

# PSE : Réactions Bioorthogonales – Méthodes et Protocoles

Les expériences que nous avons réalisées sont des synthèses de chimie organique. Elles nécessitent donc de la verrerie adaptée. Les réactifs doivent être utilisés sous une hotte aspirante. L'expérimentateur doit porter une blouse, des gants et des lunettes de protection. Ce document a pour but de décrire les protocoles mis en œuvre lors du PSE sur les réactions bioorthogonales.

## I-Démarche expérimentale

Notre démarche a été de trouver des protocoles déjà existants de réactions de Sonogashira étant le plus biocompatible possible afin d'essayer de les rendre entièrement biocompatibles. Nous nous sommes penchées sur un premier protocole qui se déroulait sans cuivre, à température ambiante et en milieu aqueux (solvant). Nous avons réalisé ce protocole afin d'avoir un spectre RMN référence du produit (avec les réactifs que nous avons choisis pour la réaction, mais avec le catalyseur au palladium préconisé par l'article). Puis nous avons fait varier certains paramètres (enlever les réactifs toxiques ou les remplacer, température, catalyseur, composition du solvant, durée des étapes d'agitation et/ou de chauffage...) l'un après l'autre pour voir leur influence sur le rendement. Ce premier protocole n'a pas donné de résultat satisfaisant. Les résultats (taux de conversion) ont été suivis par RMN.

Nous nous sommes ensuite intéressées à un second protocole dans le but de réaliser un meilleur catalyseur. Celui-ci se base sur une matrice d'agarose emprisonnant le catalyseur de palladium sous forme de nanoparticules avec du PEG400 comme solvant. Nous avons donc fabriqué cette matrice puis nous l'avons testée avec une réaction test. Nous avons utilisé le catalyseur ayant eu le meilleur rendement lors de nos premiers essais et celui du protocole initial pour faire différentes matrices.

Pour nous assurer que les matrices avaient bien été formées comme nous le désirions, c'est-à-dire que les molécules de palladium étaient bien emprisonnées dans la matrice d'agarose, nous les avons observées à l'aide d'un Microscope à Balayage Électronique (MEB).

Il est important de partir d'une réaction ayant déjà eu des résultats afin de pouvoir comparer les résultats des autres manipulations au produit de référence. Il faut toujours avoir un point de référence. Cela permet de mettre en perspective les résultats et conversions obtenus, et de comprendre quels facteurs sont à modifier.

Nous avons travaillé sur de petites molécules aussi simples que possible pour pouvoir généraliser nos résultats à toutes molécules présentant la fonction spécifique. Les molécules actives sont plus grosses et n'auront peut-être pas le même comportement mais cela est un point de départ. De plus, ces dernières ont un prix plus élevé. Nous avons choisi la 4-iodoacétophénone car les protons de son groupement méthyle sont facilement repérables en RMN et sont suffisamment influençables par leur environnement pour être identifiables dans les produits résultants. Les RMN sont effectuées dans du chloroforme deutéré pure.

Un résultat négatif n'est pas un échec mais est considéré comme apportant une information supplémentaire au problème.

## II-Réaction de Sonogashira avec de la pyrrolidine

### Réactifs :

-pyrrolidine (CAS : 123-75-1)

-4-iodoacétophénone (CAS : 13329-40-3)

-phénylacétylène (CAS : 536-74-3)

-eau distillée

-PdCl<sub>2</sub>(MeCN)<sub>2</sub> (CAS : 14592-56-4)

- acétate d'éthyle (CAS : 141-78-6)
- sulfate de sodium (CAS : 7757-82-6)

Dans un ballon de 25ml sont ajoutés le  $\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2$  (5.2 mg, 0.02 mmol), la 4-iodoacétophénone (492 mg, 2 mmol), l'eau (2.5 mL) et la pyrrolidine (0.83 mL, 10 mmol). La solution est agitée pendant 5 minutes puis le phénylacétylène (0.26 mL, 2.4 mmol) est ajouté. Le tout est laissé à agiter pendant 24h à température ambiante. La solution est alors extraite avec de l'acétate d'éthyle (3x10 mL ou plus) puis séchée avec du sulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif. Le produit est alors analysé à l'aide d'une RMN du proton dans du chloroforme deutéré.

Nous avons réalisé ce protocole plusieurs fois en changeant un paramètre à chaque fois pour en comprendre l'influence. Nous nous sommes particulièrement concentrées sur le catalyseur de palladium. Nous avons testé deux autres catalyseurs qui sont :  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (CAS : 13820-53-6,) et  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  (CAS : 207596-32-5). Nous avons aussi cherché à remplacer la pyrrolidine par des bases moins toxiques comme le carbonate de potassium ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ , CAS : 584-08-7) et le phosphate de potassium ( $\text{K}_3\text{PO}_4$ , CAS : 7778-53-2). En annexe se trouvent les spectres RMN du produit obtenu dans les conditions décrites précédemment ainsi que de la réaction sans pyrrolidine.

### III-Réaction de Sonogashira avec une matrice d'agarose

#### a) Fabrication de la matrice d'agarose

##### Réactifs :

- agarose (CAS : 9012-36-6)
- eau distillée
- $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (CAS : 3375-31-3)
- acide citrique (CAS : 5949-29-1)

Une solution aqueuse (100 mL) d'agarose est préparée en le dissolvant à 80°C. Une solution de  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (100mL, 1mM) est ajoutée à la solution d'agarose avant de diluer avec de l'eau (100 mL). Une solution d'acide citrique (20 mL, 4mM) est ajoutée au goutte à goutte pour obtenir une couleur brune. Le tout est porté à reflux pendant 1h. La solution est ensuite refroidie à température ambiante pendant une nuit puis séchée à pression réduite pendant 24h. Le résultat se présente sous la forme de feuillets brunâtres.

Nous avons réalisé trois matrices, deux avec du  $\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2$  et une avec le  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (palladium utilisé dans l'article).

Pour préparer 20 mL d'acide citrique à 4 mM, il faut prélever 16.8 mg d'acide citrique en poudre.

#### b) Réaction de Sonogashira de référence

##### Réactifs :

- matrice d'agarose
- PEG 400 (CAS : 25322-68-3)
- 4-iodoanisole (CAS : 696-62-8)
- phénylacétylène
- acétate de potassium (CAS : 127-08-2)
- éther (CAS : 60-29-7)

Dans un ballon contenant la matrice d'agarose (0.05 g), l'acétate de potassium (0.15 g, 1.5 mmol) et le PEG 400 (2 mL) sont ajoutés la 4-iodoanisole (0.234 g, 1 mmol) et le phénylacétylène (0.16 mL, 1.5 mmol). La solution est portée à reflux pendant 2h à 90°C puis elle est extraite avec de l'éther (3x5 mL). Le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif. Le produit est analysé par spectre RMN du proton dans du chloroforme deutéré.

#### **IV- Étude de la matrice d'agarose au MEB**

##### a) Préparation des échantillons

Nous avons placé dans un tube en verre des feuillets de la matrice à étudier, et ce, pour préparer des solutions à 0,5% en masse de matrice dans de l'eau acide (pH=3). Nous avons, dans les mêmes conditions, préparés des solutions à 0,05% en masse de matrice.

Ces tubes étaient mis sous agitation pendant 24h, de manière à obtenir des solutions les plus homogènes possibles.

Puis, nous avons préparé des wafers de silicium en scotchant sur un quart de leur surface des bouts de papiers. Ceux-ci permettant de sauvegarder des zones « vierges » de tout dépôt et donc des zones utiles pour caractériser le changement de surface lorsque la matrice sera présente.

Nous avons ensuite déposé cette matrice par spin-coating en faisant tourner à 3000 tours/min pendant 30 s chaque wafer.

Les wafers, une fois préparés, sont conservés dans des boîtes de pétri.

##### b) Étude des échantillons au MEB

Le MEB est un moyen de visualisation de nos échantillons mais nous ne savons pas ce que nous voulons observer et ce que nous allons observer. La première image est celle de la première matrice. Nous pensons que les points blancs sont les nanoparticules de palladium. De même pour la deuxième image qui est la deuxième matrice. On remarque que les points blancs sont homogènes ce qui est un signe que le spin-coating a été réussi. Néanmoins, la taille des tâches blanches sont différentes. On peut expliquer cette différence à partir de la texture des deux matrices. La première est visqueuse donc on peut avoir un effet « iceberg » des particules ce qui implique de ne pas pouvoir terminer leurs tailles, seul paramètre que nous pouvons comparer.

Le MEB permet de faire des hypothèses : les nanoparticules de palladium seraient bien emprisonnées dans la matrice d'agarose mais nous n'en sommes pas certaines.

De plus, la matrice d'agarose se détériore rapidement sous le faisceau d'électrons ce qui ne permet pas d'avoir une bonne précision.

Nous avons travaillé avec le MEB de l'ESPCI Paris.

#### **Annexes**

1-Spectre proton RMN 4-iodo-acétophénone

CDCl<sub>3</sub> : 3H (2.58, s), 2H (7.66, d), 2H (7.82, d)

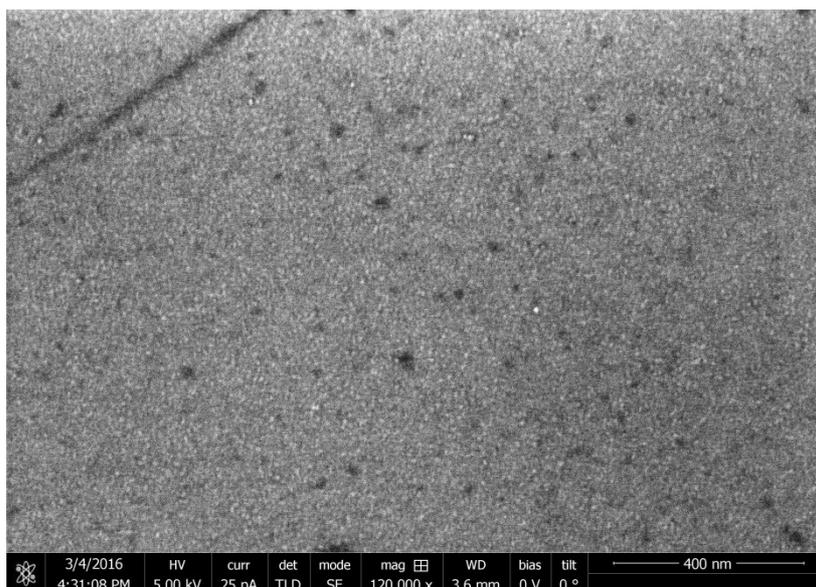
2-Spectre proton RMN produit synthèse avec pyrrolidine

CDCl<sub>3</sub> : protons d'intérêts : 3H (2.61, s), 3H<sub>aromatiques iodure</sub> (7.92, m), protons réactifs : 3H (2.56, s), 2H (7.8, d)

3-Spectre proton RMN produit synthèse sans pyrrolidine (pics de la 4-iodo-acétophénone)

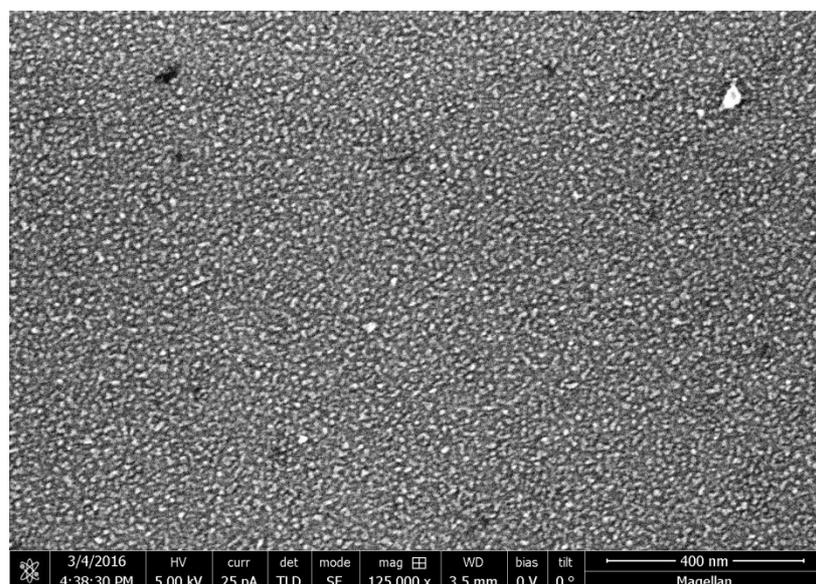
CDCl<sub>3</sub> : 3H (2.58, s), 2H (7.66, d), 2H (7.83, d)

4-



Photographie prise avec le MEB de la première matrice d'agarose

5-



Photographie prise avec le MEB de la deuxième matrice

### Bibliographie :

Ellen M. Sletten and Carolyn R. Bertozzi, Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 6974-6998

Bo Liang, Mingji Dai, Jiahua Chen, and Zhen Yang, Copper-Free Sonogashira Coupling Reaction with PdCl<sub>2</sub> in Water under Aerobic Conditions, *J. Org. Chem.* 2005, 70, 391-393

Habid Firouzabadi, Nasser Iranpoor, Faezeh Kazemi, Mohammad Gholinejad, Palladium nano-particles supported on agarose as efficient catalyst and bioorganic ligan for C-C bond formation via solventless Mizoroki-Heck reaction and Sonogashira-Hagihara reaction in polyethylene glycol (PEG 400), *Journal of Molecular Catalysts A: Chemical* 357 (2012) 154-161

Urgaonkar,S.; Verkade,J. G.J.Org. Chem. 2004, ASAP, web release data: 16-Jul-2004

Li, J. Lin, S., Wang, J. Jia,S. Yang, M. Hao, Z. Zhang, X. Chen, P. R., 2013. Ligand-Free Palladium-Mediated Site Specific Protein Labeling Inside Gram-Negative Bacterial Pathogens. J. Am. Chem. Soc. 135: 7330-7338

Li, J. Chen, P. R., 2012. Moving Pd-Mediated Protein Cross Coupling to Living Systems. Chem. Bio. Chem. 13: 1728-1731