placer à l'extrémité croissante du filament. Le domaine FH1 peut se lier à la profiline, la protéine formant des complexes avec la G-actine et empêchant sa polymérisation spontanée. En se liant à un complexe actine/profiline, cela va rapprocher ce nouveau monomère d'actine de l'extrémité croissante qui va pouvoir s'y ajouter, se détachant de la profiline. Ce faisant, les formines peuvent progresser pour se placer à nouveau à l'extrémité, vont relâcher la profiline et pouvoir continuer à recruter d'autres complexes actine/profiline. Ce mécanisme permet aux formines de rester à l'extrémité croissante d'un filament et d'y accélérer la croissance.<sup>15,20</sup>

Le dimère de formines, s'il n'est pas lié à un filament, peut aussi se lier à deux complexes d'actine/profiline à la fois pour forcer la formation du dimère initial d'actine, qui pourra évoluer vers le trimère et initier un nouveau filament. C'est par ce mécanisme que les formines vont aussi promouvoir la nucléation.<sup>15,20</sup>



**Figure 131 :** (A) Structure de diffraction aux rayons X de l'homodimère de domaines FH2 (Identifiant PDB : 1UX5)<sup>126</sup> (B) Structure de diffraction aux rayons X du domaine FH2 de la formine lié à de l'actine-ATP-Ca<sup>2+</sup>. Pour simplifier, une seule unité de l'homodimère a été représentée (Identifiant PDB : 1Y64)<sup>127</sup> (C) Représentation schématique de l'élongation des filaments promue par les formines<sup>15,20</sup>

- (126) Xu, Y., Moseley, J. B., Sagot, I., Poy, F., Pellman, D., Goode, B. L., Eck, M. J. Crystal Structures of a Formin Homology-2 Domain Reveal a Tethered Dimer Architecture. *Cell* **2004**, *116* (5), 711–723.
- (127) Otomo, T., Tomchick, D. R., Otomo, C., Panchal, S. C., Machius, M., Rosen, M. K. Structural Basis of Actin Filament Nucleation and Processive Capping by a Formin Homology 2 Domain. **2005**, *433*, 7.

### A3.2 L'inhibiteur des formines SMIFH2, un malheureux exemple d'activité hors cible

Dans l'optique de pouvoir étudier les rôles précis des formines parmi les différents mécanismes cellulaires impliquant la croissance de l'actine, le groupe de Kovar a conduit un screening d'environ 10 000 molécules pour rechercher des inhibiteurs des formines. Une famille de composés dont le plus actif a été nommé SMIFH2 **[18]** (« Small Molecule Inhibitor of FH2 ») ont été découverts comme inhibant la polymérisation de l'actine assistée par les formines. Il a été montré que ce composé agissait sur le domaine FH2 et inhibait les formines avec un IC<sub>50</sub> de l'ordre de 15 µM.<sup>35</sup> Ce composé était et reste à ce jour le seul inhibiteur connu des formines et son utilisation est devenue commune.

Ce composé a néanmoins été controversé dans la communauté scientifique vis-à-vis de son mécanisme d'action. Il semblait en effet que ce composé inhibe d'autres mécanismes cellulaires que ceux liés à la polymérisation de l'actine. En 2021, il a été observé que la contraction de fibroblastes était également inhibée par SMIFH2 **[18]**, ce qui a entraîné l'étude de l'activité de ce composé sur les myosines, protéines usuellement responsables de ce mécanisme. Il a été démontré que SMIFH2 **[18]** montrait des activités hors cible. En plus de l'activité inhibitrice souhaitée sur les formines, il s'avère que le SMIFH2 **[18]** est également actif sur différentes myosines. Ce résultat a d'une part résolu le débat autour de ce composé, montrant qu'il n'était effectivement pas sélectif des formines, mais a également remis en cause un certain nombre de résultats provenant de l'utilisation de ce composé sur cellules.<sup>128</sup>

N'étant pas au fait de ce débat au début de la thèse, on a vu SMIFH2 **[18]** comme une cible particulièrement intéressante dans le développement d'un outil photocontrôlable ciblant les formines. Ce composé a une structure relativement simple et était communément utilisé pour l'inhibition des formines sur cellules. Il avait été décidé de synthétiser une forme photocagée de ce composé **[4]**.

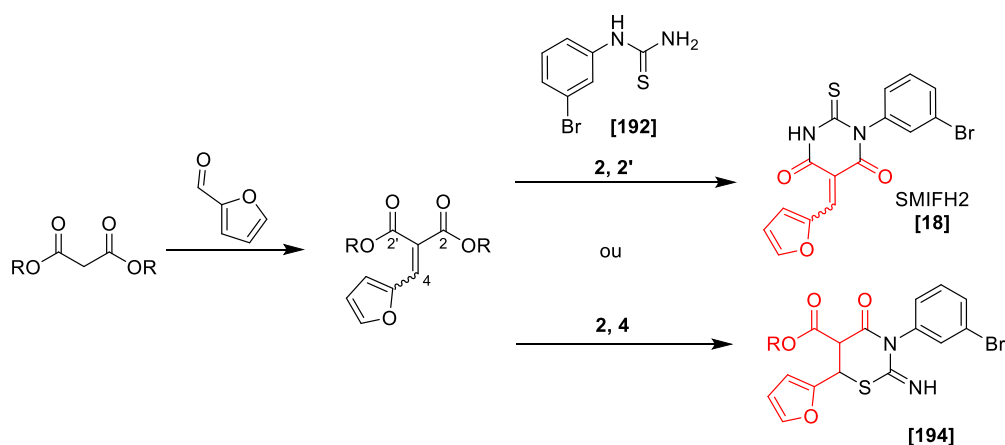
---

(128) Nishimura, Y., Shi, S., Zhang, F., Liu, R., Takagi, Y., Bershadsky, A. D., Viasnoff, V., Sellers, J. R. The Formin Inhibitor SMIFH2 Inhibits Members of the Myosin Superfamily. *J. Cell Sci.* **2021**, *134* (8).

### A3.3 Synthèse du SMIFH2

Le SMIFH2 **[18]** est composé d'un noyau hétérocyclique basé sur l'acide thiobarbiturique, décoré sur un des azotes avec un groupement *meta*-bromophényle et en C5 avec un furan-2-ylméthylène. Cette structure n'a donc qu'une seule position nucléophile pour le placement du groupement photolabile, qui est le motif thiourée de l'acide thiobarbiturique sur l'azote ou le soufre en fonction de la réactivité de cette position. Comme pour le CK666 et la wiskostatine des parties précédentes, ce groupement pourra donc être placé directement sur le SMIFH2 **[18]**.

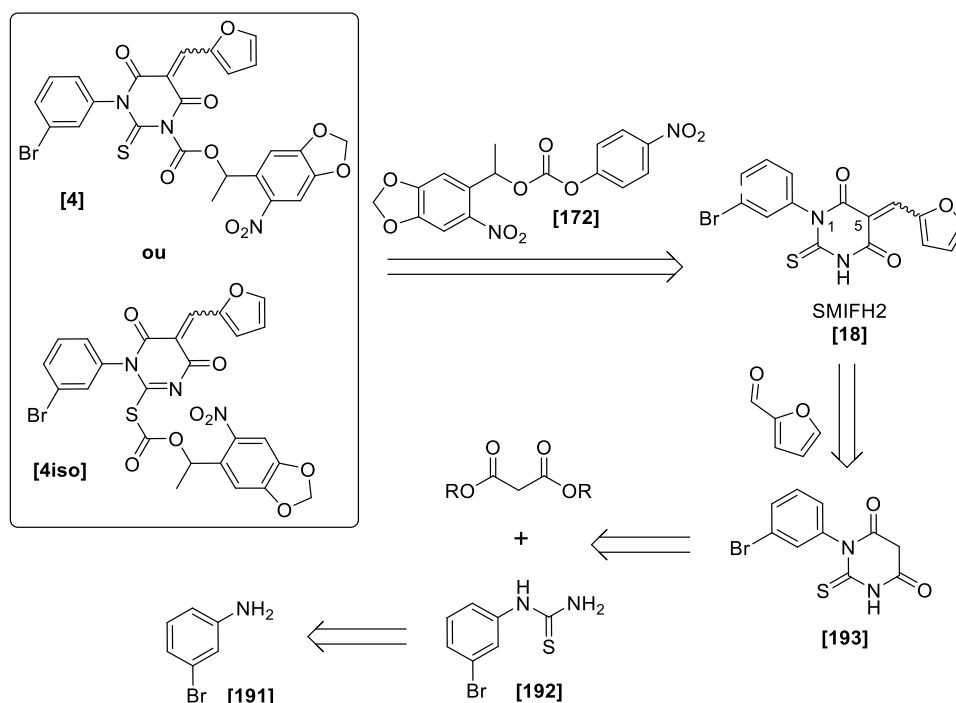
La synthèse du SMIFH2 **[18]** n'étant pas décrite, une voie a été développée. En termes de stratégie, la présence des différentes substitutions sur l'hétérocycle central, et en particulier le groupement *meta*-bromophényle sur un des deux azotes, incite à construire ce cycle en positionnant d'ores et déjà ce noyau aromatique sur l'un des substrats de départ. Les acides thiobarbituriques peuvent être préparés en faisant cycliser des dérivés d'acide malonique avec des thiourées selon la stratégie de Grimaux.<sup>129</sup> En préparant la thiourée portant le groupement *meta*-bromophényle **[192]**, on pourrait directement obtenir l'hétérocycle avec ce substituant à la bonne position. La mise en place du furane sur le malonate se fera de manière assez évidente par condensation du furfural sur la position malonique. Cette réaction pourrait se faire avant ou après la cyclisation pour former l'acide thiobarbiturique mais il a été décidé de la faire après la cyclisation pour éviter toute addition de type Michael lors de la cyclisation avec la thiourée (pouvant donner la 1,3-thiazinan-4-one **[194]** par exemple) (Figure 132).



**Figure 132** : Potentielle réaction secondaire lors de l'étape de cyclisation si la condensation du furane est faite au préalable

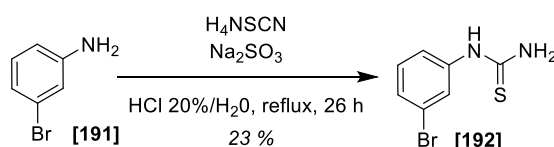
(129) Grimaux, E. In *Annales de chimie*, **1879**, 17, 276.

Finalement, la synthèse se déroulera donc la manière suivante : (1) Formation de la thioruée portant le *meta*-bromophényle [192] (2) Cyclisation avec un dérivé d'acide malonique pour former l'acide thiobarbiturique [193] (3) Condensation sur le furfural pour donner le SMIFH2 [18] (4) Attachement du groupement photolabile (Figure 133)



**Figure 133** : Stratégie de synthèse du SMIFH2 photocagé

La préparation de la thioruée [192] peut être faite à partir de l'aniline correspondante [191] par addition sur un sel de thiocyanate. Cette réaction est décrite dans la littérature et a été reprise ici.<sup>130</sup> L'aniline [191], le thiocyanate d'ammonium et le sulfite de sodium sont solubilisés dans une solution de HCl aqueux à 20 % et chauffés à reflux dans un tube scellé pendant 26 h. Protoné, l'acide thiocyanique devient électrophile et l'aniline peut s'ajouter pour former la thioruée. Le rôle du sulfite n'est pas évident ici, il peut être là comme réducteur pour éviter l'oxydation de l'aniline ou comme acide de Lewis sous la forme déshydratée SO<sub>2</sub>. La thioruée [184] a été isolée par chromatographie sur colonne avec un rendement de 23 %, faible mais prévu à 29 % par la publication (Figure 134). Cela est sûrement dû à la faible nucléophilicité de cette aniline.



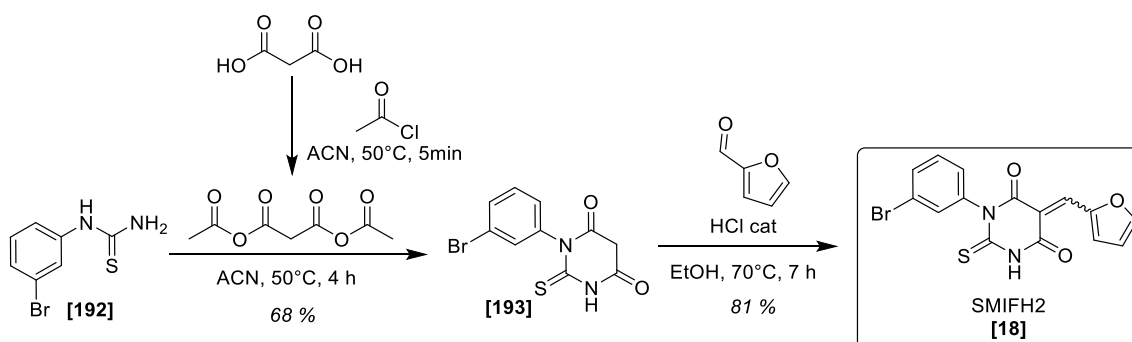
**Figure 134** : Formation de la thioruée [192]

(130) Nguyen, W., Lee, E. F., Evangelista, M., Lee, M., Harris, T. J., Colman, P. M., Smith, N. A., Williams, L. B., Jarman, K. E., Lowes, K. N., Haerberli, C., Keiser, J., Smith, B. J., Fairlie, W. D., Sleebs, B. E. Optimization of Benzothiazole and Thiazole Hydrazones as Inhibitors of Schistosome BCL-2. *ACS Infect. Dis.* **2021**, 7 (5), 1143–1163.



La cyclisation de la thiourée **[192]** avec un dérivé d'acide malonique a ensuite été essayée. On retrouve dans plusieurs publications et brevets l'utilisation du malonate de diéthyle en conditions basiques. Une solution d'éthanoate de sodium dans l'éthanol a été préparée et la thiourée **[192]** ainsi que le malonate de diéthyle ont été ajoutés. La réaction a été chauffée à reflux pendant deux jours mais elle ne progresse pas. Le diester ne réagissant pas, un dérivé plus électrophile a été envisagé. L'anhydride mixte de diacétyle a été préparé en traitant l'acide malonique avec du chlorure d'acétyle dans le DCM. La thiourée **[192]** a ensuite été ajoutée. Cette fois-ci le produit cyclisé **[193]** est obtenu mais avec un faible rendement de 25 %. On remarque pendant la réaction que le mélange n'est pas bien soluble. En changeant de solvant pour l'acétonitrile, le mélange n'est toujours pas parfaitement soluble mais le produit **[193]** peut tout de même être isolé avec un rendement meilleur de 68 % (Figure 135).

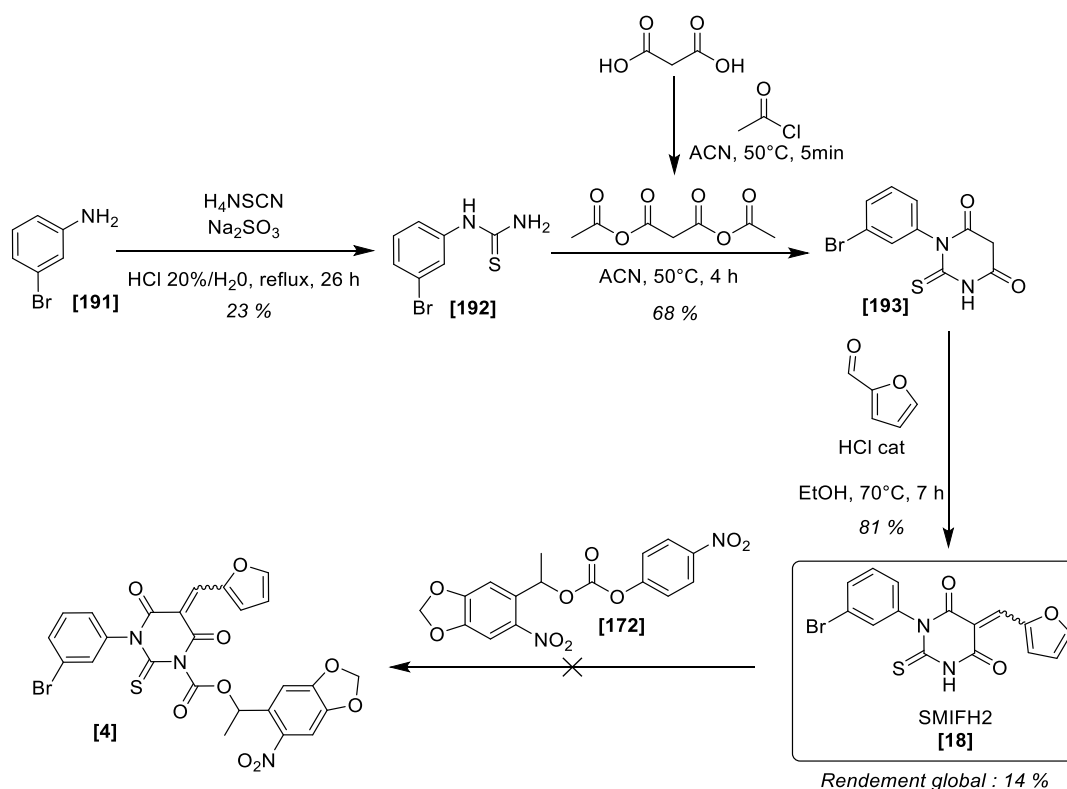
L'acide thiobarbiturique **[193]** en main, l'étape finale pour former le SMIFH2 **[18]** a été réalisée. La condensation de Knoevenagel entre l'acide thiobarbiturique et le furfural a été faite dans l'éthanol à 70°C avec une quantité catalytique d'HCl. Le SMIFH2 **[18]** s'avère insoluble dans la plupart des solvants et peut être isolé par filtration et purifié par chromatographie sur colonne. Le SMIFH2 **[18]** est obtenu pur avec un rendement de 81 % (Figure 135). La synthèse du SMIFH2 **[18]** a été réalisée en trois étapes avec un rendement global de 14 %.



**Figure 135** : Étapes de cyclisation et du SMIFH2

Le greffage du groupement photolabile a été essayé dans les mêmes conditions qu'avec le CK666. Après déprotonation du SMIFH2 **[18]** avec NaH, le carbonate de *para*-nitrophénol portant le groupement photolabile **[172]** a été ajouté. On n'observe initialement pas de conversion du SMIFH2 et après un chauffage progressif jusqu'à 90°C, on commence à voir de la dégradation mais pas de formation du produit photocagé **[4]**. Le proton de la thiourée étant sûrement assez acide, la réaction a été réessayée avec des bases moins fortes. NEt<sub>3</sub> ou Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ont été essayés pour voir si l'on aurait une différence entre une base organique et une base minérale. Dans les deux cas, on n'observe pas

de réaction. La question de la nucléophilicité relative entre la thiourée du SMIFH2 **[18]** et le *para*-nitrophénol se pose car il se pourrait que la carbonate du groupement photolabile avec le *para*-nitrophénol soit plus stable que son carbamate avec le SMIFH2 **[18]** (ou thiocarbonate s'il réagit par le soufre). La réaction ne pourrait alors pas se produire avec ce réactif et il faudrait alors avoir recours au chloroformiate **[169]** en espérant qu'il ne se dégrade pas. La mesure du pKa du SMIFH2 **[18]** aurait été un potentiel indicateur de sa nucléophilicité.



**Figure 136** : Synthèse du SMIFH2 et échec de la photoprotection

Ce projet a été abandonné à ce stade suite à la publication de l'article prouvant les activités hors cible du SMIFH2 **[18]**.<sup>128</sup> Le développement de la bibliothèque d'inhibiteurs photocagées ayant pour but de pouvoir contrôler chaque aspect des mécanismes liés à l'actine, ce manque de sélectivité va à l'encontre de notre objectif. La non-sélectivité empêche en effet de discriminer les différents mécanismes.

Une voie de synthèse pour le SMIFH2 **[18]** a néanmoins été développée et pourrait être utilisée pour optimiser ce composé en vue d'une meilleure sélectivité.



# Références

## 1ère Partie : Introduction Générale

- (1) Bershadsky, A. D., Vasiliev, J. M. *Cytoskeleton*, Springer Science & Business Media, 2012.
- (2) Fletcher, D. A., Mullins, R. D. Cell Mechanics and the Cytoskeleton. *Nature* **2010**, 463 (7280), 485–492.
- (3) Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., Plastino, J. Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility. *Physiol. Rev.* **2014**, 94 (1), 235–263
- (4) Gardel, M. L., Schneider, I. C., Aratyn-Schaus, Y., Waterman, C. M. Mechanical Integration of Actin and Adhesion Dynamics in Cell Migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, 26, 315–333.
- (5) Pantaloni, D., Clainche, C. L., Carlier, M.-F. Mechanism of Actin-Based Motility. *Science* **2001**, 292 (5521), 1502–1506.
- (6) Vicente-Manzanares, M., Choi, C. K., Horwitz, A. R. Integrins in Cell Migration – the Actin Connection. *J. Cell Sci.* **2009**, 122 (2), 199–206.
- (7) Dominguez, R., Holmes, K. C. Actin Structure and Function. *Annu. Rev. Biophys.* **2011**, 40, 169–186.
- (8) Heald, R., Nogales, E. Microtubule Dynamics. *J. Cell Sci.* **2002**, 115 (1), 3–4.
- (9) Sui H., Downing K. H. Structural Basis of Interprotofilament Interaction and Lateral Deformation of Microtubules. *Structure* **2010**, 18 (8), 1022–1031.
- (10) Kabsch W., Vandekerckhove J. Structure and Function of Actin. *Struct. Funct. Action* **1992**, 21, 49–76.
- (11) Otterbein, L. R., Graceffa, P., Dominguez, R. The Crystal Structure of Uncomplexed Actin in the ADP State. *Science* **2001**, 293 (5530), 708–711.
- (12) Neuhaus, J. M., Wanger, M., Keiser, T., Wegner, A. Treadmilling of Actin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **1983**, 4 (5), 507–527.
- (13) Pollard, T. D. Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, 8 (8), a018226.
- (14) Svitkina T. M. Actin Cell Cortex: Structure and Molecular Organization. *Trends Cell Biol.* **2020**, 30 (7), 556–565.
- (15) Paul, A. S., Pollard, T. D. Review of the Mechanism of Processive Actin Filament Elongation by Formins. *Cell Motil.* **2009**, 66 (8), 606–617.
- (16) Bamburg, J. R. Proteins of the ADF/Cofilin Family: Essential Regulators of Actin Dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1999**, 15 (1), 185–230.
- (17) Yamashita A., Maeda K., Maeda Y. Crystal Structure of CapZ: Structural Basis for Actin Filament Barbed End Capping. *EMBO J.* **2003**, 22 (7), 1529–1538.
- (18) Goley, E. D., Welch, M. D. The ARP2/3 Complex: An Actin Nucleator Comes of Age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, 7 (10), 713–726.
- (19) Witke, W. The Role of Profilin Complexes in Cell Motility and Other Cellular Processes. *Trends Cell Biol.* **2004**, 14 (8), 461–469.
- (20) Romero, S., Clainche, L. C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D., Carlier M.F. Formin Is a Processive Motor That Requires Profilin to Accelerate Actin Assembly and Associated ATP Hydrolysis. *Cell* **2004**, 119 (3), 419–429.
- (21) Golji, J., Mofrad, M. R. K. The Interaction of Vinculin with Actin. *PLoS Comput. Biol.* **2013**, 9 (4), e1002995.
- (22) Hirata, H., Tatsumi, H., Lim, C. T., Sokabe, M. Force-Dependent Vinculin Binding to Talin in Live Cells: A Crucial Step in Anchoring the Actin Cytoskeleton to Focal Adhesions. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2014**, 306 (6), C607–C620.
- (23) Adelstein, R., Eisenberg E. Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction. *Ann. Rev. Biochem.* **1980**, 49, 921–956.
- (24) Koubassova, N. A., Tsaturyan, A. K. Molecular Mechanism of Actin-Myosin Motor in Muscle. *Biochem. Mosc.* **2011**, 76 (13), 1484–1506.
- (25) Galli-Taliadoros, L. A., Sedgwick, J. D., Wood, S. A., Körner, H. Gene Knock-out Technology: A Methodological Overview for the Interested Novice. *J. Immunol. Methods* **1995**, 181 (1), 1–15.
- (26) Toogood, P. L. Inhibition of Protein–Protein Association by Small Molecules: Approaches and Progress. *J. Med. Chem.* **2002**, 45 (8), 1543–1558.
- (27) Sheng, C., Dong, G., Miao, Z., Zhang, W., Wang, W. State-of-the-Art Strategies for Targeting Protein–Protein Interactions by Small-Molecule Inhibitors. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44 (22), 8238–8259.
- (28) Spector, I., Shochet, N. R., Blasberger, D., Kashman, Y. Latrunculins—Novel Marine Macrolides That Disrupt Microfilament Organization and Affect Cell Growth: I. Comparison with Cytochalasin D. *Cell Motil.* **1989**, 13 (3), 127–144.
- (29) Brown, S. S., Spudich, J. A. Mechanism of Action of Cytochalasin: Evidence That It Binds to Actin Filament Ends. *J. Cell Biol.* **1981**, 88 (3), 487–491.
- (30) Wakatsuki, T., Schwab, B., Thompson, N. C., Elson, E. L. Effects of Cytochalasin D and Latrunculin B on Mechanical Properties of Cells. *J. Cell Sci.* **2001**, 114 (5), 1025–1036.
- (31) Sasse, F., Kunze, B., Gronewold, T. M. A., Reichenbach, H. The Chondramides: Cytostatic Agents From Myxobacteria Acting on the Actin Cytoskeleton. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, 90 (20), 1559–1563.
- (32) Bubb, M. R., Spector, I., Beyer, B. B., Fosen, K. M. Effects of Jasplakinolide on the Kinetics of Actin Polymerization: An explanation for certain in vivo observations. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (7), 5163–5170.
- (33) Cooper, J. A. Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin. *J. Cell Biol.* **1987**, 105 (4), 1473–1478.
- (34) MacLean-Fletcher, S., Pollard, T. D. Mechanism of Action of Cytochalasin B on Actin. *Cell* **1980**, 20 (2), 329–341.
- (35) Rizvi, S. A., Neidt, E. M., Cui, J., Feiger, Z., Skau, C. T., Gardel, M. L., Kozmin, S. A., Kovar, D. R. Identification and Characterization of a Small Molecule Inhibitor of Formin-Mediated Actin Assembly. *Chem. Biol.* **2009**, 16 (11), 1158–1168.

- (36) Nolen, B. J., Tomasevic, N., Russell, A., Pierce, D. W., Jia, Z., McCormick, C. D., Hartman, J., Sakowicz, R., Pollard, T. D. Characterization of Two Classes of Small Molecule Inhibitors of Arp2/3 Complex. *Nature* **2009**, *460* (7258), 1031–1034.
- (37) Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., Kirschner, M. W. The Interaction between N-WASP and the Arp2/3 Complex Links Cdc42-Dependent Signals to Actin Assembly. *Cell* **1999**, *97* (2), 221–231.
- (38) Peterson, J. R., Bickford, L. C., Morgan, D., Kim, A. S., Ouerfelli, O., Kirschner, M. W., Rosen, M. K. Chemical Inhibition of N-WASP by Stabilization of a Native Autoinhibited Conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11* (8), 747–755.
- (39) Surviladze, Z., Waller, A., Strouse, J. J., Bologa, C., Ursu, O., Salas, V., Parkinson, J. F., Phillips, G. K., Romero, E., Wandinger-Ness, A., Sklar, L. A., Schroeder, C., Simpson, D., Nöth, J., Wang, J., Golden, J., Aubé, J. A Potent and Selective Inhibitor of Cdc42 GTPase. In *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*, National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD), 2010.
- (40) Komatsu, H., Koseki, Y., Kanno, T., Aoki, S., Kodama, T. 2,3-Butandione 2-Monoxime Inhibits Skeletal Myosin II by Accelerating ATP Cleavage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *490* (3), 849–854.
- (41) Kovács, M., Tóth, J., Hetényi, C., Málnási-Csizmadia, A., Sellers, J. R. Mechanism of Blebbistatin Inhibition of Myosin II\*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (34), 35557–35563.
- (42) Baluška, F., Jasik, J., Edelmann, H. G., Salajová, T., Volkmann, D. Latrunculin B-Induced Plant Dwarfism: Plant Cell Elongation Is F-Actin-Dependent. *Dev. Biol.* **2001**, *231* (1), 113–124.
- (43) Fedorov, V. V., Lozinsky, I. T., Sosunov, E. A., Anyukhovskiy, E. P., Rosen, M. R., Balke, C. W., Efimov, I. R. Application of Blebbistatin as an Excitation–Contraction Uncoupler for Electrophysiological Study of Rat and Rabbit Hearts. *Heart Rhythm* **2007**, *4* (5), 619–626.
- (44) Henson, J. H., Yeterian, M., Weeks, R. M., Medrano, A. E., Brown, B. L., Geist, H. L., Pais, M. D., Oldenbourg, R., Shuster, C. B. Arp2/3 Complex Inhibition Radically Alters Lamellipodial Actin Architecture, Suspended Cell Shape, and the Cell Spreading Process. *Mol. Biol. Cell* **2015**, *26* (5), 887–900.
- (45) Lichtman, J. W., Conchello, J.-A. Fluorescence Microscopy. *Nat. Methods* **2005**, *2* (12), 910–919.
- (46) Leung, B. O., Chou, K. C. Review of Super-Resolution Fluorescence Microscopy for Biology. *Appl. Spectrosc.* **2011**, *65* (9), 967–980.
- (47) Lasorne, B., Worth, G. A., Robb, M. A. Excited-State Dynamics. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2011**, *1* (3), 460–475.
- (48) Klán, P., Šolomek, T., Bochet, C. G., Blanc, A., Givens, R., Rubina, M., Popik, V., Kostikov, A., Wirz, J. Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (1), 119–191.
- (49) Szymański, W., Beierle, J. M., Kistemaker, H. A. V., Velema, W. A., Feringa, B. L. Reversible Photocontrol of Biological Systems by the Incorporation of Molecular Photoswitches. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (8), 6114–6178.
- (50) Pillai, V. N. R. Photoremovable Protecting Groups in Organic Synthesis. *Synthesis* **1980**, *1980* (1), 1–26.
- (51) Wang, P. Photolabile Protecting Groups: Structure and Reactivity. *Asian J. Org. Chem.* **2013**, *2* (6), 452–464.
- (52) Vekariya, R. H., Patel, H. D. Recent Advances in the Synthesis of Coumarin Derivatives via Knoevenagel Condensation: A Review. *Synth. Commun.* **2014**, *44* (19), 2756–2788.
- (53) Weiss, R. M., Warshel, A. A New View of the Dynamics of Singlet Cis-Trans Photoisomerization. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101* (20), 6131–6133.
- (54) Yamashita, S. Photochemical Cis-Trans Isomerization of Stilbene. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1961**, *34* (4), 490–493.
- (55) Mallory, F. B., Wood, C. S., Gordon, J. T. Photochemistry of stilbenes. III. Some aspects of the mechanism of photocyclization to phenanthrenes. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (15), 3094–3102.
- (56) Griffiths, J. II. Photochemistry of Azobenzene and Its Derivatives. *Chem. Soc. Rev.* **1972**, *1* (4), 481.
- (57) Kaplan, J. H., Forbush, B., Hoffman, J. F. Rapid Photolytic Release of Adenosine 5'-Triphosphate from a Protected Analog: Utilization by the Sodium:Potassium Pump of Human Red Blood Cell Ghosts. *Biochemistry* **1978**, *17* (10), 1929–1935.
- (58) Goard, M., Aakalu, G., Fedoryak, O. D., Quinonez, C., St. Julien, J., Poteet, S. J., Schuman, E. M., Dore, T. M. Light-Mediated Inhibition of Protein Synthesis. *Chem. Biol.* **2005**, *12* (6), 685–693.
- (59) Anstaett, P., Pierroz, V., Ferrari, S., Gasser, G. Two-Photon Uncageable Enzyme Inhibitors Bearing Targeting Vectors. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14* (10), 1821–1825.
- (60) Karginov, A. V., Zou, Y., Shirvanyants, D., Kota, P., Dokholyan, N. V., Young, D. D., Hahn, K. M., Deiters, A. Light Regulation of Protein Dimerization and Kinase Activity in Living Cells Using Photocaged Rapamycin and Engineered FKBP. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (3), 420–423.
- (61) Arkhipova, V., Fu, H., Hoorens, M. W. H., Trinco, G., Lameijer, L. N., Marin, E., Feringa, B. L., Poelarends, G. J., Szymanski, W., Slotboom, D. J., Guskov, A. Structural Aspects of Photopharmacology: Insight into the Binding of Photoswitchable and Photocaged Inhibitors to the Glutamate Transporter Homologue. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (3), 1513–1520.
- (62) Bourbon, P., Peng, Q., Ferraudi, G., Stauffacher, C., Wiest, O., Helquist, P. Synthesis and Photochemical Behavior of Coumarin-Caged Cholesterol. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (7), 2162–2165.
- (63) Ieda, N., Yamada, S., Kawaguchi, M., Miyata, N., Nakagawa, H. (7-Diethylaminocoumarin-4-Yl)Methyl Ester of Suberoylanilide Hydroxamic Acid as a Caged Inhibitor for Photocontrol of Histone Deacetylase Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24* (12), 2789–2793.
- (64) Lemke, E. A., Summerer, D., Geierstanger, B. H., Brittain, S. M., Schultz, P. G. Control of Protein Phosphorylation with a Genetically Encoded Photocaged Amino Acid. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3* (12), 769–772.
- (65) Shao, Q., Xing, B. Photoactive Molecules for Applications in Molecular Imaging and Cell Biology. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (8), 2835.
- (66) Umeda, N., Ueno, T., Pohlmeier, C., Nagano, T., Inoue, T. A Photocleavable Rapamycin Conjugate for Spatiotemporal Control of Small GTPase Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (1), 12–14.

- (67) Borowiak, M., Nahaboo, W., Reynders, M., Nekolla, K., Jalinot, P., Hasserodt, J., Rehberg, M., Delattre, M., Zahler, S., Vollmar, A., Trauner, D., Thorn-Seshold, O. Photoswitchable Inhibitors of Microtubule Dynamics Optically Control Mitosis and Cell Death. *Cell* **2015**, *162* (2), 403–411.
- (68) Gao, L., Meiring, J. C. M., Varady, A., Ruider, I. E., Heise, C., Wraniak, M., Velasco, C. D., Taylor, J. A., Terni, B., Cabernard, C. C., Llobet, A., Steinmetz, M. O., Distel, M., Thorn-Seshold, J., Akhmanova, A., Thorn, O. In Vivo Photocontrol of Microtubule Dynamics and Integrity, Migration and Mitosis, by the Potent GFP-Imaging-Compatible Photoswitchable Reagents SBTubA4P and SBTub2M. **2022**, *114* (12), 5614–5628.
- (69) Müller-Deku, A., Meiring, J. C. M., Loy, K., Kraus, Y., Heise, C., Bingham, R., Jansen, K. I., Qu, X., Bartolini, F., Kapitein, L. C., Akhmanova, A., Ahlfeld, J., Trauner, D., Thorn-Seshold, O. Photoswitchable Paclitaxel-Based Microtubule Stabilisers Allow Optical Control over the Microtubule Cytoskeleton. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 4640.
- (70) Gao, L., Meiring, J. C. M., Heise, C., Rai, A., Müller-Deku, A., Akhmanova, A., Thorn-Seshold, J., Thorn-Seshold, O. Photoswitchable Epothilone-Based Microtubule Stabilisers Allow GFP-Imaging-Compatible, Optical Control over the Microtubule Cytoskeleton\*\*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61* (10), e202114614.
- (71) Borowiak, M., Küllmer, F., Gegenfurtner, F., Peil, S., Nasufovic, V., Zahler, S., Thorn-Seshold, O., Trauner, D., Arndt, H.-D. Optical Manipulation of F-Actin with Photoswitchable Small Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (20), 9240–9249.

## 2ème Partie : Vers la synthèse totale d'une latrunculine B photocagée

- (72) Kashman, Y., Groweiss, A., Shmueli, U. Latrunculin, a New 2-Thiazolidinone Macrolide from the Marine Sponge *Latrunculia Magnifica*. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21* (37), 3629–3632.
- (73) Zibuck, Regina., Liverton, N. J., Smith, A. B. Total Synthesis of (+)-Latrunculin B. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108* (9), 2451–2453.
- (74) Spector, I., Shochet, N. R., Kashman, Y., Groweiss, A. Latrunculins: Novel Marine Toxins That Disrupt Microfilament Organization in Cultured Cells. *Science* **1983**, *219* (4584), 493–495.
- (75) Coué, M., Brenner, S. L., Spector, I., Korn, E. D. Inhibition of Actin Polymerization by Latrunculin A. *FEBS Lett.* **1987**, *213* (2), 316–318.
- (76) Fürstner, A., De Souza, D., Parra-Rapado, L., Jensen, J. T. Catalysis-Based Total Synthesis of Latrunculin B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42* (43), 5358–5360.
- (77) Scheiper, B., Bonnekessel, M., Krause, H., Fürstner, A. Selective Iron-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Grignard Reagents with Enol Triflates, Acid Chlorides, and Dichloroarenes. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (11), 3943–3949.
- (78) Fürstner, A., Turet, L. Concise and Practical Synthesis of Latrunculin A by Ring-Closing Enyne-Yne Metathesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (22), 3462–3466.
- (79) Fürstner, A., De Souza, D., Turet, L., Fenster, M. D. B., Parra-Rapado, L., Wirtz, C., Mynott, R., Lehmann, C. W. Total Syntheses of the Actin-Binding Macrolides Latrunculin A, B, C, M, S and 16-*Epi*-Latrunculin B. *Chem. - Eur. J.* **2007**, *13* (1), 115–134.
- (80) Fürstner, A., Kirk, D., Fenster, M. D. B., Aïssa, C., De Souza, D., Nevado, C., Tuttle, T., Thiel, W., Müller, O. Latrunculin Analogues with Improved Biological Profiles by “Diverted Total Synthesis”: Preparation, Evaluation, and Computational Analysis. *Chem. - Eur. J.* **2007**, *13* (1), 135–149.
- (81) Amagata, T., Johnson, T. A., Cichewicz, R. H., Tenney, K., Mooberry, S. L., Media, J., Edelstein, M., Valeriote, F. A., Crews, P. Interrogating the Bioactive Pharmacophore of the Latrunculin Chemotype by Investigating the Metabolites of Two Taxonomically Unrelated Sponges. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (22), 7234–7242.
- (82) She, J., Lampe, J. W., Polianski, A. B., Watson, P. S. Examination of the Olefin–Olefin Ring Closing Metathesis to Prepare Latrunculin B. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (3), 298–301.
- (83) Müller, D. S., Curbet, I., Raoul, Y., Le Nôtre, J., Baslé, O., Mauduit, M. Stereoretentive Olefin Metathesis Made Easy: In Situ Generation of Highly Selective Ruthenium Catalysts from Commercial Starting Materials. *Org. Lett.* **2018**, *20* (21), 6822–6826.
- (84) Keitz, B. K.; Endo, K.; Patel, P. R.; Herbert, M. B.; Grubbs, R. H. Improved Ruthenium Catalysts  $Z$ -Selective Olefin Metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (1), 693–699.
- (85) Kim, I. S., Ngai, M.-Y., Krische, M. J. Enantioselective Iridium-Catalyzed Carbonyl Allylation from the Alcohol or Aldehyde Oxidation Level via Transfer Hydrogenative Coupling of Allyl Acetate: Departure from Chirally Modified Allyl Metal Reagents in Carbonyl Addition. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (44), 14891–14899.
- (86) Kim, I. S., Ngai, M.-Y., Krische, M. J. Enantioselective Iridium-Catalyzed Carbonyl Allylation from the Alcohol or Aldehyde Oxidation Level Using Allyl Acetate as an Allyl Metal Surrogate. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (20), 6340–6341.
- (87) Hoye, T. R., Jeffrey, C. S., Shao, F. Mosher Ester Analysis for the Determination of Absolute Configuration of Stereogenic (Chiral) Carbinol Carbons. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (10), 2451–2458.
- (88) Mihelich, E. D., Daniels, K., Eickhoff, D. J. Vanadium-Catalyzed Epoxidations. 2. Highly Stereoselective Epoxidations of Acyclic Homoallylic Alcohols Predicted by a Detailed Transition-State Model. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103* (25), 7690–7692.
- (89) Bajwa, J. S., Anderson, R. C. A Highly Regioselective Conversion of Epoxides to Halohydrins by Lithium Halides. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32* (26), 3021–3024.
- (90) Babinski, D., Soltani, O., Frantz, D. E. Stereoselective Synthesis of Acetoacetate-Derived Enol Triflates. *Org. Lett.* **2008**, *10* (13), 2901–2904.
- (91) Seyferth, Dietmar., Welch, D. E., Heeren, J. K. The Reaction of Triphenylphosphine Oxide with Alkylolithium and Grignard Reagents. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (6), 1100–1105.

- (92) Spiegl, H. J., Groh, G., Berthold, H. J. Über die Darstellung von Lithiumtetramethyloferrat(II)  $\text{Li}_2[\text{Fe}(\text{CH}_3)_4]$ . *Z. Für Anorg. Allg. Chem.* **1973**, *398* (3), 225–230.
- (93) Zweifel, G., Clark, G. M., Polston, N. L. Directive Effects in the Monohydroboration of Alkynes and Enynes. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93* (14), 3395–3399.
- (94) Seki, M., Hatsuda, M., Mori, Y., Yoshida, S., Yamada, S., Shimizu, T. A Practical Synthesis of (+)-Biotin From L-Cysteine. *Chem. - Eur. J.* **2004**, *10* (23), 6102–6110.
- (95) Heravi, M. M., Zadsirjan, V., Kafshdarzadeh, K., Amiri, Z. Recent Advances in Stetter Reaction and Related Chemistry: An Update. *Asian J. Org. Chem.* **2020**, *9* (12), 1999–2034.
- (96) Burghardt, T. E. Developments in the Deprotection of Thioacetals. *J. Sulfur Chem.* **2005**, *26* (4–5), 411–427.
- (97) Deuchert, K., Hertenstein, U., Hünig, S. Nucleophile Acylierung mit verkappten Acylanionen. *Synthesis* **1973**, *1973* (12), 777–779.
- (98) Majhi, J., Turnbull, B. W. H., Ryu, H., Park, J., Baik, M.-H., Evans, P. A. Dynamic Kinetic Resolution of Alkenyl Cyanohydrins Derived from  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Aldehydes: Stereoselective Synthesis of *E*-Tetrasubstituted Olefins. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (30), 11770–11774.
- (99) Liu, C.-Y., Ren, H., Knochel, P. Magnesiated Unsaturated Silylated Cyanohydrins as Synthetic Equivalents of Aromatic and Heterocyclic Grignard Reagents Bearing a Ketone or an Aldehyde. *Org. Lett.* **2006**, *8* (4), 617–619.
- (100) Michel, B. W.; Steffens, L. D.; Sigman, M. S. Wacker Oxidation, The. In *Organic Reactions*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, **2014**, 75–414.
- (101) Kulasegaram, S., Kulawiec, R. J. Chemo- and Regioselective Isomerization of Epoxides to Carbonyl Compounds via Palladium Catalysis. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (24), 7195–7196.
- (102) Prandi, J., Namy, J. L., Menoret, G., Kagan, H. B. Selective Catalyzed-Rearrangement of Terminal Epoxides to Methyl Ketones. *J. Organomet. Chem.* **1985**, *285* (1–3), 449–460.
- (103) Nielsen, A. T., Houlihan, W. J. The Aldol Condensation. *Org. React.* **2004**, *16*, 1–438.
- (104) Matsuo, J., Murakami, M. The Mukaiyama Aldol Reaction: 40 Years of Continuous Development. *Angew Chem Int Ed* **2013**, *52*, 1–11.

### 3ème Partie : Synthèse d'autres inhibiteurs photocagés

- (105) Slade, J., Parker, D., Girgis, M., Wu, R., Joseph, S., Repič, O. Optimization and Scale-Up of the Grandberg Synthesis of 2-Methyltryptamine. *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11* (4), 721–725.
- (106) Baggett, A. W.; Cournia, Z.; Han, M. S.; Patargias, G.; Glass, A. C.; Liu, S.-Y.; Nolen, B. J. Structural Characterization and Computer-Aided Optimization of a Small-Molecule Inhibitor of the Arp2/3 Complex, a Key Regulator of the Actin Cytoskeleton. *ChemMedChem* **2012**, *7* (7), 1286–1294.
- (107) Anderson, E., Brown, T., Picken, D. Novel Photocleavable Universal Support for Oligonucleotide Synthesis. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, *22* (5–8), 1403–1406.
- (108) Kouyama, T., Mihashi, K. Fluorimetry Study of N-(1-Pyrenyl)Iodoacetamide-Labelled F-Actin. *Eur. J. Biochem.* **1981**, *114* (1), 33–38.
- (109) Aldridge, D. C., Armstrong, J. J., Speake, R. N., Turner, W. B. The Cytochalasins, a New Class of Biologically Active Mould Metabolites. *Chem. Commun. Lond.* **1967**, *1*, 26–27.
- (110) Nair, U. B., Joel, P. B., Wan, Q., Lowey, S., Rould, M. A., Trybus, K. M. Crystal Structures of Monomeric Actin Bound to Cytochalasin D. *J. Mol. Biol.* **2008**, *384* (4), 848–864.
- (111) Allingham, J. S., Miles, C. O., Rayment, I. A Structural Basis for Regulation of Actin Polymerization by Pectenotoxins. *J. Mol. Biol.* **2007**, *371* (4), 959–970.
- (112) Merifield, E., Thomas, E. J. Total Synthesis of Cytochalasin D: Total Synthesis and Full Structural Assignment of Cytochalasin O. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1999**, No. 22, 3269–3283.
- (113) Nair, R. V., Zhao, S., Terriac, E., Lautenschläger, F., Hetmanski, J. H. R., Caswell, P. T., Campo, A. del. Possibilities and Limitations of Photoactivatable Cytochalasin D for the Spatiotemporal Regulation of Actin Dynamics. *ChemRxiv*. **2020**.
- (114) Fathoni, A., Agusta, A. Bioproduction of Cytochalasin D by Endophytic Fungus *Xylaria* Sp. DAP KRI-5. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2019**, *9* (3), 105–110.
- (115) Prehoda, K. E., Scott, J. A., Mullins, R. D., Lim, W. A. Integration of Multiple Signals Through Cooperative Regulation of the N-WASP-Arp2/3 Complex. *Science* **2000**, *290* (5492), 801–806.
- (116) Gong, W.-L., Zhong, F., Aldred, Matthew. P., Fu, Q., Chen, T., Huang, D.-K., Shen, Y., Qiao, X.-F., Ma, D., Zhu, M.-Q. Carbazole Oligomers Revisited: New Additions at the Carbazole 1- and 8-Positions. *RSC Adv.* **2012**, *2* (29), 10821.
- (117) Meguro, M., Asao, N., Yamamoto, Y. Ytterbium Triflate and High Pressure-Mediated Ring Opening of Epoxides with Amines. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1994**, No. 18, 2597–2601.

#### 4<sup>ème</sup> Partie : Synthèse de variants photocommuteurs du CK666

- (118) Merino, E. Synthesis of Azobenzenes: The Coloured Pieces of Molecular Materials. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (7), 3835–3853.
- (119) Takeda, Y., Okumura, S., Minakata, S. A Practical Synthesis of Azobenzenes through Oxidative Dimerization of Aromatic Amines Using Tert-Butyl Hypoiodite. *Synthesis* **2013**, *45* (08), 1029–1033.
- (120) t-butyl hypochlorite. *Org. Synth.* **1969**, *49*, 9.
- (121) Prieswisch, B., Rück-Braun, K. Efficient Preparation of Nitrosoarenes for the Synthesis of Azobenzenes. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (6), 2350–2352.
- (122) Boujemaa-Paterski, R.; Gouin, E.; Hansen, G.; Samarin, S.; Le Clairche, C.; Didry, D.; Dehoux, P.; Cossart, P.; Kocks, C.; Carlier, M.-F.; Pantaloni, D. Listeria Protein ActA Mimics WASP Family Proteins: It Activates Filament Barbed End Branching by Arp2/3 Complex. *Biochemistry* **2001**, *40* (38), 11390–11404.

#### Annexes

- (123) Kornblum, N., Larson, H. O., Blackwood, R. K., Mooberry, D. D., Oliveto, E. P., Graham, G. E. A New Method for the Synthesis of Aliphatic Nitro Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78* (7), 1497–1501.
- (124) Kornblum, N.; Blackwood, R. K.; Mooberry, D. D. The Reaction of Aliphatic Nitro Compounds with Nitrite Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78* (7), 1501–1504.
- (125) Seebach, D., Lehr, F. Lithium- und Kupfer-Derivate von  $\alpha,\alpha$ -doppeldeprotonierten Nitroalkanen. – Erzeugung, Eigenschaften und Umsetzungen mit Alkyl- und Allylhalogeniden. *Helv. Chim. Acta* **1979**, *62* (7), 2239–2257.
- (126) Xu, Y., Moseley, J. B., Sagot, I., Poy, F., Pellman, D., Goode, B. L., Eck, M. J. Crystal Structures of a Formin Homology-2 Domain Reveal a Tethered Dimer Architecture. *Cell* **2004**, *116* (5), 711–723.
- (127) Otomo, T., Tomchick, D. R., Otomo, C., Panchal, S. C., Machius, M., Rosen, M. K. Structural Basis of Actin Filament Nucleation and Processive Capping by a Formin Homology 2 Domain. **2005**, *433*, 7.
- (128) Nishimura, Y., Shi, S., Zhang, F., Liu, R., Takagi, Y., Bershadsky, A. D., Viasnoff, V., Sellers, J. R. The Formin Inhibitor SMIFH2 Inhibits Members of the Myosin Superfamily. *J. Cell Sci.* **2021**, *134* (8).
- (129) Grimaux, E. In *Annales de chimie*, **1879**, *17*, 276.
- (130) Nguyen, W., Lee, E. F., Evangelista, M., Lee, M., Harris, T. J., Colman, P. M., Smith, N. A., Williams, L. B., Jarman, K. E., Lowes, K. N., Haerberli, C., Keiser, J., Smith, B. J., Fairlie, W. D., Sleebs, B. E. Optimization of Benzothiazole and Thiazole Hydrazones as Inhibitors of Schistosome BCL-2. *ACS Infect. Dis.* **2021**, *7* (5), 1143–1163.





---

# Partie expérimentale

---



## Partie expérimentale

### Materials and Methods:

All reactions were performed in flame-dried flasks fitted with rubber septa under a positive pressure of argon. DCM and Et<sub>2</sub>O were purified using a MB-SPS 800 (MBraun Solvent Purification System). THF was distilled over sodium and benzophenone. Anhydrous DMF was purchased from Merck. Other solvents were purchased from suppliers and were of technical quality. PE refers to the fraction of petroleum boiling between 40 and 60°C. Reagents were purchased and used without further purification except for the following. Allyl acetate, NEt<sub>3</sub>, DiPEA, pyridine, acetyl chloride, methyl chloroformate, quinoline, Tf<sub>2</sub>O, epichlorohydrin and HMPA were distilled and recrystallisation was performed on NBS (from hot water), DMAP (from EtOAc), Me<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>Cl (from hot chloroform) and Fe(acac)<sub>3</sub> (from EtOH).

Analytical TLC were carried out on aluminum plates coated with Merck F254 silica gel 60 and visualized by exposure to 240 nm UV light and/or exposure to a basic solution of potassium permanganate followed by heating. Column chromatography was performed using Merck PLC silica gel 60.

Infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer Spectrum Two FTIR equipped with a Jasco ATR. Absorption maxima ( $\tilde{\nu}$ ) are reported in wavenumbers (cm<sup>-1</sup>). High resolution mass spectra (HRMS) were obtained on a Bruker tims-TOF mass spectrometer (ESI+) and reported as m/z (relative intensity). UV-visible absorption spectra were recorded on an Agilent Cary 60 UV-vis. Optical rotary powers were recorded on an Anton Paar MCP 100 polarimeter, sample concentrations are given in g/100 mL. Melting points were measured by a Stuart SMP40 automatic melting point apparatus. HPLC chromatography was performed on an assembly of a DGU-20A<sub>5R</sub> degassing unit, a NexeraX2 LC-30AD command module, a NexeraX2 SIL-30AC autosampler, a CTO-20AC column oven, an SDP-M20A diode array detector and a Shimadzu LCMS-2020 mass spectrometer. A KINETEX 1.7 μm EVO C18 100 Å LC column 150 x 2.1 mm was used eluting with HPLC grade solvents purchased from Merck.

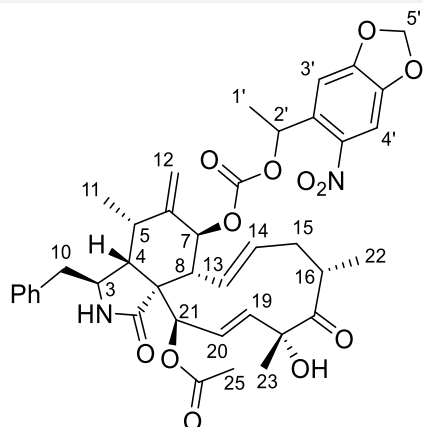
Nuclear magnetic resonance spectra (<sup>1</sup>H NMR & <sup>13</sup>C NMR) were recorded at ambient temperature with a Bruker Avance 400 spectrometer (<sup>1</sup>H at 400 MHz and <sup>13</sup>C at 100 MHz). For CDCl<sub>3</sub>, DMSO-d<sub>6</sub>, MeOH-d<sub>4</sub>, Pyr-d<sub>5</sub> and ACN-d<sub>3</sub> solutions, chemical shifts are reported as parts per million (ppm) referenced to the residual proton or carbon peak of the solvent (CDCl<sub>3</sub>: δ<sub>H</sub> = 7.26 and δ<sub>C</sub> = 77.1; DMSO-d<sub>6</sub>: δ<sub>H</sub> = 2.50 and δ<sub>C</sub> = 39.5; MeOH-d<sub>4</sub>: δ<sub>H</sub> = 3.31 and δ<sub>C</sub> = 49.0; Pyr-d<sub>5</sub>: δ<sub>H</sub> = 7.22 and δ<sub>C</sub> = 123.9;

ACN-d<sub>3</sub>:  $\delta_{\text{H}} = 1.94$  and  $\delta_{\text{C}} = 118.3$ ). Coupling constants are reported in Hertz (Hz). Data for <sup>1</sup>H spectra are reported as follows: chemical shift ppm, referenced to protium (br s: broad singlet or s: singlet or d = doublet or t: triplet or q: quadruplet or m: multiplet, coupling constants J in Hz, integration, and attribution). All carbon spectra were recorded as <sup>1</sup>H-decoupled or DEPT-135 (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer at 135°).

Irradiation of samples were performed with different lamps. UV irradiation in the early stages of this work were performed with a setup consisting of 4 x 2 FL15 Blacklight Blue Tube (15 Watts) light tubes (broad spectrum centered at 450 nm filtered through a tube opaque to visible light). This setup is referred to as the UV blacklight lamp. Irradiation in the later stages were performed with Kessil PR160 lamps at 370 nm (43 Watts) or 440 nm (45 Watts) (unfiltered narrow banded spectrum). These lamps are referred to as Kessil lamps with the according wavelength.

## Experimental procedures and characterization of the prepared compounds

**[2]:** (3S,3aR,4S,6S,6aR,7E,10S,12R,13E,15R,15aR)-3-benzyl-12-hydroxy-4,10,12-trimethyl-5-methylene-6-(((1-(6-nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)ethoxy)carbonyl)oxy)-1,11-dioxo-2,3,3a,4,5,6,6a,9,10,11,12,15-dodecahydro-1H-cycloundeca[d]isoindole-15-yl acetate



Chemical Formula:  $C_{40}H_{44}N_2O_{12}$

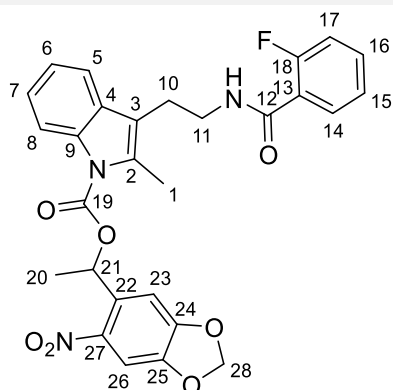
Molecular Weight: 744.79

A vial was charged with 2.5 mg of cytochalasin D **[10]** (4.9  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv), 0.6 mg of DMAP (4.9  $\mu\text{mol}$ , 1.0 equiv), and 0.4 mL of dry DCM. To the solution was added 1.9 mg of **[172]** (1.9  $\mu\text{mol}$ , 1.0 equiv) and the reaction was stirred at room temperature for 6 days. The solution was concentrated under reduced pressure and purification by column chromatography (EP/EtOAc: 80/20 to 65/35) yielded  $\geq$  3 mg of product **[2]** as a white solid.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (both diastereomers)**  $\delta$  7.50 & 7.49 (2s, 1H,  $1\text{H}_{4'}$ ), 7.33 – 7.24 (m, 3H,  $\text{H}_{\text{Ph}}$ ), 7.13 – 7.09 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{Ph}}$ ), 7.00 & 6.87 (2s, 1H,  $\text{H}_{3'}$ ), 6.19 (q,  $J = 6.5$  Hz) & 6.15 – 6.09 (overlapped) (1H,  $\text{H}_{2'}$ ), 6.13 (d,  $J = 1.2$  Hz, 0.5H,  $\text{H}_{5'}$ ) & 6.11 (2d,  $J = 1.1$  Hz, 1H) & 6.10 (d,  $J = 1.2$  Hz, 0.5H) ( $\text{H}_{5'}$ ), 6.07 (dd,  $J = 15.7, 2.6$  Hz, 0.5H) & 6.05 (dd,  $J = 15.8, 2.6$  Hz, 0.5H) ( $\text{H}_{20}$ ), 5.66 (t,  $J = 2.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_{21}$ ), 5.61 (dd,  $J = 15.7, 9.8$  Hz, 0.5H) & 5.54 (dd,  $J = 15.8, 9.7$  Hz, 0.5H) ( $\text{H}_{14}$ ), 5.41 & 5.39 (2br s, 1H, NH), 5.34 – 5.20 (m, 2H,  $\text{H}_{12}$  &  $\text{H}_{19}$ ), 5.11 (dd,  $J = 15.8, 2.4$  Hz, 0.5H) & 5.11 (dd,  $J = 15.8, 2.5$  Hz, 0.5H) ( $\text{H}_{13}$ ), 5.05 & 5.03 (2s, 1H,  $\text{H}_{12}$ ), 4.90 (d,  $J = 10.7$  Hz, 0.5H) & 4.89 (d,  $J = 10.7$  Hz, 0.5H) ( $\text{H}_7$ ), 4.62 & 4.59 (2s, 1H, OH), 3.23 – 3.17 (m, 1H,  $\text{H}_3$ ), 3.17 – 3.06 (m, 1H,  $\text{H}_8$ ), 2.82 – 2.63 (m, 4H,  $\text{H}_5$  &  $\text{H}_{10}$  &  $\text{H}_{16}$ ), 2.43 (dd,  $J = 12.6, 10.8$  Hz, 0.5H) & 2.34 (dd,  $J = 12.9, 11.1$  Hz, 0.5H) ( $\text{H}_{15a}$ ), 2.29 & 2.28 (2s, 3H,  $\text{H}_{25}$ ), 2.18 – 2.12 (m, 1H,  $\text{H}_4$ ), 1.95 (dd,  $J = 13.0, 5.5$  Hz, 0.5H) & 1.87 (dd,  $J = 12.8, 5.3$  Hz, 0.5H) ( $\text{H}_{15b}$ ), 1.58 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1.5H) & 1.57 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1.5H) ( $\text{H}_{1'}$ ), 1.49 (s, 3H,  $\text{H}_{23}$ ), 1.17 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H,  $\text{H}_{22}$ ), 0.90 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1.5H) & 0.87 (d,  $J = 6.9$  Hz, 1.5H) ( $\text{H}_{11}$ ).

**LCMS (ESI+):** Calculated for  $C_{40}H_{45}N_2O_{12}$  [ $\text{MH}^+$ ]: 745.79; Found: 745;

**[3]:** 1-(6-nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)ethyl 3-(2-(2-fluorobenzamido)ethyl)-2-methyl-1H-indole-1-carboxylate



Chemical Formula: C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>7</sub>

Molecular Weight: 533.51

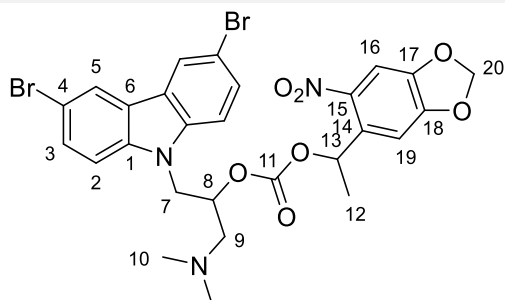
A round bottom flask was charged with 30 mg of CK666 **[14]** (0.10 mmol, 1 equiv) and 1.0 mL of dry DMF. The solution was placed at 0°C and 4 mg of NaH (60% on mineral oil, 0.10 mmol, 1.0 equiv) was added. The reaction was stirred at 0°C for 5 min and 38 mg of **[172]** (0.10 mmol, 1.0 equiv) was added. The reaction was left at room temperature for 1h30 and was quenched with a saturated solution of NaOAc, the product extracted with EtOAc, washed again with a saturated solution of NaOAc and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/EtOAc: 90/10 to 80/20) yielded 38 mg of product **[3]** as a yellow solid (yield: 71 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.14 (dd, J = 7.5, 1.9 Hz, 1H, H<sub>8</sub>), 8.11 (td, J = 7.7, 1.8 Hz, 1H, H<sub>14</sub>), 7.56 (dd, J = 6.6, 1.9 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.54 (s, 1H, H<sub>26</sub>), 7.46 (dddd, J = 8.3, 7.2, 5.2, 1.9 Hz, 1H, H<sub>16</sub>), 7.32 – 7.23 (m, 3H, H<sub>6</sub> & H<sub>7</sub> & H<sub>15</sub>), 7.08 (ddd, J = 12.8, 8.6, 1.3 Hz, 1H, H<sub>17</sub>), 7.06 (s, 1H, H<sub>23</sub>), 6.89 – 6.77 (m, 1H, NH), 6.65 (q, J = 6.5 Hz, 1H, H<sub>21</sub>), 6.10 (d, J = 1.2 Hz, 1H, H<sub>28a</sub>), 6.07 (d, J = 1.2 Hz, 1H, H<sub>28b</sub>), 3.78 – 3.62 (m, 2H, H<sub>11</sub>), 3.04 (t, J = 7.0 Hz, 2H, H<sub>10</sub>), 2.57 (s, 3H, H<sub>1</sub>), 1.85 (d, J = 6.5 Hz, 3H, H<sub>20</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 163.6 (d, J = 3.1 Hz, C<sub>12</sub>), 160.7 (d, J = 247.1 Hz, C<sub>18</sub>), 152.7 (C<sub>25</sub>), 151.0 (C<sub>19</sub>), 147.6 (C<sub>24</sub>), 141.9 (C<sub>27</sub>), 135.8 (C<sub>9</sub>), 135.09 (C<sub>22</sub>), 134.4 (C<sub>2</sub>), 133.4 (d, J = 9.4 Hz, C<sub>16</sub>), 132.1 (d, J = 1.9 Hz, C<sub>14</sub>), 130.1 (C<sub>4</sub>), 125.0 (d, J = 3.0 Hz, C<sub>15</sub>), 124.2 (C<sub>6</sub>), 123.3 (C<sub>7</sub>), 121.1 (d, J = 11.6 Hz, C<sub>13</sub>), 118.2 (C<sub>5</sub>), 116.3 (C<sub>3</sub>), 116.1 (d, J = 24.9 Hz, C<sub>17</sub>), 115.7 (C<sub>8</sub>), 105.7 (C<sub>23</sub> & C<sub>26</sub>), 103.3 (C<sub>28</sub>), 71.7 (C<sub>20</sub>), 40.0 (C<sub>11</sub>), 24.1 (C<sub>10</sub>), 22.1 (C<sub>20</sub>), 14.0 (C<sub>1</sub>).

**HRMS (ESI+):** Calculated for C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 534,1671; Found: 534,1667.

**[5]:**1-(3,6-dibromo-9H-carbazol-9-yl)-3-(dimethylamino)propan-2-yl (1-(6-nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)ethyl) carbonate



Chemical Formula:  $C_{27}H_{25}Br_2N_3O_7$

Molecular Weight: 663.32

A round bottom flask was charged with 16 mg of wiskostatin **[16]** (0.038 mmol, 1 equiv), 4.5 mg of DMAP (0.038 mmol, 1.0 equiv) and 0.7 mL of dry DCM. To the solution was added 14 mg of **[172]** (0.038 mmol, 1.0 equiv) and the reaction was stirred at room temperature overnight. The reaction was quenched with a saturated solution of  $NaHCO_3$ , the product extracted with DCM, washed with brine, dried over  $MgSO_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (DCM/MeOH: 98/02) yielded 24 mg of product **[5]** as a yellow solid (yield: 95 %, dr: 55/45).

#### $^1H$ NMR (400 MHz, $CDCl_3$ )

**Diastereomer A:**  $\delta$  8.13 (dd,  $J = 2.0, 0.5$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 7.56 (dd,  $J = 8.7, 2.0$  Hz, 2H,  $H_3$ ), 7.46 (s, 1H,  $H_{16}$ ), 7.40 (dd,  $J = 8.7, 0.5$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 6.95 (s, 1H,  $H_{19}$ ), 6.11 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H,  $H_{20a}$ ), 6.10 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H,  $H_{20b}$ ), 6.01 (q,  $J = 6.4$  Hz, 1H,  $H_{13}$ ), 5.10 (dddd,  $J = 6.9, 6.6, 6.0, 4.4$  Hz, 1H,  $H_8$ ), 4.58 (dd,  $J = 15.3, 4.4$  Hz, 1H,  $H_{7a}$ ), 4.41 (dd,  $J = 15.3, 6.9$  Hz, 1H,  $H_{7b}$ ), 2.45 (d,  $J = 6.6$  Hz, 1H,  $H_{9a}$ ), 2.45 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H,  $H_{9b}$ ), 2.25 (s, 6H,  $H_{10}$ ), 1.39 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H,  $H_{12}$ ).

**Diastereomer B:**  $\delta$  8.08 (dd,  $J = 2.0, 0.5$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 7.52 (dd,  $J = 8.7, 2.0$  Hz, 2H,  $H_3$ ), 7.43 (s, 1H,  $H_{16}$ ), 7.37 (dd,  $J = 8.7, 0.5$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 6.63 (s, 1H,  $H_{19}$ ), 6.14 (q,  $J = 6.4$  Hz, 1H,  $H_{13}$ ), 6.14 (s, 2H,  $H_{20}$ ), 5.02 (dddd,  $J = 7.5, 7.0, 5.7, 3.6$  Hz, 1H,  $H_8$ ), 4.57 (dd,  $J = 15.5, 3.6$  Hz, 1H,  $H_{7a}$ ), 4.39 (dd,  $J = 15.5, 7.0$  Hz, 1H,  $H_{7b}$ ), 2.49 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H,  $H_{9a}$ ), 2.47 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1H,  $H_{9b}$ ), 2.30 (s, 6H,  $H_{10}$ ), 1.55 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H,  $H_{12}$ ).

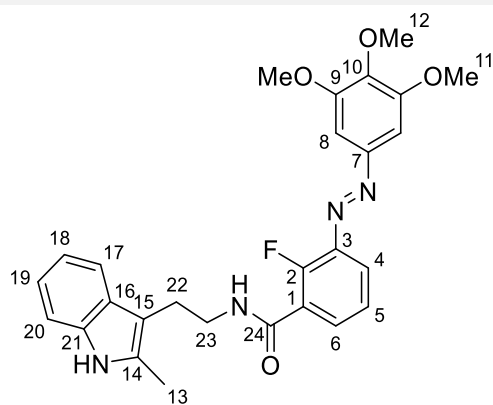
$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  153.4 & 153.4 (2s,  $C_{11}$ ), 152.6 & 152.5 (2s,  $C_{17}$ ), 147.5 & 147.5 (2s,  $C_{18}$ ), 141.6 & 141.4 (2s,  $C_{15}$ ), 139.9 ( $C_1$ ), 134.7 & 134.6 (2s,  $C_{14}$ ), 129.4 & 129.3 (2s,  $C_3$ ), 123.9 & 123.8 (2s,  $C_6$ ), 123.4 & 123.3 (2s,  $C_5$ ), 112.7 & 112.7 (2s,  $C_4$ ), 111.0 ( $C_2$ ), 105.9 ( $C_{19A}$ ), 105.4 & 105.4 (2s,  $C_{16}$ ), 105.3 ( $C_{19B}$ ), 103.4 & 103.2 (2s,  $C_{20}$ ), 75.5 & 74.9 (2s,  $C_8$ ), 72.6 & 72.5 (2s,  $C_{13}$ ), 60.0 & 59.9 (2s,  $C_9$ ), 46.3 & 46.3 (2s,  $C_{10}$ ), 45.0 & 45.0 (2s,  $C_7$ ), 22.2 & 21.9 (2s,  $C_{12}$ ).



### General procedure for the synthesis of products [6<sub>A</sub>], [6<sub>B</sub>], [6<sub>C</sub>] and [6<sub>D</sub>]:

A round bottom flask was charged with 20 mg of [179<sub>A,B,C or D</sub>] (0.059 mmol, 1.5 equiv), activated 4Å molecular sieves and 0.6 mL of dry DMF. To the solution were added 0.6 mL of a 0.06 M solution of HOBT (0.034 mmol, 0.6 equiv) in dry DMF, 10 µL of NEt<sub>3</sub> (0.069 mmol, 1.2 equiv), 12 µL of EDC (0.069 mmol, 1.2 equiv) and 10 mg of [162] (0.057 mmol, 1 equiv) and the reaction was heated to 40°C for 24 h. The reaction was quenched with a saturated solution of NaOAc, the product extracted with EtOAc, washed with a saturated solution of NaOAc and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The product [6<sub>A,B,C or D</sub>] was purified by column chromatography (EP/EtOAc: 60/40).

[6<sub>A</sub>]: 2-fluoro-N-(2-(2-methyl-1H-indole-3-yl)ethyl)-3-((3,4,5-trimethoxyphenyl)diazenyl)benzamide



Chemical Formula: C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

Molecular Weight: 490.54

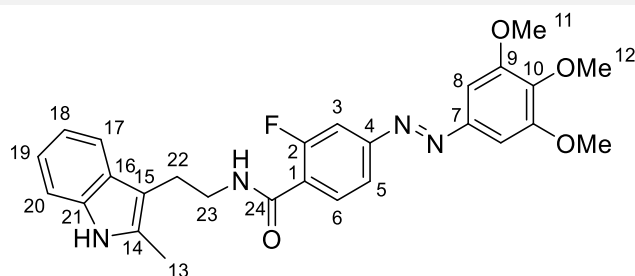
The product was isolated as an orange solid (yield: 46 %)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.19 (td, *J* = 7.5, 1.9 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.86 (s, 1H, NH indole), 7.82 (td, *J* = 7.7, 1.9 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.57 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, H<sub>17</sub>), 7.34 – 7.26 (m, 2H, H<sub>5</sub> & H<sub>20</sub>), 7.26 (s, 2H, H<sub>8</sub>), 7.13 (ddd, *J* = 8.1, 7.5, 1.3 Hz, 1H, H<sub>19</sub>), 7.09 (ddd, *J* = 7.5, 7.1, 1.3 Hz, 1H, H<sub>18</sub>), 6.95 – 6.82 (m, 1H, NH amide), 3.97 (s, 6H, H<sub>11</sub>), 3.95 (s, 3H, H<sub>12</sub>), 3.79 (td, *J* = 6.8, 6.5 Hz, 2H, H<sub>23</sub>), 3.09 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H<sub>22</sub>), 2.41 (s, 3H, H<sub>13</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 163.0 (C<sub>24</sub>), 157.8 (d, *J* = 258.0 Hz, C<sub>2</sub>), 153.7 (C<sub>9</sub>), 148.7 (C<sub>7</sub>), 141.6 (C<sub>10</sub>), 140.9 (d, *J* = 8.9 Hz, C<sub>3</sub>), 135.5 (C<sub>21</sub>), 134.2 (C<sub>6</sub>), 132.3 (C<sub>14</sub>), 128.6 (C<sub>16</sub>), 124.7 (C<sub>5</sub>), 123.1 (d, *J* = 10.9 Hz, C<sub>1</sub>), 121.4 (C<sub>19</sub>), 120.9 (C<sub>4</sub>), 119.6 (C<sub>18</sub>), 118.0 (C<sub>17</sub>), 110.4 (C<sub>20</sub>), 108.5 (C<sub>15</sub>), 101.1 (C<sub>8</sub>), 61.2 (C<sub>12</sub>), 56.4 (C<sub>11</sub>), 40.8 (C<sub>23</sub>), 24.3 (C<sub>22</sub>), 11.8 (C<sub>13</sub>).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** Calculated for C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 491.2089; Found: 491.2094.

**[6B]:** 2-fluoro-N-(2-(2-methyl-1H-indole-3-yl)ethyl)-4-((3,4,5-trimethoxyphenyl)diazenyl)benzamide



Chemical Formula: C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

Molecular Weight: 490.54

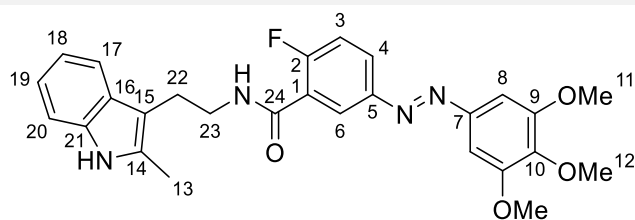
The product was isolated as a red solid (yield: 43 %)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.26 (t, J = 8.3 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.88 (s, 1H, NH indole), 7.80 (dd, J = 8.3, 1.8 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.57 (dd, J = 12.8, 1.8 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 7.56 (dd, J = 7.6, 1.2 Hz, 1H, H<sub>17</sub>), 7.30 (ddd, J = 8.0, 1.3, 0.8 Hz, 1H, H<sub>20</sub>), 7.27 (s, 2H, H<sub>8</sub>), 7.14 (ddd, J = 8.0, 7.2, 1.2 Hz, 1H, H<sub>19</sub>), 7.09 (ddd, J = 7.6, 7.2, 1.3 Hz, 1H, H<sub>18</sub>), 6.89 – 6.80 (m, 1H, NH amide), 3.97 (s, 6H, H<sub>11</sub>), 3.96 (s, 3H, H<sub>12</sub>), 3.78 (qd, J = 6.8, 1.2 Hz, 2H, H<sub>23</sub>), 3.07 (t, J = 6.8 Hz, 2H, H<sub>22</sub>), 2.41 (s, 3H, H<sub>13</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 162.9 (d, J = 3.5 Hz, C<sub>24</sub>), 161.0 (d, J = 248.8 Hz, C<sub>2</sub>), 155.5 (d, J = 8.0 Hz, C<sub>4</sub>), 153.7 (C<sub>9</sub>), 148.23 (C<sub>7</sub>), 141.8 (C<sub>10</sub>), 135.5 (C<sub>21</sub>), 132.8 (d, J = 2.8 Hz, C<sub>6</sub>), 132.3 (C<sub>14</sub>), 128.5 (C<sub>16</sub>), 122.5 (d, J = 12.6 Hz, C<sub>1</sub>), 121.3 (C<sub>19</sub>), 120.4 (d, J = 2.7 Hz, C<sub>5</sub>), 119.5 (C<sub>18</sub>), 118.0 (C<sub>17</sub>), 110.5 (C<sub>20</sub>), 108.8 (d, J = 26.8 Hz, C<sub>3</sub>), 108.4 (C<sub>15</sub>), 101.1 (C<sub>8</sub>), 61.2 (C<sub>12</sub>), 56.4 (C<sub>11</sub>), 40.7 (C<sub>23</sub>), 24.2 (C<sub>22</sub>), 11.7 (C<sub>13</sub>).

**HRMS (ESI+):** Calculated for C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 491.2089; Found: 491.2094.

**[6c]: 2-fluoro-N-(2-(2-methyl-1H-indole-3-yl)ethyl)-5-((3,4,5-trimethoxyphenyl)diazenyl)benzamide**



Chemical Formula: C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

Molecular Weight: 490.54

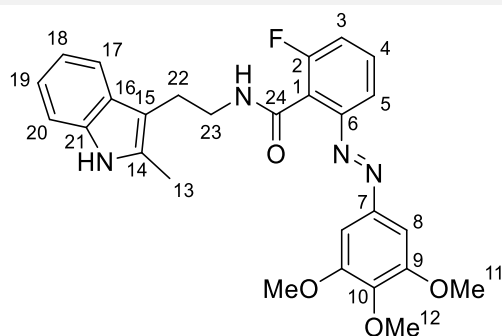
The product was isolated as an orange solid (yield: 29 %)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.66 (dd, J = 7.3, 2.6 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.98 (ddd, J = 8.7, 4.7, 2.6 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.86 (s, 1H, NH indole), 7.57 (dd, J = 7.7, 1.2 Hz, 1H, H<sub>17</sub>), 7.30 (ddd, J = 7.9, 1.3, 0.8 Hz, 1H, H<sub>20</sub>), 7.26 (s, 2H, H<sub>8</sub>), 7.20 (dd, J = 11.1, 8.7 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 7.14 (ddd, J = 7.9, 7.1, 1.2 Hz, 1H, H<sub>19</sub>), 7.09 (ddd, J = 7.7, 7.1, 1.3 Hz, 1H, H<sub>18</sub>), 6.84 – 6.76 (m, 1H, NH amide), 3.97 (s, 6H, H<sub>11</sub>), 3.94 (s, 3H, H<sub>12</sub>), 3.79 (qd, J = 6.8, 1.3 Hz, 2H, H<sub>23</sub>), 3.08 (t, J = 6.8 Hz, 2H, H<sub>22</sub>), 2.42 (s, 3H, H<sub>13</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 162.8 (C<sub>24</sub>), 161.5 (d, J = 248.8 Hz, C<sub>2</sub>), 153.7 (C<sub>9</sub>), 149.30 (C<sub>5</sub>), 148.3 (C<sub>7</sub>), 141.2 (C<sub>10</sub>), 135.5 (C<sub>21</sub>), 132.3 (C<sub>14</sub>), 128.6 (C<sub>16</sub>), 127.3 (d, J = 3.2 Hz, C<sub>6</sub>), 126.6 (d, J = 10.1 Hz, C<sub>4</sub>), 122.3 (d, J = 13.3 Hz, C<sub>1</sub>), 121.4 (C<sub>19</sub>), 119.6 (C<sub>18</sub>), 118.0 (C<sub>17</sub>), 117.0 (d, J = 26.8 Hz, C<sub>3</sub>), 110.5 (C<sub>20</sub>), 108.5 (C<sub>15</sub>), 100.8 (C<sub>8</sub>), 61.2 (C<sub>12</sub>), 56.4 (C<sub>11</sub>), 40.7 (C<sub>23</sub>), 24.2 (C<sub>22</sub>), 11.7 (C<sub>13</sub>).

**HRMS (ESI+):** Calculated for C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 491.2089; Found: 491.2095.

**[6o]:** 2-fluoro-N-(2-(2-methyl-1H-indole-3-yl)ethyl)-6-((3,4,5-trimethoxyphenyl)diazenyl)benzamide



Chemical Formula: C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

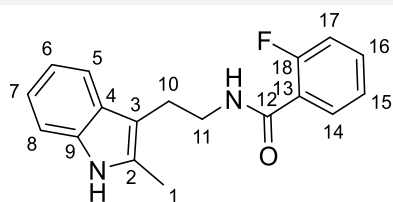
Molecular Weight: 490.54

The product was isolated as a red solid (yield: 29 %)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.80 (s, 1H, NH indole), 7.53 (ddd, J = 8.1, 1.1, 0.5 Hz, 1H, H<sub>17</sub>), 7.50 (dd, J = 8.0, 1.0 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.43 (td, J = 8.0, 5.7 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.23 (ddd, J = 7.9, 1.1, 0.5 Hz, 1H, H<sub>20</sub>), 7.21 (s, 2H, H<sub>8</sub>), 7.17 (ddd, J = 8.3, 8.0, 1.0 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 7.08 (ddd, J = 8.2, 7.1, 1.1 Hz, 1H, H<sub>19</sub>), 7.00 (ddd, J = 8.2, 7.1, 1.1 Hz, 1H, H<sub>18</sub>), 6.01 (t, J = 6.1 Hz, 1H, NH amide), 3.92 (s, 3H, H<sub>12</sub>), 3.88 (s, 6H, H<sub>11</sub>), 3.77 (q, J = 6.9 Hz, 2H, H<sub>23</sub>), 3.05 (t, J = 6.9 Hz, 2H, H<sub>22</sub>), 2.34 (s, 3H, H<sub>13</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 163.7 (C<sub>24</sub>), 159.7 (d, J = 249.5 Hz, C<sub>2</sub>), 153.6 (C<sub>9</sub>), 150.6 (d, J = 5.0 Hz, C<sub>6</sub>), 148.3 (C<sub>7</sub>), 141.6 (C<sub>10</sub>), 135.4 (C<sub>21</sub>), 132.2 (C<sub>14</sub>), 130.8 (d, J = 8.7 Hz, C<sub>4</sub>), 128.5 (C<sub>16</sub>), 124.7 (d, J = 19.5 Hz, C<sub>1</sub>), 121.2 (C<sub>19</sub>), 119.4 (C<sub>18</sub>), 117.8 (C<sub>5</sub>), 117.7 (d, J = 21.9 Hz, C<sub>3</sub>), 112.7 (d, J = 3.1 Hz, C<sub>17</sub>), 110.4 (C<sub>20</sub>), 108.2 (C<sub>15</sub>), 101.1 (C<sub>8</sub>), 61.2 (C<sub>12</sub>), 56.3 (C<sub>11</sub>), 40.7 (C<sub>23</sub>), 24.8 (C<sub>22</sub>), 11.6 (C<sub>13</sub>).

**HRMS (ESI+):** Calculated for C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 491.2089; Found: 491.2097.

**CK666 [14]:** 2-fluoro-N-(2-(2-methyl-1H-indole-3-yl)ethyl)benzamideChemical Formula: C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>FN<sub>2</sub>O

Molecular Weight: 296.35

A round bottom flask was charged with 162 mg of 2-methyltryptamine **[162]** (0.93 mmol, 1 equiv), 11 mg of DMAP (0.09 mmol, 10 % equiv) and 3.9 mL of dry DCM. To the solution were added 188  $\mu$ L of NEt<sub>3</sub> (1.39 mmol, 1.5 equiv) and 122  $\mu$ L of 2-fluorobenzyl chloride (1.02 mmol, 1.1 equiv) and the reaction was stirred at room temperature for 30 min. The reaction was quenched with a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl, the product extracted with DCM, washed with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> and with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/EtOAc: 80/20 to 70/30) yielded 306 mg of product **[14]** as white crystals (yield: 94 %).

Data matches literature data from Cournia, Z *et al.* **2012**, *ChemMedChem*, 7 (7), 1286-1294.

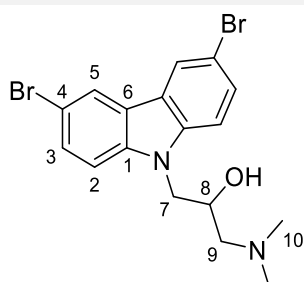
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  8.09 (td, *J* = 7.9, 1.9 Hz, 1H, H<sub>14</sub>), 7.92 (br s, 1H, NH indole), 7.55 (dd, *J* = 7.7, 0.6 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.42 (dddd, *J* = 8.3, 7.3, 5.2, 1.9 Hz, 1H, H<sub>16</sub>), 7.28 (ddd, *J* = 7.9, 1.2, 0.6 Hz, 1H, H<sub>8</sub>), 7.23 (ddd, *J* = 7.9, 7.3, 1.1 Hz, 1H, H<sub>15</sub>), 7.12 (dd, *J* = 7.9, 7.2 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 7.08 (ddd, *J* = 7.7, 7.2, 1.2 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.04 (ddd, *J* = 12.1, 8.3, 1.1 Hz, 1H, H<sub>17</sub>), 6.84 – 6.73 (m, 1H, NH amide), 3.74 (dtd, *J* = 6.8, 5.9, 1.3 Hz, 2H, H<sub>11</sub>), 3.04 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H<sub>10</sub>), 2.38 (s, 3H, H<sub>1</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  163.4 (C<sub>12</sub>), 160.7 (d, *J* = 247.4 Hz, C<sub>18</sub>), 135.5 (C<sub>9</sub>), 133.2 (d, *J* = 9.3 Hz, C<sub>16</sub>), 132.3 (C<sub>2</sub>), 132.1 (d, *J* = 2.1 Hz, C<sub>14</sub>), 128.5 (C<sub>4</sub>), 124.9 (d, *J* = 3.4 Hz, C<sub>15</sub>), 121.3 (C<sub>7</sub>), 121.3 (d, *J* = 11.5 Hz, C<sub>13</sub>), 119.5 (C<sub>6</sub>), 118.0 (C<sub>5</sub>), 116.0 (d, *J* = 24.8 Hz, C<sub>17</sub>), 110.4 (C<sub>8</sub>), 108.5 (C<sub>3</sub>), 40.6 (C<sub>11</sub>), 24.2 (C<sub>10</sub>), 11.7 (C<sub>1</sub>).

**Melting point:** 91.3°C

**HRMS (ESI+):** Calculated for C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>2</sub>O<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 297.1398; Found: 297.1397.

**Wiskostatin [16]:** 1-(3,6-dibromo-9H-carbazol-9-yl)-3-(dimethylamino)propan-2-ol



Chemical Formula:  $C_{17}H_{18}Br_2N_2O$

Molecular Weight: 426.15

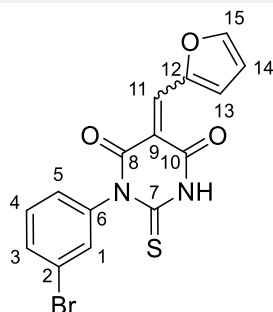
A round bottom flask was charged with 300 mg of **[182]** (0.78 mmol, 1 equiv), 166 mg of  $Na_2CO_3$  (1.57 mmol, 2.0 equiv), 24 mg of  $Yb(OTf)_3$  (0.039 mmol, 5 % equiv) and 8.0 mL of dry MeOH. To the solution was added 96 mg of  $Me_2NH_2Cl$  (1.18 mmol, 1.5 equiv) and the reaction was heated to 70°C overnight. The solution was filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (DCM/MeOH: 95/05) yielded 266 g of product **[16]** as white crystals (yield: 79 %).

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.12 (dd,  $J = 2.0, 0.5$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 7.55 (dd,  $J = 8.7, 2.0$  Hz, 2H,  $H_3$ ), 7.36 (dd,  $J = 8.7, 0.5$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 4.31 (dd,  $J = 15.2, 4.9$  Hz, 1H,  $H_{7a}$ ), 4.26 (dd,  $J = 15.2, 5.3$  Hz, 1H,  $H_{7b}$ ), 4.10 (dddd,  $J = 10.3, 5.3, 4.9, 3.7$  Hz, 1H,  $H_8$ ), 3.08 (br s, 1H, OH), 2.38 (dd,  $J = 12.0, 10.3$  Hz, 1H,  $H_{9a}$ ), 2.26 (dd,  $J = 12.0, 3.7$  Hz, 1H,  $H_{9b}$ ), 2.23 (s, 6H,  $H_{10}$ ).

$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  140.1 ( $C_1$ ), 129.3 ( $C_3$ ), 123.7 ( $C_6$ ), 123.3 ( $C_5$ ), 112.5 ( $C_4$ ), 111.2 ( $C_2$ ), 67.0 ( $C_8$ ), 62.9 ( $C_9$ ), 47.5 ( $C_7$ ), 45.5 ( $C_{10}$ ).

HRMS (ESI+): Calculated for  $C_{17}H_{19}Br_2N_2O^+$  [ $MH^+$ ]: 424.9859; Found: 424.9863.

**SMIFH2 [18]:** 1-(3-bromophenyl)-5-(furan-2-ylmethylene)-2-thioxodihydropyrimidine-4,6(1H,5H)-dione



Chemical Formula:  $C_{15}H_9BrN_2O_3S$

Molecular Weight: 377.21

A round bottom flask was charged with 152 mg of **[193]** (0.51 mmol, 1 eq and 11 mL of EtOH. To the solution were added 42  $\mu$ L of furfural (0.51 mmol, 1.0 equiv) and a couple drops of HCl 37% and the reaction was heated to 70°C for 7 h. The reaction was left to return to room temperature and a couple more drops of HCl 37% were added. The precipitate was filtered and washed with a 1 M solution of HCl, EtOH, DCM and pentane yielding 156 mg of product **[18]** as a yellow/green solid (yield: 81 %).

#### $^1\text{H}$ NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )

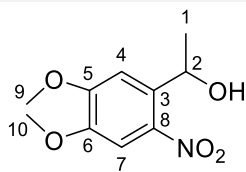
**Isomer A:**  $\delta$  12.83 (s, 1NH), 8.41 (d,  $J = 3.9$  Hz, 1H,  $H_{15}$ ), 8.34 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H,  $H_{13}$ ), 8.16 (s, 1H,  $H_{11}$ ), 7.62 (ddd,  $J = 8.0, 2.0, 1.0$  Hz, 1H,  $H_3$ ), 7.60 (dd,  $J = 2.0, 1.8$  Hz, 1H,  $H_1$ ), 7.44 (dd,  $J = 8.0, 7.9$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 7.35 (ddd,  $J = 7.9, 1.8, 1.0$  Hz, 1H,  $H_5$ ), 6.91 (ddd,  $J = 3.9, 1.5, 0.7$  Hz, 1H,  $H_{14}$ ).

**Isomer B:**  $\delta$  12.78 (s, 1NH), 8.61 (d,  $J = 3.9$  Hz, 1H,  $H_{15}$ ), 8.36 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H,  $H_{13}$ ), 8.07 (s, 1H,  $H_{11}$ ), 7.61 (ddd,  $J = 8.2, 2.1, 0.9$  Hz, 1H,  $H_3$ ), 7.57 (dd,  $J = 2.1, 1.8$  Hz, 1H,  $H_1$ ), 7.44 (dd,  $J = 8.2, 8.0$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 7.32 (ddd,  $J = 8.0, 1.8, 0.9$  Hz, 1H,  $H_5$ ), 6.99 (ddd,  $J = 3.9, 1.6, 0.8$  Hz, 1H,  $H_{14}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  179.4 & 179.3 (2s,  $C_7$ ), 161.9 & 160.5 (2s,  $C_8$ ), 159.9 & 159.0 (2s,  $C_{10}$ ), 152.5 & 152.4 (2s,  $C_{13}$ ), 150.5 & 150.4 (2s,  $C_{12}$ ), 140.7 & 140.4 (2s,  $C_6$ ), 138.3 & 138.0 (2s,  $C_{11}$ ), 132.1 & 132.0 (2s,  $C_1$ ), 131.2 ( $C_3$ ), 130.7 & 130.7 (2s,  $C_4$ ), 128.7 & 128.6 (2s,  $C_5$ ), 128.1 & 127.9 (2s,  $C_{15}$ ), 121.0 & 121.0 (2s,  $C_2$ ), 115.8 & 115.8 (2s,  $C_{14}$ ), 113.3 & 113.1 (2s,  $C_9$ ).

**HRMS (ESI+):** Calculated for  $C_{15}H_{10}BrN_2O_3S^+$  [ $MH^+$ ]: 376.959; Found: 376.9591.

**[36]:** 1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethan-1-ol



Chemical Formula: C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub>

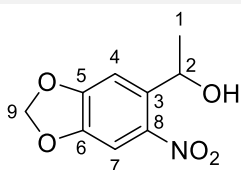
Molecular Weight: 227.22

A round bottom flask was charged with 1.0 g of 6-nitroveratraldehyde **[167]** (4.73 mmol, 1 equiv) and 10 mL of dry DCM. The solution was placed at 0°C and 3.5 mL of a 2 M Al(Me)<sub>3</sub> solution in toluene (7.10 mmol, 1.5 equiv) was added slowly. The reaction was left at room temperature overnight and was quenched carefully with a 1 M solution of NaOH. The product extracted with DCM, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and filtered. Evaporation of the solvent under reduced pressure yielded 1.01 g of product **[37]** as a light brown solid (yield: 94 %).

Data matches literature data from Chaudhuri, A *et al.* **2019**, *J. Org. Chem.*, *84* (18), 11441-11449.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.57 (s, 1H, H<sub>7</sub>), 7.31 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 5.58 (q, J = 6.2 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.00 (s, 3H, H<sub>9</sub>), 3.94 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 2.29 (br s, 1H, OH), 1.56 (d, J = 6.3 Hz, 3H, H<sub>1</sub>).

**[37]:** 1-(6-nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)ethan-1-ol



Chemical Formula: C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>5</sub>

Molecular Weight: 211.17

A round bottom flask was charged with 2.0 g of 6-nitropiperonal **[168]** (10.3 mmol, 1 equiv) and 20 mL of dry DCM. The solution was placed at 0°C and 7.7 mL of a 2 M Al(Me)<sub>3</sub> solution in toluene (15.4 mmol, 1.5 equiv) was added slowly. The reaction was left at room temperature overnight and was quenched carefully with a 1 M solution of NaOH. The product extracted with DCM, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and filtered. Evaporation of the solvent under reduced pressure yielded 2.03 g of product **[37]** as a light brown solid (yield: 88 %).

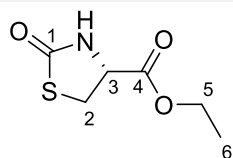
Data matches literature data from McGall, G. H. *et al.* **1997**, *JACS*, *119* (22), 5081-5090.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.46 (s, 1H, H<sub>7</sub>), 7.27 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 6.12 (d, J = 1.2 Hz, 1H, H<sub>9a</sub>), 6.11 (d, J = 1.2 Hz, 1H, H<sub>9b</sub>), 5.46 (qd, J = 6.2, 2.0 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 2.24 (d, J = 2.0 Hz, 1H, OH), 1.54 (d, J = 6.2 Hz, 3H, H<sub>1</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 152.5 (C<sub>6</sub>), 147.0 (C<sub>5</sub>), 141.6 (C<sub>8</sub>), 139.2 (C<sub>3</sub>), 106.5 (C<sub>4</sub>), 105.2 (C<sub>7</sub>), 103.1 (C<sub>9</sub>), 65.8 (C<sub>2</sub>), 24.3 (C<sub>1</sub>).



**[61]: Ethyl (R)-2-oxothiazolidine-4-carboxylate**



Chemical Formula: C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>S

Molecular Weight: 175.20

A round bottom flask was charged with 2.0 g (10.8 mmol, 1 equiv) of L-cysteine ethyl ester hydrochloride **[73]** and 40 mL of dry DCM. The solution was placed at 0°C and 1.9 mg of CDI (11.8 mmol, 1.1 equiv) was added. The reaction was stirred at 0°C for 3 h and quenched with water, the product was extracted with EtOAc and filtered over a tall silica pad, eluting with 3 volumes of EtOAc. After evaporation of the solvent under vacuum, 2.4 g of product **[61]** was isolated as a transparent viscous oil (yield: 85 %).

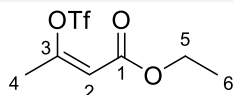
Data matches literature data from Fürstner, A. *et al.* **2007**, *Chem–Eur J.*, *13* (1), 115-134.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.29 (b, 1H, NH), 4.42 (ddd, J = 8.2, 5.3, 1.0 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 4.27 (q, J = 7.1 Hz, 2H, H<sub>5</sub>), 3.70 (dd, J = 11.4, 8.2 Hz, 1H, H<sub>2a</sub>), 3.62 (ddd, J = 11.4, 5.3, 0.5 Hz, 1H, H<sub>2b</sub>), 1.31 (t, J = 7.1 Hz, 3H, H<sub>6</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 174.6 (C<sub>1</sub>), 170.0 (C<sub>4</sub>), 62.6 (C<sub>5</sub>), 56.1 (C<sub>2</sub>), 31.9 (C<sub>2</sub>), 14.2 (C<sub>6</sub>).

[α<sub>D</sub>]<sup>25</sup> = - 51.1 (c 1.95, CHCl<sub>3</sub>) [Lit. -51.8 (c 3.14, CHCl<sub>3</sub>)].

**[82]: Ethyl (Z)-3-(((trifluoromethyl)sulfonyl)oxy)but-2-enoate**



Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>F<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S

Molecular Weight: 262.20

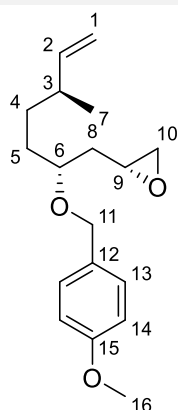
A round bottom flask was charged with 500  $\mu$ L of ethyl acetylacetate **[81]** (3.96 mmol, 1 equiv) and 20 mL of toluene. It was placed at 0°C and 5 mL of a saturated solution of LiOH was added. The mixture was stirred vigorously for 5 min and 1.6 mL of Tf<sub>2</sub>O (9.5 mmol, 2.4 equiv) was added slowly. The reaction was stirred at 0°C for 30 min and was diluted in EtOAc and water. The organic phase was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and filtered. Evaporation of the solvent under vacuum yielded 968 mg of the product **[82]** as a transparent oil (yield: 93 %).

Data matches literature data from Frantz, D. E. *et al.* **2008**, *Organic Letters*, 10 (13), 2901-2904.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  5.75 (q, J = 1.0 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.23 (q, J = 7.1 Hz, 2H, H<sub>5</sub>), 2.15 (d, J = 1.0 Hz, 3H, H<sub>4</sub>), 1.29 (t, J = 7.1 Hz, 3H, H<sub>6</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  162.4 (C<sub>1</sub>), 155.2 (C<sub>3</sub>), 118.4 (q, J = 319.7 Hz, CF<sub>3</sub>), 112.9 (C<sub>2</sub>), 61.3 (C<sub>5</sub>), 21.0 (C<sub>4</sub>), 14.1 (C<sub>6</sub>).

**[96]: (R)-2-((2R,5S)-2-((4-methoxybenzyl)oxy)-5-methylhept-6-en-1-yl)oxirane**



Chemical Formula: C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub>

Molecular Weight: 290.40

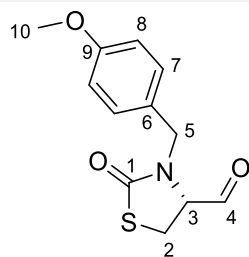
A round bottom flask was charged with 195 mg (1.15 mmol, 1 equiv) of **[101]** and 6.0 mL of dry DMF. The solution was placed at 0°C and 46 mg of NaH (60 % on mineral oil, 1.15 mmol, 1.0 equiv) was added. The solution was stirred at 0°C for 5 minutes and 198 μL of freshly prepared PMB-Br (1.37 mmol, 1.2 equiv) was added. The reaction was left at room temperature for 1h20 and quenched with a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl. The product was extracted with Et<sub>2</sub>O, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (pentane/Et<sub>2</sub>O: 90/10 to 80/20) yielded 261 mg of product **[96]** as a transparent oil (yield: 78 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** (major stereoisomer) δ 7.31 – 7.23 (m, 2H, H<sub>13</sub>), 6.91 – 6.84 (m, 2H, H<sub>14</sub>), 5.67 (ddd, J = 17.2, 10.3, 7.6 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.95 (ddd, J = 17.2, 1.9, 1.2 Hz, 1H, H<sub>1a</sub>), 4.91 (ddd, J = 10.3, 1.9, 0.9 Hz, 1H, H<sub>1b</sub>), 4.46 (d, J = 2.8 Hz, 2H, H<sub>11</sub>), 3.80 (s, 3H, H<sub>16</sub>), 3.59 – 3.50 (m, 1H, H<sub>6</sub>), 3.02 (dddd, J = 6.3, 5.3, 4.0, 2.7 Hz, 1H, H<sub>9</sub>), 2.74 (dd, J = 5.0, 4.0 Hz, 1H, H<sub>10a</sub>), 2.46 (dd, J = 5.0, 2.7 Hz, 1H, H<sub>10b</sub>), 2.14 – 2.02 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 1.82 (dt, J = 14.3, 6.3 Hz, 1H, H<sub>8a</sub>), 1.70 (dt, J = 14.3, 5.3 Hz, 1H, H<sub>8b</sub>), 1.65 – 1.53 (m, 2H, H<sub>5</sub>), 1.45 – 1.29 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 0.99 (d, J = 6.7 Hz, 3H, H<sub>7</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** (major stereoisomer) δ 159.3 (C<sub>15</sub>), 144.6 (C<sub>2</sub>), 130.9 (C<sub>12</sub>), 129.5 (C<sub>13</sub>), 113.9 (C<sub>14</sub>), 113.0 (C<sub>1</sub>), 76.5 (C<sub>6</sub>), 70.6 (C<sub>11</sub>), 55.4 (C<sub>16</sub>), 49.8 (C<sub>9</sub>), 47.0 (C<sub>10</sub>), 37.9 (C<sub>3</sub>), 37.0 (C<sub>8</sub>), 32.1 (C<sub>4</sub>), 31.7 (C<sub>5</sub>), 20.4 (C<sub>7</sub>).

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2931, 2860, 1736, 1638, 1611, 1585, 1512, 1455, 1418, 1343, 1300, 1244, 1172, 1070, 1033, 996, 911, 820, 753, 683.

**[97]: (R)-3-(4-methoxybenzyl)-2-oxothiazolidine-4-carbaldehyde**



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>S

Molecular Weight: 251.30

A round bottom flask was charged with 400 mg of **[121]** (1.58 mmol, 1 equiv) and 16 mL of dry DCM. The solution was placed at 0°C and 737 mg of DMP (1.74 mmol, 1.1 equiv) was added. The reaction was stirred at room temperature for 1h10 and quenched with a saturated solution of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The product was extracted with DCM, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/EtOAc: 50/50) yielded 305 mg of product **[97]** as a transparent viscous oil (yield: 77 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 9.49 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.19 – 7.15 (m, 2H, H<sub>7</sub>), 6.88 – 6.83 (m, 2H, H<sub>8</sub>), 4.85 (d, J = 14.8 Hz, 1H, H<sub>5a</sub>), 4.27 (d, J = 14.8 Hz, 1H, H<sub>5b</sub>), 4.04 (ddd, J = 9.0, 3.3, 1.8 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 3.79 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 3.47 (dd, J = 11.5, 9.0 Hz, 1H, H<sub>2a</sub>), 3.30 (dd, J = 11.5, 3.3 Hz, 1H, H<sub>2b</sub>).

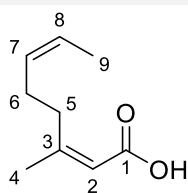
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 197.9 (C<sub>4</sub>), 171.7 (C<sub>1</sub>), 159.7 (C<sub>9</sub>), 130.1 (C<sub>7</sub>), 127.3 (C<sub>6</sub>), 114.5 (C<sub>8</sub>), 65.1 (C<sub>2</sub>), 55.4 (C<sub>10</sub>), 47.9 (C<sub>5</sub>), 26.4 (C<sub>2</sub>).

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 1661, 1610, 1511, 1440, 1393, 1372, 1302, 1244, 1172, 1109, 1028, 978, 840, 815, 663.

**HRMS (ESI+):** Calculated for C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>3</sub>S<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 252.0689; Found: 252.0694.

**[ $\alpha$ <sub>D</sub>]<sup>25</sup>** = – 31.3° (c 0.21, CHCl<sub>3</sub>).

**[98]:** (2Z,6Z)-3-methylocta-2,6-dienoic acid



Chemical Formula: C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>

Molecular Weight: 154.21

A round bottom flask was charged with 337 mg of **[118]** (1.85 mmol, 1 equiv), 1.9 mL of MeOH and 1.9 mL of water. To the solution was added 133 mg of LiOH (5.55 mmol, 3.0 equiv) and the reaction was stirred at room temperature for 64 h. The reaction was quenched with a 1 M solution of HCl, and the product was extracted with Et<sub>2</sub>O, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (pentane/Et<sub>2</sub>O: 92/08) yielded 235 mg of product **[98]** as a light-yellow oil (yield: 82 %).

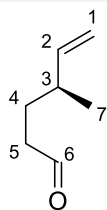
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 11.87 (br s, 1H, OH), 5.70 (tq, J = 1.4, 0.7 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 5.49 (dq, J = 11.1, 6.5, 1.3 Hz, 1H, H<sub>8</sub>), 5.41 (dtq, J = 11.1, 7.1, 1.6 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 2.73 – 2.63 (m, 2H, H<sub>6</sub>), 2.29 – 2.20 (m, 2H, H<sub>5</sub>), 1.94 (d, J = 1.4 Hz, 3H, H<sub>4</sub>), 1.62 (ddt, J = 6.5, 1.6, 0.8 Hz, 3H, H<sub>9</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171.9 (C<sub>1</sub>), 163.5 (C<sub>3</sub>), 129.5 (C<sub>7</sub>), 124.9 (C<sub>8</sub>), 116.0 (C<sub>2</sub>), 33.5 (C<sub>6</sub>), 25.8 (C<sub>4</sub>), 25.7 (C<sub>5</sub>), 12.8 (C<sub>9</sub>).

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3014, 2920, 1685, 1634, 1441, 1413, 1374, 1291, 1251, 1196, 1154, 1035, 927, 860, 703.

**HRMS (ESI+):** Calculated for C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 155.1067; Found: 155.1065.

**[99]: (S)-4-methylhex-5-enal**



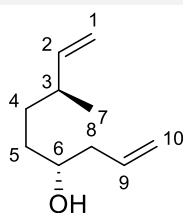
Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O

Molecular Weight: 112.17

A three-necked round bottom flask was charged with 120 mL of dry DCM and 2.6 mL (14.3 mmol, 1 equiv) of (+)- $\beta$ -citronellene **[74]** was added. The solution was placed at  $-78^{\circ}\text{C}$  and ozone was injected for 1h45. The reaction is followed by TCL until near full consumption of the starting material. To the reaction mixture were added 1.4 g of zinc dust (21.5 mmol, 1.5 equiv) and 4 mL of AcOH (70 mmol, 5 equiv) and the reaction was left at room temperature for 1 h. The reaction was quenched with a 1 M solution of NaOH, the product extracted with DCM, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. After purification by column chromatography (pentane/Et<sub>2</sub>O: 90/10), 637 mg of product **[99]** was isolated as a transparent oil (yield: 40 %).

Data matches literature data from Fürstner, A *et al. Tetrahedron*, **2004**, 60 (43), 9543-9558

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  9.76 (t, J = 1.7 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 5.63 (ddd, J = 17.1, 10.3, 7.8 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.98 (ddd, J = 17.1, 1.8, 1.1 Hz, 1H, H<sub>1a</sub>), 4.95 (ddd, J = 10.3, 1.8, 0.9 Hz, 1H, H<sub>1b</sub>), 2.19 – 2.11 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 1.72 – 1.64 (m, 2H, H<sub>5</sub>), 1.64 – 1.55 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 1.02 (d, J = 6.7 Hz, 3H, H<sub>7</sub>).

**[100]: (4R,7S)-7-methylnona-1,8-dien-4-ol**Chemical Formula: C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O

Molecular Weight: 154.25

A Schlenk flask was charged with 29 mg of [Ir(COD)Cl]<sub>2</sub> (0.04 mmol, 2.5 % equiv), 54 mg of (S)-SEGPPOS (0.09 mmol, 5 % equiv), 29 mg of 3-nitrobenzoic acid (0.18 mmol, 10 % equiv) and 114 mg of Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.35 mmol, 20 % equiv). The argon atmosphere was restored by a cycle of vacuum and argon and a solution of 200 mg of **[103]** (1.75 mmol, 1 equiv) and 1.9 mL of allyl acetate (17.5 mmol, 10 equiv) in 4 mL of distilled THF was added. The tube was sealed and the reaction heated to 100°C for 24 h. The solution was carefully concentrated under reduced pressure and purification by column chromatography (pentane/Et<sub>2</sub>O: 90/10) yielded 231 mg of product **[100]** as a light-yellow oil (yield: 86 %, dr: 93/7).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 5.82 (dddd, J = 17.6, 9.6, 7.9, 6.5 Hz, 1H, H<sub>9</sub>), 5.67 (ddd, J = 17.2, 10.3, 7.6 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 5.16 - 5.13 (m, 1H, H<sub>10a</sub>), 5.13 - 5.10 (m, 1H, H<sub>10b</sub>), 4.95 (ddd, J = 17.2, 1.9, 1.1 Hz, 1H, H<sub>1a</sub>), 4.92 (ddd, J = 10.3, 1.9, 0.9 Hz, 1H, H<sub>1b</sub>), 3.62 (m, 1H, H<sub>6</sub>), 2.37 - 2.24 (m, 1H, H<sub>8a</sub>), 2.21 - 2.05 (m, 2H, H<sub>8b</sub> & H<sub>3</sub>), 1.59 (d, J = 4.2 Hz, 1H, OH), 1.52 - 1.41 (m, 3H, H<sub>5</sub> & H<sub>4a</sub>), 1.38 - 1.24 (m, 1H, H<sub>4b</sub>), 1.00 (d, J = 6.7 Hz, 3H, H<sub>7</sub>).

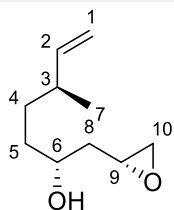
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 144.6 (C<sub>2</sub>), 135.0 (C<sub>9</sub>), 118.3 (C<sub>10</sub>), 112.9 (C<sub>1</sub>), 70.8 (C<sub>6</sub>), 42.1 (C<sub>8</sub>), 37.9 (C<sub>3</sub>), 34.5 (C<sub>5</sub>), 32.6 (C<sub>4</sub>), 20.4 (C<sub>7</sub>).

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3342, 3076, 2938, 2864, 1639, 1454, 1417, 1373, 1293, 993, 908, 680, 638.

**HRMS (ESI+):** Calculated for C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 155.1430; Found: 155.1432.

**[ $\alpha$ <sub>D</sub>]<sup>25</sup> = + 28.1 (c 0.274, CHCl<sub>3</sub>).**

**[101]: (2R,5S)-5-methyl-1-((R)-oxiran-2-yl)hept-6-en-2-ol**



Chemical Formula: C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>

Molecular Weight: 170.25

A round bottom flask was charged with 1.17 g (7.60 mmol, 1 equiv) of **[100]**, 15 mL of dry DCM and 350  $\mu$ L of V(O)(OiPr)<sub>3</sub> (1.52 mmol, 20 % equiv). The solution was placed at – 30°C and 3.3 mL of a 5 M solution of di-tert-butylperoxide in decane (16.7 mmol, 2.2 equiv) was added. The solution was stirred at – 30°C for 6 days and quenched with a saturated solution of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The product was extracted with DCM, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (pentane/Et<sub>2</sub>O: 85/15 to 60/40) yielded 269 g of product **[101]** as a transparent oil (yield: 82 %, dr: 83/17).

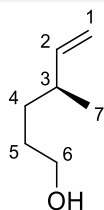
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (major stereoisomer)  $\delta$  5.67 (ddd, J = 17.2, 10.3, 7.7 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.96 (ddd, J = 17.2, 1.9, 1.2 Hz, 1H, H<sub>1a</sub>), 4.92 (ddd, J = 10.3, 1.9, 0.8 Hz, 1H, H<sub>1b</sub>), 3.92 – 3.83 (m, 1H, H<sub>6</sub>), 3.08 (dtd, J = 7.5, 4.1, 2.8 Hz, 1H, H<sub>9</sub>), 2.78 (dd, J = 4.8, 4.1 Hz, 1H, H<sub>10a</sub>), 2.50 (dd, J = 4.8, 2.8 Hz, 1H, H<sub>10b</sub>), 2.19 – 2.07 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 2.02 (d, J = 2.8 Hz, 1H, OH), 1.85 (ddd, J = 14.5, 6.7, 2.8 Hz, 1H, H<sub>8a</sub>), 1.55 – 1.40 (m, 4H, H<sub>8b</sub> & H<sub>5</sub> & H<sub>4a</sub>), 1.40 – 1.31 (m, 1H, H<sub>4b</sub>), 1.01 (d, J = 6.7 Hz, 3H, H<sub>7</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (major stereoisomer)  $\delta$  144.5 (C<sub>2</sub>), 113.1 (C<sub>1</sub>), 70.8 (C<sub>6</sub>), 50.8 (C<sub>9</sub>), 46.7 (C<sub>10</sub>), 39.9 (C<sub>8</sub>), 37.9 (C<sub>3</sub>), 35.2 (C<sub>5</sub>), 32.4 (C<sub>4</sub>), 20.5 (C<sub>7</sub>).

IR (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 3409, 2924, 2864, 2087, 1638, 1454, 1411, 1373, 1258, 1090, 995, 909, 829, 749, 682.

$[\alpha_D]^{25} = + 53.1$  (c 0.096, CHCl<sub>3</sub>).



**[103]: (S)-4-methylhex-5-en-1-ol**Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>O

Molecular Weight: 114.19

A three-necked round bottom flask was charged with 60 mL of dry DCM and 1.3 mL (7.14 mmol, 1 equiv) of (+)-beta-citronellene **[74]** was added. The solution was placed at - 78°C and ozone was injected for 55 min. The reaction was followed by TLC until near full consumption of the starting material. To the reaction mixture was added 570 mg of NaBH<sub>4</sub> (21.4 mmol, 3.0 equiv) and 5 mL of EtOH and the reaction was left at room temperature for 3h30. The reaction was quenched carefully with a 1 M solution of HCl, the product extracted with DCM, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (pentane/Et<sub>2</sub>O: 80/20) yielded 638 mg of product **[103]** as a transparent oil (yield: 78 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 5.68 (ddd, J = 17.2, 10.3, 7.6 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.96 (ddd, J = 17.2, 1.9, 1.2 Hz, 1H, H<sub>1a</sub>), 4.92 (ddd, J = 10.3, 1.9, 0.9 Hz, 1H, H<sub>1b</sub>), 3.63 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H<sub>6</sub>), 2.20 – 2.07 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 1.62 – 1.50 (m, 2H, H<sub>5</sub>), 1.41 – 1.29 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 1.00 (d, J = 6.7 Hz, 3H, H<sub>7</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 144.6 (C<sub>2</sub>), 112.9 (C<sub>1</sub>), 63.3 (C<sub>6</sub>), 37.8 (C<sub>3</sub>), 32.7 (C<sub>4</sub>), 30.6 (C<sub>5</sub>), 20.4 (C<sub>7</sub>).

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3320, 2077, 2932, 2867, 1639, 1454, 1418, 1373, 1288, 1203, 1056, 993, 908, 680.

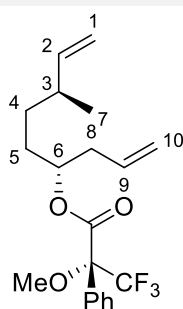
**[ $\alpha$ <sub>D</sub>]<sup>25</sup>** = + 13.1 (c 0.137, CHCl<sub>3</sub>).

### General procedure for Mosher esters [105+] and [105]:

A round bottom flask was charged with 50 mg of Mosher acid (+) or (-) (0.21 mmol, 1 equiv), 10 mL of n-hexane and 16  $\mu$ L of DMF (0.21 mmol, 1.0 equiv). To the solution was added 85  $\mu$ L of (COCl)<sub>2</sub> (1.0 mmol, 4.7 equiv) and the reaction was stirred at room temperature for 1 h. The opaque solution was filtered and evaporated under argon flow. The crude acyl chlorides were used as such in the next step.

Another round bottom flask was charged with 5 mg (0.03 mmol, 1 equiv) of **[100]**, 0.1 mL of dry DCM, ~1 mg of DMAP (0.008 mmol, 20 % equiv) and 10  $\mu$ L of NEt<sub>3</sub> (0.07 mmol, 2.2 equiv). The solution was placed at 0°C and 0.5 mL of a 0.1 M solution of the acyl chloride (0.05 mmol, 1.4 equiv) was added. The reaction was kept at 0°C for 1 h then left at room temperature for another 2 h. The solution was concentrated under reduced pressure and the product isolated by column chromatography (pentane/Et<sub>2</sub>O: 90/10).

**[105+]:** (4R,7S)-7-methylnona-1,8-dien-4-yl (R)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoate

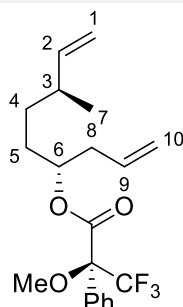


Chemical Formula: C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

Molecular Weight: 370.41

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.59 – 7.53 (m, 2H, H<sub>Ph</sub>), 7.41 – 7.35 (m, 3H, H<sub>Ph</sub>), 5.75 (ddt, J = 16.9, 10.5, 7.0 Hz, 1H, H<sub>9</sub>), 5.52 (ddd, J = 16.9, 10.6, 7.8 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 5.21 – 5.13 (m, 1H, H<sub>6</sub>), 5.13 – 5.07 (m, 2H, H<sub>10</sub>), 4.94 – 4.87 (m, 2H, H<sub>1</sub>), 3.56 (q, J = 1.3 Hz, 3H, H<sub>OMe</sub>), 2.45 – 2.33 (m, 2H, H<sub>8</sub>), 2.07 – 1.96 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 1.61 – 1.53 (m, 2H, H<sub>5</sub>), 1.21 – 1.12 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 0.91 (d, J = 6.7 Hz, 3H, H<sub>7</sub>).

**[105]:** (4R,7S)-7-methylnona-1,8-dien-4-yl (S)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoate

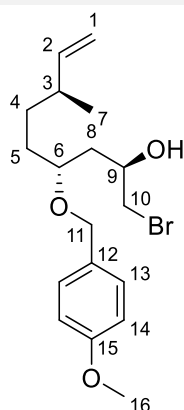


Chemical Formula: C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

Molecular Weight: 370.41

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.57 – 7.51 (m, 2H, H<sub>Ph</sub>), 7.43 – 7.37 (m, 3H, H<sub>Ph</sub>), 5.71 – 5.53 (m, 2H, H<sub>2</sub> & H<sub>9</sub>), 5.17 – 5.10 (m, 1H, H<sub>6</sub>), 5.07 – 4.98 (m, 2H, H<sub>10</sub>), 4.95 (ddd, J = 17.2, 1.8, 1.1 Hz, 1H, H<sub>1a</sub>), 4.93 (ddd, J = 10.3, 1.8, 0.9 Hz, 1H, H<sub>1b</sub>), 3.54 (q, J = 1.2 Hz, 3H, H<sub>OMe</sub>), 2.34 (ddt, J = 7.3, 6.3, 1.3 Hz, 2H, H<sub>8</sub>), 2.15 – 2.04 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 1.71 – 1.57 (m, 2H, H<sub>5</sub>), 1.38 – 1.25 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 0.97 (d, J = 6.7 Hz, 3H, H<sub>7</sub>).

**[116]: (2R,4R,7S)-1-bromo-4-((4-methoxybenzyl)oxy)-7-methylnon-8-en-2-ol**



Chemical Formula:  $C_{18}H_{27}BrO_3$

Molecular Weight: 371.32

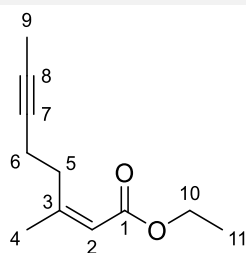
A round bottom flask was charged with 210 mg (0.72 mmol, 1 equiv) of **[96]** and 7.0 mL of dry THF. To this solution were added 188 mg of LiBr (2.17 mmol, 3 equiv) and 124  $\mu$ L of AcOH (2.17 mmol, 3equiv) and the reaction was stirred at room temperature overnight. The reaction was quenched with a saturated solution of  $NaHCO_3$ , the product was extracted with  $Et_2O$ , washed with brine, dried over  $MgSO_4$  and filtered. Evaporation of the solvent under vacuum yielded 216 mg of the product **[116]** as a transparent oil (yield: 81 %).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  7.27 – 7.22 (m, 2H,  $H_{13}$ ), 6.91 – 6.84 (m, 2H,  $H_{14}$ ), 5.68 (ddd,  $J = 17.2, 10.3, 7.6$  Hz, 1H,  $H_2$ ), 4.98 (ddd,  $J = 17.2, 1.9, 1.2$  Hz, 1H,  $H_{1a}$ ), 4.95 (ddd,  $J = 10.3, 1.9, 0.9$  Hz, 1H,  $H_{1b}$ ), 4.56 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H,  $H_{11a}$ ), 4.36 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H,  $H_{11b}$ ), 4.00 – 3.90 (m, 1H,  $H_9$ ), 3.80 (s, 3H,  $H_{16}$ ), 3.76 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, OH), 3.66 (ddt,  $J = 8.7, 6.5, 4.3$  Hz, 1H,  $H_6$ ), 3.37 (s, 1H,  $H_{10}$ ), 3.35 (d,  $J = 0.8$  Hz, 1H,  $H_{10b}$ ), 2.16 – 2.04 (m, 1H,  $H_3$ ), 1.79 (ddd,  $J = 14.5, 4.3, 3.6$  Hz, 1H,  $H_{8a}$ ), 1.72 (dd,  $J = 14.5, 8.7$  Hz, 1H,  $H_{8b}$ ), 1.68 – 1.51 (m, 2H,  $H_5$ ), 1.42 – 1.28 (m, 2H,  $H_4$ ), 1.01 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H,  $H_7$ ).

**$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  159.5 ( $C_{15}$ ), 144.4 ( $C_2$ ), 130.0 ( $C_{12}$ ), 129.7 ( $C_{13}$ ), 114.1 ( $C_{14}$ ), 113.2 ( $C_1$ ), 78.5 ( $C_6$ ), 70.9 ( $C_9$ ), 70.4 ( $C_{11}$ ), 55.4 ( $C_{16}$ ), 38.9 ( $C_8$ ), 38.9 ( $C_{10}$ ), 38.1 ( $C_{13}$ ), 31.3 ( $C_4$ ), 30.9 ( $C_5$ ), 20.4 ( $C_7$ ).

**HRMS (ESI+):** Calculated for  $C_{18}H_{28}BrO_3^+$  [ $MH^+$ ]: 371.1216; Found: 371.1207.

**[117]: Ethyl (Z)-3-methyloct-2-en-6-ynoate**



Chemical Formula: C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>

Molecular Weight: 180.25

A round bottom flask was charged with 519 mg of magnesium turnings (21.6 mmol, 3.3 equiv) and a few milligrams of iodine. The solids were stirred for 20 min and 2 mL of dry THF was added and heated to gentle reflux. A solution of 2.89 g of **[119]** (19.7 mmol, 3.0 equiv) in 20 mL of dry THF was added dropwise over 1h30. The reaction was heated to reflux for another 1h30. The obtained solution was left to cool to room temperature and used as such in the next step.

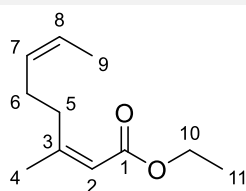
Another round bottom flask was charged with 350 mg of Fe(acac)<sub>3</sub> (0.99 mmol, 15 % equiv), 7.0 mL of dry THF and 1.74 g of **[82]** (6.62 mmol, 1 equiv). It was placed at -30°C and the solution of Grignard reagent was added. The reaction immediately turns brown/black and was stirred at -30°C for 30 min and quenched with a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl. The product was extracted with Et<sub>2</sub>O, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (pentane/Et<sub>2</sub>O: 100/0 to 98/02) yielded 824 mg of product **[117]** as a light-yellow oil (yield: 69 %).

Data matches literature data from Fürstner, A. *et al.* **2007**, *Chem–Eur J.*, *13* (1), 115-134.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 5.68 (tq, J = 1.4, 0.6 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.13 (q, J = 7.1 Hz, 2H, H<sub>10</sub>), 2.77 (td, J = 7.5, 0.6 Hz, 2H, H<sub>5</sub>), 2.32 (tq, J = 7.5, 2.6 Hz, 2H, H<sub>6</sub>), 1.93 (d, J = 1.4 Hz, 3H, H<sub>4</sub>), 1.75 (t, J = 2.6 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 1.26 (t, J = 7.1 Hz, 3H, H<sub>11</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 166.3 (C<sub>1</sub>), 158.8 (C<sub>3</sub>), 117.1 (C<sub>2</sub>), 78.5 (C<sub>7</sub>), 76.2 (C<sub>8</sub>), 59.7 (C<sub>10</sub>), 32.8 (C<sub>5</sub>), 25.8 (C<sub>4</sub>), 17.9 (C<sub>6</sub>), 14.4 (C<sub>11</sub>), 3.6 (C<sub>9</sub>).

**[118]: Ethyl (2Z,6Z)-3-methylocta-2,6-dienoate**



Chemical Formula: C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>

Molecular Weight: 182.26

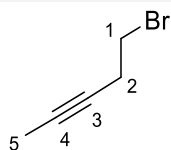
A round bottom flask was charged with 1.11 mL of BH<sub>3</sub>.SMe<sub>2</sub> (11.8 mmol, 1.0 equiv) and 35 mL of dry THF. The solution was placed at 0°C and 2.38 mL of cyclohexene (23.5 mmol, 2.0 equiv) was added dropwise. The reaction was kept at 0°C for 1h as a white suspension appears. This 0.3 M solution of Cy<sub>2</sub>BH was used as such.

Another round bottom flask was charged with 706 mg of **[117]** (3.92 mmol, 1 equiv) and 8.0 mL of dry THF. Successive cycles of additions of the 0.3 M Cy<sub>2</sub>BH solution followed by stirring at room temperature for 30 min were performed until full consumption of the starting material is observed by TLC. In total, 3 cycles of 10.0, 3.0 and 0.5 mL of addition were done (total 4.55 mmol, 1.16 equiv). To the reaction mixture was added 3 mL of AcOH (52 mmol, 13 equiv) and the reaction was left at room temperature for 1 h. The reaction was carefully quenched with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub>. The product was extracted with pentane, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (pentane/Et<sub>2</sub>O: 100/0 to 99/01) yielded 604 mg of product **[118]** as a light-yellow oil (yield: 72 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.66 (tq, J = 1.4, 0.7 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 5.51 – 5.37 (m, 2H, H<sub>8</sub> & H<sub>7</sub>), 4.14 (q, J = 7.1 Hz, 2H, H<sub>10</sub>), 2.72 – 2.63 (m, 2H, H<sub>6</sub>), 2.28 – 2.19 (m, 2H, H<sub>5</sub>), 1.89 (d, J = 1.4 Hz, 3H, H<sub>4</sub>), 1.62 (dtd, J = 5.0, 1.1, 0.5 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 1.27 (t, J = 7.1 Hz, 3H, H<sub>11</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.5 (C<sub>1</sub>), 159.9 (C<sub>3</sub>), 129.7 (C<sub>7</sub>), 124.6 (C<sub>8</sub>), 116.6 (C<sub>2</sub>), 59.6 (C<sub>10</sub>), 33.2 (C<sub>6</sub>), 25.7 (C<sub>5</sub>), 25.4 (C<sub>4</sub>), 14.5 (C<sub>11</sub>), 12.9 (C<sub>9</sub>).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 183.1380; Found: 183.1380.

**[119]:** 5-bromopent-2-yneChemical Formula: C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>Br

Molecular Weight: 147.02

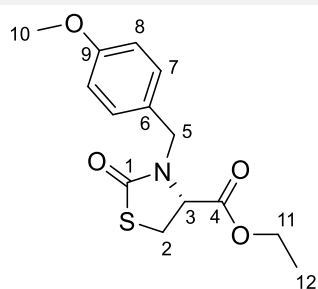
A round bottom flask was charged with 2.1 g of PPh<sub>3</sub> (8.3 mmol, 1.5 equiv), 20 mL of Et<sub>2</sub>O and 11 mL of ACN. The solution was placed at 0°C and 390 μL of Br<sub>2</sub> (7.6 mmol, 1.4 equiv) was added slowly. The solution was stirred at 0°C for 20 min and 500 μL (5.42 mmol, 1 equiv) of 3-pentyne-1-ol **[116]** and 554 mg of imidazole (8.3 mmol, 1.5 equiv) were added. The reaction was kept at 0°C for 30 min then left at room temperature for another 2 h. The solution was diluted with pentane and with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub>. The aqueous phase was extracted with pentane and the combined organic phases were filtered as OPPh<sub>3</sub> precipitates out, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered again and concentrated carefully under reduced pressure. The crude mixture was filtered over a silica pad eluting with pentane. After careful evaporation of the solvent, 1.26 g of product **[119]** was isolated as a transparent oil (yield: 94 %).

Data matches literature data from Fürstner, A. *et al.* **2013**, *Chem. – Eur J.*, 19 (39), 13047-13058

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.41 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 2.69 (tq, J = 7.4, 2.5 Hz, 2H, H<sub>2</sub>), 1.79 (t, J = 2.5 Hz, 3H, H<sub>5</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 78.1 (C<sub>4</sub>), 76.2 (C<sub>3</sub>), 30.5 (C<sub>1</sub>), 23.4 (C<sub>2</sub>), 3.6 (C<sub>5</sub>).

**[120]: Ethyl (R)-3-(4-methoxybenzyl)-2-oxothiazolidine-4-carboxylate**



Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>S

Molecular Weight: 295.35

A round bottom flask was charged with 1.9 g (11.0 mmol, 1 equiv) of **[61]** and 40 mL of dry THF. The solution was placed at 0°C and 438 mg of NaH (60 % on mineral oil, 10.9 mmol, 1.0 equiv) was added. The solution was stirred at 0°C for 5 minutes and 1.73 mL of freshly prepared PMB-Br (12.1 mmol, 1.1 equiv) was added. The reaction was left at room temperature overnight and quenched with a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl. The product was extracted with EtOAc, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/EtOAc: 80/20) yielded 2.52 g of product **[120]** as a transparent oil (yield: 72 %).

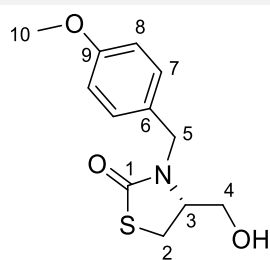
Data matches literature data from Fürstner, A *et al. Chem. - Eur. J.* **2007**, *13* (1), 115–134.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.18 – 7.12 (m, 2H, 2H<sub>7</sub>), 6.89 – 6.83 (m, 2H, H<sub>8</sub>), 5.08 (d, J = 14.8 Hz, 1H, H<sub>5a</sub>), 4.24 (q, J = 7.1 Hz, 2H, H<sub>11</sub>), 4.11 (dd, J = 8.5, 3.1 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 3.98 (d, J = 14.8 Hz, 1H, H<sub>5b</sub>), 3.79 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 3.48 (dd, J = 11.4, 8.5 Hz, 1H, H<sub>2a</sub>), 3.33 (dd, J = 11.4, 3.1 Hz, 1H, 1H<sub>2b</sub>), 1.30 (t, J = 7.1 Hz, 3H, H<sub>12</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.7 (C<sub>1</sub>), 170.1 (C<sub>4</sub>), 159.5 (C<sub>9</sub>), 129.9 (C<sub>7</sub>), 127.7 (C<sub>6</sub>), 114.4 (C<sub>8</sub>), 62.3 (C<sub>11</sub>), 59.4 (C<sub>3</sub>), 55.4 (C<sub>10</sub>), 47.4 (C<sub>5</sub>), 29.2 (C<sub>2</sub>), 14.3 (C<sub>12</sub>).

[α<sub>D</sub>]<sup>25</sup> = -92.5 (c 0.87, EtOH) [Lit. -96.7 (c 1.3, EtOH)].

**[121]: (R)-4-(hydroxymethyl)-3-(4-methoxybenzyl)thiazolidin-2-one**



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>S

Molecular Weight: 253.32

A round bottom flask was charged with 2.07 g (7.02 mmol, 1 equiv) of **[120]**, 40 mL of dry THF and 8 mL of dry EtOH. A first 510 mg of LiBH<sub>4</sub> (7.0 mmol, 1.0 equiv) was added and the solution was stirred vigorously for 30 minutes. A second addition of 510 mg of LiBH<sub>4</sub> (7.0 mmol, 1.0 equiv) was performed and the solution was stirred vigorously for another 30 minutes. The reaction was carefully quenched with a 1 M HCl solution and the product was extracted with EtOAc, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/EtOAc: 50/50) yielded 1.60 g of product **[121]** as white crystals (yield: 90 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.19-7.24 (m, 2H, 2H<sub>7</sub>), 6.85-6.90 (m, 2H, H<sub>8</sub>), 4.74 (d, J = 15.0 Hz, 1H, H<sub>5a</sub>), 4.26 (d, J = 15.0 Hz, 1H, H<sub>5b</sub>), 3.88 – 3.70 (m, 5H, H<sub>10</sub> & H<sub>4a</sub> & H<sub>3</sub>), 3.64 (ddd, J = 10.4, 6.5, 2.9 Hz, 1H, H<sub>4b</sub>), 3.30 (dd, J = 11.3, 7.4 Hz, 1H, H<sub>2a</sub>), 3.26 (dd, J = 11.3, 5.4 Hz, 1H, H<sub>2b</sub>), 1.50 (dd, J = 6.5, 4.6 Hz, 1H, OH).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 173.1 (C<sub>1</sub>), 159.3 (C<sub>9</sub>), 129.4 (C<sub>7</sub>), 128.4 (C<sub>6</sub>), 114.4 (C<sub>8</sub>), 61.1 (C<sub>4</sub>), 59.6 (C<sub>3</sub>), 55.4 (C<sub>10</sub>), 46.8 (C<sub>5</sub>), 28.0 (C<sub>2</sub>).

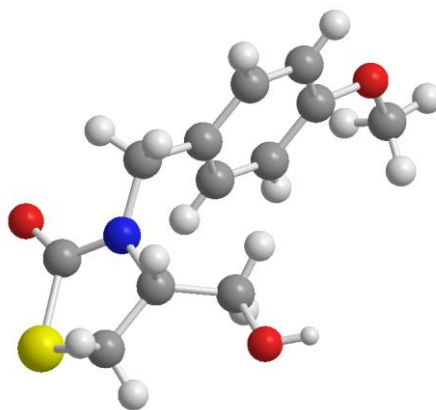
**Melting point:** 74.1°C

**[α<sub>D</sub>]<sup>25</sup>** = - 9.8 (c 1.14, CHCl<sub>3</sub>).

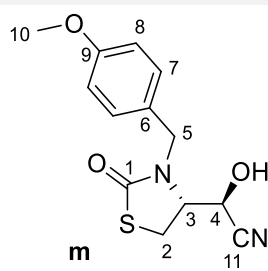
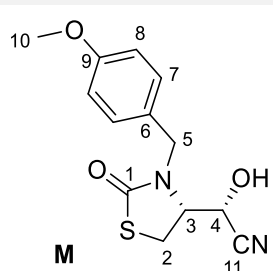


### Crystallographic structure:

Empirical formula	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub> S
Formula weight	253.31
Temperature/K	150.0
Crystal system	monoclinic
Space group	P2 <sub>1</sub>
a/Å	5.5075(16)
b/Å	5.6395(15)
c/Å	19.524(6)
α/°	90
β/°	93.936(9)
γ/°	90
Volume/Å <sup>3</sup>	605.0(3)
Z	2
ρ <sub>calc</sub> /cm <sup>3</sup>	1.391
μ/mm <sup>-1</sup>	0.263
F(000)	268.0
Crystal size/mm <sup>3</sup>	0.35 × 0.3 × 0.12
Radiation	MoKα (λ = 0.71073)
2θ range for data collection/°	4.182 to 54.916
Index ranges	-7 ≤ h ≤ 6, -7 ≤ k ≤ 7, -25 ≤ l ≤ 25
Reflections collected	9492
Independent reflections	2769 [R <sub>int</sub> = 0.0876, R <sub>sigma</sub> = 0.0987]
Data/restraints/parameters	2769/9/167
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.078
Final R indexes [I ≥ 2σ (I)]	R <sub>1</sub> = 0.0832, wR <sub>2</sub> = 0.2167
Final R indexes [all data]	R <sub>1</sub> = 0.1064, wR <sub>2</sub> = 0.2346
Largest diff. peak/hole / e Å <sup>-3</sup>	1.17/-0.51
Flack parameter	0.0 (3)



**[122]:** 2-hydroxy-2-((R)-3-(4-methoxybenzyl)-2-oxothiazolidin-4-yl)acetonitrile



Chemical Formula: C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S

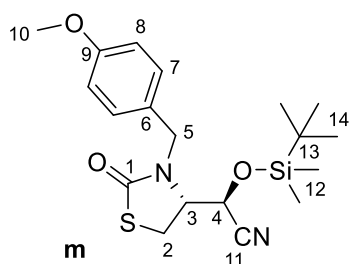
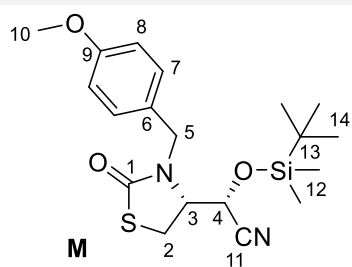
Molecular Weight: 278.33

A round bottom flask was charged with 363 mg of **[97]** (1.44 mmol, 1 equiv) and 5.0 mL of dry THF. To the solution was added 141 mg of KCN (2.17 mmol, 1.5 equiv) and 125  $\mu$ L of AcOH (2.17 mmol, 1.5 equiv) and the reaction was stirred at room temperature overnight. The reaction was carefully quenched with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub>, the product was extracted with EtOAc, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/EtOAc: 65/35) yielded 345 mg of product **[122]** as a transparent viscous oil (yield: 74 %, dr: 55/45).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  7.25 – 7.17 (m, 4H, H<sub>7M</sub> & H<sub>7m</sub>), 6.93 – 6.85 (m, 4H, H<sub>8M</sub> & H<sub>8m</sub>), 4.99 (d, J = 15.2 Hz, 0.9H, H<sub>5aM</sub>), 4.95 (d, J = 14.9 Hz, 1.1H, H<sub>5aM</sub>), 4.77 (dd, J = 6.9, 5.8, 1.1H, 1H<sub>4M</sub>), 4.72 (t, J = 4.9, 0.9H, 1H<sub>4m</sub>), 4.55 (d, J = 5.8 Hz, 1.1H, OH<sub>M</sub>), 4.34 (d, J = 4.9 Hz, 0.9H, OH<sub>m</sub>), 4.33 (d, J = 15.0 Hz, 1.1H, H<sub>5bM</sub>), 4.22 (d, J = 15.2 Hz, 0.9H, H<sub>5bM</sub>), 3.96 (ddd, J = 8.2, 6.9, 2.5 Hz, 1.1H, H<sub>3M</sub>), 3.92 (ddd, J = 6.9, 4.9, 4.9 Hz, 0.9H, H<sub>3m</sub>), 3.81 (s, 2.7H, H<sub>10m</sub>), 3.80 (s, 3.3H, H<sub>10M</sub>), 3.48 (dd, J = 12.1, 8.2 Hz, 1.1H, H<sub>2aM</sub>), 3.43 (d, J = 4.9 Hz, 0.9H, H<sub>2aM</sub>), 3.43 (d, J = 6.9 Hz, 0.9H, H<sub>2bM</sub>), 3.24 (dd, J = 12.1, 2.5 Hz, 1.1H, H<sub>2bM</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  173.4 (C<sub>1m</sub>), 172.9 (C<sub>1M</sub>), 159.8 & 159.7 (2s, C<sub>9M</sub> & C<sub>9m</sub>), 129.8 & 129.6 (2s, C<sub>7M</sub> & C<sub>7m</sub>), 127.6 & 127.2 (2s, C<sub>6M</sub> & C<sub>6m</sub>), 118.1 & 117.8 (2s, C<sub>11M</sub> & C<sub>11m</sub>), 114.7 & 114.6 (2s, C<sub>8M</sub> & C<sub>8m</sub>), 62.8 (C<sub>4M</sub>), 60.6 (C<sub>4m</sub>), 60.3 (C<sub>3m</sub>), 60.1 (C<sub>3M</sub>), 55.5 (C<sub>10M</sub> & C<sub>10m</sub>), 48.4 (C<sub>5M</sub>), 47.3 (C<sub>5m</sub>), 28.18 (C<sub>2M</sub>), 27.1 (C<sub>2m</sub>).

**[123]:** 2-((tert-butyldimethylsilyloxy)-2-((R)-3-(4-methoxybenzyl)-2-oxothiazolidin-4-yl)acetonitrile



Chemical Formula: C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>SSi

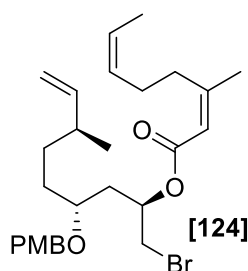
Molecular Weight: 392.59

A round bottom flask was charged with 265 mg (0.95 mmol, 1 equiv) of **[122]** and 9.5 mL of dry DCM. To the solution was added 78 mg of imidazole (1.14 mmol, 1.2 equiv) followed by 158 mg of TBSOTf (1.05 mmol, 1.1 equiv) and the reaction was stirred at room temperature overnight. The reaction was quenched with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub>, the product was extracted with DCM, washed with a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl and with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/EtOAc: 90/10 to 80/20) yielded 252 mg of product **[123]** as a transparent viscous oil (yield: 68 %).

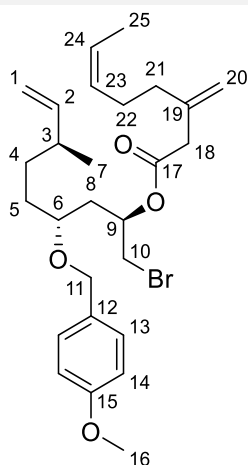
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.23 – 7.17 (m, 4H, H<sub>7M</sub> & H<sub>7'</sub>), 6.92 – 6.86 (m, 4H, H<sub>8M</sub> & H<sub>8'</sub>), 5.13 (d, J = 15.1 Hz, 0.9H, H<sub>5aM</sub>), 4.91 (d, J = 14.9 Hz, 1.1H, H<sub>5aM</sub>), 4.63 (d, J = 5.3 Hz, 0.9H, H<sub>4M</sub>), 4.57 (d, J = 6.3 Hz, 1.1H, H<sub>4M</sub>), 4.26 (d, J = 14.9 Hz, 1.1H, H<sub>5bM</sub>), 4.07 (d, J = 15.1 Hz, 0.9H, H<sub>5bM</sub>), 3.88 – 3.97 (m, 2H, H<sub>3M</sub> & H<sub>3m</sub>), 3.81 (s, 6H, H<sub>10M</sub> & H<sub>10m</sub>), 3.42 (dd, J = 12.1, 8.2 Hz, 1.1H, H<sub>2aM</sub>), 3.38 (dd, J = 11.7, 8.0 Hz, 0.9H, H<sub>2aM</sub>), 3.31 (dd, J = 11.7, 2.6 Hz, 0.9H, H<sub>2bM</sub>), 3.27 (dd, J = 12.1, 3.2 Hz, 1.1H, H<sub>2bM</sub>), 0.92 (s, 8.1H, H<sub>14M</sub>), 0.90 (s, 9.9H, H<sub>14M</sub>), 0.23 (s, 2.7H, H<sub>12aM</sub>), 0.17 (s, 3.3H, H<sub>12aM</sub>), 0.16 (s, 2.7H, H<sub>12bM</sub>), 0.10 (s, 3.3H, H<sub>12bM</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.1 (C<sub>1M</sub>), 171.8 (C<sub>1M</sub>), 159.8 (C<sub>9M</sub>), 159.7 (C<sub>9m</sub>), 129.7 (C<sub>7M</sub> & C<sub>7m</sub>), 127.8 (C<sub>6M</sub>), 127.5 (C<sub>6m</sub>), 118.6 (C<sub>11M</sub>), 117.6 (C<sub>11M</sub>), 114.6 (C<sub>8M</sub> & C<sub>8m</sub>), 63.3 (s), 61.1 (C<sub>4M</sub>), 60.5 (C<sub>4m</sub>), 60.4 (C<sub>2M</sub>), 55.5 (C<sub>2m</sub>), 55.4 (C<sub>10M</sub> & C<sub>10m</sub>), 48.1 (C<sub>5M</sub>), 47.0 (C<sub>5m</sub>), 27.7 (C<sub>3M</sub>), 27.3 (C<sub>3m</sub>), 25.6 (C<sub>14M</sub>), 25.5 (C<sub>14m</sub>), 18.2 (C<sub>13M</sub>), 18.1 (C<sub>13m</sub>), -5.0 (C<sub>12m</sub>), -5.3 (C<sub>12M</sub>).

Product **[124]** was never isolated pure and therefore will not be described here.



**[124<sub>iso</sub>]:** (2R,4R,7S)-1-bromo-4-((4-methoxybenzyl)oxy)-7-methylnon-8-en-2-yl (Z)-3-methylenehept-5-enoate



Chemical Formula: C<sub>27</sub>H<sub>39</sub>BrO<sub>4</sub>

Molecular Weight: 507.51

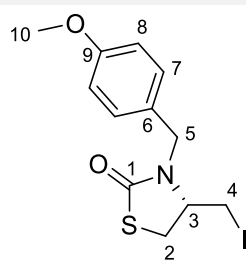
A round bottom flask was charged with 19 mg of **[98]** (0.12 mmol, 1.5 equiv) and 1.0 mL of dry DCM. The solution was placed at 0°C and 18 μL of S(O)Cl<sub>2</sub> (0.25 mmol, 3.0 equiv) was added. The reaction was kept at 0°C for 4h. Volatiles were evaporated under argon flow and the crude acyl chloride **[129]** used as such in the next step.

Another round bottom flask was charged with 29 mg of **[116]** (0.078 mmol, 1 equiv), 0.5 mL of dry DCM and 16 μL of NEt<sub>3</sub> (0.12 mmol, 3.0 equiv). A solution of the acyl chloride **[129]** in 0.5 mL of dry DCM was added slowly and the reaction was stirred overnight. The reaction was quenched with a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl. And the product was extracted with EtOAc, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/Et<sub>2</sub>O: 98/2 to 99/1) yielded 13 mg of product **[124<sub>iso</sub>]** as a light-yellow oil (yield: 33 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.27 – 7.22 (m, 2H, H<sub>13</sub>), 6.91 – 6.85 (m, 2H, H<sub>14</sub>), 5.66 (ddd, J = 17.2, 10.3, 7.7 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 5.51 – 5.43 (m, 1H, H<sub>24</sub>), 5.41 – 5.32 (m, 1H, H<sub>23</sub>), 5.12 (tdd, J = 6.5, 5.1, 4.0 Hz, 1H, H<sub>9</sub>), 4.99 – 4.89 (m, 4H, H<sub>1</sub> & H<sub>20</sub>), 4.45 (d, J = 11.2 Hz, 1H, H<sub>11a</sub>), 4.36 (d, J = 11.2 Hz, 1H, H<sub>11b</sub>), 3.80 (s, 3H, H<sub>16</sub>), 3.53 (dd, J = 11.1, 4.0 Hz, 1H, H<sub>10a</sub>), 3.45 – 3.38 (m, 1H, H<sub>6</sub>), 3.36 (dd, J = 11.1, 5.1 Hz, 1H, H<sub>10b</sub>), 3.09 – 2.97 (m, 2H, H<sub>18</sub>), 2.25 – 2.13 (m, 4H, H<sub>21</sub> & H<sub>22</sub>), 2.13 – 2.02 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 1.97 – 1.87 (m, 2H, H<sub>8</sub>), 1.61 (ddd, J = 6.7, 1.7, 0.9 Hz, 2H, H<sub>25</sub>), 1.58 – 1.46 (m, 2H, H<sub>5</sub>), 1.38 – 1.30 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 1.02 – 0.97 (m, 3H, H<sub>7</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 170.7 (C<sub>17</sub>), 159.2 (C<sub>15</sub>), 144.3 (C<sub>2</sub>), 141.8 (C<sub>19</sub>), 130.5 (C<sub>12</sub>), 129.6 (C<sub>23</sub>), 129.4 (C<sub>13</sub>), 124.4 (C<sub>24</sub>), 114.0 (C<sub>20</sub>), 113.9 (C<sub>14</sub>), 113.0 (C<sub>1</sub>), 74.7 (C<sub>6</sub>), 70.3 (C<sub>9</sub>), 70.0 (C<sub>11</sub>), 55.3 (C<sub>16</sub>), 42.0 (C<sub>18</sub>), 37.9 (C<sub>3</sub>), 36.4 (C<sub>8</sub>), 35.6 (C<sub>21</sub>), 34.6 (C<sub>10</sub>), 31.7 (C<sub>4</sub>), 31.0 (C<sub>5</sub>), 24.8 (C<sub>23</sub>), 20.3 (C<sub>7</sub>), 12.8 (C<sub>25</sub>).

**[135]: (S)-4-(iodomethyl)-3-(4-methoxybenzyl)thiazolidin-2-one**



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>INO<sub>2</sub>S

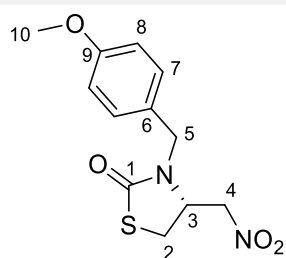
Molecular Weight: 363.21

A round bottom flask was charged with 621 mg of PPh<sub>3</sub> (2.37 mmol, 1.5 equiv) and 16 mL of dry DCM. The solution was placed at 0°C and 361 mL of I<sub>2</sub> (2.21 mmol, 1.4 equiv) was added portion-wise. The solution was stirred at 0°C for 20 min and 400 mg (1.57 mmol, 1 equiv) of **[121]** and 161 mg of imidazole (2.37 mmol, 1.5 equiv) were added. The reaction was kept at 0°C for 30 min then left at room temperature for another 2h30. The reaction was quenched with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub>, the product was extracted in EtOAc, washed with a 1 M solution of HCl and with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/EtOAc: 88/12 to 80/20) yielded 491 g of product **[135]** as a transparent oil (yield: 86 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.21 – 7.14 (m, 2H, H<sub>7</sub>), 6.91 – 6.85 (m, 2H, H<sub>8</sub>), 4.91 (d, J = 15.1 Hz, 1H, H<sub>5a</sub>), 4.01 (d, J = 15.1 Hz, 1H, H<sub>5b</sub>), 3.81 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 3.71 (dddd, J = 8.8, 7.7, 4.2, 2.9 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 3.38 (ddd, J = 11.4, 7.7, 0.8 Hz, 1H, H<sub>2a</sub>), 3.31 (dd, J = 10.5, 8.8 Hz, 1H, H<sub>4a</sub>), 3.25 (ddd, J = 10.5, 2.9, 0.8 Hz, 1H, H<sub>4b</sub>), 3.21 (dd, J = 11.4, 4.2 Hz, 1H, H<sub>2b</sub>).

**HRMS (ESI+):** Calculated for C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>INO<sub>2</sub>S<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 363.9862; Found: 363.9846.

**[136]: (R)-3-(4-methoxybenzyl)-4-(nitromethyl)thiazolidin-2-one**



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S

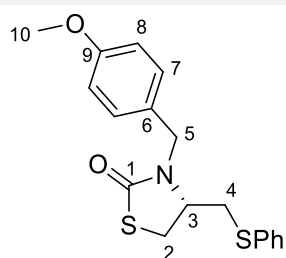
Molecular Weight: 282.31

A round bottom flask was charged with 92 mg of **[135]** (0.25 mmol, 1 equiv) and 2.5 mL of dry DFM. To the solution were added 35 mg of phloroglucinol (0.27 mmol, 1.1 equiv), 33 mg of urea (0.56 mmol, 2.2 equiv) and 38 mg of NaNO<sub>2</sub> (0.56 mmol, 2.2 equiv) and the reaction was stirred at room temperature for 2 days. The reaction was quenched with a saturated solution of NaOAc. The product was extracted with EtOAc, washed again with a saturated solution of NaOAc and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/EtOAc: 85/15 to 75/25) yielded 60 mg of product **[136]** as an off-white viscous oil (yield: 85 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.24 – 7.17 (m, 2H, H<sub>7</sub>), 6.93 – 6.86 (m, 2H, H<sub>8</sub>), 4.80 (d, J = 15.0 Hz, 1H, H<sub>5a</sub>), 4.59 (dd, J = 12.6, 8.8 Hz, 1H, H<sub>4a</sub>), 4.37 (ddd, J = 12.6, 3.7, 0.6 Hz, 1H, H<sub>4b</sub>), 4.32 (dddd, J = 8.8, 7.2, 3.7, 1.9 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 4.13 (d, J = 15.0 Hz, 1H, H<sub>5b</sub>), 3.81 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 3.54 (ddd, J = 11.9, 7.2, 0.5 Hz, 1H, H<sub>2a</sub>), 3.11 (dd, J = 11.9, 1.9 Hz, 1H, H<sub>2b</sub>).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub>S<sup>+</sup> [MNa<sup>+</sup>]: 305.0566; Found: 305.0558.

**[137]: (R)-3-(4-methoxybenzyl)-4-((phenylthio)methyl)thiazolidin-2-one**



Chemical Formula:  $C_{18}H_{19}NO_2S_2$

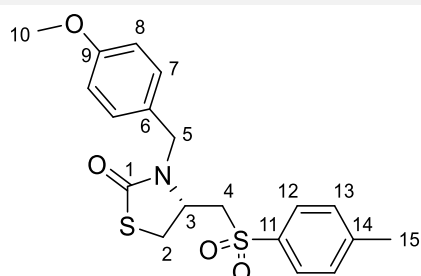
Molecular Weight: 345.48

A round bottom flask was charged with 240  $\mu$ L of  $PBU_3$  (0.95 mmol, 1.2 equiv) and 8.0 mL of dry THF. To the solution was added 207 mg of PhSSPh (0.95 mmol, 1.2 equiv) and the reaction was stirred for 1 h. To the phosphonium salt solution was added 200 mg of **[121]** (0.79 mmol, 1 equiv) and the reaction was heated to 50°C for another 40 h. The reaction was quenched with a 1 M solution of HCl, the product was extracted in EtOAc, washed with brine, dried over  $MgSO_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/EtOAc: 95/05 to 90/10) yielded 186 mg of product **[137]** as a white solid (yield: 75 %).

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.31 – 7.23 (m, 5H,  $H_{Ph}$ ), 7.08 – 6.99 (m, 2H,  $H_7$ ), 6.83 – 6.77 (m, 2H,  $H_8$ ), 4.86 (d,  $J$  = 15.0 Hz, 1H,  $H_{5a}$ ), 3.92 (d,  $J$  = 15.0 Hz, 1H,  $H_{5b}$ ), 3.79 (s, 3H,  $H_{10}$ ), 3.67 (dddd,  $J$  = 10.2, 7.5, 3.3, 3.1 Hz, 1H,  $H_3$ ), 3.37 (ddd,  $J$  = 11.3, 7.5, 1.0 Hz, 1H,  $H_{2a}$ ), 3.24 (dd,  $J$  = 11.3, 3.3 Hz, 1H,  $H_{2b}$ ), 3.14 (ddd,  $J$  = 13.8, 3.1, 1.0 Hz, 1H,  $H_{4a}$ ), 2.99 (dd,  $J$  = 13.8, 10.0 Hz, 1H,  $H_{4b}$ ).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): Calculated for  $C_{18}H_{20}NO_2S_2^+$  [ $MH^+$ ]: 346.0930; Found: 346.0926.

**[139]:** (S)-3-(4-methoxybenzyl)-4-(tosylmethyl)thiazolidin-2-one



Chemical Formula: C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>S<sub>2</sub>

Molecular Weight: 391.50

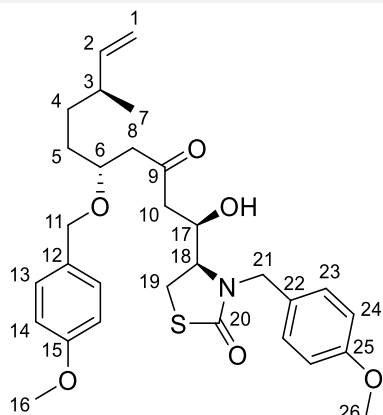
A round bottom flask was charged with 176 mg (0.48 mmol, 1 equiv) of **[135]** and 5.0 mL of dry DFM. To the solution were added 130 mg of sodium *p*-toluene sulfinate (0.73 mmol, 1.5 equiv) and 144  $\mu$ L of 15-crown-5 (0.73 mmol, 1.5 equiv) and the reaction was heated to 40°C overnight. The reaction was quenched with a saturated solution of NaOAc. The product was extracted with EtOAc, washed again with a saturated solution of NaOAc and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/EtOAc: 85/15 to 65/35) yielded 148 mg of product **[139]** as an off-white viscous oil (yield: 79 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.70 – 7.63 (m, 2H, H<sub>12</sub>), 7.36 – 7.31 (m, 2H, H<sub>13</sub>), 7.00 – 6.95 (m, 2H, H<sub>7</sub>), 6.78 – 6.74 (m, 2H, H<sub>8</sub>), 4.66 (d, J = 14.9 Hz, 1H, H<sub>5a</sub>), 4.06 (dddd, J = 10.1, 7.0, 1.9, 1.7 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 3.88 (d, J = 14.9 Hz, 1H, H<sub>5b</sub>), 3.77 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 3.48 (ddd, J = 11.7, 7.0, 1.0 Hz, 1H, H<sub>2a</sub>), 3.45 (dd, J = 14.3, 10.1 Hz, 1H, H<sub>4a</sub>), 3.35 (dd, J = 11.7, 1.9 Hz, 1H, H<sub>2b</sub>), 3.06 (ddd, J = 14.3, 1.7, 1.0 Hz, 1H, H<sub>4b</sub>), 2.45 (s, 3H, H<sub>15</sub>).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NNaO<sub>4</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> [MNa<sup>+</sup>]: 414.0804; Found: 414.0801.



**[141]:** (R)-4-((1R,5R,8S)-1-hydroxy-5-((4-methoxybenzyl)oxy)-8-methyl-3-oxodec-9-en-1-yl)-3-(4-methoxybenzyl)thiazolidin-2-one



Chemical Formula: C<sub>30</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>6</sub>S

Molecular Weight: 541.70

A round bottom flask was charged with 356 mg (1.23 mmol, 1 equiv) of **[145]** and 4.0 mL of dry DCM, 6.0 mL of dry Et<sub>2</sub>O and 430 μL of DiPEA (2.45 mmol, 2.0 equiv). The solution was placed at – 78°C and 1.35 mL of a 1M solution of Cy<sub>2</sub>BCl in hexanes (1.35 mmol, 1.1 equiv) was added slowly and the reaction was stirred at – 78°C for 30 min. The obtained suspension was added dropwise at – 78°C into a solution of 343 mg of **[97]** (1.36 mmol, 1.1 equiv) in 4.5 ml of dry DCM. The reaction was kept at – 78°C for 45 min before being quenched with a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl. The product was extracted in EtOAc, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and dried under reduced pressure. The product was purified by column chromatography (EP/EtOAc: 85/15 to 75/25) followed by washing with a saturated solution of NaHSO<sub>3</sub>. Evaporation of the solvent yielded 343 mg of product **[141]** as a transparent oil (yield: 55 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.24 – 7.19 (m, 2H, H<sub>13</sub>), 7.19 – 7.14 (m, 2H, H<sub>23</sub>), 6.88 – 6.84 (m, 2H, H<sub>14</sub>), 6.86 – 6.81 (m, 2H, H<sub>24</sub>), 5.66 (ddd, J = 17.2, 10.3, 7.6 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.96 (ddd, J = 17.2, 1.8, 1.2 Hz, 1H, H<sub>1a</sub>), 4.94 (ddd, J = 10.3, 1.8, 0.8 Hz, 1H, H<sub>1b</sub>), 4.78 (d, J = 14.9 Hz, 1H, H<sub>11a</sub>), 4.47 (d, J = 11.0 Hz, 1H, H<sub>21a</sub>), 4.34 (d, J = 11.0 Hz, 1H, H<sub>11b</sub>), 4.36 – 4.30 (m, 1H, H<sub>17</sub>), 3.96 (d, J = 14.9 Hz, 1H, H<sub>21b</sub>), 3.91 – 3.82 (m, 1H, H<sub>6</sub>), 3.81 – 3.78 (m, 1H, H<sub>18</sub>), 3.78 (s, 3H, H<sub>26</sub>), 3.76 (s, 3H, H<sub>16</sub>), 3.44 (d, J = 3.1 Hz, 1H, OH), 3.24 (dd, J = 11.9, 8.9 Hz, 1H, H<sub>19a</sub>), 3.06 (dd, J = 11.9, 3.0 Hz, 1H, H<sub>19b</sub>), 2.64 (dd, J = 15.2, 8.2 Hz, 1H, H<sub>8a</sub>), 2.59 (s, 1H, H<sub>10a</sub>), 2.58 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H<sub>10b</sub>), 2.44 (dd, J = 15.2, 4.4 Hz, 1H, H<sub>8b</sub>), 2.14 – 2.03 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 1.66 – 1.42 (m, 2H, H<sub>5</sub>), 1.37 – 1.27 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 1.00 (d, J = 6.7 Hz, 3H, H<sub>7</sub>).

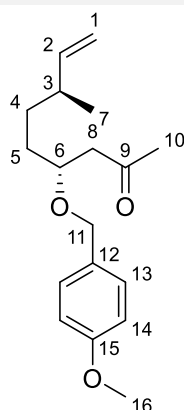
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 210.9 (C<sub>9</sub>), 172.2 (C<sub>20</sub>), 159.4 & 159.4 (2s, C<sub>15</sub> & C<sub>25</sub>), 144.3 (C<sub>2</sub>), 130.3 (C<sub>12</sub>), 129.7 (C<sub>23</sub>), 129.6 (C<sub>13</sub>), 128.4 (C<sub>22</sub>), 114.3 (C<sub>24</sub>), 114.0 (C<sub>14</sub>), 113.2 (C<sub>1</sub>), 75.5 (C<sub>6</sub>), 71.1 (C<sub>11</sub>), 66.6 (C<sub>17</sub>), 60.1 (C<sub>18</sub>), 55.4 & 55.4 (2s, C<sub>16</sub> & C<sub>26</sub>), 48.3 (C<sub>8</sub>), 47.3 (C<sub>21</sub>), 44.1 (C<sub>10</sub>), 37.9 (C<sub>3</sub>), 31.7 (C<sub>4</sub>), 31.5 (C<sub>5</sub>), 25.7 (C<sub>19</sub>), 20.4 (C<sub>7</sub>).

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 1667, 1610, 1511, 1398, 1302, 1245, 1216, 1199, 1174, 1108, 1065, 1031, 997, 912, 818.

**HRMS (ESI+):** Calculated for C<sub>30</sub>H<sub>40</sub>NO<sub>6</sub>S<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 542.2571; Found: 542.2575.

**[ $\alpha$ <sub>D</sub>]<sup>25</sup>** = – 49.3° (c 0.15, CHCl<sub>3</sub>).

**[145]: (4R,7S)-4-((4-methoxybenzyl)oxy)-7-methylnon-8-en-2-one**



Chemical Formula: C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub>

Molecular Weight: 290.40

A round bottom flask was charged with 110 mg of **[96]** (0.38 mmol, 1 equiv) and 4.0 mL of dry THF. The solution was placed at 0°C and 29 mg of LiAlH<sub>4</sub> (0.76 mmol, 2 equiv) was added and the reaction was stirred at 0°C for 1h15. The reaction was quenched carefully with 1 M NaOH, the product was extracted with Et<sub>2</sub>O, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and dried under reduced pressure. The crude was solubilized in 4.0 mL of dry DCM and placed at 0°C. 177 mg of DMP (0.42 mmol, 1.1 equiv) was added and the reaction was left at room temperature for 30 min. The reaction was quenched with a saturated solution of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, the product was extracted in DCM, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/Et<sub>2</sub>O: 85/15 to 80/20) yielded 87 mg of product **[145]** as a transparent oil (yield: 78 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.25 – 7.20 (m, 2H, H<sub>13</sub>), 6.89 – 6.84 (m, 2H, H<sub>14</sub>), 5.66 (ddd, J = 17.2, 10.3, 7.6 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.95 (ddd, J = 17.2, 1.9, 1.2 Hz, 1H, H<sub>1a</sub>), 4.91 (ddd, J = 10.3, 1.9, 0.9 Hz, 1H, H<sub>1b</sub>), 4.45 (d, J = 11.0 Hz, 1H, H<sub>11a</sub>), 4.41 (d, J = 11.0 Hz, 1H, H<sub>11b</sub>), 3.93 – 3.86 (m, 1H, H<sub>6</sub>), 3.79 (s, 3H, H<sub>16</sub>), 2.74 (dd, J = 15.8, 7.5 Hz, 1H, H<sub>8a</sub>), 2.48 (dd, J = 15.8, 4.9 Hz, 1H, H<sub>8b</sub>), 2.15 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 2.12 – 2.04 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 1.62 – 1.43 (m, 2H, H<sub>5</sub>), 1.40 – 1.28 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 0.98 (d, J = 6.7 Hz, 3H, H<sub>7</sub>).

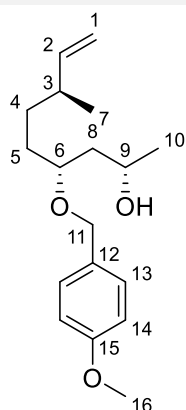
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 207.9 (C<sub>9</sub>), 159.3 (C<sub>15</sub>), 144.4 (C<sub>2</sub>), 130.8 (C<sub>12</sub>), 129.5 (C<sub>13</sub>), 113.9 (C<sub>14</sub>), 113.0 (C<sub>1</sub>), 75.4 (C<sub>6</sub>), 71.3 (C<sub>11</sub>), 55.4 (C<sub>16</sub>), 48.7 (C<sub>8</sub>), 37.9 (C<sub>3</sub>), 32.0 (C<sub>5</sub>), 31.9 (C<sub>4</sub>), 31.3 (C<sub>10</sub>), 20.4 (C<sub>7</sub>).

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 1712, 1612, 1512, 1355, 1301, 1245, 1172, 1065, 1033, 996, 910, 820, 732, 682, 636.

**HRMS (ESI+):** Calculated for C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 291.1955; Found: 291.1959.

**[α<sub>D</sub>]<sup>25</sup>** = – 8.1° (c 0.22, CHCl<sub>3</sub>).

**[146]:** (2S,4R,7S)-4-((4-methoxybenzyl)oxy)-7-methylnon-8-en-2-ol



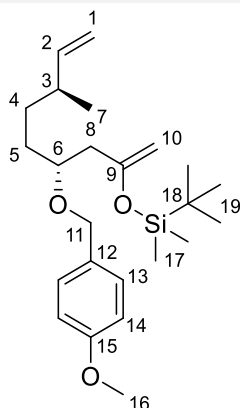
Chemical Formula:  $C_{18}H_{28}O_3$

Molecular Weight: 292.42

A round bottom flask was charged with 33 mg (0.11 mmol, 1 equiv) of **[96]** and 1.0 mL of dry THF. The solution was placed at 0°C and 8.6 mg of  $LiAlH_4$  (0.23 mmol, 2 equiv) was added and the reaction was stirred at 0°C for 1 h. The reaction was quenched carefully with 1 M NaOH, the product was extracted with  $Et_2O$ , washed with brine, dried over  $MgSO_4$ , filtered and dried under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/ $Et_2O$ : 80/20 to 60/40) yielded 26 mg of product **[146]** as a transparent oil (yield: 78 %).

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.27 – 7.23 (m, 2H,  $H_{13}$ ), 6.89 – 6.85 (m, 2H,  $H_{14}$ ), 5.68 (ddd,  $J = 17.2, 10.3, 7.6$  Hz, 1H,  $H_2$ ), 4.97 (ddd,  $J = 17.2, 1.9, 1.2$  Hz, 1H,  $H_{1a}$ ), 4.94 (ddd,  $J = 10.3, 1.9, 0.9$  Hz, 1H,  $H_{1b}$ ), 4.57 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H,  $H_{11a}$ ), 4.35 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H,  $H_{11b}$ ), 3.98 – 3.88 (m, 1H,  $H_9$ ), 3.79 (s, 3H,  $H_{16}$ ), 3.70 – 3.57 (m, 1H,  $H_6$ ), 2.16 – 2.04 (m, 1H,  $H_3$ ), 1.72 – 1.48 (m, 4H,  $H_8$  &  $H_5$ ), 1.41 – 1.23 (m, 2H,  $H_4$ ), 1.14 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H,  $H_{10}$ ), 1.01 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H,  $H_7$ ).

**[147]:** *tert*-butyl(((4*R*,7*S*)-4-((4-methoxybenzyl)oxy)-7-methylnona-1,8-dien-2-yl)oxy)dimethylsilane



Chemical Formula: C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>O<sub>3</sub>Si

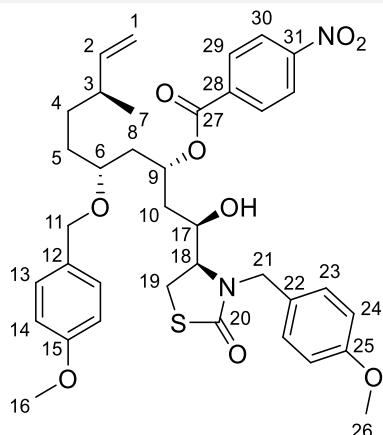
Molecular Weight: 404.67

A round bottom flask was charged with 266 mg of **[145]** (0.92 mmol, 1 equiv), 9 mL of dry DCM and 240  $\mu$ L of DiPEA (1.37 mmol, 1.5 equiv). The solution was placed at  $-78^{\circ}\text{C}$  and 211  $\mu$ L of TBSOTf (0.92 mmol, 1.0 equiv) was added dropwise. The reaction was stirred at  $-78^{\circ}\text{C}$  for 2 h and was quenched with a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl. The product was extracted with DCM, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/Et<sub>2</sub>O: 99/01 to 98/02) yielded 216 mg of product **[147]** as a transparent oil (yield: 58 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  7.29 – 7.25 (m, 2H, H<sub>13</sub>), 6.89 – 6.84 (m, 2H, H<sub>14</sub>), 5.67 (ddd,  $J = 17.2, 10.3, 7.5$  Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.94 (ddd,  $J = 17.2, 2.0, 1.1$  Hz, 1H, H<sub>1a</sub>), 4.90 (ddd,  $J = 10.3, 2.0, 0.9$  Hz, 1H, H<sub>1b</sub>), 4.52 (d,  $J = 11.1$  Hz, 1H, H<sub>11a</sub>), 4.41 (d,  $J = 11.1$  Hz, 1H, H<sub>11b</sub>), 4.11 (d, 0.8 Hz, 1H, H<sub>10a</sub>), 4.08 (d, 0.8 Hz, 1H, H<sub>10b</sub>), 3.80 (s, 3H, H<sub>16</sub>), 3.68 – 3.57 (m, 1H, H<sub>6</sub>), 2.40 (dd,  $J = 13.8, 6.2$  Hz, 1H, H<sub>8a</sub>), 2.10 (dd,  $J = 13.8, 6.8$  Hz, 1H, H<sub>8b</sub>), 2.13 – 2.00 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 1.61 – 1.40 (m, 3H, H<sub>5</sub> & H<sub>4a</sub>), 1.37 – 1.24 (m, 1H, H<sub>4b</sub>), 0.98 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H, H<sub>7</sub>), 0.92 (s, 9H, H<sub>19</sub>), 0.18 (s, 3H, H<sub>17a</sub>), 0.17 (s, 3H, H<sub>17b</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  159.2 (C<sub>15</sub>), 156.9 (C<sub>9</sub>), 144.8 (C<sub>1</sub>), 131.3 (C<sub>12</sub>), 129.5 (C<sub>13</sub>), 113.8 (C<sub>14</sub>), 112.7 (C<sub>2</sub>), 91.8 (C<sub>10</sub>), 76.4 (C<sub>6</sub>), 71.0 (C<sub>11</sub>), 55.4 (C<sub>16</sub>), 42.3 (C<sub>8</sub>), 37.9 (C<sub>3</sub>), 32.2 (C<sub>4</sub>), 31.9 (C<sub>5</sub>), 25.8 (C<sub>19</sub>), 20.4 (C<sub>7</sub>), 18.2 (C<sub>18</sub>), -4.5 & -4.7 (C<sub>17</sub>).

**[152]:** (1R,3R,5R,8S)-1-hydroxy-1-((R)-3-(4-methoxybenzyl)-2-oxothiazolidin-4-yl)-5-((4-methoxybenzyl)oxy)-8-methyldec-9-en-3-yl 4-nitrobenzoate



Chemical Formula: C<sub>37</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S

Molecular Weight: 692.82

A round bottom flask was charged with 67 mg (0.44 mmol, 1.2 equiv) of samarium dust. The argon atmosphere was restored by a cycle of vacuum and argon and 4.4 ml of distilled THF was added. To the solution was added 30  $\mu$ L of CH<sub>2</sub>I<sub>2</sub> (0.37 mmol, 1 equiv) and the reaction was stirred 15 min as the solution turns deep blue. This 0.1 M SmI<sub>2</sub> solution was used as such.

Another round bottom flask was charged with 82 mg (0.15 mmol, 1 equiv) of **[141]** and 97 mg of *para*-nitrobenzaldehyde (0.45 mmol, 3 equiv). The argon atmosphere was restored by a cycle of vacuum and argon and 1.5 mL of distilled THF was added. After full dissolution, 1.5 mL of the SmI<sub>2</sub> solution (0.15 mmol, 1.0 equiv) was added dropwise and the reaction was left at room temperature for 24 h. The reaction was quenched with a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl. The product was extracted in EtOAc, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and dried under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/EtOAc: 90/10 to 80/20) yielded 79 mg of product **[152]** as a yellow viscous oil (yield: 76 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  8.26 – 8.19 (m, 2H, H<sub>30</sub>), 8.10 – 8.02 (m, 2H, H<sub>29</sub>), 7.20 – 7.13 (m, 2H, H<sub>13</sub>), 7.11 – 7.02 (m, 2H, H<sub>23</sub>), 6.80 – 6.75 (m, 2H, H<sub>14</sub>), 6.75 – 6.69 (m, 2H, H<sub>24</sub>), 5.64 (ddd, J = 17.0, 10.5, 7.7 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 5.44 – 5.31 (m, 1H, H<sub>9</sub>), 4.90 (ddd, J = 17.4, 1.8, 1.1 Hz, 1H, H<sub>1a</sub>), 4.89 (ddd, J = 10.3, 1.8, 1.0 Hz, 1H, H<sub>1b</sub>), 4.77 (d, J = 14.9 Hz, 1H, H<sub>21a</sub>), 4.50 (d, J = 11.0 Hz, 1H, H<sub>11a</sub>), 4.28 (d, J = 11.0 Hz, 1H, H<sub>11b</sub>), 4.06 (d, J = 14.9 Hz, 1H, H<sub>21b</sub>), 3.79 – 3.76 (m, 2H, H<sub>18</sub> & H<sub>17</sub>), 3.74 (s, 3H, H<sub>16</sub>), 3.73 (s, 3H, H<sub>26</sub>), 3.63 – 3.58 (m, 1H, OH), 3.57 – 3.51 (m, 1H, H<sub>6</sub>), 3.23 (dd, J = 11.7, 8.6 Hz, 1H, H<sub>19a</sub>), 2.99 (dd, J = 11.7, 2.8 Hz, 1H, H<sub>19b</sub>), 2.16 – 2.01 (m, 2H, H<sub>8a</sub> & H<sub>3</sub>), 1.89 – 1.74 (m, 3H, H<sub>10</sub> & H<sub>8b</sub>), 1.63 – 1.50 (m, 2H, H<sub>5</sub>), 1.38 – 1.27 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 0.98 (d, J = 6.7 Hz, 3H, H<sub>7</sub>).

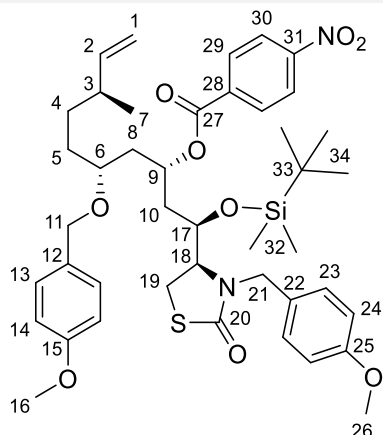
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172.4 (C<sub>20</sub>), 165.6 (C<sub>27</sub>), 159.3 & 159.3 (2s, C<sub>15</sub> & C<sub>25</sub>), 150.7 (C<sub>28</sub>), 144.2 (C<sub>2</sub>), 135.04(C<sub>31</sub>), 130.9 (C<sub>29</sub>), 130.1 (C<sub>12</sub>), 129.7 (C<sub>13</sub>), 129.4 (C<sub>23</sub>), 128.3 (C<sub>22</sub>), 123.6 (C<sub>30</sub>), 114.2 (C<sub>24</sub>), 113.8 (C<sub>14</sub>), 113.2 (C<sub>1</sub>), 75.4 (C<sub>6</sub>), 71.9 (C<sub>9</sub>), 70.2 (C<sub>11</sub>), 66.8 (C<sub>17</sub>), 61.2 (C<sub>18</sub>), 55.3 & 55.3 (2s, C<sub>16</sub> & C<sub>26</sub>), 47.6 (C<sub>21</sub>), 38.9 (C<sub>8</sub>), 37.9 (C<sub>3</sub>), 36.0 (C<sub>10</sub>), 31.4 (C<sub>4</sub>), 30.9 (C<sub>5</sub>), 26.0 (C<sub>19</sub>), 20.4 (C<sub>7</sub>).

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 1665, 1526, 1512, 1347, 1272, 1246, 1174, 1102, 1032, 1014, 908, 819, 720, 665.

**HRMS (ESI+):** Calculated for C<sub>37</sub>H<sub>45</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 693.2840; Found: 693.2831.

**[ $\alpha$ <sub>D</sub>]<sup>25</sup>** = - 51.6° (c 0.32, CHCl<sub>3</sub>).

**[153]** (1R,3S,5R,8S)-1-((tert-butyltrimethylsilyloxy)-1-((R)-3-(4-methoxybenzyl)-2-oxothiazolidin-4-yl)-5-((4-methoxybenzyl)oxy)-8-methyldec-9-en-3-yl 4-nitrobenzoate



Chemical Formula:  $C_{43}H_{58}N_2O_9SSi$

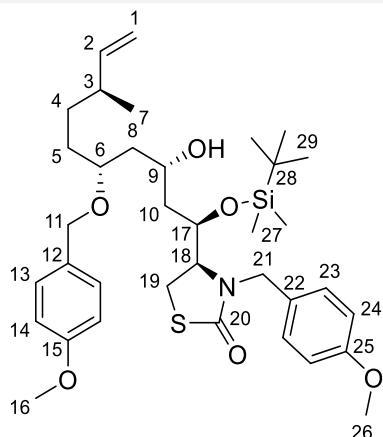
Molecular Weight: 807.09

A round bottom flask was charged with 20 mg (0.029 mmol, 1 equiv) of **[152]** and 0.3 mL of dry DCM. The solution was placed at 0°C and 5  $\mu$ L of 2,6 lutidine (0.032 mmol, 1.5 equiv) followed by 7.3  $\mu$ L of TBSOTf (0.032 mmol, 1.1 equiv) were added dropwise. The reaction was left at room temperature for 1 h and then quenched with a saturated solution of  $NH_4Cl$ . The product was extracted in DCM, washed with brine, dried over  $MgSO_4$ , filtered and dried under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/EtOAc: 95/05 to 90/10) yielded 18 mg of product **[153]** as a light-yellow viscous oil (yield: 73 %).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  8.30 – 8.25 (m, 2H,  $H_{30}$ ), 8.15 – 8.09 (m, 2H,  $H_{29}$ ), 7.19 – 7.15 (m, 2H,  $H_{13}$ ), 6.99 – 6.93 (m, 2H,  $H_{23}$ ), 6.80 – 6.74 (m, 4H,  $H_{14}$  &  $H_{24}$ ), 5.65 (ddd,  $J = 17.2, 10.3, 7.7$  Hz, 1H,  $H_2$ ), 5.44 – 5.33 (m, 1H,  $H_9$ ), 5.13 (d,  $J = 14.9$  Hz, 1H,  $H_{21a}$ ), 4.93 (ddd,  $J = 17.2, 1.9, 1.1$  Hz, 1H,  $H_{1a}$ ), 4.90 (ddd,  $J = 10.3, 1.9, 0.8$  Hz, 1H,  $H_{1b}$ ), 4.45 (d,  $J = 11.1$  Hz, 1H,  $H_{11a}$ ), 4.33 (d,  $J = 11.1$  Hz, 1H,  $H_{11b}$ ), 4.04 (dt,  $J = 7.5, 4.5$  Hz, 1H,  $H_{17}$ ), 3.76 & 3.75 (2s, 6H,  $H_{16}$  &  $H_{26}$ ), 3.66 – 3.60 (m, 1H,  $H_{18}$ ), 3.59 (d,  $J = 14.9$  Hz, 1H,  $H_{21b}$ ), 3.56 – 3.49 (m, 1H,  $H_6$ ), 3.22 (dd,  $J = 11.7, 4.4$  Hz, 1H,  $H_{19a}$ ), 3.16 (dd,  $J = 11.7, 9.1$  Hz, 1H,  $H_{19b}$ ), 2.15 (dt,  $J = 14.4, 6.8$  Hz, 1H,  $H_{8a}$ ), 2.10 – 2.03 (m, 1H,  $H_3$ ), 1.93 (dd,  $J = 7.2, 5.0$  Hz, 2H,  $H_{10}$ ), 1.80 (ddd,  $J = 14.4, 6.2, 4.9$  Hz, 1H,  $H_{8b}$ ), 1.64 – 1.54 (m, 2H,  $H_5$ ), 1.40 – 1.30 (m, 2H,  $H_4$ ), 0.99 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H,  $H_7$ ), 0.79 (s, 9H,  $H_{34}$ ), -0.09 – -0.12 (m, 3H,  $H_{32a}$ ), -0.33 – -0.39 (m, 3H,  $H_{32b}$ ).

**$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  172.7 ( $C_{20}$ ), 164.4 ( $C_{27}$ ), 159.6 & 159.2 (2s,  $C_{15}$  &  $C_{25}$ ), 150.7 ( $C_{28}$ ), 144.5 ( $C_2$ ), 135.9 ( $C_{31}$ ), 130.6 ( $C_{29}$ ), 130.5 ( $C_{12}$ ), 129.5 & 129.4 (2s,  $C_{13}$  &  $C_{23}$ ), 127.0 ( $C_{22}$ ), 123.8 ( $C_{30}$ ), 114.5 ( $C_{26}$ ), 113.8 ( $C_{14}$ ), 113.1 ( $C_1$ ), 75.2 ( $C_6$ ), 72.0 ( $C_9$ ), 69.7 ( $C_{11}$ ), 66.9 ( $C_{17}$ ), 59.8 ( $C_{18}$ ), 55.5 & 55.4 (2s,  $C_{16}$  &  $C_{26}$ ), 46.8 ( $C_{21}$ ), 39.4 ( $C_8$ ), 38.1 ( $C_3$ ), 35.4 ( $C_{10}$ ), 31.7 ( $C_4$ ), 31.1 ( $C_5$ ), 25.8 ( $C_{34}$ ), 24.6 ( $C_{19}$ ), 20.4 ( $C_7$ ), 18.0 ( $C_{33}$ ), -4.6 ( $C_{32}$ ), -5.0 ( $C_{32'}$ ).

**[154]:** (R)-4-((1R,3S,5R,8S)-1-((tert-butyldimethylsilyloxy)-3-hydroxy-5-((4-methoxybenzyl)oxy)-8-methyldec-9-en-1-yl)-3-(4-methoxybenzyl)thiazolidin-2-one



Chemical Formula: C<sub>36</sub>H<sub>55</sub>NO<sub>6</sub>SSi

Molecular Weight: 657.98

A round bottom flask was charged with 15 mg (0.022 mmol, 1 equiv) of **[152]** and 0.2 mL of dry DCM. The solution was placed at 0°C and 15 µL of 2,6 lutidine (0.1 mmol, 6 equiv) followed by 21 µL of TBSOTf (0.092 mmol, 4.2 equiv) were added dropwise. The reaction was left at room temperature for 1 h and then quenched with a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl. The product was extracted in DCM, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and dried under reduced pressure.

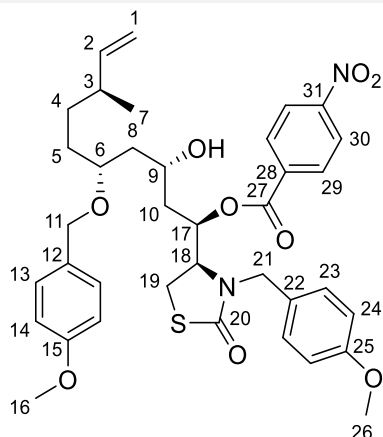
The crude mixture was solubilized in 0.2 mL of MeOH. 8 mg of NaOH (0.22 mmol, 10 equiv) was added and the reaction was stirred for 20min. The solution was diluted with EtOAc and water, the organic phase, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and dried under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/EtOAc: 90/10 to 85/15) yielded 10 mg of product **[154]** as a light-yellow viscous oil (yield: 69 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.28 – 7.24 (m, 2H, H<sub>13</sub>), 7.22 – 7.18 (m, 2H, H<sub>23</sub>), 6.91 – 6.88 (m, 2H, H<sub>14</sub>), 6.88 – 6.84 (m, 2H, H<sub>24</sub>), 5.68 (ddd, J = 17.2, 10.3, 7.6 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 5.10 (d, J = 14.9 Hz, 1H, H<sub>21a</sub>), 4.98 (ddd, J = 17.2, 1.9, 1.2 Hz, 1H, H<sub>1a</sub>), 4.95 (ddd, J = 10.3, 1.9, 0.9 Hz, 1H, H<sub>1b</sub>), 4.59 (d, J = 11.1 Hz, 1H, H<sub>11a</sub>), 4.36 (d, J = 11.0 Hz, 1H, H<sub>11b</sub>), 4.36 – 4.32 (m, 1H, H<sub>17</sub>), 3.81 (s, 3H, H<sub>26</sub>), 3.79 (s, 3H, H<sub>16</sub>), 3.80 – 3.78 (m, 1H, H<sub>9</sub>), 3.77 (d, J = 14.9 Hz, 1H, H<sub>21b</sub>), 3.70 – 3.59 (m, 2H, H<sub>6</sub> & H<sub>18</sub>), 3.58 (s, 1H, OH), 3.25 (dd, J = 11.5, 5.1 Hz, 1H, H<sub>19a</sub>), 3.13 (dd, J = 11.5, 9.1 Hz, 1H, H<sub>19b</sub>), 2.16 – 2.06 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 1.75 – 1.45 (m, 6H, H<sub>10</sub> & H<sub>8</sub> & H<sub>5</sub>), 1.42 – 1.21 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 1.02 (d, J = 6.7 Hz, 3H, H<sub>7</sub>), 0.80 (s, 9H, H<sub>29</sub>), 0.02 (s, 3H, H<sub>27a</sub>), -0.22 (s, 3H, H<sub>27b</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172.6 (C<sub>20</sub>), 159.5 (C<sub>15</sub> & C<sub>25</sub>), 144.5 (C<sub>2</sub>), 130.2 (C<sub>12</sub>), 129.9 (C<sub>23</sub>), 129.7 (C<sub>13</sub>), 127.9 (C<sub>22</sub>), 114.3 (C<sub>24</sub>), 114.1 (C<sub>14</sub>), 113.2 (C<sub>1</sub>), 79.8 (C<sub>6</sub>), 70.2 (C<sub>11</sub>), 67.4 (C<sub>9</sub>), 66.3 (C<sub>17</sub>), 60.2 (C<sub>18</sub>), 55.5 & 55.4 (2s, C<sub>16</sub> & C<sub>26</sub>), 46.3 (C<sub>21</sub>), 42.1 (C<sub>8</sub>), 38.2 (C<sub>3</sub>), 38.1 (C<sub>10</sub>), 31.2 (C<sub>4</sub>), 30.9 (C<sub>5</sub>), 25.9 (C<sub>29</sub>), 24.9 (C<sub>19</sub>), 20.4 (C<sub>7</sub>), 18.0 (C<sub>28</sub>), -4.8 (C<sub>27</sub>), -4.9 (C<sub>27</sub>).



**[142]:** (1R,3S,5R,8S)-3-hydroxy-1-((R)-3-(4-methoxybenzyl)-2-oxothiazolidin-4-yl)-5-((4-methoxybenzyl)oxy)-8-methyldec-9-en-1-yl 4-nitrobenzoate



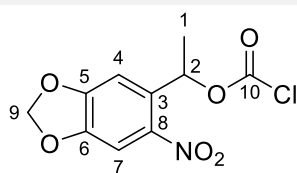
Chemical Formula: C<sub>37</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S

Molecular Weight: 692.82

A round bottom flask was charged with 17 mg (0.031 mmol, 1 equiv) of **[141]** and 24 mg of *para*-nitrobenzaldehyde (0.157 mmol, 5 equiv). The argon atmosphere was restored by a cycle of vacuum and argon and 0.3 mL of distilled THF was added. The reaction was placed at 0°C and 30 μL of a freshly prepared Sml<sub>2</sub> solution (0.003 mmol, 10 % equiv) was added and the reaction was left at room temperature for 5 h. The reaction was quenched with a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl. The product was extracted in EtOAc, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and dried under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/EtOAc: 85/15 to 80/20) yielded 16 mg of product **[142]** as a mixture with residual amounts of **[152]** (yield: 71 %). This experiment was never successfully reproduced and it was the only time **[142]** was obtained somewhat pure.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.30 – 8.26 (m, 2H, H<sub>30</sub>), 8.19 – 8.13 (m, 2H, H<sub>29</sub>), 7.35 – 7.29 (m, 2H, H<sub>23</sub>), 7.19 – 7.16 (m, 2H, H<sub>13</sub>), 6.92 – 6.86 (m, 2H, H<sub>24</sub>), 6.77 – 6.74 (m, 2H, H<sub>14</sub>), 5.82 (ddd, J = 10.6, 4.0, 2.0 Hz, 1H, H<sub>17</sub>), 5.65 (ddd, J = 17.2, 10.3, 7.6 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 5.07 (d, J = 14.9 Hz, 1H, H<sub>21a</sub>), 4.95 (ddd, J = 17.2, 1.9, 1.2 Hz, 1H, H<sub>1a</sub>), 4.92 (ddd, J = 10.3, 1.9, 0.9 Hz, 1H, H<sub>1b</sub>), 4.54 (d, J = 11.1 Hz, 1H, H<sub>11a</sub>), 4.30 (d, J = 11.1 Hz, 1H, H<sub>11b</sub>), 4.06 – 4.01 (m, 1H, H<sub>18</sub>), 4.02 (d, J = 14.9 Hz, 1H, H<sub>21b</sub>), 3.79 (s, 3H, H<sub>26</sub>), 3.78 – 3.76 (m, 1H, H<sub>9</sub>), 3.75 (s, 3H, H<sub>16</sub>), 3.71 (br s, 1H, OH), 3.67 – 3.58 (m, 1H, H<sub>6</sub>), 3.30 (dd, J = 11.6, 8.8 Hz, 1H, H<sub>19a</sub>), 3.21 (dd, J = 11.6, 3.3 Hz, 1H, H<sub>19b</sub>), 2.15 – 2.03 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 1.97 – 1.78 (m, 2H, H<sub>10</sub>), 1.78 – 1.68 (m, 1H, H<sub>8a</sub>), 1.66 – 1.48 (m, 3H, H<sub>8b</sub> & H<sub>5</sub>), 1.39 – 1.27 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 0.99 (d, J = 6.7 Hz, 3H, H<sub>7</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.0 (C<sub>20</sub>), 164.0 (C<sub>27</sub>), 159.6 & 159.4 (2s, C<sub>15</sub> & C<sub>25</sub>), 150.9 (C<sub>31</sub>), 144.3 (C<sub>2</sub>), 135.1 (C<sub>28</sub>), 130.9 (C<sub>29</sub>), 130.1 (C<sub>23</sub>), 130.0 (C<sub>12</sub>), 129.5 (C<sub>13</sub>), 127.9 (C<sub>22</sub>), 123.8 (C<sub>30</sub>), 114.4 (C<sub>24</sub>), 114.0 (C<sub>14</sub>), 113.2 (C<sub>1</sub>), 79.1 (C<sub>6</sub>), 70.7 (C<sub>17</sub>), 69.9 (C<sub>11</sub>), 67.3 (C<sub>9</sub>), 57.6 (C<sub>18</sub>), 55.4 & 55.3 (2s, C<sub>16</sub> & C<sub>26</sub>), 46.9 (C<sub>21</sub>), 41.4 (C<sub>8</sub>), 38.01 (C<sub>3</sub>), 35.9 (C<sub>10</sub>), 31.2 (C<sub>4</sub>), 30.8 (C<sub>5</sub>), 26.1 (C<sub>19</sub>), 20.4 (C<sub>7</sub>).

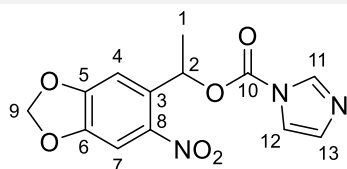
**[169]: 1-(6-nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)ethyl carbonochloridate**Chemical Formula: C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>ClNO<sub>6</sub>

Molecular Weight: 273.63

A round bottom flask was charged with 100 mg of **[37]** (0.47 mmol, 1 equiv), 50 mg of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.47 mmol, 1.0 equiv) and 2.0 mL of dry THF. The solution was placed at 0°C and 140 mg of triphosgene (0.47 mmol, 1.0 equiv) was added. The reaction was stirred at room temperature overnight. The solution was filtered over a MgSO<sub>4</sub> pad and the solvent and remaining phosgene were evaporated under argon flow, leaving through an aqueous NaOH trap. After evaporation under vacuum, 125 mg of product **[169]** was isolated as a white solid (yield: *quantitative*).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, ACN-d<sub>3</sub>) δ 7.50 (s, 1H, H<sub>7</sub>), 7.14 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 6.35 (q, J = 6.5 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 6.18 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H<sub>9a</sub>), 6.16 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H<sub>9b</sub>), 1.70 (d, J = 6.5 Hz, 3H, H<sub>1</sub>).

IR (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 2936, 1734, 1698, 1615, 1503, 1478, 1326, 1253, 1025, 923, 873, 854.

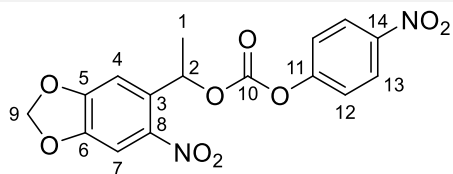
**[170]: 1-(6-nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)ethyl 1H-imidazole-1-carboxylate**Chemical Formula: C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>

Molecular Weight: 305.25

A round bottom flask was charged with 100 mg of **[37]** (0.44 mmol, 1 equiv) and 2.0 mL of dry DCM. To the solution was added 88 mg of CDI (0.53 mmol, 1.2 equiv) and the reaction was stirred at room temperature for 3 h. The reaction was quenched at 0°C with a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl, the product was extracted in DCM, washed with cold brine, dried with MgSO<sub>4</sub> and filtered. Evaporated of the solvent under reduced pressure yielded 137 mg of product **[170]** as a light brown solid (yield: 95 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.15 (dd, J = 1.2, 0.9 Hz, 1H, H<sub>11</sub>), 7.53 (s, 1H, H<sub>7</sub>), 7.43 (dd, J = 1.6, 1.2 Hz, 1H, H<sub>13</sub>), 7.09 (dd, J = 1.6, 0.9 Hz, 1H, H<sub>12</sub>), 7.01 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 6.61 (q, J = 6.4 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 6.15 (d, J = 1.2 Hz, 1H, H<sub>9a</sub>), 6.13 (d, J = 1.2 Hz, 1H, H<sub>9b</sub>), 1.80 (d, J = 6.4 Hz, 3H, H<sub>1</sub>).

**[172]:** 1-(6-nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)ethyl (4-nitrophenyl) carbonate



Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>

Molecular Weight: 376.28

A round bottom flask was charged with 200 mg **[37]** (0.95 mmol, 1 equiv), 100 mg of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.95 mmol, 1.0 equiv) and 5.0 mL of dry THF. The solution was placed at 0°C and 281 mg of triphosgene (0.95 mmol, 1.0 equiv) was added. The reaction was stirred at room temperature overnight. The solution was filtered and the solvent and remaining phosgene were evaporated under argon flow, leaving through an aqueous NaOH trap.

The crude solid was solubilized in 4.0 mL of dry THF and placed at 0°C. To the solution were added 158 mg of *para*-nitrophenol (1.14 mmol, 1.2 equiv) and 300 μL of NEt<sub>3</sub> (2.23 mmol, 2.3 equiv). The reaction was left at room temperature for 1 h and was quenched with a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl. The product was extracted with DCM, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was taken in EtOAc and the white precipitate was collected by filtration, yielding 196 mg of product **[172]** as a white solid (yield: 55 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.29 – 8.23 (m, 2H, 2H<sub>13</sub>), 7.52 (s, 1H, H<sub>7</sub>), 7.39 – 7.32 (m, 2H, H<sub>12</sub>), 7.13 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 6.42 (q, J = 6.4 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 6.15 (s, 2H, H<sub>9</sub>), 1.76 (d, J = 6.4 Hz, 3H, H<sub>1</sub>).

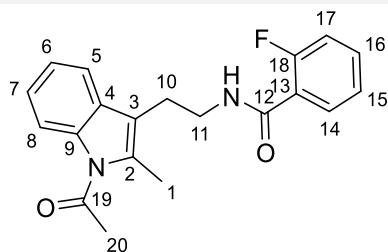
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 155.4 (C<sub>11</sub>), 152.8 (C<sub>6</sub>), 151.6 (C<sub>10</sub>), 147.8 (C<sub>5</sub>), 145.6 (C<sub>14</sub>), 141.9 (s C<sub>8</sub>), 133.9 (C<sub>3</sub>), 125.5 (C<sub>13</sub>), 121.8 (C<sub>12</sub>), 105.8 (C<sub>4</sub>), 105.6 (C<sub>7</sub>), 103.4 (C<sub>9</sub>), 73.9 (C<sub>2</sub>), 22.1 (C<sub>1</sub>).

**HRMS (ESI+):** Calculated for C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>9</sub><sup>+</sup> [MNa<sup>+</sup>]: 399.0435; Found: 399.0423.

**General procedure for the synthesis of products [173<sub>1</sub>], [173<sub>2</sub>], [173<sub>3</sub>], [173<sub>4</sub>] and [173<sub>5</sub>]:**

A round bottom flask was charged with 15 mg of CK666 [14] (0.051 mmol, 1 equiv) and 0.5 mL of dry DMF. The solution was placed at 0°C and 2.0 mg of NaH (60% on mineral oil, 0.051 mmol, 1.0 equiv) was added. The reaction was stirred at 0°C for 5 min and 1.1 eq of reagent [R] was added. The reaction was left at room temperature for between 30 min and 3 h and was quenched with a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl, the product extracted with EtOAc, washed with a saturated solution of NaOAc and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was isolated by purification by column chromatography (EP/EtOAc).

**[173<sub>1</sub>]: N-(2-(1-acetyl-2-methyl-1H-indole-3-yl)ethyl)-2-fluorobenzamide**



Chemical Formula: C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Molecular Weight: 338.38

[R]: Acetyl chloride.

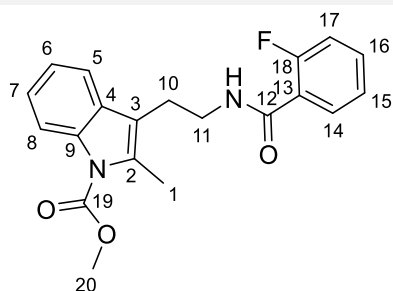
Reaction time: 30 min.

The product was isolated as a white solid (yield: 53 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.11 (td, J = 7.9, 1.9 Hz, 1H, H<sub>14</sub>), 8.01 – 7.94 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 7.59 – 7.53 (m, 1H, H<sub>5</sub>), 7.46 (dddd, J = 8.3, 7.2, 5.2, 1.9 Hz, 1H, H<sub>16</sub>), 7.31 – 7.26 (m, 2H, H<sub>6</sub> & H<sub>15</sub>), 7.26 – 7.23 (m, 1H, H<sub>7</sub>), 7.08 (ddd, J = 12.2, 8.3, 0.8 Hz, 1H, H<sub>17</sub>), 6.90 – 6.76 (m, 1H, NH), 3.71 (qd, J = 7.0, 1.3 Hz, 2H, H<sub>11</sub>), 3.04 (t, J = 7.0 Hz, 2H, H<sub>10</sub>), 2.74 (s, 3H, H<sub>20</sub>), 2.59 (s, 3H, H<sub>1</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.4 (C<sub>19</sub>), 163.6 (d, J = 3.0 Hz, C<sub>12</sub>), 160.7 (d, J = 246.7 Hz, C<sub>18</sub>), 135.9 (C<sub>9</sub>), 134.3 (C<sub>2</sub>), 133.5 (d, J = 9.4 Hz, C<sub>16</sub>), 132.1 (d, J = 2.2 Hz, C<sub>14</sub>), 130.3 (C<sub>4</sub>), 125.0 (d, J = 3.0 Hz, C<sub>15</sub>), 124.1 (C<sub>6</sub>), 123.3 (C<sub>7</sub>), 121.1 (d, J = 11.5 Hz, C<sub>13</sub>), 118.3 (C<sub>5</sub>), 116.8 (C<sub>3</sub>), 116.1 (d, J = 24.9 Hz, C<sub>17</sub>), 115.3 (C<sub>8</sub>), 40.0 (C<sub>11</sub>), 27.8 (C<sub>20</sub>), 24.1 (C<sub>10</sub>), 14.6 (C<sub>1</sub>).

**[173<sub>2</sub>]:** Methyl 3-(2-(2-fluorobenzamido)ethyl)-2-methyl-1H-indole-1-carboxylate



Chemical Formula: C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Molecular Weight: 354.38

**[R]:** Methyl chloroformate.

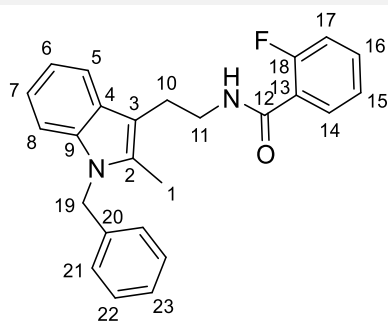
Reaction time: 30 min.

The product was isolated as a white solid (yield: 50 %)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.11 (td, J = 8.1, 1.9 Hz, 1H, H<sub>14</sub>), 8.11 – 8.08 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 7.57 – 7.50 (m, 1H, H<sub>5</sub>), 7.45 (dddd, J = 8.3, 7.2, 5.2, 1.9 Hz, 1H, H<sub>16</sub>), 7.31 – 7.26 (m, 2H, H<sub>7</sub> & H<sub>15</sub>), 7.26 – 7.21 (m, 1H, H<sub>6</sub>), 7.07 (dddd, J = 12.2, 8.3, 1.1, 0.4 Hz, 1H, H<sub>17</sub>), 6.92 – 6.70 (m, 1H, NH), 4.04 (s, 3H, H<sub>20</sub>), 3.71 (tdd, J = 7.0, 5.8, 1.5 Hz, 2H, H<sub>11</sub>), 3.04 (t, J = 7.0 Hz, 2H, H<sub>10</sub>), 2.57 (s, 3H, H<sub>1</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 163.6 (d, J = 3.1 Hz, C<sub>12</sub>), 160.7 (d, J = 246.8 Hz, C<sub>18</sub>), 152.9 (C<sub>19</sub>), 135.8 (C<sub>9</sub>), 134.5 (C<sub>2</sub>), 133.4 (d, J = 9.0 Hz, C<sub>16</sub>), 132.1 (d, J = 2.1 Hz, C<sub>14</sub>), 130.0 (C<sub>4</sub>), 125.0 (d, J = 3.1 Hz, C<sub>15</sub>), 123.9 (C<sub>6</sub>), 123.1 (C<sub>7</sub>), 121.1 (d, J = 11.7 Hz, C<sub>13</sub>), 118.0 (C<sub>5</sub>), 116.1 (d, J = 24.8 Hz, C<sub>17</sub>), 115.9 (C<sub>3</sub>), 115.7 (C<sub>8</sub>), 53.6 (C<sub>20</sub>), 40.0 (C<sub>11</sub>), 24.1 (C<sub>10</sub>), 13.8 (C<sub>1</sub>).

**[173<sub>3</sub>]:** N-(2-(1-benzyl-2-methyl-1H-indole-3-yl)ethyl)-2-fluorobenzamide



Chemical Formula: C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>FN<sub>2</sub>O

Molecular Weight: 386.47

**[R]:** Benzyl bromide.

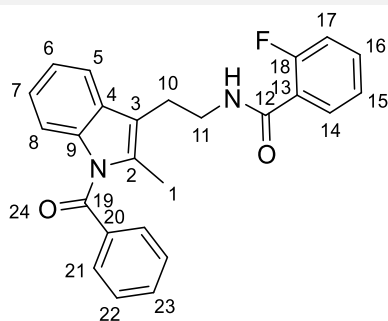
Reaction time: 2 h.

The product was isolated as a yellow oil (yield: 66 %)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.10 (td, J = 7.9, 1.9 Hz, 1H, H<sub>14</sub>), 7.64 – 7.60 (m, 1H, H<sub>5</sub>), 7.43 (dddd, J = 8.3, 7.2, 5.2, 1.9 Hz, 1H, H<sub>16</sub>), 7.28 – 7.21 (m, 5H, H<sub>8</sub> & H<sub>15</sub> & H<sub>22</sub> & H<sub>23</sub>), 7.14 (td, J = 7.0, 1.5 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.11 (td, J = 7.0, 1.5 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 7.02 (ddd, J = 12.1, 8.3, 1.1 Hz, 1H, H<sub>17</sub>), 6.99 – 6.95 (m, 2H, H<sub>21</sub>), 6.85 – 6.73 (m, 1H, NH), 5.32 (s, 2H, H<sub>19</sub>), 3.78 (qd, J = 6.8, 1.4 Hz, 2H, H<sub>11</sub>), 3.12 (t, J = 6.8 Hz, 2H, H<sub>10</sub>), 2.31 (s, 3H, H<sub>1</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 163.4 (d, J = 3.1 Hz, C<sub>12</sub>), 160.7 (d, J = 247.3 Hz, C<sub>19</sub>), 138.1 (C<sub>20</sub>), 136.8 (C<sub>9</sub>), 134.1 (C<sub>2</sub>), 133.2 (d, J = 9.4 Hz, C<sub>16</sub>), 132.2 (d, J = 2.2 Hz, C<sub>14</sub>), 128.9 (C<sub>22</sub>), 127.8 (C<sub>4</sub>), 127.4 (C<sub>23</sub>), 126.1 (C<sub>21</sub>), 124.9 (d, J = 3.4 Hz, C<sub>15</sub>), 121.3 (C<sub>6</sub>), 121.2 (d, J = 11.7 Hz, C<sub>13</sub>), 119.4 (C<sub>7</sub>), 118.1 (C<sub>5</sub>), 116.0 (d, J = 24.9 Hz, C<sub>17</sub>), 109.3 (C<sub>8</sub>), 108.5 (C<sub>3</sub>), 46.7 (C<sub>19</sub>), 40.7 (C<sub>11</sub>), 24.5 (C<sub>10</sub>), 10.4 (C<sub>1</sub>).

**[1734]:** N-(2-(1-benzoyl-2-methyl-1H-indole-3-yl)ethyl)-2-fluorobenzamide



Chemical Formula:  $C_{25}H_{21}FN_2O_2$

Molecular Weight: 400.45

**[R]:** Benzoyl chloride.

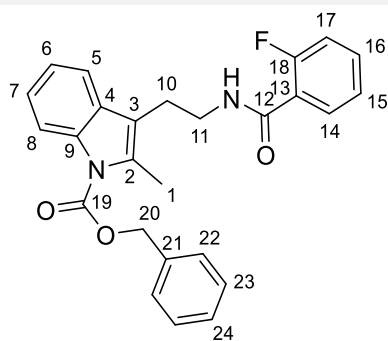
Reaction time: 2 h.

The product was isolated as a yellow solid (yield: 20 %)

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  8.12 (td,  $J = 7.8, 1.9$  Hz, 1H,  $H_{14}$ ), 7.75 – 7.69 (m, 2H,  $H_{21}$ ), 7.65 – 7.60 (m, 1H,  $H_{23}$ ), 7.57 (dt,  $J = 7.8, 1.0$  Hz, 1H,  $H_5$ ), 7.51 – 7.43 (m, 3H,  $H_{16}$  &  $H_{22}$ ), 7.27 (ddd,  $J = 7.8, 7.3, 1.1$  Hz, 1H,  $H_{15}$ ), 7.18 (ddd,  $J = 7.8, 6.7, 1.5$  Hz, 1H,  $H_6$ ), 7.12 – 7.03 (m, 2H,  $H_7$  &  $H_{17}$ ), 7.02 (ddd,  $J = 8.3, 1.5, 0.8$  Hz, 1H,  $H_8$ ), 6.93 – 6.78 (m, 1H, NH), 3.76 (qd,  $J = 7.0, 1.4$  Hz, 2H,  $H_{11}$ ), 3.07 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H,  $H_{10}$ ), 2.36 (s, 3H,  $H_1$ ).

**$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  169.9 ( $C_{19}$ ), 163.5 (d,  $J = 3.1$  Hz,  $C_{12}$ ), 160.8 (d,  $J = 246.8$  Hz,  $C_{18}$ ), 136.7 ( $C_9$ ), 135.8 ( $C_{20}$ ), 134.8 ( $C_2$ ), 133.5 (d,  $J = 9.5$  Hz,  $C_{16}$ ), 133.0 ( $C_{23}$ ), 132.2 (d,  $J = 2.4$  Hz,  $C_{14}$ ), 129.9 ( $C_{21}$ ), 129.8 ( $C_4$ ), 128.9 ( $C_{22}$ ), 125.0 (d,  $J = 3.4$  Hz,  $C_{15}$ ), 123.3 ( $C_7$ ), 122.7 ( $C_6$ ), 121.1 (d,  $J = 11.6$  Hz,  $C_{13}$ ), 118.2 ( $C_5$ ), 116.2 ( $C_3$ ), 116.12 (d,  $J = 24.9$  Hz,  $C_{17}$ ), 114.4 ( $C_8$ ), 40.0 ( $C_{11}$ ), 24.2 ( $C_{10}$ ), 13.2 ( $C_1$ ).

**[173<sub>5</sub>]:** Benzyl 3-(2-(2-fluorobenzamido)ethyl)-2-methyl-1H-indolee-1-carboxylate



Chemical Formula: C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Molecular Weight: 430.48

**[R]:** Benzyl chloroformate.

Reaction time: 3 h.

The product was isolated as a white solid (yield: *quantitative* %)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.15 – 8.05 (m, 2H, H<sub>8</sub> & H<sub>14</sub>), 7.56 – 7.47 (m, 3H, H<sub>5</sub> & H<sub>22</sub>), 7.47 – 7.35 (m, 4H, H<sub>16</sub> & H<sub>23</sub> & H<sub>24</sub>), 7.28 – 7.20 (m, 3H, H<sub>6</sub> & H<sub>7</sub> & H<sub>15</sub>), 7.06 (ddd, J = 12.1, 8.3, 1.1 Hz, 1H, H<sub>17</sub>), 6.89 – 6.73 (m, 1H, NH), 5.47 (s, 2H, H<sub>20</sub>), 3.70 (qd, J = 7.0, 1.3 Hz, 2H, H<sub>11</sub>), 3.03 (t, J = 7.0 Hz, 2H, H<sub>10</sub>), 2.56 (s, 3H, H<sub>1</sub>).

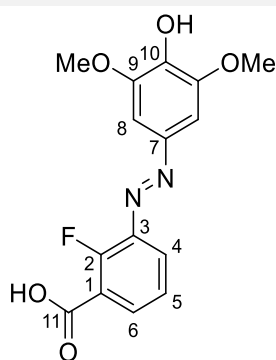
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 163.6 (d, J = 3.3 Hz, C<sub>12</sub>), 160.7 (d, J = 247.2 Hz, C<sub>18</sub>), 152.2 (C<sub>19</sub>), 135.9 (C<sub>9</sub>), 135.3 (C<sub>21</sub>), 134.6 (C<sub>2</sub>), 133.4 (d, J = 9.5 Hz, C<sub>16</sub>), 132.1 (d, J = 2.1 Hz, C<sub>14</sub>), 130.0 (C<sub>4</sub>), 128.9 (C<sub>23</sub>), 128.8 (C<sub>24</sub>), 128.7 (C<sub>22</sub>), 124.9 (d, J = 3.6 Hz, C<sub>15</sub>), 124.0 (C<sub>6</sub>), 123.1 (C<sub>7</sub>), 121.1 (d, J = 11.5 Hz, C<sub>13</sub>), 118.0 (C<sub>5</sub>), 116.1 (d, J = 25.1 Hz, C<sub>17</sub>), 116.0 (C<sub>3</sub>), 115.8 (C<sub>8</sub>), 68.7 (C<sub>20</sub>), 40.0 (C<sub>11</sub>), 24.1 (C<sub>10</sub>), 14.0 (C<sub>1</sub>).



### General procedure for the synthesis of products [177<sub>A</sub>], [177<sub>B</sub>], [177<sub>C</sub>] and [177<sub>D</sub>]:

A round bottom flask was charged with 200 mg of aniline [174<sub>A,B,C or D</sub>] (1.30 mmol, 1 equiv) and 17 mL of water. It was placed at 0°C and 116 mg of NaNO<sub>2</sub> (1.68 mmol, 1.3 equiv) followed by 0.5 mL of HCl 37% (6.05 mmol, 4.6 equiv) were added. The reaction was stirred at 0°C for 10 min and 219 mg of 2,6-dimethoxyphenol (1.42 mmol, 1.1 equiv) and 10 mL of a 1 M solution of NaOH (10 mmol, 7.7 equiv) were added. The reaction was kept at cold for another 30 min as it turns dark red and thickens quickly. The solution was diluted with 1M HCl and filtered over a paper filter. The solid was washed with HCl 1M, water and DCM and dried under vacuum.

#### [177<sub>A</sub>]: 2-fluoro-3-((4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)diazenyl)benzoic acid



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

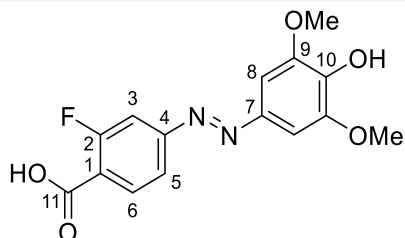
Molecular Weight: 320.28

The product was isolated as a dark red solid (yield: 56 %)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ 13.42 (br s, 1H, OH acid), 9.53 (br s, 1H, OH phenol), 7.97 (ddd, J = 7.9, 6.9, 1.9 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.86 (ddd, J = 7.9, 7.2, 1.9 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.40 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.29 (s, 2H, H<sub>8</sub>), 3.88 (s, 6H, H<sub>OMe</sub>).

**HRMS (ESI+):** Calculated for C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 321.0881; Found: 321.0884.

#### [177<sub>B</sub>]: 2-fluoro-4-((4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)diazenyl)benzoic acid



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

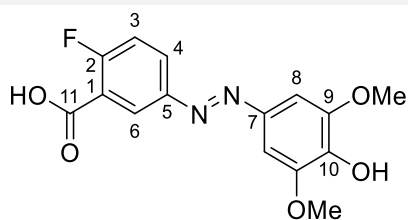
Molecular Weight: 320.28

The product was isolated as a dark orange solid (yield: 81 %)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ 7.93 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.68 – 7.55 (m, 1H, H<sub>5</sub>), 7.56 – 7.44 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 7.26 (s, 2H, H<sub>8</sub>), 3.86 (s, 6H, H<sub>OMe</sub>).

**HRMS (ESI+):** Calculated for C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 321.0881; Found: 321.0883.

**[177c]:** 2-fluoro-5-((4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)diazenyl)benzoic acid



Chemical Formula:  $C_{15}H_{13}FN_2O_5$

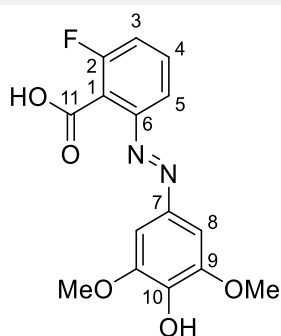
Molecular Weight: 320.28

The product was isolated as a brown solid (yield: 65 %)

$^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.54 (br s, 1H, OH acid), 9.41 (br s, 1H, OH phenol), 8.30 (dd,  $J$  = 7.0, 2.5 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 8.11 (ddd,  $J$  = 8.9, 4.1, 2.5 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.52 (dd,  $J$  = 10.1, 8.9 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 7.31 (s, 2H, H<sub>8</sub>), 3.88 (s, 6H, H<sub>OMe</sub>).

HRMS (ESI+): Calculated for  $C_{15}H_{14}FN_2O_5^+$  [ $MH^+$ ]: 321.0881; Found: 321.0883.

**[177d]:** 2-fluoro-6-((4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)diazenyl)benzoic acid



Chemical Formula:  $C_{15}H_{13}FN_2O_5$

Molecular Weight: 320.28

The product was isolated as a red solid (yield: 80 %)

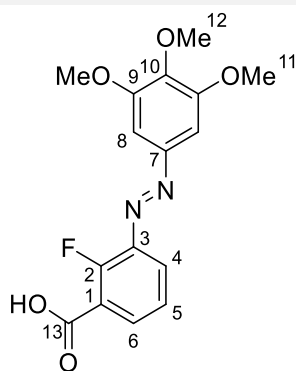
$^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.63 (br s, 1H, OH acid), 9.55 (s, 1H, OH phenol), 7.64 (ddd,  $J$  = 8.1, 7.7, 5.7 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.59 (dd,  $J$  = 8.1, 1.6 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.44 (ddd,  $J$  = 8.7, 7.7, 1.6 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 7.22 (s, 2H, H<sub>8</sub>), 3.86 (s, 6H, H<sub>OMe</sub>).

HRMS (ESI+): Calculated for  $C_{15}H_{14}FN_2O_5^+$  [ $MH^+$ ]: 321.0881; Found: 321.0886.

### General procedure for the synthesis of products [179<sub>A</sub>], [179<sub>B</sub>], [179<sub>C</sub>] and [179<sub>D</sub>]:

A round bottom flask was charged with 100 mg [177<sub>A,B,C or D</sub>] (0.31 mmol, 1 equiv) and 3.5 mL of EtOH. To the solution were added 0.78 mL of a 1M solution of NaOH (0.78 mmol, 2.5 equiv) and 58  $\mu$ L of MeI (0.94 mmol, 3 equiv) and the reaction was heated to 70°C for 2h. Another 2.5 mL of a 1M solution of NaOH (2.5 mmol, 8 equiv) was added and the reaction was heated to 85°C overnight. The solution was diluted with a 1 M solution of NaOH and EtOAc. The organic phase was extracted with with a 1 M solution of NaOH and the combined aqueous phases were acidified with a 1 M solution of HCl until precipitation occurs. The precipitate was extracted with EtOAc, washed with brine, dried with MgSO<sub>4</sub> and the solvent was evaporated under vacuum.

**[179<sub>A</sub>]:** 2-fluoro-3-((3,4,5-trimethoxyphenyl)diazenyl)benzoic acid



Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Molecular Weight: 334.30

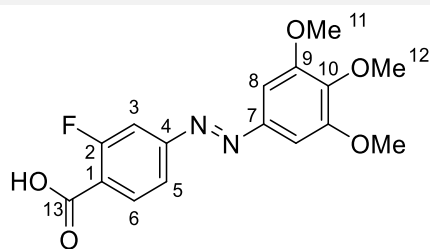
The product was isolated as a brown solid (yield: 82 %)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  9.67 (br s, 1H, 1OH), 8.06 (ddd, J = 8.2, 6.5, 1.9 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.88 (ddd, J = 8.2, 6.7, 1.9 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.28 – 7.22 (t, J = 8.2 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.22 (s, 2H, H<sub>8</sub>), 3.89 (s, 6H, H<sub>11</sub>), 3.88 (s, 3H, H<sub>12</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  168.4 (C<sub>13</sub>), 159.8 (d, J = 273.3 Hz, C<sub>2</sub>), 153.7 (C<sub>9</sub>), 148.7 (C<sub>7</sub>), 141.7 (d, J = 9.6 Hz, C<sub>3</sub>), 141.7 (C<sub>10</sub>), 134.7 (C<sub>6</sub>), 124.1 (C<sub>5</sub>), 123.1 (C<sub>4</sub>), 119.3 (d, J = 9.1 Hz, C<sub>1</sub>), 101.2 (d, J = 10.3 Hz, C<sub>8</sub>), 61.3 (C<sub>12</sub>), 56.4 (C<sub>11</sub>).

**HRMS (ESI+):** Calculated for C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 335.1038; Found: 335.1038.

**[179<sub>B</sub>]:** 2-fluoro-4-((3,4,5-trimethoxyphenyl)diazenyl)benzoic acid



Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Molecular Weight: 334.30

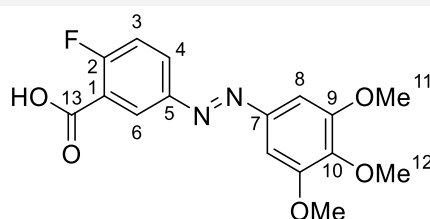
The product was isolated as a red solid (yield: 74 %)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.20 (dd, *J* = 8.3, 7.5 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.79 (dd, *J* = 8.3, 1.6 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.67 (dd, *J* = 11.5, 1.6 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 7.30 (s, 2H, H<sub>8</sub>), 3.98 (s, 6H, H<sub>11</sub>), 3.97 (s, 3H, H<sub>12</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 168.8 (C<sub>13</sub>), 163.3 (d, *J* = 263.5 Hz, C<sub>2</sub>), 157.2 (d, *J* = 8.1 Hz, C<sub>4</sub>), 153.7 (C<sub>9</sub>), 148.3 (C<sub>7</sub>), 142.1 (C<sub>10</sub>), 133.7 (C<sub>6</sub>), 119.6 (d, *J* = 3.4 Hz, C<sub>5</sub>), 118.7 (d, *J* = 10.0 Hz, C<sub>1</sub>), 110.1 (d, *J* = 24.0 Hz, C<sub>3</sub>), 101.3 (d, *J* = 10.3 Hz, C<sub>8</sub>), 61.3 (C<sub>12</sub>), 56.4 (C<sub>11</sub>).

**HRMS (ESI+):** Calculated for C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 335.1038; Found: 335.1042.

**[179<sub>C</sub>]:** 2-fluoro-5-((3,4,5-trimethoxyphenyl)diazenyl)benzoic acid



Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Molecular Weight: 334.30

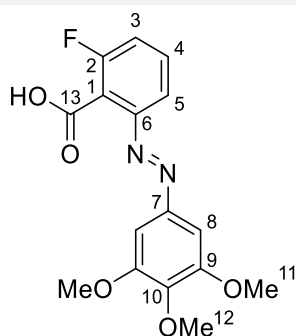
The product was isolated as a brown solid (yield: 82 %)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.61 (dd, *J* = 6.8, 2.6 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 8.15 (ddd, *J* = 8.9, 6.6, 2.6 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.33 (dd, *J* = 10.0, 8.9 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 7.28 (s, 2H, H<sub>8</sub>), 3.98 (s, 6H, H<sub>11</sub>), 3.95 (s, 3H, H<sub>12</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 168.2 (C<sub>13</sub>), 163.7 (d, *J* = 267.3 Hz, C<sub>2</sub>), 153.7 (C<sub>9</sub>), 148.7 (C<sub>5</sub>), 148.2 (C<sub>7</sub>), 141.4 (C<sub>10</sub>), 128.9 (d, *J* = 14.1 Hz, C<sub>4</sub>), 128.0 (C<sub>6</sub>), 118.3 (d, *J* = 10.8 Hz, C<sub>1</sub>), 118.2 (d, *J* = 23.9 Hz, C<sub>3</sub>), 100.9 (C<sub>8</sub>), 61.2 (C<sub>12</sub>), 56.4 (C<sub>11</sub>).

**HRMS (ESI+):** Calculated for C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 335.1038; Found: 335.1040.

**[179<sub>D</sub>]:** 2-fluoro-6-((3,4,5-trimethoxyphenyl)diazenyl)benzoic acid



Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Molecular Weight: 334.30

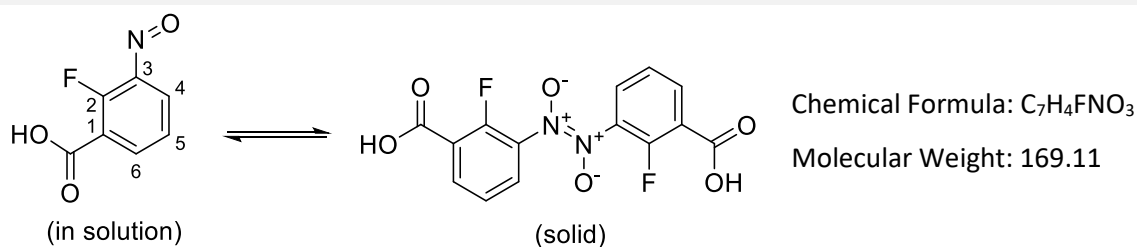
The product was isolated as an orange solid (yield: 79 %)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.73 (br s, 1H, OH), 7.71 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.58 (td, J = 8.2, 5.5 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.29 (ddd, J = 9.2, 8.2, 1.0 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 7.19 (s, 2H, H<sub>8</sub>), 3.93 (s, 3H, H<sub>12</sub>), 3.89 (s, 6H, H<sub>11</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 168.0 (C<sub>13</sub>), 160.9 (d, J = 256.0 Hz, C<sub>2</sub>), 153.7 (C<sub>9</sub>), 150.7 (C<sub>6</sub>), 147.8 (C<sub>7</sub>), 142.3 (C<sub>10</sub>), 132.6 (d, J = 9.5 Hz, C<sub>4</sub>), 118.7 (d, J = 17.0 Hz, C<sub>3</sub>), 117.2 (d, J = 14.9 Hz, C<sub>1</sub>), 115.4 (C<sub>5</sub>), 101.3 (C<sub>8</sub>), 61.2 (C<sub>12</sub>), 56.3 (C<sub>11</sub>).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** Calculated for C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 335.1038; Found: 335.1065.

**[185<sub>A</sub>]: 2-fluoro-3-nitrosobenzoic acid**

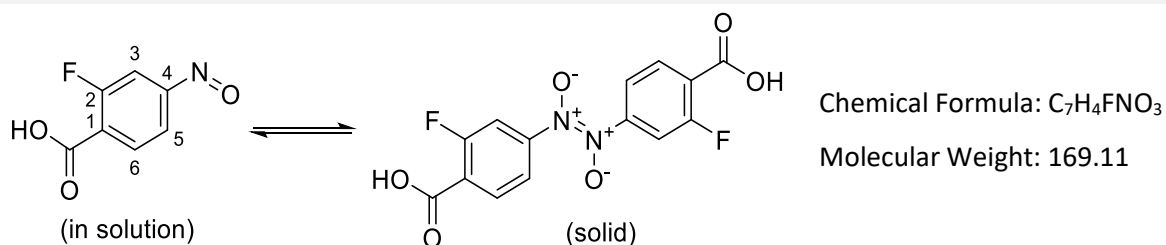


A round bottom flask was charged with 717 mg of aniline **[174<sub>A</sub>]** (4.62 mmol, 1 equiv) and 9 mL of DCM. A solution of 2.98 g of oxone<sup>®</sup> (9.71 mmol, 2.1 equiv) in 31 mL of water was added and the reaction was stirred vigorously for 4 h. The precipitate was filtered, washed with DCM and water and dried under vacuum yielding 660 mg of red/grey solid (yield: 84 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) δ 8.36 (ddd, J = 7.7, 6.8, 1.9 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.30 (ddd, J = 8.0, 7.7, 1.0 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 6.63 (ddd, J = 8.0, 6.3, 1.9 Hz, 1H, H<sub>4</sub>).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>FNO<sub>3</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 170.0248; Found: 170.0247.

**[185<sub>B</sub>]: 2-fluoro-4-nitrosobenzoic acid**

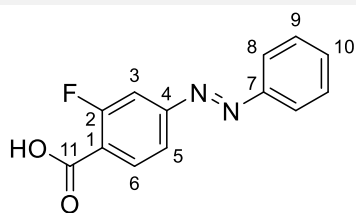


A round bottom flask was charged with 500 mg of aniline **[174<sub>B</sub>]** (3.22 mmol, 1 equiv) and 6.5 mL of DCM. A solution of 2.98 g of oxone<sup>®</sup> (6.77 mmol, 2.1 equiv) in 23 mL of water was added and the reaction was stirred vigorously for 4 h. The precipitate was filtered, washed with DCM and water and dried under vacuum yielding 435 mg of a light brown solid (yield: 79 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) δ 8.29 (dd, J = 8.2, 6.9 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 8.08 (ddd, J = 8.2, 1.7, 0.4 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.44 (dd, J = 10.0, 1.7 Hz, 1H, H<sub>3</sub>).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>FNO<sub>3</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 170.0248; Found: 170.0247.

**[186<sub>B</sub>]:** 2-fluoro-4-(phenyldiazenyl)benzoic acid



Chemical Formula: C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Molecular Weight: 244.23

A round bottom flask was charged with 100 mg of **[185<sub>B</sub>]** (0.59 mmol, 1 equiv), 1.0 mL of DMA and 1.0 mL of AcOH. To this solution was added 65  $\mu$ L of aniline (0.71 mmol, 1.2 equiv) and the reaction was stirred at room temperature overnight. The reaction was diluted with EtOAc and with a 0.2 M solution of HCl. The organic phase was washed with water the product extracted with a saturated solution of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. This new aqueous layer was washed with EtOAc and acidified carefully with HCl 37%. The precipitate was extracted with EtOAc, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and dried under vacuum. The crude solid was recrystallized from EP/EtOAc (50/50), yielding 48 mg of product **[186<sub>B</sub>]** as an orange solid (yield: 33 %).

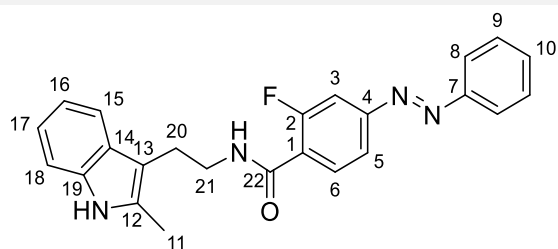
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  8.20 (dd, J = 8.3, 7.6 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 8.00 – 7.94 (m, 2H, H<sub>8</sub>), 7.82 (dd, J = 8.3, 1.8 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.69 (dd, J = 11.5, 1.8 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 7.60 – 7.52 (m, 3H, H<sub>9</sub> & H<sub>10</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>)**  $\delta$  8.12 (dd, J = 8.3, 7.6 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.99 – 7.94 (m, 2H, H<sub>8</sub>), 7.81 (ddd, J = 8.3, 1.8, 0.4 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.67 (dd, J = 11.5, 1.8 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 7.60 – 7.55 (m, 3H, H<sub>9</sub> & H<sub>10</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>)**  $\delta$  166.8 (C<sub>11</sub>), 163.8 (d, J = 260.1 Hz, C<sub>2</sub>), 157.7 (d, J = 7.7 Hz, C<sub>4</sub>), 153.7 (C<sub>7</sub>), 134.2 (d, J = 1.1 Hz, C<sub>6</sub>), 133.4 (C<sub>10</sub>), 130.5 (C<sub>9</sub>), 124.3 (C<sub>8</sub>), 122.2 (d, J = 10.6 Hz, C<sub>1</sub>), 120.4 (d, J = 3.6 Hz, C<sub>5</sub>), 110.6 (d, J = 24.4 Hz, C<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** Calculated for C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 245.0721; Found: 245.0720.

**[187<sub>B</sub>]:** 2-fluoro-N-(2-(2-methyl-1H-indole-3-yl)ethyl)-4-(phenyldiazenyl)benzamide



Chemical Formula: C<sub>24</sub>H<sub>21</sub>FN<sub>4</sub>O

Molecular Weight: 400.46

A round bottom flask was charged with 6 mg **[186<sub>B</sub>]** (0.025 mmol, 1 equiv), activated 4Å molecular sieves and 0.3 mL of dry DMF. To the solution were added 0.3 mL of a 0.06 M solution of HOBT (0.018 mmol, 0.75 equiv) in dry DMF, 5 µL of NEt<sub>3</sub> (0.037 mmol, 1.5 equiv), 6 µL of EDC (0.034 mmol, 1.4 equiv) and 5 mg of **[162]** (0.029 mmol, 1.2 equiv) and the reaction was heated to 40°C for 26 h. The reaction was quenched with a saturated solution of NaOAc, the product extracted with EtOAc, washed with a saturated solution of NaOAc and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/EtOAc: 80/20 to 65/35) yielded 6 mg of product **[187<sub>B</sub>]** as an orange solid (yield: 60 %).

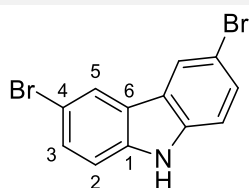
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.27 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.97 – 7.91 (m, 2H, H<sub>8</sub>), 7.86 (s, 1H, NH indole), 7.83 (dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.59 (dd, *J* = 12.6, 1.9 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 7.56 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, H<sub>15</sub>), 7.55 – 7.51 (m, 3H, H<sub>9</sub> & H<sub>10</sub>), 7.30 (ddd, *J* = 7.9, 1.3, 0.8 Hz, 1H, H<sub>18</sub>), 7.14 (ddd, *J* = 7.9, 7.2, 1.4 Hz, 1H, H<sub>17</sub>), 7.10 (ddd, *J* = 7.6, 7.2, 1.3 Hz, 1H, H<sub>16</sub>), 6.89 – 6.78 (m, 1H, NH amide), 3.78 (qd, *J* = 6.8, 1.3 Hz, 2H, H<sub>21</sub>), 3.08 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H<sub>20</sub>), 2.41 (s, 3H, H<sub>11</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 162.9 (C<sub>22</sub>), 161.0 (d, *J* = 248.5 Hz, C<sub>2</sub>), 155.6 (d, *J* = 7.9 Hz, C<sub>4</sub>), 152.4 (C<sub>7</sub>), 135.5 (C<sub>19</sub>), 132.9 (d, *J* = 2.7 Hz, C<sub>6</sub>), 132.3 (C<sub>12</sub>), 132.2 (C<sub>10</sub>), 129.4 (C<sub>9</sub>), 128.6 (C<sub>14</sub>), 123.4 (C<sub>8</sub>), 122.8 (d, *J* = 12.6 Hz, C<sub>1</sub>), 121.4 (C<sub>17</sub>), 120.6 (C<sub>5</sub>), 119.6 (C<sub>16</sub>), 118.0 (C<sub>15</sub>), 110.5 (C<sub>18</sub>), 108.9 (d, *J* = 26.6 Hz, C<sub>3</sub>), 108.5 (C<sub>13</sub>), 40.7 (C<sub>21</sub>), 24.2 (C<sub>20</sub>), 11.8 (C<sub>11</sub>).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** Calculated for C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>FN<sub>4</sub>O<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 401.1772; Found: 401.1778.



**[189]:** 3,6-dibromo-9H-carbazole



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>7</sub>Br<sub>2</sub>N

Molecular Weight: 325.00

A round bottom flask was charged with 1.5 g of carbazol **[180]** (9.0 mmol, 1 equiv) and 20 mL of dry DMF. The solution was placed at 0°C and 3.35 g of NBS (19.0 mmol, 2.1 equiv) was added. The reaction was stirred at room temperature for 2 h and was diluted with EtOAc and with a saturated solution of NaOAc. The product was extracted with EtOAc, washed with a saturated solution of NaOAc and with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/EtOAc: 90/20 to 80/20) yielded 2.55 g of product **[182]** as white crystals (yield: 60 %).

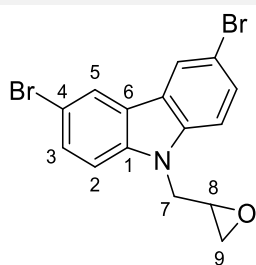
Data matches literature data from Thyraug, E., Hauer, J. *et al.*, **2021**, *Dyes and Pigments*, 186, 109012.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.14 (dt, J = 1.9, 0.6 Hz, 2H, H<sub>5</sub>), 8.10 (br s, 1H, NH), 7.53 (dd, J = 8.6, 1.9 Hz, 2H, H<sub>3</sub>), 7.32 (dd, J = 8.6, 0.6 Hz, 2H, H<sub>2</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.61 (br s, 1H, NH), 8.43 (s, 2H, H<sub>5</sub>), 7.53 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H<sub>3</sub>), 7.47 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 138.8 (C<sub>1</sub>), 128.7 (C<sub>3</sub>), 123.4 (C<sub>6</sub>), 123.3 (C<sub>5</sub>), 113.2 (C<sub>2</sub>), 111.0 (C<sub>4</sub>).

**[190]:** 3,6-dibromo-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazole



Chemical Formula:  $C_{15}H_{11}Br_2NO$

Molecular Weight: 381.07

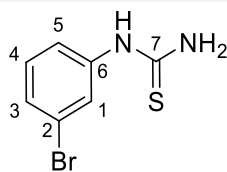
A round bottom flask was charged with 1.0 g of **[181]** (3.1 mmol, 1 equiv) and 31 mL of dry DMF. The solution was placed at 0°C and 140 mg of NaH (60 % on mineral oil, 3.4 mmol, 1.1 equiv) was added. The reaction was stirred at 0°C for 5 min and 690 mg of NaI (4.6 mmol, 1.5 equiv) was added. Successive cycles of addition of 300  $\mu$ L of epichlorohydrin (3.8 mmol, 1.2 equiv) followed by stirring for 30 min were performed until near completion of the reaction is observed by TLC. In total, 5 cycles were performed and the reaction was diluted with EtOAc and with a saturated solution of NaOAc. The product extracted with EtOAc, washed with a saturated solution of NaOAc and with brine, dried over  $MgSO_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/EtOAc: 90/10) yielded 803 g of product **[182]** as white crystals (yield: 69 %).

Data matches literature data from Pieper, A. A. *et al.* **2013**, *Tetrahedron Letters*, 54 (33), 4429-4431.

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  8.12 (dd,  $J = 2.0, 0.5$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 7.56 (dd,  $J = 8.7, 2.0$  Hz, 2H,  $H_3$ ), 7.33 (dd,  $J = 8.7, 0.5$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 4.64 (dd,  $J = 15.9, 2.7$  Hz, 1H,  $H_{7a}$ ), 4.27 (dd,  $J = 15.9, 5.2$  Hz, 1H,  $H_{7b}$ ), 3.31 (ddt,  $J = 5.2, 3.9, 2.7$  Hz, 1H,  $H_8$ ), 2.81 (dd,  $J = 4.7, 3.9$  Hz, 1H,  $H_{9a}$ ), 2.49 (dd,  $J = 4.7, 2.7$  Hz, 1H,  $H_{9b}$ ).

**$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  139.8 ( $C_1$ ), 129.5 ( $C_3$ ), 123.8 ( $C_6$ ), 123.4 ( $C_5$ ), 112.8 ( $C_4$ ), 110.7 ( $C_2$ ), 50.6 ( $C_8$ ), 45.1 ( $C_9$ ), 45.0 ( $C_7$ ).

**[192]: 1-(3-bromophenyl)thiourea**



Chemical Formula:  $C_7H_7BrN_2S$

Molecular Weight: 231.11

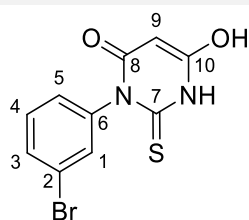
A round bottom flask was charged with 734 mg of  $H_4NSCN$  (9.65 mmol, 1.05 equiv), 670 mg of  $Na_2SO_3$  (6.43 mmol, 0.7 equiv), 1.0 mL of HCl 37% and 0.8 mL of water. To the solution was added 1.0 mL of 3-bromo aniline **[191]** (9.19 mmol, 1 equiv) and the reaction was heated to reflux for 30h. The solution was diluted in DCM and water and the organic phase was washed with brine, dried over  $MgSO_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/EtOAc: 50/50) yielded 494 mg of product **[192]** as a white solid (yield: 23 %).

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.13 (br s, 1H, NH), 7.46 (ddd,  $J = 7.9, 1.8, 1.0$  Hz, 1H,  $H_3$ ), 7.43 (dd,  $J = 2.0, 1.8$  Hz, 1H,  $H_1$ ), 7.32 (dd,  $J = 8.0, 7.9$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 7.20 (ddd,  $J = 8.0, 2.0, 1.0$  Hz, 1H,  $H_5$ ), 6.18 (br s, 2H,  $NH_2$ ).

$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  181.9 ( $C_7$ ), 137.7 ( $C_6$ ), 131.6 ( $C_4$ ), 131.0 ( $C_3$ ), 128.1 ( $C_1$ ), 125.3 ( $C_2$ ), 123.7 ( $C_5$ ).

HRMS (ESI+): Calculated for  $C_7H_8BrN_2S^+$  [ $MH^+$ ]: 230.9586; Found: 230.9588.

**[193]:** 1-(3-bromophenyl)-2-thioxodihydropyrimidine-4,6(1H,5H)-dione



Chemical Formula: C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S

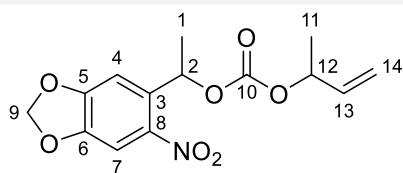
Molecular Weight: 299.14

A round bottom flask was charged with 176 mg of malonic acid (1.68 mmol, 1.3 equiv) and 1.5 mL of dry ACN. 240  $\mu$ L of acetyl chloride (3.38 mmol, 2.6 equiv) was added and the reaction was heated to 50°C for 5 min. 300 mg of **[192]** (1.30 mmol, 1 equiv) was added and the reaction was heated to 50°C for another 4 h. The reaction was carefully quenched with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub>. The aqueous phase was washed with DCM and acidified with a 1 M solution of HCl to pH  $\sim$  1. The yellow precipitate was extracted with EtOAc, dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under vacuum. 265 mg of product **[193]** was isolated as a light brown solid (yield: 68 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Pyr-d<sub>5</sub>)**  $\delta$  7.86 (dd, J = 2.0, 1.9 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 7.59 (ddd, J = 7.9, 1.9, 1.0 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 7.54 (ddd, J = 8.1, 2.0, 1.0 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.36 (dd, J = 8.1, 7.9 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 3.90 (s, 1H, H<sub>9</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, Pyr-d<sub>5</sub>)**  $\delta$  170.8 (C<sub>7</sub>), 164.6 (C<sub>8</sub>), 164.2 (C<sub>10</sub>), 143.0 (C<sub>6</sub>), 133.6 (C<sub>4</sub>), 131.5 (C<sub>3</sub>), 131.10 (C<sub>1</sub>), 129.7 (C<sub>5</sub>), 122.6 (C<sub>2</sub>), 43.8 (C<sub>9</sub>).

**[195]:** But-3-en-2-yl (1-(6-nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)ethyl) carbonate



Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>7</sub>

Molecular Weight: 309.27

A round bottom flask was charged with 8  $\mu$ L of but-3-en-2-ol (0.095 mmol, 1 equiv), 10  $\mu$ L of 2-methyl but-3-en-2-ol (0.095 mmol, 1 equiv), 12 mg of DMAP (0.095 mmol, 1.0 equiv) and 0.5 mL of dry DCM. The solution was placed at 0°C and 35 mg of **[172]** (0.095 mmol, 1.0 equiv) was added. The reaction was stirred at room temperature for 2 days and quenched with a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl, the product extracted with EtOAc, washed with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> and with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (EP/EtOAc: 95/5) yielded 30 mg of product **[195]** as a yellow oil (yield: 95 %).

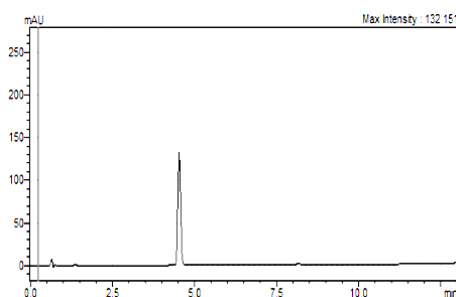
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (both diastereoisomers)  $\delta$  7.49 (s, 1H, H<sub>7</sub>), 7.08 & 7.08 (2s, 1H, H<sub>4</sub>), 6.27 (q, J = 6.4 Hz, 0.5H) & 6.25 (q, J = 6.4 Hz, 0.5H) (H<sub>2</sub>), 6.11 (d, J = 2.0 Hz, 2H, H<sub>9</sub>), 5.83 (ddd, J = 17.0, 10.5, 5.6 Hz, 0.5H) & 5.82 (ddd, J = 17.2, 10.5, 6.2 Hz, 0.5H) (H<sub>13</sub>), 5.27 (dt, J = 17.2, 1.1 Hz, 0.5H) & 5.23 (dt, J = 17.0, 1.2 Hz, 0.5H) (H<sub>14a</sub>), 5.18 (dt, J = 10.5, 1.1 Hz, 0.5H) & 5.14 (dt, J = 10.5, 1.2 Hz, 0.5H) (H<sub>14b</sub>), 5.16 – 5.07 (m, 1H, H<sub>12</sub>), 1.64 (d, J = 6.4 Hz, 1.5H) & 1.64 (d, J = 6.4 Hz, 1.5H) (H<sub>1</sub>), 1.36 (d, J = 6.5 Hz, 1.5H) & 1.33 (d, J = 6.5 Hz, 1.5H) (H<sub>11</sub>).

## Photo-uncaging experiments

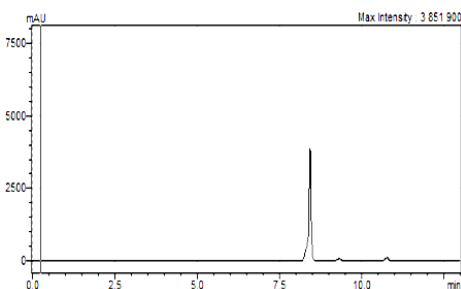
### Deprotection of the photocaged CK666

The reference sample of CK666 **[14]** was prepared in DMSO. The experimental sample of photoprotected CK666 **[3]** was diluted from pure DMSO to water in order to have < 2 % of DMSO in the final sample. Both samples were analyzed initially by HPLC. The HPLC setup was the following. The samples were injected to the C<sub>18</sub> column and eluted with a gradient of H<sub>2</sub>O/ACN with 0.1 % of formic acid in proportions going from 70/30 to 20/80 over 10 min and a flowrate of 0.5 mL/min. The HPLC chromatogram was recorded at 275 nm.

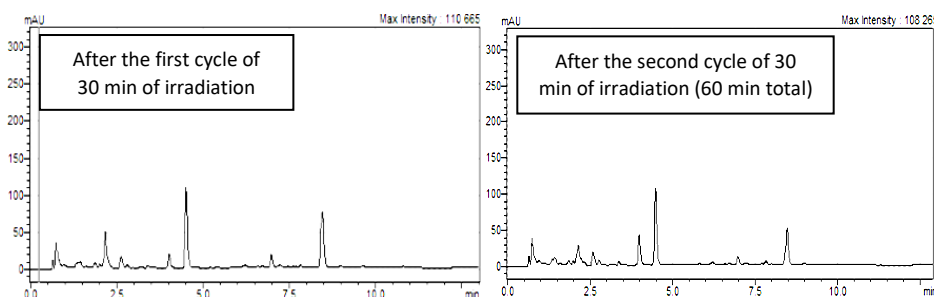
CK666 **[14]** was observed at a retention time of 4.5 min and an LCMS ESI response of + 297 ( [MH<sup>+</sup>] ).



Photoprotected CK666 **[3]** was observed at a retention time of 8.5 min and an LCMS ESI response of + 534 ( [MH<sup>+</sup>] ), - 568 ( [MCl<sup>-</sup>] ) and - 578 ( [MHCO<sub>2</sub><sup>-</sup>] ).



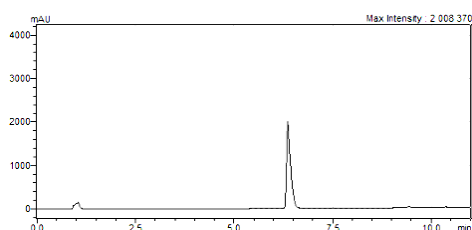
The photoprotected CK666 **[3]** sample was analyzed after two cycles of 30 min of irradiation with the UV blacklight lamp.



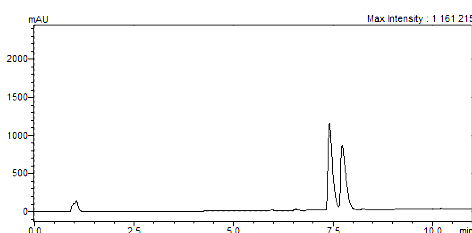
## Deprotection of the photocaged wiskostatin

The reference sample of wiskostatin **[16]** was prepared in DMSO. The experimental sample of photoprotected wiskostatin **[5]** was diluted from pure DMSO to water in order to have 5 % of DMSO in the final sample. Both samples were analyzed initially by HPLC. The HPLC setup was the following. The samples were injected to the C<sub>18</sub> column and eluted with a gradient of H<sub>2</sub>O/ACN with 0.1 % of formic acid in proportions going from 95/05 to 10/90 over 10 min and a flowrate of 0.5 mL/min. The HPLC chromatogram was recorded at 250 nm.

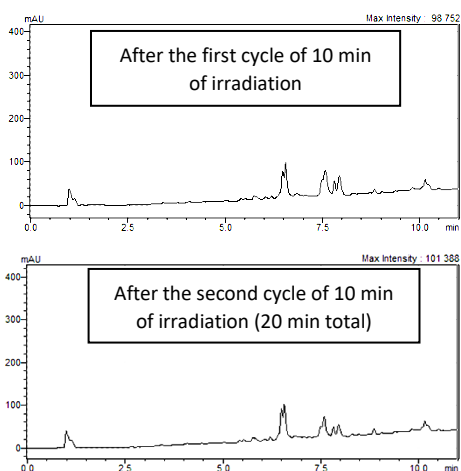
Wiskostatin **[16]** was observed at a retention time of 6.4 min.

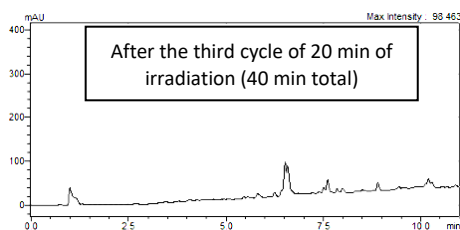


Photoprotected wiskostatin **[5]** was observed at a retention time of 7.4 and 7.8 min (two diastereomers).



The photoprotected wiskostatin **[5]** sample was analyzed after three cycles of respectively 10, 10 and 20 min of irradiation with the UV blacklight lamp.

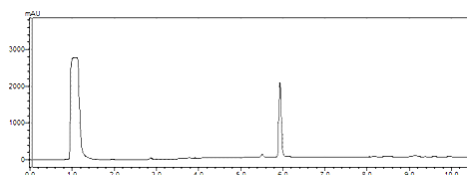




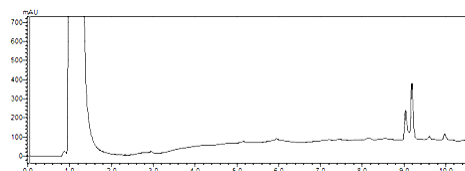
### Deprotection of the photocaged cytochalasin D

The samples of cytochalasin D **[10]** and photoprotected cytochalasin D **[2]** were prepared in H<sub>2</sub>O with 1 % of DMSO. Both samples were analyzed initially by HPLC. The HPLC setup was the following. The samples were injected to the C<sub>18</sub> column and eluted with a gradient of H<sub>2</sub>O/ACN with 0.1 % of formic acid in proportions going from 80/20 to 10/90 over 10 min and a flowrate of 0.5 mL/min. The HPLC chromatogram was recorded at 200 nm.

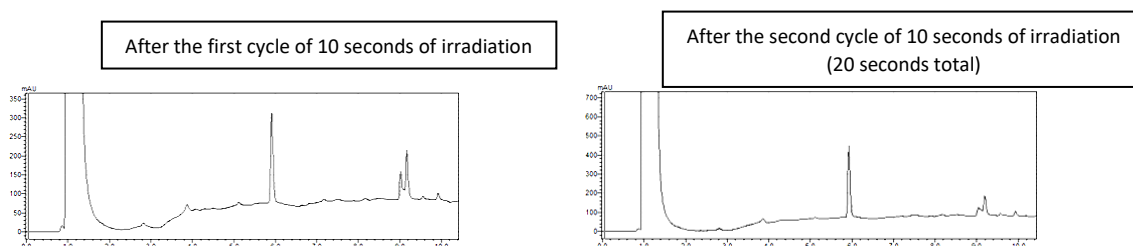
Cytochalasin D **[10]** was observed at a retention time of 5.9 min.



Photoprotected cytochalasin D **[2]** was observed at a retention time of 9.0 and 9.2 min (two diastereomers).



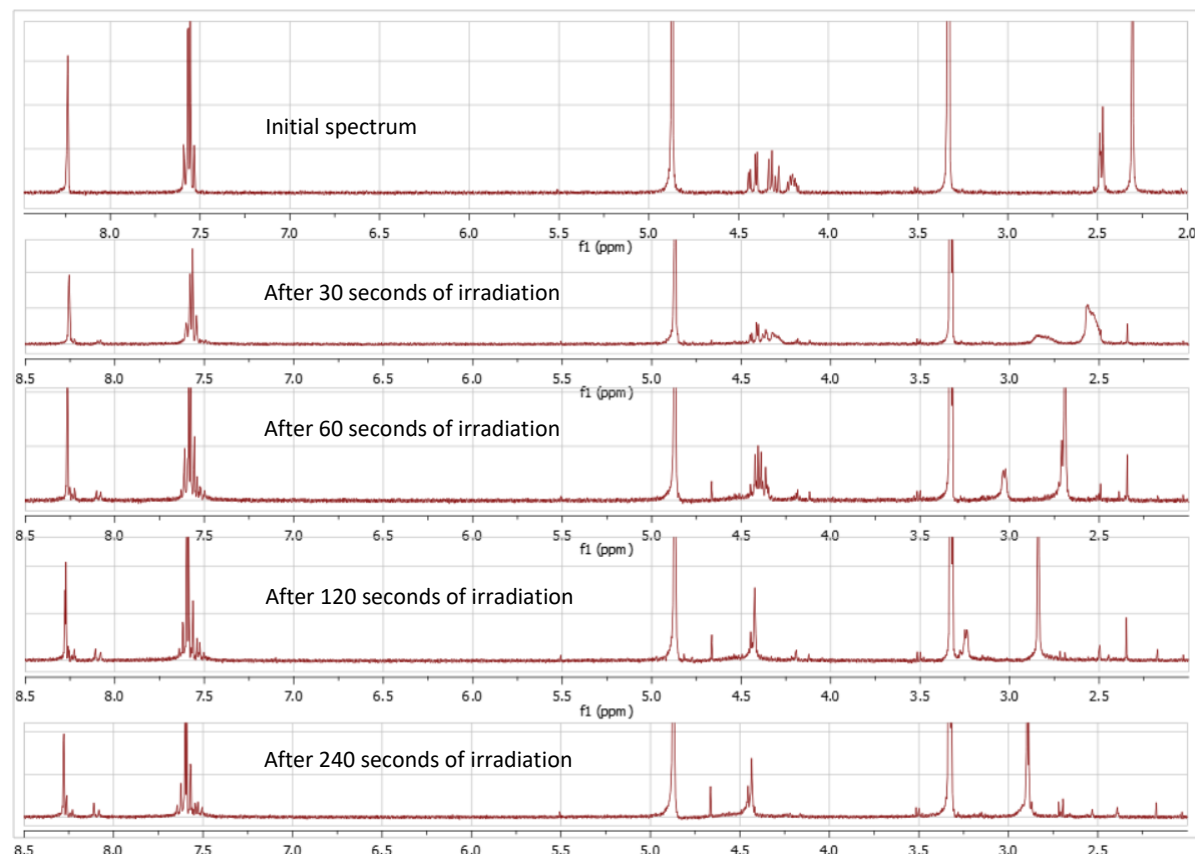
The photoprotected cytochalasin D **[2]** sample was analyzed after two cycles of 10 seconds of irradiation with the Kessil 370 nm lamp.





## UV irradiation of wiskostatin

A solution of 3.8 mg of wiskostatin **[16]** (8.9  $\mu\text{mol}$ ) was prepared in 0.5 mL of  $\text{MeOH-d}_4$ . The sample was analysed by  $^1\text{H}$  NMR initially and after irradiation with the Kessil 370 nm lamp for cumulated 10, 30, 60, 120 and 240 seconds.



## *In vitro* biological activity measurement assays

G-buffer refers to a solution of 0.2 mM CaCl<sub>2</sub> and 5 mM Tris-HCl, pH set at 8.0.

KME refers to a solution of 2 M KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub> and 4 mM EGTA.

### **Proteins:**

Rabbit skeletal muscle actin was prepared as previously described.<sup>1</sup> Briefly, actin was extracted from rabbit skeletal muscle acetone powder and submitted to cycles of polymerization and depolymerization. Finally, actin was gel filtered through a Superdex G-200 column (GE Healthcare) in 5 mM Tris pH 7.8, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM ATP, 1 mM DTT. Purified monomeric Ca-G-actin (calcium bound monomeric actin) was kept on ice.

Actin-pyrene was prepared as previously described.<sup>2</sup> A 4.7 μM solution of F-actin in a buffer consisting of 0.1 M KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM ATP and 1 mM bicarbonate (pH 7.6) was treated with N-(1-pyrenyl)iodoacetamide and left to react at room temperature for 20 h. The reaction happens preferentially at a single site, the Cys373. 1 % weight ratio of Whatman CF-11 cellulose was added to quench the excess unreacted pyrene. Removal of the cellulose furnished the actin-pyrene solution.

Spectrin-actin seeds were purified from human erythrocytes as described.<sup>3</sup>

Arp2/3 was purified from bovine brains according to the described procedure.<sup>4</sup>

VCA was prepared as a recombinant protein in *Escherichia coli* from the human N-WASP domain, according to the described procedure.<sup>4</sup>

- 
- (1) Wiesner, S. Purification of Skeletal Muscle Actin. In *Cell Biology (Third Edition)*; Ed.; Academic Press: Burlington, **2006**.
  - (2) Kouyama, T.; Mihashi, K. Fluorimetry Study of N-(1-Pyrenyl)iodoacetamide-Labelled F-Actin. *European Journal of Biochemistry* **1981**, 114 (1), 33–38.
  - (3) Casella, J. F.; Maack, D. J.; Lin, S. Purification and Initial Characterization of a Protein from Skeletal Muscle That Caps the Barbed Ends of Actin Filaments. *Journal of Biological Chemistry* **1986**, 261 (23), 10915–10921.
  - (4) Egile, C.; Loisel, T. P.; Laurent, V.; Li, R.; Pantaloni, D.; Sansonetti, P. J.; Carlier, M.-F. Activation of the Cdc42 Effector N-Wasp by the Shigella Flexneri Icsa Protein Promotes Actin Nucleation by Arp2/3 Complex and Bacterial Actin-Based Motility. *Journal of Cell Biology*, **1999**, 146 (6), 1319–1332.

### **Actin-pyrene polymerization assays:**

Protein stock solutions were diluted with G-buffer from the purified protein samples:

- Actin-pyrene: 40  $\mu$ M 10% pyrene
- Arp2/3: 1.5  $\mu$ M
- N-Wasp: 7  $\mu$ M
- VCA: 4  $\mu$ M
- F-Actin/spectrin seeds: 1.2 nM

Tested chemicals' solutions were diluted in water from concentrated DMSO solutions in order to have < 2% DMSO in the experiment's final solution:

- CK666 **[14]**: 1 mM, from 100 mM in DMSO
- Photocaged CK666 **[3]**: 1 mM, from 20 mM in DMSO
- Photoswitchable CK666 A-D **[6<sub>A-D</sub>]**: 1 mM, from 5 mM in DMSO
- Wiskostatin **[16]**: 1 mM, from 50 mM in DMSO
- Photocaged Wiskostatin **[5]**: 1 mM, from 50 mM in DMSO
- Cytochalasin D **[10]**: 2  $\mu$ M, from 0.5 mM in DMSO
- Photocaged Cytochalasin D **[3]**: 2  $\mu$ M, from 0.5 mM in DMSO

### **General procedure for the actin-pyrene polymerization assays:**

To an Eppendorf tube was transferred at 0°C and in order the G-buffer, the KME solution, the actin-related proteins (Arp2/3 then VCA for CK666 related products **[14]**, **[3]**, **[173<sub>1-5</sub>]** & **[6<sub>A-D</sub>]**, Arp2/3 then N-WASP for wiskostatin related products **[16]** & **[5]** or F-actin/spectrin seeds for cytochalasin D related products **[10]** & **[3]**) and the tested chemical of interest. The solution was gently homogenized by vortex. The actin-pyrene solution was added and the sample was transferred into a quartz cell and the fluorescence intensity was recorded on a Safas Xenius FLX spectrofluorimeter. Excitation and emission wavelengths were 366 nm and 407 nm, respectively, with 10 nm excitation and emission slits.

The amount of each solution was calculated to match the following final concentrations for a total 160  $\mu$ L. The working conditions are the following:

For all experiments, KME was set at 5 % (100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EGTA) and Actin-pyrene (10% pyrene) at 1.5  $\mu$ M.

For all CK666 related experiments, Arp2/3 was set at 20 nM, and VCA at 250 nM, CK666 [14] at 5, 25 or 100  $\mu$ M, photocaged CK666 [3] at 100  $\mu$ M, N-sustituted CK666 [173<sub>1-5</sub>] at 100  $\mu$ M and photoswitchable CK666 [6<sub>A-D</sub>]\* at 100  $\mu$ M.

\*The photoswitchable CK666 [6<sub>A-D</sub>] samples were split in two and irradiated under either UV light or blue LED light just before the experiments.

For wiskostatin related experiments, Arp2/3 was set at 20 nM, N-WASP at 50 nM, Wiskostatin [16] at 20 or 100  $\mu$ M and photocaged wiskostatin [5] at 100  $\mu$ M.

For cytochalasin D related experiments, F-actin/spectrin seeds were set at 150 pM, Cytochalasin D [10] at 5, 10, 25 or 50 nM and photocaged cytochalasin D [3] at 50 nM.

## Cellular experiments

### Cell line and growth conditions

MCF10A cells were maintained in complete medium [DMEM F12, Gibco,31331-028; horse serum 5 % Sigma, H1270; hydrocortisone 0,1 %, Sigma, H-0888; EGF 0,025% Sigma, SRP3027; cholera toxin 0,01 % Sigma, C8052; insulin 0,1 % Sigma, I9278; pen/strep 1 %, Gibco,15140-22] at 37°C with 5 % of CO<sub>2</sub>. Every two days cells were washed two times with PBS and then trypsinized during 20 min. Complete media was added and cells were plated at 1/10 in flask T75. They were incubated and maintained.

### Wound healing experiments

200  $\mu$ L of MCF10A cells (80000 cells/mL) were plated in each well of an insert (Ibidi, 80466) on an ibitreat 35 mm Petri dish (Ibidi, 81156). The next day after cells reached 100 % of confluency, the insert was removed and 1,5 ml of complete medium with 1 % of DMSO or with 0.1 mM of the molecule of interest was added. Observations in phase contrast microscopy were performed during 24h at 37°C on an Olympus IX83 microscope equipped with a Hamamatsu Orca Fusion camera and driven with Micro-Manager 2.0, using a 10x objective (numerical aperture: 0.4). Images were taken every 10 minutes. Every two hours, cells were photo-irradiated at 365 nm or 450 nm during 30 seconds using high power LEDs (M450LP2 and SOLIS-365C, Thorlabs). The wound size was quantified in Fiji using the Wound Healing Tools plug.





**Titre :** Molécules photoactivables pour le contrôle spatio-temporel du cytosquelette d'actine : synthèse et applications biologiques

**Mots clés :** synthèse totale – inhibiteurs – photocontrôle – actine – arp2/3

**Résumé :** L'étude de systèmes biologiques dynamiques et complexes requiert un contrôle spatio-temporel précis des éléments impliqués. Les petites molécules bioactives photocagées et photocommutatrices apparaissent comme des outils adéquats pour l'étude de ce type de système. Ces composés permettent un contrôle de l'activité biologique avec la précision que les équipements modernes offrent sur la lumière.

Dans le contexte de l'étude des réseaux d'actine du cytosquelette, ce projet de thèse présente le développement d'inhibiteurs photocontrôlables de l'actine et de ses protéines partenaires. En particulier, le développement d'une bibliothèque d'inhibiteurs photocagés pour le contrôle de la polymérisation de l'actine par

l'inhibition directe de l'actine ou indirecte à travers ses promoteurs a été envisagé. Le travail a été porté sur les synthèses totales de formes photocagées de la latrunculine B, un produit naturel complexe et inhibiteur direct sur l'actine, et de petites molécules de synthèse touchant ses principaux promoteurs. La capacité de photodéprotection, ainsi que les activités biologiques des composés obtenus ont été évaluées.

En plus, des variants photocommutateurs du CK666, un inhibiteur de synthèse du complexe Arp2/3, promoteur des ramifications de l'actine, ont également été synthétisés. Les activités biologiques des photoisomères ont pu être observées sur cellules.

**Title :** Spacio-temporal photocontrol of the actin cytoskeleton using photoactive molecules: synthesis and biological applications

**Keywords :** total synthesis – inhibitors – photocontrol – actin – arp2/3

**Abstract :** Studying dynamic and complex biological systems requires precise spatio-temporal control over the different elements involved. Photocaged and photoswitchable bioactive small molecules are potent tools for the study of such systems. These compounds allow the control the biological activity with the precision that modern equipment reaches with light.

For the study of the cytoskeleton's actin networks, this doctoral project aimed at the development of photoactivatable inhibitors of actin polymerization and of actin related proteins. In fact, the development of a library of photocaged inhibitors for the control of the polymerization of actin through direct

inhibition of actin or via the inhibition of promoters was aimed for. The focus was on the total synthesis of photocaged versions of latrunculin B, a complex natural product and direct inhibitor of actin polymerization, as well as of other synthetic small molecules targeting its main promoters. The photocleavage of the compounds as well as their biological activities was studied.

Additionally, photoswitchable variants of the CK666, a synthetic inhibitor of the Arp2/3 complex, the actin filament branching promoter, have been prepared. The biological activities of the different photoisomers have been evaluated on cells.