



HAL
open science

Synthèse de ligands iodés et fluorés en série indazole : application en imagerie des récepteurs 5-HT4 centraux

Reynald Mangeant

► **To cite this version:**

Reynald Mangeant. Synthèse de ligands iodés et fluorés en série indazole : application en imagerie des récepteurs 5-HT4 centraux. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMC419 . tel-03265143

HAL Id: tel-03265143

<https://theses.hal.science/tel-03265143v1>

Submitted on 19 Jun 2021

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Synthèse de ligands iodés et fluorés en série indazole : application en imagerie des récepteurs 5-HT4 centraux

**Présentée et soutenue par
Reynald MANGEANT**

**Thèse soutenue publiquement le 18/12/2020
devant le jury composé de**

Mme MURIEL DUFLOS	Professeur des universités, Université de Nantes	Rapporteur du jury
M. FRANCK SUZENET	Professeur des universités, Université d'Orléans	Rapporteur du jury
M. THOMAS CAILLY	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Membre du jury
M. BERTRAND KUNHAST	Docteur, CEA Saclay	Membre du jury
Mme VALERIE COLLOT	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

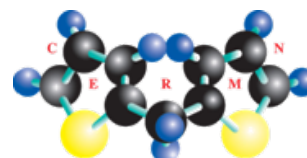
Thèse dirigée par VALERIE COLLOT, Centre d'études et de recherches sur le médicament de normandie (Caen)



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normande de Chimie



A Madame Valérie Collot,

Professeur des Universités de Caen

A Madame Muriel Duflos,

Professeur des Universités de Nantes

A Monsieur Franck Suzenet,

Professeur des Universités d'Orléans

A Monsieur Thomas Cailly,

Maître de conférences des Universités de Caen

A Monsieur Bertrand Kuhnast,

Docteur au Commissariat à l'Energie Atomique et aux énergies alternatives

Qui me font l'honneur de lire ce manuscrit

Et de juger mon travail,

En témoignage de ma profonde reconnaissance

« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre »

Marie Curie (1867-1934) – Physicienne

Remerciements

Je souhaiterais en premier lieu remercier ma directrice de thèse, le Pr. Valérie COLLOT. Depuis 3 ans, nous travaillons et collaborons ensemble sur notre « indazole project » et je souhaiterais te dire à quel point je te suis reconnaissant pour tout le temps que tu as consacré à mon égard, pour ta disponibilité et ta patience ainsi que pour tous les bons moments qu'on a partagés ensemble dans notre « indazole team ». C'est avec beaucoup d'émotions que je vais partir du laboratoire. Je n'oublierai jamais tout ce que tu as fait pour moi et si devais résumer en quelques mots toutes mes pensées, je te dirai simplement, merci pour tout.

Je souhaiterais remercier le Dr. Thomas CAILLY. Durant mes 3 années thèses, tu as toujours été très disponible pour moi et j'ai énormément évolué en chimie grâce à tes nombreux conseils avisés qui m'ont permis de nombreuses fois de voir la lumière au bout du tunnel notamment pour mes synthèses chimiques. Tu es quelqu'un que j'apprécie et que je respecte pour ton honnêteté, ton tact, ton humour et pour ta rigueur de travail. Je retiendrai toujours une phrase pleine de bon sens que tu m'as dit : « tu penses que tu n'as pas le niveau ? un niveau ça s'augmente ». Merci beaucoup !

Ah la la.... Ma chère Silvia! Comment trouver les mots pour te remercier ! On a partagé tellement de belles choses durant toutes ces années et j'ai, en même temps, cette étrange sensation que le temps est passé bien trop vite. Quand je suis arrivé au laboratoire, tu as su très rapidement me mettre à l'aise et je me suis immédiatement senti intégré dans une deuxième « famille » avec Valérie, Gonzalo et toi. Merci, pour ta gentillesse, ta bonne humeur dans les moments difficiles, pour ton écoute, ta patience (parfois tu as vraiment pris sur toi) et pour toutes tes qualités qui seraient probablement trop longues à énumérées. J'ai énormément appris à tes côtés et je me sens en confiance quand je manipule grâce à l'enseignement pratique de la chimie dont tu m'as fais bénéficier. Enfin, c'est avec beaucoup d'émotions que je te dis un grand merci Silvia d'avoir été là ces quelques années.

Je souhaite remercier toute l'équipe du CERMN, pour son accueil, son aide et sa convivialité avec une pensée toute particulière pour les doctorants avec qui j'ai partagé de formidables

moments durant ces trois années : Pauline, Caroline, Babinou, Clémy, Line, Mirka, Gonzy, Camille, Martina, Hugo, Alexandra, Amanda...

Je ne pouvais pas faire ces remerciements sans penser évidemment à ma DT, FX et Bérénice. Quand je suis arrivé au CERMN, le contact est passé très rapidement entre nous et au fil du temps vous êtes devenu des personnes indispensables dans ma vie. Mon petit FX, mon coloc préféré, j'ai été heureux de partager ces 3 années avec toi et je n'oublierai jamais ta gentillesse, ta patience (souvent très utile), ton don pour la cuisine rapide *via* la livraison à domicile. Un énorme merci pour tout, tu es sûrement dans mes proches celui à qui je dois le plus et ton amitié compte énormément pour moi. Ma Béré, ma petite blonde, ma BF, je crois que je n'ai jamais eu un feeling aussi rapide avec quelqu'un, j'adore ton caractère (surtout quand c'est fx qui ramasse dès 9 heures), ton humour, ta délicatesse, tes lasagnes (bien sûr) et j'ai vraiment passé des moments exceptionnels à tes côtés durant cette première année au CERMN. Un grand merci à toi.

Ensuite je souhaiterais remercier mes amis qui ont toujours été d'un grand soutien pendant ces années où je parcourais le globe en quête d'un nouveau radiotraceur. Merci à ma petite Vanessa, Cyril, coraline, Pauline(s), Julien, Franck, Greg(s), Cathy, Mika(s), Olivier, Michel ainsi que notre petite team nantaise. Evidemment, je ne peux oublier tous ceux que j'ai rencontré pendant ma première année à Cherbourg, Guy, Marion, Margaux, Virginie, Marc, Romain, Estelle.

Enfin je souhaiterais remercier toute ma famille, mes frères et sœur, Arnold, Betty, mes petits (ou pas) neveux et nièces. J'ai évidemment une pensée toute particulière pour ma mère à qui je dois énormément. Je suis bien conscient des sacrifices que tu as faits durant toute ta vie pour me donner la chance de réussir allant jusqu'à travailler pendant des semaines avec moi mon concours de pharmacie. Je ne pourrais jamais assez te témoigner ma reconnaissance et mon amour pour toi. Ensuite, je souhaitais remercier la personne avec qui je partage ma vie depuis bientôt 8 ans, Alexandre. Merci pour tous les sacrifices que tu as accepté de faire pendant toutes ces années à distance, je sais que tu as énormément pris sur toi et je te remercie pour ton soutien inconditionnel, ta bienveillance et l'amour que tu me portes depuis toutes ces années.

Enfin, je souhaite remercier mon père qui malheureusement ne pourra pas être présent en ce jour si important pour moi. Avant de partir tu m'avais demandé de te « ramener pleins de diplômes » et je sais que venant de ta part cela reflétait la fierté que tu portais à mon égard. La route a été longue mais j'y suis arrivé et j'espère que tu es fier de moi, où que tu sois.

Un grand merci à chacun d'entre vous.

Table des matières

Liste des abréviations	13
Avant-propos.....	25
Chapitre 1: Introduction et contexte	27
I- Le système sérotoninergique	29
1. Le ligand endogène : la sérotonine	29
2. Les récepteurs sérotoninergiques.....	32
2.1 Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)	34
2.2 Les récepteurs ionotropes.....	39
2.3 Les récepteurs sérotoninergiques de type 4 (5-HT ₄ R).....	40
2.3.1 Découverte et identification du 5-HT ₄ R	40
2.3.2 Clonage et identification des isoformes.....	41
2.3.3 Voie de signalisation et de transduction du signal.....	42
2.3.4 Localisation et implication biologique des 5-HT ₄ R	44
2.3.5 Ligands des 5-HT ₄ R décrits dans la littérature.....	46
II- L'imagerie médicale.....	52
1. Histoire et grandes découvertes	52
2. La radioactivité et ses applications	55
2.1 Principe de la radioactivité.....	55
2.2 La Tomographie par Emission de positons (TEP).....	58
2.3 La tomographie par émission monophotonique (TEMP)	60
2.4 Généralités sur les radiopharmaceutiques	61
2.4.1 Définition	61
2.4.2 Structure d'un radiopharmaceutique.....	62
2.4.3 Propriétés des radiotraceurs	63

2.4.4	Radiotraceurs utilisés en milieu hospitalier	65
2.4.5	Radiotraceurs des 5-HT ₁ R décrits dans la littérature.....	66
2.4.6	Radiotraceurs des 5-HT ₄ R décrits dans la littérature	68
III-	Le noyau indazole.....	70
1.	Propriétés et origine du cycle indazole	70
2.	Médicaments commercialisés portant un noyau indazolique	71
3.	Composés indazoliques soumis à des essais cliniques.....	73
4.	Ligands indazoliques affins et sélectifs des 5-HT ₄ R décrits dans la littérature	80
Chapitre 2: Contexte et objectifs du projet		85
I-	Contexte du projet de thèse.....	87
II-	Objectifs du projet de thèse.....	96
Chapitre 3: Travaux personnels.....		99
I-	Synthèse de radioligands fluorés pour l'imagerie TEP	101
1.	Analyse rétrosynthétique.....	101
2.	Synthèse des acides 4,5 et 6-fluoro-1- <i>H</i> -indazole-3-carboxyliques	102
2.1	Contexte bibliographique.....	102
2.2	Synthèse de l'acide 5-fluoro-1H-indazole-3-carboxylique à partir de la 5-fluoroisatine 106	
2.3	Obtention des acides 4- et 6-fluoro-1H-indazole-3-carboxyliques	107
2.3.1	Méthode développée en série iodée	107
2.3.2	Application à la synthèse des esters en série 4- et 6-fluoro-1H-indazole	109
3.	Fonctionnalisation des positions <i>N</i> ₁ et <i>N</i> ₂ du cycle indazole.....	110
3.1	Obtention des composés N-alkylés via des Substitutions Nucléophiles (<i>S</i> _N)	111
3.2	Obtention des composés N-alkylés via la réaction de Mitsunobu	113
4.	Formation des premiers ligands des 5-HT ₄ R et développement d'une voie de synthèse convergente.....	114
4.1	Synthèse des ligands 5-HT ₄ R via des méthodes non convergentes	115

4.2	Méthode convergente d'obtention des précurseurs amides et esters via couplage peptidique	120
4.3	Développement d'une méthode d'obtention des composés en série cétone.....	122
4.3.1	Contexte en série iodoindazole	122
4.3.2	Obtention des composés en série cétone via un intermédiaire bêta-cétoester.	123
4.3.3	Obtention des composés en série cétone via métallation et utilisation d'un amide de Weinreb	125
4.4	Développement d'une série de composés en série 1,2,3 triazole et 1,2,4 oxadiazole.....	130
4.4.1	Synthèse des précurseurs indazoliques en série 1,2,3 triazole	130
4.4.2	Synthèse d'un ligand en série 1,2,4-oxadiazole	133
5.	Accès aux indazoles plurifonctionnalisés	133
5.1	Accès aux ligands N-propylés en série amide et cétone	135
5.2	Synthèse des ligands N-éthylsulfonamide en série ester, amide et cétone	136
5.3	Synthèse des ligands N-méthyltétrahydro-2H-pyran-4-ol	137
5.4	Synthèse de ligands portant d'autres chaînes	138
5.5	Synthèse des ligands en série 1,2,3-triazole	140
6.	Evaluation biologique des ligands, RSA et détermination des leads.....	142
6.1	Description du test de compétition in vitro	142
6.2	Relations structure-activité des ligands froids étudiés	144
7.	Sélections des leads pour un radiomarquage au fluor-18	148
8.	Voie d'obtention du radiotracer fluoré [¹⁸ F]MR3806	155
8.1	Méthodes de fluoration au fluor-18 décrites dans la littérature	155
8.1.1	Synthèses des sources radioactives	155
8.1.2	Radiochimie de ligands décrits dans la littérature	156
8.2	Synthèse des précurseurs pour un radiomarquage en vue de l'obtention du [¹⁸ F]MR35806	160
II-	Synthèse de nouveaux ligands en série iodoindazole	163
1.	Synthèse de ligands froids en série iodoindazole	163

2.	Evaluation biologique des ligands en série 4- et 5-iodoindazoles.....	167
III-	Projet complémentaire	168
1.	Méthodes de thioalkylations de noyaux aromatiques décrites dans la littérature	169
1.1	Utilisation de bases pour des réactions de type S _N 2 et S _N Ar.....	169
1.2	Couplage croisé catalysé par des métaux de transition.....	171
1.3	Utilisation de réactifs de Grignard et de sels de Bunte.....	174
1.4	Métallation des cycles aromatiques et addition de chaînes disulfures	175
2.	Développement d'une nouvelle méthode de thiofonctionnalisation des hétérocycliques azotés	177
2.1	Thioétherification d'hétérocycles azotés variés.....	178
2.2	Variations des thiofonctionnalisations du cycle pyrazole	186
	Conclusions et perspectives.....	191
	Experimental section.....	197
	Bibliographie.....	345

Abréviations

5-HIAA : de l'anglais *5-Hydroxyindoleacetic acid*

5-HT : 5-hydroxytryptamine ou sérotonine

5-HTR : Récepteur sérotoninergique

5-HT₄R : Récepteur sérotoninergique de type 4

A, B, C

AC : Adénylate cyclase

ACh : Acétylcholine

AChE : Acétylcholinique estérase

AcOH : Acide acétique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AE : Addition-élimination

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium (III)

AMM : Autorisation de mise sur le marché

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

Anh. : Anhydre ou de l'anglais *anhydrous*

APP : de l'anglais *Amyloid precursor protein*

APTS : Acide para-toluène-sulfonique

ASMR : Amélioration du service médicale rendu

ATP : Adénosine triphosphate

BHE : Barrière hémato-encéphalique

Boc : *tert*-butyloxycarbonyle

Boc₂O : Dicarbonate de di-*tert*-butyle

Cat. : Catalytique

CDI : Carbonyldiimidazole

CE : Cellule entérochromaffine

CEA : Commissariat à l'énergie Atomique

CERMN : Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie

CGRP : de l'anglais *Calcitonin gene-related peptide*

CHI logD : de l'anglais *Chromatography hydrophobicity index logD*

Ci : Cellules intestinales

Cn : Cellules neuronales

COVID 19 : Coronavirus disease 2019

CPNPC : Cancer du poumon non à petite cellule

CsCO₃ : Carbonate de césium

Cul : Iodure de cuivre

D, E, F

DAG : Diacylglycérol

DCM : Dichlorométhane
DEAD : Azodicarboxylate de diéthyle
DHP : 3,4-Dihydro-2*H*-pyrane
DME : 1,2-Diméthoxyéthane
DMF : *N,N*-diméthylformamide
DMSO : Diméthylsulfoxyde
EDCI : 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
EPAC-1 : de l'anglais Exchange protein directly activated by AMPc
ERK : de l'anglais *Extracellular signal-regulated kinase*
FDG : Fluorodésoxyglucose

G, H, I,

GDP : Guanosine diphosphate
GIPs : de l'anglais *GPCR interacting proteins*
GP : Groupe partant
GTP : Guanosine triphosphate
HBF₄ : Acide tétrafluoroborique
HCl : Acide chlorhydrique
HOBt : Hydroxybenzotriazole
HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
HPN : Hémoglobinurie paroxystique nocturne
HUG : Hôpitaux universitaires de Genève
IBX : Acide 2-iodoxybenzoïque
IP₃ : Inositol-1,4,5-triphosphate
iPrMgCl.LiCl : Chlorure d'isopropylmagnésium/chlorure de lithium
IRA : Insuffisance rénale aiguë
IRM : Imagerie par résonance magnétique

K, L, M, N

K₂₂₂ : Azacryptand kryptofix 222
K₂CO₃ : Carbonate de potassium
K_i : Constante d'affinité
LCR : Liquide céphalo-rachidien
LiAlH₄ : Tétrahydroaluminure de lithium
LLE : de l'anglais *Ligand lipophilicity efficiency*
L-Trp : L-tryptophane
MA : Maladie d'Alzheimer
MAO-A : Monoamine oxydase de type A
MRP : Médicament radiopharmaceutique
n-Buli : *n*-Butyllithium
NaH : Hydrure de sodium
NaNO₂ : Nitrite de sodium

NaOH : Soude ou hydroxyde de sodium
NTRK : Neurotrophic tyrosine receptor kinase

O, P, R

OA : Ostéoarthrose
PA : Potentiel d'action
Pampa-BBB : de l'anglais *Parallel artificial membrane permeability assay – Blood-brain-barrier*
PARP : de l'anglais *Poly-ADP ribose polymerase*
Pe : Perméabilité effective
PFI : de l'anglais *Proterty Forecast Index*
PI3K : Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP2 : Phosphatidyl inositol biphosphate
PKA : Protéine kinase A
PKC : Protéine kinase C
PLC : Phospholipase C
PLK4 : Polo-like kinase 4
POCl₃ : Trichlorure de phosphoryle
PPTS : 4-Tolènesulfonate de pyridinium
PPh₃ : Triphénylphosphine
PRP : Préparation radiopharmaceutique
RCPG : Récepteur couplé à une protéine G
RCY : de l'anglais *Radiochemical yield*
RE : Réticulum endoplasmique
Rfx : Reflux
RMN : Résonance magnétique nucléaire
ROS : de l'anglais *Reactive Oxygen Species*
RT : de l'anglais *Room Temperature*

S, T, V

SE_{Ar} : Substitution électrophile aromatique
SEM : 2-(Triméthylsilyl)éthoxyméthyl
SERT : de l'anglais *Serotonin transporter*
SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise
SMR : Service médical rendu
S_N : Substitution nucléophile
S_NAr : Substitution nucléophile aromatique
SNC : Système nerveux central
SnCl₂ : Chlorure d'étain (II)
SOCl₂ : Chlorure de thionyle
SPECT : de l'anglais *Single photon emission computed tomography*
t_{1/2} : Temps de demi-vie
ta : Température ambiante
TBAF : Tétra-*n*-butylammonium

TDM : Tomodensitométrie
TEA : Triéthylamine
TEMP : Tomographie par émission monophotonique
TEP : Tomographie par émission de positrons
t-Buli : *tert*-Butyllithium
TFA : Acide trifluoroacétique
THF : Tétrahydrofurane
THP : tétrahydropyran-2-yle
TMPH : 2,2,6,6-Tétraméthylpipéridine
TPH : Tryptophane hydroxylase
Tr : Temps de rétention
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VMAT : de l'anglais *Vesicular monoamine transporter*

Liste des figures :

Figure 1: Biosynthèse et dégradation de la 5-HT	30
Figure 2: Distribution du système sérotoninergique central	30
Figure 3: Cycle de la sérotonine ⁸	31
Figure 4: Transduction du signal par les RCPG	35
Figure 5: Cycle d'activation des RCPG	36
Figure 6: Mécanisme de transduction du signal médié par une protéine $G\alpha_s$	37
Figure 7: Mécanisme de transduction du signal médié par une protéine $G\alpha_{i/o}$	38
Figure 8: Mécanisme de transduction du signal médié par une protéine $G\alpha_{q/11}$	39
Figure 9: Structure du récepteur 5-HT ₃	39
Figure 10: Variations d'épissage du gène humain des 5-HT ₄ R. ³⁵	42
Figure 11: Voie de transduction du signal médiée par EPAC1	43
Figure 12: Voie de transduction du signal médié par Src.....	44
Figure 13: Distribution des 5-HT ₄ R centraux.....	46
Figure 14: Agonistes des 5-HT ₄ R en série benzamide	47
Figure 15: Formule du Tegaserod.....	48
Figure 16: Agonistes des 5-HT ₄ R étudiés dans le cadre de la MA	49
Figure 17: Pharmacophore des antagonistes des 5-HT ₄ R ⁷⁴	50
Figure 18: Formules chimiques du GR113808, SB-204070 et le Piboserod	51
Figure 19: Portraits de Henri Becquerel, Pierre et Marie Curie	53
Figure 20: Marie Curie dans une "petite curie"	54
Figure 21: Frédéric et Irène Joliot-Curie.....	54
Figure 22: Principe de l'imagerie TEP ⁹⁴	59
Figure 23: Principe de la TEMP ⁹⁴	60
Figure 24: Structure d'un radiotracteur constitué d'un vecteur	62
Figure 25: Radiopharmaceutiques utilisés en milieu hospitalier	65
Figure 26: Formules chimiques des radiotraceurs des 5-HT ₄ R.....	68
Figure 27: Alcaloïdes possédant un structure indazolique	71
Figure 28: Formules chimiques de l'indole et formes tautomères de l'indazole	71
Figure 29: Formules chimiques des médicaments indazoliques	73
Figure 30: Composés indazoliques utilisés en oncologie dans le cadre d'essais cliniques	74
Figure 31: Candidats médicaments testés dans la MA	75
Figure 32: Composés indazoliques étudiés en infectiologie	76

Figure 33: Composés indazoliques testés dans diverses indications	78
Figure 34: Pharmacomodulations réalisées par Kaunmann et al.....	80
Figure 35: Pharmacomodulations d'agonistes affins et sélectifs des 5-HT ₄ R	81
Figure 36: Composés indazoliques développés par Schauss et al.....	81
Figure 37: Composés indazoliques en série 1,3,4 oxadiazole	82
Figure 38: Travaux du Dr. Lam en série iodoindazole	83
Figure 39: Ligands affins des 5-HT ₄ R issus du S-21007.....	88
Figure 40: Développement et autoradiographies du [¹²⁵ I]MR-26100.....	89
Figure 41: Radiotraceurs des 5-HT ₄ R synthétisés par Dubost et al.....	90
Figure 42: Travaux et évaluation biologique du [¹²⁵ I]MR-26132 par Fresneau et al.....	91
Figure 43: Synthèse du radiotracer [¹²⁵ I]MR35109 et évaluation biologique	92
Figure 44: Pharmacomodulations envisagées en série iodoindazole	93
Figure 45 : Structure et évaluation biologique des radiotraceurs en série iodoindazole	95
Figure 46: Nouvelles perspectives en série fluoroindazole.....	95
Figure 47: Etapes clés pour l'obtention de nouveaux radioligands	96
Figure 48: Pharmacomodulations envisagées.....	96
Figure 49: Travaux de N1-alkylation sélective par Hunt et al.	112
Figure 50: Exemple de suivi RMN ¹ H en série 4-fluoroindazole N2-THP.....	128
Figure 51: Protocole de détermination des % d'inhibition	143
Figure 52: Détermination de l'IC ₅₀ % et du Ki.....	143
Figure 53: Détermination de la lipophilie par méthode HPLC : CHI logD.....	150
Figure 54: Principe du test in vitro Pampa-BBB	153
Figure 55: Leads sélectionnés pour un radiomarquage au fluor-18	154
Figure 56: Radioligands synthétisés par le Dr. Lam en série iodée	163
Figure 57: Stratégie envisagée en série iodoindazole.....	164
Figure 58 : Objectif du projet complémentaire.....	169
Figure 59: Hétérocycles azotés sélectionnés pour la thioétherification	178
Figure 60: Classement des hétérocycles azotés en 3 systèmes différents	183
Figure 61: Comparaison des protons en RMN ¹ H avant et après thioalkylation.....	184
Figure 62: Nouvelle série proposée pour les 4- et 5-fluoroindazoles	195

Liste des tableaux :

Tableau 1: Description des 5-HTR et leurs radiotraceurs.....	33
Tableau 2: Caractéristiques principales des émetteurs de positons.....	59
Tableau 3: Période radioactive des radioisotopes émetteurs gamma	60
Tableau 4: Tableau récapitulatif des radiotraceurs référents des 5-HTR	68
Tableau 5: Essais cliniques réalisés sur les composés indazoliques.....	80
Tableau 6: Affinité des premiers composés synthétisés en série indazole.....	93
Tableau 7: Ligands affins des 5-HT ₄ R en série iodoindazole	94
Tableau 8: Comparatifs des homologues iodés en série ester, cétone et amide	94
Tableau 9: Synthèse des iodoindazoles protégés en position N2	108
Tableau 10: Comparaison des N-alkylations par Furlotti et al	111
Tableau 11: N-alkylations appliquées au cycle 5-fluoro-1H-indazole	112
Tableau 12: Obtention des indazoles N-alkylés via une réaction de Mitsunobu.....	114
Tableau 13: Synthèse de 35-39 en utilisant HOBt/EDCI.HCl	117
Tableau 14: obtention des précurseurs protégés en série 4- et 5-fluoroindazole.....	121
Tableau 15: Formation des cétones en série 4,5,6 et 7-iodoindazole	123
Tableau 16: Conditions opératoires étudiées pour la formation du β -cétioester 56	124
Tableau 17: Conditions de métallation en position C3	129
Tableau 18: Obtention des précurseurs 1,2,3 triazoles via la chimie click	132
Tableau 19: Synthèse des ligands N-propylés.....	135
Tableau 20: Synthèse des ligands sulfonamides 86-91	137
Tableau 21: Synthèse des ligands 93-100	138
Tableau 22: Obtentions des ligands 108-110 en série 1,2,3-triazole.....	140
Tableau 23: Nouveaux ligands des 5-HT ₄ R en série fluoroindazole.....	141
Tableau 24: Ligands fluorés synthétisés en série triazole et oxadiazole.....	141
Tableau 25: Influence du fluor sur l'affinité des composés N-propylés vis-à-vis des 5-HT ₄ R	144
Tableau 26: Influence du fluor pour les composés indazoliques portant une chaîne oxane.....	145
Tableau 27: Affinités vis-à-vis des 5-HT ₄ R des ligands fluoroindazoles portant une chaîne éthyle sulfonamide.....	146
Tableau 28: Influence des N-alkylations sur l'affinité vis-à-vis des 5-HT ₄ R.....	146
Tableau 29: Comparaison des chaînes latérales sur l'affinité et la lipophilie en série 5-fluoroindazole	147
Tableau 30: Affinités des ligands 1,2,3-triazoles et 1,2,4-oxadiazole	148
Tableau 31: Ligands affins des 5-HT ₄ R (K _i < 10 nM).....	149

Tableau 32: Lipophilie et affinité des ligands sélectionnés en deuxième intention	150
Tableau 33: Statistiques associées aux valeurs de PFI ²³³	151
Tableau 34: Déterminations des LLE et PFI des ligands sélectionnés	152
Tableau 35: Résultats du test Pampa-BBB sur 3 ligands froids affins des 5-HT ₄ R.....	154
Tableau 36: Premiers essais de radiomarquage du précurseur 116 par Kuhnast et al.....	162
Tableau 37: Synthèse des précurseurs Boc 117 à 120	166
Tableau 38: Obtention des ligands en série 4- et 5-iodoindazole.....	167
Tableau 39: Affinités et clogP des ligands en série iodoindazole.....	167
Tableau 40: Caractéristiques du MR35824	168
Tableau 41: Formations des précurseurs THP en présence de DHP et d'APTS.....	180
Tableau 42: Formation des précurseurs THP à l'aide du Cl-THP	181
Tableau 43: Mise au point de la thioalkylation sur le noyau benzimidazole	182
Tableau 44: Thioalkylation des hétérocycles azotés du système N-C=N	184
Tableau 45: Thioalkylation des hétérocycles azotés du système N-N-C.....	185
Tableau 46: Thioalkylation des hétérocycles azotés appartenant au système N-C=C.....	186
Tableau 47: Thiofonctionnalisation du noyau pyrazole	187

Liste des Schémas :

Schéma 1: Etapes primordiales pour l'obtention d'un radiotracteur.....	97
Schéma 2: Evolution du projet en série iodoindazole.....	98
Schéma 3: Analyse rétrosynthétique en série amide et ester	101
Schéma 4: Analyse rétrosynthétique en série cétone.....	101
Schéma 5: Analyse rétrosynthétique en série triazole.....	102
Schéma 6: Synthèse de l'acide 1H-indazole-3-carboxylique par Schad et al.	102
Schéma 7: Obtention d'acides 1H-indazole-3-carboxyliques substitués en position 5	103
Schéma 8: Synthèse de l'acide 1H-indazole-3-carboxylique par Ferrari et al.	103
Schéma 9: Synthèse de l'acide 1H-indazole-3-carboxylique par Kuang et al.....	104
Schéma 10: Obtention d'indazoles substitués par Jacobson et al.	104
Schéma 11: Obtention des esters de l'acide 1H-indazole-3-carboxylique à partir de dérivés 2-nitrophénylacétique	105
Schéma 12: Synthèse de dérivés indazoliques via une cycloaddition [3+2] par Jin et al.....	105
Schéma 13: Obtention de dérivés indazoliques par Liu et al.	106
Schéma 14: Synthèse du 5-fluoro-1H-indazole-3-carboxylate d'éthyle 13	106
Schéma 15: Fonctionnalisation du cycle iodoindazole.....	107
Schéma 16: Protection régiosélective du 5-bromoindazole par Slade et al.	108
Schéma 17: Préparation du TMPMgCl.LiCl.....	108
Schéma 18: Synthèse des esters indazoliques via l'utilisation de TMPMgCl.LiCl.....	109
Schéma 19: Accès à des iodoindazoles diversement substitués en position 3.....	109
Schéma 20: Voie d'obtention des esters 4- et 6-fluoro-1H-indazole-3-carboxylates	110
Schéma 21: Mécanisme proposé pour la réaction de Mitsunobu	113
Schéma 22: Sélective N1-alkylation par Procopiou et al.....	113
Schéma 23: N-alkylation et saponification des précurseurs indazoliques	114
Schéma 24: Stratégies envisagées pour synthétiser les ligands des 5-HT ₄ R.....	115
Schéma 25: Mécanisme d'activation de l'acide carboxylique par HOBt/EDCI.HCl	116
Schéma 26: Voie d'obtention des chaînes pipéridines N-propylées 32 et 34	116
Schéma 27: Voie générale d'obtention des liaisons ester et amide via un chlorure d'acide	117
Schéma 28: Formation de la liaison amide via l'utilisation de (COCl) ₂ et DMF.....	118
Schéma 29: Accès aux amides 40 et 41	118
Schéma 30: Mécanisme de formation de 43 en présence de CDI	119
Schéma 31: Stratégies envisagées pour obtenir les produits finaux.....	120
Schéma 32: Synthèse de la chaîne 46	120

Schéma 33: Obtention des précurseurs protégés en série 6-fluoroindazole.....	122
Schéma 34: Synthèse de la cétone 53.....	123
Schéma 35 : Formation du précurseur cétone 58.....	125
Schéma 36: Nouvelle voie de synthèse des ligands cétoniques	126
Schéma 37: Voie d'obtention de la chaîne pipéridinique 63 portant l'amide de Weinreb.....	127
Schéma 38: Conditions sélectionnées pour la métallation	127
Schéma 39: Formation des précurseurs cétoniques en série 4 et 5-fluoroindazole.....	129
Schéma 40: Méthodes de formation du cycle 1,2,3 triazole.....	131
Schéma 41: Voie de synthèse des alcynes 70 et 71	132
Schéma 42: Obtention des chaînes azotures 73 et 74	132
Schéma 43: Voie de synthèse de la chaîne 78	133
Schéma 44: Obtention du ligand 79 en série 1,2,4 oxadiazole	133
Schéma 45: Principales chaînes latérales sélectionnées.....	135
Schéma 46: Voie d'obtention du composé 84	136
Schéma 47: Formation de la chaîne 85	136
Schéma 48: Formation de la chaîne 1,6-dioxaspiro[2,5]octane 92	137
Schéma 49: Voie de synthèse de la chaîne 102	138
Schéma 50: Formation du composé 103	139
Schéma 51: Voie de synthèse des ligands 106 et 107	139
Schéma 52: Formation de fluor électrophile à partir de néon-20	155
Schéma 53: Formation de fluor électrophile à partir d'oxygène-18	155
Schéma 54: Méthode d'obtention d'un fluor-18 électrophile via l'utilisation d'un courant électrique	156
Schéma 55: Synthèse du [¹⁸ F]AcOF et du [¹⁸ F]NFSI	156
Schéma 56: Formation d'un fluor-18 nucléophile.....	156
Schéma 57: Variations stéréochimiques selon la source de fluor-18 utilisée.....	157
Schéma 58: Voie de synthèse du [¹⁸ F]fluoro-L-DOPA	157
Schéma 59: Synthèse du [¹⁸ F]FDG et du [¹⁸ F]PFCIT via une S _N aliphatique	158
Schéma 60: Obtention du [¹⁸ F]FMZ par S _N Ar	159
Schéma 61: Formation du [¹⁸ F]FMZ par substitution directe d'un fluor	159
Schéma 62: Obtention du [¹⁸ F]FMZ via un intermédiaire iodonium.....	159
Schéma 63: Méthode générale d'obtention de fluoration des arènes par Gouverneur et al.	160
Schéma 64: Obtention de la [¹⁸ F]fluoro-L-DOPA et du [¹⁸ F]FMZ par Gouverneur et al.....	160
Schéma 65: Intermédiaires nécessaires pour l'obtention du [¹⁸ F]MR35816	161

Schéma 66: Voie de synthèse du précurseur Bpin 116	161
Schéma 67: Essai de radiomarquage de 116 dans le DMA en présence de KOTf.....	162
Schéma 68: Formation des noyaux 4 et 5-iodoindazoles.....	165
Schéma 69: Formation des précurseurs 21a et 21d	165
Schéma 70: Synthèse du précurseur cétonique 121	166
Schéma 71: Voie de synthèse du [¹²⁵ I]MR35824 envisagée.....	168
Schéma 72: Méthode générale d'obtention de composés thioalkylés et thioarylés par des S _N 2 et S _N Ar	169
Schéma 73: Formation de thioethers sur des systèmes hétérocycliques par Brown et al.	170
Schéma 74: Thioalkylation par Yin et al.	170
Schéma 75: Forme mésomère et S-alkylation du benzimidazole	171
Schéma 76: Méthode générale de formation des liaisons C-S via des métaux de transition.....	171
Schéma 77: Cycle catalytique des métaux de transition.....	172
Schéma 78: Thioalkylations catalysées au Palladium par Schopfer et al.	172
Schéma 79: Thioalkylations des dérivés du [¹²⁵ I]IMPY	173
Schéma 80: Application des réactions de couplage croisés sur le noyau indole, indazole et 1,2,3 triazole	174
Schéma 81: Méthode générale de thioétherification via des réactifs de Grignard et des sels de Bunte	175
Schéma 82: Synthèse de liaisons thioéthers via l'utilisation de sels de Bunte	175
Schéma 83: Méthode générale de formation de liaisons thioéthers via les superbases organométalliques.....	176
Schéma 84: Thioalkylation et thioarylation sur un noyau pyrazole par Katrizky et al.	176
Schéma 85: Thioarylation du pyrazole par Hanamoto et al.....	176
Schéma 86: Thioarylation et thioalkylation par Knochel et al.	177
Schéma 87: Thioalkylation et arylation du noyau indazole par Lam et Berhault.....	177
Schéma 88: Méthode de S-alkylation développée par le Dr. Berhault	178
Schéma 89: Formation du 2-chloro-THP	180
Schéma 90: Premier essais de Thioalkylations sur des noyaux aromatiques	181
Schéma 91: Formes tautomères du 1H-benzo[d]imidazole-2-thiol.....	181
Schéma 92: Double thiofonctionnalisation du noyau pyrazole	188
Schéma 93: Synthèse de la Cerlapirdine décrite dans la littérature	188
Schéma 94: Synthèse de la cerlapirdine envisagée par nos équipes	189
Schéma 95: Nouvelle voie de synthèse envisagée en série 4 et 5-fluoroindazole.....	193

Schéma 96: Nouvelle voie d'obtention des composés cétoniques des séries 4 et 5-fluoroindazoles	194
Schéma 97: Voie convergente et non convergente d'obtention des ligands en série fluoroindazole	194
Schéma 98: Perspectives de synthèse de nouveaux radiotraceurs en série 4-fluoroindazole	195

Avant-Propos

Au cours de ces trente dernières années, l'imagerie médicale s'est imposée comme une discipline indispensable de la médecine moderne. Rayonnante dans de nombreuses spécialités médicales comme l'oncologie, la neurologie et la cardiologie, elle est utilisée quotidiennement dans le dépistage, le suivi et le traitement de diverses pathologies. Elle s'est considérablement affinée *via* la synthèse de nouveaux radiopharmaceutiques utilisables en imagerie TEP et TEMP. Leur développement est issu des nombreuses études et recherches réalisées sur des cibles d'intérêt permettant ainsi de mieux comprendre les processus biologiques et physiologiques du corps humain.

Parmi ces cibles, les récepteurs sérotoninergiques de type 4 (5-HT₄R) ont rapidement suscité un intérêt particulier notamment pour leur implication dans diverses maladies neuropsychiatriques et neurodégénératives comme la dépression ou la Maladie d'Alzheimer (MA). En 2010, on distingue plus de 130 familles de composés antagonistes ou agonistes présentant une forte affinité et spécificité pour ces récepteurs avec pour objectif majeur de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques de ces neuropathologies. A contrario, la synthèse de radiotraceurs affins des 5-HT₄R n'a pas eu l'essor escompté puisqu'actuellement seulement quatre radiotraceurs sont décrits dans la littérature et qu'aucun d'entre eux n'est utilisé chez l'homme dans un cadre diagnostique.

C'est dans ce contexte que ce projet de thèse s'inscrit puisque notre objectif vise à concevoir une nouvelle série de radiotraceurs en nous appuyant sur un noyau chimique d'intérêt : le noyau indazole. Ces travaux, dirigés par le Pr. Valérie Collot, sont la résultante d'une vingtaine d'années de recherches effectuées au Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN).

Ce manuscrit se divise en quatre grands chapitres. En premier lieu, nous aborderons le contexte et les généralités associées au système sérotoninergique, à l'imagerie médicale et au noyau indazole. Dans le deuxième chapitre, je présenterai les étapes indispensables à la réalisation de ce projet en précisant les objectifs à atteindre ainsi que les travaux antérieurs qui nous ont orientés dans certaines prises de décision. Enfin, nous décrirons précisément les travaux réalisés au cours de ces trois dernières années et présenterons les résultats biologiques issus de cette nouvelle série de composés.

Chapitre 1: Introduction et contexte

I- Le système sérotoninergique

1. Le ligand endogène : la sérotonine

La sérotonine appelée aussi 5-hydroxytryptamine (5-HT) est un neurotransmetteur qui appartient à la famille des indolamines. Vittorio Erspamer fut le premier à l'identifier et la dénomma Enteramine en 1946. En effet, Il observa que la substance issue de l'extraction de cellules entérochromaffines avait la propriété de contracter les tissus musculaires utérins de rat et publia un grand nombre d'articles en lien avec cette nouvelle substance^{1,2,3}, jusqu'en 1952 où il fut établi qu'elle avait été parallèlement identifiée et isolée par l'équipe de Maurice Rapport, Arda Green et Irvine Page.⁴ Les compétences variées de ces trois chercheurs furent mises à contribution à la fois dans l'identification et dans la purification de la 5-HT à partir de plus de « 900 litres de sérum issus de 2 tonnes de sang de bœuf ». En 1948, elle fut définitivement nommée sérotonine résultant de la contraction de sérum (ser) et de constriction « tonin » des vaisseaux sanguins.

La 5-HT est produite principalement (>95%) dans les cellules entérochromaffines (CE) de l'intestin et moindre quantité au niveau des noyaux du raphé. Elle est issue de la biotransformation du L-Tryptophane (L-Trp), acide aminé essentiel, retrouvé dans divers aliments comme les œufs, le chocolat et les bananes. Deux enzymes sont nécessaires à sa synthèse : la Tryptophane hydroxylase (TPH) et la 5-Hydroxytryptophane-décarboxylase (Figure 1). On note la présence de deux isoformes différents de la TPH, la TPH1 localisée au niveau du système périphérique et la TPH2 au niveau du système nerveux central.⁵ Cette synthèse est minoritaire à ce niveau, puisque seulement 5 à 10% du L-Trp suit cette voie de transformation, la majorité étant orientée pour la synthèse de la Kynurénine et de ses dérivés.⁶

¹ Erspamer, V.; Assero, B. *Nat. Publ. Gr.* **1952**, *169*, 800–801.

² Erspamer, V. *Acta Pharmacol.* **1948**, *4*, 213–223.

³ Erspamer, V.; Ghiretti, F. *J. Physiol.* **1951**, *115* (4), 470–481.

⁴ Rapport, M. M.; Green, A. A.; Page, I. H. *J. Biol. Chem* **1948**, No. 176, 1243–1251.

⁵ Walther, D. J.; Bader, M. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66* (9), 1673–1680.

⁶ Stone, T. W.; Darlington, L. G. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1* (8), 609–620.

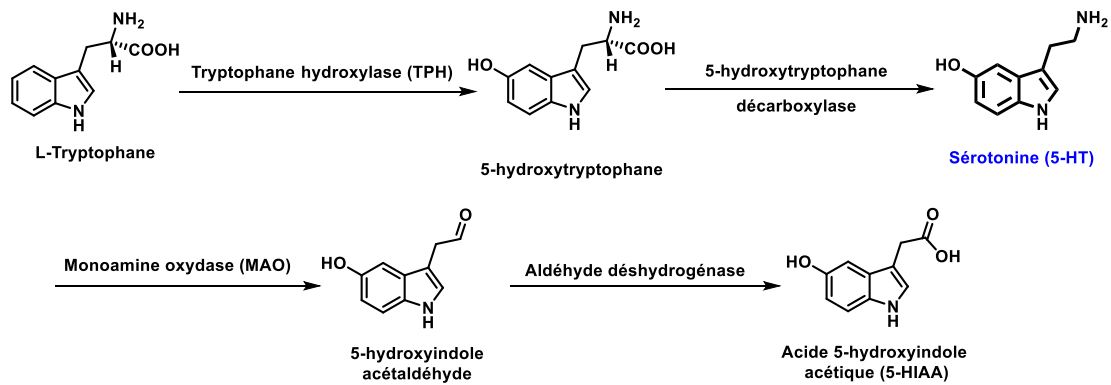


Figure 1: Biosynthèse et dégradation de la 5-HT

Dans le système périphérique, elle représente la part majoritaire du stock total présent dans l'organisme (98%). On la retrouve principalement au niveau du tractus digestif, des plaquettes mais aussi au niveau du poumon et des reins. La 5-HT a un rôle primordial puisqu'elle participe activement aux phénomènes de contraction des muscles lisses augmentant notamment la motilité de l'intestin grêle et du duodénum.

A la différence du L-Tryptophane, la 5-HT ne peut pas passer la barrière hémato-encéphalique (BHE). Sa présence dans le système nerveux central (SNC) ne peut qu'être la résultante d'une synthèse *in situ*. Elle est principalement localisée au niveau des noyaux du raphé situés dans le tronc cérébral, véritable carrefour neuronal permettant sa dissémination dans l'intégralité des aires cérébrales parcourues par le système sérotoninergique, à savoir le cerveau antérieur, les régions du striatum, les régions corticales, la moelle allongée, le mésencéphale, le thalamus, l'hypothalamus, l'hippocampe et bien d'autres régions (Figure 2).⁷

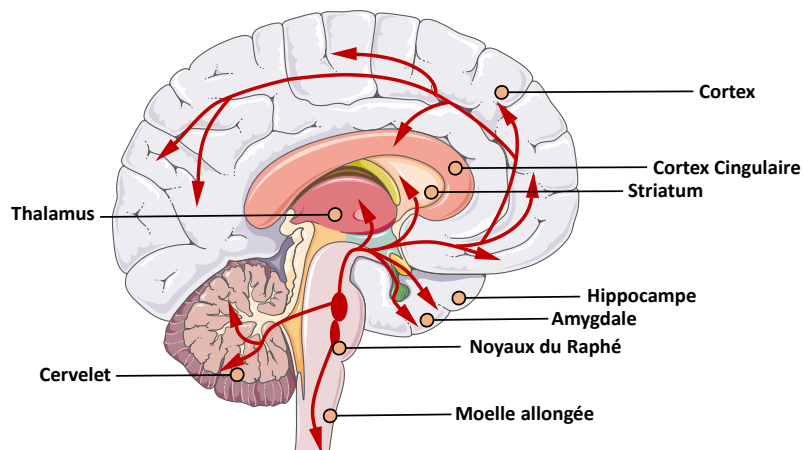


Figure 2: Distribution du système sérotoninergique central

⁷ Fidalgo, S.; Ivanov, D. K.; Wood, S. H. *Biogerontology* **2013**, *14* (1), 21–45.

Dans les neurones sérotoninergiques, la 5-HT est stockée dans les vésicules synaptiques grâce à un transporteur vésiculaire nommé VMAT pour Vesicular MonoAmine Transporter. Les VMAT-1 et VMAT-2 sont des protéines présentes respectivement en périphérie et dans le SNC. Ce sont des transporteurs antiports qui utilisent une H⁺-ATPase et un gradient de proton pour permettre le passage membranaire du cytosol cellulaire vers le milieu intra-vésiculaire. En présence d'un influx nerveux, la 5-HT est libérée par exocytose dans la fente synaptique et peut dès lors se fixer sur les récepteurs sérotoninergiques (5-HTR). Ces derniers sont localisés sur le neurone postsynaptique et permettent la diffusion de l'influx nerveux du neurone présynaptique au neurone postsynaptique. On note que la quantité de 5-HT dans la fente synaptique est modulée par un transporteur membranaire sélectif, le SERT (Serotonin Transporter), permettant de recapturer jusqu'à 80% de la 5-HT libérée. Son action est complétée par la présence de récepteurs pré-synaptiques qui provoquent un rétrocontrôle négatif et inhibent la libération de sérotonine supplémentaire par diminution du potentiel d'action (PA).⁸

Enfin, la 5-HT est catabolisée en un métabolite stable : l'acide 5-hydroxyindole acétique (5-HIAA). Elle suit une voie enzymatique mobilisant successivement une monoamine oxydase de type A (MAO-A) puis une aldéhyde déshydrogénase (Figure 3). La 5-HIAA est excrétée dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) avant de rejoindre la circulation sanguine et d'être éliminée par voie urinaire. Actuellement, elle constitue un marqueur prédictif d'une production anormale de 5-HT et présente un intérêt notamment en oncologie.⁹

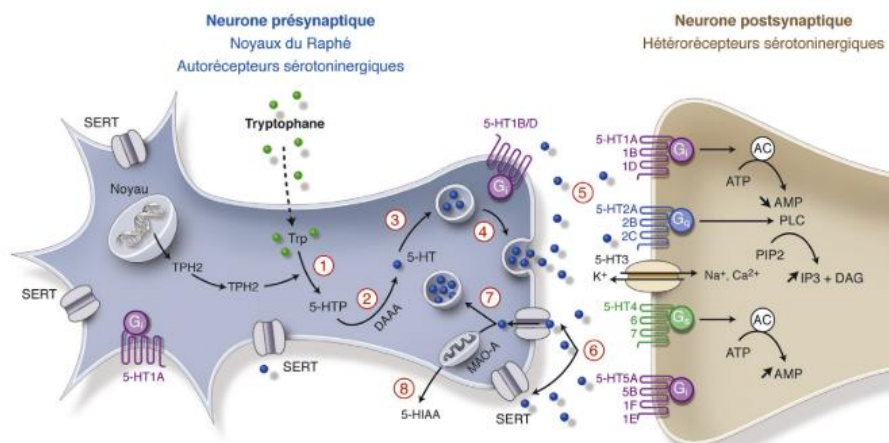


Figure 3: Cycle de la sérotonine⁸

Dans le SNC, la sérotonine est impliquée dans de nombreux processus physiologiques comme la régulation des comportements alimentaires, l'anxiété, l'impulsivité, la thermorégulation, la mémorisation ou encore l'apprentissage.¹⁰ De plus, de nombreux désordres neuropsychiatriques sont

⁸ David, D. J.; Gardier, A. M. *Encephale*. **2016**, *42* (3), 255–263.

⁹ Kvols, L. K.; Buck, M. *Am. J. Med.* **1987**, *82* (5), 77–83.

¹⁰ Meneses, A.; Liy-Salmeron, G. *Rev. Neurosci.* **2012**, *23* (5–6), 543–553.

intimement liés à la régulation du système sérotoninergique comme la dépression¹¹, l’anorexie et la maladie d’Alzheimer. C’est pourquoi, il est devenu ces dernières décennies, une cible de choix en thérapie et en recherche *via* l’étude de ces récepteurs.

2. Les récepteurs sérotoninergiques

Les récepteurs sérotoninergiques ou 5-hydroxytryptamine (5-HTR) sont classés en sept familles (5-HT₁R à 5-HT₇R) subdivisées en 14 sous-types.^{12,13} Leurs structures, leurs fonctions, les mécanismes de transduction du signal et leurs effets pharmacologiques sont à la base de leur classification. A l’exception du 5-HT₃R qui est un récepteur ionotrope, tous les autres font partie de la superfamille des récepteurs métabotropiques constitués de 7 hélices transmembranaires hydrophobes et couplés à une protéine G (RCPG). Ils sont classifiés, comme les récepteurs aux monoamines et bien d’autres types, dans la famille des récepteurs à la rhodopsine (branche α).¹⁴ Malgré leur appartenance à la même famille, il existe de grandes variations entre les différents sous-types de 5-HTR nécessitant de discriminer leur détection au sein du SNC. Les recherches réalisées ces dernières décennies ont facilité leur caractérisation et ont abouti au développement de nombreux radiotraceurs affins et spécifiques de ces cibles (Tableau 1).

Récepteurs	Transduction du signal	Localisation	Implication biologique	Principaux radiotraceurs
5-HT _{1A}	G _{i/o} (\downarrow AMPC)	NR, Cpf, HC, AM, Ci	Plasticité neuronale Mémorisation Apprentissage Anxiété, dépression	[¹¹ C]WAY100635 [¹⁸ F]MPPF [¹¹ C]CUMI-101 [¹⁸ F]F13640
5-HT _{1B}		Sn, Pu, HC, C, Gp	Mémorisation Apprentissage Agressivité	[¹¹ C]AZ10419369 [¹¹ C]P943
5-HT _{1D}		Gp, Gb, Sn, VP	Douleur	-
5-HT _{1E}		C, Pc	nd	-
5-HT _{1F}		C, Pc, NAc, BO, To, NR, T	Douleur	-
5-HT _{2A}	G _q (\uparrow IP ₃ /DAG)	C, HC, Nc	Dépression Anxiété	[¹⁸ F]Altanserin [¹⁸ F]Setoperone

¹¹ Yohn, C. N.; Gergues, M. M.; Samuels, B. A. *Mol. Brain* **2017**, *10* (1), 28.

¹² Nichols, D. E.; Nichols, C. D. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (5), 1614–1641.

¹³ Hoyer, D.; Clarke, D. E.; Fozard, J. R.; Hartig, P. R. *et al. Pharmacol. Rev.* **1994**, *46* (2), 157–203.

¹⁴ Fredriksson, R.; Lagerström, M. C.; Lundin, L.-G.; Schiöth, H. B. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63* (6), 1256–1272.

			Schizophrénie	[¹¹ C]MDL100907 [¹¹ C]CIMBI-36 [¹²³ I]R91150
5-HT_{2B}		Cer, AM	Anxiété Psychoses	-
5-HT_{2c}		C, HC, AM, PC, Nac, NR, Sn	Mémoire Prise alimentaire Psychoses, douleurs	-
5-HT₃	Canal cationique non sélectif	AP, Cen, SL	Douleur Nausées Vomissement	[¹¹ C]Granisetron [¹²⁵ I]DAIZAC
5-HT₄	G _s (↑ AMPC)	Nc, Gp, Pu, HC, Sn, AM, Nac, To, Cf	Mémorisation Apprentissage MA Dépression Anorexie	[¹²³ I]SB207710 [¹¹ C]SB207145 [¹⁸ F]MNI-698 [¹⁸ F]MNI-699
5-HT_{5A}	G _{i/o} (↓ AMPC)	C, HC, BO, Cer	Motricité Sommeil	-
5-HT₆		To, Nac, Nc, Pu, HC, Sn, Cf, T	Mémorisation Apprentissage Dépression Anxiété Obésité	[¹¹ C]GSK215083 [¹⁸ F]2FNQ1P
5-HT₇	G _s (↑ AMPC)	T, HC, AM, HT, C	Mémorisation Apprentissage Thermorégulation MA Schizophrénie	[¹⁸ F]2FP3 [¹⁸ F]ENL30 [¹¹ C]CIMBI-701

Tableau 1: Description des 5-HTR et leurs radiotraceurs

Abbreviations : AM, Amygdale ; AP, Area postrema ; BO, Bulbe olfactif ; C, Cortex ; Cen, Cortex entorhinal ; Cer, Cervelet ; Cf, Cortex frontal ; Ci, Colliculus inférieur ; Cpf, Cortex pré-frontal ; Gb, Ganglions de la base ; Gp, Globus pallidus ; HC, Hippocampe ; HT, Hypothalamus ; NAC, Noyaux accubens ; Nc, Noyaux caudés ; NR, Noyaux du Raphé ; PC, Plexus choroïde ; Pc, Putamen caudé ; Pu, Putamen ; SL, Système limbique ; Sn, Substance noire ; T, Thalamus ; To, Tubercule olfactif.

2.1 Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Les protéines membranaires exprimées à la surface cellulaire constituent un support de communication déterminant entre le milieu extracellulaire et le cytosol. Il en existe une grande variété tels que des récepteurs, des canaux, des transporteurs et des pompes. Parmi elles, les RCPG forment l'une des familles de protéines les plus diversifiées qui, par ailleurs, représentent environ 3% du génome humain et sont codés par plus de 800 gènes chez l'homme.¹⁴ Ils sont notamment présents dans de nombreux systèmes neuronaux différents comme le système muscarinique, adrénérique, histaminique et sérotoninergique.

La structure des RCPG se divise en 3 parties : la région extracellulaire, constituée de l'extrémité N-terminale et de 3 boucles extracellulaires (e1 à e3), sert de façon générale à moduler l'accès du ligand (Lg) sur son site de fixation ; la région transmembranaire (TM), constituée de 7 hélices α (TMs I-VII), forme le noyau structurel du récepteur et permet la transduction du signal par modification de sa conformation tridimensionnelle. Enfin la région intracellulaire, formée de 3 boucles (i1 à i3), d'une hélice intracellulaire (hélice VIII) et du domaine C-terminal de la protéine, sert d'interface avec les protéines cytosoliques et dans ce cas précis la protéine G.¹⁵ Toutefois, il est important de souligner que cette interaction avec la protéine G n'est pas la seule existante. Au début des années 2000, d'importantes découvertes ont permis de mettre en évidence de nombreuses interactions entre les RCPG et des protéines solubles ou transmembranaires nommées GIPs (GPCR interacting proteins).

Ces GIPs ont des rôles multiples et peuvent diriger les RCPG vers des compartiments cellulaires spécifiques, les assembler en grands complexes nommés « réceptosomes » ou contrôler leur distribution au sein même de la membrane plasmique.¹⁶ Ils interagissent principalement au niveau du domaine C-terminal et notamment au niveau de l'hélice α (VIII) qui est cruciale pour le couplage avec la protéine G. L'extrémité C-terminale est nommée « magic tail » de par son importance et par l'étendue de ses fonctions (Figure 4).¹⁷

¹⁵ Venkatakrisnan, A. J. *Top Med Chem*, **2019**, 9, 53–64.

¹⁶ Bockaert, J.; Roussignol, G.; Bécamel, C. *et al. Biochem. Soc. Trans.* **2004**, 32 (5), 851–855.

¹⁷ Bockaert, J.; Marin, P.; Dumuis, A.; Fagni, L. *FEBS Lett.* **2003**, 546 (1), 65–72.

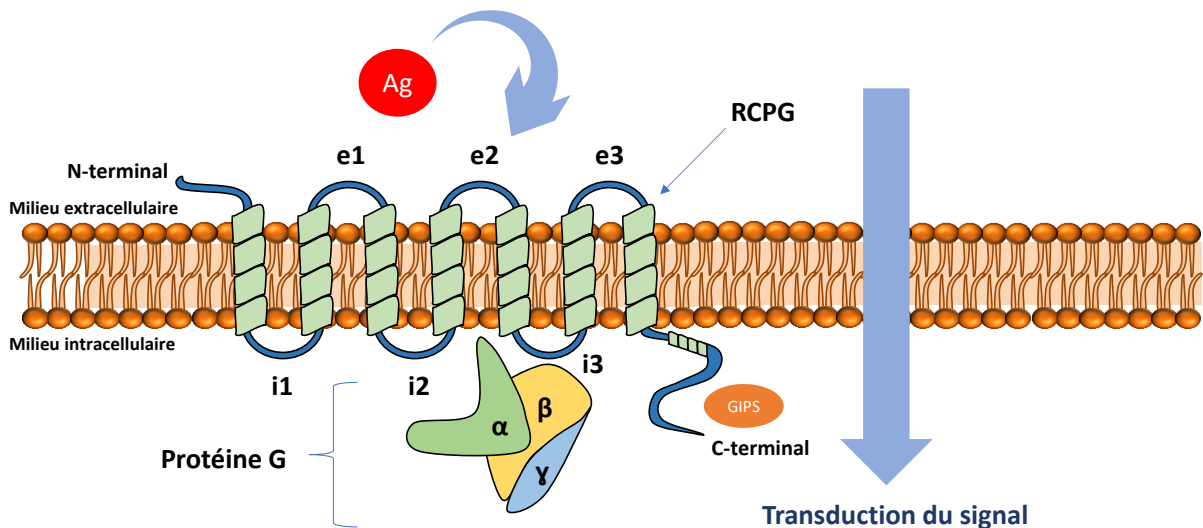


Figure 4: Transduction du signal par les RCPG

Découvertes dans les années 1970 par Alfred G. Gilman et Martin Rodbell, les protéines G ont rapidement suscité l'intérêt de la communauté scientifique et ont fait l'objet du prix Nobel de médecine en 1994.¹⁸ Il s'agit de protéines hétérotrimériques constituées d'une sous-unité $G\alpha$ et d'une sous-unité dimérique $G\beta\gamma$ indissociable. La $G\alpha$ est elle-même divisée en 4 sous-classes ($G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{12/13}$) et possède une homologie structurale et fonctionnelle avec les autres « Guanine nucleotide binding protein ». En absence d'agoniste, le complexe $\beta\gamma$ et la sous-unité α sont associés à une guanosine diphosphaste (GDP). En présence d'un agoniste, le changement de conformation tridimensionnelle du récepteur entraîne une dissociation du GDP sur la sous-unité $G\alpha$ permettant son remplacement par une guanosine triphosphate (GTP). Cette nouvelle interaction entraîne des modifications de la protéine G se traduisant par la dissociation de $G\alpha$ et du complexe $G\beta\gamma$. Ces derniers sont dès lors disponibles et capables d'interagir avec les protéines effectrices (canaux ioniques, enzymes) et de réguler leurs fonctions. Ceci se traduit par une cascade de réactions enzymatiques variables, fonction du système étudié, qui permet la transduction et l'amplification d'un signal extracellulaire vers le milieu intracellulaire *via* la production de messagers secondaires.

Une activité GTPasique, inhérente à la $G\alpha$, met fin à l'activation de la protéine G en réassociant le complexe $G\alpha/G\beta\gamma$. Ainsi, elle peut se fixer sur le RCPG à l'état basal c'est-à-dire sans ligand. Ce processus correspond à la fin du signal et permet au récepteur d'être disponible pour la fixation d'un éventuel nouveau ligand (Figure 5).

¹⁸ Gilman, A. G.; Rodbell, M. *Médecine/science* **1994**, *10*, 1183–1884.

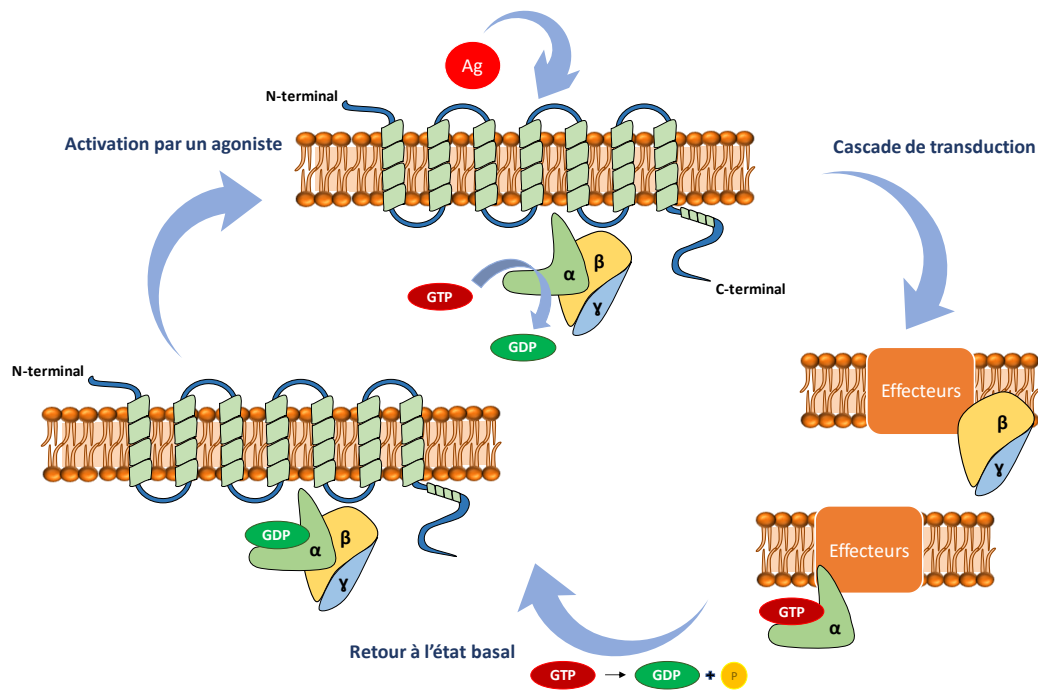


Figure 5: Cycle d'activation des RCPG

Il est important de préciser qu'il existe des phénomènes de désensibilisation des RCPG mettant en jeu des processus de phosphorylation de l'extrémité C-terminale de la protéine. En effet, la β -arrestine a la capacité de reconnaître les résidus de sérine et thréonine préalablement phosphorylés par des kinases spécifiques (GRK). Dans ces conditions, elle a la capacité de découpler le récepteur de la protéine G ou d'internaliser le récepteur activé, ces deux processus entraînant une désensibilisation du neurone concerné.

Les 5-HT_R représentent une large famille de récepteurs impliqués dans de nombreux processus biologiques et dans diverses structures du corps humain. De ce fait, il n'est pas étonnant d'observer différents mécanismes de transduction du signal, dépendants de la protéine G et permettant de réguler de façon positive ou négative la production des messagers secondaires intracellulaires comme l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) ou l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP₃).

- **Récepteurs couplés à une $G\alpha_s$**

L'activation des récepteurs couplés à une protéine G_s (5-HT₄R, 5-HT₆R et 5-HT₇R) entraîne la stimulation d'une protéine transmembranaire : l'adénylate cyclase (AC). Cette protéine est activée spécifiquement par la sous-unité G α et participe activement à la transduction des signaux via l'augmentation de l'AMPC dans le cytoplasme. L'AMPC est synthétisée à partir d'adénosine triphosphate (ATP), en présence de Mg²⁺, libère du pyrophosphate qui est aussitôt hydrolysé rendant la réaction irréversible. La cascade réactionnelle se poursuit par l'activation des protéines kinases A (PKA). Les PKA sont formées de 4 sous-unités (2 sous-unités catalytiques (C) et deux régulatrices (R) et

possèdent la propriété de phosphoryler les acides aminés, notamment les sérines en position 333 des canaux potassiques TREK-1.¹⁹ Cette phosphorylation entraîne la fermeture des canaux qui se traduit par une augmentation du K⁺ intracellulaire et permet la propagation de l'influx nerveux (Figure 6).

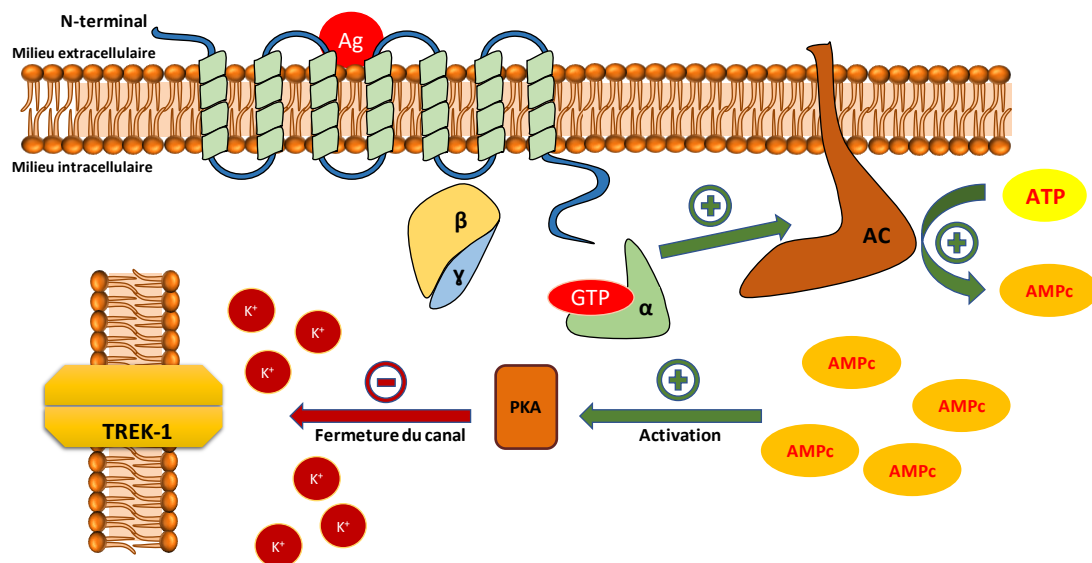


Figure 6: Mécanisme de transduction du signal médié par une protéine Gα_s

- Récepteurs couplés à une Gα_{i/o}

Les récepteurs 5-HT_{1a-f} et 5-HT_{5a} sont couplés à une protéine Gα_{i/o}. Son action est opposée avec celle vue précédemment (Gα_s) puisque la sous-unité Gα_{i/o} provoque l'inhibition de l'AC ce qui induit la diminution de la concentration intracellulaire en AMPc. Cette diminution a pour conséquence directe de diminuer l'activation des PKA entraînant une fuite potassique dans le milieu extracellulaire *via* les récepteurs TREK-1. Il en résulte une hyperpolarisation cellulaire conduisant à l'inhibition de la transmission du signal neuronal. Les fonctions de cette Gα_{i/o} peuvent être bloquées en présence de toxine pertussique, qui empêche la dissociation de Gα et du complexe Gβγ (Figure 7).²⁰

¹⁹ Murbartian, J.; Lei, Q.; Sando, J. J.; Bayliss, D. A. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (34), 30175–30184.

²⁰ Reisine, T. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *39* (10), 1499–1504.

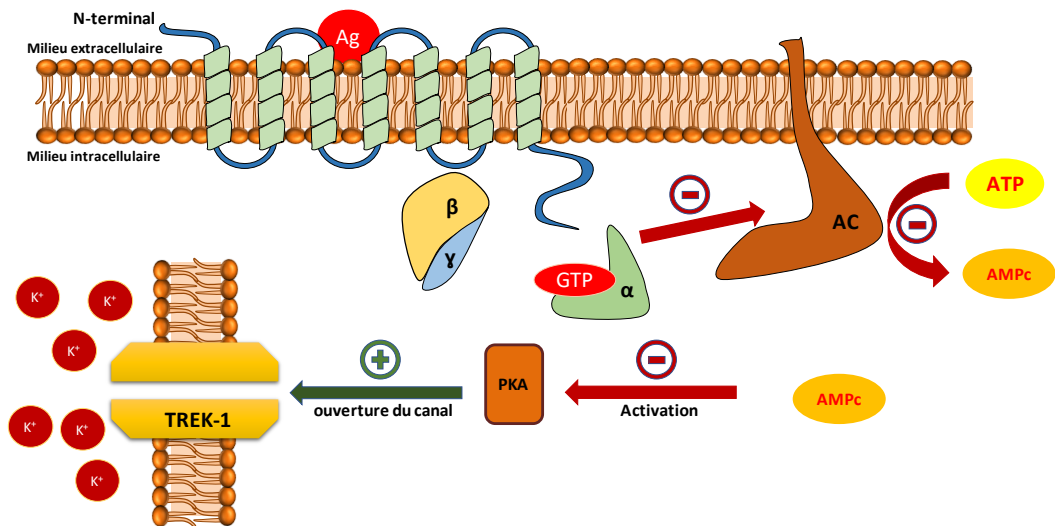


Figure 7: Mécanisme de transduction du signal médié par une protéine $G\alpha_{i/o}$

- **Récepteurs couplés à une $G\alpha_{q/11}$**

Les récepteurs couplés à une protéine $G\alpha_{q/11}$ (5-HT_{2a}R, 5-HT_{2b}R et 5-HT_{2c}R) régulent une cascade enzymatique faisant intervenir une phospholipase C (PLC). Cette enzyme conduit à l'hydrolyse de la phosphatidylinositol biphosphate (PIP₂) membranaire en deux seconds messagers intracellulaires : le diacylglycérol (DAG) et l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP₃). L'IP₃ joue un rôle important dans la libération d'ions calcium (Ca^{2+}) en se fixant sur les récepteurs à l'IP₃ présents sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Cette augmentation de Ca^{2+} dans le cytosol est complétée par l'action de pompes ioniques (permettant le passage de Ca^{2+} extracellulaire) et sont activées par les protéines kinases C (PKC), elles-mêmes activées par les DAG synthétisés préalablement (Figure 8).^{21,12}

Une autre fonction majeure des récepteurs couplés à une protéine G_q , incluant les $G\alpha_{12/13}$, est de réguler les changements structuraux au sein même de la cellule. Ils sont principalement médiés par une activation de la voie de signalisation Rho et seraient impliqués de manière significative dans les processus de développement et de migration cellulaire par l'activation des 5-HT₂R.²²

²¹ Conn, P. J.; Sanders-Bush, E. *Neuropharmacology* **1984**, *23* (8), 993–996.

²² Sah, V. P.; Seasholtz, T. M.; Sagi, S. A.; Brown, J. H. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2000**, *40* (1), 459–489.

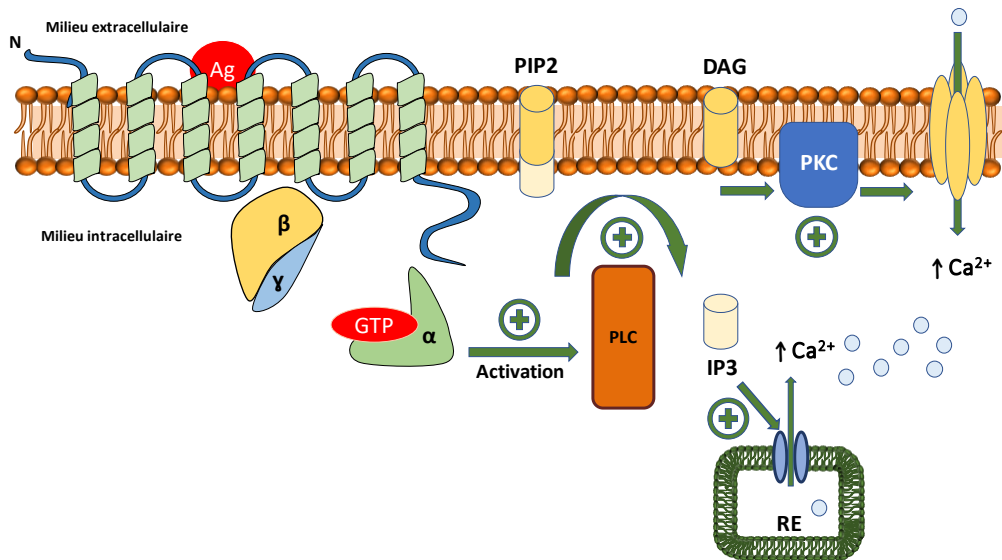


Figure 8: Mécanisme de transduction du signal médié par une protéine G $\alpha_{q/11}$

2.2 Les récepteurs ionotropes

Parmi les récepteurs sérotoninergiques, le 5-HT₃R est le seul à posséder une structure de type canal ionique. Il appartient à la famille des récepteurs pentamériques (Cys-loop) qui inclut divers types de récepteurs : nicotinique de l'acétylcholine (nAChR), GABA_{A/C} et glycine (GlyR). Il possède une structure composée de 5 sous-unités pseudo-symétriquement disposées autour d'un pore central conducteur de cations (nAChR, 5-HT₃R) ou d'anions (GABA_AR, GABA_CR, GlyR).²³ Il se compose de 3 domaines distincts : extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire (Figure 9).

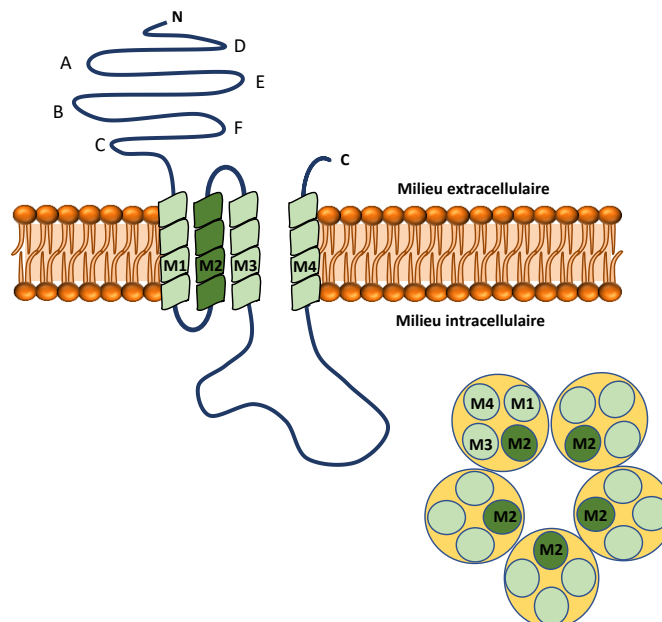


Figure 9: Structure du récepteur 5-HT₃

²³ Lester, H.; Dibas, M.; Dahan, D.; Leite, J.; Dougherty, D. *Trends Neurosci.* **2004**, *27* (6), 329–336.

Le domaine extracellulaire contient le site de fixation des ligands des 5-HT₃R et constitue actuellement une cible de choix dans le traitement de certaines pathologies comme la migraine. Il est composé de 3 boucles (A-C) et de 3 feuillets β (D-F) complémentaires avec la sous-unité avoisinante.²⁴

Le domaine transmembranaire constitue le corps du canal ionique et se décompose en 4 hélices α hydrophobes (M1-M4). Les régions M2 de chacune des sous-unités tapissent la face interne du pore et sont responsables de la sélectivité ionique et du déclenchement de son ouverture.

Le domaine intracellulaire est constitué d'une grande boucle reliant les hélices α M3 et M4. Cette zone demeure la moins connue actuellement, toutefois des études ont prouvé qu'elle n'est pas essentielle dans l'expression du canal puisqu'elle peut être remplacée par d'autres linkers.²⁵

2.3 Les récepteurs sérotoninergiques de type 4 (5-HT₄R)

2.3.1 Découverte et identification du 5-HT₄R

Après une longue période de scepticisme autour de son existence, le 5-HT₄R a été découvert par Dumuis *et al.* en 1988.²⁶ Il fut décrit pour la première fois au niveau de l'hippocampe et des colliculis issus de cultures embryonnaires de rat et fut identifié comme un récepteur à la sérotonine permettant d'augmenter la production d'AMPc intracellulaire *via* l'activation d'une AC. Toutefois, ce dernier possédait des différences importantes avec les récepteurs identifiés à l'époque (5-HT₁R, 5-HT₂R et 5-HT₃R) puisqu'il ne répondait pas aux antagonistes de référence de ces mêmes récepteurs. Le Tropicsetron (antagoniste 5-HT₃R) était la seule exception et induisait une réponse très modérée excluant la possibilité qu'il puisse s'agir d'une liaison avec le 5-HT₃R. A contrario, les composés appartenant à la famille des benzamides (Métoclopramide, Cisapride, Renzapride et Zacopride) furent rapidement identifiés comme de puissants agonistes permettant de faire le lien avec des récepteurs présents dans l'iléon de cochon d'Inde qui n'avaient pas pu être classés jusque-là. Très rapidement, de nouveaux antagonistes spécifiques des 5-HT₄R furent identifiés : le SDZ 205557 en série benzamide et le DAU 6215 en série benzimidazole. Ainsi, ces composés furent utilisés pour le caractériser permettant d'identifier de nouvelles localisations notamment au niveau de l'œsophage de rat, le côlon de cobaye et dans les cellules des corticosurrénales humaines et de cochon. Cette exploration s'intensifia dans les années 1990 avec la détermination de la distribution des 5-HT₄R centraux (chez le rat, souris, cochon d'Inde, singe et chez l'homme) issus du développement de radiotraceurs spécifiques de cette cible : [³H]GR113808, [¹²⁵I]SB207710, [³H]R116712 et [³H]Prucalopride.²⁷

²⁴ Thompson, A. J.; Lummis, S. C. R. *Expert Opin. Ther. Targets* **2007**, *11* (4), 527–540.

²⁵ Jansen, M.; Bali, M.; Akabas, M. H. *J. Gen. Physiol.* **2008**, *131* (2), 137–146.

²⁶ Dumuis, A.; Bouhelal, R.; Sebben, M.; Cory, R.; Bockaert, J. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34* (6), 880–887.

²⁷ Bockaert, J.; Claeysen, S.; Compan, V.; Dumuis, A. *CNS Neurol. Disord.* **2004**, 39–51.

2.3.2 Clonage et identification des isoformes

Le gène du 5-HT₄R fut cloné pour la première fois par Gérald *et al.* en 1995 et permit d'identifier, chez le rat, la présence de deux ADNc de tailles différentes.²⁸ Le premier, de 387 acides aminés fut nommé préalablement 5-HT_{4s} (S = short) et le deuxième de 406 résidus fut nommé 5-HT_{4L}. En accord avec les recommandations NC-IUPHAR, ils furent renommés 5-HT_{4a} et 5-HT_{4b}. Les travaux de Van den Wyngaert *et al.* corrigèrent les erreurs de séquençage du 5-HT_{4b}R qui se révéla n'avoir qu'un seul résidu surnuméraire comparativement au 5-HT_{4a}R (388 résidus).²⁹

Le gène humain codant pour les 5-HT₄R est situé sur le bras long du chromosome 5 (bande q31-q33) et présente une structure complexe puisqu'il comporte au moins 38 exons et une extrémité 5' non codante d'environ 500 kb. Parmi les gènes codant pour les RCPG, ce gène est probablement un des plus grand avec une longueur totale de 700Kb.³⁰

De nombreux laboratoires étudièrent les parties codantes du gène *via* les ADNc (Acide désoxyribonucléique complémentaire) et les isolèrent dans plusieurs espèces comme le rat, la souris et chez l'homme. Après alignement des parties C-terminales, cette approche révéla des divergences de séquences à partir de la leucine en position 358 (L³⁵⁸).²⁷ Ces modifications sont la résultante de variations d'épissage des protéines et explique la présence de plusieurs isoformes. Ainsi, quatre isoformes ont été clonés chez la souris (a,b,e,f)³¹ et trois chez le rat (a,b,e).³²

Les nombreuses études réalisées chez l'homme ont identifié 10 isoformes du 5-HT₄R (Figure 10) :

- Les isoformes 5-HT_{4a,b,c,d,e,f,g,n} se définissent par des variations d'épissage de l'extrémité C-terminale de la protéine à partir de la L³⁵⁸.³³
- L'isoforme 5-HT_{4hb} possède une séquence identique à l'isoforme 5-HT_{4b} avec une insertion supplémentaire de 14 acides aminés dans la seconde boucle extracellulaire du récepteur.
- L'isoforme 5-HT_{4i} possède une structure commune avec le 5-HT_{4b} avec une addition de 120 paires de bases sur l'extrémité C-terminale (40 acides aminés).³⁴

²⁸ Gerald, C.; Adham, N.; Kao, H. T.; Olsen, M. A., *et al.* *EMBO J.* **1995**, *14* (12), 2806–2815.

²⁹ Van den Wyngaert, I.; Gommeren, W.; Verhasselt, P.; *et al.* *J. Neurochem.* **2002**, *69* (5), 1810–1819.

³⁰ Hiroi, T.; Hayashi-Kobayashi, N.; Nagumo, S., *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *289* (2), 337–344.

³¹ Claeysen, S.; Sebben, M.; Journot, L.; Bockaert, J.; Dumuis, A. *FEBS Lett.* **1996**, *398* (1), 19–25.

³² Claeysen, S.; Sebben, M.; Becamel, C.; Bockaert, J.; Dumuis, A. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *55* (5), 910–920.

³³ Blondel, O.; Vandecasteele, G.; Gastineau, M. *et al.* *FEBS Lett.* **1997**, *412* (3), 465–474.

³⁴ Brattelid, T.; Kvingedal, A. M.; Krobert, K. A.; *et al.* *Naunyn. S. Arch. Pharmacol.* **2004**, *369* (6), 616–628.

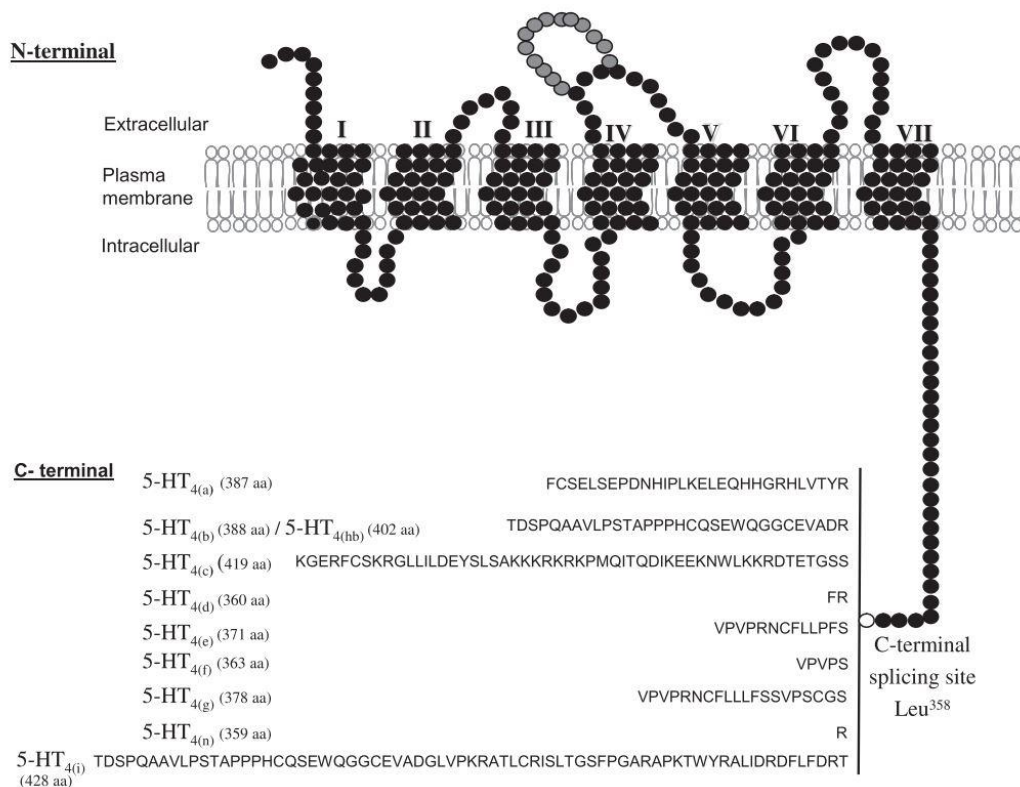


Figure 10: Variations d'épissage du gène humain des 5-HT₄R.³⁵

Ces modifications structurales expliquent la présence de variations à la fois dans la localisation de ces récepteurs mais aussi dans la cascade de transduction médiée par la protéine G. Claeysen *et al.* démontra que les variants d'épissage possédant une séquence C-terminale courte (5-HT_{4e}R et 5-HT_{4f}R) ont une activité constitutive supérieure aux variants d'épissage possédant une extrémité C-terminale plus importante (5-HT_{4a}R et 5-HT_{4b}R).³² Malgré cela, il n'existe que très peu de différences pharmacologiques entre ces isoformes puisque le domaine transmembranaire permettant la liaison avec le ligand est préservé pour chacun d'entre eux (même pour le 5-HT_{4hb}).

2.3.3 Voie de signalisation et de transduction du signal

Comme expliqué précédemment, le 5-HT₄R est couplé à une protéine G_{αs}. L'activation du récepteur par un agoniste conduit à une cascade réactionnelle se traduisant par une augmentation de l'AMPC dans le milieu intracellulaire. L'AMPC entraîne la phosphorylation des PKA qui vont avoir une action directe sur la fermeture des canaux potassiques. Cette fermeture des canaux potassiques entraîne l'accumulation du K⁺ intracellulaire qui génère une excitabilité neuronale. Toutefois, il ne s'agit pas de la seule voie d'activation médiée par cette protéine G puisque l'AMPC a la propriété d'activer une autre protéine : Exchange Protein Directly Activated by cAMP Type-1 (EPAC1).

³⁵ Berque-Bestel, I.; Lezoualc'h, F. *Emerging Drugs and Targets for Alzheimer's disease*; 2010, Vol-2, 169–190.

La famille de protéines EPAC est composée de EPAC1 et EPAC2 et fut identifiée pour la première fois en 1998 par De Rooij *et al.*³⁶ Elle constitue un facteur d'échange qui catalyse le passage du GDP en GTP et active certaines petites protéines G à activité GTPasique de la super-famille R-Ras tel Rap1 (Ras-proximate-1). Une fois activée, Rap-1 stimule un facteur d'échange nucléotidique (STEF), forme un complexe qui active à son tour une petite GTPase Rho : Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1). Cette enzyme favorise le clivage de l'APP (Amyloid Precursor Protein) par l' α -sécrétase et augmente la libération du fragment sAPP α .³⁷

Le fragment sAPP α présente un intérêt tout particulier puisqu'il possède des propriétés neuroprotectrices notamment dans la MA (voie non amyloïdogenique). Il est important de souligner que dans le développement de cette pathologie, il y a un dérèglement entre les voies amyloïdogenique et non amyloïdogenique se traduisant par une libération de fragments A β *via* l'action d'une γ -sécrétase. Ces fragments A β (non solubles) s'assemblent en feuillets β formant ainsi les plaques séniles responsables de la mort neuronale (Figure 11).³⁸

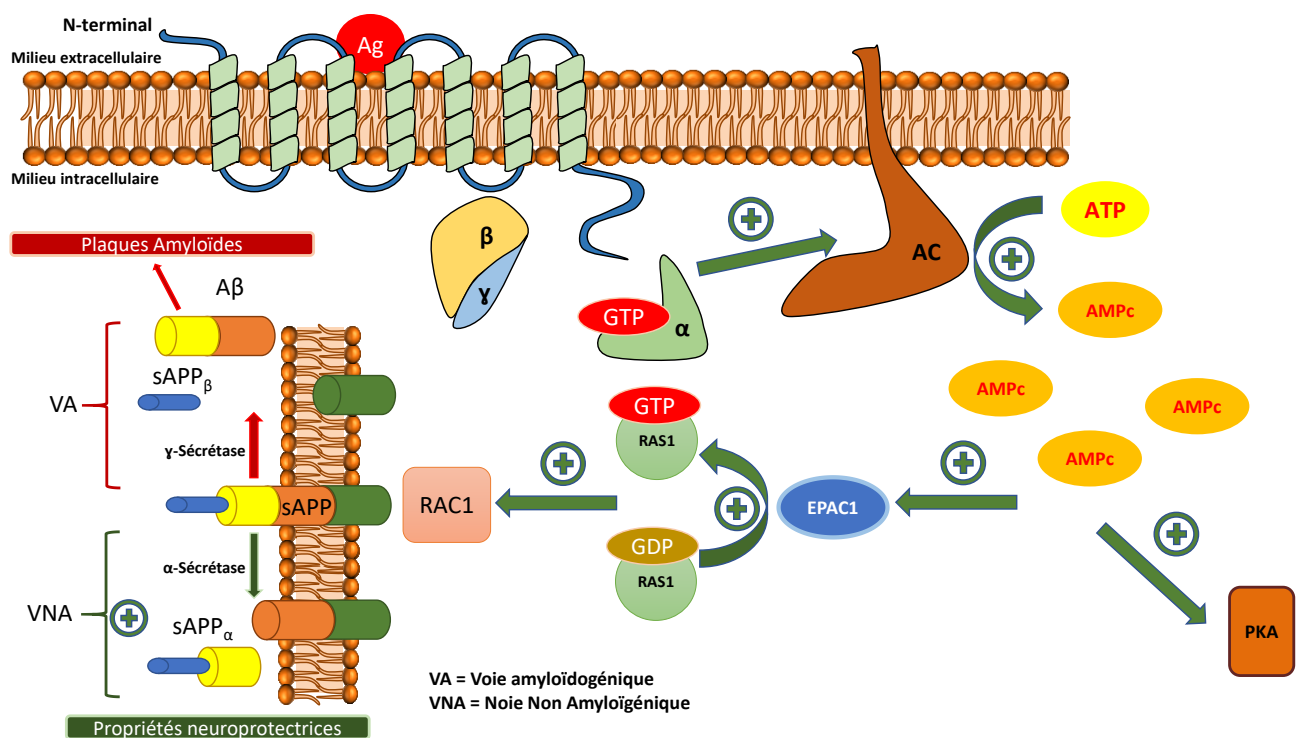


Figure 11: Voie de transduction du signal médiée par EPAC1

³⁶ De Rooij, J.; Zwartkruis, F. J. T.; Verheijen, M. H. G.; Cool, R. H.; *et al.* *Nature* **1998**, 396 (6710), 474–477.

³⁷ Lezoualc'h, F.; Robert, S. J. *Exp. Gerontol.* **2003**, 38 (1–2), 159–166.

³⁸ Bockaert, J.; Claeysen, S.; Compan, V.; Dumuis, A. *Neuropharmacology* **2008**, 55 (6), 922–931.

Ce mécanisme est révélateur de l'intérêt porté aux 5-HT₄R vis-à-vis de la MA. Ainsi, de nouvelles stratégies thérapeutiques ont été envisagées se traduisant par un développement intensif de nouveaux agonistes affins et sélectifs pour cette cible.

Enfin, il existe une voie de transduction du signal ne faisant pas intervenir la protéine G. Elle est localisée dans les neurones colliculi, dans les cellules intestinales (Ci), et survient après l'activation des 5-HT₄R par un agoniste. Dans les cellules neuronales (Cn), elle se traduit par l'activation d'une Src tyrosine kinase qui activera elle-même une protéine ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases).³⁹ Dans les cellules intestinales (Caco2 et T84), elle suit une voie faisant intervenir le couple Ca²⁺/Calmoduline et aboutissant à l'activation de l'échangeur Na⁺/H⁺ (NHE) (Figure 12).⁴⁰

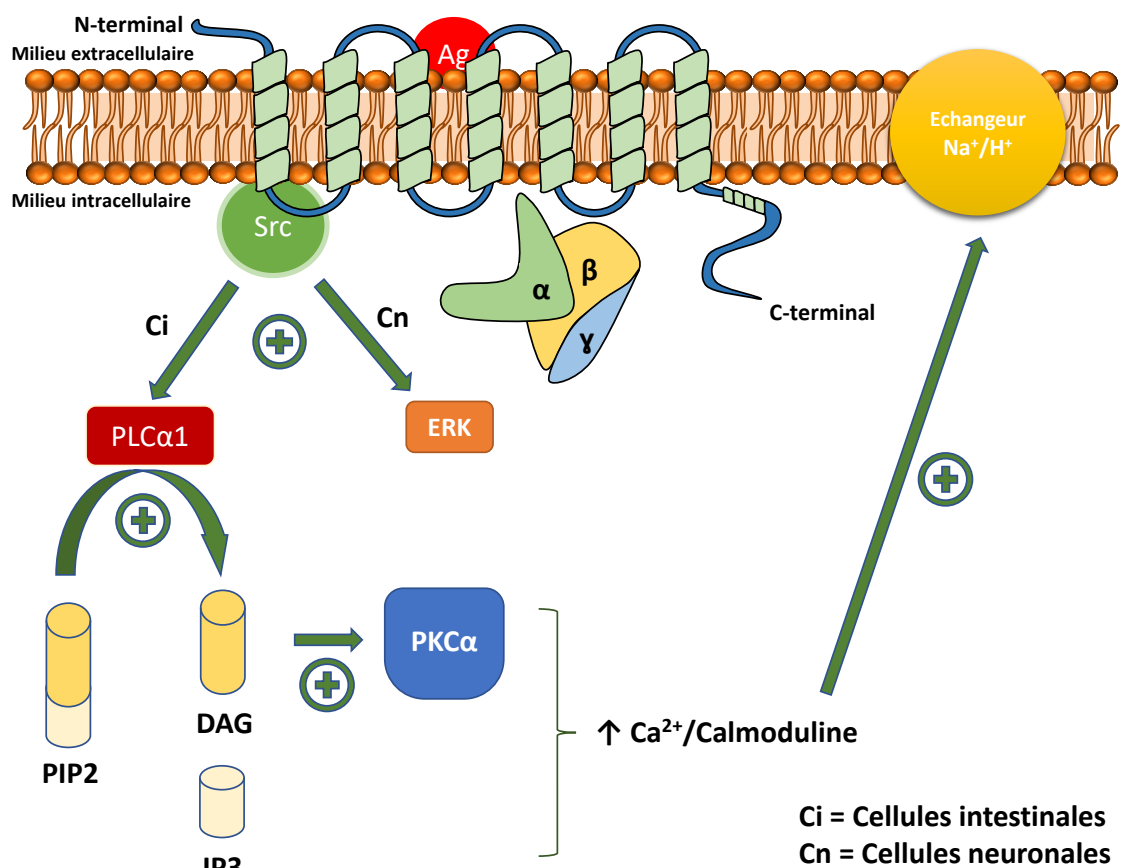


Figure 12: Voie de transduction du signal médié par Src

2.3.4 Localisation et implication biologique des 5-HT₄R

Les récepteurs 5-HT₄R sont localisés d'une part dans le système périphérique, et d'autre part, dans le système nerveux central.

³⁹ Barthe, G.; Gaven, F.; Pellissier, L.; Reiter, E.; Claeysen, S.; Dumuis, A. *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 1979–1991.

⁴⁰ Gill, R. K.; Saksena, S.; Tyagi, S.; Alrefai, W. A.; Malakooti, J. *Gastroenterology* **2005**, *128* (4), 962–974.

Dans le système périphérique, les 5-HT₄R sont présents principalement dans les neurones moteurs et les entérocytes du tractus gastro-intestinal (cellules enterochromaffines), au niveau du tractus urinaire, du cortex surrénalien, des vaisseaux sanguins, du cœur ainsi que dans les poumons.⁴¹ Dans le tractus gastro-intestinal, l'activation du récepteur a une action directe sur le tonus musculaire permettant, en fonction de l'espèce, de relaxer ou de contracter les muscles lisses de la région stimulée. De plus, le 5-HT₄R favorise la libération d'acétylcholine et la relaxation du colon expliquant l'intérêt porté pour certains agonistes comme le Tegaserod (Zelmac®).^{42,43,44} Ce médicament était prescrit chez les patients atteints de constipations ou du syndrome du côlon irritable et fut retiré du marché pour cause d'effets secondaires cardiaques majeurs (allongement du Qt, crise cardiaque, accident vasculaire cérébral). Au niveau du cœur, ces récepteurs sont localisés au niveau des cellules myocardiques de l'Atrium (oreillettes) et ont une action inotrope (capacité à contracter les muscles cardiaques) et chronotrope positif (modification de la fréquence cardiaque).^{45,46} Enfin au niveau du tractus urinaire et cortex surrénal, l'activation des 5-HT₄R a une influence sur la contraction des muscles lisses et stimule la sécrétion et la libération de certaines hormones tels l'aldostérone et la corticostérone.^{47,48}

Dans le SNC humain, les 5-HT₄R sont localisés majoritairement au niveau du système limbique (hippocampe, l'amygdale et l'hypothalamus, noyaux accubens et tubercules olfactifs), des noyaux gris centraux (striatum, putamen et globus pallidus), dans la substance noire et le cortex frontal (Figure 13).^{49,50,51} De nombreuses techniques ont été utilisées afin de déterminer leurs localisations précises au niveau cellulaire (ARNm, études pharmacologiques et électrophysiologiques). Les observations générales montrent une distribution neuronale avec une expression prédominante dans le compartiment somato-dendritique et dans le corps cellulaire des neurones GABAergique au sein du système nigro-striatal (récepteurs post-synaptiques). Dans le cortex, l'hippocampe et l'amygdale, les 5-HT₄R sont localisés sur les neurones cholinergiques (stimulation de la libération d'acétylcholine) ainsi que sur les neurones glutamatergiques. Ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions cognitives

⁴¹ Hegde, S. S.; Eglon, R. M. *FASEB J.* **1996**, *10* (12), 1398–1407.

⁴² Gershon, M. D. *J. Clin. Gastroenterol.* **2005**, *39*, S184–S193.

⁴³ Irving, H. R.; Tan, Y. Y.; Tochon-Danguy, N.; Liu, H.; *et al.* *Life Sci.* **2007**, *80* (13), 1198–1205.

⁴⁴ Kale-Pradhan, P. B.; Wilhelm, S. M. *Pharmacotherapy* **2007**, *27* (2), 267–277.

⁴⁵ Shoemaker, R. G.; Du, X. Y.; Bax, W. A.; Bos, E.; Saxena, P. R. *Eur. J. Pharmacol.* **1993**, *230* (1), 103–105.

⁴⁶ Sanders, L.; Kaumann, A. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1992**, *345* (4), 382–386.

⁴⁷ Lefebvre, H. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1993**, *77* (6), 1662–1666.

⁴⁸ Lefebvre, H.; Contesse, V.; Delarue, C.; Feuilloley, M.; *et al.* *Neuroscience* **1992**, *47* (4), 999–1007.

⁴⁹ Doménech, T.; Beleta, J.; Fernández, A. G.; Gristwood, R. W.; *et al.* *Mol. Brain Res.* **1994**, *21* (1–2), 176–180.

⁵⁰ Bonaventure, P.; Hall, H.; Gommeren, W.; Cras, P.; *et al.* *Synapse* **2000**, *36* (1), 35–46.

⁵¹ Varnäs, K.; Halldin, C.; Pike, V. W.; Hall, H. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2003**, *13* (4), 228–234.

comme l'apprentissage, la mémorisation⁵² ou la plasticité neuronale⁵³ et jouent un rôle prépondérant dans le développement de certaines pathologies comme la dépression⁵⁴, la maladie d'Alzheimer⁵⁵ et l'anorexie.⁵⁶

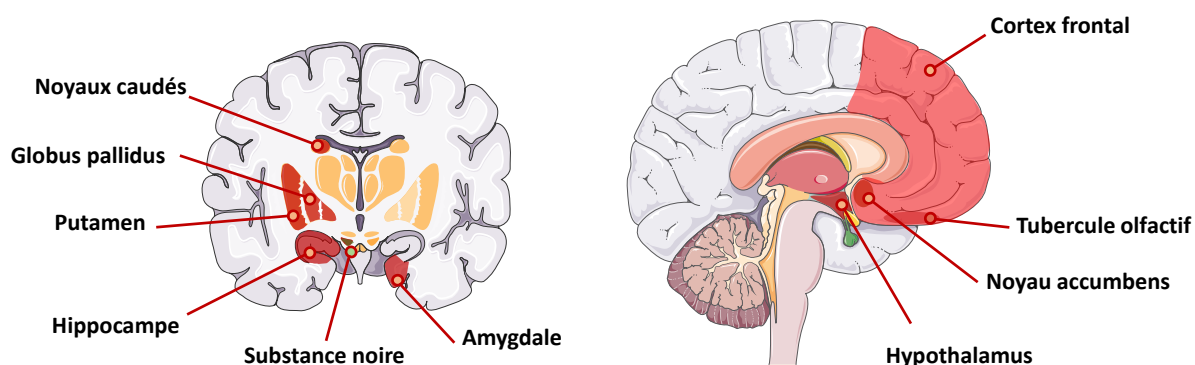


Figure 13: Distribution des 5-HT₄R centraux

2.3.5 Ligands des 5-HT₄R décrits dans la littérature

De nombreux ligands agonistes et antagonistes des 5-HT₄R ont été synthétisés ces deux dernières décennies. En effet, comme décrit dans le paragraphe précédent, leur implication dans de nombreux troubles cognitifs et dans certaines maladies neurodégénératives comme la MA ont fait d'eux une cible de choix en thérapie médicale.

2.3.5.1 Agonistes des 5-HT₄R

Les agonistes affins et sélectifs des 5-HT₄R présentent un intérêt tout particulièrement dans le traitement des maladies neurodégénératives comme la MA *via* l'augmentation de la libération de sAPP α et dans le traitement des troubles digestifs. Dans ce contexte, de nombreuses familles de composés ont été développées : les benzamides, oxadiazoles, quinolones et indazoles.

Les composés formant la famille des benzamides sont tous utilisés pour soigner les troubles intestinaux, possèdent une affinité mixte 5-HT₄R - 5-HT₃R et sont des dérivés du chef de file de cette famille : le Métoclopramide (Primpéran®) (Figure 14).⁵⁷ Ce médicament est utilisé quotidiennement pour traiter les désordres fonctionnels gastro-intestinaux, stimuler la motricité intestinale et prévenir des nausées et vomissements induits par la radiothérapie ou par la prise concomitante de traitements

⁵² King, M.; Marsden, C.; Fone, K. C. F. *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, *29* (9), 482–492.

⁵³ Kemp, A.; Manahan-Vaughan, D. *Cereb. Cortex* **2005**, *15* (7), 1037–1043.

⁵⁴ Rosel, P.; Arranz, B.; Urretavizcaya, M.; Oros, M.; *et al.* *Neuropsychobiology* **2004**, *49* (4), 189–195.

⁵⁵ Reynolds, G. P.; Mason, S. L.; Meldrum, A.; Keczer, S.; *et al.* *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *114* (5), 993–998.

⁵⁶ Jean, A.; Conductier, G.; Manrique, C.; Bouras, C.; *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (41), 16335–16340.

⁵⁷ Bureau, R.; Boulouard, M.; Dauphin, F.; Lezoualc'h, F.; Rault, S. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10* (5), 527–553.

cytotoxiques.⁵⁸ Le **Métoclopramide** ($K_i(s5\text{-HT}_4\text{R}) = 1114 \text{ nM}$) ($5\text{-HT}_4\text{R}$ souris = $s5\text{-HT}_4\text{R}$)⁵⁹ n'est pas spécifique des $5\text{-HT}_4\text{R}$, puisqu'il s'agit d'un neuroleptique (antagoniste des récepteurs dopaminergiques D_2) qui prévient des vomissements par blocage des sites dopaminergiques. Le **Cisapride** (Prepulsid®) ($K_i(h5\text{-HT}_4\text{R}) = 39,9 \text{ nM}$) ($5\text{-HT}_4\text{R}$ humain = $h5\text{-HT}_4\text{R}$) fut découvert plus tardivement et fut commercialisé en 1988 pour traiter les troubles gastro-intestinaux. En 2004, il a été retiré du marché puisqu'il fut mis en cause dans de nombreux troubles graves du rythme. D'autres composés, comme le **Renzapride** ($K_i(h5\text{-HT}_4\text{R}) = 138 \text{ nM}$) et le **Zacopride** ($K_i(h5\text{-HT}_4\text{R}) = 331 \text{ nM}$), furent synthétisés avec pour objectif de rigidifier la structure portant l'azote basique. Aucun d'entre eux n'est actuellement commercialisé.

Une deuxième génération de composés très sélectifs des $5\text{-HT}_4\text{R}$ fut synthétisée en série benzamide. Parmi eux, on retrouve le **Prucalopride** (RESOLOR®) ($K_i(h5\text{-HT}_4\text{R}) = 25,1 \text{ nM}$).⁶⁰ Ce médicament, indiqué dans le traitement symptomatique de la constipation chronique chez la femme pour lesquels les laxatifs n'ont pas les effets escomptés, obtint son AMM en 2009. Le **Mosapride** (Mopride®) est un agoniste sélectif des $5\text{-HT}_4\text{R}$ ($K_i(h5\text{-HT}_4\text{R}) = 199 \text{ nM}$)⁶¹, dont le principal métabolite possède une activité antagoniste des $5\text{-HT}_3\text{R}$. Il est indiqué dans les RGO ainsi que dans le syndrome du côlon irritable et dans les dyspepsies fonctionnelles. Actuellement, il n'est pas commercialisé en France.

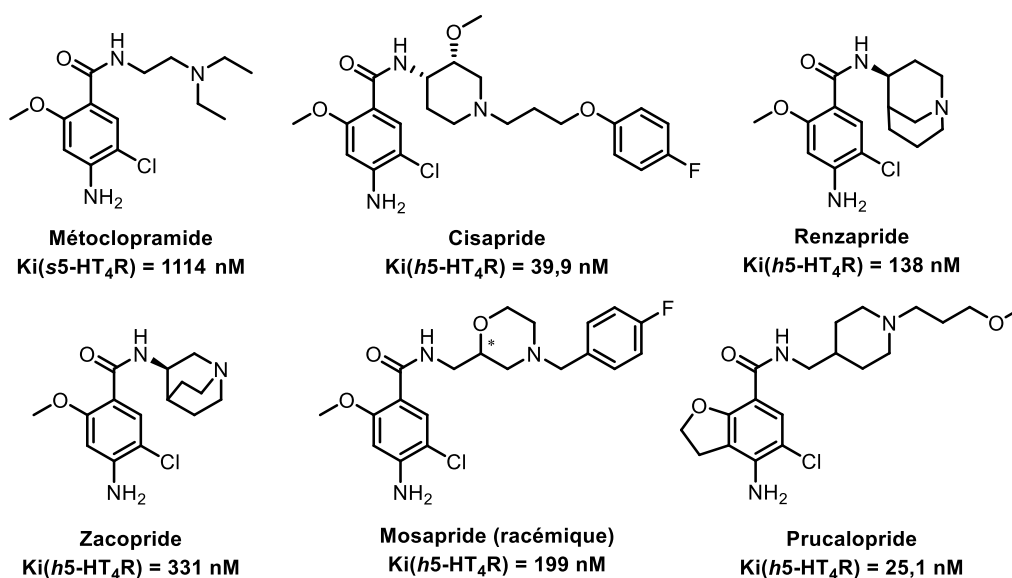


Figure 14: Agonistes des $5\text{-HT}_4\text{R}$ en série benzamide

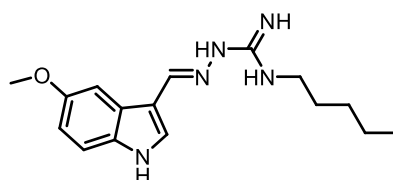
⁵⁸ www.theriaque.org.

⁵⁹ Dumuis, A.; Sebben, M.; Bockaert, J. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* **1989**, *340* (4), 403–410.

⁶⁰ Nirogi, R.; Kandikere, V.; Bhyrapuneni, G.; Saralaya, R.; et al. *J. Pharm. Pharmacol.* **2013**, *65* (5), 704–712.

⁶¹ Bender, E.; Pindon, A.; Van Oers, I.; Zhang, Y.-B.; et al. *J. Neurochem.* **2001**, *74* (2), 478–489.

Un composé en série indolique a été commercialisé en 2002 aux Etats-Unis. Il s'agit du Tegaserod (ZELNORM®) (Figure 15). Ce médicament présentait une affinité mixte pour les 5-HT₄R (Ki(h5-HT₄R = 2,5 nM)⁶⁰, 5-HT₁R et une activité antagoniste pour les 5-HT₂R. Le Tegaserod était indiqué dans le traitement du syndrome du côlon irritable et dans la constipation. Il a été retiré du marché en 2007 pour des raisons semblables au Cisapride, c'est-à-dire, la présence de troubles cardiaques majeurs.



Tegaserod
 Ki(h5-HT₄R) = 2,5 nM

Figure 15: Formule du Tegaserod

La MA représente un enjeu majeur de santé publique puisqu'elle touche plus de 900 000 personnes en France avec un coût annuel moyen de 19 milliards d'euros.⁶² De plus, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement efficace pour soigner cette pathologie. C'est pourquoi, la recherche d'un traitement curatif s'amplifie ces dernières décennies *via* le développement d'agonistes affins et sélectifs des 5-HT₄R. Le SL 65.0155 (Capeserod) est un agoniste partiel des 5-HT₄R (Ki(h5-HT₄R) = 0,6 nM)⁶³ qui démontra un potentiel intéressant dans l'amélioration des phénomènes cognitifs (Figure 16). Ce composé chimique fut testé sur plusieurs modèles animaux (souris TASTPM (souris transgéniques mimant la maladie d'Alzheimer), souris et rats amnésiques par hypoxie) et révéla une amélioration des déficits cognitifs mnésiques de diverses aires cérébrales comme l'hippocampe.^{64,65,66} Les travaux de Marchetti *et al.* complétèrent ces observations en démontrant l'intérêt du SL 65.0155 chez le rat âgé (amélioration significative de la mémoire) et chez le rat présentant des déficits mémoriels issus de lésions au niveau de l'hippocampe (après injection de colchicine).^{67,68} Cette action au niveau de l'hippocampe ne se limite pas aux troubles mnésiques puisqu'une étude additionnelle menée par Tamburella *et al.* révéla les propriétés antidépressives du SL 65.0155 sur le rat.⁶⁹ Des essais cliniques

⁶² <https://alzheimer-recherche.org>.

⁶³ Moser, P. C.; Bergis, O. E.; Jegham, S.; Lothead, A.; *et al.* *Pharmacology* **2002**, *302* (2), 731–741.

⁶⁴ Spencer, J. P.; Brown, J. T.; Richardson, J. C.; Medhurst, A. D.; *et al.* *Neuroscience* **2004**, *129* (1), 49–54.

⁶⁵ Micale, V.; Marco Leggio, G.; Mazzola, C.; Drago, F. *Brain Res.* **2006**, *1121* (1), 207–215.

⁶⁶ Restivo, L.; Roman, F.; Dumuis, A.; Bockaert, J.; *et al.* *MNeuropsychopharmacology* **2008**, *33* (10), 2427–2434.

⁶⁷ Marchetti, E.; Jacquet, M.; Jeltsch, H.; Migliorati, M.; *et al.* *Neurobiol. Learn. Mem.* **2008**, *90* (1), 185–191.

⁶⁸ Marchetti, E.; Jacquet, M.; Escoffier, G.; Migliorati, M.; Dumuis, A.; Bockaert, J. *Brain Res.* **2011**, *1405*, 49–56.

⁶⁹ Tamburella, A.; Micale, V.; Navarria, A.; Drago, F. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **2009**, *33* (7), 1205–1210.

(phase II) furent menés, toutefois aucun article récent ne mentionne son utilisation probablement lié à l'abandon de cette molécule.

Le PF-04995274 (Figure 16) développé par Pfizer est un agoniste partiel des 5-HT₄R humains (Ki(h5-HT₄R) = 0,47 nM) qui fut utilisé dans le cadre d'études cliniques (phase I) pour lutter contre les maladies neurodégénératives comme la MA. Malgré des résultats encourageants et une bonne tolérance chez l'homme et le primate, son développement a été stoppé par Pfizer pour des raisons qui restent inconnues.^{70,71}

Plus récemment, de nouvelles stratégies furent élaborées pour lutter contre cette pathologie. L'une d'entre elles, repose sur la synthèse de molécules ayant la caractéristique de viser plusieurs cibles biologiques simultanément. Cette propriété permet de potentialiser l'effet thérapeutique en agissant sur des voies biologiques différentes et limiter l'apparition d'effets secondaires issus de la prise concomitante de plusieurs principes actifs. C'est dans ce contexte que le Donécopride (Figure 16) a été synthétisé au Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN). D'une part, ce candidat médicament possède une forte affinité pour les 5-HT₄R (Ki(h5-HT₄R) = 1,6 nM) permettant d'augmenter la libération de sAPP α (action neuroprotectrice). D'autre part, il inhibe l'acétylcholine estérase (AChE) et limite la métabolisation de l'acétylcholine (ACh) qui est fortement diminuée à cause de la mort neuronale.^{72,73}

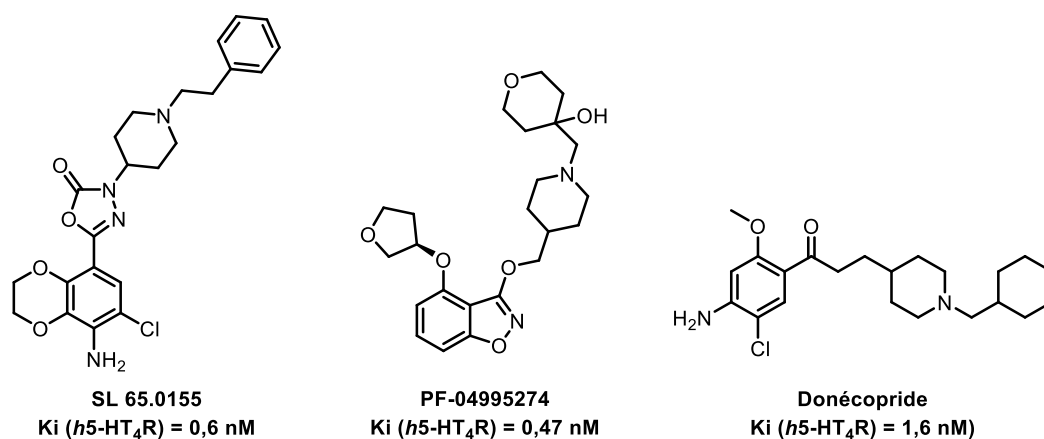


Figure 16: Agonistes des 5-HT₄R étudiés dans le cadre de la MA

2.3.5.2 Antagonistes des 5-HT₄R

Les antagonistes affins et sélectifs vis-à-vis des 5-HT₄R ne présentent pas d'intérêt particulier dans le traitement des maladies neurodégénératives, toutefois ils ont largement participé à la caractérisation

⁷⁰ Nicholas, T.; Duvvuri, S.; Leurent, C.; Raunig, D.; *et al. Adv. Alzheimer's Dis.* **2013**, 02 (03), 83–98.

⁷¹ Uto, Y. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2015**, 25 (6), 643–662.

⁷² Lecoutey, C.; Hedou, D.; Freret, T.; Giannoni, P.; *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, 111 (36), E3825–E3830.

⁷³ Rochais, C.; Lecoutey, C.; Hamidouche, K.; Giannoni, P. *et al. Br. J. Pharmacol.* **2020**, 177 (9), 1988–2005.

et la détermination de la distribution des 5-HT₄R centraux et périphériques. Ils agissent en se fixant sur le site de liaison du récepteur mais à la différence des agonistes, ils ne provoquent pas la transduction du signal à l'intérieur de la cellule. L'occupation du récepteur empêche la fixation du ligand endogène (la 5-HT) et inhibe son action physiologique. Cette fixation sur le récepteur n'est pas irréversible et explique les phénomènes de compétition observés entre l'antagoniste et la 5-HT. En 2002, Bureau *et al.* proposèrent un pharmacophore (3DQSAR) pour les antagonistes des 5-HT₄R et mirent en évidence plusieurs caractéristiques structurales indispensables à respecter (Figure 17)⁷⁴:

- La présence d'un groupement aromatique
- Un groupe hydrophobe porté sur le noyau aromatique pouvant être de nature variable
- Un groupement accepteur de liaison hydrogène (HBA)
- La présence d'un centre basique qui est dans la plupart des cas un azote
- Une chaîne latérale hydrophobe de structure variable

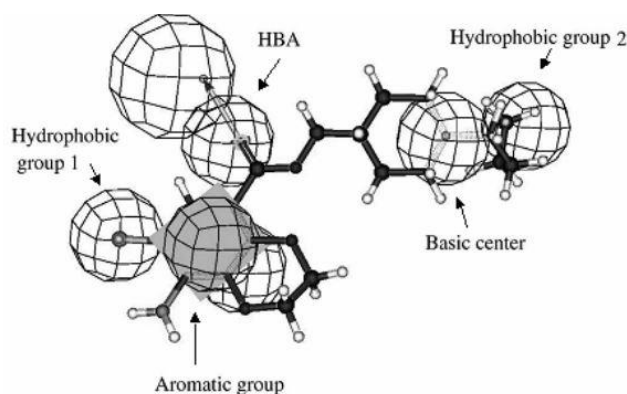


Figure 17: Pharmacophore des antagonistes des 5-HT₄R⁷⁴

Le tropisetron (ICS 205930) est le premier antagoniste des 5-HT₄R à avoir été identifié. Son affinité était très modérée ($K_i(5\text{-HT}_4\text{R}) = 315 \text{ nM}$) et peu sélective puisqu'à l'origine il s'agissait d'un antagoniste puissant des 5-HT₃R ($K_i(5\text{-HT}_3\text{R}) = 0,1 \text{ nM}$). En 1988, Il fut utilisé par le Dr. Dumuis pour identifier le récepteur 5-HT₄R, toutefois son manque de sélectivité ne permettait pas de déterminer leur localisation précise.²⁶ C'est pourquoi, la recherche s'orienta vers la synthèse de nouveaux ligands plus sélectifs de ces récepteurs. Le GR113808, est le premier antagoniste affin et sélectif vis-à-vis des 5-HT₄R ($K_i(h5\text{-HT}_4\text{R}) = 0,53 \text{ nM}$)⁷⁵ à avoir été synthétisé. Il permet d'affiner considérablement les études *via* l'utilisation de son homologue tritié, le [³H]GR113808. Les autoradiographies réalisées chez l'homme et l'animal précisèrent la répartition des 5-HT₄R dans les diverses aires cérébrales étudiées

⁷⁴ Bureau, R.; Daveu, C.; Lemaître, S.; Dauphin, F.; *et al.* *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, *42* (4), 962–967.

⁷⁵ Curtet, S.; Soulier, J.-L.; Zahradnik, I.; Giner, M.; *et al.* *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (20), 3761–3769.

révélant notamment leur diminution dans la maladie d'Alzheimer et dans la maladie de Parkinson.^{76,77,78} Actuellement, il est utilisé comme antagoniste de référence dans les tests compétitifs de binding visant à déterminer l'affinité *in vitro* des ligands.

Le SB-204070 est un autre exemple d'antagoniste très affiné et sélectif des 5-HT₄R (K_i (h5-HT₄R) = 0,015 nM).⁷⁹ Ce dérivé benzoate se révéla être un outil intéressant pour les études menées sur le cochon d'Inde (guinea pig) et le chien.^{80,81,82} Toutefois, ce composé n'est plus utilisé en raison de son instabilité métabolique qui limite grandement son temps d'utilisation (dégradation de la fonction ester).

Enfin, le SB-207266 (Piboserod) est un candidat médicament très sélectif des 5-HT₄R.^{83,84} L'activation de ces récepteurs au niveau des cellules de l'oreille peut entraîner l'apparition de troubles cardiaques comme des arythmies auriculaires. C'est pourquoi, son action antagoniste suscita un fort intérêt lui permettant d'accéder à des essais cliniques de phase II pour deux indications : la fibrillation atriale et dans le syndrome du côlon irritable. Malgré l'échec de ces essais cliniques pour ces deux indications, le Piboserod passa avec succès les essais cliniques de phase II pour le traitement des patients souffrant d'insuffisance cardiaque congestive en 2007.^{85,86}

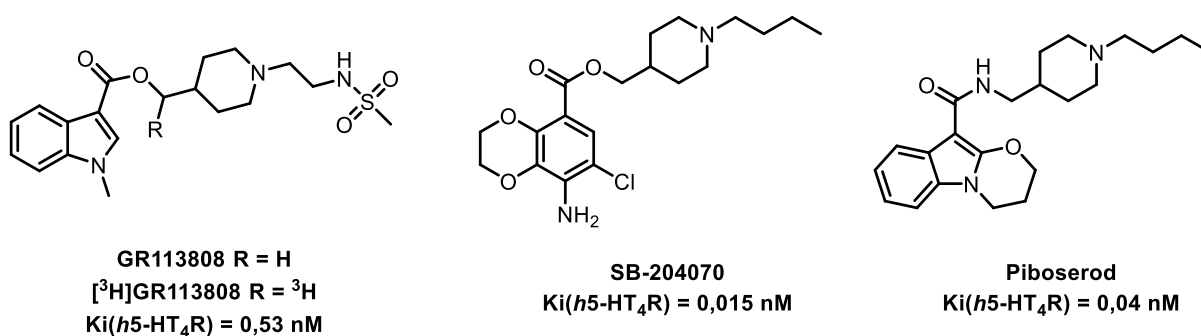


Figure 18: Formules chimiques du GR113808, SB-204070 et le Piboserod

Cette liste d'agonistes et d'antagonistes affines des 5-HT₄R n'est pas exhaustive, les revues publiées par Bureau *et al.* montrent l'intérêt porté pour cette cible en chimie thérapeutique. En 2020, elle fut complétée par la revue de Lanthier *et al.* décrivant l'ensemble des brevets édités entre 2014 et

⁷⁶ Jakeman, L. B.; To, Z. P.; Eglén, R. M.; Wong, E. H.; Bonhaus, D. *Neuropharmacology* **1994**, *33* (8), 1027–1038.

⁷⁷ Wong, E. H. F.; Reynolds, G. P.; Bonhaus, D. W.; Hsu, S.; Eglén, R. M. *Behav. Brain Res.* **1995**, *73* (1–2), 249–252.

⁷⁸ Gale, J. D.; Grossman, C. J.; Whitehead, J. W. F.; Oxford, A. W.; *et al.* *Br. J. Pharmacol.* **1994**, *111* (1), 332–338.

⁷⁹ Gaster, L. M.; Jennings, A. J.; Joiner, G. F.; King, F. D.; *et al.* *J. Med. Chem.* **1993**, *36* (25), 4121–4123.

⁸⁰ Wardle, K. A.; Ellis, E. S.; Baxter, G. S.; Kennett, G. A.; *et al.* *Br. J. Pharmacol.* **1994**, *112* (3), 789–794.

⁸¹ Bingham, S.; King, B. F.; Rushant, B.; Smith, M. I.; *et al.* *J. Pharm. Pharmacol.* **1995**, *47* (3), 219–222.

⁸² Yoshida, A.; S.-Yamashita, Y.; Kaibara, M.; Taniyama, K.; Tanaka, N. *Jpn. J. Pharmacol.* **2002**, *89* (4), 349–355.

⁸³ Wardle, K. A.; Bingham, S.; Ellis, E. S.; Gaster, L. M.; *et al.* *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *118* (3), 665–670.

⁸⁴ Beattie, D. T.; Smith, J. A. M.; Marquess, D.; Vickery, R. G.; *et al.* *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *143* (5), 549–560.

⁸⁵ <https://clinicaltrials.gov>

⁸⁶ Kjekshus, J. K.; Torp-Pedersen, C.; Gullestad, L.; Kjøber, L.; *et al.* *Eur. J. Heart Fail.* **2009**, *11* (8), 771–778.

2020.⁸⁷ La recherche de ces ligands ne se limite pas à leur utilisation comme agent thérapeutique visant à soigner les pathologies neurogénératives, cardiaques et digestives puisqu'un deuxième axe de recherche vise à développer de nouveaux outils diagnostics utilisables en imagerie TEP et TEMP *via* la synthèse de radiotraceurs affins et sélectifs des 5-HT₄R.

II- L'imagerie médicale

1. Histoire et grandes découvertes

L'histoire de l'imagerie médicale débuta en Allemagne à la fin du XIX^e siècle par la découverte « d'une nouvelle sorte de rayons ». Wilhelm Conrad Röntgen, physicien et ancien recteur de l'Université de Wurtzbourg, mit en évidence l'existence de rayons invisibles qu'il nomma rayons X. Il multiplia les expérimentations afin d'étudier leurs propriétés physiques et observa qu'en plus de traverser la matière, ces derniers étaient plus ou moins absorbés selon la densité des tissus pénétrés. Ainsi, il réalisa le premier cliché radiographique de l'histoire en se servant de la main de son épouse comme support. Cette découverte eut immédiatement un impact majeur dans la communauté scientifique et fut, par ailleurs, récompensée du prix Nobel de physique dès 1901.⁸⁸ a nouvelle fut largement et rapidement diffusée dans de nombreux pays comme étant l'évènement technologique du XX^e siècle. D'une part, ces rayons invisibles furent accueillis par le public comme un moyen de divertissement présenté en diverses occasions comme des fêtes foraines ou au cours de soirées mondaines. D'autre part, le corps médical s'empara dès 1896 de cette découverte percevant une potentielle utilisation en médecine *via* des techniques d'exploration non invasives du corps humain. Le 20 janvier de cette même année, le mathématicien Henri Poincaré présenta à l'Académie des sciences de Paris, les premières radiographies des os de la main issues des recherches menées par Röntgen et de deux médecins parisiens : Toussaint Barthélemy et Paul Oudin.

Le physicien français Henri Becquerel, qui assistait à cette communication, s'interrogea sur les rapports entre rayons X et fluorescence, il reprit ses recherches et c'est le 1^{er} mars 1896 qu'il fit la découverte de la radioactivité naturelle. Ces travaux furent rapidement complétés par ceux de Marie et Pierre Curie qui isolèrent le radium en 1898. Le prix Nobel de physique fut accordé en 1903 à ces 3 grands scientifiques en témoignage des services extraordinaires rendus par leurs recherches conjointes sur les phénomènes radiatifs initiés par le Pr. Becquerel (Figure 19).

⁸⁷ Lanthier, C.; Dallemagne, P.; Lecoutey, C.; Claeysen, S.; Rochais, C. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2020**, *30* (7), 495–508.

⁸⁸ Röntgen, W. *Über Eine Neue Art von Strahlen*; **1895**.



Figure 19: Portraits de Henri Becquerel, Pierre et Marie Curie

Suite au décès accidentel de son mari en 1906, Marie Curie continua seule leurs recherches et devint lauréate du prix Nobel de chimie en 1911 pour les services rendus à l'avancement de la chimie, sa découverte des éléments radium et polonium et pour avoir isolé et étudié le radium.

Cette série de découvertes a entraîné une véritable révolution médicale puisqu'il était désormais possible d'explorer le corps humain de l'extérieur, véritable prouesse à l'époque au vu du risque infectieux que représentait les gestes invasifs en l'absence d'antibiotiques. Le docteur Antoine Bécclère, actuellement considéré comme le père de la radiologie française, fut pionnier dans le domaine de la radiologie et de la radiothérapie. En 1897, il dota à ses frais son service de médecine générale à l'hôpital Tenon d'un appareil de radioscopie dans. En 1899, il rejoint l'hôpital Saint-Antoine, où il créa le premier centre de radiologie et va s'illustrer par la promotion de cette nouvelle discipline, par ses nombreuses recherches et l'enseignement réalisé à ses étudiants.

La première guerre mondiale (1914-1918) révéla l'intérêt absolu de continuer à développer les techniques de radiologie appliquées à la médecine. Au cours de ce conflit, de nombreux combattants furent blessés par des projectiles et les bombardements massifs nécessitant une prise en charge rapide et efficiente. Marie Curie forma le personnel et équipa les véhicules du matériel nécessaire aux examens radiologiques. Ces ambulances surnommées « petites Curies » sillonnaient les champs de bataille pour aider les chirurgiens à détecter les éclats d'obus et les corps métalliques logés chez les soldats blessés (Figure 20).



Figure 20: Marie Curie dans une "petite curie"

La période entre 1920 et 1960 est qualifiée d'âge d'or de la radiologie. En effet, un grand nombre d'avancées dans ce domaine ont été réalisées en combinant la radiographie et l'utilisation de radiotraceurs. Ainsi, en 1927, le neurochirurgien portugais Egaz Moniz réalisa la première encéphalographie artérielle par injection d'iodure de sodium. Deux ans plus tard, les professeurs Lichtwitz et Von Lichtenberg effectuèrent la première urographie. Puis en 1934, Frédéric et Irène Joliot-Curie firent la découverte de la radioactivité artificielle. Ces travaux furent le point de départ de l'imagerie nucléaire d'émission. En effet, avec cette méthode, est née l'idée de produire des isotopes radioactifs que l'on peut suivre dans des organes cibles du corps humain. Cette théorie s'appuya sur le travail du chimiste hongrois George Von Hevesy qui étudia préalablement la circulation sanguine et la formation des os à l'aide d'une solution de phosphate de sodium radioactif. Ces travaux furent récompensés par deux prix Nobel (Figure 21). Il faudra attendre plus de 20 ans pour voir émerger les premières techniques de scintigraphie.

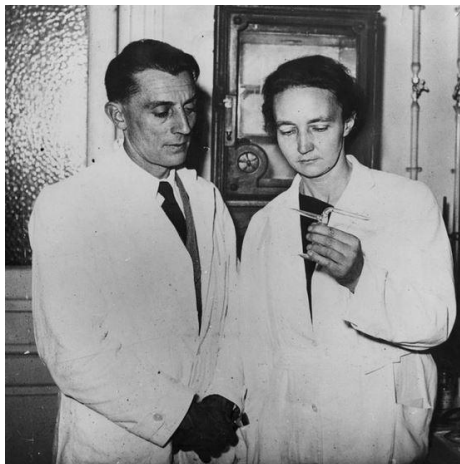


Figure 21: Frédéric et Irène Joliot-Curie

En 1937, Joseph Hamilton mesura pour la première fois la fixation de l'iode (iode-128) par la thyroïde toutefois la faible demi-vie de cet isotope radioactif ($t_{1/2} = 25$ minutes) limita son utilisation. Il fut, naturellement remplacé par l'iode 131 ($t_{1/2} = 8,02$ jours) qui permet, par ailleurs, de réaliser des études

complètes du métabolisme thyroïdien, diagnostiquer et traiter les hyperthyroïdies (1940 – Seaborg et Livingood). En 1954, l'institut Curie conçut le premier scintigraphe européen servant à explorer la thyroïde. Il était désormais possible pour la population d'accéder à cette nouvelle forme de diagnostic qui déterminait la répartition de la radioactivité à l'aide d'un compteur Geiger-Müller placé au niveau du cou.

En 1957, le biophysicien américain Hal Oscar Anger inventa la première gamma-caméra, élément essentiel de la tomographie par émission monophotonique (TEMP). Les bases de la tomographie par émission de positrons (TEP) seront publiées par Mac Leod Cormack dès 1964 mais cette technique ne sera popularisée qu'après la conception du 1^{er} scanner par l'ingénieur Godfrey Hounsfield leur valant la remise du prix Nobel de physique en 1979. Par la suite, ces scanners furent améliorés *via* l'utilisation d'une imagerie multimodale couplant l'imagerie structurelle et fonctionnelle TDM/TEP.

Le terme d'imagerie médicale ne sera finalement utilisé qu'à partir de 1989 et regroupe l'ensemble des découvertes réalisées en un peu plus d'un siècle. Les prouesses technologiques dans les différents domaines comme les mathématiques, l'informatique, la biophysique et la chimie. Cette spécialité médicale incontournable continua de s'amplifier dans les années 2000 avec la mise au point de nombreux radiotraceurs qui ont permis de varier les indications d'utilisation.^{89,90}

La principale innovation dans le domaine fut probablement la découverte du fluorodésoxyglucose (¹⁸F]FDG) en oncologie.⁹¹ Le métabolisme accéléré des cellules cancéreuses et la présence d'un système enzymatique modifié permet d'accumuler le composé au sein de ces mêmes cellules rendant possible leurs détections après collection de la radioactivité émise. D'autres radiotraceurs sont actuellement utilisés dans un cadre diagnostic. On note l'intérêt porté à la [¹⁸F]-DOPA⁹² dans la détection des cancers digestifs et des tumeurs de la thyroïde ainsi que la commercialisation récente (2014) du [¹⁸F]Florbetaben qui permet de mettre en évidence la présence de plaques amyloïdes révélatrices de démences comme la MA.⁹³

2. La radioactivité et ses applications

2.1 Principe de la radioactivité

La radioactivité est un phénomène physique naturel qui existe depuis la création de l'Univers. Découverte en 1896 par le physicien français Henri Becquerel, elle est la conséquence directe d'une

⁸⁹ Dubois, P. A History of Scintigraphy. *Irbm* **2009**, 30 (2), 40–46.

⁹⁰ Pallardy, G.; Pallardy, M.-J. *Histoire Abrégée Du Radiodiagnostic et de l'imagerie Médicale*; **2007**.

⁹¹ Belhocine, T.; Spaepen, K.; Dusart, M.; Castaigne, C.; *et al. Int. J. Oncol.* **2006**, 28 (5), 1249–1261.

⁹² Hoegerle, S.; Althoefer, C.; Ghanem, N.; Koehler, G.; *et al. Radiology* **2001**, 220 (2), 373–380.

⁹³ Villemagne, V. L.; Ong, K.; Mulligan, R. S.; Holl, G.; *et al. J. Nucl. Med.* **2011**, 52 (8), 1210–1217.

instabilité de certains noyaux atomiques, qui pour acquérir une meilleure stabilité, expulsent à un moment donné une quantité d'énergie sous forme de rayonnements ou de particules.

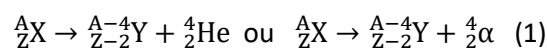
L'atome, du latin atomos « insécable », a longtemps été considéré comme étant la plus petite unité existante des corps simples. Les atomes sont en réalité constitués de particules subatomiques formant un noyau entouré d'un nuage électronique. Le noyau est composé de nucléons (A) subdivisés en protons (Z) de charge positive et de neutrons (N). Autour de ce noyau gravitent des électrons (e^-) porteurs d'une charge négative. La nomenclature d'un atome s'écrit : A_ZX

- X est le symbole chimique de l'élément
- A est le nombre de masse = nombre de protons + neutrons
- Z est le numéro atomique = nombre de protons

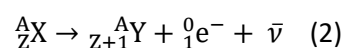
Il est important de préciser l'existence d'atomes possédant un numéro atomique (Z) identique mais un nombre de masse différent (A). Ces composés, nommés isotopes, ont des propriétés chimiques identiques, toutefois la modification de la balance (Z)/(N) dans le noyau peut entraîner l'apparition de phénomènes radioactifs.

Ainsi un noyau père instable (X) se désintègrera en un atome fils plus stable (Y) par émission de rayons ou de matière. Il existe quatre types de désintégrations différentes :

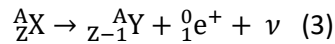
- **La désintégration α** : Elle concerne uniquement les atomes lourds et s'apparente à une fission du noyau avec émission d'une particule α équivalente à un noyau d'Hélium (2 protons et 2 neutrons). Le pouvoir de pénétration de ces rayons est très limité (stoppés par une feuille de papier) lié principalement à la taille importante des particules α émises.



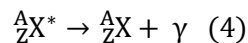
- **La désintégration β^-** : Elle correspond à l'émission d'un électron et d'un antineutrino accompagnant la transformation d'un neutron en proton. Elle s'observe dans les noyaux possédant un excès de neutron. Ces rayons sont plus pénétrant que les rayons α et sont stoppés par une feuille d'aluminium de quelques millimètres.



- **La désintégration β^+** : Elle concerne les nucléides présentant un excès de protons. Il y a conversion d'un proton en neutron engendrant la libération d'un positron et d'un neutrino.



- **La désintégration γ** : Elle correspond à une désexcitation d'un noyau et est de même nature que l'émission de lumière ou de rayon X pour les atomes. Elle est généralement instantanée et suit de très près l'émission de particules α et β . En effet, la plupart des désintégrations engendrent des noyaux « fils » riches en énergie. Ces noyaux dans un état excité sont notés : ${}^A_ZX^*$. Ces rayons sont très pénétrants et sont arrêtés par une large épaisseur de plomb ou de béton.



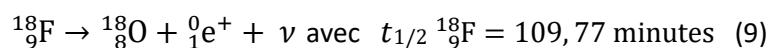
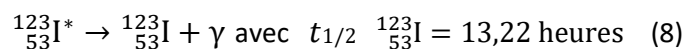
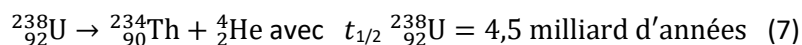
Le nombre de désintégration d'atomes instables dans un échantillon suit la loi de décroissance radioactive découverte en 1900 par Ernest Rutherford et Frederick Soddy. Elle permet de déterminer statistiquement le nombre de radionucléides présents à un temps t (N_t) en se servant du nombre de noyaux (N_0) à un temps initial t_0 comme référence

$$N(t) = N_0 \times e^{-\lambda t} \quad (5)$$

La constante de radioactivité λ est déterminée à l'aide de la période radioactive du radionucléide étudié ($t_{1/2}$ ou T).

$$\text{Si } N(t) = N_0/2 \text{ alors } \lambda = \frac{\ln 2}{T} \quad (6)$$

La période radioactive correspond au temps nécessaire pour que la moitié des atomes radioactifs présents initialement se soient désintégrés. Elle est caractéristique et constante pour un même radionucléide mais peut être extrêmement variable d'un radionucléide à un autre.



Dans le domaine médical, les caractéristiques physicochimiques des atomes radioactifs sont primordiales puisqu'elles vont conditionner leur utilisation comme agent thérapeutique, de stérilisation ou encore radiotraceur pour l'imagerie médicale.

En effet, de par son fort potentiel ionisant, l'iode-131 est utilisé dans le traitement des cancers thyroïdiens et de leurs métastases ainsi que dans les hyperthyroïdies. Cette activité s'explique par le fort tropisme de l'iode pour les cellules thyroïdiennes et par les rayonnements β^- émis par ce dernier.

Le temps de demi-vie de l'iode-131 ($t_{1/2} = 8,02$ jours) et son faible pouvoir pénétrant permet de cibler spécifiquement les cellules thyroïdiennes tout en épargnant les tissus à proximité.

A contrario, l'iode-123 est utilisé principalement pour réaliser des scintigraphies thyroïdiennes. Le pouvoir pénétrant des rayons γ est trop important pour cibler spécifiquement un organe. Cette propriété le rend facile à détecter faisant de lui un agent idéal pour l'imagerie médicale. Toutefois, elle ne permet pas d'augmenter les doses pour un potentiel effet thérapeutique au risque d'irradier et de provoquer des dégénérescences globales des tissus corporels du patient.

Suivant les techniques utilisées, les examens d'imagerie médicale permettent d'obtenir des informations cliniques variées sur le patient. On distingue deux groupes différents d'imagerie :

D'une part, l'imagerie structurelle permet d'obtenir des renseignements sur la structure des organes étudiés. On peut ainsi déterminer leurs tailles, leurs volumes, leurs localisations et leurs éventuelles altérations. Les techniques les plus couramment utilisées sont l'échographie, la tomodensitométrie (TDM) appelée aussi scanner et l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Elles ne seront pas détaillées dans ce manuscrit. D'autre part, l'imagerie fonctionnelle permet d'observer, caractériser et quantifier précisément les processus biologiques au sein de l'organe ou de la tumeur cible. Cet examen consiste à injecter chez le patient une dose très faible d'un produit radioactif. Ce traceur ou « radiopharmaceutique » est porteur d'un atome radioactif qui va émettre un rayonnement permettant la reconstitution d'une image après traitement informatique. On distingue 2 techniques de scintigraphie différentes :

- La Tomographie par Emission de Positons (TEP)
- La Tomographie par Emission MonoPhotonique (TEMP)

2.2 La Tomographie par Emission de positons (TEP)

La TEP ou PET scan (Positron Emission Tomography) est une méthode d'imagerie médicale qui permet de mesurer en trois dimensions l'activité d'un organe ou d'un métabolisme cible. Elle est déterminée grâce aux émissions photoniques produites par la désintégration d'un traceur radioactif émetteur β^+ préalablement injecté. Ces photons de 511KeV (rayons γ) sont issus de l'annihilation des positons dans la matière, émis dans des sens opposés et captés par des caméras TEP disposées autour du patient. Le signal collecté est traité par informatique en images qui permettent d'apprécier la localisation de la source radioactive avec une grande précision (Figure 22).

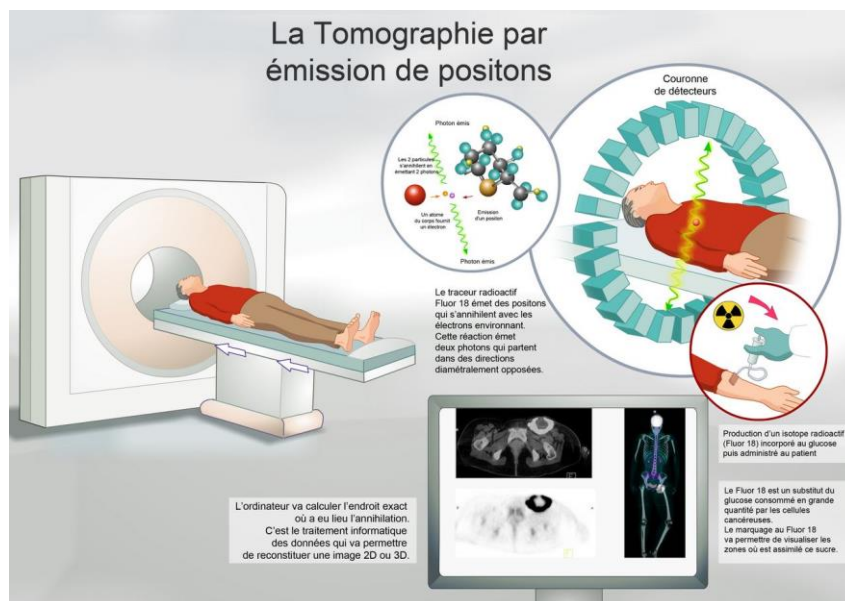


Figure 22: Principe de l'imagerie TEP⁹⁴

Son application nécessite la production de radionucléides émetteurs de positons tels que le fluor-18, l'oxygène-15, l'azote-13 ou le carbone-11 (Tableau 2). Ces atomes possèdent de brèves périodes radioactives ($t_{1/2}$) impliquant de nombreuses contraintes à leur utilisation notamment une préparation extemporanée à proximité du lieu d'examen rendu possible par la présence d'un cyclotron et d'installations lourdes en laboratoire de radiochimie.

Isotopes radioactifs	$t_{1/2}$	Energie β maximale	Libre parcours moyen
Fluor-18 (¹⁸F)	110 min	630 Kev	2,6 mm
Carbone-11 (¹¹C)	21 min	960 KeV	4,1 mm
Azote-13 (¹³N)	10 min	1200 KeV	5,4 mm
Oxygène-15 (¹⁵O)	2 min	1730 KeV	8,2 mm

Tableau 2: Caractéristiques principales des émetteurs de positons

Parmi ces isotopes radioactifs, le fluor-18 est probablement le plus intéressant d'entre eux car en plus de posséder une $t_{1/2}$ plus importante, ces positons sont plus rapidement stoppés dans la matière (2,6 mm) permettant d'augmenter la précision et la résolution de l'imagerie obtenue.

Depuis le début des années 2000, la TEP a été largement diffusée dans les centres hospitaliers. En effet, l'apparition d'une nouvelle génération d'appareils permettant de coupler l'imagerie TEP et la tomodensitométrie (TDM) a permis d'affiner grandement la résolution et la précision des images

⁹⁴ www.cea.fr

obtenues. Cette imagerie, dite multimodale, permet à la fois de coupler l'imagerie structurale *via* l'utilisation des rayons X (TDM) et l'imagerie fonctionnelle *via* l'injection de radiopharmaceutiques.⁹⁵

2.3 La tomographie par émission monophotonique (TEMP)

La Tomographie par émission monophotonique (TEMP) dite SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) en anglais est une technique utilisée quotidiennement dans de nombreux domaines tels que l'oncologie ou la neurologie. Son principe est similaire à celui de la TEP, toutefois elle repose sur la détection de rayons γ émis directement par les radioisotopes (^{123}I , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$). La reconstruction en trois dimensions des organes et des métabolismes est réalisée à l'aide de γ caméras tournant autour du patient (Figure 23).

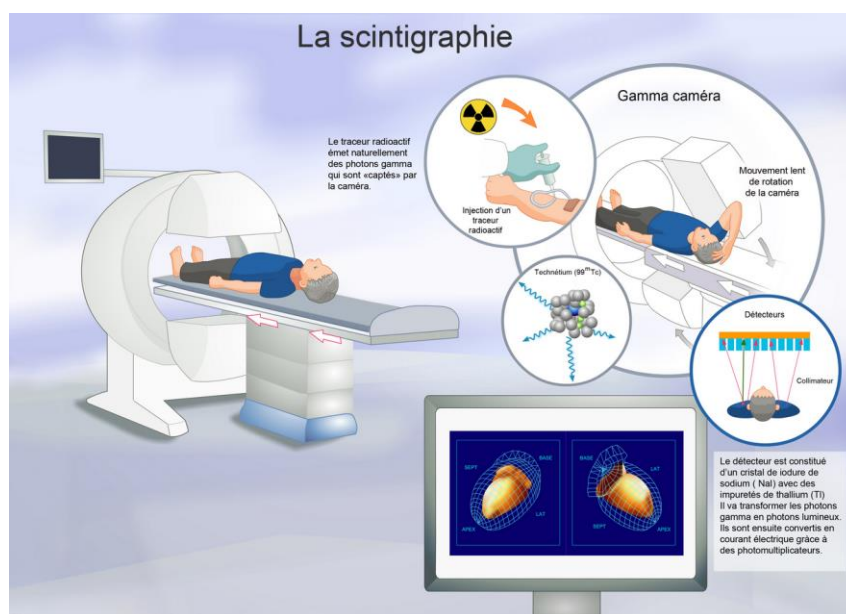


Figure 23: Principe de la TEMP⁹⁴

La TEMP possède une résolution et une sensibilité inférieure à la TEP, toutefois de par sa réalisation plus simple et par le grand panel de traceurs disponibles, elle demeure une technique de référence. Les radioisotopes utilisés en TEMP possèdent des temps de demi-vie plus longs comparativement à ceux utilisés en imagerie TEP, ce qui facilite leur utilisation et permet des durées d'acquisition de données plus longues au cours d'études cliniques (Tableau 3). Tout comme la TEP, la TEMP peut être couplée à des techniques d'imagerie morphologique comme l'IRM ou la TDM.

isotopes	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	^{123}I	^{133}Xe	^{201}Tl	^{111}In
$t_{1/2}$	6,01 h	13,21 h	125,86 h	72,98 h	67,31 h

Tableau 3: Période radioactive des radioisotopes émetteurs gamma

⁹⁵ Talbot, J.-N.; Petegnief, Y.; de Beco, V.; Nataf, V.; Balard, M. *Presse Med.* **2006**, 35 (9), 1331–1337.

2.4 Généralités sur les radiopharmaceutiques

2.4.1 Définition

De par leur nature complexe, les radiotraceurs répondent à la définition combinée du médicament et des radiopharmaceutiques. Ce statut particulier les soumet à une double réglementation qui a pour conséquence de complexifier l'ensemble des règles de production, de conservation et d'utilisation.

Ils répondent dans un premier temps à la définition du médicament décrite dans le code de santé publique (article L5121-1)⁹⁶ : « *On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique. Sont notamment considérés comme des médicaments les produits diététiques qui renferment dans leur composition des substances chimiques ou biologiques ne constituant pas elles-mêmes des aliments, mais dont la présence confère à ces produits soit des propriétés spéciales recherchées en thérapeutique diététique, soit des propriétés de repas d'épreuve.*

Les produits utilisés pour la désinfection des locaux et pour la prothèse dentaire ne sont pas considérés comme des médicaments.

Lorsque, eu égard à l'ensemble de ses caractéristiques, un produit est susceptible de répondre à la fois à la définition du médicament prévue au premier alinéa et à celle d'autres catégories de produits régies par le droit communautaire ou national, il est, en cas de doute, considéré comme un médicament. »

D'après l'article L5121-1 du code de santé publique, un médicament radiopharmaceutique (MRP) correspond à « *Tout médicament qui, lorsqu'il est prêt à l'emploi, contient un ou plusieurs isotopes radioactifs, dénommés radionucléides, incorporés à des fins médicales* ».

Les MRP appartiennent tous à la liste I, peuvent être des médicaments dérivés du sang et ont une obligation de traçabilité. Ils sont majoritairement administrés par voie parentérale et sont conditionnés sous forme d'une spécialité radiopharmaceutique prête à l'emploi ou sous forme d'une préparation radiopharmaceutique (PRP) réalisée *in situ* par les services de radiopharmacie. Ces PRP utilisent deux catégories de matières premières : le radionucléide et l'utilisation d'une trousse portant le vecteur indispensable à l'action ciblée du radiopharmaceutique. Le radionucléide peut être produit industriellement ou issu d'un générateur.⁹⁶

⁹⁶ <http://www.ordre.pharmacien.fr/>

2.4.2 Structure d'un radiopharmaceutique

Les radiopharmaceutiques peuvent se présenter sous différentes formes qui vont conditionner leur utilisation.

On distingue deux grands groupes de radiotraceurs :

- Les radiotraceurs utilisés sous forme chimique simple.
- Les radiotraceurs constitués d'un vecteur spécifique.

Les radiotraceurs, sous forme chimique simple, ne possèdent pas de vecteur à proprement parlé puisque l'affinité est issue du tropisme naturel de l'atome radioactif pour sa cible. Parmi eux, on distingue notamment l'iodure de sodium (^{123}I) qui est indiqué dans les explorations morphologiques et fonctionnelles de la thyroïde et comme outil diagnostique des dysthyroïdies. Le sodium fluorure (^{18}F) (CISNAF) est quant à lui utilisé pour étudier le système osseux avec diverses indications comme le diagnostic d'une ostéogénèse anormale et la présence de métastases osseuses.⁵⁸

Certaines cibles ou récepteurs ne possèdent pas d'affinité particulière pour un atome, c'est pourquoi la synthèse d'un radiotracer constitué d'un vecteur spécifique d'une cible a un intérêt tout particulier. Ces vecteurs sont de nature variable (molécule organique, anticorps monoclonaux, particules...) qui va conditionner sa distribution, métabolisation et son élimination dans l'organisme. L'exemple le plus connu est le [^{18}F]FDG (molécule organique) qui correspond à un désoxyglucose sur lequel on a fixé un fluor-18 (Figure 24). Ce fluor présente un intérêt certain puisque le FDG n'est pas pris en charge dans la voie de glycolyse et va s'accumuler dans le cytosol des cellules cancéreuses sous forme de [^{18}F]FDG-6P.⁹⁷ Il est important de préciser que l'insertion de l'atome radioactif ne doit en aucun cas diminuer significativement l'affinité du radiotracer pour son récepteur au risque de le rendre obsolète.

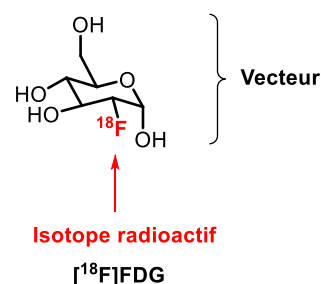


Figure 24: Structure d'un radiotracer constitué d'un vecteur

Pour commercialiser un nouveau radiopharmaceutique, il est important de respecter un certain nombre de caractéristiques intrinsèques et de réaliser des études permettant de les vérifier. Ces

⁹⁷ Talbot, J.; Montravers, F.; Grahek, D.; Kerrou, K.; et al. *Presse Med.* **2006**, 35 (9), 1339–1346.

propriétés ne sont pas immuables mais peuvent permettre de prédire l'intérêt porté pour un composé comparativement à un autre.

2.4.3 Propriétés des radiotraceurs

L'imagerie TEP et TEMP sont deux techniques d'imagerie médicale d'une très grande sensibilité, c'est pourquoi les radiotraceurs utilisés dans le cadre d'études précliniques et cliniques nécessitent de répondre à un cahier des charges très rigoureux. Les revues de Pike *et al.* de 2009 et 2013 présentent avec précision ces propriétés que nous détaillerons succinctement afin de bien comprendre l'intérêt majeur de leur détermination.^{98,99}

L'affinité et la spécificité : l'affinité correspond à la capacité d'un ligand à se fixer sur sa cible (récepteur). Cette propriété est déterminée à l'aide de tests *in vitro* réalisés à partir du ligand froid (composé similaire sans atome radioactif) qui permet de définir une constante d'affinité **Ki**. Elle est fondamentale puisque le radiopharmaceutique a pour fonction de cibler spécifiquement un récepteur, un tissu ou un organe. La plupart du temps, cette valeur est de l'ordre du nanomolaire ou subnanomolaire et dépend principalement de la densité des récepteurs étudiés. Il est important de préciser que certains articles préfèrent se fier à la constante de dissociation **Kd**. Plus le Kd est faible, plus l'affinité pour le ligand est importante.

La stabilité métabolique : Elle correspond à la capacité d'un radioligand à résister aux réactions de catabolisme présentes naturellement dans le corps humain. Ces réactions peuvent, par divers biais, entraîner une altération du composé empêchant ou limitant son utilisation *in vivo*. Il est primordial d'étudier les métabolites issus du radiotraceur puisque ces derniers peuvent être porteurs du radionucléide et être à l'origine d'une fixation aspécifique.¹⁰⁰ De plus, la photosensibilité, la température et la résistance au pH seront prises en compte dans le choix du conditionnement afin de préserver l'intégrité du radiopharmaceutique et assurer une imagerie de qualité.

Caractéristiques pharmacochimiques compatibles : La structure d'un radiopharmaceutique détermine un certain nombre de paramètres conditionnant son comportement au sein même du corps humain. La lipophilie, la solubilité ou encore le poids moléculaire sont essentiels à prendre en compte

⁹⁸ Pike, V. W. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30* (8), 431–440.

⁹⁹ Paterson, L. M.; Kornum, B. R.; Nutt, D. J.; Pike, V. W.; Knudsen, G. M. *Med. Res. Rev.* **2013**, *33* (1), 54–111.

¹⁰⁰ Van de Bittner, G. C.; Ricq, E. L.; Hooker, J. M. A. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47* (10), 3127–3134.

car ils influenceront la distribution, la métabolisation et l'élimination du radiotracteur. L'étude du devenir d'une substance dans l'organisme est désignée par le terme pharmacocinétique.

Lipophilie (logP et logD) : Parmi les caractéristiques chimiques d'un radioligand, la lipophilie est probablement la plus remarquable d'entre elles. Elle correspond au rapport des répartitions de la substance étudiée dans l'octanol (C_{oct}) et dans l'eau (C_{aq}). Lorsque le logP est strictement supérieur à 0, on considère que la molécule est plus soluble dans l'octanol que dans l'eau, elle est ainsi considérée comme lipophile. Si cette valeur est négative alors celle-ci est considérée comme hydrophile

$$\text{Log } P = \frac{C_{oct}}{C_{aq}} \quad (10)$$

Le $\log D_{pH}$ propose une analyse plus fine puisque ce paramètre prend en compte la fraction ionisée de la molécule en fonction du pH.¹⁰¹ Dans le cas d'un radiotracteur, la valeur de pH la plus couramment utilisée est égale à 7,4 et correspond aux valeurs physiologiques normales du pH sanguin (VN = 7,35-7,45). Il existe deux formules distinctes pour déterminer le logD : sous forme acide (**11a**) et sous forme basique (**11b**).

$$\log D_{pH} = \log P + \log \left[\frac{1}{(1 + 10^{pH-pKa})} \right] \quad (11a)$$

$$\log D_{pH} = \log P + \log \left[\frac{1}{(1 + 10^{pKa-pH})} \right] \quad (11b)$$

La lipophilie est impliquée dans de nombreux phénomènes comme la distribution, l'absorption et l'élimination des composés. Son influence s'étend au passage des membranes comme la barrière hémato-encéphalique (BHE)¹⁰² et au marquage non spécifique rendant sa détermination indispensable pour les cibles présentes dans le cerveau. Une valeur modérée, comprise entre 1 et 3, constitue dans la plupart des cas un atout majeur, toutefois certains traceurs de la littérature possèdent des valeurs bien plus importantes. La lipophilie peut être calculée *via* différentes méthodes décrites dans la littérature (clogP et clogD) ou peut être déterminée expérimentalement.¹⁰¹ La technique la plus

¹⁰¹ Kah, M.; Brown, C. D.. *Chemosphere* **2008**, 72 (10), 1401–1408.

¹⁰² Waterhouse, R. *Mol. Imaging Biol.* **2003**, 5 (6), 376–389.

répandue est la méthode du flacon agité qui consiste à déterminer la distribution, dans l'eau et dans l'octanol, du composé étudié par mesure spectroscopique UV/visible.

2.4.4 Radiotraceurs utilisés en milieu hospitalier

Le développement de nouvelles technologies a considérablement amélioré la précision et la sensibilité des techniques d'imagerie médicales TEP et TEMP rendant leur utilisation indispensable comme outils diagnostique dans diverses pathologies. Cette évolution fut accompagnée par la mise au point de nouveaux radiotraceurs visant un grand panel de cibles biologiques et variant les possibilités d'utilisation au sein de notre système de santé. Actuellement, il existe plus de 70 spécialités pharmaceutiques possédant une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) classées dans les radiopharmaceutiques à usage diagnostique.

Le [^{18}F]FDG (Flucis[®], Glusca[®], Glucotep[®]) est le radiotracteur le plus utilisé et permet de diagnostiquer les carcinomes pancréatiques, les cancers colorectaux, les lymphomes malins et les cancers primitifs pulmonaires. D'autres radiopharmaceutiques sont utilisés couramment comme le [^{18}F]Florbetaben (Neuraceq[®]) qui permet de déterminer la densité de plaques séniles β -amyloïdes dans le cerveau; le [^{18}F]Fluciclovine (Axumin[®]) pour le diagnostic des récurrences de cancers de la prostate¹⁰³ ou encore le [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]ECD (Neurolite[®]) pour l'exploration de la perfusion cérébrale chez les personnes présentant des troubles du système nerveux central (SNC) (Figure 25).¹⁰⁴

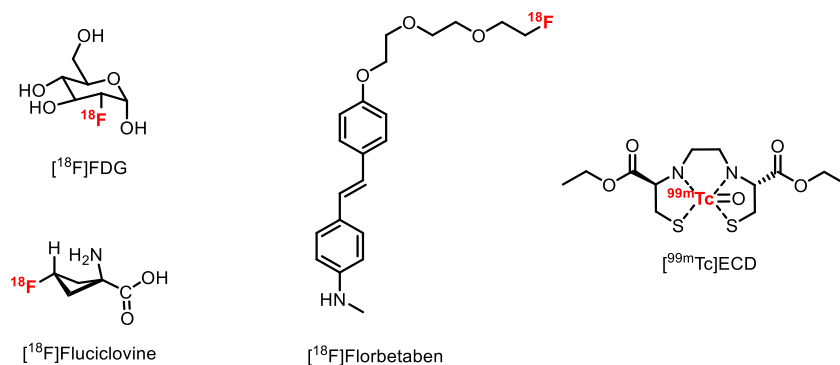


Figure 25: Radiopharmaceutiques utilisés en milieu hospitalier

Actuellement, aucun radiotracteur affin et sélectif vis-à-vis des 5-HT_{1A} n'est utilisé dans le système hospitalier français, toutefois certains se sont fait remarquer pour leurs propriétés intéressantes en recherche fondamentale.

¹⁰³ Parent, E. E.; Schuster, D. M. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (5), 733–739.

¹⁰⁴ Berrouschot, J.; Barthel, H.; Hesse, S.; Köster, J.; et al. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1998**, *18* (8), 921–929.

2.4.5 Radiotraceurs des 5-HTR décrits dans la littérature

En imagerie TEP, on note l'utilisation courante du [¹¹C]WAY-100635 pour la caractérisation des 5-HT_{1A}R chez l'homme et l'animal ainsi que chez des patients atteints de désordres comportementaux comme la dépression, l'anxiété ou l'anorexie.^{105,106,107,108}

Le [¹¹C]AZ10419369 est considéré comme le radiotraceur de référence des 5-HT_{1B}R et fut utilisé à de nombreuses reprises pour déterminer leur distribution cérébrale dans différentes espèces animales.^{109,110} De plus, il révéla une diminution de ces récepteurs chez des patients dépressifs et atteints par la maladie de Parkinson.^{111,112}

Plusieurs radiotraceurs ont été utilisés pour étudier la densité des 5-HT_{2A}R centraux. En imagerie TEP, on utilise principalement le [¹⁸F]Altanserin, le [¹¹C]MDL100907 et le [¹¹C]CIMBI-36.^{113,114,115} En imagerie TEMP, ces radiotraceurs sont tous porteurs d'un iode-123 : Le [¹²³I]R91150 et le [¹²³I]-3-I-CO.^{116,117}

Les 5-HT₆R sont explorés à l'aide de deux radiotraceurs utilisés en imagerie TEP : Le [¹¹C]GSK215083 et le [¹⁸F]2FNQ1P.^{118,119} Enfin, l'étude des 5-HT₇R se concentre sur un composé en série oxaindolique : le [¹¹C]CIMBI-717¹²⁰ et une série de composés en série *N*-sulfopyrrole.¹²¹ Malheureusement, aucun d'entre eux n'a prouvé son efficacité pour une utilisation chez l'homme.

L'ensemble de ces radiotraceurs sont décrits dans le tableau ci-dessous (Tableau 4). Les radiotraceurs des 5-HT₄R seront décrits dans la suite de ce manuscrit.

¹⁰⁵ Rabiner, E. A.; Messa, C.; Sargent, P. A.; Husted-Kjaer, K.; *et al. Neuroimage* **2002**, *15* (3), 620–632.

¹⁰⁶ Sullivan, G. M.; Ogden, R. T.; Oquendo, M. A.; Kumar, J. S. D.; *et al. Biol. Psychiatry* **2009**, *66* (3), 223–230.

¹⁰⁷ Penttilä, J.; Hirvonen, J.; Tuominen, L.; Lumme, V.; *et al. Eur. Neuropsychopharmacol.* **2016**, *26* (3), 570–577.

¹⁰⁸ Metts, A. V.; Rubin-Falcone, H.; Ogden, R. T.; Lin, X.; *et al. J. J. Synapse* **2019**, *73* (6), 1–10.

¹⁰⁹ Pierson, M. E.; Andersson, J.; Nyberg, S.; McCarthy, D. J.; *et al. Neuroimage* **2008**, *41* (3), 1075–1085.

¹¹⁰ Maier, D. L.; Sobotka-Briner, C.; Ding, M.; Powell, M. E.; *et al. J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *330* (1), 342–351.

¹¹¹ Tiger, M.; Farde, L.; Rück, C.; Varrone, A.; *et al. Psychiatry Res. Neuroimaging* **2016**, *253*, 36–42.

¹¹² Varrone, A.; Svenningsson, P.; Forsberg, A.; Varnäs, K.; *et al. Neurobiol. Aging* **2014**, *35* (4), 867–875.

¹¹³ Biver, F.; Goldman, S.; Luxen, A.; Monclus, M.; Forestini, M.; *et al. Eur. J. Nucl. Med.* **1994**, *21* (9), 937–946.

¹¹⁴ Talbot, P. S.; Slifstein, M.; Hwang, D.-R.; Huang, Y.; *et al. Neuroimage* **2012**, *59* (1), 271–285.

¹¹⁵ Da Cunha-Bang, S.; Ettrup, A.; Mc Mahon, B.; Skibsted, A. P.; *et al. Transl. Psychiatry* **2019**, *9* (1), 134.

¹¹⁶ Busatto, G. F.; Pilowsky, L. S.; Costal, D. C.; Mertens, J.; *et al. Eur. J. Nucl. Med.* **1997**, *24* (6), 707–707.

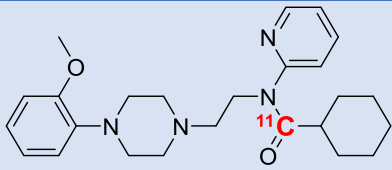
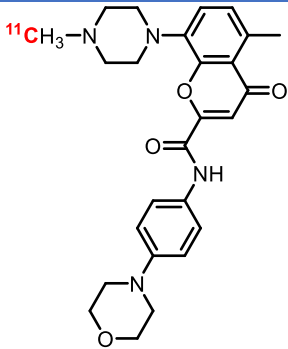
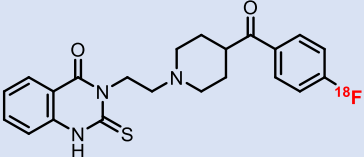
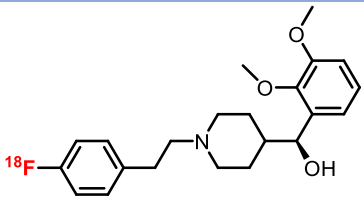
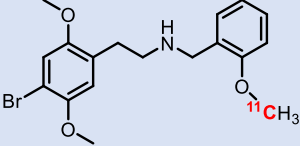
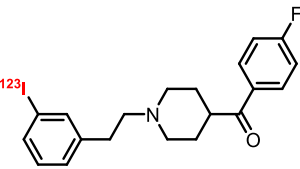
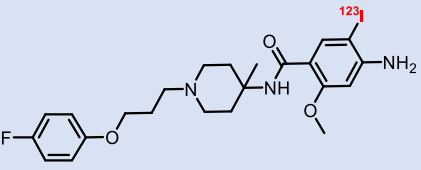
¹¹⁷ Blanckaert, P. B. M.; Burvenich, I.; Wyffels, L.; De Bruyne, S.; *et al. Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35* (8), 861–867.

¹¹⁸ Radhakrishnan, R.; Matuskey, D.; Nabulsi, N.; *et al. Psychiatry Res. Neuroimaging* **2020**, *295*, 111007.

¹¹⁹ Emery, S.; Fieux, S.; Vidal, B.; Courault, P.; Bouvard, S.; *et al. Nucl. Med. Biol.* **2020**, *82–83*, 57–63.

¹²⁰ L'Estrade, E. T.; Shalgunov, V.; Edgar, F.G.; *et al. J. Label. Compd. Radiopharm.* **2020**, *63* (2), 46–55.

¹²¹ Lemoine, L.; Andries, J.; Le Bars, D.; Billard, T.; Zimmer, L. J. *Nucl. Med.* **2011**, *52* (11), 1811–1818.

Récepteurs	Radioligands	Formules chimiques	Appli. Animale	Appli. Humaine
5-HT _{1A} R	[¹¹ C]WAY-100635		✓	✓
5-HT _{1B} R	[¹¹ C]AZ10419369		✓	✓
5-HT _{2A} R	[¹⁸ F]Altanserin		✓	✓
	[¹¹ C]MDL100907		✓	✓
	[¹¹ C]CIMBI-36		✓	✓
	[¹²³ I]-3-I-CO		✓	✓
	[¹²³ I]R91150		✓	✗

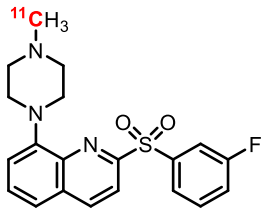
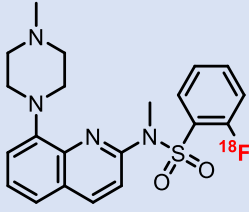
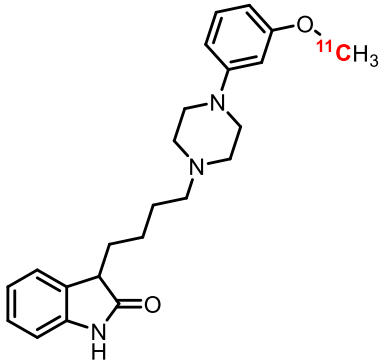
5-HT ₆ R	[¹¹ C]GSK215083		✓	✓
	[¹⁸ F]2FNQ1P		✓	✗
5-HT ₇ R	[¹¹ C]CIMBI-717		✓	✗

Tableau 4: Tableau récapitulatif des radiotraceurs référents des 5-HTR

2.4.6 Radiotraceurs des 5-HT₄R décrits dans la littérature

Depuis leur découverte en 1989, les 5-HT₄R ont suscité un intérêt particulier dans le développement d'outils diagnostics utilisables en imagerie TEP et TEMP. De nombreuses familles chimiques ont ainsi été explorées avec des résultats très variables. Dans ce manuscrit, nous allons concentrer notre attention sur une famille de radioligands qui est à la base de l'exploration de ce récepteur s'appuyant sur un motif benzodioxane issu du premier radiotraceur décrit : le [¹²³I]SB207710 (Figure 26)

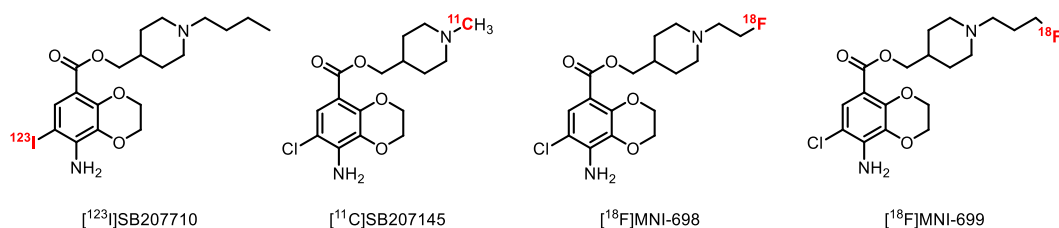


Figure 26: Formules chimiques des radiotraceurs des 5-HT₄R

- [¹²³I]SB207710

Le [¹²³I]SB207710 est le premier radiotraceur des 5-HT₄R utilisable en imagerie TEMP à avoir été synthétisé. En 2003, ce puissant antagoniste fut testé par Pike *et al.* sur le rat et le singe (*in vivo*) et permit d'observer un signal intense et spécifique des régions cérébrales riches en récepteurs (striatum,

cortex frontal et cortex temporal). Ce composé offrit une nouvelle perspective de radiodétection des 5-HT₄R *via* le développement de radiotraceurs utilisables en imagerie TEP et TEMP avec une optimisation du passage de la BHE et de l'intensité d'émission du signal.¹²²

- [¹¹C]SB207145

Le [¹¹C]SB207145 est l'analogue du [¹²³I]SB207710 le plus décrit pour caractériser et quantifier les 5-HT₄R centraux en imagerie TEP. Cet antagoniste puissant (K_i(5-HT₄R) = 0,3 nM) fut testé, pour la première fois en 2009, chez le cochon nain et sur une petite cohorte de sujets sains volontaires (3 hommes et 3 femmes) révélant un radiomarquage spécifique des zones riches en 5-HT₄R (striatum, hippocampe, cortex frontal).^{123,124} De plus, cette étude révéla une métabolisation intense du [¹¹C]SB207145 pouvant être responsable d'une accumulation de radiométabolites dans le cerveau ne remettant pas en cause son utilisation. En 2010, Marner *et al.* réalisèrent une étude complémentaire sur 16 sujets sains et confirmèrent la répartition des récepteurs observés précédemment. Ils complétèrent ces résultats en indiquant une diminution des 5-HT₄R avec l'âge et l'absence de différence significative entre les genres masculin et féminin.¹²⁵ En 2011, Madsen *et al.* se penchèrent plus précisément sur ces deux derniers points (cohorte de 30 sujets sains volontaires) et conclurent à une diminution significative (19% inférieur) du radiomarquage de l'amygdale chez les femmes par rapport aux hommes pouvant expliquer la prévalence plus importante de la maladie d'Alzheimer et des troubles affectifs dans cette population.¹²⁶ En 2014, Haahr *et al.* démontrèrent l'intérêt du [¹¹C]SB207145 comme biomarqueur du tonus extracellulaire en 5-HT par l'exploration des fluctuations des 5-HT₄R centraux avec de possibles applications cliniques comme outil d'évaluation thérapeutique.¹²⁷ Depuis 2015, il fut utilisé à plusieurs reprises en condition physiologique normale (influence des taux hormonaux en testostérone et cortisol) ainsi que chez des patients atteints de migraines.^{128,129,130}

- [¹⁸F]MNI-698 et [¹⁸F]MNI-699

Le [¹⁸F]MNI-698 et 699 sont respectivement des analogues éthyl et propylfluoré du [¹²³I]SB207710 qui possèdent de très fortes affinités pour les 5-HT₄R (K_i = 0,2 et 0,07 nM). En 2013, ces antagonistes furent

¹²² Pike, V. W.; Halldin, C.; Nobuhara, K.; Hiltunen, J.; *et al.* *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30* (11), 1520–1528.

¹²³ Kornum, B. R.; Lind, N. M.; Gillings, N.; Marner, L.; *et al.* *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2009**, *29* (1), 186–196.

¹²⁴ Marner, L.; Gillings, N.; Comley, R. A.; Baare, W. F. C.; *et al.* *J. Nucl. Med.* **2009**, *50* (6), 900–908.

¹²⁵ Marner, L.; Gillings, N.; Madsen, K.; Erritzoe, D.; *et al.* *Neuroimage* **2010**, *50* (3), 855–861.

¹²⁶ Madsen, K.; Marner, L.; Haahr, M.; Gillings, N.; Knudsen, G. M. *Nucl. Med. Biol.* **2011**, *38* (8), 1085–1091.

¹²⁷ Haahr, M. E.; Fisher, P. M.; Jensen, C. G.; Frokjaer, V. G.; *et al.* *Mol. Psychiatry* **2014**, *19* (4), 427–432.

¹²⁸ Jakobsen, G. R.; Fisher, P.; Dyssegaard, A.; McMahan, B.; *et al.* *Psychoneuroendocrinology* **2016**, *67*, 124–132.

¹²⁹ Deen, M.; Hansen, H. D.; Hougaard, A.; Nørgaard, M.; *et al.* *NeuroImage Clin.* **2018**, *18*, 97–102.

¹³⁰ Perfalk, E.; Cunha-Bang, S. da; Holst, K. K.; Keller, S.; *et al.* *Psychoneuroendocrinology* **2017**, *81*, 22–28.

testés sur le singe (*in vivo*) révélant un radiomarquage des régions cérébrales d'intérêt en corrélation avec celles obtenues avec les radiotraceurs de référence (striatum, putamen, noyaux caudés, globus pallidus, putamen, hippocampe et substance noire).¹³¹ Des études additionnelles, avec le [¹⁸F]MNI-698, démontrèrent un passage satisfaisant de la BHE malgré une métabolisation rapide du composé ne remettant pas en cause son intérêt pour des études sur l'homme.^{132,133} Aucune publication récente ne fait référence à l'utilisation de ces radioligands chez l'homme.

Cette liste de radiotraceurs n'est pas exhaustive puisque de nombreuses équipes scientifiques ont participé au développement et la synthèse de composés originaux. Ces recherches innovantes reposent notamment sur les substitutions possibles du cycle aromatique pour optimiser les paramètres chimiques et physiques. C'est dans ce contexte que le noyau indazole s'est imposé comme une nouvelle référence dans ce domaine.

III- Le noyau indazole

Le cycle indazole constitue la base chimique de nombreuses molécules utilisées en recherche clinique et en thérapie. De nombreuses équipes scientifiques se sont intéressées aux voies d'obtention et de fonctionnalisation de ce noyau chimique permettant de varier considérablement ses indications thérapeutiques. Dans ce manuscrit, nous présenterons cet hétérocycle azoté en précisant ces propriétés, ses indications et son utilisation pour la caractérisation des récepteurs 5-HT₄R centraux.

1. Propriétés et origine du cycle indazole

Le noyau indazole appelé aussi 2-azaindole, 1,2 benzodiazole ou 1,2 benzopyrazole est un cycle aromatique peu répandu dans la nature qui suscita, ces dernières années, un grand intérêt en raison de son fort potentiel en biologie. Cet hétérocycle azoté a été identifié dans trois alcaloïdes : la Nigellicine, la Nigeglanine et la Nigellidine issus de *Nigella sativa*¹³⁴ et *Nigella glandulifera* (Figure 27).¹³⁵

¹³¹ Caillé, F.; Morley, T. J.; Tavares, A. A. S.; Papin, C.; *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (23), 6243–6247.

¹³² Tavares, A. A. S.; Caillé, F.; Barret, O.; Papin, C.; *et al. Nucl. Med. Biol.* **2014**, *41* (5), 432–439.

¹³³ Tavares, A. A. S.; Caille, F.; Barret, O.; Papin, C.; *et al. J. Nucl. Med.* **2014**, *55* (5), 858–864.

¹³⁴ Atta-ur-Rahman; Malik, S.; Cun-heng, H.; Clardy, J. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26* (23), 2759–2762.

¹³⁵ Liu, Y.-M.; Yang, J.-S.; Liu, Q.-H. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **2004**, *52* (4), 454–455.

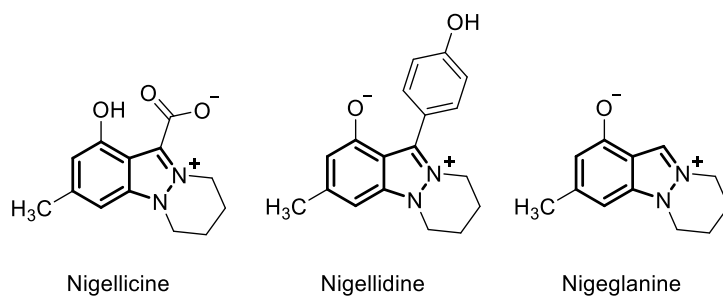


Figure 27: Alcaloïdes possédant un structure indazolique

Il possède une structure intéressante puisqu'en plus d'être un bioisostère de l'indole¹³⁶, il existe sous trois formes tautomères¹³⁷ et dispose d'un azote en position 2 qui permet une grande variabilité de pharmacomodulations *via* des *N*-alkylations de ce cycle (Figure 28).

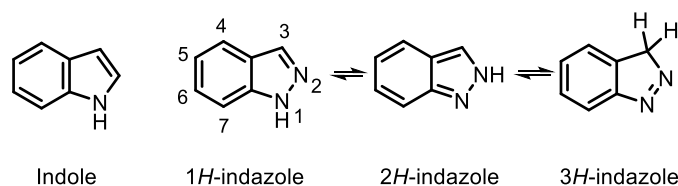


Figure 28: Formules chimiques de l'indole et formes tautomères de l'indazole

2. Médicaments commercialisés portant un noyau indazolique

Actuellement il n'existe que très peu de médicaments commercialisés portant un noyau indazole. Ils sont au nombre de six et sont utilisés dans diverses indications (Figure 29).

Le **Pazopanib** (Votrient®) est un inhibiteur de protéine tyrosine kinase qui est indiqué chez l'adulte comme traitement de 1^{ère} ligne des cancers du rein avancé.¹³⁸ Il est utilisé en oncologie pour soigner les patients souffrant de sarcomes des tissus mous avancés qui ont été préalablement traités par chimiothérapie. Ce médicament a obtenu son AMM en 2012 mais présente un Service Médical Rendu (SMR) faible en raison de sa faible efficacité et la présence d'une toxicité cardiaque pouvant être mortelle pour le patient.¹³⁹

¹³⁶ Kaumann, A. J.; King, F. D.; Young, R. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, 2 (5), 419–420.

¹³⁷ Alkorta, I.; Elguero, J. *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, 18 (8), 719–724.

¹³⁸ Sonpavde, G.; Hutson, T. E. *Curr. Oncol. Rep.* **2007**, 9 (2), 115–119.

¹³⁹ <https://www.has-sante.fr/>

L'**Axitinib** (Inlyta®) possède le même mécanisme pharmacologique que le Pazopanib mais présente un SMR important dans l'indication prévue par son AMM. Il est utilisé principalement pour soigner les cancers du rein après un échec d'un traitement par Sunitinib ou de cytokines.¹⁴⁰

L'**Entrectinib** (Rozlytrek®) a été commercialisé en France en 2019. Il s'agit encore une fois d'un inhibiteur de tyrosine kinase qui agit sélectivement sur le récepteur kinase à la tropomyosine (TRK) A, B et C. Il est indiqué uniquement chez les patients pédiatriques ayant un fibrosarcome infantile ou un autre sarcome des tissus mous, avec une fusion du gène NTRK (Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase), au stade localement avancé ou métastatique et en rechute.¹⁴¹ Il possède un SMR modéré et n'apporte pas d'Amélioration du Service Médical Rendu (ASMR) principalement pour cause d'absence de données comparatives avec la prise en charge habituelle.¹³⁹

Le **Niraparib** (Zejula®) est utilisé en oncologie pour traiter les patientes atteintes d'un cancer épithélial séreux de haut grade de l'ovaire, des trompes de fallope ou péritonéal primitif qui sont sensibles au platine et récidivant. Il possède un SMR important et justifie son action par une inhibition de PARP (poly-ADP Ribose Polymérase).¹⁴²

Le **Granisetron** (Kytril®) est un antagoniste des 5-HT₃R qui est indiqué dans la prévention et le traitement des nausées et vomissements aigus induits par la chimiothérapie cytotoxique ou la radiothérapie pro-émétisante.¹⁴³ Ce médicament est commercialisé en France depuis 1994 et présente un SMR important.

D'autres composés indazoliques sont commercialisés pour leurs propriétés antalgiques (antalgique niveau 1) et pour leur capacité à diminuer l'inflammation. Le **Benzylamine** (Opalgyn®) en est un exemple et appartient à la famille des Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien (AINS). Il est indiqué uniquement pour le traitement symptomatique douloureux lié à l'inflammation vaginale dans les vaginites aiguës.¹⁴⁴ On peut notamment évoquer l'utilisation jusqu'en 1993 du **Bendazac** (AINS) qui fut retiré du marché (France et Espagne) en raison de sa forte hépatotoxicité.¹⁴⁵

¹⁴⁰ Rixe, O.; Bukowski, R. M.; Michaelson, M. D.; Wilding, G.; et al. *Lancet Oncol.* **2007**, *8* (11), 975–984.

¹⁴¹ Ardini, E.; Menichincheri, M.; Banfi, P.; Bosotti, R.; et al. *Mol. Cancer Ther.* **2016**, *15* (4), 628–639.

¹⁴² Mirza, M. R.; Monk, B. J.; Herrstedt, J.; Oza, A. M.; et al. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375* (22), 2154–2164.

¹⁴³ Morrow, G. R.; Hickok, J. T.; Rosenthal, S. N. *Cancer* **1995**, *76* (3), 343–357.

¹⁴⁴ Di Stefano, A. F.; Radicioni, M. M.; Vaccani, A.; Caccia, G.; et al. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **2020**, *2020*, 1–11.

¹⁴⁵ Alcalde, M.; Garcia-Diaz, M.; Najarro, F.; Donoso, M. S.; et al. *Scand. J. Gastroenterol.* **1996**, *31* (2), 206–208.

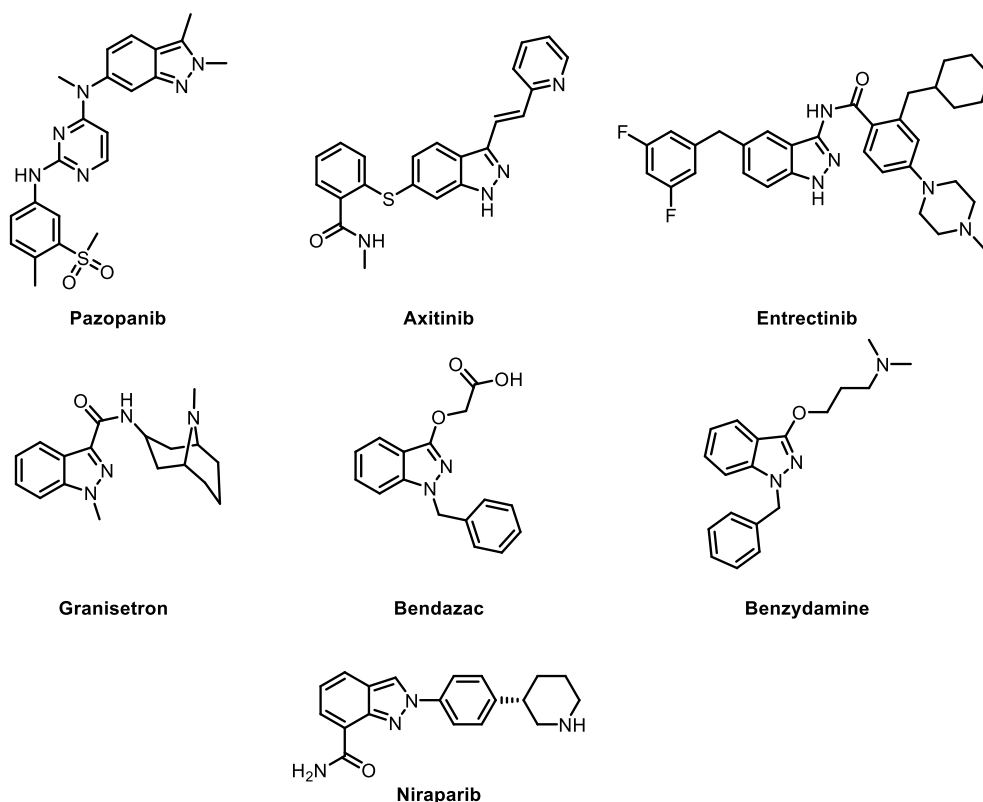


Figure 29: Formules chimiques des médicaments indazoliques

La plupart des médicaments commercialisés en série indazolique sont utilisés en oncologie *via* l'inhibition des tyrosines kinases. Toutefois, il ne s'agit pas de la seule cible étudiée dans ce domaine. De nombreux essais cliniques sont en cours de réalisation visant à stopper ou limiter le développement de ces pathologies et permettent d'affiner grandement la prise en charge de ces patients.

3. Composés indazoliques soumis à des essais cliniques

Actuellement, une vingtaine de composés en série indazolique sont soumis ou ont été soumis à des essais cliniques ciblant diverses pathologies notamment en oncologie, infectiologie ou en cardiologie. Dans ce manuscrit, nous précisons certains d'entre eux en détaillant l'objet de ces essais cliniques et le stade d'avancement de ces recherches. De plus, certains médicaments commercialisés font aussi l'objet d'études permettant d'étendre leur application dans diverses circonstances bien précises.

En oncologie, on note l'intérêt porté pour le **Lonidamine**, une molécule à activité antitumorale qui était testée en phase III d'essais cliniques pour le traitement de l'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) et dans les hypertrophies prostatiques (NCT00435448 et NCT00237536). Il a une action multiple puisqu'il agit en inhibant la glycogénolyse des cellules cancéreuses, en bloquant le complexe II des mitochondries qui permet la transformation du succinate en fumarate et en induisant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) avec pour conséquence de provoquer l'altération et la mort de

la cellule cancéreuse.¹⁴⁶ Ces deux études ont malheureusement été interrompues pour des raisons qui restent inconnues.

Le **Pictisilib** (GDC-0941) est un inhibiteur des phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) qui est impliqué dans la régulation de certains processus caractéristiques des cellules cancéreuses telle la croissance cellulaire, la survie, le métabolisme et l'invasion des métastases. Actuellement, il est en essai clinique de phase Ib pour le traitement des tumeurs solides ainsi que dans les cancers du sein métastasés (NCT02389842). Des études préalables (essais cliniques phase II) ont permis de déterminer l'efficacité de cette molécule ainsi que sa sureté en présence de traitements anticancéreux comme le Carboplatine, le Paclitaxel et le Bevacizumab pour traiter les Cancers du Poumon Non à Petites Cellules (CPNPC).^{147,148,149} Il est important de préciser qu'un essai clinique de phase II fut interrompu en 2017 lié à une toxicité trop importante du composé en présence de Cisplatine (NCT01918306).

Enfin, nous aborderons le **CFI-400945** qui est un inhibiteur de la polo-like kinase 4 (PLK4). La PLK4 est une protéine importante dans la régulation de la croissance, la division et la mort cellulaire.^{150,151} De nombreuses tumeurs produisent trop de PLK4 expliquant la croissance et la division incontrôlée des cellules cancéreuses. Par conséquent, en empêchant la protéine de fonctionner, ce composé pourrait limiter le développement de la tumeur, voire la réduire. Depuis 2014, un essai clinique de phase I est en cours de réalisation sur une cohorte de 48 patients présentant des cancers en stade avancé.¹⁵² De plus, 4 autres essais cliniques sont en cours de réalisation visant à déterminer l'ensemble des indications possibles pour ce composé d'intérêt.

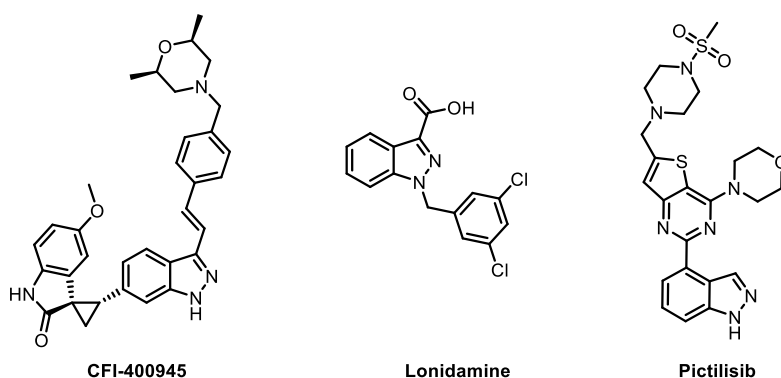


Figure 30: Composés indazoliques utilisés en oncologie dans le cadre d'essais cliniques

¹⁴⁶ Nath, K.; Guo, L.; Nancolas, B.; Nelson, D. S.; Shestov, A. A.; et al. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **2016**, *1866* (2), 151–162.

¹⁴⁷ Sarker, D.; Ang, J. E.; Baird, R.; Kristeleit, R.; et al. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21* (1), 77–86.

¹⁴⁸ Schmid, P.; Pinder, S. E.; Wheatley, D.; Macaskill, J.; et al. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34* (17), 1987–1994.

¹⁴⁹ Schöffski, P.; Cresta, S.; Mayer, I. A.; Wildiers, H.; et al. *Breast Cancer Res.* **2018**, *20* (1), 109.

¹⁵⁰ Sampson, P. B.; Liu, Y.; Forrest, B.; Cumming, G.; et al. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (1), 147–169.

¹⁵¹ Yu, B.; Yu, Z.; Qi, P.-P.; Yu, D.-Q.; Liu, H.-M. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *95*, 35–40.

¹⁵² Veitch, Z. W.; Cescon, D. W.; Denny, T.; et al. *Br. J. Cancer* **2019**, *121* (4), 318–324.

D'autres candidats médicaments sont utilisés en oncologie tels que le **BMS-599626**, la **Pyrazoloacridine**, le **Merestinib** ou encore le **NP-G2-044**. Une liste plus exhaustive est présentée dans le tableau 5.

Dans la MA, deux molécules portant le noyau indazole ont fait l'objet d'études : le **Cerlapirdine** et le **Facinicline**.

Le **Cerlapirdine** (PF-05212365 ou SAM-531) a été développé par les laboratoires Pfizer (Figure 31) et justifia son indication contre la MA et la schizophrénie par son action antagoniste des 5-HT₆R. Actuellement, on dénombre plus d'une dizaine d'essais cliniques utilisant ce composé. Des essais cliniques de phase II (2008) ont été réalisés et ne révélèrent aucune efficacité clinique versus placebo expliquant l'interruption de ces tests.¹⁵³ En 2010, un essai clinique de phase I fut entrepris sur une petite cohorte de sujets sains (6 sujets volontaires) avec pour objectif de déterminer une relation entre la concentration plasmatique du produit radiomarqué et la densité des 5-HT₆R détectables par imagerie PET (NCT01253655).

Le **Facinicline** ou MEM 3454 (Figure 31), un agoniste partiel des récepteurs $\alpha 7$ nicotinique et antagoniste des 5-HT₃R, fut utilisé à deux reprises comme traitement symptomatique de la MA par modulation de la libération d'acétyl choline.¹⁵⁴ Le premier essai clinique de phase II (NCT00454870) rassembla une cohorte de 80 patients atteints par la MA et fut réalisée de 2007 à 2008 (8 semaines de traitements).¹⁵⁴ Il montra un bénéfice des fonctions cognitives chez ces patients mais fut abandonné suite à un deuxième essai clinique (NCT00884507) réalisé sur une cohorte de 389 patients (versus placebo).^{155,156}

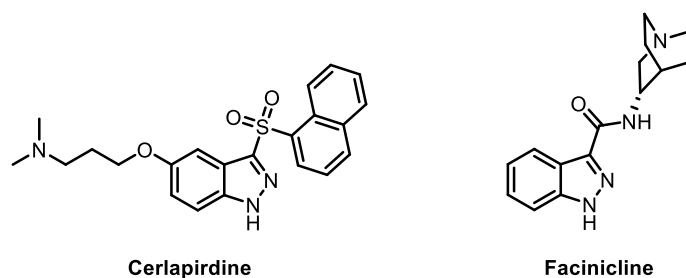


Figure 31: Candidats médicaments testés dans la MA

¹⁵³ Ferrero, H.; Solas, M.; Francis, P. T.; Ramirez, M. J. *CNS Drugs* **2017**, *31* (1), 19–32.

¹⁵⁴ Rezvani, A. H.; Kholdebarin, E.; Brucato, F. H.; et al. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **2009**, *33* (2), 269–275.

¹⁵⁵ Haydar, S.; Dunlop, J. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10* (2), 144–152.

¹⁵⁶ Dunkel, P.; Chai, C.; Sperlágh, B.; Huleatt, P.; Mátyus, P. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2012**, *21* (9), 1267–1308.

En infectiologie, deux composés indazoliques sont en essais cliniques : le **Lenacapavir** (GS-6207) et le **Vagezepant** (BHV-3500).

Le **Lenacapavir** (Figure 32) est un inhibiteur de capsid utilisé sur le Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1) responsable du Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise (SIDA). Actuellement, deux essais cliniques en phase II sont réalisés sur une cohorte de 100 et 175 patients (NCT04150068 et NCT04143594). Cette nouvelle stratégie permettrait d'inhiber le cycle de développement du VIH en inhibant la protection du matériel génétique du virus, en empêchant sa pénétration dans la cellule et en inhibant le pouvoir infectieux des nouvelles copies.^{157,158} Les résultats de ces études ne sont pas encore connus mais représentent un espoir dans la prise en charge des patients atteints de cette pathologie.

Le **Vagezepant** (Figure 32) est un antagoniste des CGRP (Calcitonin-Gen Related Peptide) étudié principalement dans la lutte contre les migraines aiguës. Le CGPR entraîne la dilatation des vaisseaux sanguins et joue un rôle dans la transmission de la douleur. Pendant la crise migraineuse, il y a augmentation de ce neuropeptide notamment au niveau des ganglions sensitifs et dans le nerf trijumeau localisé dans la base du crâne. Son inhibition module la cascade réactionnelle biochimique responsable de la crise.¹⁵⁹

En 2020, une étude (NCT04346615) financée par Biohaven Pharmaceutical Inc. a été initiée avec pour but principal de déterminer si ces antagonistes des CGRP peuvent réguler la réponse inflammatoire sévère au niveau alvéolaire, principale cause de décès chez les patients atteints par la COVID-19 (Coronavirus Disease 2019).¹⁶⁰

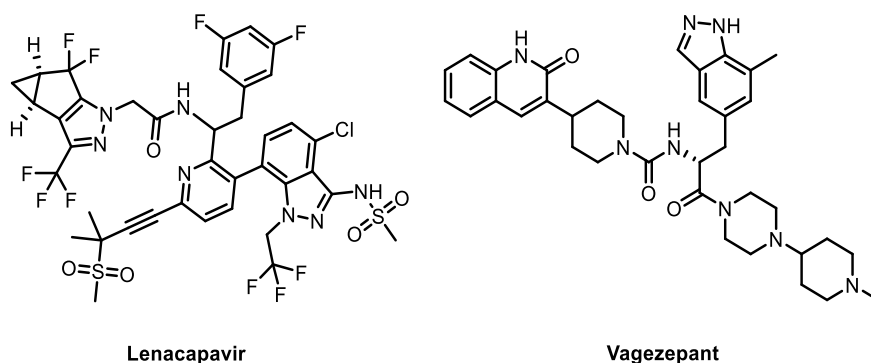


Figure 32: Composés indazoliques étudiés en infectiologie

¹⁵⁷ Marcelin, A. G.; Charpentier, C.; Jary, A.; Perrier, M.; et al. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, 75 (6), 1588–1590.

¹⁵⁸ McArthur, C.; Gallazzi, F.; Quinn, T. P.; Singh, K. *Diseases* **2019**, 7 (4), 56.

¹⁵⁹ Macone, A.; Tepper, S. J. *Futur. Drug Discov.* **2019**, 1 (2), FDD14.

¹⁶⁰ Poduri, R.; Joshi, G.; Jagadeesh, G. *Cell. Signal.* **2020**, 74, 1-60.

Enfin, d'autres candidats médicaments sont à l'étude pour des indications n'appartenant pas à ces grandes disciplines. Parmi eux, on distingue le **Bindarit**, le **Lorecivivint** (SM04690), le **Danicopan** (ACH-4471) et le **Granisétron**.

Le **Bindarit** (Figure 33) est un modulateur de la réponse inflammatoire étudié dans de nombreuses pathologies comme la néphrite lupique, l'arthrite, la pancréatite, la sténose coronarienne ainsi que dans la néphropathie diabétique.¹⁶¹ C'est pour ces deux dernières indications qu'il a été testé *via* des essais cliniques de phase II (NCT01269242 et NCT01109212). Ce composé indazolique est un inhibiteur de MCP-1 qui est produit dans les cellules en réponse à un stimulus pro-inflammatoire (taux de glucose élevé, HbA1c). MCP-1 entraîne le recrutement des monocytes sanguins et des macrophages tissulaires se traduisant par la fibrose du tissu concerné et donc à la perte de sa fonction. Dans le rein, l'accumulation des macrophages entraîne des lésions des glomérules rénaux qui se complique en sclérose glomérulaire provoquant une insuffisance rénale aiguë (IRA).¹⁶² Cette IRA constitue un facteur de gravité important chez des populations à risque comme les diabétiques. C'est pourquoi, le développement d'un anti-inflammatoire comme **Bindarit** constitue une avancée importante dans la prise en charge de ces patients.

L'ostéoarthrose (OA) est une maladie dégénérative qui se caractérise par une perte de cartilage et une augmentation de l'os sous-chondral dans les articulations synoviales. La voie de signalisation Wnt est impliquée dans sa pathogénèse puisqu'elle module à la fois la différenciation des ostéoblastes ou chondrocytes et participe à la production de protéases cataboliques. Le **Lorecivivint** (Figure 33) est un inhibiteur de cette voie de signalisation. Il permet de stimuler la réparation articulaire *via* la différenciation des chondrocytes et réduit l'avancée de la maladie en limitant l'action des protéases responsables de la destruction du cartilage.¹⁶³ Actuellement, il est au centre de trois essais cliniques (phase III) visant à déterminer sa sûreté et son efficacité dans les OA du genoux.

Le **Danicopan** (Figure 33) est un inhibiteur affin et sélectif du facteur D (Kd = 0,54 nM). Il inhibe la voie alternative du complément qui est responsable de la lyse des hématies retrouvée notamment dans l'Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne (HPN).¹⁶⁴ Actuellement, trois essais cliniques sont en cours de recrutement de cohorte et visent à déterminer la sûreté et l'efficacité de ce composé chez l'homme sain et chez des participants atteints de HPN.

¹⁶¹ Lacava, V.; Pellicanò, V.; Ferrajolo, C.; Cernaro, V.; *et al.* *Expert Opin. Investig. Drugs* **2017**, *26* (4), 445–462.

¹⁶² Tesch, G. H. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2008**, *294* (4), F697–F701.

¹⁶³ Deshmukh, V.; Hu, H.; Barroga, C.; Bossard, C.; *et al.* *Osteoarthr. Cartil.* **2018**, *26* (1), 18–27.

¹⁶⁴ Yuan, X.; Gavriilaki, E.; Thanassi, J. A.; Yang, G.; *et al.* *Haematologica* **2017**, *102* (3), 466–475

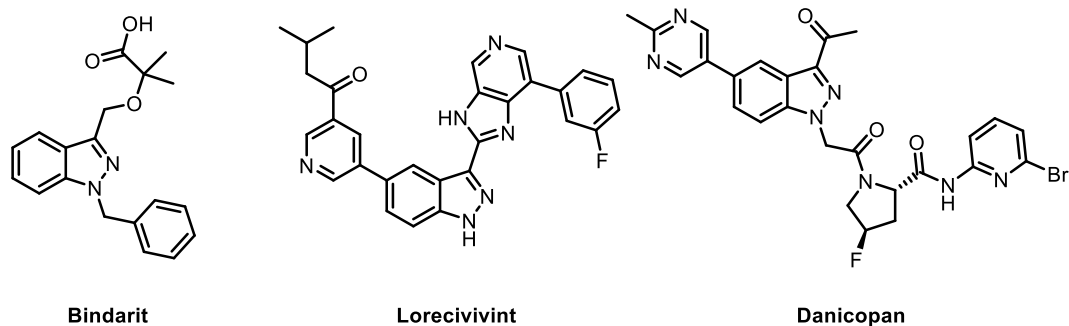


Figure 33: Composés indazoliques testés dans diverses indications

Malgré sa commercialisation, le **Granisétron** est au centre de nombreux essais cliniques (9 essais cliniques en cours) avec pour intérêt de tester de nouvelles indications et pour vérifier sa toxicité en association avec d'autres thérapies.

Le tableau récapitulatif ci-dessous (non exhaustif) présente ces composés indazoliques en précisant pour chacun l'indication, le statut, les dates, la taille de la cohorte et l'identification de l'essai clinique (Tableau 5). Ces données proviennent du site www.clinicalTrials.gov.

Nom	Indications	Phase	Statut	Dates	Cohorte	N°EC
Oncologie						
Lonidamine	Hyperplasie et HBP	III	Interrompue	2005-2006	480	NCT00435448
	HBP	II	Interrompue	2005-2006	240	NCT00237535
Pictilisib	Tumeurs solides et cancer du sein	Ib	En cours	2015- ???	93	NCT02389842
	Cancer du poumon (non à petite cellules)	II	Terminé	2011-2017	501	NCT0149843
	Cancer du sein avec Cisplatine	I et II	Interrompue	2013-2017	11	NCT01918306
CFI-400945	Cancer du sein	II	En cours	2019- ??	28	NCT04176848
	LAM, syndromes myélodysplasiques	I	En cours	2017- ???	48	NCT03187288
	Cancers avancés	I	En cours	2013- ???	48	NCT01954316
	Cancer du sein avancé ou métastaté	II	En cours	2018- ???	72	NCT03624543

	Biomarqueur du cancer de la prostate	II	En cours	2017- ???	500	NCT03385655
Merestinib	Carcinome, tumeurs solides, CPNPC	II	En cours	2016- ???	12	NCT02920996
	Cancer tractus biliaire, métastasé/avancé	II	En cours	2016- ???	306	NCT02711553
	Tolérance et sureté Nombreux cancers	I	En cours	2016- ???	215	NCT02791334
GDC-0810	Cancer du sein	I	En cours	2017- ???	220	NCT03332797
	Volontaires sains Pharmacocinétique	I	Terminé	2016-2017	45	NCT02722018
BMS-599626	Gliomes malins	I	Terminé	2009-2014	5	NCT00979173
	Tumeurs solides	I	Terminé	2004-2012	9	NCT00093730
	Tumeurs solides HER2 ou EGFR positif	I	Terminé	2005-2010	45	NCT00207012
Pyrazoloacridine	Cancer du sein	II	Terminé	1994-1999	20	NCT00002585
	Cancer du SNC	I et II	Terminé	2000-2004	-	NCT00006355
	Mélanomes	II	Terminé	1999-2003	-	NCT00003802
LY2874455	Cancer avancés	I	Terminé	2010-2015	94	NCT01212107
	Leucémie aigüe myéloïde	I	Terminé	2017-2020	16	NCT03125239
NP-G2-044	Nombreux cancers	I	En cours	2017- ???	60	NCT03199586
Maladie d'Alzheimer						
Cerlapirdine	Humains volontaires	I	Terminé	2010-2011	6	NCT01253655
	MA	II	Terminé	2009-2013	526	NCT00895895
		II	Terminé	2007-2009	72	NCT00481520
Facinicline	MA	II	Terminé	2007-2008	80	NCT00454870
		II	Terminé	2009-2010	389	NCT00884507
Infectiologie						
Lenacapavir	VIH-1	II	En cours	2019- ???	175	NCT04143594
		II / III	En cours	2019- ???	100	NCT04150068
Vagezepant	COVID-19	II / III	En cours	2020- ???	120	NCT04346615

	Migraine aiguë	II / III	En cours	2020- ???	600	NCT04408794
	Migraine	II / III	Terminé	2019-2020	2154	NCT03872453
Autres indications						
Bindarit	Néphropathie diabétique	II	Terminé	2007-2008	100	NCT01109212
	Sténose coronarienne	II	Terminé	2009-2011	148	NCT01269242
Loxecivint	OA du genoux	III	En cours	2020- ???	500	NCT04520607
		III	En cours	2020- ???	726	NCT04385303
		III	En cours	2019- ???	725	NCT03928184
Danicopan	HPN	II	En cours	2021- ???	26	NCT04170023
		III	En cours	2020- ???	84	NCT04469465
	Volontaires sains	I	En cours	2020- ???	9	NCT04451434
Granisétron	Nausées post-chimio (2 à 5 ans)	II	En cours	2019- ???	30	NCT040855393
	Nausées post-chimio (6 à 12 ans)	I	En cours	2012- ???	16	NCT01596413
	Sepsis	II	En cours	2019- ???	154	NCT03924518

Tableau 5: Essais cliniques réalisés sur les composés indazoliques

Depuis, leur découverte par Dumuis *et al.*, le 5-HT₄R a fait l'objet de nombreuses études. L'indazole s'est rapidement affirmé comme un noyau chimique d'intérêt en raison son homologie avec le motif indole qui constitue le ligand endogène : la 5-HT. Dans le paragraphe suivant, nous préciserons les publications et brevets évoquant son utilisation.

4. Ligands indazoliques affins et sélectifs des 5-HT₄R décrits dans la littérature

En 1992, Kaunmann *et al.* publièrent le premier article révélant l'intérêt de remplacer l'indole par un indazole (Figure 34). Il synthétisa 5 composés indazoliques et détermina, pour chacun d'entre eux, l'interaction avec le 5-HT₄R *via* le calcul du pKB (constante de dissociation).¹³⁶

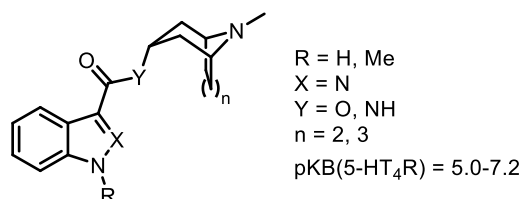


Figure 34: Pharmacomodulations réalisées par Kaunmann *et al.*

En 1997, Kikuchi *et al.* étudièrent plus précisément les agonistes des 5-HT₄R et déposèrent un brevet (US 005684003A) dévoilant un grand nombre de pharmacomodulations de ce cycle indazole avec pour structure commune, la présence d'une liaison amide et du cycle 3-oxa-9-azabicyclo[3.3.1]nonane (Figure 35). Ainsi, ils calculèrent les ED_{50%} correspondant à la concentration du composé nécessaire pour provoquer 50% de la relaxation musculaire (œsophage de rat).¹⁶⁵

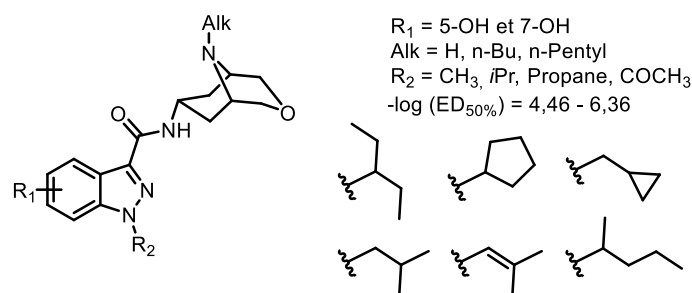
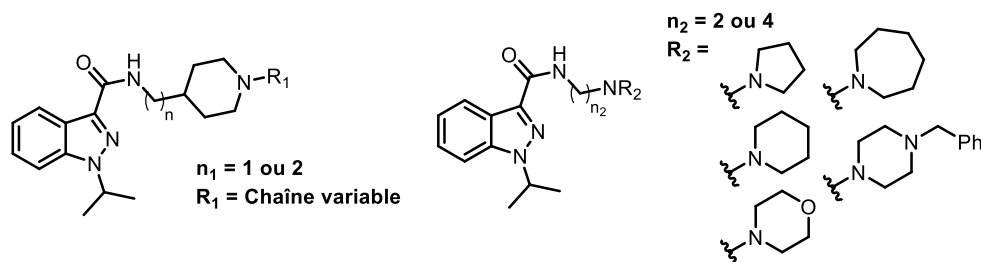


Figure 35: Pharmacomodulations d'agonistes affins et sélectifs des 5-HT₄R

En 1998 et 2000, Schaus *et al.* publièrent une étude et un brevet complémentaire ouvrant de nouvelles perspectives en série indazolique *via* la synthèse de dérivés portant une pipéridine sur la chaîne latérale (Figure 36).^{166,167}

Publication *J. Med. Chem.* **1998**



Brevet US006069152A. **2000**

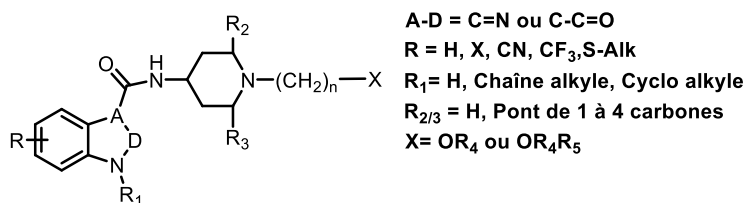


Figure 36: Composés indazoliques développés par Schaus *et al.*

En 2006, Becker *et al.* publièrent une nouvelle série de composés pyrrolizidine. Malgré de bonnes affinités (K_i de l'ordre du nanomolaire), ces composés n'ont pas été davantage explorés.¹⁶⁸

¹⁶⁵ Kikuchi, H.; Satoh, H.; Suzuki, M.; Fukutomi, R.; Ueno, M., **1997**. US 005684003A.

¹⁶⁶ Schaus, J. M.; Thompson, D. C.; Bloomquist, W.; Susemichel, A.; *et al.* *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (11), 1943–1955.

¹⁶⁷ Schaus, J. M.; Cohen, M. L.; Thompson, D. C.; **2000**. US006069152A

¹⁶⁸ Becker, D. P.; Flynn, D. L.; Moormann, A. E.; Nosal, R.; *et al.* *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (3), 1125–1139.

Entre 2008 et 2012, on compte plus de 6 publications faisant référence à de nouvelles molécules en série indazolique. Les brevets US 007351704B2¹⁶⁹ et US 007674908B2¹⁷⁰ se concentrèrent sur la détermination d'agonistes en série indazole-carboxamide ; la publication de McKinnell *et al.* confirma l'intérêt d'insérer un carbone entre la liaison amide et la pipéridine¹⁷¹ ; Celle de Furlotti *et al.* révéla la perte importante d'affinité pour les composés *N*₂-alkylés comparativement aux *N*₁-alkylés. De plus, cette dernière étude calcula la lipophilie pour l'intégralité des molécules synthétisées.¹⁷²

Plus récemment, Nirogi déposa 3 brevets sur des composés indazoliques : US010005711B2, US 009636335B2 et US009951045B2. Le brevet US 010005711B2 décrit précisément la voie de synthèse d'un composé portant en position 3 un motif chimique 1,3,4 oxadiazole.¹⁷³ Ce brevet a été complété en 2017 par le US 009636335B2 qui décrit un grand panel de composés dans la même série.¹⁷⁴ Enfin, le brevet US 010005711B2 se distingua par la description de nouveaux composés indazoliques portant en position 7 le même motif 1,3,4 oxadiazole.¹⁷⁵

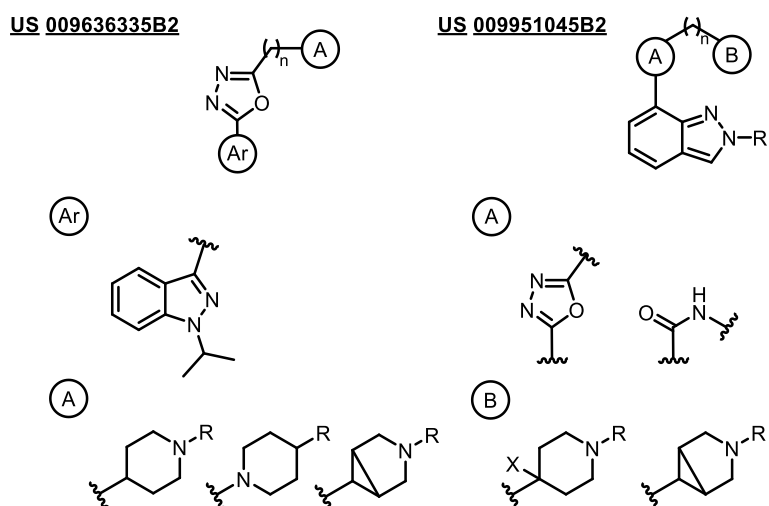


Figure 37: Composés indazoliques en série 1,3,4 oxadiazole

Enfin, le Dr. Bao Vy Lam, sous la direction du Pr. Valérie Collot, s'intéressa à une nouvelle série de composés en série iodoindazole. Cette addition d'un iode en position 4,5,6 ou 7 du cycle n'a pas pour objectif d'optimiser l'affinité ou la spécificité vis-à-vis des 5-HT₄R mais de permettre son remplacement par un iode-123 et par ce biais, d'obtenir des radiotraceurs pour ces mêmes récepteurs. Ce travail est à l'origine même de mon projet de thèse puisque le Dr. Lam synthétisa le premier composé en série

¹⁶⁹ Marquess, D.; Choi, S.-K.; Fatheree, P.; Gendron, R., **2008**. US 7351704B2.

¹⁷⁰ Choi, S.-K.; Goldblum, A. A.; Long, D. D., **2010**. US 007674908B2.

¹⁷¹ McKinnell, R. M.; Armstrong, S. R.; Beattie, D. T.; Choi, S.-K.; *et al.* *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (17), 5330–5343.

¹⁷² Furlotti, G.; Alisi, M. A.; Apicella, C.; Capezzone de Joannon, A.; *et al.* *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (22), 9446–9466.

¹⁷³ Nirogi, R.; Mohammed, A. R.; Jasti, V.; **2016**. US 010005711B2.

¹⁷⁴ Nirogi, R.; Mohammed, A. R.; Yarlagadda, S.; Ravella, S. R.; Shinde, A. K.; **2017**. US 009636335B2.

¹⁷⁵ Nirogi, R.; Rasheed, M. A.; Shinde, A. K.; Gagginapally, R.; Jasti, V.; **2018**. US 009951045B2.

fluoroindazole et révéla sa très forte affinité pour les 5-HT₄R (Figure 38). Ces travaux seront détaillés dans la suite de ce manuscrit.

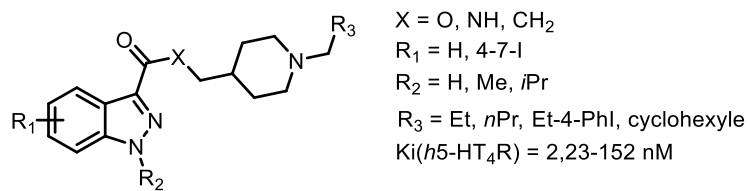


Figure 38: Travaux du Dr. Lam en série iodoindazole

Chapitre 2: Contexte et objectifs du projet

Le Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN) est un laboratoire de chimie thérapeutique qui consacre son activité à plusieurs domaines essentiels de la médecine moderne comme l'oncologie, l'infectiologie et les neurosciences. Ces équipes participent activement au développement de nouvelles molécules innovantes utilisées notamment pour leur propriété thérapeutique à l'égard de pathologies humaines comme la MA, le paludisme et le cancer de l'ovaire. Ces dix dernières années, un deuxième axe de recherche s'est considérablement développé au sein du laboratoire avec pour objectif principal de mettre au point de nouvelles méthodologies de radio-marquage à l'iode (123, 125 et 131) mais aussi par la synthèse de radiotraceurs utilisables en imagerie médicale TEP et TEMP. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de thèse puisque celui-ci est l'aboutissement de ces nombreux travaux explorant de nombreuses familles chimiques et visant spécifiquement le 5-HT₄R.

I- Contexte du projet de thèse

Les premières études ciblant les récepteurs sérotoninergiques ont été initiées au CERMN à la fin des années 1990 et ont fait l'objet de sept publications durant ces vingt dernières années. Rault *et al.* initièrent ces recherches en développant de nouveaux composés affins et sélectifs des 5-HT₃R. Les nombreuses pharmacomodulations appliquées au tricycle pyrrolo[1,2-*a*]thiéo[3,2-*e*]pyrazine ont permis d'obtenir plus d'une cinquantaine de nouveaux ligands affins pour cette cible.¹⁷⁶ Parmi eux, le **S-21007 (13a** dans la publication) s'est imposé comme étant le plus prometteur (Ki(5-HT₃R) = 1,41 nM) notamment en raison de sa capacité à activer le récepteur (agoniste partiel). Les études réalisées à cette époque, démontrèrent qu'un certain nombre de composés affins des 5-HT₃R possédaient une affinité amoindrie pour les 5-HT₄R mais bel et bien existante (Chapitre 1:1-2.3.5.2). C'est pourquoi, les recherches suivantes s'inspirèrent de la structure du S-21007 en la combinant avec celle de ligands affins des 5-HT₄R préalablement identifiés (GR113808, SB204070). Cette démarche offrit de nouvelles perspectives dans le développement de nouvelles séries de dérivés tricycliques affins pour cette nouvelle cible (Figure 39). En 2003, Hirschberger *et al.* détectèrent le potentiel intéressant du noyau [1,6]naphthyridine et synthétisèrent une dizaine de nouveaux antagonistes affins pour le 5-HT₄R. Le lead issu de ces recherches, le **MR-21366 (4a** dans la publication) présenta une affinité très importante pour ces récepteurs (Ki(5-HT₄R) = 2,89 nM) et une inhibition de la production de l'AMPC intracellulaire (cellules COS-7) d'environ 70%.¹⁷⁷

¹⁷⁶ Rault, S.; Lancelot, J.-C.; Prunier, H.; Robba, M.; Renard, P.; *et al.* *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (10), 2068–2080.

¹⁷⁷ Hirschberger, A.; Butt, S.; Lelong, V.; Boulouard, M.; *et al.* *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (1), 138–147

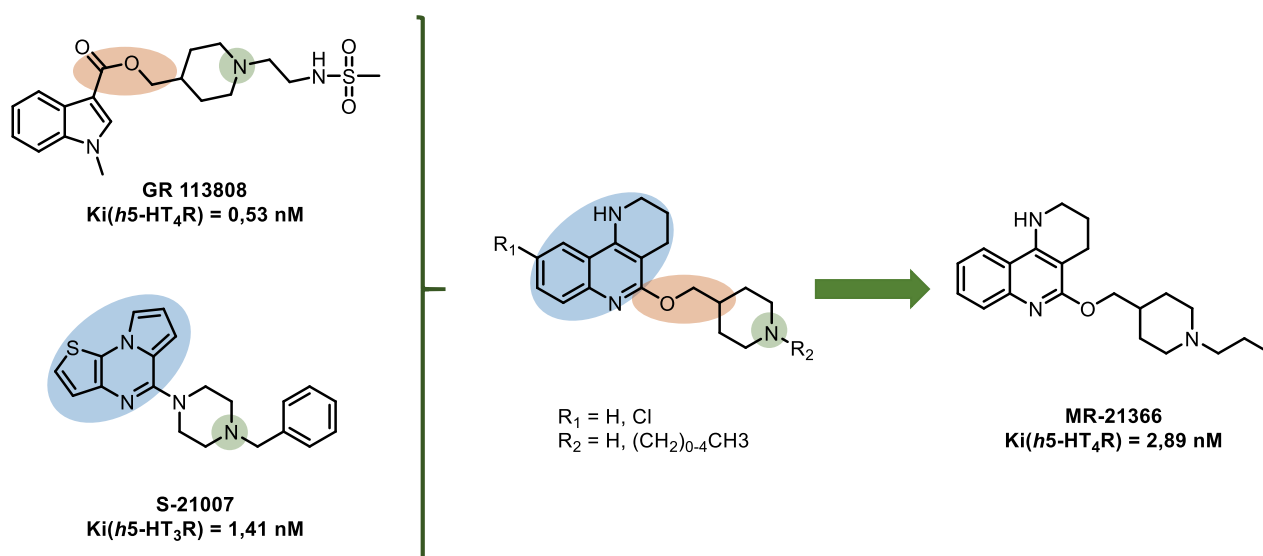
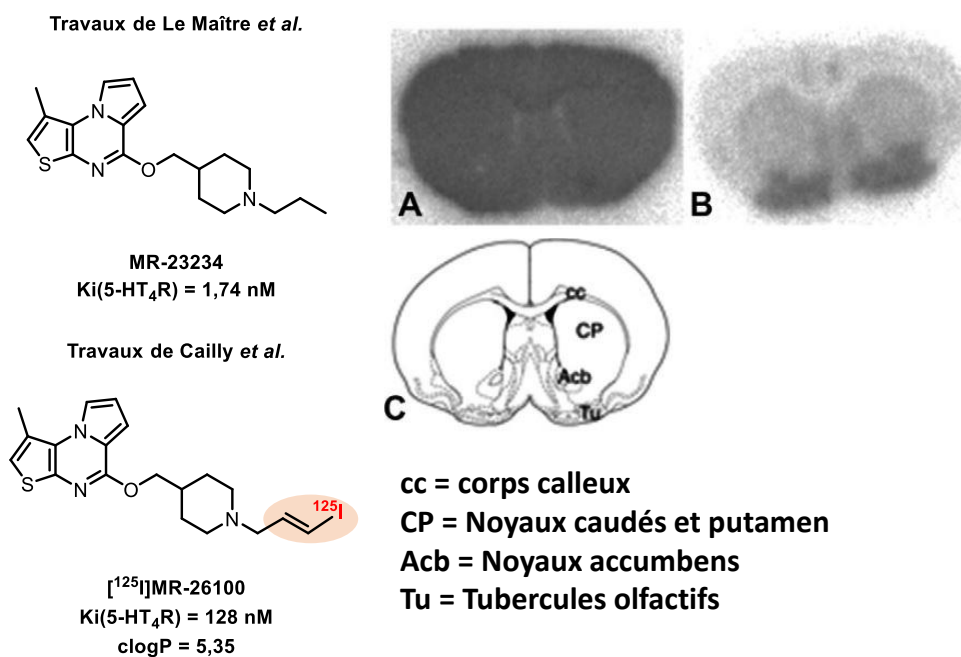


Figure 39: Ligands affins des 5-HT₄R issus du S-21007

En 2009, Lemaître *et al.* se réintéressèrent aux motifs Pyrrolo[1,2-*a*]thiéno[3,2-*e*]pyrazine et pyrrolo[1,2-*a*]thiéno[2,3-*e*]pyrazine et proposèrent une nouvelle série de dérivés s'inspirant du pharmacophore des antagonistes 5-HT₄R déterminé dans la même décennie par Bureau *et al.*¹⁷⁸ Le composé **MR-23234** (**34d** dans la publication) se révéla être le plus prometteur ($K_i(5-HT_4R) = 1,74 \text{ nM}$) et devint le point de départ pour la synthèse du premier radioligand du CERMN. En effet, Cailly *et al.* réutilisèrent ce même motif chimique mais effectuèrent des modifications de la chaîne latérale portée par la pipéridine. L'introduction d'un iode ouvra de nouvelles perspectives de radiomarquage et aboutira à la mise au point du [¹²⁵I]MR-26100 ([¹²⁵I]-7 dans la publication).¹⁷⁹ Ce dernier fut testé chez l'animal (*ex vivo* sur des coupes de cerveau de souris) mais n'a pas permis d'apprécier une intensité radioactive dans les aires cérébrales en corrélation avec les données acquises précédemment avec les radiotraceurs de référence ([¹²⁵I]-SB207710). L'autoradiographie révéla une fixation diffuse du radiotraceur pouvant être la résultante d'un manque de spécificité ou d'une lipophilie trop importante (Figure 40).

¹⁷⁸ Lemaître, S.; Lepailleur, A.; Bureau, R.; Butt-Gueulle, S.; *et al.* *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (6), 2607–2622.

¹⁷⁹ Cailly, T.; Dumas, N.; Millet, P.; Lemaître, S.; *et al.* *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (11), 5465–5467.



A : marquage *ex vivo* du [¹²⁵I]MR-26100 sur coupe de cerveau de souris
B : marquage *ex vivo* du [¹²⁵I]SB-207710 (référence) sur coupe de cerveau de souris
C : représentation schématique des aires cérébrales denses en 5-HT₄R

Figure 40: Développement et autoradiographies du [¹²⁵I]MR-26100

En parallèle de ce travail, le Dr. Dubost étudia deux autres familles de composés tricycliques : les aza et diazaphénanthridines.¹⁸⁰ Cette équipe du CERMN réalisa de nombreuses modifications du cycle et de ses substituants permettant d'obtenir trois radiotraceurs affins des 5-HT₄R marqués à l'iode-125 ([¹²⁵I]MR-29302, [¹²⁵I]MR-29303 et [¹²⁵I]MR-29308) (Figure 41). L'affinité, la spécificité et le profil pharmacologique des ligands froids ont été déterminants dans le choix de ces trois composés. Ainsi, des tests *in vitro* et *ex vivo* ont été réalisés sur des souris et ont permis de mettre en évidence des phénomènes compétitifs sur les 5-HT₄R entre le radiotraceur de référence le [¹²⁵I]SB207710 ([¹²⁵I]1 dans la publication) et le ligand froid MR-29308. Malgré ces résultats encourageants, aucun d'entre eux n'a permis d'aboutir à l'obtention d'un radiotraceur efficace en raison d'un radiomarquage diffus principalement lié à une lipophilie trop importante.

¹⁸⁰ Dubost, E.; Dumas, N.; Fossey, C.; Magnelli, R.; *et al.* *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (22), 9693–9707.

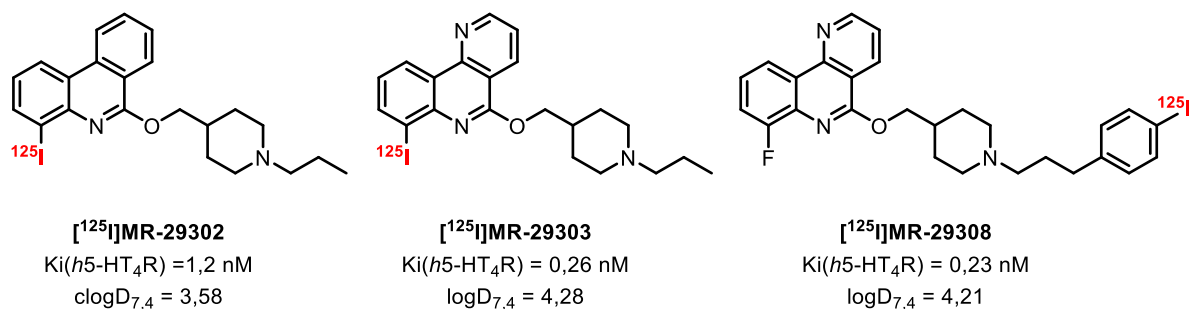


Figure 41: Radiotraceurs des 5-HT₄R synthétisés par Dubost et al.

En 2015, Fresneau et al complétèrent ces travaux en développant une nouvelle série de molécules moins lipophile *via* l'insertion d'un azote supplémentaire en position 7.¹⁸¹ De nombreuses pharmacomodulations du cycle diazaphénanthridine ont été envisagées permettant d'obtenir plus d'une dizaine de composés affins des 5-HT₄R (affinité de l'ordre du nanomolaire). Parmi eux, le **MR-26132** en série iodé et le **MR-26117** en série fluorée ont attiré une attention toute particulière en raison de leur très forte affinité et spécificité. Le **MR-26132** a été radiomarqué à l'iode-125 *via* un intermédiaire stannylé et a été testé *in vitro* et *ex vivo* chez la souris. Les résultats démontrèrent l'intérêt de diminuer la lipophilie puisqu'il a été observé une intensité radioactive importante au niveau des aires cérébrales riches en 5-HT₄R en corrélation partielle avec les résultats obtenus avec les radiotraceurs de référence. L'injection concomitante du **RS-39604** (antagoniste de référence) et du [¹²⁵I]MR-26132 confirma la spécificité des liaisons par diminution de cette émission radioactive sur les autoradiographies. Malheureusement, le marquage de certaines régions cérébrales dépourvues de 5-HT₄R a été observé pouvant être dû à une lipophilie encore trop élevée pour permettre une liaison spécifique (Figure 42).

¹⁸¹ Fresneau, N.; Dumas, N.; Tournier, B. B.; Fossey, C.; et al. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *94*, 386–396.

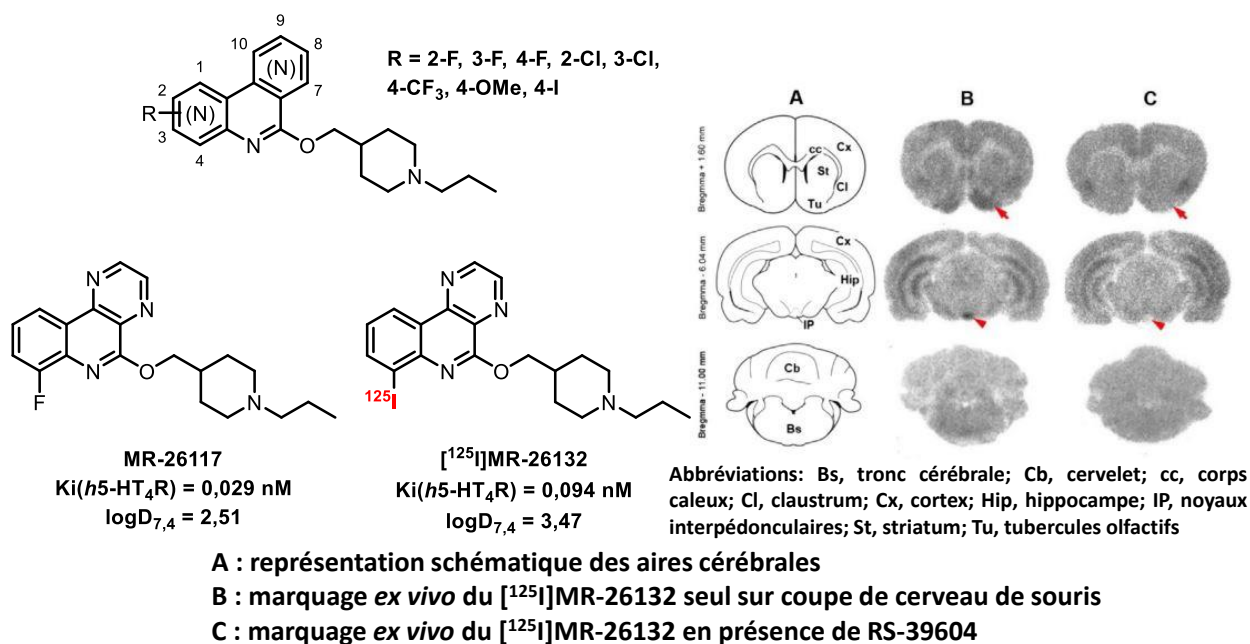


Figure 42: Travaux et évaluation biologique du [¹²⁵I]MR-26132 par Fresneau et al.

En 2020, Babin *et al.* prolongèrent ces travaux en faisant varier les chaînes latérales portées par la pipéridine. L'introduction d'un groupement hydroxyle ou d'une amine offrit de nouvelles perspectives notamment en faisant baisser la lipophilie. Il synthétisa vingt-cinq nouveaux ligands affins vis-à-vis des 5-HT₄R et sélectionna les molécules les plus prometteuses à l'aide d'un indice qui n'avait pas été exploré jusque-là : le ligand lipophilicity efficiency (LLE).¹⁸² Cette approche innovante en drug design prend en compte l'affinité et la lipophilie pour prédire l'intérêt d'un composé chimique comme radiotraceur de récepteurs centraux. Par cette méthode, il sélectionna le **MR35109** ($K_i(h5-HT_4R) = 3,9 \text{ nM}$, $\log P = 2,39$, $LLE = 6,02$) et le fit marquer à l'iode-125 aboutissant au radiotraceur [¹²⁵I]MR35109. Des tests compétitifs en présence du radiotraceur de référence (SB207710) ont été menés et ont montré une diminution de l'intensité radioactive inférieure à celle obtenue avec le MR-26132 (issus des travaux de Fresneau *et al.*). Les études *in vivo* (imagerie TEMP) n'ont pas permis d'observer d'émission radioactive dans les zones riches en 5-HT₄R (striatum, hippocampe) probablement lié à un

¹⁸² Babin, V.; Tournier, B. B.; Davis, A.; Dubost, E.; *et al.* *Bioorg. Chem.* **2020**, *96*, 1–13.

défaut majeur de passage de la BHE (Figure 43). Malgré une approche intéressante, ce projet n'a pas pu aboutir à la mise au point d'un radiotraceur affin et sélectif des 5-HT₄R.

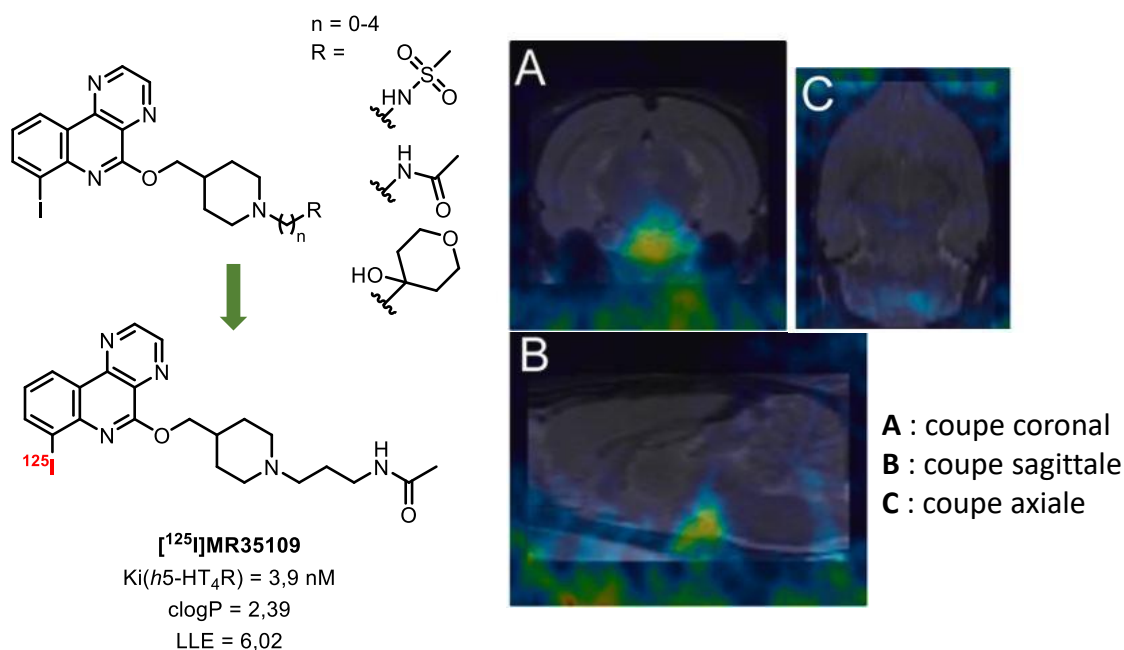
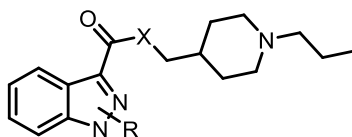


Figure 43: Synthèse du radiotraceur [¹²⁵I]MR35109 et évaluation biologique

Les motifs aza- et diazaphénanthridines sont des noyaux aromatiques tricycliques très lipophiles ce qui explique les difficultés d'obtention d'un radiotraceur passant à la fois la BHE et se fixant sélectivement sur un seul type de récepteur. C'est pourquoi, une deuxième stratégie fut développée parallèlement avec pour objectif principal de remplacer ces noyaux par un cycle aromatique moins lipophile. Ces travaux dirigés par le Pr. Valérie Collot se concentrèrent sur l'indazole en raison de sa lipophilie modérée (bicycle), sa résistance au métabolisme et par son homologie de structure avec le GR113808 (noyau indole). Le Dr. Quintin élaborait une première série de composés en série ester et amide et observa une diminution très importante de l'affinité des composés N2-alkylés comparativement aux composés N1-alkylés. De plus il révéla l'intérêt du groupement isopropyl (*i*Pr) fixé sur l'azote en position 1 du cycle (Tableau 6).



Composé	X	R	% inh. (10 ⁻⁶ /10 ⁻⁸ M)	Ki 5-HT ₄ R cobaye (nM)
MR-31700	O	H	100/83	2,62 (n = 3)
MR-31703	O	1-Me	100/90	1,18 (n = 3)
MR-31704	O	1- <i>i</i> Pr	95/77	0,38 (n = 3)

MR-26112	O	2- <i>i</i> Pr	100/17	29,3 (n = 3)
MR-26108	NH	1-Me	100/25	36,3 (n = 1)
MR-31523	NH	1- <i>i</i> Pr	100/75	1,86 (n = 3)
MR-31524	NH	2- <i>i</i> Pr	45/8	nd

nd, non déterminé (%inh. insuffisant)

Tableau 6: Affinité des premiers composés synthétisés en série indazole

Le Dr. Lam étoffa ce projet en intégrant à cette série de composés indazoliques, un iode qui pouvait être remplacé par un atome radioactif dans le cadre de l'imagerie TEMP. Ses travaux de thèse se concentrèrent d'une part sur la mise au point de composés en série 4,5,6 et 7-iodoindazole et d'autre part sur la synthèse de dérivés portant l'iode sur la chaîne latérale de la pipéridine. De plus, elle augmenta considérablement le panel de dérivés indazoliques en faisant varier la nature du R₂, les chaînes latérales et en développant 3 linkers différents (ester, amide et cétone) (Figure 44).

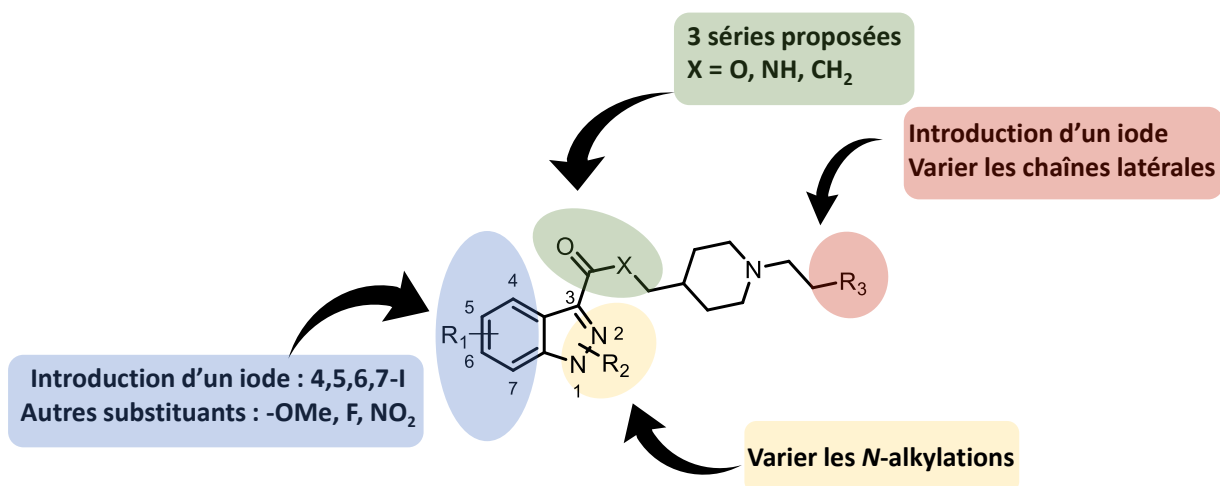
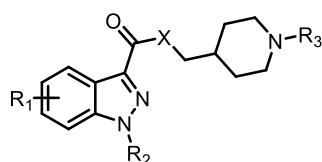


Figure 44: Pharmacomodulations envisagées en série iodoindazole

Ces nombreuses pharmacomodulations lui ont permis d'obtenir plus d'une vingtaine de composés indazoliques, pour lesquels elle détermina l'affinité vis-à-vis des 5-HT₄R *via* des tests *in vitro* effectués par la plateforme screening et drugabilité du CERMN. Ainsi, elle confirma les hypothèses formulées précédemment en décrivant la supériorité des composés portant un *i*Pr sur l'azote en position 1 du cycle. De plus, elle démontra que la présence d'un atome d'iode sur l'indazole diminuait l'affinité pour les 5-HT₄R. Parmi les séries explorées, la série 4-iodoindazole semblait être la plus prometteuse, de même pour celles portant l'iode sur la chaîne latérale (Tableau 7).



Composé	X	R ₁	R ₂	R ₃	%inh. (10 ⁻⁶ /10 ⁻⁸ M)	Ki 5-HT ₄ R (nM)
MR-31700	O	H	H	C ₃ H ₇	100/83	2,62
MR-33011	O	4-I	H	C ₃ H ₇	102/78	10,2
MR-31705	O	5-I	H	C ₃ H ₇	93/11	118
MR-31707	O	5-I	1- <i>i</i> Pr	C ₃ H ₇	100/22	16,5
MR-33010	O	6-I	H	C ₃ H ₇	81/1	nd
MR-33006	O	7-I	H	C ₃ H ₇	98/33	120
MR-29319	O	H	H	Prop-4-PhI	100/3	26,5
MR-33000	O	H	1- <i>i</i> Pr	Prop-4-PhI	100/87	2,23

Tableau 7: Ligands affins des 5-HT₄R en série iodoindazole

Enfin, elle observa une supériorité des composés en série ester comparativement à leurs homologues en série amide et cétone (Tableau 8).

Composé	X	R ₁	R ₂	R ₃	%inh. (10 ⁻⁶ /10 ⁻⁸ M)	Ki 5-HT ₄ (nM)
MR-33011	O	4-I	H	C ₃ H ₇	102/78	10,2
MR-33020	CH ₂	4-I	H	C ₃ H ₇	98/24	97,8
MR-33009	NH	4-I	H	C ₃ H ₇	47/0	nd

Tableau 8: Comparatifs des homologues iodés en série ester, cétone et amide

Dans un deuxième temps, elle sélectionna les molécules les plus prometteuses pour un radiomarquage à l'iode-125. Cette synthèse nécessita la production d'intermédiaires stannylés. Ces précurseurs ont fait l'objet d'un radiomarquage par nos collaborateurs des Hôpitaux Universitaires de Genève (HUG) à l'aide d'une source d'iode radioactive (Na¹²⁵I), d'eau oxygénée et d'un mélange éthanol/acide acétique. Ainsi, quatre radiotraceurs ont été testés *ex vivo* chez le rat et *in vivo* chez la souris : le [¹²⁵I]MR31707, [¹²⁵I]MR33005, [¹²⁵I]26110 et le [¹²⁵I]MR33000. L'imagerie *ex vivo* n'a pas permis d'observer une intensité radioactive importante dans les zones riches en 5-HT₄R. Les autoradiogrammes ont révélé un marquage diffus probablement lié à une lipophilie trop importante de ces radioligands (Figure 45). De plus l'imagerie TEMP (*in vivo*) révéla une accumulation des radiotraceurs dans les orbites oculaires ainsi que dans les glandes de Harder suggérant un défaut de passage de la BHE ou une métabolisation trop rapide du radiotraceur.¹⁸³

¹⁸³ Lam, B. V.; Thèse de doctorat; Université de Caen Normandie, 2015.

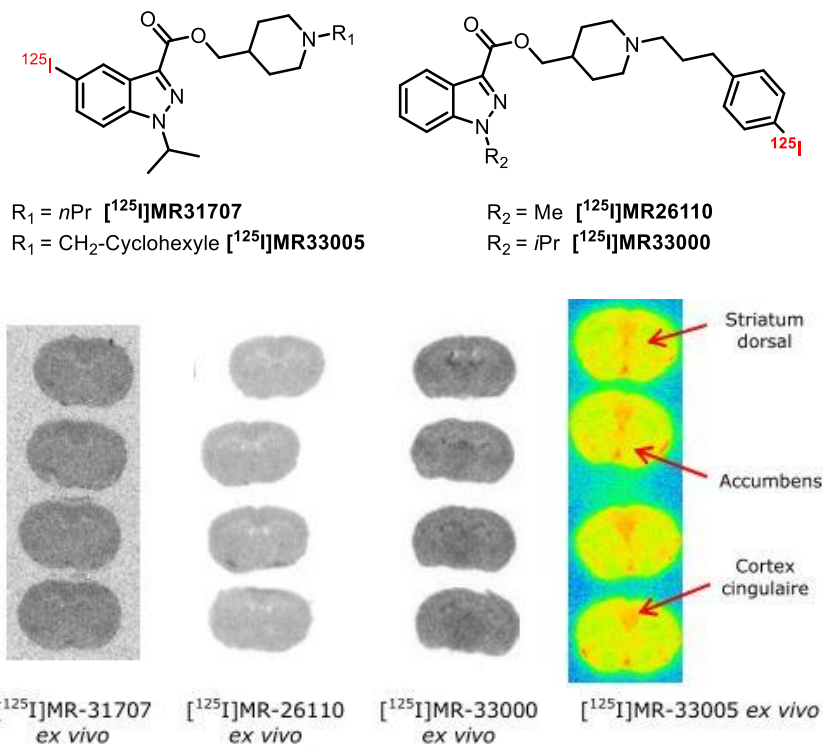


Figure 45 : Structure et évaluation biologique des radiotraceurs en série iodoindazole

Ces résultats n'étaient pas en faveur d'un éventuel développement de nouvelles séries et devaient probablement mettre un terme à ces recherches. Toutefois, au cours de sa thèse, le Dr. Lam synthétisa un composé en série fluoroindazole et observa que la substitution d'un iode par un fluor permettait d'augmenter de façon significative l'affinité. De plus, la présence d'un fluor sur le cycle indazole permettait de limiter l'augmentation de la lipophilie induite par l'iode. C'est dans ce contexte que mon projet de thèse fut déterminé (Figure 46). Il ne s'agissait plus de fabriquer des radiotraceurs utilisables en imagerie TEMP mais bel et bien des composés marqués au fluor-18 en vue d'une utilisation en imagerie TEP.

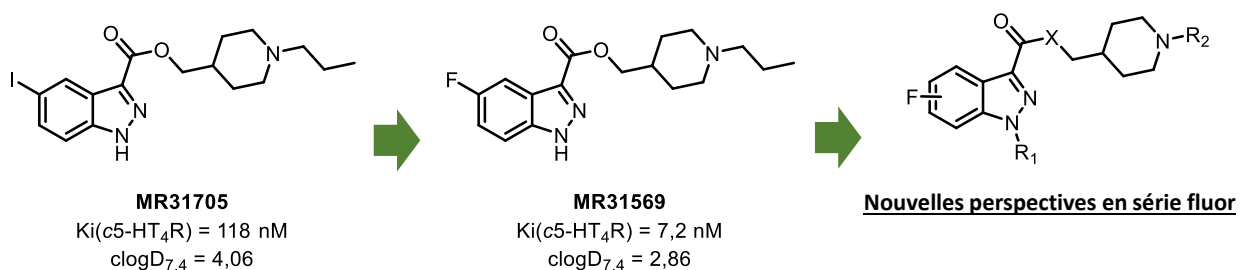


Figure 46: Nouvelles perspectives en série fluoroindazole

II- Objectifs du projet de thèse

Mon projet de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux menés précédemment par les équipes du CERMN. D'une part, nous compléterons la série iodée initiée préalablement par le Dr. Bao Vy Lam en introduisant une nouvelle chaîne latérale portant un groupe hydroxyle. Cette nouvelle chaîne pourrait apporter une réponse au problème de lipophilie rencontré au cours des études chez l'animal. De plus, nous synthétiserons les séries cétone et amide pour répondre au problème d'instabilité métabolique rencontré en série ester.

D'autre part, nous concentrerons notre attention sur la synthèse de nouveaux ligands affins et sélectifs des 5-HT₄R en série fluoroindazole. Nous étudierons l'influence de l'atome de fluor sur l'affinité et déterminerons sa position optimale. L'objectif final de ces travaux sera d'obtenir un nouveau radiotracer affiné et sélectif des 5-HT₄R qui pourra être utilisé soit dans le cadre d'études de caractérisation de ces mêmes récepteurs, soit comme outil diagnostique utilisable pour détecter diverses neuropathologies humaines comme la dépression ou la MA. Trois étapes sont indispensables à l'obtention de ces nouveaux radioligands fluorés (Figure 47).

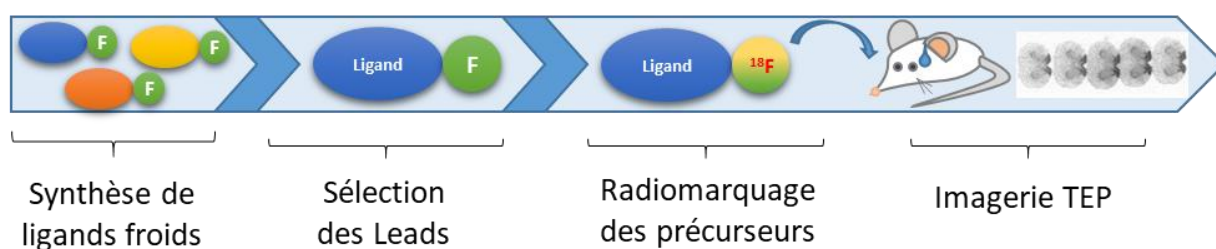


Figure 47: Etapes clés pour l'obtention de nouveaux radioligands

La première étape de ce travail consiste à synthétiser des ligands froids possédant une structure analogue au radioligand envisagé mais en l'absence d'un atome radioactif. L'affinité pour les 5-HT₄R sera ensuite évaluée pour chacun de ces composés à l'aide de tests *in vitro* réalisés au sein de notre laboratoire. Afin d'obtenir un panel de molécules suffisant pour nos études, un grand nombre de pharmacomodulations du noyau indazole et de la chaîne latérale seront envisagées (Figure 48).

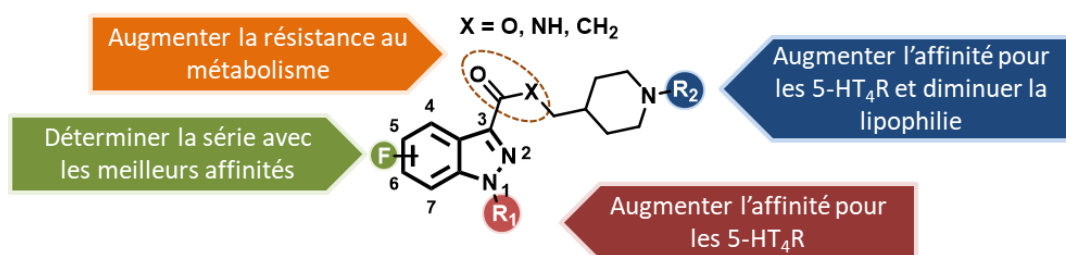


Figure 48: Pharmacomodulations envisagées

Nous déplacerons l'atome de fluor en position 4, 5, et 6 du cycle indazole afin de déterminer la série présentant les meilleures affinités vis-à-vis des 5-HT₄R. Nous ferons varier les *N*-alkylations (R₁) en nous concentrant principalement sur le groupement *i*Pr puisqu'il a prouvé sa supériorité comparativement aux autres motifs étudiés. La résistance au métabolisme est un paramètre important dans le choix d'un radiotracer, c'est pourquoi, nous avons envisagé de produire des linkers cétones et triazoles en plus des esters et amides plus traditionnels. Enfin, nous modulerons l'affinité et la lipophilie en intégrant des chaînes latérales (R₂) portant des groupes hydroxyles et sulfonamides en s'inspirant de ligands décrits dans la littérature.

La deuxième étape de ce travail consistera à sélectionner les meilleures molécules (« leads ») parmi les ligands froids synthétisés. L'expérience acquise sur le sujet nous confirmera l'intérêt majeur des approches multiparamétriques dans ce domaine. C'est pourquoi, l'affinité pour les 5-HT₄R ne sera plus le seul élément déterminant dans le choix de ces leads. Ainsi, nous avons constitué un cahier des charges à respecter :

- Affinité pour les 5-HT₄R < 10 nM
- Sélectivité pour les récepteurs 5-HT₄R
- Lipophilie modérée comprise entre 1 et 3 (1 < clogP < 3)
- Résistante au métabolisme *via* la synthèse de linkers amide, cétone, 1,2,3-triazole.

De plus, nous utiliserons des outils de drug design comme le LLE et le PFI pour confirmer ce choix et favoriser notre réussite dans l'obtention d'un radiotracer efficace.

La dernière étape de notre travail consistera à mettre au point les précurseurs indispensables à l'obtention de ce radiotracer. Cette étape engagera une nouvelle voie de synthèse d'un ligand portant un brome, qui lors de l'étape finale, sera substitué par un ester boronique (Schéma 1). Le radiomarquage du précurseur boronique au fluor-18 sera effectué par nos partenaires du Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA) de Paris Orsay et fera l'objet de tests chez l'animal (*ex vivo* ou/et *in vivo*).

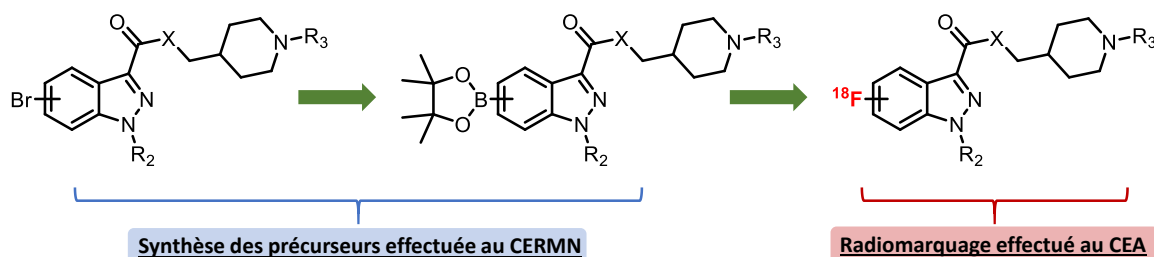


Schéma 1: Etapes primordiales pour l'obtention d'un radiotracer

En parallèle de ce travail, nous compléterons les séries iodoindazoles initiées par le Dr. Lam. Notre objectif principal sera de diminuer la lipophilie *via* l'insertion de chaînes latérales portant des groupes hydroxyles. Nous orienterons notre synthèse vers les séries amide et cétone afin d'optimiser la résistance au métabolisme tout en cherchant à conserver l'affinité pour les 5-HT₄R (Schéma 2).



Schéma 2: Evolution du projet en série iodoindazole

Enfin, nous développerons une nouvelle méthode de thiofonctionnalisation applicable au noyau indazole. Celle-ci sera étendue à de nombreux hétérocycles azotés et met en jeu l'utilisation du TMPMgCl.LiCl , de soufre (S_8) et d'un groupement directeur : le THP. Notre objectif final sera de développer une nouvelle série de composés portant un linker de type sulfoxyde.

Chapitre 3: Travaux personnels

I- Synthèse de radioligands fluorés pour l'imagerie TEP

1. Analyse rétrosynthétique

Mon projet de thèse s'oriente principalement sur la synthèse de nouveaux radioligands affins et sélectifs vis-à-vis des 5-HT₄R. Une étude rétrosynthétique a été réalisée dans le but de déterminer les synthons indispensables à la synthèse de nos produits. Ce travail est le point de départ de l'ensemble de nos réactions et a permis de mettre en évidence l'intérêt de synthétiser d'une part le cycle indazole possédant un acide carboxylique en position 3 et la synthèse des chaînes latérales variées possédant une fonction amine ou alcool d'autre part. Un protocole synthétique commun pour accéder aux composés en série ester et amide a été mis au point (Schéma 3).

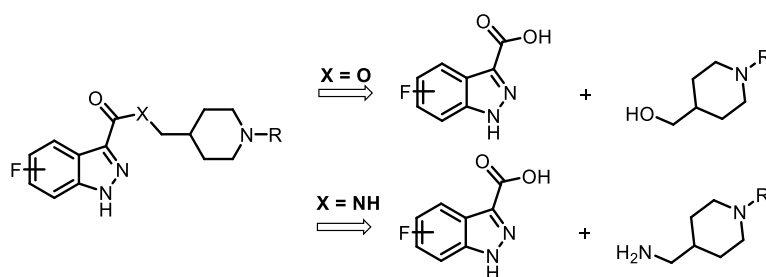


Schéma 3: Analyse rétrosynthétique en série amide et ester

Les composés en série cétone nécessitent une autre voie de synthèse car ils ne sont pas directement accessibles à partir de l'acide 1H-indazole-3-carboxylique. Deux méthodes seront privilégiées en vue de l'obtention de cette 3^{ème} série (Schéma 4).

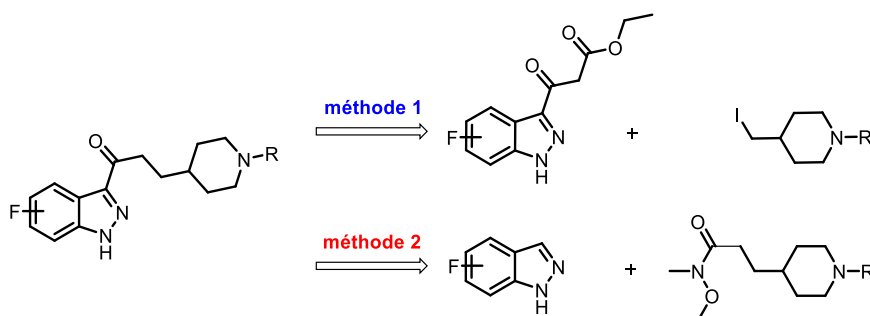


Schéma 4: Analyse rétrosynthétique en série cétone

La méthode 1 fait intervenir un intermédiaire β -cétioester en présence d'une chaîne iodée alors que la méthode 2 s'oriente sur une fonctionnalisation régiosélective en position 3 du cycle indazole en présence d'une base forte : le TMPMgCl.LiCl nommée aussi base de Knochel-Hauser.¹⁸⁴

¹⁸⁴ Krasovskiy, A.; Krasovskaya, V.; Knochel, P.; et al. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2006**, *45* (18), 2958–2961.

Enfin, notre appétence pour la recherche de radioligands très résistant au métabolisme nous orienta vers la synthèse de composés en série tricyclique. Ces composés additionnels font intervenir un intermédiaire alcyne en position 3 du cycle indazole ainsi qu'une chaîne azoture (Schéma 5).

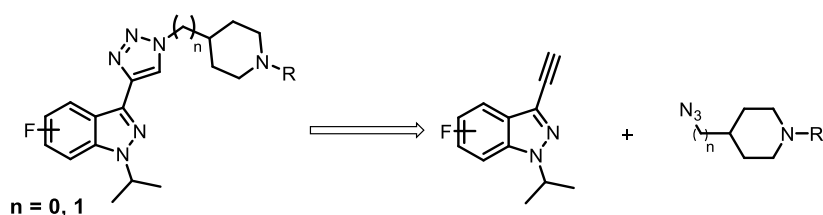


Schéma 5: Analyse rétrosynthétique en série triazole

2. Synthèse des acides 4,5 et 6-fluoro-1-*H*-indazole-3-carboxyliques

La première étape de notre travail de synthèse consista à préparer les matières premières indispensables à l'obtention de nos ligands froids. Plusieurs voies ont été envisagées mettant en perspective différentes techniques décrites dans la littérature.

2.1 Contexte bibliographique

En 1883, Schad fut le premier à décrire la synthèse de l'acide 1*H*-indazole-3-carboxylique **3** à partir de l'isatine **1**. Cette méthode se décompose en 3 étapes. La première permet d'ouvrir le cycle en présence de soude (NaOH). L'étape suivante consiste à former un intermédiaire diazonium **2** en présence de nitrite de sodium (NaNO₂) qui sera, dans une étape finale, réduit et cyclisé à l'aide de sulfite de sodium (Na₂SO₃) (Schéma 6). La publication ne décrit pas le rendement obtenu pour cette voie de synthèse.¹⁸⁵

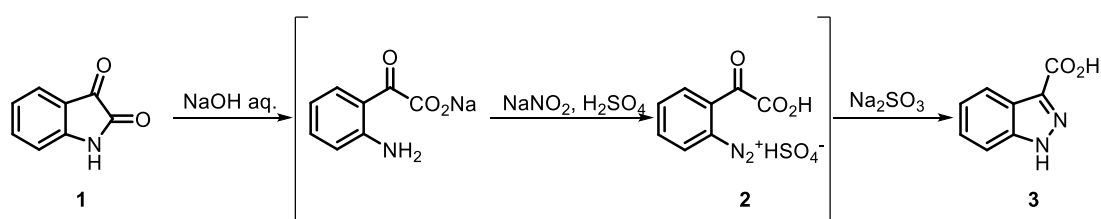


Schéma 6: Synthèse de l'acide 1*H*-indazole-3-carboxylique par Schad et al.

En 1952, Snyder *et al.* développèrent une variante de cette méthode en réduisant l'ion diazonium en hydrazine à l'aide de chlorure d'étain (II) (SnCl₂). Celle-ci fut appliquée par Buu-hoi *et al.* sur des indazoles substitués offrant de nouvelles perspectives notamment en série 5-fluoroindazole.¹⁸⁶

¹⁸⁵ Schad, P. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1893**, 26 (1), 216–224.

¹⁸⁶ Buu-Hoi, N.; Hoeffinger, J. P.; Jacquignon, P. J. *Heterocycl. Chem.* **1964**, 1 (5), 239–241.

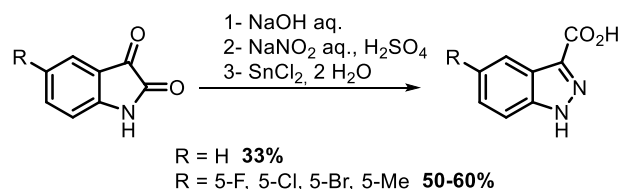


Schéma 7: Obtention d'acides 1H-indazole-3-carboxyliques substitués en position 5

En 1989, Ferrari *et al.* proposèrent une nouvelle voie d'obtention de **3** utilisant l'isatine non plus comme matière première mais comme intermédiaire réactionnel.¹⁸⁷ Le schéma réactionnel se divise en 3 étapes utilisant comme précurseur la β -acétylphénylhydrazine **4** et suivant le protocole de cyclisation décrit en 1919 par Sandmeyer (Schéma 8).¹⁸⁸

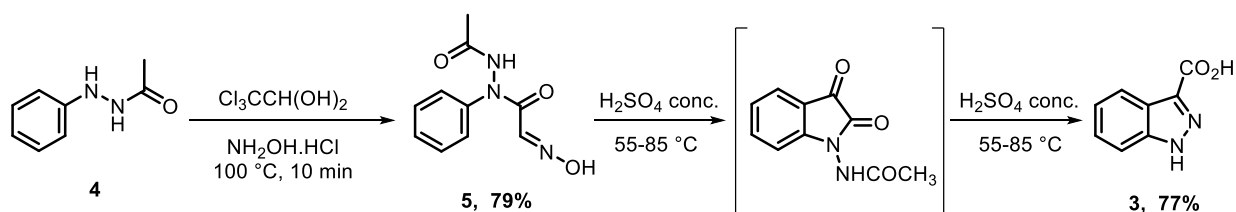


Schéma 8: Synthèse de l'acide 1H-indazole-3-carboxylique par Ferrari *et al.*

Cette méthode a permis d'augmenter significativement le rendement d'obtention de **3** passant de 33% à 61% en deux étapes.

En 2011, Kuang *et al.* décrivent une nouvelle méthode d'obtention de **3** (Schéma 9).¹⁸⁹ Celle-ci est réalisée en 4 étapes et utilise la phénylhydrazine **6** comme matière première. Elle consiste à former le dérivé phénylhydrazone **7** en présence de benzaldéhyde puis de fonctionnaliser l'azote à l'aide de chlorure d'oxalyle (COCl)₂. L'intermédiaire chloré **8** obtenu est activé en présence d'un acide de Lewis, plus précisément du chlorure d'aluminium (III) (AlCl₃) et permet de favoriser la cyclisation en *N*-(2,3-diméthylidène-2,3-dihydro-1H-indol-1-yl)-1-phénylméthanimine **9** *via* la méthode d'acylation décrite par Friedel-Crafts. Enfin, la dernière étape permet d'obtenir l'acide 1H-indazole-3-carboxylique **3** en présence d'un mélange d'acide chlorhydrique (HCl) et d'acide acétique (AcOH).

¹⁸⁷ Ferrari, M.; Ripa, A.; Ripa, G.; Sisti, M. *J. Heterocycl. Chem.* **1989**, 26 (2), 531–532.

¹⁸⁸ Sandmeyer, T. *Helv. Chim. Acta* **1919**, 2 (1), 234–242.

¹⁸⁹ Kuang, S.-M.; Zhang, P., **2011**. US 20110172428A1.

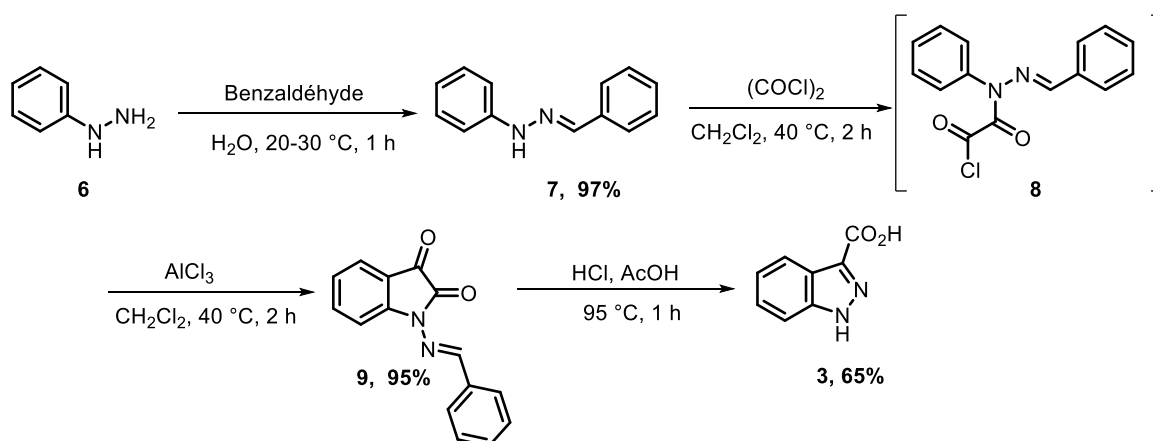


Schéma 9: Synthèse de l'acide 1H-indazole-3-carboxylique par Kuang *et al.*

L'isatine est un motif chimique d'intérêt dans le développement de composés en série indazole. Toutefois, l'inaccessibilité à certaines isatines substituées ou les défauts d'ouverture de ces cycles a motivé certaines équipes à mettre au point de nouvelles voies de synthèse complémentaires.

En 1908, Jacobson *et al.* publièrent un article présentant une nouvelle voie d'obtention de l'indazole mettant en jeu l'utilisation d'*ortho*-toluidines comme matière première.¹⁹⁰ Cette méthode fait intervenir un intermédiaire acétylé obtenu en présence d'anhydride acétique (Ac₂O) puis un intermédiaire nitrosylé qui est cyclisé en milieu acide dans une étape finale avec des rendements modérés (Schéma 10).

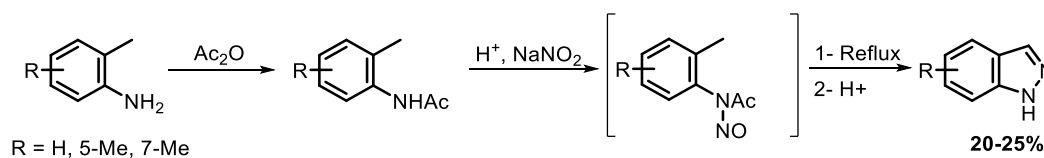


Schéma 10: Obtention d'indazoles substitués par Jacobson *et al.*

Cette technique fut adaptée et appliquée à de nombreuses reprises pour former des indazoles portant des groupements variés. Les optimisations de cette méthode ont notamment permis d'obtenir les acides et ester indazoliques sans étape supplémentaire (Schéma 11).^{191,192,193,194}

¹⁹⁰ Jacobson, P.; Huber, L.; *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1908**, 41 (1), 660–671.

¹⁹¹ Borchardt, A. J.; Kania, R. S.; Palmer, C. L., **2004**. US 20040192735A1.

¹⁹² Schumacher, R.; Danca, M. D.; Ma, J.; Herbert, B.; *et al.* **2007**. WO 2007/038367A1.

¹⁹³ Ryono, D. E.; Cheng, P. T. W.; Bolton, S. A.; Chen, S.; *et al.* **2012**. US 20120142636A1.

¹⁹⁴ Georg, I. G.; Tash, J. S.; Chakrasali, R.; Jakkraj, S. R.; *et al.* **2013**. US 008377958B2

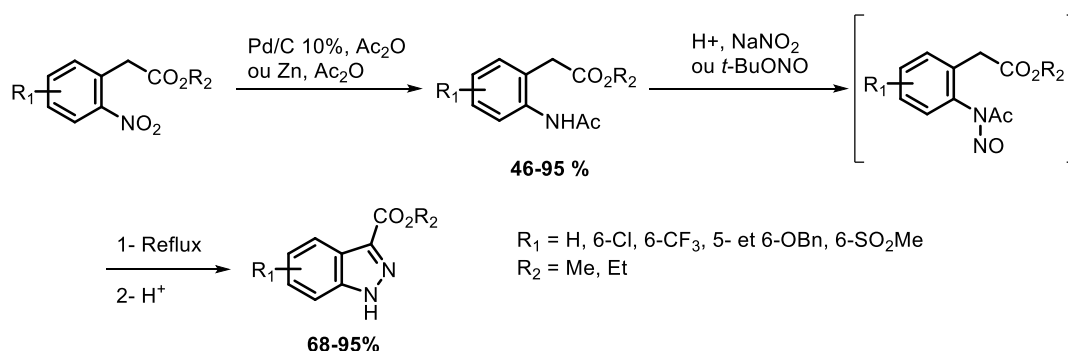


Schéma 11: Obtention des esters de l'acide 1H-indazole-3-carboxylique à partir de dérivés 2-nitrophénylacétique

En 2007, Jin et al. développèrent une nouvelle stratégie d'obtention des acides 1H-indazole-3-carboxyliques.¹⁹⁵ Cette technique fait intervenir des dérivés (triméthylsilyl)phényl triflate comme matière première et permet d'obtenir des dérivés indazoliques en présence de diazoacétate d'éthyle, de fluorure de potassium (KF) et d'éther 18-couronne-6 ([18]-crown-6) (Schéma 12). Son principe repose sur une cycloaddition [3+2] et met en jeu la formation d'un intermédiaire benzyne.

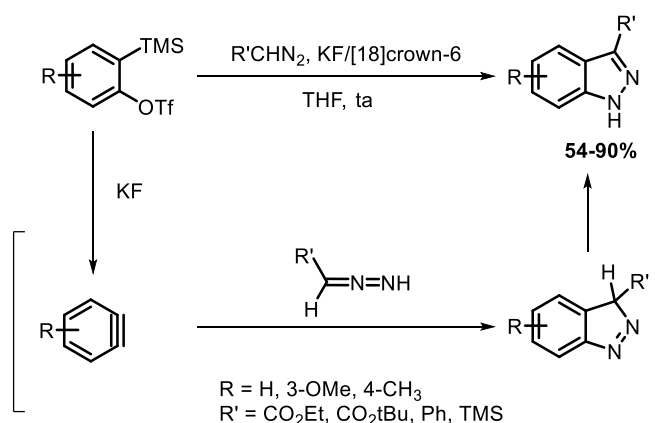


Schéma 12: Synthèse de dérivés indazoliques via une cycloaddition [3+2] par Jin et al.

Les problèmes de sélectivité liés à la forte réactivité de l'intermédiaire benzyne poussa l'équipe de Liu à déterminer de nouvelles conditions opératoires notamment en changeant la source de fluor et en diminuant drastiquement la température. Ainsi, l'utilisation du fluorure de tétra-*n*-butylammonium (TBAF) à -78°C permet d'obtenir sélectivement les dérivés 1H-indazole-3-carboxylate de méthyle et d'éthyle (Schéma 13).¹⁹⁶

¹⁹⁵ Jin, T.; Yamamoto, Y. *Angew. Chemie* **2007**, *119* (18), 3387–3389.

¹⁹⁶ Liu, Z.; Shi, F.; Martinez, P. D. G.; Raminelli, C.; Larock, R. C. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (1), 219–226.

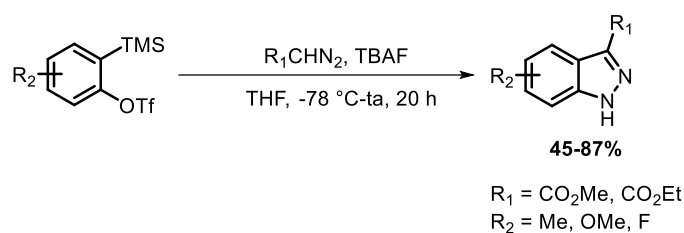


Schéma 13: Obtention de dérivés indazoliques par Liu et al.

2.2 Synthèse de l'acide 5-fluoro-1H-indazole-3-carboxylique à partir de la 5-fluoroisatine

En série 5-fluoroindazole, notre équipe s'orienta vers une synthèse faisant intervenir comme matière première la 5-fluoroisatine **10** commerciale. En effet, son coût très modéré, sa disponibilité et la possibilité d'obtenir directement des indazoles possédant un acide carboxylique en position 3 du cycle, nous orienta sur ce choix. Cette voie de synthèse avait été décrite précédemment par Buu-Hoi *et al.* et fit l'objet de certaines optimisations. La première étape a consisté à ouvrir l'isatine en présence de d'hydroxyde de sodium (NaOH) suivi d'une diazotation en présence de NaNO₂. L'intermédiaire diazonium **11** ainsi formé permet d'obtenir l'acide 5-fluoro 1H-indazole-3-carboxylique **12** après une étape finale de cyclisation à l'aide de SnCl₂ avec un rendement global de 97 % sur trois étapes (Schéma 14). Une estérification additionnelle a été réalisée avec pour objectif de protéger l'acide carboxylique pour l'étape suivante (Chapitre 3: I- 3.1). Ainsi, le composé **13** a été synthétisé en présence d'éthanol et d'une quantité catalytique d'acide sulfurique (H₂SO₄). Le rendement modéré de l'estérification (72 %) s'explique par la présence de nombreux sels issus des trois réactions qui ont permis l'obtention du composé **12**.

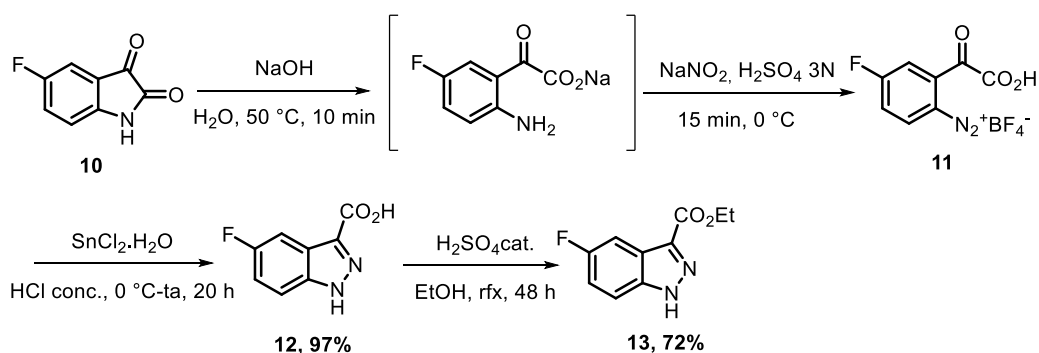


Schéma 14: Synthèse du 5-fluoro-1H-indazole-3-carboxylate d'éthyle 13

Les composés en série 4- et 6-fluoroindazole n'ont pas pu être préparés *via* cette méthode en raison d'un coût trop important des isatines correspondantes. C'est pourquoi, nous avons envisagé d'autres méthodes d'obtention présentées ci-dessous.

2.3 Obtention des acides 4- et 6-fluoro-1H-indazole-3-carboxyliques

Une voie de synthèse commune a été développée en série 4- et 6-fluoroindazole s'appuyant sur l'expérience acquise lors des synthèses précédentes en série iodée. Les travaux du Dr. Bao Vy Lam se sont orientés sur l'obtention des précurseurs indazoliens en deux étapes avec une première phase de formation des indazoles *N*2-THP suivie par une fonctionnalisation régiosélective de la position 3.

2.3.1 Méthode développée en série iodée

Lors de ses travaux de thèse, le Dr. Lam synthétisa de nombreux ligands iodés affins vis-à-vis des 5-HT₄R. Cette synthèse s'accompagna de la mise au point d'une nouvelle méthode efficace de fonctionnalisation régiosélective de la position C3 du cycle indazole permettant d'accéder en deux étapes aux précurseurs esters. Cette méthode sollicite la présence d'un groupement directeur tétrahydropyrane (THP) présent sur l'azote en position 2 du cycle indazole ainsi qu'une base forte synthétisée au sein même de notre laboratoire : le TMPMgCl.LiCl nommée aussi base de Knöchel-Hauser (Schéma 15).¹⁹⁷

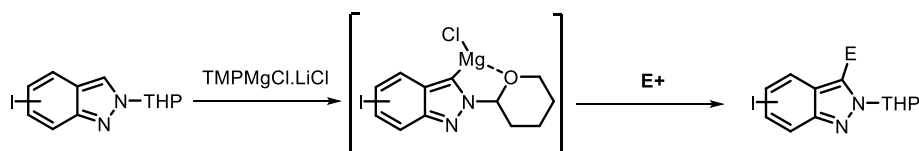


Schéma 15: Fonctionnalisation du cycle iodoindazole

La première étape de ce travail consista à synthétiser les iodoindazoles fonctionnalisés en position *N*2 par le THP. Ce dernier a été sélectionné en raison du faible coût de son précurseur le 3,4-dihydro-2H-pyrane (DHP), de sa capacité à stabiliser les réactions de métallations grâce à l'oxygène présent en position 2 du cycle pyrane, en raison d'une protection sélective en *N*1 et *N*2 selon les conditions opératoires choisies et car ce groupement peut être déprotégé simplement en milieu acide.¹⁹⁸ Cette propriété avait été préalablement déterminée en série 5-bromoindazole par Slade *et al.* en 2009.¹⁹⁹ En effet, en présence d'acide paratoluènesulfonique (APTS) et de DHP, on observe la formation sélective d'indazoles *N*1-THP **17** (98%) alors que l'utilisation de pyridinium *p*-toluènesulfonate (PPTS) pendant 5 heures favorise la formation du *N*2-THP **18** (92%). Cette publication évoque l'intérêt de surveiller le temps de réaction puisqu'au bout de 18 heures, on observe un ratio *N*1/*N*2 de 3 pour 1 suggérant que les composés *N*2 sont cinétiquement favorisés alors que les isomères *N*1 correspondent aux produits thermodynamiques (Schéma 16).

¹⁹⁷ Lam, B. V.; Berhault, Y.; Stiebing, S.; Fossey, C.; *et al.* *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22* (13), 4440–4446.

¹⁹⁸ Gérard, A. L.; Bouillon, A.; Mahatsekake, C.; Collot, V.; Rault, S. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (27), 4665–4669.

¹⁹⁹ Slade, D. J.; Pelz, N. F.; Bodnar, W.; Lampe, J. W.; Watson, P. S. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (16), 6331–6334.

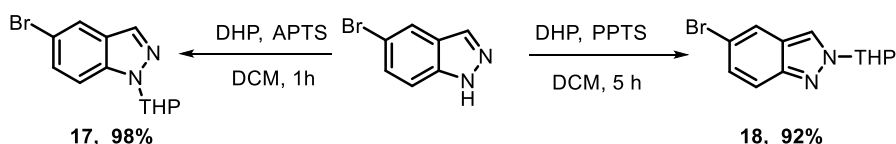
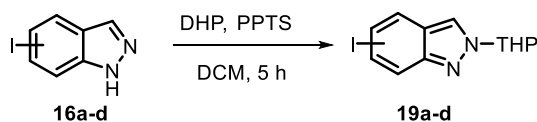


Schéma 16: Protection régiosélective du 5-bromoindazole par Slade et al.

Cette méthode fut appliquée en série iodoindazole permettant d'obtenir les composés N2-THP en séries 4,5,6 et 7 iodoindazoles avec des rendements compris entre 74 et 93% (Tableau 9).



Entrée	Indazole	Position I	Rendement (%)
1	19a	5	85
2	19b	6	74
3	19c	7	93
4	19d	4	90

Tableau 9: Synthèse des iodoindazoles protégés en position N2

La deuxième étape consista à fonctionnaliser régiosélectivement la position 3 du cycle indazole *via* la technique de métallation utilisant le $\text{TMPMgCl}\cdot\text{LiCl}$. La base de Knöchel est synthétisée en condition anhydre (flux d'azote) en faisant réagir du chlorure d'isopropylmagnésium/chlorure de lithium ($i\text{PrMgCl}\cdot\text{LiCl}$) nommé aussi Turbo Grignard sur du 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine (TMPH) dans le tétrahydrofurane (THF) à 25°C pendant 48 h (Schéma 17).²⁰⁰

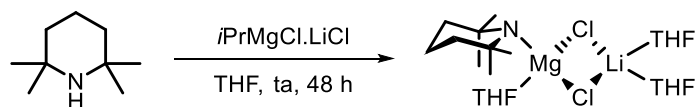


Schéma 17: Préparation du $\text{TMPMgCl}\cdot\text{LiCl}$

Par la suite, les précurseurs iodés ont été dissous dans du THF anhydre et le $\text{TMPMgCl}\cdot\text{LiCl}$ a été ajouté lentement sous atmosphère inerte à -10°C. Le contrôle de la métallation a été effectué en prélevant une petite quantité du milieu réactionnel, en y ajoutant un excès de diiode (I_2) et en analysant le spectre RMN ^1H . En présence d'une fonctionnalisation par un iode, on observe un déplacement de signaux aromatiques et la disparition du proton (singulet) situé en position 3 du cycle indazole. L'utilisation de chloroformiate d'éthyle (ClCO_2Et) comme électrophile puis la déprotection *in situ* du

²⁰⁰ Haag, B.; Mosrin, M.; Ila, H.; Malakhov, V.; Knochel, P. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2011**, *50* (42), 9794–9824.

THP en présence d'HCl 3N permet d'accéder directement aux dérivés esters **20b-d** avec d'excellents rendements (Schéma 18).

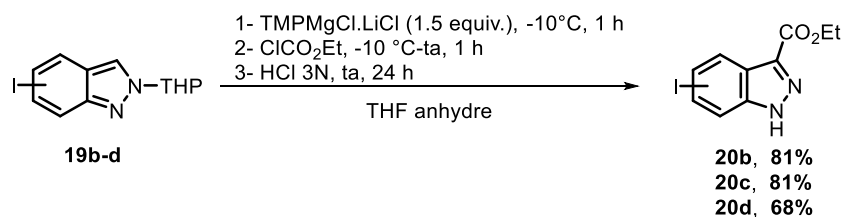


Schéma 18: Synthèse des esters indazoliques via l'utilisation de TMPMgCl.LiCl

Cette méthode a permis de compléter considérablement la chimiothèque des iodoindazoles puisqu'en fonction du choix de l'électrophile, il était désormais possible de varier les fonctions chimiques présentes en position 3 du cycle (Schéma 19).¹⁹⁷

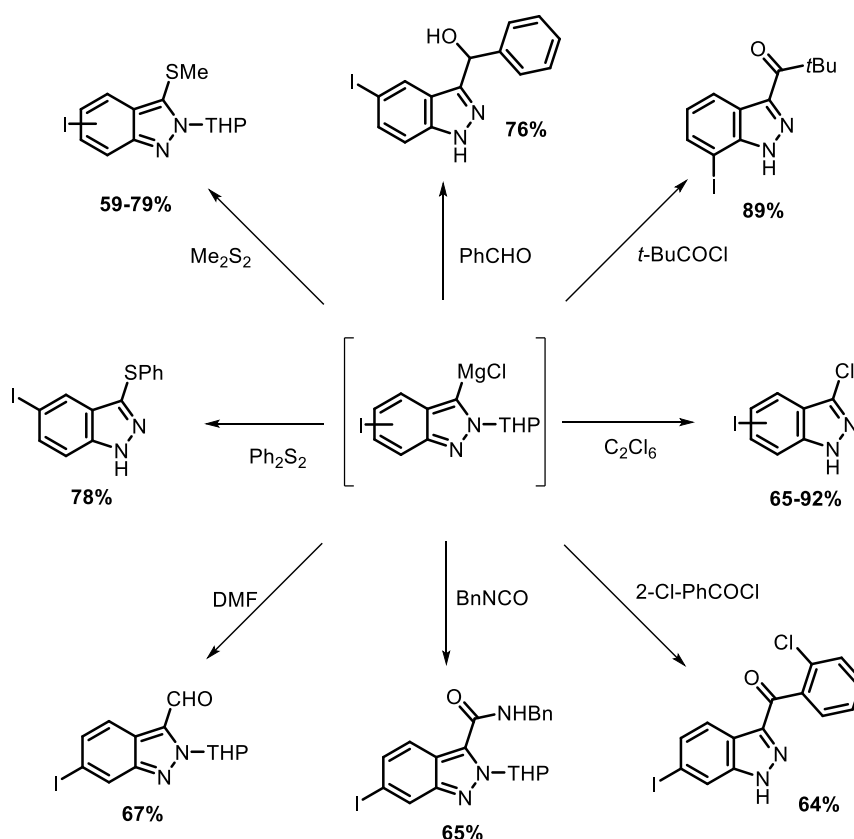


Schéma 19: Accès à des iodoindazoles diversement substitués en position 3

Cette voie de synthèse a été appliquée à nos composés en série 4- et 6-fluoroindazole.

2.3.2 Application à la synthèse des esters en série 4- et 6-fluoro-1H-indazole

Les précurseurs en série 4- et 6-fluoroindazoles ont été synthétisés à partir des fluoro-méthylanilines correspondantes. Les intermédiaires diazonium ont été obtenus en présence d'acide tétrafluoroborique (HBF₄) et de NaNO₂ et ont été réengagés directement sans purification

intermédiaire. Les 4- et 6- fluoroindazoles **22a-b** sont issus d'une cyclisation additionnelle utilisant le 18-crown-6 et l'AcOK avec des rendements modérés (44 et 56%). Ces précurseurs ont permis d'obtenir les composés *N*2 protégés **23a-b** *via* le protocole décrit précédemment. Enfin, les esters 4- et 6-fluoro-1*H*-indazole-3-carboxylates **24a-b** ont été obtenus en présence de TMPMgCl.LiCl, du ClCO₂Et et d'une étape finale de déprotection du groupement THP en milieu acide (Schéma 20).

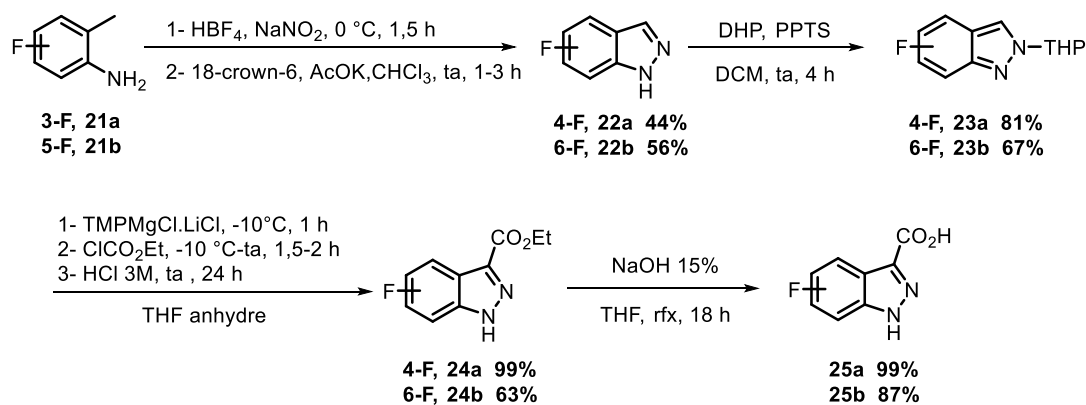
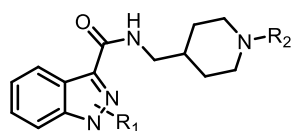


Schéma 20: Voie d'obtention des esters 4- et 6-fluoro-1*H*-indazole-3-carboxylates

L'ester éthylique présente un réel intérêt puisqu'il permet de protéger la fonction acide carboxylique pour la *N*-alkylation à venir. C'est pourquoi, nous avons décidé de déplacer la saponification à une étape ultérieure de la voie de synthèse en série 5-fluoroindazole. En fin de thèse, nous avons proposé une alternative dans le développement des composés en série 6-fluoroindazole, c'est pourquoi, la saponification a été effectuée directement après la fonctionnalisation sélective de la position 3. De plus, certains composés en série 4-fluoroindazole ne feront pas l'objet de *N*-alkylation d'où l'intérêt de disposer à la fois du précurseur **24a** mais aussi de son homologue acide carboxylique **25a**.

3. Fonctionnalisation des positions *N*₁ et *N*₂ du cycle indazole

Précédemment, nous avons évoqué l'intérêt de *N*-alkyler le cycle indazole afin de diversifier au maximum la bibliothèque de ligands affins des 5-HT₄R. Les nombreuses publications sur le sujet ont mis en avant l'intérêt du substituant *i*Pr comparativement aux autres substituants. En série indazole, Furlotti *et al.* comparèrent l'affinité pour les 5-HT₄R d'un composé *N*1-alkylé et son homologue *N*2-alkylé et observèrent une nette diminution de l'affinité de ces derniers. De plus, il démontra la supériorité du groupement *i*Pr comparativement au groupement méthyl (Tableau 10).¹⁷²



Entrée	R ₁	R ₂	%inh 5-HT ₄ R (10 ⁻⁸ /10 ⁻⁹ M)
1	1-Me	C ₄ H ₉	37/12 ^a
2	2-Me	C ₄ H ₉	0/0
3	H	EtPh	56/15
4	1-Me	EtPh	84/29
5	1- <i>i</i> Pr	EtPh	108/88

^a %inh (10⁻⁷M) = 88%.

Tableau 10: Comparaison des *N*-alkylations par Furlotti et al

L'équipe du Pr. Valérie Collot avait préalablement observé cette augmentation d'affinité (Tableau 6) sur des composés indazoliques, c'est pourquoi, les séries iodoindazoles se sont concentrés sur la synthèse de composés *N1-iPr*. Dans le cadre de cette thèse, nous avons décidé de vérifier cette hypothèse en présence de fluor. Ainsi, notre effort se porta essentiellement sur la formation de composés *N1-iPr* mais aussi sur la synthèse de quelques composés *N2-iPr*. Pour atteindre notre objectif, nous avons envisagé différentes stratégies de synthèse en tentant d'orienter nos méthodes vers des *N*-alkylations sélectives.

3.1 Obtention des composés *N*-alkylés via des Substitutions Nucléophiles (S_N)

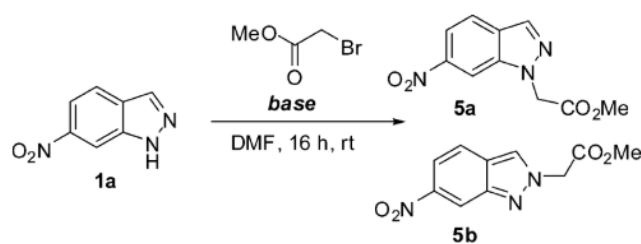
Dans un premier temps, nous nous sommes orientés dans le développement de méthodes favorisant les processus de Substitutions Nucléophiles (S_N). Ces recherches s'appuient sur plusieurs articles notamment celui de Hunt *et al.* de 2009 qui fit la description de *N*-alkylations *N1*-sélective via l'utilisation de bases faibles (Figure 49).^{201,202,203,204}

²⁰¹ Hunt, K. W.; Moreno, D. A.; Suiter, N.; Clark, C. T. *Org. Lett.* **2009**, *11* (21), 5054–5057.

²⁰² Marquess, D.; Choi, S.-K.; Fatheree, P. R.; Gendron, R.; Goldblum, A. A.; Long, D. D., **2005**. WO 2005/080389A1.

²⁰³ Yang, X.; Li, F.; Konze, K. D.; Meslamani, J.; Ma, A.; *et al.* *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (16), 7617–7633.

²⁰⁴ Angapelly, S.; Sri Ramya, P. V.; Angeli, A.; Supuran, C. T.; *et al.* *ChemMedChem* **2017**, *12* (19), 1578–1584.

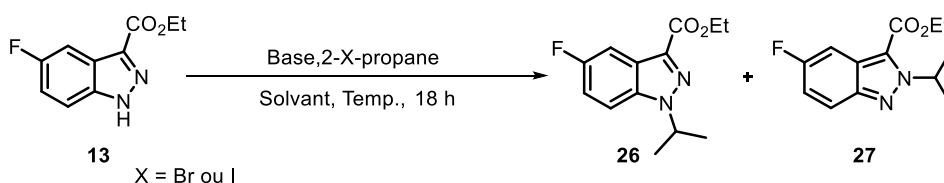


entry	base	conversion (%)	a:b ratio	yield of 5a (%)
1	Cs ₂ CO ₃	100	131:1	87
2	K ₂ CO ₃	100	92:1	80
3	DIEA	100	2.2:1	ND
4	DBU	81	9:1	ND
5	proton sponge	68	19:1	44
6	NaH	99	1.9:1	ND
7	CsOH	77	63:1	61

^a Reaction conditions: 0.3 M, 2 equiv R-Br, 3 equiv base.

Figure 49: Travaux de N1-alkylation sélective par Hunt et al.

Parmi ces bases, le carbonate de césium (Cs₂CO₃) et le carbonate de potassium (K₂CO₃) présentaient les meilleurs résultats et la meilleure sélectivité. C'est pourquoi, nous avons appliqué et adapté ces conditions malgré des différences notables comme l'absence de substituant en position 3 du cycle indazole. Nous avons fait varier les bases, les solvants et la température (Temp.) (Tableau 11).



	Base	Solvant	Temp.	Rdt (%) 26	Rdt (%) 27
1	tBuOK (2 eq.)	THF anh.	reflux	traces	58
2	Cs ₂ CO ₃ (1,5 eq.)	DMF	reflux	28	45
3	K ₂ CO ₃ (1,5 eq.)	DMF	reflux	40	60
4	K ₂ CO ₃ (1,5 eq.)	Acétone	reflux	45	42

Tableau 11: N-alkylations appliquées au cycle 5-fluoro-1H-indazole

Ces essais, appliqués au 5-fluoro-1H-indazole **13**, ne nous ont pas permis d'identifier de méthode d'alkylation N1 sélective. Ceci est probablement lié à la présence du groupement acide carboxylique (électroattracteur) et par la nature de l'électrophile proposé. Ainsi, nous avons décidé d'explorer une autre voie d'obtention de ces composés en utilisant la réaction de Mitsunobu.²⁰⁵

²⁰⁵ Mitsunobu, O.; Wada, M.; Sano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94* (2), 679–680.

3.2 Obtention des composés N-alkylés via la réaction de Mitsunobu

La réaction de Mitsunobu est un processus chimique qui permet de transformer une fonction hydroxyle en un bon groupe partant à l'aide de triphénylphosphine (PPh₃) et d'azodicarboxylate de diéthyle (DEAD). Ces deux réactifs combinés forment un intermédiaire phosphonium qui provoque une déprotonation de la fonction alcool (propan-2-ol dans ce cas précis) entraînant ainsi la formation d'un alcoolate. Cet alcoolate est très réactif et forme à son tour un oxyde de phosphine qui constitue un très bon groupe partant. Ainsi, l'azote présent sur l'indazole va se comporter comme un nucléophile et pourra substituer l'oxyde de phosphine *via* un mécanisme de S_N2 (Schéma 21).

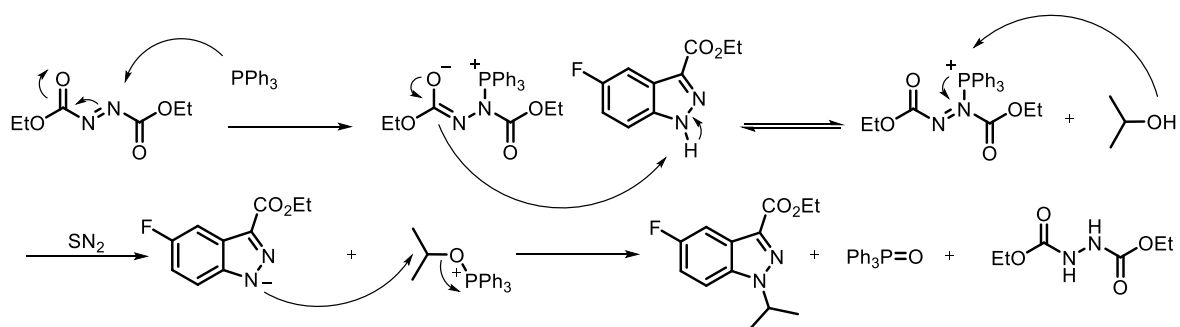


Schéma 21: Mécanisme proposé pour la réaction de Mitsunobu

Notre choix se tourna vers cette technique en raison de l'excellent rendement (96%) obtenu par Procopiou *et al.* pour l'étape de N1-alkylation du cycle indazole (Schéma 22).²⁰⁶

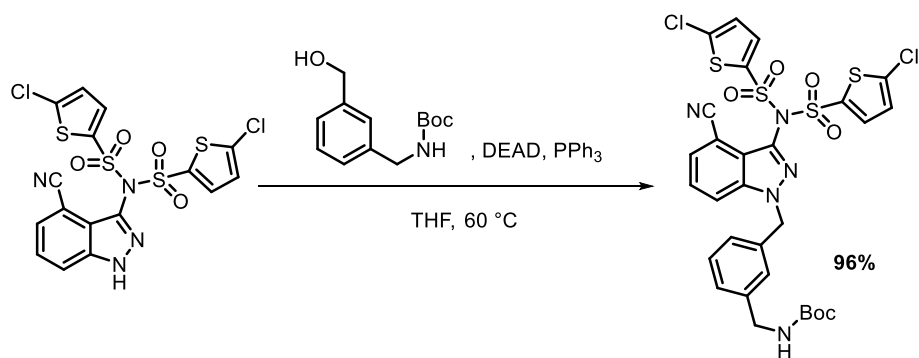
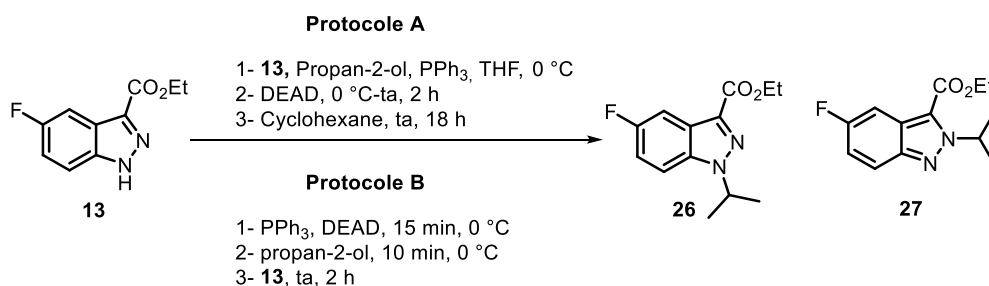


Schéma 22: Sélective N1-alkylation par Procopiou *et al.*

Nous avons appliqué deux protocoles différents variant par l'ordre d'addition des réactifs au sein du milieu réactionnel. Le protocole A débute par l'addition concomitante du 5-fluoro-1H-indazole-3-carboxylate d'éthyle, du propan-2-ol et de la PPh₃ dans le THF. Le DEAD est ajouté après refroidissement du milieu réactionnel à 0 °C et incubé 2 h à température ambiante. Le solvant est évaporé et le résidu est repris dans le cyclohexane pendant 18 h. Le Protocole B se distingue par une addition préalable de la PPh₃, du DEAD suivi du propan-2-ol à 0 °C. Enfin, le 5-fluoro-1H-indazole-3-

²⁰⁶ Procopiou, P. A.; Barrett, J. W.; Barton, N. P.; Begg, M.; *et al.* *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (5), 1946–1960.

carboxylate d'éthyle **13** est ajouté et agité pendant deux heures à température ambiante. Les résultats obtenus avec ces deux méthodes n'ont pas permis d'observer la formation majoritaire de composés *N1*-alkylés. Toutefois, le Protocole A présente un véritable intérêt puisqu'il donne de nouvelles perspectives pour une éventuelle voie de synthèse sélective de composés *N2*-alkylés avec un ratio **26** : **27** de 1 : 10 (Tableau 12).



Entrée	Protocole	Rdt 26 (%)	Rdt 27 (%)	Rdt total (%)	Ratio 26 : 27
1	A	7 ^a	73 ^a	80	1 : 10
2	B	15 ^a	71 ^a	86	1 : 5

^aRendements déterminés par RMN ¹H en présence d'un étalon interne (MeCN)

Tableau 12: Obtention des indazoles *N*-alkylés via une réaction de Mitsunobu

Au vu de l'ensemble de ces résultats, nous avons décidé de sélectionner la méthode utilisant le K₂CO₃ (1,5 equiv.) dans l'acétone afin de former un maximum de composés *N1*-alkylés. Cette méthode fut utilisée en série 4- et 5-fluoroindazole et permit d'obtenir nos composés avec des rendements satisfaisants. Une saponification des esters **26-28** en présence de NaOH 15% a été réalisée offrant les acides carboxyliques correspondants **29** et **31** (Schéma 23). En série 6-fluoroindazole, une voie de synthèse alternative a été envisagée qui sera présentée dans la suite de ce manuscrit.

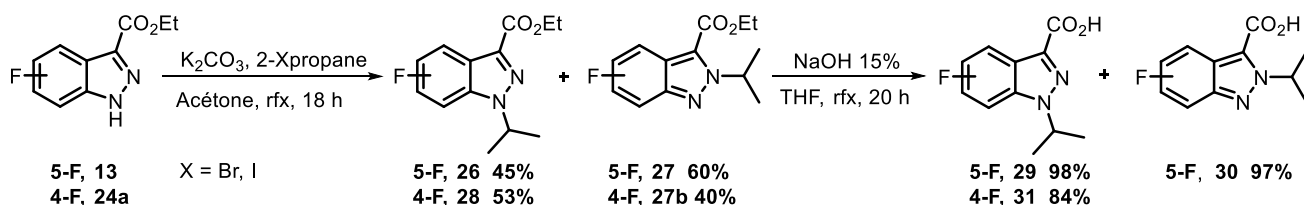


Schéma 23: *N*-alkylation et saponification des précurseurs indazoliques

4. Formation des premiers ligands des 5-HT₄R et développement d'une voie de synthèse convergente

L'étape suivante consista à former la liaison permettant de connecter nos précurseurs indazoliques **29** et **31** avec les chaînes pipéridines sélectionnées. Préalablement, nous nous sommes orientés sur diverses méthodes permettant d'obtenir en une seule étape nos produits finaux (chaîne latérale *N*-

propylée). Puis, nous avons décidé de développer une méthode convergente permettant d'accéder à un grand nombre de ligands des 5-HT₄R à partir de précurseurs communs (Schéma 24).

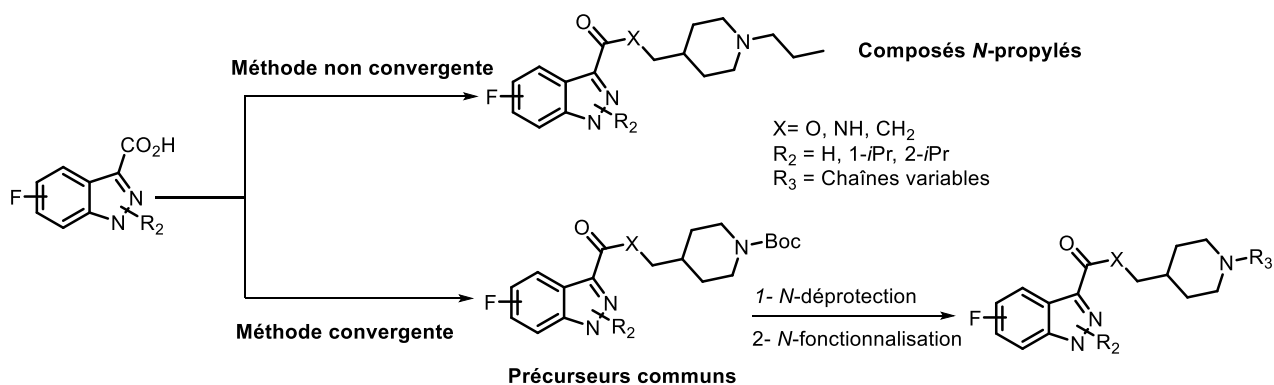


Schéma 24: Stratégies envisagées pour synthétiser les ligands des 5-HT₄R

4.1 Synthèse des ligands 5-HT₄R via des méthodes non convergentes

En début de thèse, nous n'avions pas développé de méthodes convergentes pour accéder à nos ligands affins pour les 5-HT₄R. Notre synthèse débuta par la formation de composés portant une chaîne latérale *N*-propylée *via* différentes méthodes qui avaient été préalablement décrites dans les travaux du Dr. Lam.

En série 4- et 5-fluoroindazole, nous avons synthétisé plusieurs composés finaux par des conditions de couplage peptidique utilisant l'hydroxybenzotriazole (HOBt) et le chlorhydrate de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDCI.HCl). Ces deux réactifs ont la propriété d'activer l'acide carboxylique par la formation en deux temps d'un intermédiaire *O*-acylisourée puis d'un intermédiaire *O*-Bt. Ces derniers sont de bons groupes partants et favorisent les additions-éliminations (AE) sur le carbone portant la fonction carbonyle. Ainsi, l'addition finale d'une chaîne alcool ou d'une chaîne amine permet de former respectivement une liaison ester et une liaison amide (Schéma 25).

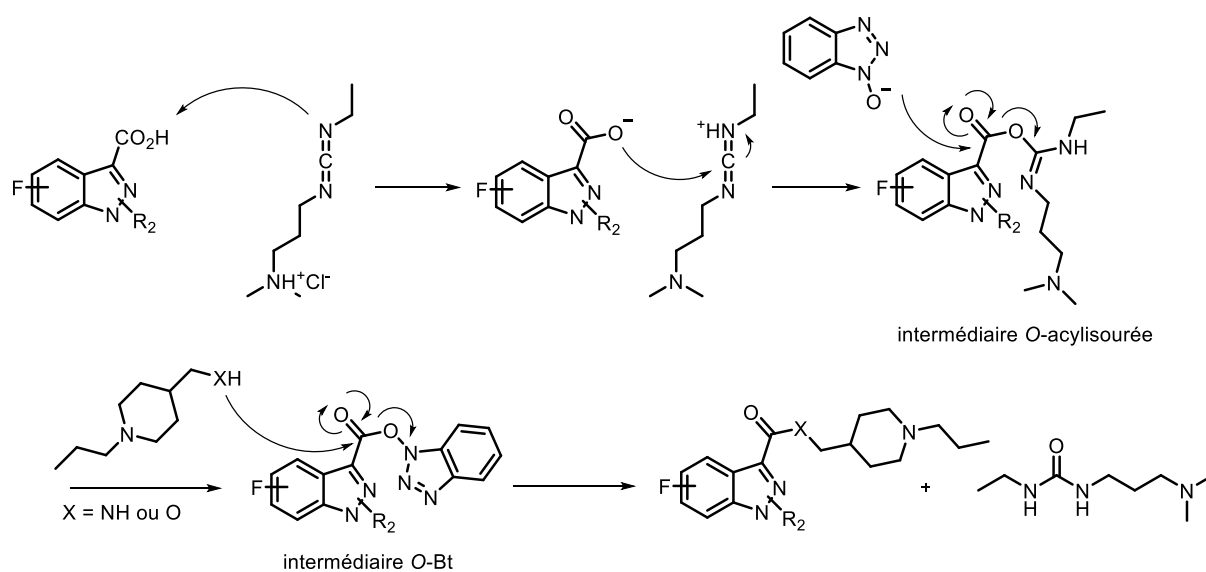
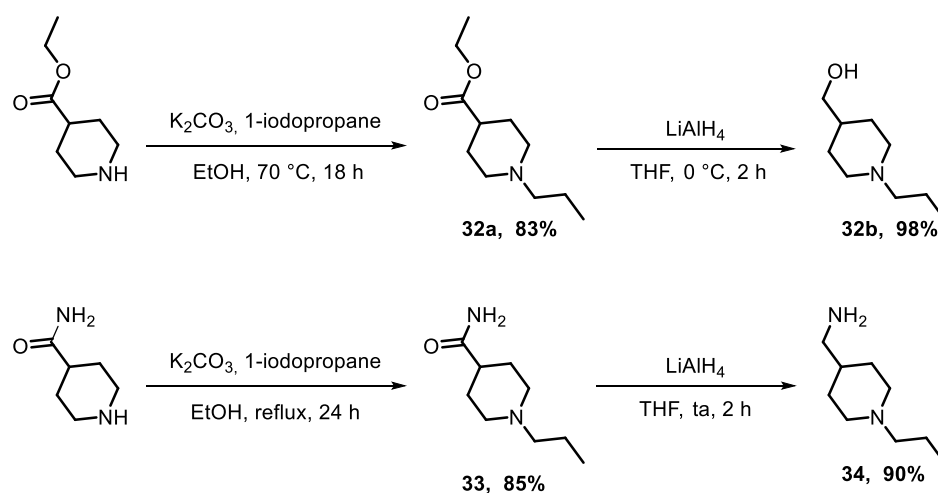


Schéma 25: Mécanisme d'activation de l'acide carboxylique par HOBT/EDCI.HCl

Cette méthode a été appliquée sur des précurseurs indazoliques et demanda la synthèse préalable des chaînes pipéridines portant le groupement propyle.

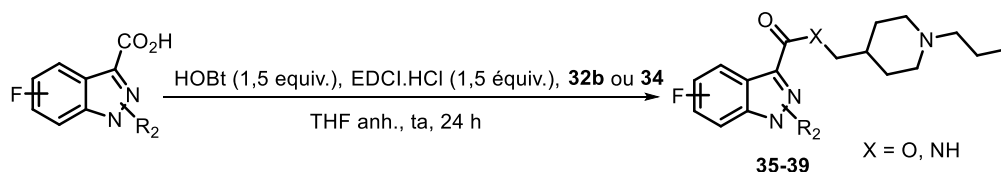
La chaîne (1-propylpipéridin-4-yl)méthanol **32b** a été obtenue en deux étapes débutant par la fonctionnalisation de l'isopécotate d'éthyle en présence de K_2CO_3 et de 1-iodopropane puis par une réduction de l'ester éthylique de **32a** en alcool grâce au tétrahydroaluminat de lithium ($LiAlH_4$). Le même protocole a été suivi pour former la chaîne 1-(1-propylpipéridin-4-yl)méthanamine **34** mais commença à partir de l'isonipécotamide (Schéma 26).



*Schéma 26: Voie d'obtention des chaînes pipéridines N-propylées **32** et **34***

Par la suite, ces chaînes ont été utilisées en présence des agents de couplage permettant d'obtenir cinq composés finaux avec des rendements très variables (Tableau 13). Cette différence est principalement liée aux difficultés de purification de ces produits. De plus, il est important de préciser

que la synthèse des composés en série 4-fluoroindazole a fait l'objet d'un ajout de triéthylamine (TEA) afin de favoriser le caractère nucléophile des chaînes **32b** et **34**.



Entrée	M1	Composé	Position F	R ₂	X	Rendement (%)
1	29	35	5-F	1- <i>i</i> Pr	O	65
2	30	36	5-F	2- <i>i</i> Pr	O	47
3	25a	37	4-F	H	O	14
4	31	38	4-F	1- <i>i</i> Pr	O	25
5	31	39	4-F	1- <i>i</i> Pr	NH	5

Tableau 13: Synthèse de 35-39 en utilisant HOBt/EDCl.HCl

Une autre méthode a été envisagée pour activer l'acide carboxylique présent en position 3 du cycle indazole. Cette méthode se compose d'une première étape de formation d'un chlorure d'acide (chlorure d'acyle) qui constitue une espèce très réactive. En présence d'un nucléophile, le chlore sera alors substitué permettant ainsi d'obtenir différentes espèces comme des amides ou des esters (Schéma 27).

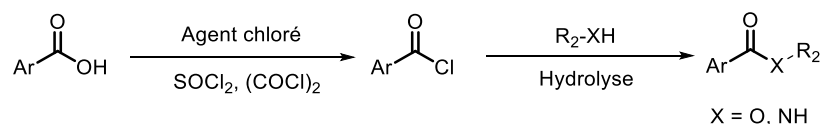
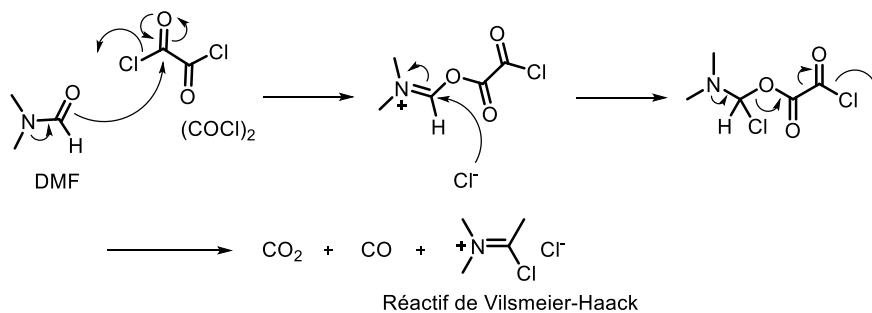


Schéma 27: Voie générale d'obtention des liaisons ester et amide via un chlorure d'acide

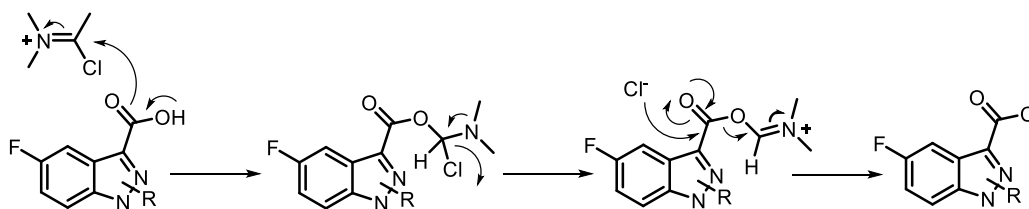
Notre choix se dirigea sur l'utilisation du chlorure d'oxalyle ((COCl)₂) en présence d'une quantité catalytique de *N,N*-diméthylformamide (DMF). Le DMF va réagir avec le (COCl)₂ formant dans un premier temps le réactif de Vilsmeier-Haack.²⁰⁷ Ce réactif agit sur l'acide carboxylique donnant le chlorure d'acide correspondant. Enfin, l'action de la chaîne **34** va permettre de former la liaison amide par un mécanisme d'AE (Schéma 28).

²⁰⁷ Dunetz, J. R.; Magano, J.; Weisenburger, G. A. *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20* (2), 140–177.

Formation du réactif de Vilsmeier-Haack



Formation du chlorure d'acide



Formation de la liaison amide

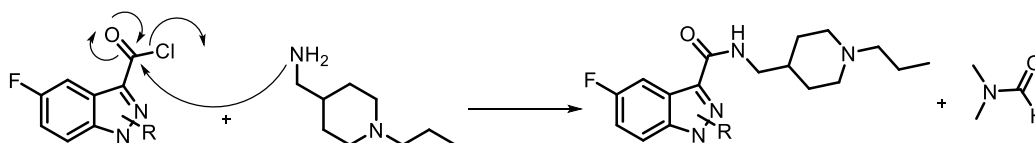


Schéma 28: Formation de la liaison amide via l'utilisation de (COCl)₂ et DMF

Cette méthode nous a permis d'accéder à deux composés amides en série 5-fluoroindazole variant par la position du groupement *i*Pr sur le cycle indazole (Schéma 29).

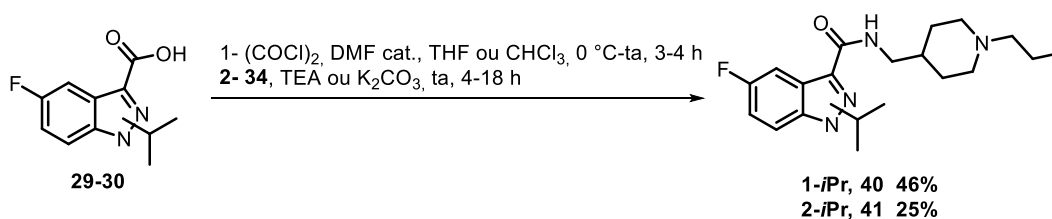


Schéma 29: Accès aux amides **40** et **41**

Enfin, une troisième méthode d'activation de l'acide carboxylique a été utilisée. Cette méthode fait intervenir le carbonyldiimidazole (CDI) comme agent de couplage et l'hydrure de sodium (NaH) pour favoriser l'action de la chaîne *tert*-butyl 4-(hydrométhyl)pipéridine-1-carboxylate **42**. La première étape de cette synthèse correspond à la déprotonation du précurseur indazolique **30** par le CDI. Le carboxylate formé est très réactif et engendre une réaction d'addition élimination (AE) sur le CDI formant l'intermédiaire acylcarboxyimidazole qui va lui-même être transformé en intermédiaire

imidazolide. La chaîne pipéridine **42** est ajoutée dans un second temps en présence d'une quantité stœchiométrique de NaH favorisant la formation d'un alcoolate réactif qui va, à son tour, provoquer une réaction d'AE et former le composé désiré **43** avec un rendement de 42% (Schéma 30).²⁰⁷

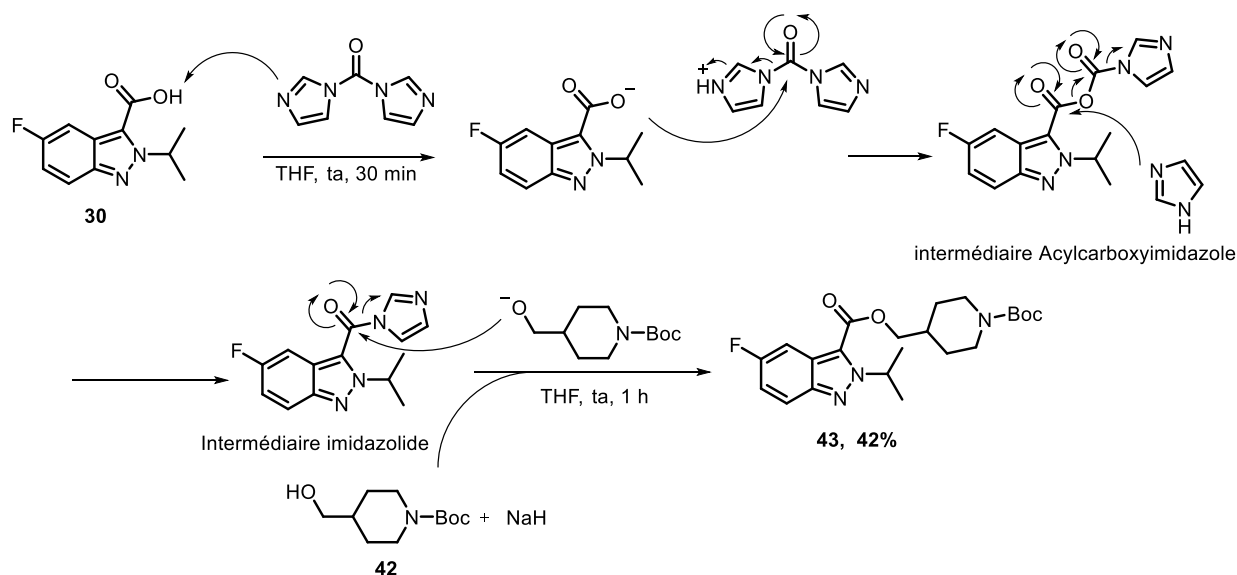


Schéma 30: Mécanisme de formation de **43** en présence de CDI

A la différence des molécules décrites précédemment, le composé **42** ne possède pas de chaîne propyle sur la pipéridine. En effet, notre objectif était de synthétiser un grand nombre de ligands affins vis-à-vis des 5-HT₄R variant par la nature de la chaîne portée sur la pipéridine. Nous avons envisagé deux stratégies différentes. La première consistait au couplage de chaînes pipéridines portant des chaînes variables et nous contraignait de produire de façon indépendante chacune de ces chaînes. La deuxième stratégie s'orientait vers la synthèse d'un précurseur commun qui pouvait être fonctionnalisé dans une étape finale (Schéma 31). C'est cette deuxième possibilité que nous avons retenue et c'est dans ce contexte que le composé **42** fut préparé. En effet, le groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc) présente de nombreux avantages puisqu'en plus de protéger la fonction amine, il est facile à obtenir à partir du dicarbonate de di-*tert*-butyl (Boc₂O) et peut être déprotégé par une simple hydrolyse du carbamate en présence d'acide chlorhydrique concentré (HCl conc.) ou d'acide trifluoroacétique (TFA)²⁰⁸ De plus, le doublet de l'azote est engagé dans la mésomérie avec le carbonyle du Boc facilitant grandement les purifications de ces intermédiaires.

²⁰⁸ Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, **2006**,696–926.

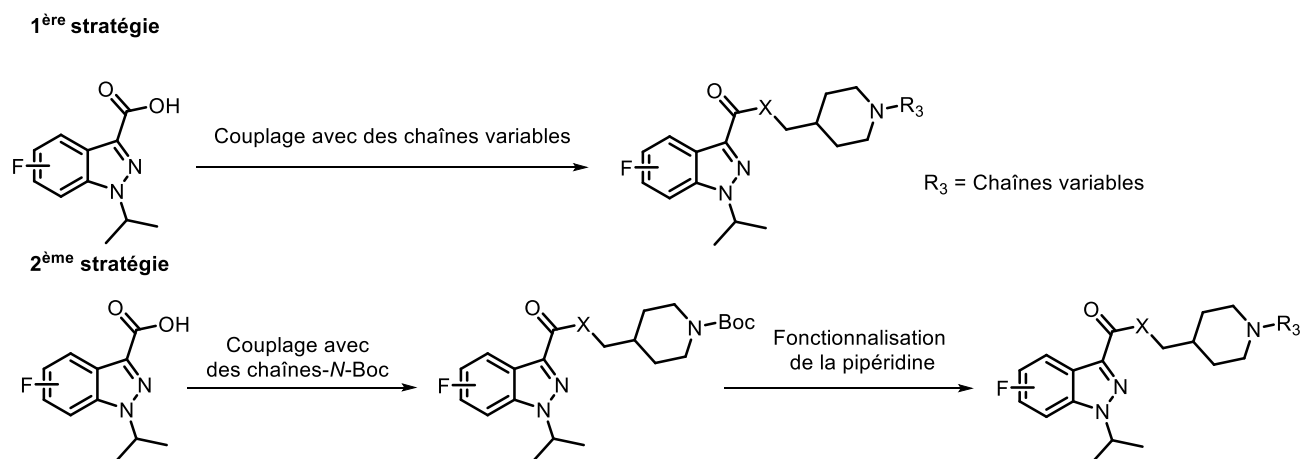


Schéma 31: Stratégies envisagées pour obtenir les produits finaux

Ainsi, nous avons développé une stratégie commune d'obtention des composés esters et amides *via* l'utilisation de ces chaînes pipéridiniques N-boc.

4.2 Méthode convergente d'obtention des précurseurs amides et esters *via* couplage peptidique

La première étape de ce travail consista à obtenir les chaînes portant le groupement Boc. Deux chaînes étaient indispensables pour obtenir les composés en série ester et amide : la chaîne **42** décrite précédemment et son homologue aminé : *tert*-butyl 4-(aminométhyl)pipéridine-1-carboxylate **46**.

La chaîne **46** a été synthétisée en trois étapes débutant par la formation de la chaîne **44** en présence de Boc_2O et de NaOH 1N. Puis, l'amide a été déshydraté en nitrile grâce à du trichlorure de phosphore (POCl_3) et de TEA. L'intermédiaire nitrile **45** ainsi formé a été réduit en amine en présence de LiAlH_4 dans le Et_2O pour donner l'amine **46** avec un rendement de 48% (Schéma 32). La chaîne **42** est un produit commercial que nous avons synthétisé en début de thèse.

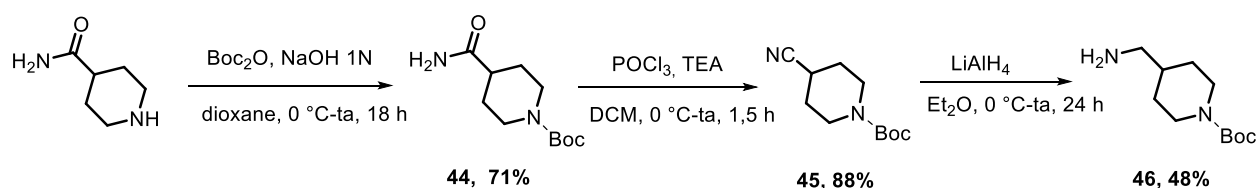
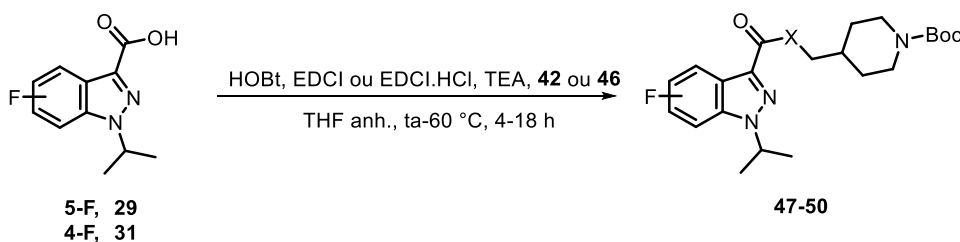


Schéma 32: Synthèse de la chaîne **46**

Ces chaînes ont par la suite été couplées en présence des acides **29** et **31** préalablement synthétisés. Nous nous sommes orientés sur la voie de synthèse dite peptidique utilisant l'EDCI, l'HOBt, en présence de TEA (Tableau 14).



Entrée	Composé	Position F	X	Rendements (%)
1	47	5-F	O	55
2	48	5-F	NH	85
3	49	4-F	O	56
4	50	4-F	NH	84

Tableau 14: obtention des précurseurs protégés en série 4- et 5-fluoroindazole

Cette méthode nous a permis d'obtenir les précurseurs **47** à **50** avec des rendements compris entre 55 et 84%. Les rendements des esters **47** et **49** sont plus faibles en raison d'une nucléophilie moins importante de la chaîne **42** comparativement à la chaîne **46**. Nous avons identifié qu'une partie de la matière première restait sous la forme activée portant l'HOBt et ne réagissait pas avec la chaîne alcool présente dans le milieu réactionnel. C'est pourquoi, nous avons chauffé la réaction à 60°C afin d'optimiser la cinétique de cette étape.

En série 6-fluoroindazole, nous nous sommes orientés vers une voie de synthèse similaire, toutefois, la réaction de couplage a été mise en œuvre avant la *N*-alkylation sur le cycle indazole. Le composé **25b** a fait l'objet d'un couplage en présence d'HOBt, EDCI et de TEA puis d'une *N*-alkylation de l'indazole dans les mêmes conditions que décrites précédemment (Schéma 33). A notre grand étonnement, nous avons observé la formation sélective du composé *N1*-alkylé **52** puisqu'en plus d'un rendement très satisfaisant (82%), nous avons été en capacité de récupérer la matière première **51** qui n'avait pas réagi. Cette sélectivité est probablement liée à l'encombrement stérique imposée par la chaîne pipéridinique et pourrait expliquer les grandes variations observées entre nos travaux et ceux de Procopiou *et al.* (§ Chapitre 3:1- 3.2).²⁰⁶ Cette nouvelle voie d'obtention de nos précurseurs a été découverte en fin de thèse, c'est pourquoi, nous ne l'avons pas appliquée en série 4- et 5-fluoroindazole. Actuellement, elle constitue notre méthode de référence dans l'obtention de précurseurs *N1*-alkylés.

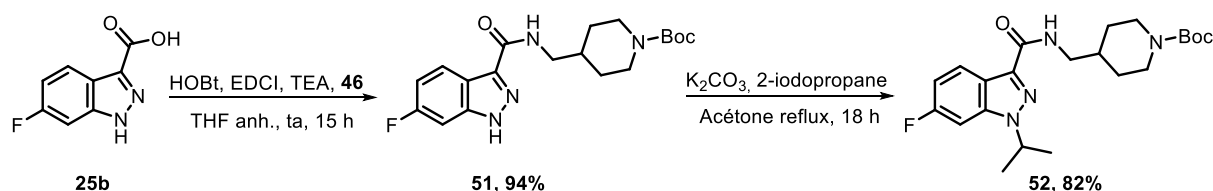


Schéma 33: Obtention des précurseurs protégés en série 6-fluoroindazole

En série 6-fluoroindazole, nous avons décidé de nous concentrer en premier lieu sur la synthèse de composés amides. Toutefois, au vu des résultats biologiques obtenus (en cohérence avec les résultats en série iodé) nous n'avons pas souhaité poursuivre l'exploration de cette série.

4.3 Développement d'une méthode d'obtention des composés en série cétone

Les précurseurs cétoniques ont fait l'objet d'un développement parallèle en raison d'une impossibilité d'y accéder par ces voies de synthèse. Ainsi, plusieurs méthodes ont été envisagées s'inspirant des travaux antérieurs réalisés au sein de notre laboratoire.

La liaison cétone représente une option prometteuse d'optimisation de la stabilité au métabolisme des nouveaux ligands affins des 5-HT₄R. En effet, les radiotraceurs de référence de ces récepteurs ont révélé une instabilité au métabolisme humain. Cette instabilité est probablement liée à la présence d'une liaison ester sensible aux phénomènes d'hydrolyses notamment par l'action du système enzymatique humain (estérases).²⁰⁹ Deux stratégies de synthèse de ces précurseurs ont été envisagées.

4.3.1 Contexte en série iodoindazole

En série iodée, la synthèse de précurseurs cétoniques fit l'objet de nombreuses investigations avec pour objectif de déterminer une voie optimale d'obtention de ces composés. La première stratégie explorée visa à obtenir directement cette liaison par la méthode de métallation sélective de la position 3. Cette stratégie orienta nos équipes à former une chaîne portant un chlorure d'acide et de la faire réagir directement en présence du TMPMgCl.LiCl et de l'indazole protégé **19d** (Schéma 34). Malheureusement, les rendements obtenus (5%) n'ont pas permis de valider cette méthode. C'est pourquoi, une seconde alternative fut explorée.

²⁰⁹ Choudhary, A.; Raines, R. T. *ChemBioChem* **2011**, *12* (12), 1801–1807.

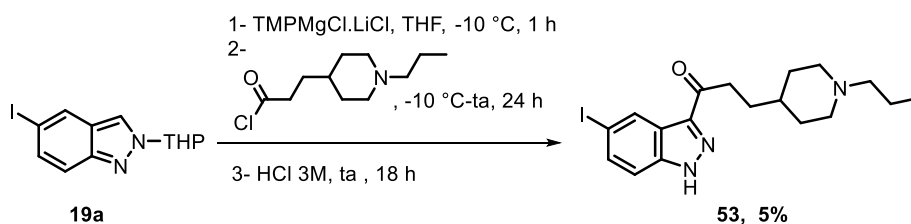
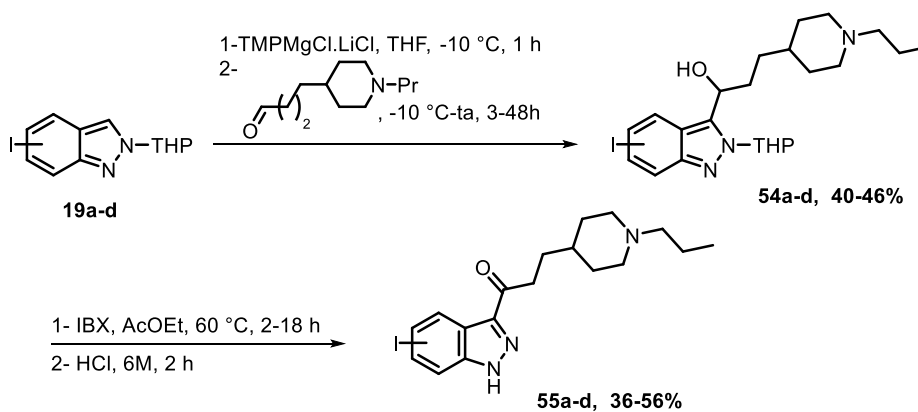


Schéma 34: Synthèse de la cétone 53

La deuxième méthode est relativement similaire mais s'oriente préalablement sur la formation d'un intermédiaire alcool **54a-d** qui sera, dans une étape additionnelle, oxydé en cétone **55a-d**. L'acide 2-iodoxybenzoïque (IBX) a été utilisé comme agent oxydant et l'acide chlorhydrique 6M a permis de déprotéger le groupement protecteur THP. Cette méthode offrit quatre composés iodés **55a-d** avec des rendements plutôt modérés (Tableau 15) expliquant notre choix de développer une nouvelle méthode d'obtention de ces dérivés cétoniques.



Entrée	Numéro	Position I	Rendement global (%) ^a
1	55a	5-I	15
2	55b	6-I	22
3	55c	7-I	25
4	55d	4-I	14

^arendement sur deux étapes après purification

Tableau 15: Formation des cétones en série 4,5,6 et 7-iodoindazole

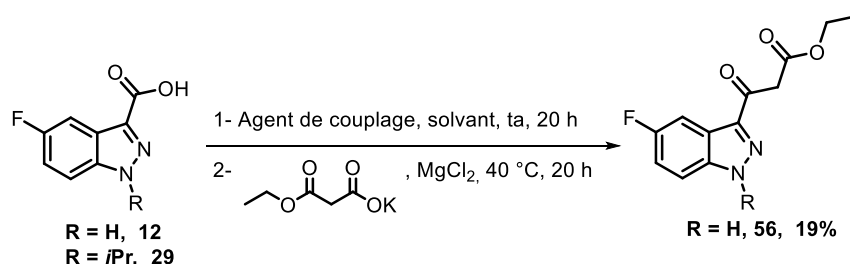
4.3.2 Obtention des composés en série cétone via un intermédiaire bêta-cétoester

Dans un premier temps, nous nous sommes orientés vers une voie de synthèse passant par un intermédiaire β -cétoester qui avait été préalablement décrite par Lalut *et al.* en 2016.²¹⁰

La mise au point de la première étape de cette voie de synthèse a été faite sur l'acide 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylique **29**. Diverses conditions furent envisagées variant par la

²¹⁰ Lalut, J.; Tournier, B. B.; Cailly, T.; Lecoutey, C.; *et al.* *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *116*, 90–101.

nature de l'agent de couplage et le solvant utilisé (Tableau 16). Ainsi, nous avons étudié la formation du β -cétoester en présence d'HOBt et d'EDCI, de chlorure de thionyle (SOCl_2) et de CDI. Malheureusement, aucune de ces méthodes nous donna le composé souhaité (présence uniquement de matière première). A contrario, nous avons observé la formation du composé désiré en présence de l'acide 5-fluoro-1*H*-indazole-3-carboxylique **12**, de CDI et de TEA avec un rendement modeste de 19%. Nous en sommes venus à la conclusion qu'il n'était pas possible de former cet intermédiaire en présence du groupement *iPr*.



Entrée	R	Agent de couplage	Solvant	Rendement (%)
1	<i>iPr</i>	SOCl_2	DMF	0 ^a
2	<i>iPr</i>	SOCl_2	CH_3CN	0 ^a
3	<i>iPr</i>	SOCl_2	Dioxane	0 ^a
4	<i>iPr</i>	SOCl_2	THF anh.	0 ^a
5	H	SOCl_2	THF anh.	0 ^a
6	<i>iPr</i>	HOBt, EDCI	THF anh.	0 ^a
7	H	HOBt, EDCI	THF anh.	0 ^a
8	<i>iPr</i>	CDI	THF anh.	0 ^a
9	H	CDI, TEA	THF anh.	19

^a Matière première uniquement

Tableau 16: Conditions opératoires étudiées pour la formation du β -cétoester **56**

Dans un second temps, une étape de *N*-alkylation de l'intermédiaire β -cétoester **56** a été réalisée en présence de K_2CO_3 et de 2-bromopropane. Enfin la chaîne malonate a été remplacée par la chaîne pipéridinique *via* l'utilisation successive du 4-(iodométhyl)pipéridine-1-carboxylate *tert*-butyl **59**, de K_2CO_3 dans le DMF suivie par une hydrolyse en présence de KOH dans un mélange éthanol/eau ($\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$) à reflux pendant 7 h (Schéma 35).

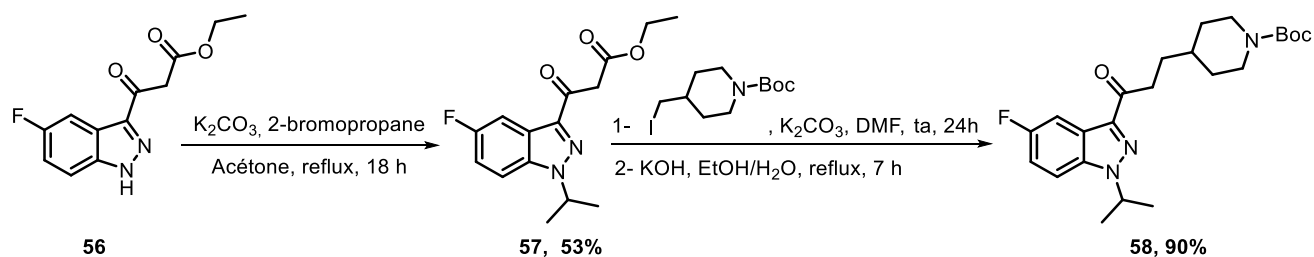


Schéma 35 : Formation du précurseur cétone 58

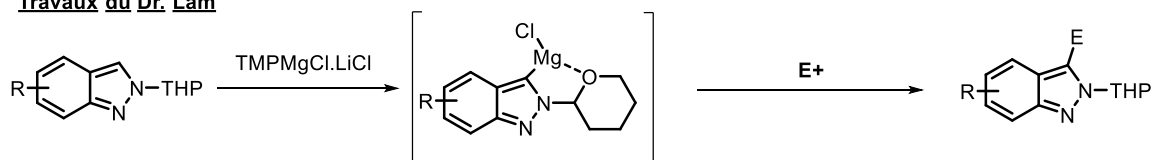
Le rendement global des 3 étapes étant de 10 %, nous avons décidé de nous orienter vers une autre voie de synthèse des précurseurs cétoniques.

4.3.3 *Obtention des composés en série cétone via métallation et utilisation d'un amide de Weinreb*

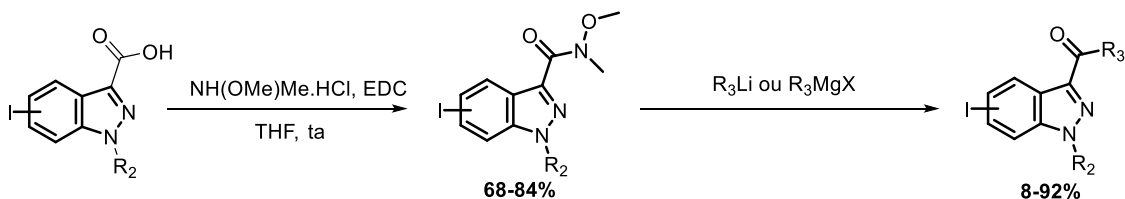
Les travaux antérieurs menés par le Pr. Valérie Collot ont permis d'étendre significativement la bibliothèque chimique de composés indazoliques. D'une part, elle développa la fonctionnalisation régiosélective de la position 3 du noyau *via* l'utilisation de la base de Knochel-Hauser permettant d'accéder à de nombreuses molécules en série amide et ester.¹⁹⁷ D'autre part, elle développa avec le Dr. Crestey une voie d'obtention de composés en série cétone utilisant des intermédiaires indazoliques portant un amide de Weinreb en présence d'organolithiens ou de réactifs de Grignard.²¹¹ Ainsi, nous décidâmes de mettre au point une technique hybride utilisant la base de Knochel-Hauser pour fonctionnaliser la position 3 du cycle indazole et un électrophile portant l'amide de Weinreb afin d'obtenir en une étape nos composés cétoniques (Schéma 36).

²¹¹ Crestey, F.; Stiebing, S.; Legay, R.; Collot, V.; Rault, S. *Tetrahedron* **2007**, *63* (2), 419–428.

Travaux du Dr. Lam



Travaux du Dr. Crestev



Nos travaux

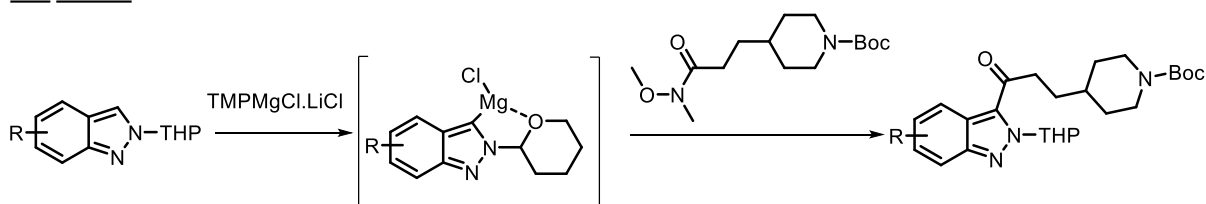


Schéma 36: Nouvelle voie de synthèse des ligands cétoniques

Il fallait pour cela établir dans un premier temps la preuve du concept et déterminer la formation du produit final dans le milieu réactionnel. Pour cela, l'obtention de la chaîne pipéridinique appropriée était indispensable.

La chaîne **63** est synthétisée en 5 étapes, elle débute par une oxydation de Swern^{212,213} suivie d'une réaction²¹⁴ de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE)^{214,215} avec un rendement global de 90% pour ces deux étapes. L'alcène est réduit en présence de dihydrogène et d'une quantité catalytique de palladium sur charbon puis une étape de saponification permet l'obtention de l'acide carboxylique **62**. Enfin l'amide de Weinreb **63** est formé dans des conditions de couplage peptidique en présence d'HOBt et d'EDCI avec un rendement de 92% (Schéma 37).

²¹² Mancuso, A. J.; Swern, D. *Synthesis* **1981**, 3, 165–185.

²¹³ Mancuso, A. J.; Huang, S.-L.; Swern, D. *J. Org. Chem.* **1978**, 43 (12), 2480–2482.

²¹⁴ Horner, L.; Hoffmann, H.; Wippel, H. G.; Klahre, G. *Chem. Ber.* **1959**, 92 (10), 2499–2505.

²¹⁵ Wadsworth, W. S.; Emmons, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83 (7), 1733–1738.

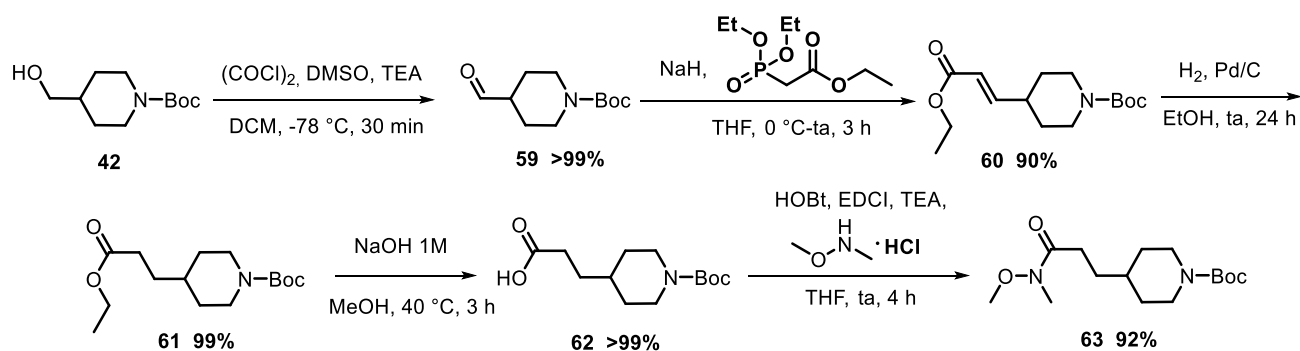


Schéma 37: Voie d'obtention de la chaîne pipéridinique **63** portant l'amide de Weinreb

Les conditions de réaction initialement sélectionnées correspondent à celles utilisées lors de la formation des esters (Schéma 38).

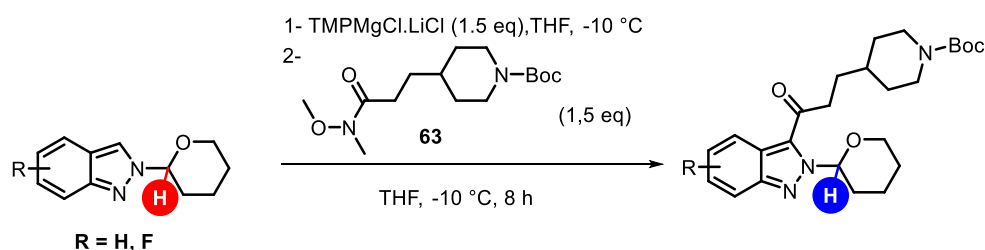


Schéma 38: Conditions sélectionnées pour la métallation

En comparant la RMN ^1H de la matière première et du mélange réactionnel, nous avons observé la formation d'un seul produit correspondant à celui désiré. Le déblindage des signaux dans la zone aromatique et du proton présent sur le C1 du THP étant en faveur de notre hypothèse.

En effet, la présence d'une liaison cétone entraîne un déblindage de l'hydrogène présent sur le C1 du THP comparativement à celui de la matière première, nous permettant de faire la détermination de l'avancement des manipulations en calculant le ratio entre ces deux protons. Cette démarche est consolidée par l'absence de réactions parasites sur l'indazole et la présence en fin de manipulation de deux produits uniquement (Figure 50).

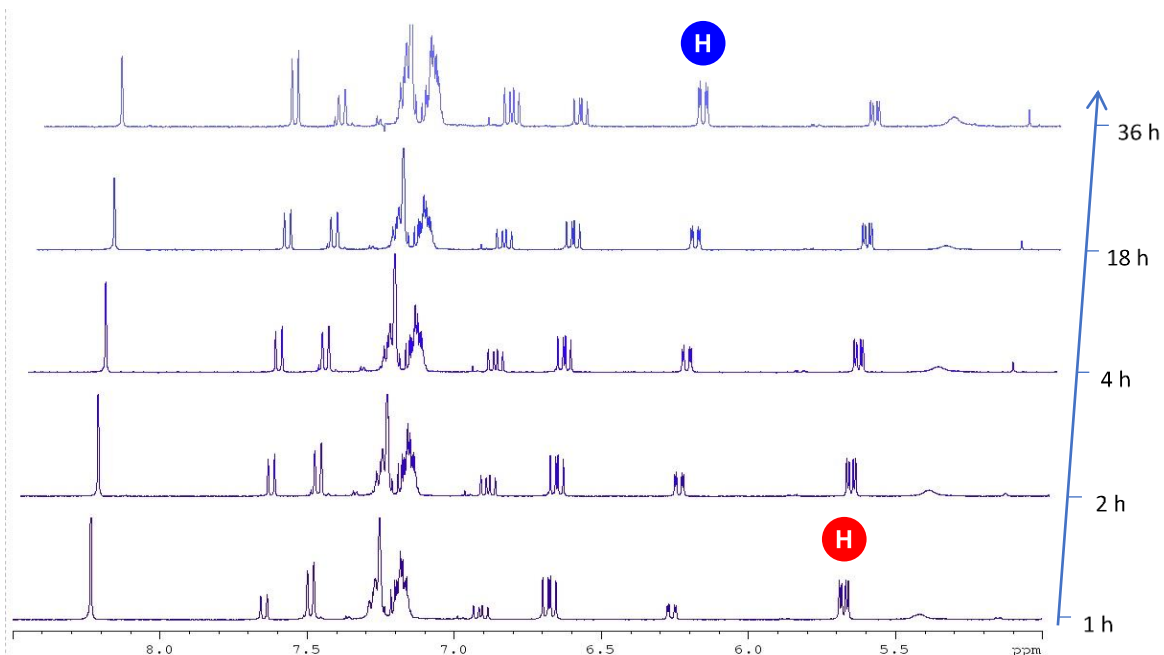


Figure 50: Exemple de suivi RMN ^1H en série 4-fluoroindazole N2-THP

Nous avons alors étudié plusieurs conditions afin d'optimiser les rendements et d'évaluer l'influence des substituants sur la réaction. Les prélèvements *in situ* ont été effectués à un temps T correspondant au temps d'attente suivant l'ajout de l'électrophile. Nous avons fait un prélèvement le 1^{er} jour à 2h (J-1), un prélèvement le 2^{ème} jour (J-2) ainsi qu'au 3^{ème} jour (J-3). Il est important de préciser qu'une addition supplémentaire de $\text{TMPMgCl}\cdot\text{LiCl}$ a été réalisée à -10°C pour chaque journée de réaction. (Tableau 17)



Entrée	X	Chaîne 63 (equiv.)	Température	T	Ratio A:B
1	H	1,5	$-10^\circ\text{C} \rightarrow \text{ta}$	J-1	76:24
				J-2	69:31
				J-3	56:44
2	H	1,5	$-10^\circ\text{C} (8\text{h}) \rightarrow \text{ta}$	J-1	46:54
				J-2	43:57
				J-3	55:45
3	5-I	1,5	$-10^\circ\text{C} (8\text{h}) \rightarrow \text{ta}$	J-1	48:52
				J-2	87:13
4	5-I	1,5	-40°C	J-1	67:33
				J-2	

				J-3	65:35
5	5-I	3 ^a	-10°C (8h) → ta	J-1	56:44
				J-2	39:61
6	4-I	1,5	-10°C (8h) → ta	J-1	100:0
7	4-F	1,5	-10°C (8h) → ta	J-1	59:41
				J-2	52:48
				J-3	40:60

^a en présence de 3 équiv. de TMPMgCl.LiCl

Tableau 17: Conditions de métallation en position C3

Ces résultats nous ont permis de déduire l'intérêt de rester à -10°C après ajout de l'électrophile (entrée **2,3** et **7**). La présence de substituants sur le cycle indazole n'influence en rien les résultats obtenus excepté lorsque l'iode est présent en position 4 du cycle où on observe l'absence de formation du produit recherché. Enfin, l'ajout d'un excès de base (3 équiv.) et de chaîne **63** (3 équiv.) nous offre de bons résultats qui ne sont pas significativement améliorés comparativement aux conditions utilisées dans les entrées **2,3** et **7**, c'est pourquoi, nous n'avons pas retenu cette option très consommatrice de chaîne **63**.

Ainsi, nous avons appliqué cette méthode pour synthétiser nos composés cétoniques en série 4 et 5-fluoroindazole (Schéma 39). Le précurseur **23c** avait été préalablement synthétisé pendant les travaux du Dr. Lam. Le THP a été déprotégé dans des conditions douces (HCl 1M à 0°C) afin d'éviter au maximum d'enlever le groupement protecteur Boc.

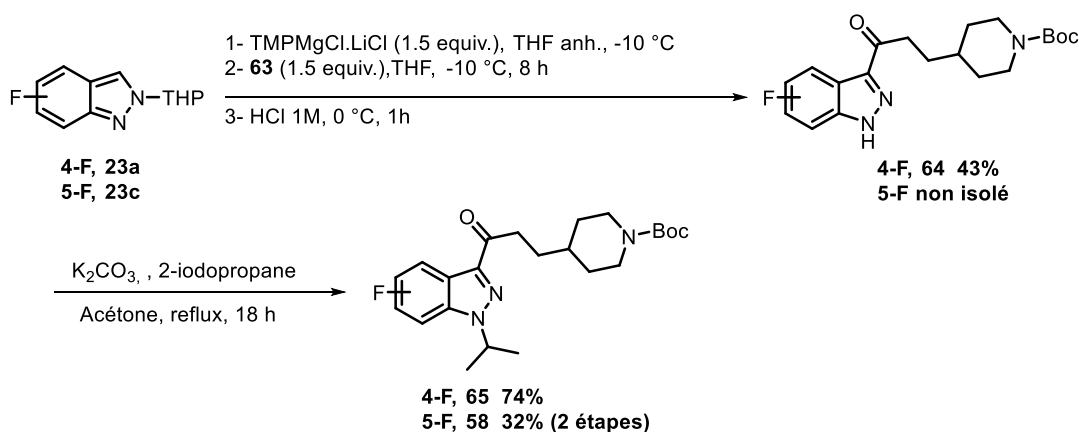


Schéma 39: Formation des précurseurs cétoniques en série 4 et 5-fluoroindazole

Nous avons obtenu un rendement global sur deux étapes de 32% pour former les composés **65** et **58**. Ces résultats sont significativement supérieurs à ceux obtenus précédemment nous confortant sur l'utilisation de cette nouvelle méthode. De plus, l'étape de N-alkylation est en concordance avec les

résultats observés en série 6-fluoroindazole, puisqu'en plus d'avoir de bons rendements de formation de composés *N1*-alkylés, nous avons été en mesure de récupérer la matière première qui n'avait pas réagi (absence ou traces de composés *N2*-alkylés).

4.4 Développement d'une série de composés en série 1,2,3 triazole et 1,2,4 oxadiazole

Enfin, notre attrait pour la synthèse de ligands résistants au métabolisme nous orienta vers la synthèse de liaisons cycliques comme les triazoles et les oxadiazoles. Ces séries additionnelles ont été développées parallèlement au projet initial en s'appuyant notamment sur les travaux de Nirogi *et al.* sur ce sujet.¹⁷³

Ces dernières décennies, le cycle 1,2,3 triazole s'est illustré comme une alternative de choix aux liaisons peptidiques conventionnelles.²¹⁶ Ce cycle présente plusieurs atouts intéressants puisqu'en plus d'être un bioisostère des amides, il est synthétisé facilement en présence de précurseurs alcynes et triazoles et optimise la résistance au métabolisme.²¹⁷ En effet, la liaison amide est métabolisée dans le corps humain par des protéases (ou peptidases) pouvant limiter l'efficacité des molécules synthétisées. De nombreux articles ont exposé l'intérêt de remplacer ces liaisons par des triazoles permettant d'optimiser considérablement le temps de demi-vie de ces molécules dans l'organisme.²¹⁸

4.4.1 Synthèse des précurseurs indazoliques en série 1,2,3 triazole

Il existe plusieurs méthodes d'obtention du noyau 1,2,3 triazole. La réaction décrite par Huisgen *et al.* permet de réaliser une cycloaddition dipolaire 1,3 offrant d'une part le régioisomère 1,4 et d'autre part le régioisomère 1,5.²¹⁹ Cette chimie click est à l'origine des travaux développés par Sharpless *et al.* qui optimisèrent la réaction en synthétisant spécifiquement le régiosomère 1,4 *via* l'utilisation d'un catalyseur au cuivre (CuSO₄) et d'ascorbate de sodium (Schéma 40).^{220,221}

²¹⁶ Bonandi, E.; Christodoulou, M.; Fumagalli, G.; Perdicchia, D.; *et al.* *Drug Discov. Today* **2017**, *22*, 1572–1581.

²¹⁷ Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; *et al.* *Med. Res. Rev.* **2007**, *28* (2), 278–308.

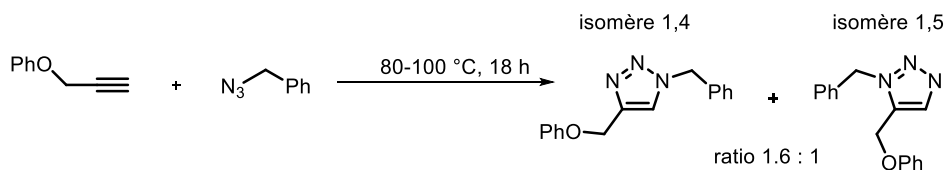
²¹⁸ Valverde, I. E.; Bauman, A.; Kluba, C. A.; Vomstein, S.; *et al.* *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52* (34), 8957–8960

²¹⁹ Gil, M.; Arévalo, M.; López, Ó. *Synthesis*. **2007**, (11), 1589–1620.

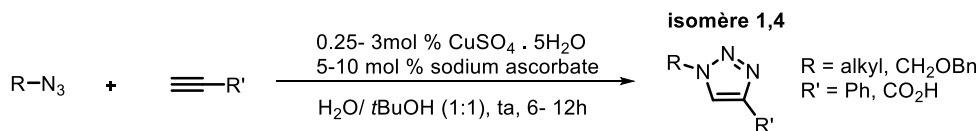
²²⁰ Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596–2599.

²²¹ Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (1), 210–216.

Cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen



Cooper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC) de Sharpless



Mécanisme

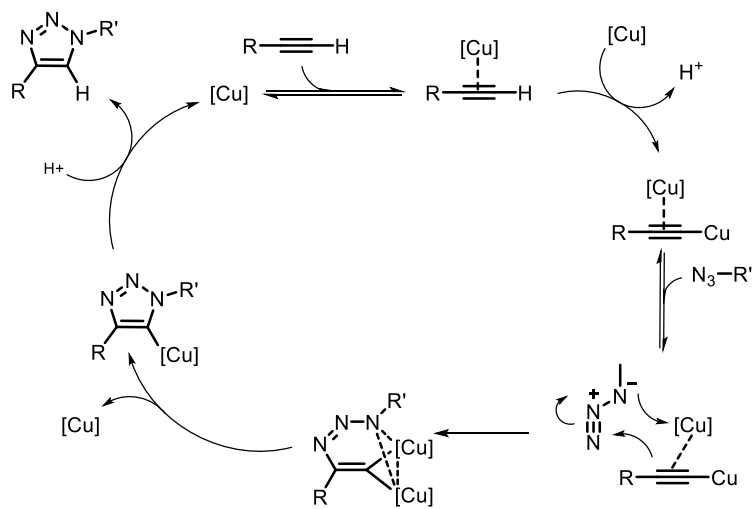


Schéma 40: Méthodes de formation du cycle 1,2,3 triazole

Il existe d'autres méthodes de synthèse des cycles 1,2,3 triazoles utilisant d'autres catalyseurs qui ne seront pas développées dans ce manuscrit. Nous avons choisi, dans le cadre de ce projet, de former sélectivement l'isomère 1,4 triazole en raison d'une structure tridimensionnelle plus similaire à celle des amides. C'est pourquoi, nous avons sélectionné la méthode développée par Sharpless *et al.* pour synthétiser nos composés.

Notre travail consista d'une part à synthétiser les précurseurs indazoliques portant en position 3 la fonction alcyne et d'autre part la synthèse de chaînes pipéridiniques portant le groupement azoture.

Les précurseurs indazoliques furent obtenus en 3 étapes. La première étape consista à synthétiser les noyaux indazoles fluorés et à intégrer un iode en position 3 du cycle. La iodation a été effectuée en présence de diiode (I₂), de KOH dans le DMF. La N-alkylation de ces intermédiaires iodés **66** et **67** a été réalisée dans les conditions décrites précédemment mais présentèrent une difficulté bien plus importante en raison d'une migration sur colonne très proche entre les composés N1 et N2 alkylés. Enfin, une réaction de Sonogashira a été effectuée sur les précurseurs iodés **68** et **69** à l'aide de tétrakis (triphenylphosphine) palladium (0) (Pd(PPh₃)₄), de iodure de Cuivre (CuI) et d'éthynyltriméthylsilane

offrant les précurseurs alcynes-TMS.^{222,223} Ces précurseurs ont été par la suite déprotégés en présence de fluorure de tétrabutyl-ammonium (TBAF) dans le THF offrant les composés **70** et **71** (Schéma 41).

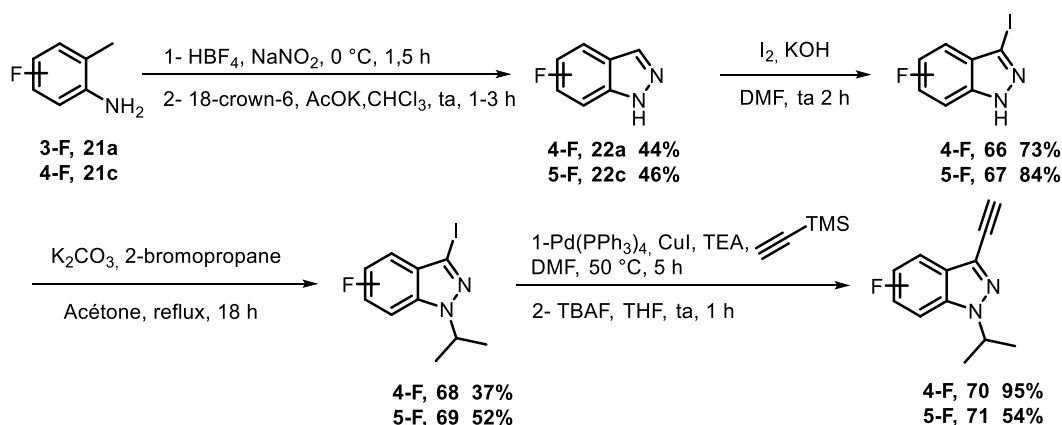


Schéma 41: Voie de synthèse des alcynes **70** et **71**

En parallèle de ce travail, nous avons synthétisé les chaînes pipéridiniques portant la fonction chimique azoture. Deux chaînes ont fait l'objet d'un développement variant par le nombre de carbones séparant la pipéridine et l'azoture (**73** et **74**) (Schéma 42).

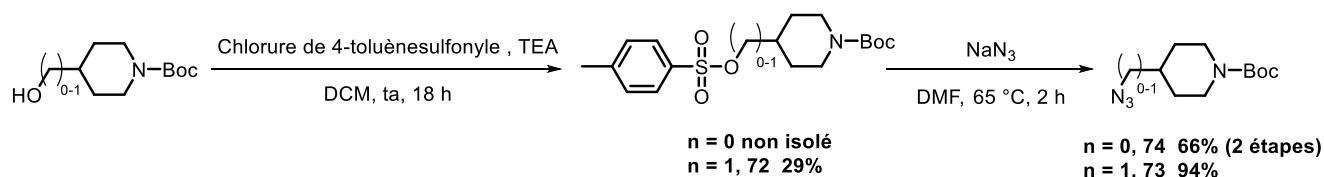
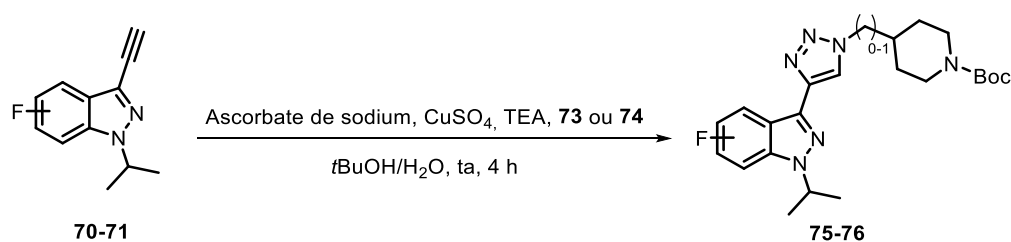


Schéma 42: Obtention des chaînes azotures **73** et **74**

Enfin, nous avons appliqué la chimie click (méthode catalysée au cuivre) entre les précurseurs alcynes **70** et **71** avec les chaînes azotures **73** et **74** (Tableau 18).



Entrée	Composé	Position fluor	n	Rendement (%)
1	75	4-F	0	44
2	76	5-F	1	50

Tableau 18: Obtention des précurseurs 1,2,3 triazoles via la chimie click

²²² Chinchilla, R.; Nájera, C. *Chem. Rev.* **2007**, 107 (3), 874–922.

²²³ Schmidt, A.; Beutler, A.; Snovydyovych, B. *European J. Org. Chem.* **2008**, 24, 4073–4095.

Les précurseurs **75** et **76** ont par la suite été fonctionnalisés avec différentes chaînes et seront décrites dans le chapitre suivant.

4.4.2 Synthèse d'un ligand en série 1,2,4-oxadiazole

Notre attrait pour les séries cycliques ne se limita pas à l'obtention de composés 1,2,3-triazoles puisqu'on proposa une synthèse additionnelle d'un ligand 1,2,4 oxadiazole. Notre choix se tourna sur ce cycle en raison de sa facilité d'obtention (nous disposions déjà du précurseur indazole), de sa présence dans diverses publications relatant de la synthèse de composés affins pour les 5-HT₄R et de ses propriétés proches des amides.^{173,224}

Nous avons formé la chaîne *N'*-hydroxy-1-propylpipéridine-4-carboxamide **78** à l'aide d'une chaîne 1-propylpipéridine-4-carbonitrile **77** en présence de chlorhydrate d'hydroxylamine (NH₂OH.HCl) et de TEA. La chaîne **77** est issue d'une chaîne pipéridinique initialement synthétisée dans le laboratoire qui a réagi en présence d'anhydride trifluoroacétique et de TEA permettant de transformer la fonction amide en nitrile (Schéma 43).

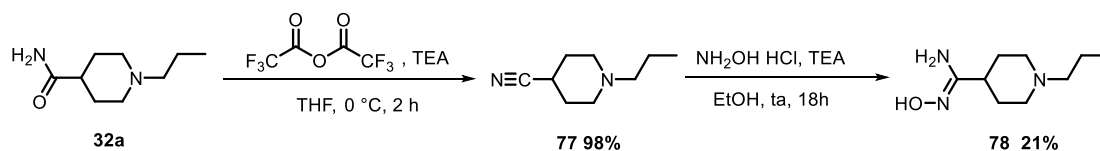


Schéma 43: Voie de synthèse de la chaîne **78**

Le composé final **79** a été obtenu par activation de l'acide carboxylique en présence de (COCl)₂, de DMF puis de l'ajout de la chaîne **78** (Schéma 44).

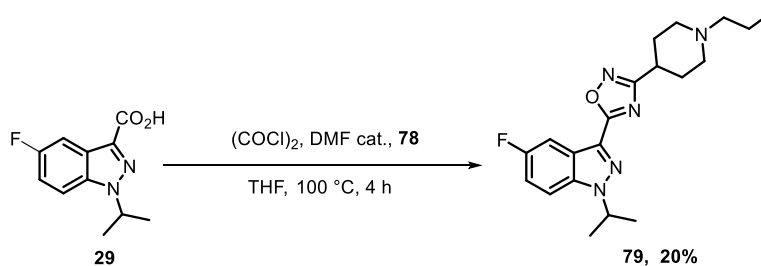


Schéma 44: Obtention du ligand **79** en série 1,2,4 oxadiazole

5. Accès aux indazoles plurifonctionnalisés

La dernière étape de notre travail de synthèse fut de fonctionnaliser nos précurseurs indazoliques afin d'obtenir un grand panel de composés affins pour les 5-HT₄R.

²²⁴ Meanwell, N. A. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (8), 2529–2591.

De nombreux ligand affins et sélectifs des 5-HT₄R sont décrits dans la littérature. Ces ligands se distinguent par les nombreuses variations des cycles explorés, des *N*-alkylations proposées et des chaînes pipéridiniques sélectionnées. Ces dernières peuvent influencer significativement l'affinité pour les 5-HT₄R et peuvent être modulées afin d'agir sur certains paramètres comme la lipophilie *via* l'introduction de fonctions hydroxyles. Notre démarche fut de sélectionner certaines de ces chaînes d'intérêt en se basant sur les molécules de référence utilisées couramment dans l'étude de ces récepteurs.

En premier lieu, nous avons orienté notre recherche sur la synthèse de ligands portant des groupements *N*-propylés. De nombreux ligands affins des 5-HT₄R (ex : **SB204070**) portent une chaîne *N*-butyle qui augmente de façon significative la lipophilie. La chaîne propyle est une alternative de choix puisqu'en plus de conserver l'affinité vis-a-vis des 5-HT₄R, nous pouvons limiter l'augmentation de la lipophilie en réduisant la taille de cette chaîne carbonée.⁸⁰ Le **GR113808** est un antagoniste de référence des 5-HT₄R qui porte une chaîne éthyle sulfonamide sur sa pipéridine. Il nous sembla intéressant de sélectionner cette chaîne en raison de la forte affinité du **GR113808** vis-à-vis des 5-HT₄R ($K_i(5\text{-HT}_4\text{R}) = 0,53 \text{ nM}$). De plus, la présence du sulfonamide pourrait limiter l'augmentation de la lipophilie générée par la présence de la chaîne carbonée éthyle.⁷⁸ La troisième chaîne à avoir été sélectionnée est une chaîne 4-méthyltétrahydro-2*H*-pyran-4-ol. Celle-ci constitue une option intéressante puisqu'en plus d'être présente dans certains composés de référence comme le **PF-04995274**, elle possède un groupement hydroxyle pouvant limiter l'augmentation de la lipophilie (Schéma 45).²²⁵

²²⁵ Brodney, M. A.; Johnson, D. E.; Sawant-Basak, A.; Coffman, K.; *et al.* *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (21), 9240–9254.

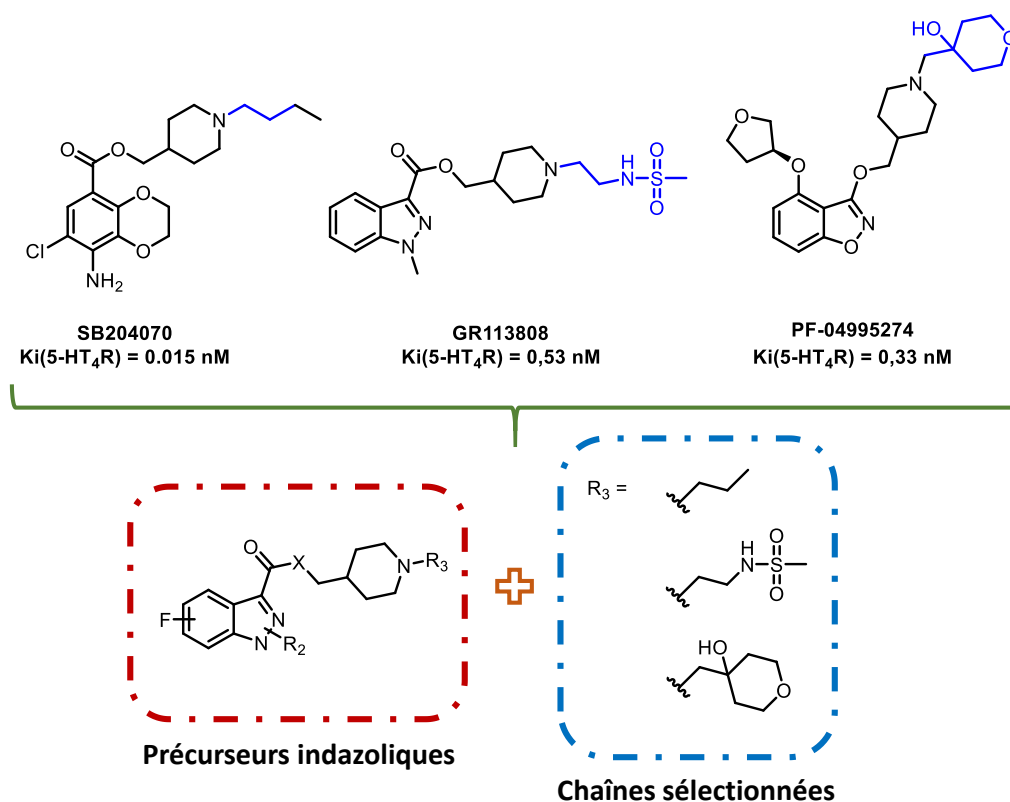
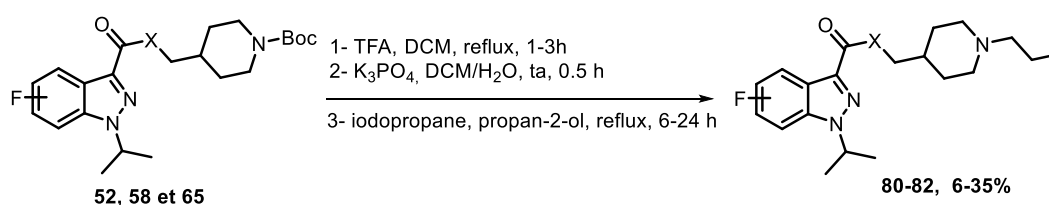


Schéma 45: Principales chaînes latérales sélectionnées

5.1 Accès aux ligands N-propylés en série amide et cétone

Dans un premier temps, nous nous sommes orientés vers la synthèse des composés présentant une chaîne latérale N-propylée. La plupart de ces composés avaient été préalablement obtenus à partir des chaînes portant directement ce substituant (§ Chapitre 3: I- 4.1). C'est pourquoi, nous avons simplement complété les séries manquantes. Les précurseurs N-Boc (**52**, **58** et **65**) ont été déprotégés en présence d'un excès d'acide trifluoroacétique (TFA), puis la fonctionnalisation a été faite en présence de TEA et de 1-iodopropane (Tableau 19). Trois ligands N-propylés ont été obtenus *via* cette méthode avec des rendements modérés compris entre 6 et 35%.



Entrée	Produit de départ	Numéro	Position fluor	X	Rendements (%)
1	65	80	4-F	CH ₂	35
2	58	81	5-F	CH ₂	6
3	52	82	6-F	NH	10

Tableau 19: Synthèse des ligands N-propylés

5.2 Synthèse des ligands *N*-éthylsulfonamide en série ester, amide et cétone

Les ligands portant la chaîne sulfonamide ont été synthétisés par deux méthodes différentes. La première consista à former dans un premier temps un intermédiaire éthyle phtalimide **83** à l'aide de *N*-(2-bromoéthyl)phtalimide commercial. Le ligand **84** a été obtenu en deux étapes débutant par une déprotection du phtalimide en présence d'hydrazine (NH₂NH₂) suivi d'une formation du sulfonamide *via* l'utilisation de chlorure de méthanesulfonyle (MeSO₂Cl). Cette méthode a été utilisée pour former un seul composé en raison du faible rendement de ces réactions et en raison de purifications trop fastidieuses (Schéma 46).

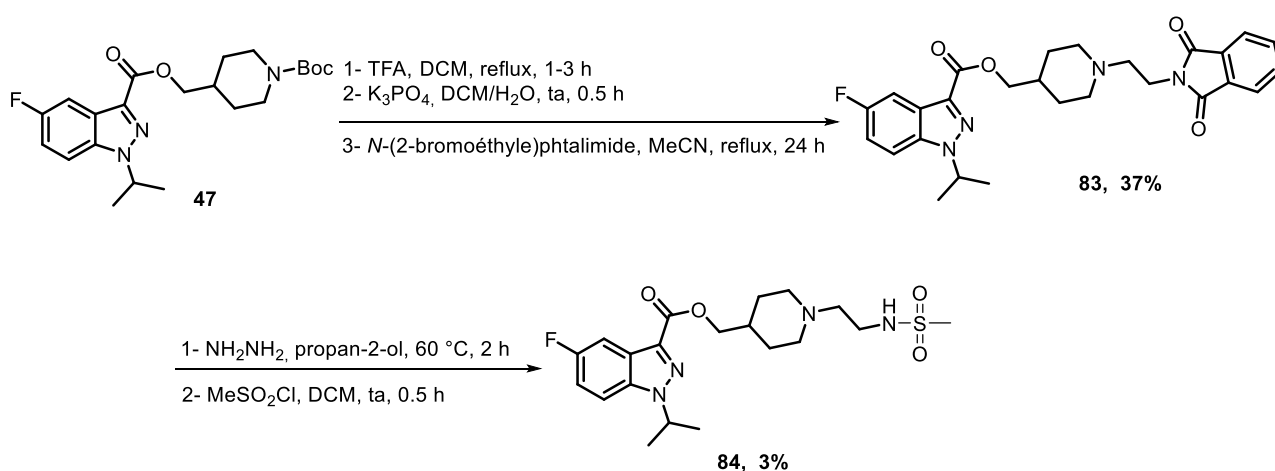


Schéma 46: Voie d'obtention du composé **84**

Notre deuxième option a été de former préalablement la chaîne sulfonamide et de la fixer directement après la déprotection du groupement Boc. Par conséquent, nous avons réalisé la formation de la chaîne *N*-(2-bromoéthyl)méthanesulfonamide **85** à partir du bromhydrate de 2-bromoéthylamine commercial et d'un équivalent de MeSOCl₂ et de TEA (Schéma 47).

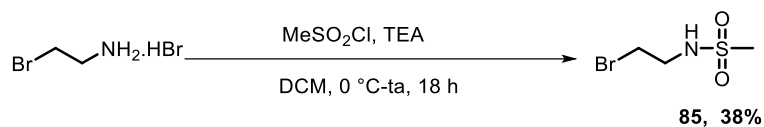
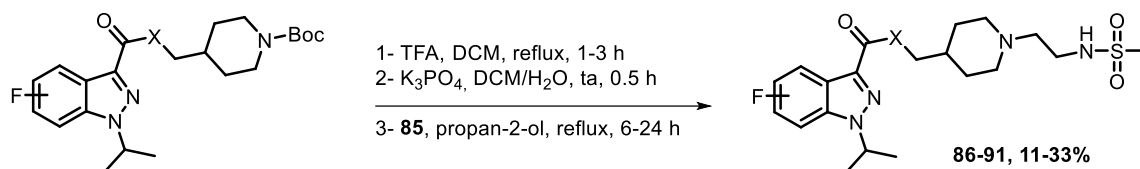


Schéma 47: Formation de la chaîne **85**

La chaîne **85** a été utilisée sur 5 précurseurs protégés différents permettant d'accéder aux composés désirés avec des rendements bien plus intéressants que dans la voie de synthèse précédente (Tableau 20).



Entrée	Produit de départ	Numéro	Position fluor	X	Rendements (%)
1	49	86	4-F	O	21
2	50	87	4-F	NH	18
3	65	88	4-F	CH ₂	33
4	48	89	5-F	NH	11
5	58	90	5-F	CH ₂	33
6	52	91	6-F	NH	31

Tableau 20: Synthèse des ligands sulfonamides 86-91

5.3 Synthèse des ligands *N*-méthyltétrahydro-2*H*-pyran-4-ol

Les ligands portant la chaîne 4-méthyltétrahydro-2*H*-pyran-4-ol ont été formés selon la même voie de synthèse. Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur la formation de la chaîne époxyde 1,6-dioxaspiro[2,5]octane **92**.²²⁶ Elle a été obtenue, en une étape, à partir du tétrahydro-4*H*-pyrane-4-one, d'hydrure de sodium (NaH) et de iodure de triméthylsulfoxonium (Me₃S(I)O) dans le THF anhydre avec un rendement de 64% (Schéma 48).

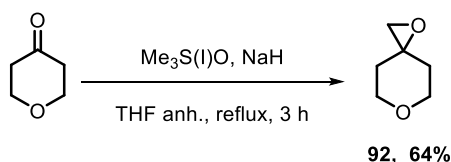
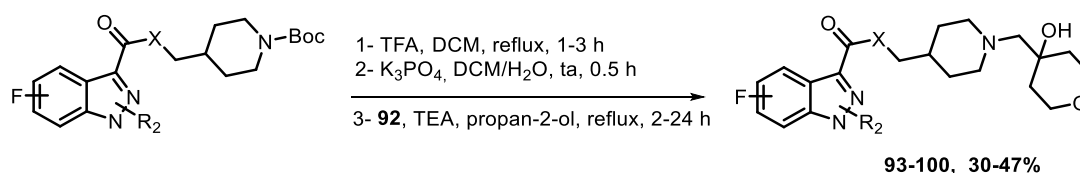


Schéma 48: Formation de la chaîne 1,6-dioxaspiro[2,5]octane **92**

La même méthode de déprotection de nos précurseurs indazoliques a été utilisée (TFA en excès) suivie d'une étape de neutralisation avec une quantité stœchiométrique de phosphate tripotassique (K₃PO₄) dans le DCM. Enfin, l'addition concomitante de TEA et de la chaîne **92**, nous a permis d'accéder aux composés finaux **93-100** portant la chaîne oxane avec des rendements compris entre 30 et 47% (Tableau 21).

²²⁶ Gensini, M.; Altamura, M.; Dimoulas, T.; Fedi, V.; et al. *ChemMedChem* **2010**, 5 (1), 65–78.



Entrée	Produit de départ	Composé	Position fluor	R ₂	X	Rendements (%)
1	49	93	4-F	1- <i>i</i> Pr	O	33
2	50	94	4-F	1- <i>i</i> Pr	NH	45
3	65	95	4-F	1- <i>i</i> Pr	CH ₂	30
4	47	96	5-F	1- <i>i</i> Pr	O	47
5	43	97	5-F	2- <i>i</i> Pr	O	38
6	48	98	5-F	1- <i>i</i> Pr	NH	39
7	58	99	5-F	1- <i>i</i> Pr	CH ₂	43
8	52	100	6-F	1- <i>i</i> Pr	NH	31

Tableau 21: Synthèse des ligands **93-100**

5.4 Synthèse de ligands portant d'autres chaînes

En plus de ces 3 chaînes d'intérêt, nous avons sélectionné deux chaînes additionnelles afin de varier davantage le panel de ligands proposés. Ces dernières ont été choisies en raison de leur disponibilité dans le laboratoire ou de l'existence de publications relatant leur utilisation. Nous n'avons pas souhaité développer des séries complètes avec ces chaînes en raison d'affinités pour les 5-HT₄R plus modérées. La première chaîne s'inspire des travaux de Long *et al.* et de McKinnel *et al.* et attira notre attention en raison de la présence du groupe d'hydroxyle sur la chaîne carbonée ainsi que d'un groupement sulfonamide sur une pipérazine additionnelle.^{227,228} La chaîne **102** a été synthétisée en deux étapes avec la formation préalable du sulfonamide sur la pipérazine en présence de chlorure de méthanesulfonyle et de TEA. Puis, la fonction protectrice Boc a été déprotégée en milieu acide (TFA) suivi d'une étape de fonctionnalisation (S_N2) en milieu basique à l'aide d'épichlorhydrine (Schéma 49).

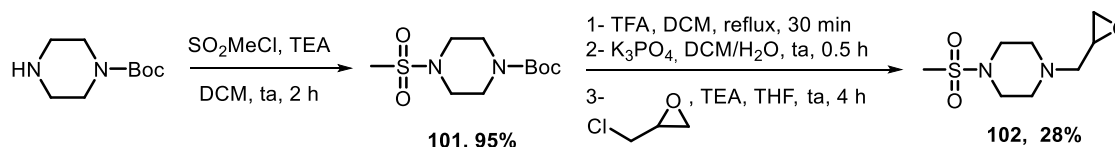


Schéma 49: Voie de synthèse de la chaîne **102**

²²⁷ Long, D. D.; Armstrong, S. R.; Beattie, D.; Choi, S.; *et al.* *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22 (14), 4849–4853.

²²⁸ McKinnell, R. M.; Armstrong, S. R.; Beattie, D. T.; *et al.* *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2013**, 23 (14), 4210–4215.

La chaîne **102** a été utilisée en présence du précurseur **47** nous offrant le composé **103** dans les mêmes conditions que décrites précédemment. Malheureusement, les difficultés de purification du ligand final ont considérablement réduit le rendement (2%) (Schéma 50).

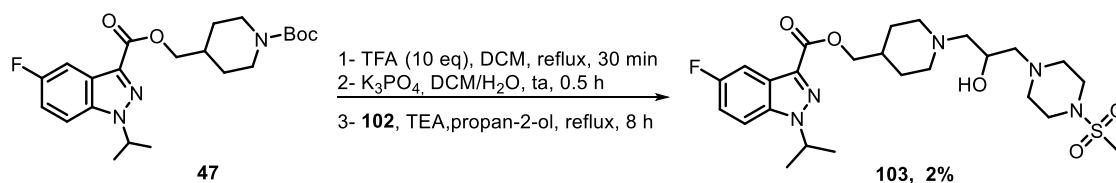


Schéma 50: Formation du composé **103**

La deuxième chaîne nous permet d'accéder à deux composés méthyle benzène-1,2-diol (en série 5-fluoroindazole) s'inspirant de ligands affins des 5-HT₄R développés au sein de notre laboratoire.²²⁹ Les ligands **106** et **107** sont issus d'une étape préalable de formation d'analogues *O*-benzylés (**104** et **105**) qui ont été déprotégés *via* l'utilisation de bromure d'hydrogène (HBr) dans l'acide acétique (Schéma 51). La présence de deux alcools pouvait s'avérer être une option intéressante dans la régulation de la lipophilie, toutefois, nous avons observé une dégradation rapide de ces ligands à température ambiante (phénomènes oxydatifs). C'est pourquoi, nous n'avons pas souhaité étendre nos recherches sur le sujet.

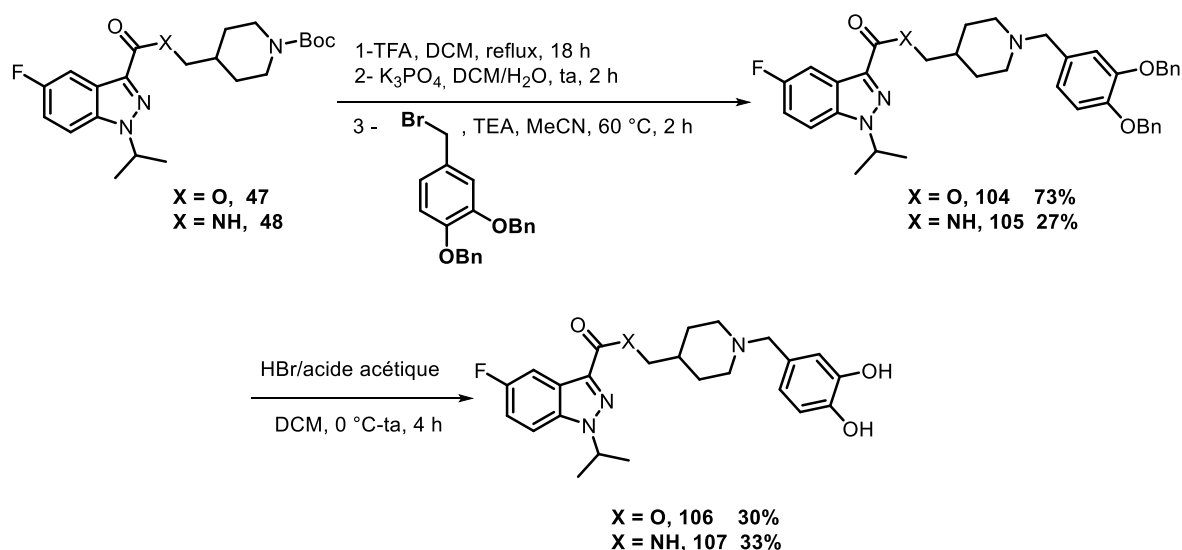
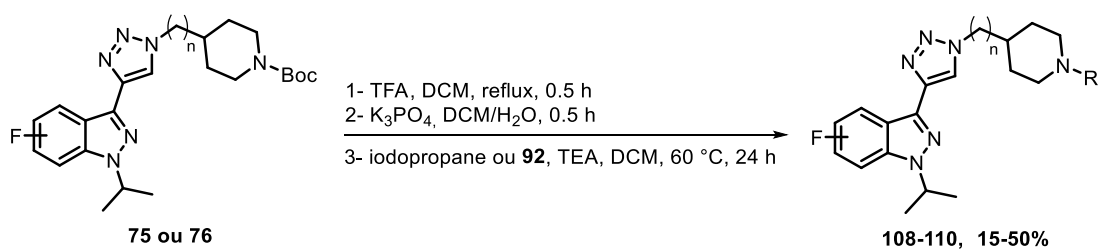


Schéma 51: Voie de synthèse des ligands **106** et **107**

²²⁹ Lanthier, C.; Payan, H.; Liparulo, I.; Hatat, B.; *et al.* *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 111596.

5.5 Synthèse des ligands en série 1,2,3-triazole

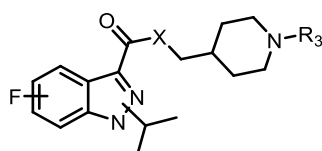
Enfin, les précurseurs en série 1,2,3-triazole ont fait eux aussi l'objet d'une fonctionnalisation de la pipéridine dans les conditions décrites précédemment (Tableau 22).



Entrée	Produit de départ	Composé	Position fluor	n	R	Rendements (%)
1	76	108	5-F	1	C ₃ H ₇	50
2	76	109	5-F	1		20
3	75	110	4-F	0	C ₃ H ₇	15

Tableau 22: Obtentions des ligands **108-110** en série 1,2,3-triazole

En résumé, nous avons synthétisé pendant ma thèse plus d'une vingtaine de nouveaux ligands des 5-HT₄R en série fluoroindazole. Ce large panel de molécules est la résultante des nombreux travaux dirigés au sein de notre laboratoire visant à optimiser le développement de nouveaux ligands affins et sélectifs des 5-HT₄R (Tableau 23 et 24).



Entrée	Composé	Position fluor	R ₂	X	R ₃
1	MR31593	4-F	H	O	
2	MR35807	4-F	1- <i>i</i> Pr	O	
3	MR35814	4-F	1- <i>i</i> Pr	NH	
4	MR35822	4-F	1- <i>i</i> Pr	CH ₂	
5	MR35800	5-F	1- <i>i</i> Pr	O	
6	MR31576	5-F	2- <i>i</i> Pr	O	
7	MR35805	5-F	1- <i>i</i> Pr	NH	
8	MR31594	5-F	1- <i>i</i> Pr	CH ₂	
9	MR35836	6-F	1- <i>i</i> Pr	NH	

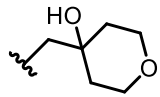
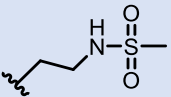
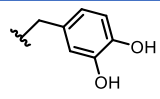
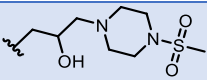
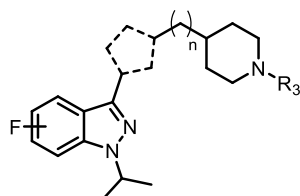
10	MR35816	4-F	1- <i>i</i> Pr	O	
11	MR35815	4-F	1- <i>i</i> Pr	NH	
12	MR35821	4-F	1- <i>i</i> Pr	CH ₂	
13	MR35801	5-F	1- <i>i</i> Pr	O	
14	MR31583	5-F	2- <i>i</i> Pr	O	
15	MR35806	5-F	1- <i>i</i> Pr	NH	
16	MR31595	5-F	1- <i>i</i> Pr	CH ₂	
17	MR35834	6-F	1- <i>i</i> Pr	NH	
18	MR35830	4-F	1- <i>i</i> Pr	O	
19	MR35828	4-F	1- <i>i</i> Pr	NH	
20	MR35832	4-F	1- <i>i</i> Pr	CH ₂	
21	MR35804	5-F	1- <i>i</i> Pr	O	
22	MR35827	5-F	1- <i>i</i> Pr	NH	
23	MR35833	5-F	1- <i>i</i> Pr	CH ₂	
24	MR35835	6-F	1- <i>i</i> Pr	NH	
25	MR35817	5-F	1- <i>i</i> Pr	O	
26	MR35818	5-F	1- <i>i</i> Pr	NH	
27	MR35804	5-F	1- <i>i</i> Pr	O	

Tableau 23: Nouveaux ligands des 5-HT₄R en série fluorindazole





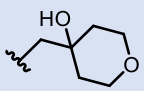
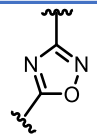

Entrée	Identification	Position fluor		n	R ₃
28	MR35811	5-F		1	
29	MR35810	5-F			
30	MR35812	4-F		0	
31	MR35813	5-F			

Tableau 24: Ligands fluorés synthésisés en série triazole et oxadiazole

Ces ligands ont fait l'objet de tests *in vitro* visant à déterminer l'affinité (K_i) pour les 5-HT₄R. Ces tests ont été effectués dans notre laboratoire au sein de la plateforme screening et drugabilité. Les résultats collectés nous permettront de déterminer les Relations Structures-Activités (RSA) et de sélectionner les molécules les plus intéressantes pour un éventuel radiomarquage au fluor-18.

6. Evaluation biologique des ligands, RSA et détermination des leads

6.1 Description du test de compétition *in vitro*

L'évaluation biologique de nos nouveaux ligands froids constitue le socle de nos travaux de recherche puisque notre objectif final est d'obtenir un radioligand affiné et spécifique des 5-HT₄R. Notre démarche était de former un grand panel de molécules afin de déterminer, pour chacune d'entre elles, les propriétés indispensables à leur sélection comme radiotraceur. Notre laboratoire possède une expertise intéressante dans la détermination des affinités pour les 5-HT₄R puisque les tests *in vitro* sont réalisés directement au sein de notre structure. Il s'agit d'un test de compétition qui a été décrit initialement par Grossman *et al.* et qui utilise l'antagoniste de référence tritié : le [³H]GR113808.²³⁰

Dans un premier tube, les membranes portant les récepteurs 5-HT_{4B}R humain sont incubées avec une concentration de [³H]GR113808 permettant d'occuper la totalité des sites de fixation du ligand (Concentration donnée par le fournisseur). La radioactivité émise après rinçage et filtration correspond à la fixation totale (F_{tot}) du radioligand. Cette F_{tot} ne permet pas de distinguer la fixation spécifique (F_{spé}) et non spécifique (F_{nspé}). Un deuxième tube contient le [³H]GR113808, les membranes portant le 5-HT_{4B}R et un excès de sérotonine (5-HT) exerçant des phénomènes de compétitions sur le site de fixation du ligand et permettant de déterminer, après rinçage et filtration, la fixation non spécifique par détection de la radioactivité restante. Ainsi, l'émission radioactive correspondant à la fixation spécifique pourra être calculée en soustrayant la radioactivité de la fixation non spécifique à la fixation totale. Enfin, les tubes suivants possèdent la même concentration de [³H]GR113808 et de membrane mais varient par la concentration de ligand froid ajouté (10⁻⁶ et 10⁻⁸M). Le pourcentage d'inhibition (%inh (10⁻⁶/10⁻⁸M)) est déterminé en faisant le rapport des radioactivités collectées aux différentes concentrations avec celle de la fixation spécifique calculée précédemment (Figure 51).

²³⁰ Grossman, C. J.; Kilpatrick, G. J.; Bunce, K. T. *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *109* (3), 618–624.

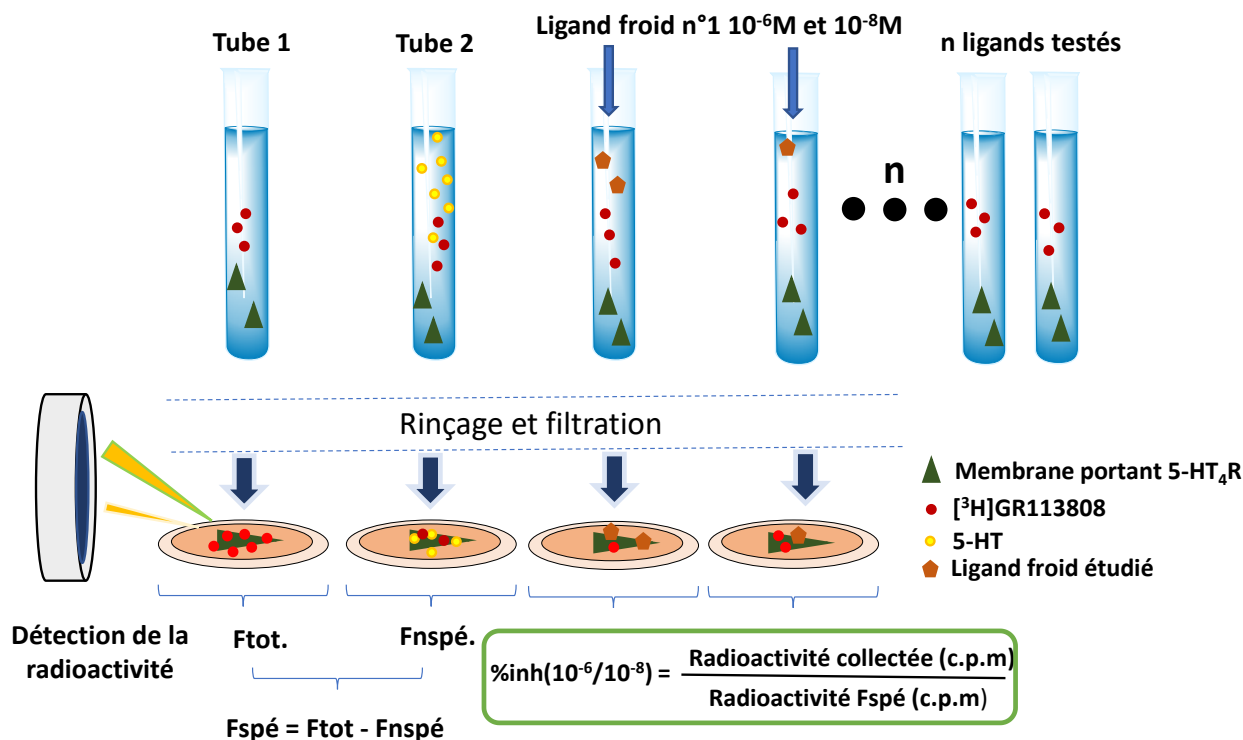
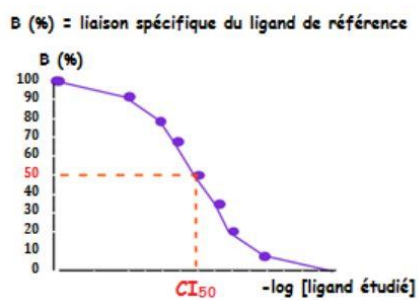


Figure 51: Protocole de détermination des % d'inhibition

Le K_i est calculé uniquement pour les molécules présentant les meilleurs $\%inh.(10^{-6}/10^{-8})$ en raison du fort coût induit par la mise en œuvre de cette technique. La même méthode est appliquée mais avec une gamme de concentration plus importante (10^{-5} à 10^{-10} M) avec pour objectif de disposer d'une gamme d'étalonnage allant de 0% à 100% d'inhibition. Ainsi, la concentration de ligand inhibant 50% de la radioactivité ($IC_{50\%}$) pourra être calculée et offrira une valeur de K_i selon l'équation de Cheng et Prusoff (Figure 52).



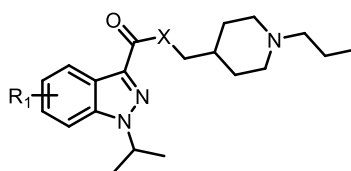
$$K_i = \frac{IC_{50\%}}{1 + \frac{[L^*]}{K_d}} \text{ avec } pK_i = -\log K_i$$

K_i : Constante d'affinité du ligand froid étudié
 K_d : Constant de dissociation (donnée par le fournisseur de la membrane)
 $[L^*]$: concentration du ligand radiomarqué

Figure 52: Détermination de l' $IC_{50\%}$ et du K_i

6.2 Relations structure-activité des ligands froids étudiés

Dans un premier temps, nous avons déterminé l'intérêt de substituer l'iode présent sur le cycle indazole par un fluor. Puis, nous avons vérifié si le positionnement du fluor avait une influence sur l'affinité vis-à-vis des 5-HT₄R. Nous avons étudié ces ligands en présence d'une chaîne latérale fixe en raison de différences notables entre ces séries. En présence d'une chaîne propyle, nous observons que la substitution d'un iode en position 5 du cycle indazole, par un fluor, permet d'augmenter significativement l'affinité des esters (entrées **1** et **2**) et des amides (entrées **3** et **4**). Ces affinités de l'ordre du nanomolaire, nous conforte dans le choix qui avait été préalablement établi de synthétiser les séries fluorindazoles. Parmi les séries fluorées, la série 4-fluoroindazole est celle qui présente les meilleurs résultats pour les composés amides (entrées **4** et **6**) et cétones (entrées **5** et **7**). En revanche, nous n'avons pas observé de différence significative entre les composés esters en série 4 et 5-fluoroindazole (entrées **2** et **5**). Le MR35836 (entrée **8**) nous a permis d'apprécier le potentiel de la série 6-fluoroindazole révélant une affinité bien moindre que les analogues fluorés en position 4 et 5 (entrées **4**, **6** et **8**). C'est pourquoi, nous n'avons pas développé cette série et avons décidé de limiter la synthèse de ces composés aux amides. De façon générale, la série 4-fluoroindazole présente les meilleures affinités pour les 5-HT₄R. Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus précédemment en série iodoindazole. La série 5-fluoroindazole reste une série intéressante puisque les affinités pour les esters et les amides sont de l'ordre du nanomolaire (Tableau 25).

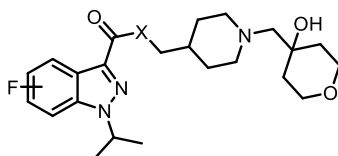


Entrées	Identifiants	R ₁	X	% inh. (10 ⁻⁶ /10 ⁻⁸ M)	Ki (5-HT ₄ R) ^a (nM)
1	MR31707	5-I	O	100/22	16,5
2	MR35800	5-F	O	100/97	4,2 ± 1,3
3	MR33001	5-I	NH	95/3	152
4	MR35805	5-F	NH	100/50	13,5 ± 0,7
5	MR31594	5-F	CH ₂	100/58	32,6 ± 7,2
5	MR35807	4-F	O	100/100	1,8 ± 0,3
6	MR35814	4-F	NH	100/84	2,6 ± 0,4
7	MR35822	4-F	CH ₂	100/99	4,5 ± 0,4
8	MR35836	6-F	NH	75/12	207 ± 43

^a 3 mesures effectuées

Tableau 25: Influence du fluor sur l'affinité des composés N-propylés vis-à-vis des 5-HT₄R

En présence d'une chaîne oxane, la différence d'affinité entre les séries 4 et 5-fluoroindazoles n'est pas significative excepté pour les cétones (entrées 6 et 7) (Tableau 26). La plupart des composés synthétisés dans cette série possèdent d'excellentes affinités (ordre du nanomolaire) comparables à celles obtenus en présence d'une chaîne propyle.

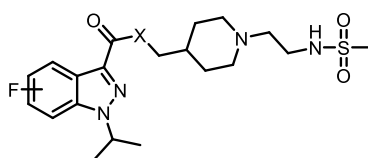


Entrées	Identifiants	F	X	% inh. ($10^{-6}/10^{-8}$ M)	Ki (5-HT ₄ R) ^a (nM)
1	MR35801	5-F	O	100/97	5,5 ± 2,4
2	MR35816	4-F	O	100/96	2,7 ± 0,1
3	MR35806	5-F	NH	100/84	5,9 ± 2,6
4	MR35815	4-F	NH	100/92	1,1 ± 0,1
5	MR35834	6-F	NH	82/30	59,4 ± 1,9
6	MR31595	5-F	CH ₂	100/80	32,4 ± 12,5
7	MR35821	4-F	CH ₂	100/97	5,0 ± 1,0

^a3 mesures effectuées

Tableau 26: Influence du fluor pour les composés indazoliques portant une chaîne oxane

Enfin, nous avons comparé l'influence du fluor sur l'affinité vis-à-vis des 5-HT₄R pour les ligands portant une chaîne sulfonamide. Nous n'avons pas observé de différence significative entre les composés esters (entrées 1 et 2). A contrario, l'amide en série 4-fluoroindazole présente une affinité significativement supérieure vis-à-vis des 5-HT₄R (entrées 3 et 4) (Tableau 27).

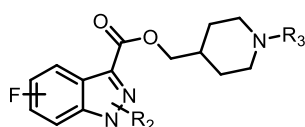


Entrées	Identifiants	F	X	% inh. ($10^{-6}/10^{-8}$ M)	Ki (5-HT ₄ R) ^a (nM)
1	MR35804	5-F	O	100/88	4,6 ± 0,9
2	MR35830	4-F	O	100/86	2,7 ± 0,3
3	MR35827	5-F	NH	100/29	19,5 ± 3,7
4	MR35828	4-F	NH	100/68	4,2 ± 0,8
5	MR35835	6-F	NH	89/12	115 ± 25
6	MR35833	5-F	CH ₂	96/60	En cours
7	MR35832	4-F	CH ₂	82/60	En cours

^a3 mesures effectuées

Tableau 27: Affinités vis-à-vis des 5-HT₄R des ligands fluorindazoles portant une chaîne éthyle sulfonamide

Ensuite, nous avons décidé de comparer l'influence des *N*-alkylations sur le cycle indazole. En série 4-fluoroindazole, nous n'avons pas observé de diminution du K_i en présence du groupement isopropyle (entrées **1** et **2**, Tableau 28). En série 5-fluoroindazole, l'augmentation d'affinité entre l'indazole sans substituant et l'analogue *N*-propylé n'est pas significative (entrées **3** et **4**). Toutefois, la présence d'un *N*-propyle en position 2 du cycle indazole fait chuter radicalement le K_i quelle que soit la chaîne latérale proposée (entrées **4** et **5** / **6** et **7**).



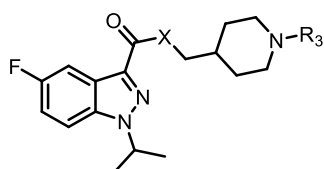
Entrées	Identifiants	F	R ₂	R ₃	% inh. (10 ⁻⁶ /10 ⁻⁸ M)	K _i (5-HT ₄ R) ^a (nM)
1	MR31593	4-F	H		100/100	0,5 ± 0,1
2	MR35807	4-F	1- <i>i</i> Pr		100/100	1,8 ± 0,3
3	MR31569	5-F	H		100/70	7,2
4	MR35800	5-F	1- <i>i</i> Pr		100/97	4,2 ± 1,3
5	MR31576	5-F	2- <i>i</i> Pr		95/8	nd
6	MR35801	5-F	1- <i>i</i> Pr		100/97	5,5 ± 2,4
7	MR31583	5-F	2- <i>i</i> Pr		98/17	nd

^a 3 mesure effectuées

Tableau 28: Influence des *N*-alkylations sur l'affinité vis-à-vis des 5-HT₄R

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'influence des chaînes latérales sur l'affinité mais aussi sur la lipophilie des composés en série 5-fluoroindazole (Tableau 29). Les trois chaînes proposées à l'origine (propyle, oxane, et sulfonamide) offrent de très bons résultats en termes d'affinité pour les 5-HT₄R. La chaîne oxane a un intérêt double puisqu'en plus de conserver l'affinité en série amide, elle permet de diminuer significativement la lipophilie calculée (clogP) (entrées **1,2/3,4**).

Les autres chaînes proposées ont révélé des affinités et des lipophilies intéressantes, toutefois, en raison des difficultés de synthèse, de purification ou de problèmes de dégradations (phénomènes d'oxydation), nous n'avons pas souhaité continuer leur développement.

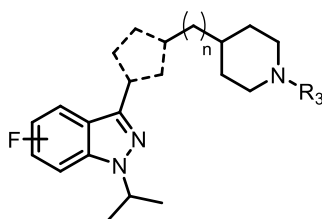



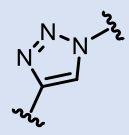
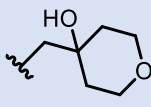
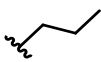
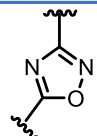
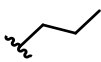
Entrées	Identifiants	X	R ₃	% inh. (10 ⁻⁶ /10 ⁻⁸ M)	Ki (5-HT ₄ R) ^a (nM)	clogP ^b
1	MR35800	O		100/97	4,2 ± 1,3	3,89
2	MR35805	NH		100/50	13,5 ± 0,7	3,16
3	MR35801	O		100/97	5,5 ± 2,4	2,21
4	MR35806	NH		100/84	5,9 ± 2,6	1,48
5	MR35804	O		100/88	4,6 ± 0,9	1,53
6	MR35827	NH		100/29	19,5 ± 3,7	0,8
7	MR35817	O		100/81	21,8 ± 1,6	3,88
8	MR35818	NH		100/80	13,1 ± 2,8	3,17
9	MR35808	O		100/83	19,9 ± 0,7	1,96

^a 3 mesures effectuées ^bValeurs obtenues sur MarvinSketch

Tableau 29: Comparaison des chaînes latérales sur l'affinité et la lipophilie en série 5-fluoroindazole

Enfin, nous avons étudié l'influence des linkers cycliques sur l'affinité vis-à-vis des 5-HT₄R. Malheureusement aucun d'entre eux n'a obtenu des %inh.(10⁻⁶/10⁻⁸M) suffisants pour justifier la réalisation d'un Ki (Tableau 30). Cette diminution très importante de l'affinité est probablement liée à la rigidification de la chaîne pipéridinique ne permettant plus aux composés d'accéder au site de fixation présent dans le 5-HT₄R. Ces résultats sont la raison pour laquelle nous avons décidé de stopper ces séries.



Entrées	Identifiants	Position fluor		n	R ₃	%inh. (10 ⁻⁶ /10 ⁻⁸ M)	Ki (5-HT ₄ R)
1	MR35811	5-F		1		35/6	nd ^a
2	MR35810	5-F				23/5	nd
3	MR35812	4-F				15/6	nd
4	MR35813	5-F		0		35/15	nd

^b non déterminé

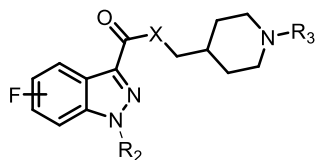
Tableau 30: Affinités des ligands 1,2,3-triazoles et 1,2,4-oxadiazole

En résumé, durant mes 3 années de thèse, nous avons synthétisé vingt-cinq nouveaux ligands affins des 5-HT₄R en série fluoroindazolique. Les affinités collectées sont dans les normes que nous nous étions fixées au début de nos travaux permettant d'envisager la possibilité d'un radiomarquage au fluor-18. Cette étape doit être précédée par une détermination des leads puisqu'il n'est pas envisageable de tester une grande quantité de composés chez l'animal. Cette étape de sélection s'appuie sur le cahier des charges que nous nous étions fixés en début de thèse.

7. Sélections des leads pour un radiomarquage au fluor-18

Le choix de leads est une étape essentielle de notre travail de détermination d'un nouveau radiotraceur efficace. En effet, l'objectif est d'obtenir un maximum d'informations sur les composés synthétisés et d'engager la formation d'un radiotraceur qui présente les meilleures propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques. Une forte affinité pour les 5-HT₄R (Ki < 10nM) conditionne la fixation sur le récepteur et la spécificité permet de limiter le risque d'obtention d'image diffuses non exploitables. La lipophilie constitue un paramètre de choix dans la détermination du passage de la BHE, de la métabolisation et la fixation non spécifique. Comme nous l'avons décrit précédemment, une valeur trop extrême (clogp > 3) de ce paramètre limiterait considérablement le potentiel de notre radiotraceur. Enfin, la synthèse des linkers amides et cétones pourrait diminuer de façon significative la métabolisation du radiotraceur.

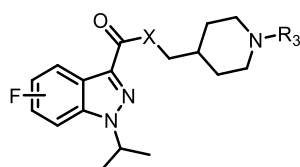
Dans un premier temps, nous avons sélectionné uniquement les composés ayant une affinité inférieure à 10 nM ($K_i(5\text{-HT}_4\text{R}) < 10 \text{ nM}$). Treize ligands se sont distingués en raison de leur très fort potentiel de fixation sur les 5-HT₄R (Tableau 31). Cette sélection constitue un premier filtre qui sera affiné d'étape en étape.



Entrée	Identifiant	F	R ₂	X	R ₃	K _i (5-HT ₄ R) (nM)
1	MR31593	4-F	H	O		0,5 ± 0,1
2	MR35807	4-F	1- <i>i</i> Pr	O		1,8 ± 0,3
3	MR35814	4-F		NH		2,6 ± 0,4
4	MR35822	4-F		CH ₂		4,5 ± 0,4
5	MR35800	5-F		O		4,2 ± 1,3
6	MR35816	4-F		O		2,7 ± 0,1
7	MR35815	4-F	NH	1,1 ± 0,1		
8	MR35821	4-F	CH ₂	5,0 ± 1,0		
9	MR35801	5-F	O		5,5 ± 2,4	
10	MR35806	5-F	NH		5,9 ± 2,6	
11	MR35830	4-F	O		2,7 ± 0,3	
12	MR35828	4-F	NH		4,2 ± 0,8	
13	MR35804	5-F	O		4,6 ± 0,9	

Tableau 31: Ligands affins des 5-HT₄R ($K_i < 10 \text{ nM}$)

Ensuite, nous avons choisi de sélectionner uniquement les ligands présentant une potentielle résistance au métabolisme. C'est pourquoi, l'ensemble des esters sélectionnés précédemment n'ont pas été retenus pour la suite du projet. Après cette sélection, seulement six ligands ont retenu notre attention (Tableau 32).



Entrée	Identifiant	F	X	R ₃	Ki(5-HT ₄ R) (nM)	clogP	CHI logD
1	MR35814	4-F	NH		2,6 ± 0,4	3,16	1,14
2	MR35822	4-F	CH ₂		4,5 ± 0,4	4,28	nd
3	MR35815	4-F	NH		1,1 ± 0,1	1,48	1,14
4	MR35821	4-F	CH ₂		5,0 ± 1,0	2,59	2,13
5	MR35806	5-F	NH		5,9 ± 2,6	1,48	1,53
6	MR35828	4-F	NH		4,2 ± 0,8	0,80	1,28

Tableau 32: Lipophilie et affinité des ligands sélectionnés en deuxième intention

Pour chacun d'entre eux, nous avons calculé la lipophilie (clogP) *via* l'utilisation du logiciel MarvinSketch. Le MR35822 fut dans un premier temps exclu de la sélection en raison d'un clogP trop important (entrée **2**). Pour les 5 restants, nous avons affiné notre exploration en déterminant expérimentalement une valeur approchée du logD : le Chromatography Hydrophobicity Index ou CHI logD. Cette méthode chromatographique (HPLC) a été réalisée au sein de notre laboratoire et utilise un panel de composés pour déterminer mathématiquement une droite de type fonction affine ($ax + b$). Ces composés ont des lipophilies connues permettant de faire la corrélation entre le temps de rétention (Tr) sur la colonne et la lipophilie. Les échantillons à analyser migrent dans un deuxième temps sur cette même colonne offrant un Tr qui sera converti en CHI logD (Figure 53).

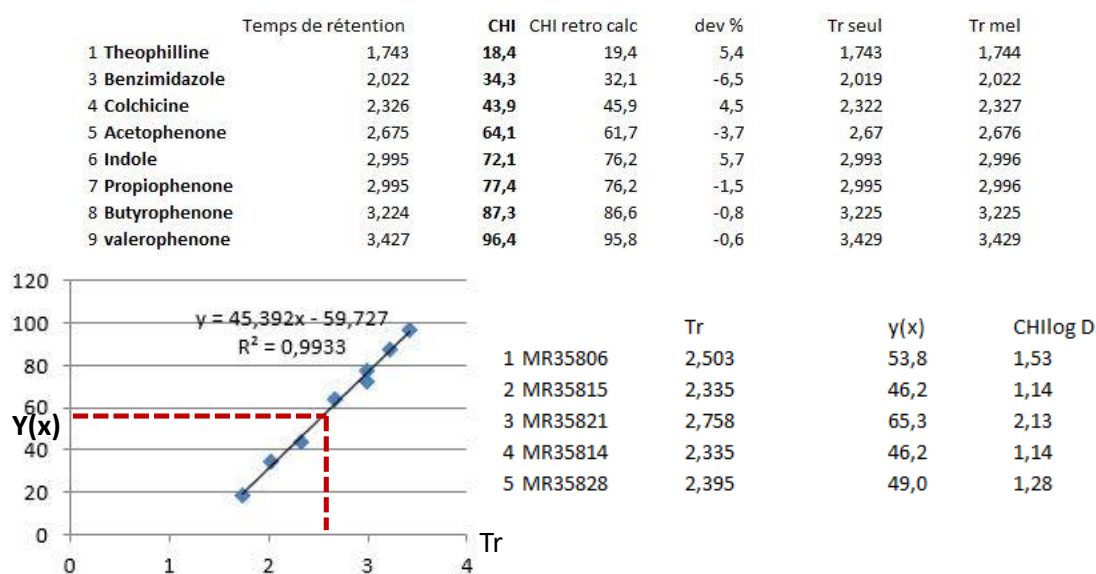


Figure 53: Détermination de la lipophilie par méthode HPLC : CHI logD

Cette méthode est bien plus précise que les évaluations faites par les logiciels et nous a permis de confirmer l'intérêt porté pour les cinq composés étudiés précédemment. Concernant le MR35822 qui (entrée 2) n'avait pas fait l'objet de recherches plus approfondies en raison d'un clogP trop élevé, au vu des différences entre le CHI logD et le clogP du MR35814 (entrée 1), il n'est pas exclu que sa lipophilie soit plus modérée que celle calculée initialement.

Enfin, nous avons décidé de nous appuyer sur un concept empirique utilisé en Drug Design : le Ligand Lipophilicity efficiency (LLE).²³¹ Cet outil présente un intérêt particulier puisqu'il permet de déterminer la drugabilité de composés en utilisant de façon combinée la lipophilie calculée (clogP) et l'affinité (Ki) déterminée par les tests *in vitro*. Le LLE est utilisé couramment pour déterminer un « lead » parmi une série de nouvelles molécules synthétisées.

$$LLE = pKi - clogP \text{ avec } pKi = -\log Ki$$

Les conditions optimales de fixation d'un ligand sur son récepteur sont présentes si ce paramètre a une valeur comprise entre 5 et 7 ou plus.²³²

De plus, nous avons associé le LLE au Property Forecast Index (PFI). Le PFI est un indice qui permet de prévoir statistiquement la solubilité, la métabolisation, la clairance ainsi que le passage membranaire d'un composé.²³³ Il est calculé à l'aide du CHI logD et par le nombre d'aromatiques présents dans le composé étudié. Un PFI est considéré comme optimal pour les valeurs comprises entre 3 et 5 (Tableau 33).

Assay / target value	PFI = mChrom log D _{pH7.4} + #Ar								
	<3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	>10
Solubility >200 μM	89	83	72	58	33	13	5	3	2
%HSA <95%	88	80	74	64	50	30	17	8	4
2C9 pIC ₅₀ <5	97	90	83	68	48	32	23	22	38
2C19 pIC ₅₀ <5	97	95	91	82	67	52	42	42	56
3A4 pIC ₅₀ <5	92	83	80	75	67	60	58	61	66
Cl _{int} <3 ml/min/kg	79	76	68	61	54	42	41	39	52
Papp >200 nm/s	20	30	46	65	74	77	65	50	33

Vert > 67% ; Jaune 34-67% ; Rouge < 33%

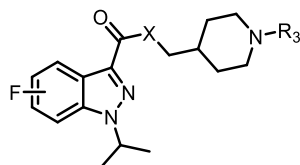
Tableau 33: Statistiques associées aux valeurs de PFI²³³

²³¹ Hopkins, A. L.; Keserü, G.; Leeson, P.; Rees, D.; Reynolds, C. H. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13* (2), 105–121.

²³² Leeson, P. D.; Springthorpe, B. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6* (11), 881–890.

²³³ Young, R. J.; Green, D. V. S.; Luscombe, C. N.; Hill, A. P. *et al. Drug Discov. Today* **2011**, *16* (17–18), 822–830.

Nous avons calculé le LLE et le PFI pour les cinq composés issus de nos sélections préalables (Tableau 34). Toutefois, ces indices ne nous ont pas permis de faire une véritable sélection entre ces composés puisque les valeurs de LLE et de PFI calculées étaient correctes pour chacun d'entre eux.



Entrée	Identifiants	F	X	R ₃	Ki(5-HT ₄ R) (nM)	clogP	CHI logD	LLE	PFI
1	MR35814	4-F	NH		2,6 ± 0,4	3,16	1,14	5,4	3,14
2	MR35815	4-F	NH		1,1 ± 0,1	1,48	1,14	7,47	3,14
3	MR35821	4-F	CH ₂		5,0 ± 1,0	2,59	2,13	5,7	4,13
4	MR35806	5-F	NH		5,9 ± 2,6	1,48	1,53	6,74	3,53
5	MR35828	4-F	NH		4,2 ± 0,8	0,80	1,28	7,5	3,28

Tableau 34: Déterminations des LLE et PFI des ligands sélectionnés

Les valeurs de PFI comprises entre 3 et 4 suggèrent un passage membranaire limité puisque seulement 30% des molécules testées dans la publication de Young *et al.* possèdent une perméabilité apparente (Papp) supérieure à 200 nm/s (Tableau 33).²³⁴ Cependant, le passage de la BHE est un paramètre indispensable pour nos radiotraceurs puisqu'il conditionne la voie d'accès aux 5-HT₄R centraux. C'est dans ce contexte que nous avons décidé de vérifier cette propriété par un test réalisé au sein de notre laboratoire.

Le Pampa-BBB (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay – Blood Brain Barrier) est un test *in vitro* qui détermine la perméabilité et la diffusion d'une substance d'un compartiment donneur vers un compartiment accepteur *via* le passage d'une membrane artificielle lipidique (lipides extraits de cerveau de porc) (Figure 54).²³⁵ Cette méthode prédictive permet uniquement d'évaluer le passage passif de ces substances à travers la BHE et n'évalue en rien les mécanismes d'efflux qui peuvent être à l'origine de leur rejet dans le système périphérique. Elle est adaptée du Pampa standard décrit par

²³⁴ Palumbo, P.; Picchini, U.; Beck, B.; Van Gelder, J.; *et al.* *J. Pharmacokinet. Pharmaco.* **2008**, 35 (2), 235–248.

²³⁵ Mensch, J.; Melis, A.; Mackie, C.; Verreck, G.; *et al.* *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, 74 (3), 495–50

Kansy *et al.* qui est utilisé pour simuler le passage intestinal de médicaments administrés par voie orale.²³⁶

Le Pampa-BBB offre une vision du passage membranaire par le calcul de la perméabilité effective (Pe) qui est déterminée par mesure des variations d'absorbance entre les milieux accepteurs et donneurs.

Si le $\log Pe \geq -5$ ou $Pe \geq 10^{-5}$ cm/s on considère qu'il y a une bonne diffusion et donc une perméabilité élevée. Si le $\log Pe$ est compris entre -5 et -6 ($10^{-6} \leq Pe \leq 10^{-5}$), on considère que la perméabilité est moyenne voire faible si elle est inférieure à -6.

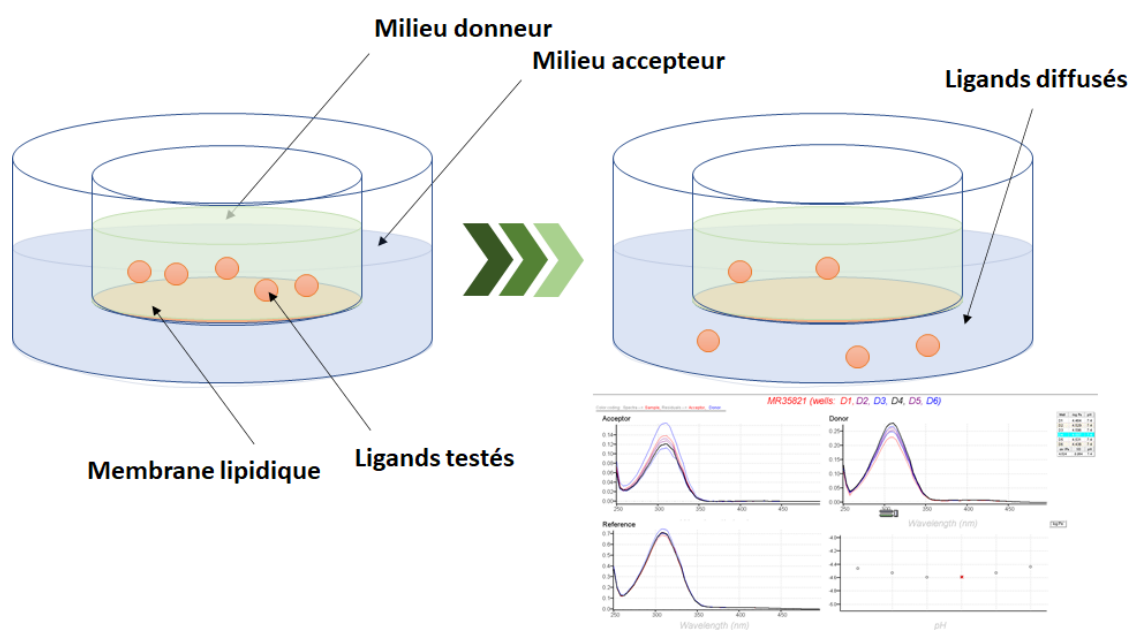
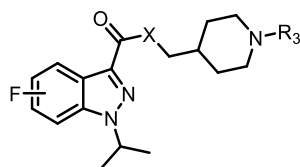


Figure 54: Principe du test in vitro Pampa-BBB

Le test Pampa-BBB a été mis en œuvre sur les MR35806, MR35821 et MR35828 révélant des prédictions prometteuses du passage de la BHE pour nos ligands froids affins pour les 5-HT₄R (entrées **1** et **2**) (Tableau 35). Les résultats sont plus mitigés pour le MR35828 (diffusion moyenne) expliquant son exclusion dans la sélection d'un lead (entrée **3**). Le Pampa-BBB n'a pas été effectué pour le MR35814 puisque nous ne disposions pas à l'époque du CHI logD et nous nous étions fixé sur le clogP pour exclure ce composé. En raison de son homologie de structure avec le MR35806, nous avons supposé que le MR35815 devait probablement posséder une diffusion similaire.

²³⁶ Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (7), 1007–1010.



Entrées	Identifiants	F	X	R ₃	Ki(5-HT ₄ R) (nM)	CHI logD	Log Pe	Diffusion
1	MR35821	4-F	CH ₂		5,0 ± 1,0	2,13	-4,52	bonne
2	MR35806	5-F	NH		5,9 ± 2,6	1,53	-4,49	bonne
3	MR35828	4-F	NH		4,2 ± 0,8	1,28	-5,35	moyenne

Tableau 35: Résultats du test Pampa-BBB sur 3 ligands froids affins des 5-HT₄R

Ainsi, parmi l'ensemble des ligands froids synthétisés pendant mes travaux de thèse, trois composés se sont distingués pour leurs propriétés pharmacologiques et chimiques optimales : le **MR35806**, le **MR35815** et le **MR35821** (Figure 55).

Nous avons initialement sélectionné le **MR35806** en raison d'une plus grande facilité d'accès de ce composé comparativement à ses deux homologues en série 4-fluoroindazole.

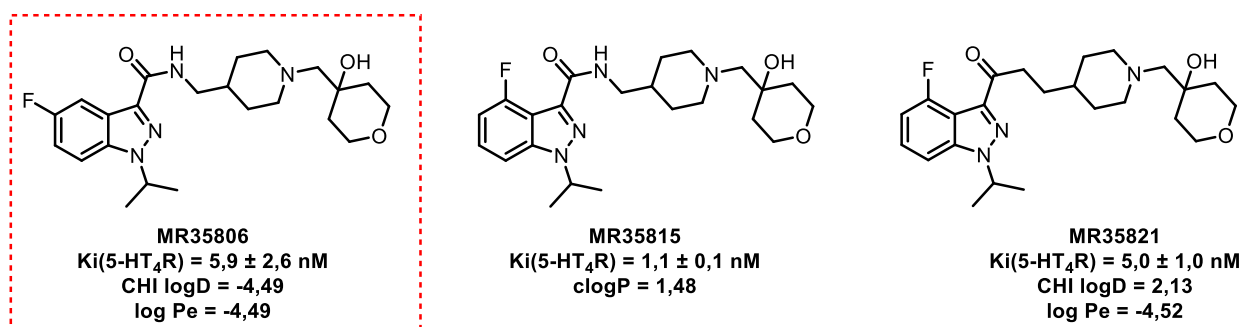


Figure 55: Leads sélectionnés pour un radiomarquage au fluor-18

Le MR35806 fera l'objet d'un radiomarquage au fluor-18 afin d'obtenir le radioligand [¹⁸F]MR35806. Ce radiomarquage fera l'objet d'une deuxième voie de synthèse afin d'obtenir le précurseur indispensable à l'obtention de notre radiotraceur.

8. Voie d'obtention du radiotracer fluoré [¹⁸F]MR3806

8.1 Méthodes de fluoration au fluor-18 décrites dans la littérature

Le fluor-18 est employé couramment en imagerie médicale en raison de sa $t_{1/2}$ (110 min.) assez longue comparativement aux autres atomes utilisés en imagerie TEP (¹³N, ¹¹C, ¹⁵O). De plus, les positrons émis par cet atome possèdent une énergie maximale relativement basse (0,63 MeV) se traduisant par un parcours dans les tissus modéré qui permet d'acquérir une imagerie de bonne résolution. De nombreux articles décrivent de façon précise l'obtention des radiotraceurs portant le fluor-18 mettant en perspective l'exploration de diverses méthodes.

La première étape est primordiale puisqu'elle consiste à former des sources de fluor-18 qui serviront à marquer les précurseurs préparés antérieurement. Il existe deux sources de fluor-18 : le difluor [¹⁸F]F₂ et les ions fluorures [¹⁸F]F⁻.

8.1.1 Synthèses des sources radioactives

Le [¹⁸F]F₂ peut être obtenu par deux méthodes différentes.^{237,238} La première utilise du néon-20 gazeux qui est bombardé avec des noyaux de deutérium (Schéma 52). Cette méthode de transmutation nucléaire utilise une source de F₂ et permet de récupérer environ 75% de l'activité radioactive produite. Toutefois, l'introduction de fluor gazeux (fluor-19) dans le milieu engendre une diminution importante de l'activité spécifique.

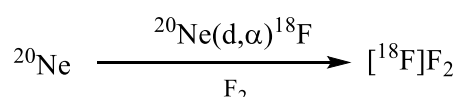


Schéma 52: Formation de fluor électrophile à partir de néon-20

D'autre part, ce fluor-18 électrophile peut être issu d'une méthode semblable utilisant de l'oxygène-18 gazeux qui est bombardé de protons (Schéma 53). Cette réaction présente le même inconvénient que la méthode précédente puisque l'introduction de fluor-19 gazeux pour entraîner le fluor-18 formé conduit à une dilution isotopique du produit.

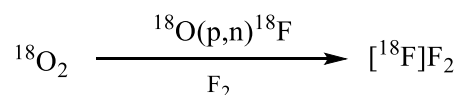


Schéma 53: Formation de fluor électrophile à partir d'oxygène-18

²³⁷ Nickles, R. J.; Gatley, S. J.; Votaw, J. R.; Kornguth, M. L. *Appl. Radiat. Isot.* **1986**, 37 (8), 649–661.

²³⁸ Casella, V.; Wolf, A. P.; Fowler, J. S.; MacGregor, R. R.; Ruth, T. J. *J. Nucl. Med.* **1980**, 2, 750–757.

Plus récemment, d'autres méthodes ont été explorées ayant pour objectif de limiter l'utilisation du fluor-19 gazeux. Ce procédé fait intervenir du fluorométhane $[^{18}\text{F}]\text{CH}_3\text{F}$ qui est soumis à une décharge électrique dans une enceinte remplie de néon (Schéma 54).²³⁹

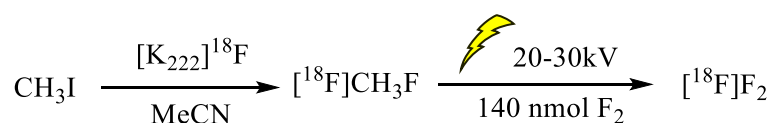


Schéma 54: Méthode d'obtention d'un fluor-18 électrophile via l'utilisation d'un courant électrique

Ce $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ pourra être utilisé dans un deuxième temps pour former d'autres dérivés comme le $[^{18}\text{F}]\text{AcOF}$ ou le $[^{18}\text{F}]\text{NFSI}$ plus réactifs ou permettant de cibler plus spécifiquement les zones d'insertion du fluor (Schéma 55).^{240,241}

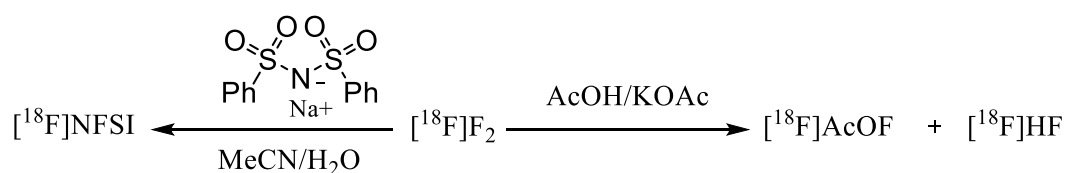


Schéma 55: Synthèse du $[^{18}\text{F}]\text{AcOF}$ et du $[^{18}\text{F}]\text{NFSI}$

La fluor-18 nucléophile est quant à lui issu de l'enrichissement d'un atome ^{18}O via l'utilisation de protons. Cette réaction permet de former des ions fluorures $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ aqueux peu réactifs qui seront activés sous la forme de $[^{18}\text{F}]\text{KF K}_{222}$ ou de $[^{18}\text{F}]\text{R}_4\text{NF}$. Cette méthode utilise l'azacryptand kryptofix-222 (K_{222}) pour complexer le K^+ et augmenter le caractère nucléophile du fluor (Schéma 56).²⁴²

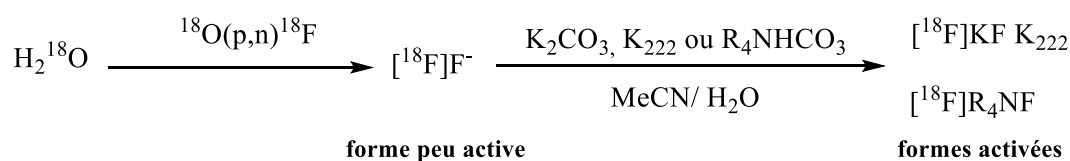


Schéma 56: Formation d'un fluor-18 nucléophile

8.1.2 Radiochimie de ligands décrits dans la littérature

La deuxième étape consiste à présenter aux sources de fluor-18 formées extemporanément, un ligand adapté qui possède une structure compatible pour leur fixation. Dans le cas d'une fluoration

²³⁹ Coenen, H. H. *PET chemistry* **2007**, 62, 15–50.

²⁴⁰ Teare, H.; Robins, E. G.; Årstad, E.; Luthra, S. K.; Gouverneur, V. *Chem. Commun.* **2007**, No. 23, 2330–2332.

²⁴¹ Gu, Y.; Huang, D.; Liu, Z.; Huang, J.; Zeng, W. *Med. Chem.* **2011**, 7 (5), 334–344.

²⁴² Miller, P. W.; Long, N. J.; Vilar, R.; Gee, A. D. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, 47 (47), 8998–9033.

électrophile, le ligand doit posséder un groupement nucléophile alors que dans le cas d'un fluor nucléophile on proposera de bons Groupes Partants (GP) pour favoriser sa fixation.

Il n'existe pas qu'une seule méthode d'obtention d'un radiotracer. En effet, en fonction du précurseur proposé, il est possible d'orienter la voie de synthèse permettant d'apprécier des rendements radiochimiques (RCY) qui peuvent être très variables. La [¹⁸F]fluoro-L-DOPA et le [¹⁸F]FDG peuvent être produits *via* l'utilisation d'un fluor-18 électrophile. Le choix de la source radioactive peut provoquer des variations importantes notamment dans la stéréochimie du produit final. Ainsi, le [¹⁸F]FDG est produit majoritairement en présence de [¹⁸F]F₂ et de [¹⁸F]AcOF, toutefois, le ratio de formation [¹⁸F]FDG/[¹⁸F]FDM est très favorable à l'utilisation du [¹⁸F]AcOF (Schéma 57). Dans ce cas précis, le fluor est ajouté par Addition Electrophile sur l'alcène présent sur le précurseur du [¹⁸F]FDG avec des RCY modérés compris entre 10 et 20%.²⁴¹

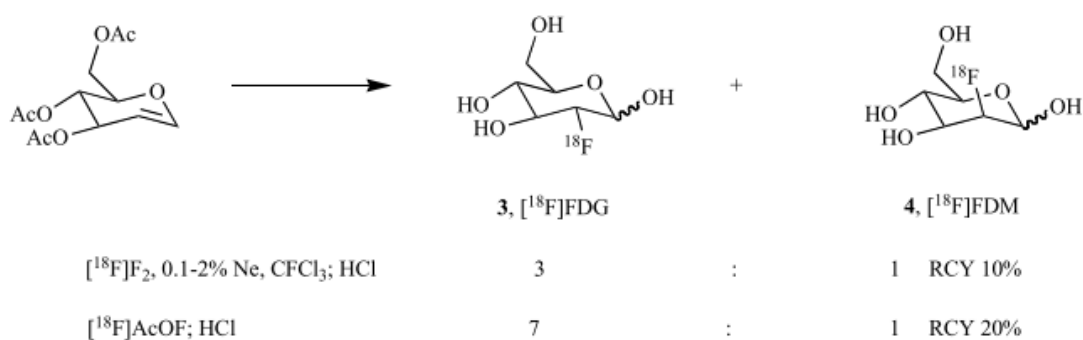


Schéma 57: Variations stéréochimiques selon la source de fluor-18 utilisée

La [¹⁸F]fluoro-L-DOPA peut être elle aussi formée en présence d'un fluor-18 électrophile. La voie de synthèse débute par une Substitution Electrophile Aromatique (SEAr) par déplacement du substituant métallique stannylé suivi d'une déprotection (Boc) de l'amine et des alcools *via* l'utilisation d'une solution d'acide bromique (HBr) (Schéma 58).²⁴³

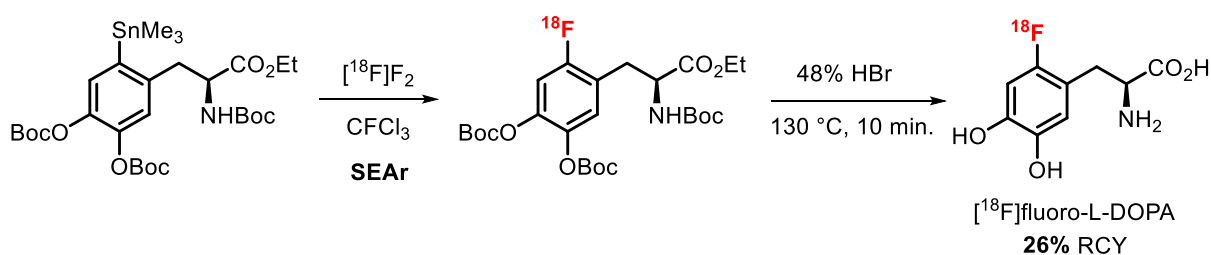


Schéma 58: Voie de synthèse du [¹⁸F]fluoro-L-DOPA

²⁴³ Dolle, F.; Demphel, S.; Hinnen, F.; Fournier, D.; *et al.* *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1998**, *41* (2), 105–114.

L'utilisation d'un fluor-18 nucléophile nécessite la formation préalable de précurseurs portant de bons GP. Ces GP sont de natures variables et pourront être utilisés à la fois pour effectuer des Substitutions Nucléophiles (S_N) sur des chaînes aliphatiques et sur des cycles aromatiques (S_{NAr}).

Sur les chaînes aliphatiques, l'insertion d'un fluor-18 ne peut être effectuée qu'en présence d'un bon GP qui peut être un halogène (I, Br) ou un alcool activé comme un mésylate (OMs), un tosylate (OTs) ou d'un triflate (OTf). Cette méthode fut utilisée à de nombreuses reprises pour former des radiotraceurs d'intérêt comme le [^{18}F]FDG ou le [^{18}F]FPCIT (Schéma 59).^{244,245}

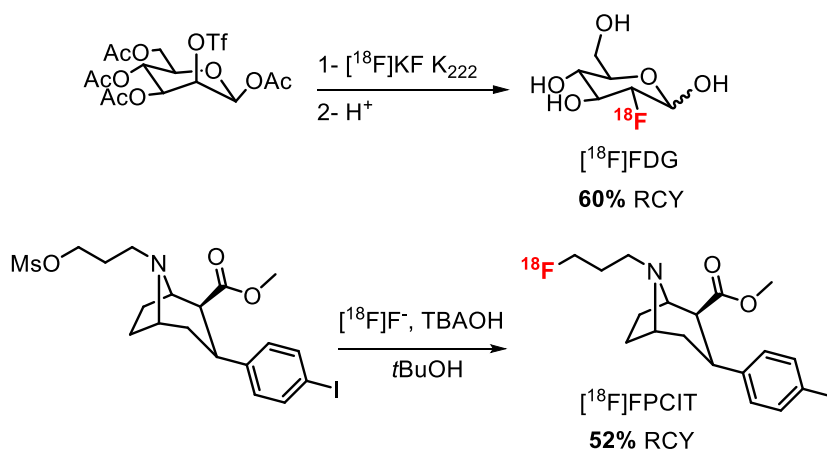


Schéma 59: Synthèse du [^{18}F]FDG et du [^{18}F]FPCIT via une S_N aliphatique

Sur un noyau aromatique, la méthode est comparable mais se distingue par l'utilisation de GP différents. En effet, les processus de S_{NAr} sont favorisés par des groupements variés comme des nitro (NO_2), des halogènes (Br, Cl, F), des ions diazoniums, des ammoniums ou des triazènes. De plus, les fonctions chimiques additionnelles appauvrissant le cycle aromatique (fluor, nitro) favorisent ces réactions en augmentant l'électrophilie du carbone portant le GP. De ce fait, un même radioligand peut être obtenu par différentes voies de synthèse. Le [^{18}F]flumazenyl ou [^{18}F]FMZ utilisé pour la détection des récepteurs centraux aux benzodiazépines en est un exemple.

Le flumazenyl marqué au fluor-18 ([^{18}F]FMZ) peut être obtenu par plusieurs réactions de type S_{NAr} variant par la nature du groupement substitué. Vulina *et al.* décrit l'obtention de ce radiotraceur à l'aide du nitromazenil avec un RCY très modéré (6%) (Schéma 60).²⁴⁶

²⁴⁴ Hamacher, K.; Coenen, H. H.; Stoecklin, G. J. *Nucl. Med.* **1986**, No. 2, 235–238.

²⁴⁵ Lee, S. J.; Oh, S. J.; Chi, D. Y.; Kang, S. H.; Kil, H. S.; Kim, J. S. *Nucl. Med. Biol.* **2007**, *34* (4), 345–351.

²⁴⁶ Vulina, D.; Nasirzadeh, M.; Gomzina, N. *Appl. Radiat. Isot.* **2018**, *135*, 110–114.

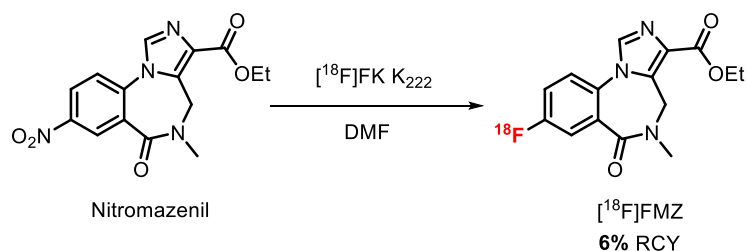


Schéma 60: Obtention du [¹⁸F]FMZ par S_NAr

D'autre part, Windhorst *et al.* ont orienté la synthèse de ce même radioligand par une méthode de substitution directe d'un fluor-19 par un fluo-18 ([¹⁸F]FK K₂₂₂) avec un RCY bien plus important (44%) (Schéma 61).²⁴⁷

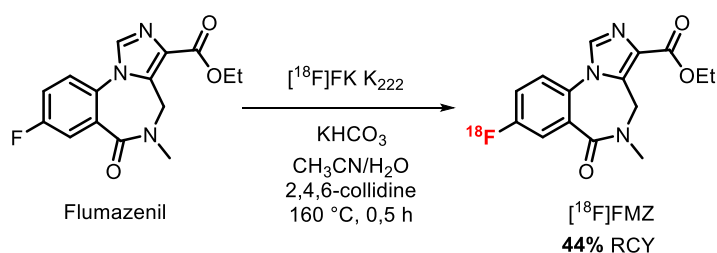


Schéma 61: Formation du [¹⁸F]FMZ par substitution directe d'un fluor

Enfin, on note qu'une troisième méthode a été employée pour former le [¹⁸F]FMZ. Elle requiert la formation d'un sel d'iodonium par substitution d'un précurseur stannylé formé préalablement (Schéma 62). L'iode ne constitue par un bon GP comparativement au fluor et au brome, c'est pourquoi, la formation d'un iode hypervalent permet de considérablement modifier sa réactivité facilitant notamment les réactions de S_NAr. Les groupements aromatiques (Ar) proposés sont de natures variables et peuvent influencer considérablement le RCY allant de 1,4 à 74%.²⁴⁸

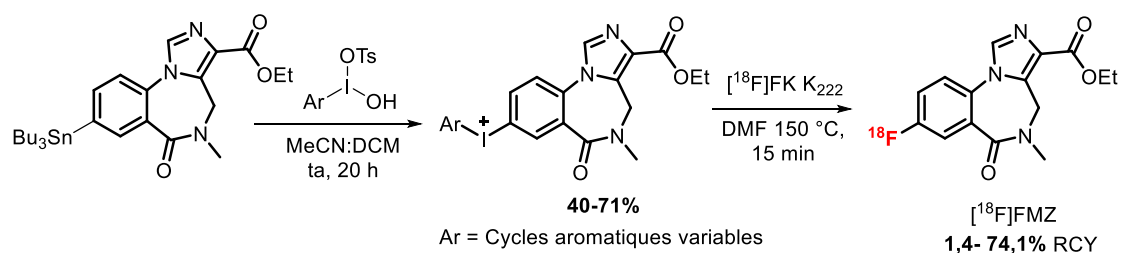


Schéma 62: Obtention du [¹⁸F]FMZ via un intermédiaire iodonium

Il existe bien d'autres méthodes d'insertion d'un fluor sur un noyau aromatique qui ne seront pas décrites dans ce manuscrit. Nous avons choisi de concentrer notre attention sur une méthode récente

²⁴⁷ Windhorst, A. D.; Klok, R. P.; Koolen, C. L.; Visser, G. J. *Label. Compd. Radiopharm.* **2001**, *44* (S1), S930–S932.

²⁴⁸ Moon, B. S.; Kil, H. S.; Park, J. H.; Kim, J. S.; *et al.* *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (24), 8346–8355.

développée par l'équipe de Gouverneur utilisant un catalyseur au cuivre $[\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4]$ et des précurseurs boroniques aromatiques (Schéma 63).²⁴⁹

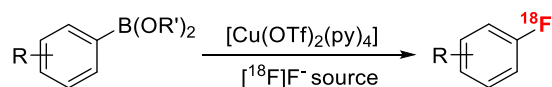


Schéma 63: Méthode générale d'obtention de fluoration des arènes par Gouverneur et al.

Cette technique décrite en 2014 présente de nombreux avantages :

- RCY importants sur les cycles aromatiques
- Précurseurs boroniques moins toxiques que les précurseurs stannylés
- L'utilisation de cuivre est plus sûre que le palladium ou le nickel
- Réaction compatible à l'air et l'oxygène

Cette méthode fut utilisée pour synthétiser la $[\text{18F}]$ fluoro-L-DOPA et le $[\text{18F}]$ FMZ partir de précurseurs portant un ester pinacolique du bore (Schéma 64).²⁵⁰

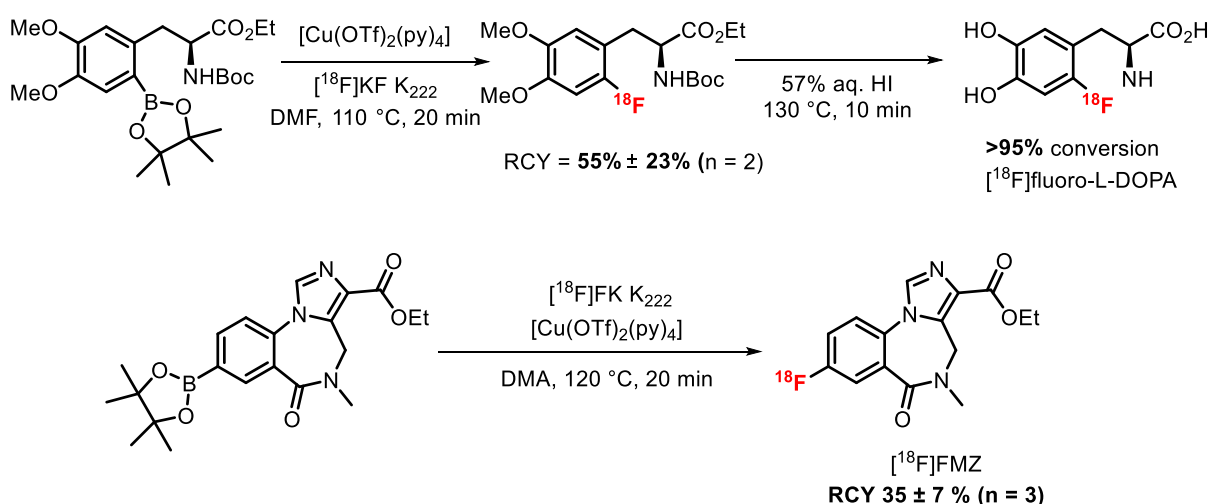


Schéma 64: Obtention de la $[\text{18F}]$ fluoro-L-DOPA et du $[\text{18F}]$ FMZ par Gouverneur et al.

De plus, elle fut appliquée sur de nombreux composés aryles portant un ester boronique mais aussi sur des hétérocycles azotés comme l'indole. Les rendements obtenus ont permis de valider cette technique offrant de nouvelles perspectives notamment pour la fluoration du cycle indazole.

8.2 Synthèse des précurseurs pour un radiomarquage en vue de l'obtention du $[\text{18F}]$ MR35806

La dernière étape de notre travail consista à synthétiser le précurseur nécessaire à l'obtention du MR35816 radiomarqué au fluor-18 : le $[\text{18F}]$ MR35806. En accord avec nos partenaires du CEA de Paris

²⁴⁹ Tredwell, M.; Preshlock, S. M.; Taylor, N.; Gruber, S.; et al. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, 53 (30), 7751–7755.

²⁵⁰ Preshlock, S.; Calderwood, S.; Verhoog, S.; Tredwell, M.; et al. *Chem. Commun.* **2016**, 52 (54), 8361–8364.

Orsay, nous avons sélectionné la méthode de Gouverneur *et al.* décrite précédemment. C'est pourquoi, nous nous sommes orientés vers la formation d'un précurseur boronique **116** (précurseur Bpin) sollicitant la mise au point d'une nouvelle voie de synthèse en série 5-bromodindazole décrite préalablement par Crestey *et al.* (Schéma 65).²⁵¹

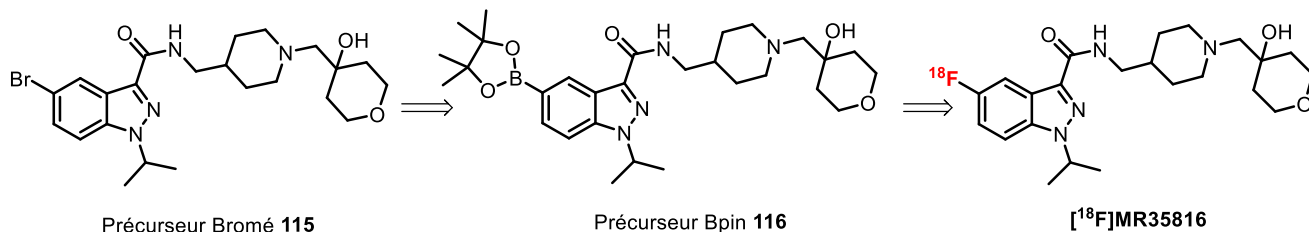


Schéma 65: Intermédiaires nécessaires pour l'obtention du [¹⁸F]MR35816

Ainsi, nous avons réappliqué la même voie de synthèse que celle qui avait été développée en série fluorée (Schéma 66). Une étape supplémentaire de formation du précurseur Bpin **116**, à partir du précurseur bromé **115**, a été ajoutée. Celui-ci a été isolé avec un rendement modéré de 16% en raison de difficultés de purification et sera prochainement optimisé.

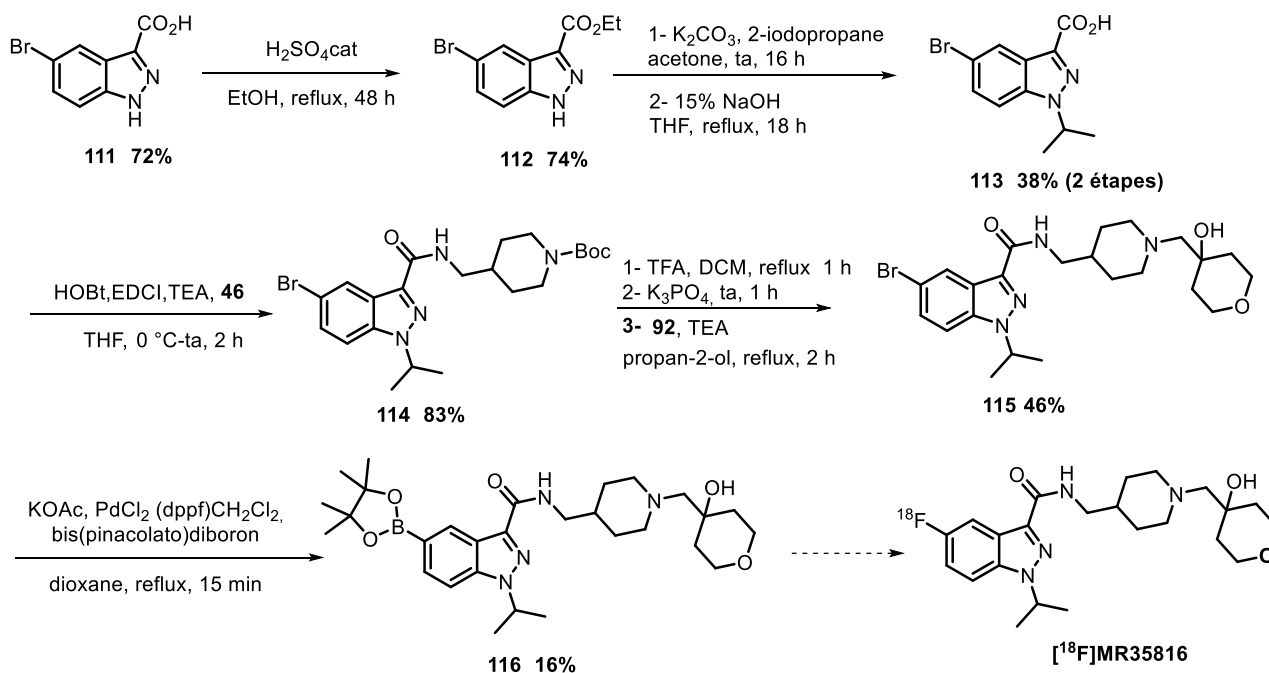
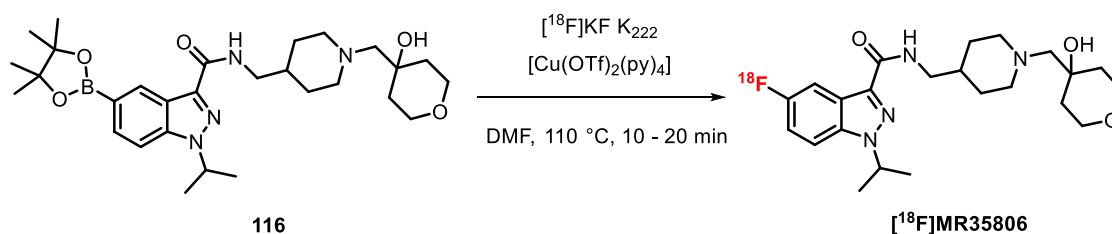


Schéma 66: Voie de synthèse du précurseur Bpin **116**

Le précurseur **116** a été envoyé à nos collaborateurs du CEA de Paris Orsay avec pour objectif d'appliquer la méthode de fluoration développée par Gouverneur *et al.*. L'équipe dirigée par le Dr. Kuhnast réalisa plusieurs essais de radiomarquage. Dans un premier temps, le précurseur **116** a fait

²⁵¹ Crestey, F.; Lohou, E.; Stiebing, S.; Collot, V.; Rault, S. *Synlett* **2009**, 4, 615–619.

l'objet d'essais en présence d'une concentration croissante de catalyseur cuivré (1, 2 et 5 equiv.) et de source de fluor ($[^{18}\text{F}]\text{KF K}_{222}$ dans du DMF : 200 et 300 μl) dans un volume fixe de DMF (100 μl) à 110°C. Malheureusement, la formation de $[^{18}\text{F}]\text{MR35806}$ n'a pas été observée par HPLC (Tableau 36).



Entrées	Précurseur 116	$[\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4]$	$[^{18}\text{F}]\text{KF K}_{222}$	RCY
1	4 mmol	1 équiv.	200 μl	ND ^a
2		2 équiv.	300 μl	ND ^a
3		5 équiv.	300 μl	ND ^a

^aND = $[^{18}\text{F}]\text{MR35806}$ Non Détecté par HPLC

Tableau 36: Premiers essais de radiomarquage du précurseur **116** par Kuhnast et al.

Au vu de ces résultats, le protocole d'obtention du $[^{18}\text{F}]\text{MR35806}$ a été modifié. Le solvant (DMF) a été remplacé par de la diméthylamine (DMA) et du trifluoromethanesulfonate de potassium (KOTf) a été ajouté. Les deux réactions ont permis d'apprécier la formation du produit avec un rendement de conversion modéré de 5% (Schéma 67).

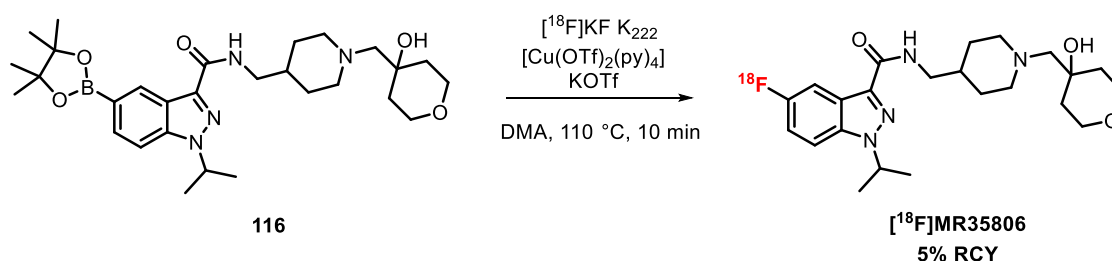


Schéma 67: Essai de radiomarquage de **116** dans le DMA en présence de KOTf

D'autres essais sont en cours d'étude au CEA de Paris Orsay avec pour objectif d'augmenter le taux de formation du $[^{18}\text{F}]\text{MR35806}$. Ces essais représentent un véritable espoir pour nos équipes puisqu'en absence d'un radiomarquage efficace, nous ne serons pas en mesure d'évaluer l'efficacité du MR35806 à détecter la distribution des 5-HT₄R centraux.

En conclusion, durant mes trois années de thèse, nous avons développé une voie d'accès convergente et efficiente d'obtention de ligands des 5-HT₄R en série fluoroindazole. Cette synthèse nous a permis d'acquérir un grand panel de composés variant par la position du fluor sur le noyau indazole, par la

modification du linker et par le changement des chaînes latérales présentes sur la pipéridine. Ainsi, nous avons isolé vingt-sept composés finaux qui ont fait l'objet de tests *in vitro* au sein de notre laboratoire. Notre approche multiparamétrique, nous a permis de sélectionner trois ligands possédant les meilleures propriétés pour un radiomarquage au fluor-18. Le **MR35806** est actuellement au centre de nos attentions puisque ce dernier pourrait s'avérer être un radiotraceur de choix pour la détection et la caractérisation de la répartition des 5-HT₄R centraux.

II- Synthèse de nouveaux ligands en série iodoindazole

1. Synthèse de ligands froids en série iodoindazole

Les travaux entrepris par le Dr. Lam ont permis d'acquies plus d'une vingtaine de nouveaux ligands iodés affins des récepteurs 5-HT₄R. Ces recherches se sont essentiellement concentrées sur la formation de ligands portant une fonction propyle sur la chaîne pipéridinique ne permettant pas de moduler des paramètres chimiques comme la lipophilie.

Ces travaux ont abouti au radiomarquage à l'iode-125 de quatre composés d'intérêt : le MR31707, MR33005, MR26110 et MR33000 (Figure 56). Des études autoradiographiques *ex vivo* de ces radioligands ont été réalisés montrant un marquage diffus témoignant d'une fixation non spécifique sur les coupes de cerveau. Le [¹²⁵I]MR26110 et le [¹²⁵I]MR33000 ont fait l'objet d'études additionnelles *in vivo* révélant un défaut de passage de la BHE (accumulation dans les glandes harderiennes) ainsi qu'un radiomarquage non spécifique dans le cerveau.

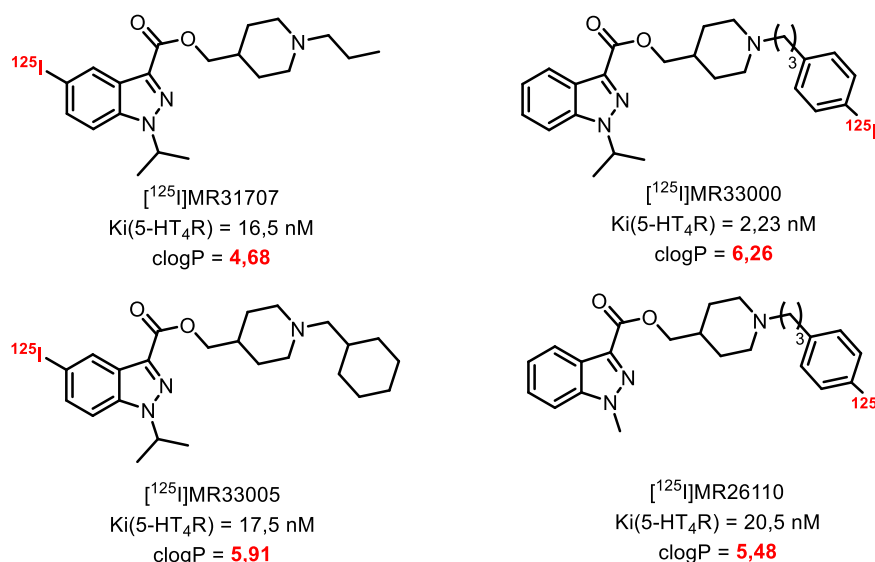


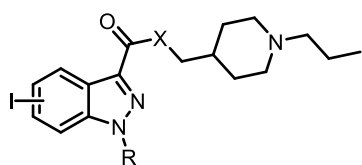
Figure 56: Radioligands synthétisés par le Dr. Lam en série iodée

Plusieurs hypothèses ont été formulées afin de comprendre l'échec de ces quatre radioligands. L'affinité insuffisante vis-à-vis des 5-HT₄R pourrait être une première explication, toutefois, le

[¹²⁵I]MR33000 présente un K_i de l'ordre du nanomolaire ($K_i(5\text{-HT}_4\text{R}) = 2,23 \text{ nM}$) excluant probablement cette hypothèse. Nous avons dans un deuxième temps calculé la lipophilie de ces quatre radiotraceurs et observé un clogP bien au-dessus des valeurs préconisées ($1 < \text{clogP} < 3$). Ces fortes lipophilies peuvent être la cause du défaut de passage BHE et expliquer le manque de sélectivité pour chacun d'entre eux. En effet, une forte lipophilie peut entraîner des interactions avec les membranes cellulaires ne permettant plus de discriminer l'émission radioactive issue de la fixation spécifique (sur le 5-HT₄R) de la fixation non spécifique (sur les membranes). Enfin, la présence de la liaison ester (liaison fragile) peut être une cause additionnelle du manque de sélectivité et du défaut de passage de la BHE puisqu'en présence d'une métabolisation intense, l'indazole séparé de sa chaîne pipéridinique ne pourrait plus jouer son rôle de radiotraceur.

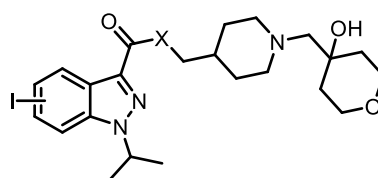
C'est dans ce contexte que nous avons décidé de produire de nouveaux radioligands en série iodoindazole. L'insertion d'une chaîne portant un groupement hydroxyle pourrait s'avérer utile pour diminuer la lipophilie dans une valeur acceptable. De plus, nous orienterons notre synthèse sur des composés amides et cétones afin d'optimiser la résistance au métabolisme. Nous n'écarterons pas totalement les composés esters afin de compléter les séries qui ont été préalablement initiées par le Dr. Lam (Figure 57).

Travaux du Dr. Lam



- $2,5 \text{ nM} < K_i(5\text{-HT}_4\text{R}) < 20,5$
- $\text{clogP} \gg 3$
- Résistance au métabolisme

Nos Travaux



- $2,5 \text{ nM} < K_i(5\text{-HT}_4\text{R}) < 20,5$
- $\text{clogP} < 3$
- Résistance au métabolisme

Figure 57: Stratégie envisagée en série iodoindazole

Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur la synthèse des précurseurs indispensables à l'obtention de ces nouveaux ligands iodés. Nous avons décidé de focaliser notre attention sur les séries 4- et 5-iodoindazoles car ce sont ces deux séries qui ont présenté les meilleurs K_i vis-à-vis des 5-HT₄R. Le 5-iodoindazole **16a** a été obtenu par réduction du 5-nitroindazole en 5-aminoindazole **15a**

suivie d'une réaction de Sandmeyer. Le 4-iodoindazole **16d** suit la voie de synthèse débutant par la 3-iodo-2-méthylaniline et passant par un intermédiaire diazonium (Schéma 68).²⁵²

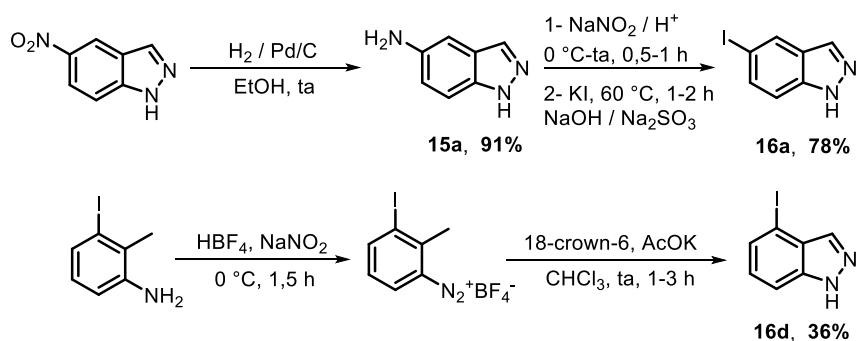


Schéma 68: Formation des noyaux 4 et 5-iodoindazoles

La suite de cette synthèse est identique à celle présentée en série 4-fluoroindazole avec une étape de formation des précurseurs THP **19a** et **19d**, de fonctionnalisation régiosélective de la position C3 offrant les composés **20a** et **20d** puis de *N*-alkylation et de saponification donnant **21a** et **21d**. Ces précurseurs ont été préalablement synthétisés dans les travaux du Dr. Lam, c'est pourquoi, ils ne seront pas davantage développés dans ce manuscrit (Schéma 69).

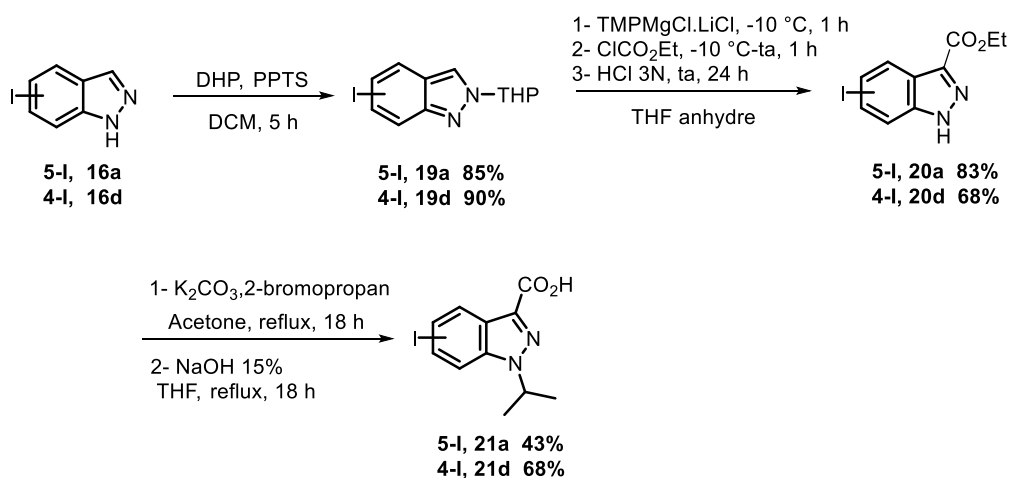
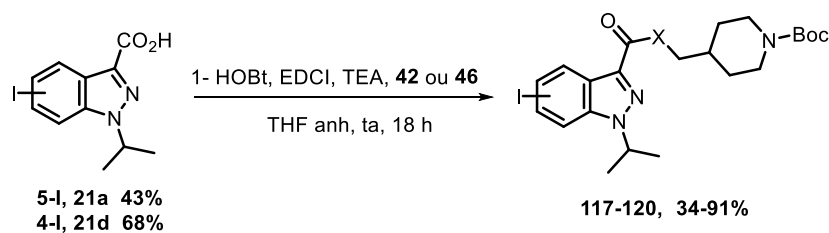


Schéma 69: Formation des précurseurs **21a** et **21d**

Enfin, nous avons appliqué le protocole de couplage peptidique en présence d'EDCI et d'HOBt mis au point en série fluoroindazole pour obtenir les précurseurs **117** à **120** (Tableau 37).

²⁵² Boulouard, M.; Schumann-Bard, P.; Butt-Gueulle, S.; Lohou, E.; Stiebing, S.; Collot, V.; Rault, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (11), 3177–3180.



Entrée	Identifiant	Position iode	X	Rendement (%)
1	117	5-I	O	85
2	118	5-I	NH	91
3	119	4-I	O	34
4	120	4-I	NH	89

Tableau 37: Synthèse des précurseurs Boc 117 à 120

De plus, nous avons formé le précurseur cétonique **121** en série 5-fluoroindazole en utilisant la nouvelle méthode mise au point au cours de mes travaux de thèse (Schéma 70). Malheureusement, celle-ci n'a pas conduit au produit attendu en série 4-iodoindazole en raison de l'encombrement de la position C3 et l'impossibilité de la chaîne **63** à se fixer dans cette position.

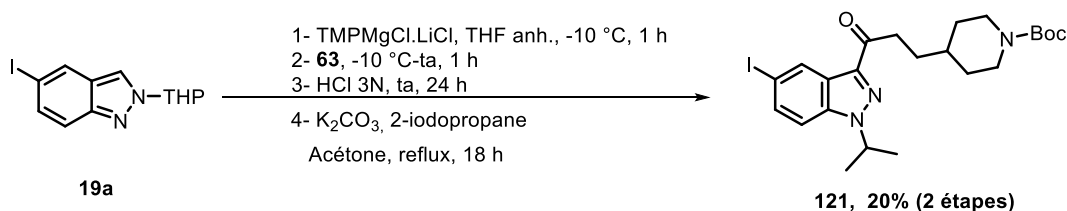
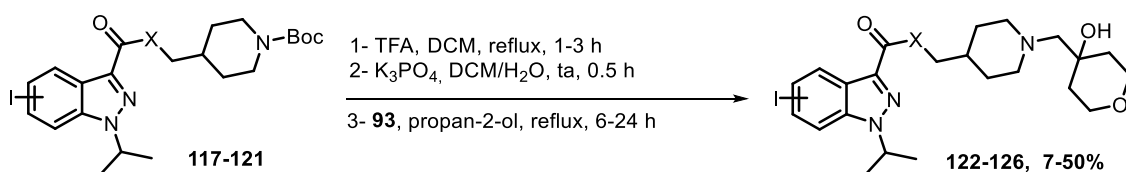


Schéma 70: Synthèse du précurseur cétonique **121**

Puis nous avons fonctionnalisé nos précurseurs iodoindazoliques par déprotection du groupement Boc en présence de TFA puis par l'ajout de la chaîne **93** dans une deuxième étape avec des rendements compris entre 7 et 50% (Tableau 38). Ces variations de rendement sont principalement liées à des difficultés de purification de ces composés finaux.



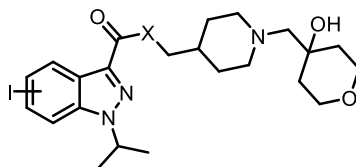
Entrée	Identifiant	Position iode	X	Rendement (%)
1	MR35823, 122	4-I	O	27
2	MR35824, 123	4-I	NH	7
3	MR35825, 124	5-I	O	19

4	MR35826, 125	5-I	NH	50
5	MR35831, 126	5-I	CH ₂	33

Tableau 38: Obtention des ligands en série 4- et 5-iodoindazole

2. Evaluation biologique des ligands en série 4- et 5-iodoindazoles

Dans un deuxième temps, nous avons décidé d'évaluer l'affinité vis-à-vis des 5-HT₄R *via* les tests *in vitro* présentés précédemment dans ce manuscrit. De plus, nous avons calculé la lipophilie à l'aide du logiciel MarkinSketch (Tableau 39).



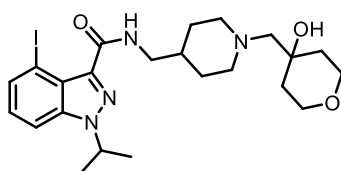
Entrée	Identifiant	I	X	% inh. (10 ⁻⁶ /10 ⁻⁸ M)	Ki(5-HT ₄ R) (nM) ^a	clogP
1	MR35823	4-I	O	100/95	20,7 ± 3,8	2,99
2	MR35824	4-I	NH	97/18	44,2 ± 6,6	2,26
3	MR35825	5-I	O	100/40	215 ± 13,1	2,99
4	MR35826	5-I	NH	90/10	nd ^b	2,26
5	MR35831	5-I	CH ₂	97/10	455 ± 15	3,38

^a déterminé sur 3 tests ; ^b non déterminé

Tableau 39: Affinités et clogP des ligands en série iodoindazole

Parmi les cinq ligands froids synthétisés, seulement deux d'entre eux possèdent une affinité suffisante pour envisager un potentiel radiomarquage à l'iode-125 (entrées **1** et **2**). L'insertion des chaînes latérales hydroxylées a permis de diminuer significativement les lipophilies calculées (clogP).

Nous avons décidé de sélectionner le **MR35824** car malgré une affinité moindre pour les 5-HT₄R (Ki(5-HT₄R) = 44,2 ± 6,6 nM) comparativement au **MR35823**, il possède une lipophilie plus modérée (clogP = 2,26) et un linker amide potentiellement résistant au métabolisme. Nous avons réalisé un test Pampa-BBB afin de vérifier si ce ligand avait la capacité de passer la BHE (Tableau 40). Les prédictions du test Pampa-BBB sont favorables à l'utilisation du **MR35824** avec une bonne diffusion passive du ligand à travers les membranes.



Identifiant	Ki(5-HT ₄ R) (nM)	clogP	logPe	Diffusion
MR35824	44,2 ± 6,6	2,26	-4,71	Bonne

Tableau 40: Caractéristiques du MR35824

La dernière étape de ce travail fut de déterminer le précurseur nécessaire à l'obtention du radiotracer $[^{125}\text{I}]\text{MR35824}$. Ainsi, nous avons décidé de nous orienter vers la formation d'un précurseur stannylé **127** directement à partir du **MR35824** comme décrit préalablement par Dubost *et al.* et Lam *et al.*^{180,253,254}

Ce dernier est en cours de synthèse, fera l'objet d'un radiomarquage à l'iode-125 et sera testé *ex vivo/in vivo* par nos collaborateurs suisses (Hôpitaux Universitaires de Genève) (Schéma 71).

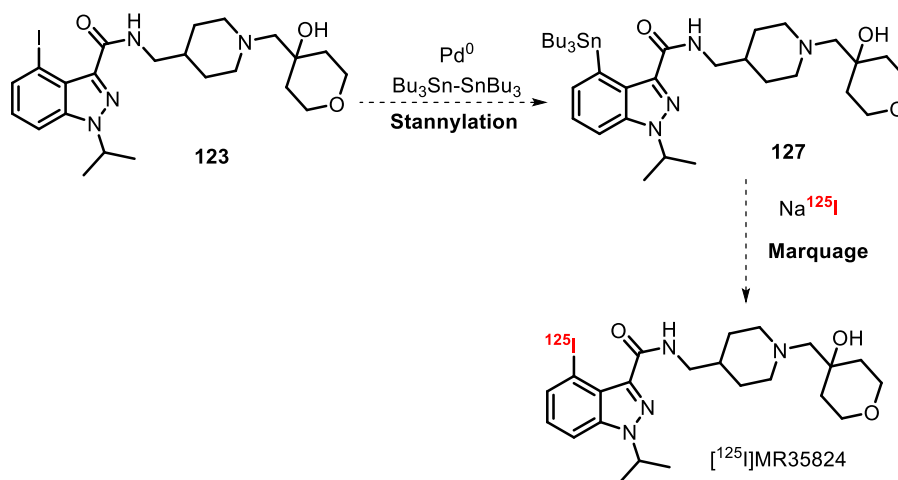


Schéma 71: Voie de synthèse du $[^{125}\text{I}]\text{MR35824}$ envisagée

III- Projet complémentaire

Dans la dernière partie de ma thèse, nous avons concentré notre attention sur un deuxième projet s'orientant vers la synthèse de nouveaux ligands du 5-HT₄R toujours en série indazole mais portant une fonction sulfoxide. L'objectif étant de varier les linkers et d'augmenter le panel de ligands froids affins vis-à-vis des 5-HT₄R (Figure 58).

²⁵³ Gribanov, P. S.; Golenko, Y.; Topchiy, M.; Minaeva, L.; *et al.* *European J. Org. Chem.* **2018**, 2018 (1), 120–125.

²⁵⁴ Farina, V.; Krishnamurthy, V.; Scott, W. J. *Organic Reactions.* **1997**, 1–93.

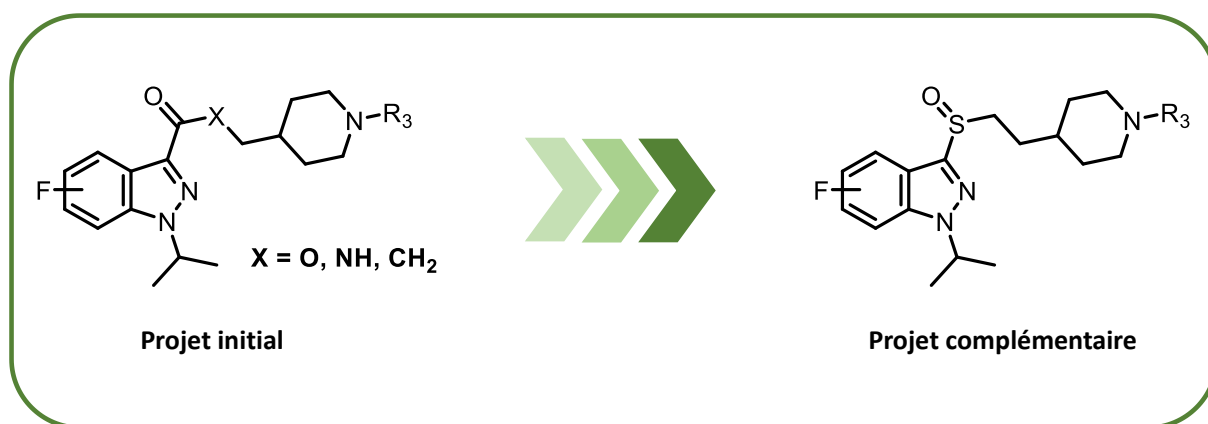


Figure 58 : Objectif du projet complémentaire

Ce nouveau projet s'accompagna du développement d'une nouvelle méthode efficace de thioalkylation applicable au noyau indazole mais aussi à d'autres hétérocycles azotés. Dans un premier temps, nous présenterons les différentes voies d'obtention de ces composés décrites dans la littérature puis nous exposerons les résultats issus de nos travaux.

1. Méthodes de thioalkylations de noyaux aromatiques décrites dans la littérature

Actuellement, il existe quatre grands procédés d'obtention de dérivés thioalkylés ou thioarylés décrits dans la littérature :

- Utilisation de bases pour des S_N2 et S_NAr
- Méthode catalysée par des métaux de transition
- Utilisation de réactifs de Grignard et de sels de Bunte
- Métallation et addition de chaînes disulfures.

1.1 Utilisation de bases pour des réactions de type S_N2 et S_NAr

La première méthode que nous allons décrire constitue un moyen simple d'obtention des composés thioalkylés ou thioarylés. Elle implique d'avoir formé préalablement un intermédiaire soufré qui pourra réagir dans un deuxième temps sur une chaîne portant un bon groupe partant (Br, I, Cl) (Schéma 72).

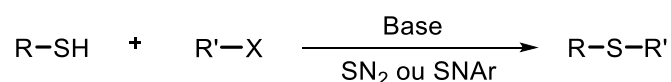


Schéma 72: Méthode générale d'obtention de composés thioalkylés et thioarylés par des S_N2 et S_NAr

Elle fut décrite à de nombreuses reprises sur différents hétérocycles azotés (pyrazole, purines, imidazole, benzimidazole) mettant en jeu l'utilisation de bases variées comme la soude (NaOH), le n-butyllithium (*n*-BuLi) ou le bicarbonate de sodium (NaHCO₃).

En 1979, Brown *et al.* publièrent un article utilisant cette méthode pour obtenir des purines S-alkylées.²⁵⁵ La purine avait été préalablement fonctionnalisée par des thiols permettant en une étape supplémentaire de former les liaisons thioéthers désirées avec des rendements très variables (5-95%). De plus, ils l'appliquèrent à d'autres hétérocycles azotés comme le 1,2,4 triazole, le benzimidazole et l'imidazole offrant de nombreuses perspectives pour cette méthode (Schéma 73).

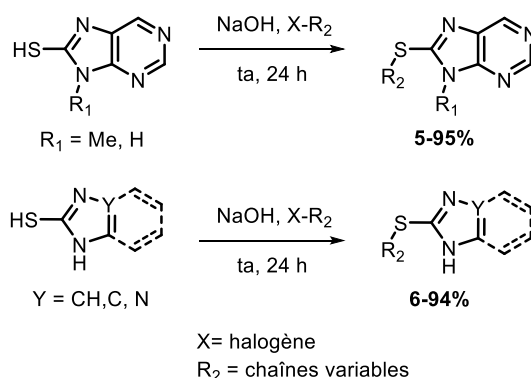


Schéma 73: Formation de thioethers sur des systèmes hétérocycliques par Brown *et al.*

En 1997, Yin *et al.* proposèrent une voie de synthèse similaire *via* l'utilisation de *n*-BuLi permettant d'accéder à de nombreux composés aliphatiques et aromatiques thiolés avec d'excellents rendements (84-98%) (Schéma 74).²⁵⁶

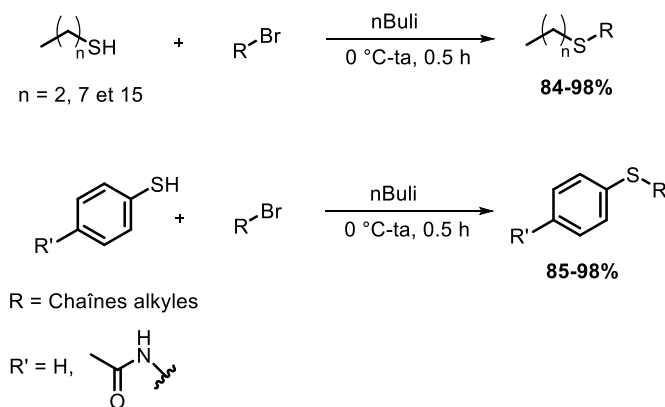


Schéma 74: Thioalkylation par Yin *et al.*

Plus récemment, Bespalov *et al.* s'intéressèrent spécifiquement au noyau benzimidazole mettant en évidence la présence d'une forme mésomère thiocarbonyle majoritaire lorsqu'un soufre est intégré en position C2 du cycle. Cette propriété n'a pas empêché la formation sélective des composés S-alkylés

²⁵⁵ Brown, D.; Grigg, G.; Iwai, Y.; McAndrew, K.; *et al.* *Aust. J. Chem.* **1979**, *32* (12), 2713-2726.

²⁵⁶ Yin, J.; Pidgeon, C. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (34), 5953-5954.

avec de très bons rendements (76-94%). Cette observation s'est avérée intéressante pour la suite de nos travaux (Schéma 75).²⁵⁷

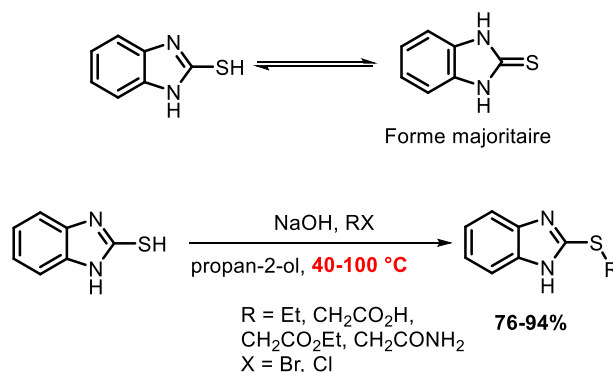


Schéma 75: Forme mésomère et S-alkylation du benzimidazole

L'utilisation de bases pour réaliser des S_N2 et S_NAr s'est imposée comme une méthode de choix dans la formation de composé thioesters et thioethers. Toutefois, l'obtention des précurseurs portant le groupement thiol n'est pas toujours possible impliquant certaines limites à son utilisation. De plus, l'absence de sélectivité dans ces réactions peut entraîner la formation de composés secondaires non désirés notamment s'il existe d'autres groupements nucléophiles sur la même molécule. C'est pourquoi, d'autres méthodes ont été envisagées afin de pallier ces deux problèmes.

1.2 Couplage croisé catalysé par des métaux de transition

La deuxième méthode que nous allons présenter utilise des métaux de transitions (M) comme catalyseur dans des réactions de couplage croisé. Ces métaux (Pd, Cu, Ni, Co) vont permettre de former directement des liaisons C-S à partir d'un précurseur thiolé et d'un groupement aryle portant un halogène (Schéma 76).

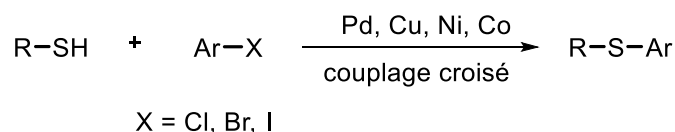


Schéma 76: Méthode générale de formation des liaisons C-S via des métaux de transition

Le mécanisme de cette approche implique un cycle catalytique passant par 3 étapes successives débutant par une insertion oxydante, suivie par une étape de transmétallation et se finalisant par une élimination réductrice (Schéma 77).

²⁵⁷ Bepalov, A. Y.; Gorchakova, T. L.; Ivanov, A. Y.; et al. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2015**, 50 (11), 1547–1558.

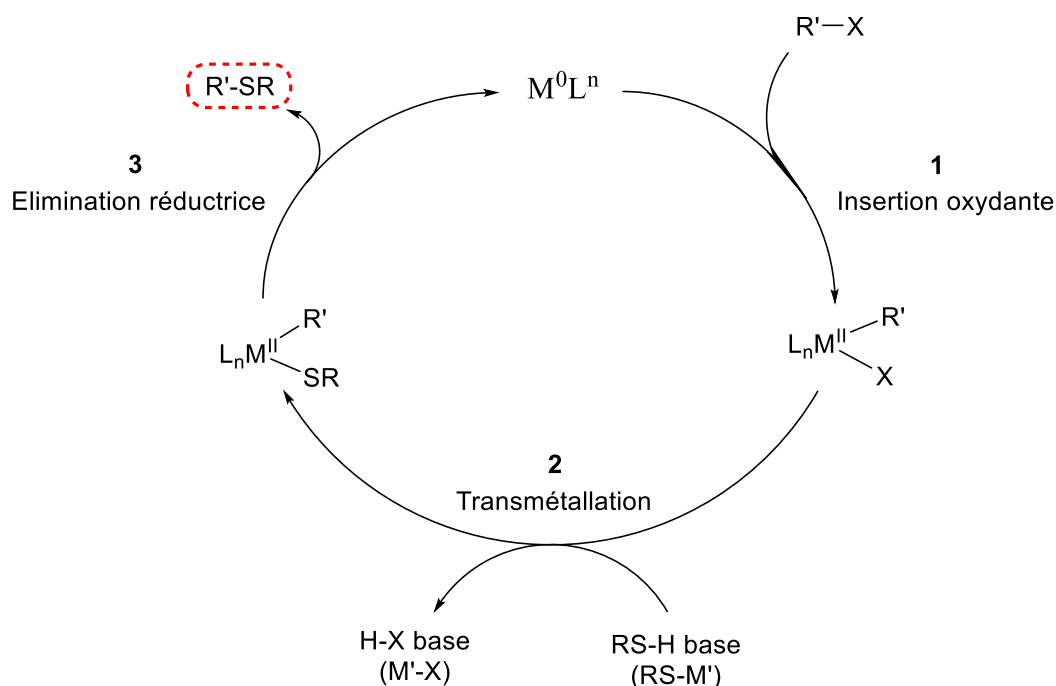


Schéma 77: Cycle catalytique des métaux de transition

De plus, des méthodes récentes de C-H activation en présence d'un catalyseur cuivré ($\text{Cu}(\text{OAc})_2$) ont démontré l'intérêt de cette technique en absence d'un halogène sur le cycle aromatique.²⁵⁸

En 2001, Schopfer *et al.* publièrent la synthèse de liaisons thioéthers sur des cycles aromatiques *via* l'utilisation d'un catalyseur au Pd.²⁵⁹ Ce catalyseur fut utilisé sous la forme de tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0) (Pd_2dba_3) en présence de DPEphos (ligand = L) et d'une base le *t*-BuOK. Ce couplage fut appliqué sur des noyaux aromatiques simples mais aussi sur des hétérocycles azotés comme l'imidazole avec des rendement compris entre 35 et 99% (Schéma 78).

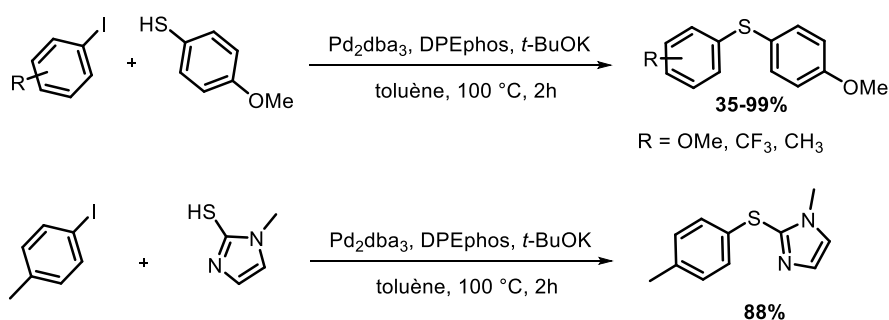


Schéma 78: Thioalkylations catalysées au Palladium par Schopfer *et al.*

Une méthode similaire de couplage croisé fut appliquée par l'équipe de Pike pour former des liaisons thioéthers sur l'imidazo[1,2-*a*]pyridine. L'objectif étant de former des dérivés du radiotracteur iodé

²⁵⁸ Chen, X.; Hao, X. S.; Goodhue, C. E.; Yu, J. Q. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (21), 6790–6791.

²⁵⁹ Schopfer, U.; Schlapbach, A. *Tetrahedron* **2001**, *57* (15), 3069–3073.

[¹²⁵I]IMPY utilisé en imagerie médicale pour la détection des plaques β -amyloïdes dans la MA. Ainsi, deux méthodes ont été proposées variant par le choix du catalyseur (CuI ou Pd₂dba₃) puis par modification du ligand choisi (DPPF, DiPPF, BINAP, BINAP-Tol) permettant d'apprécier jusqu'à 100% de conversion de la matière première (Schéma 79).²⁶⁰

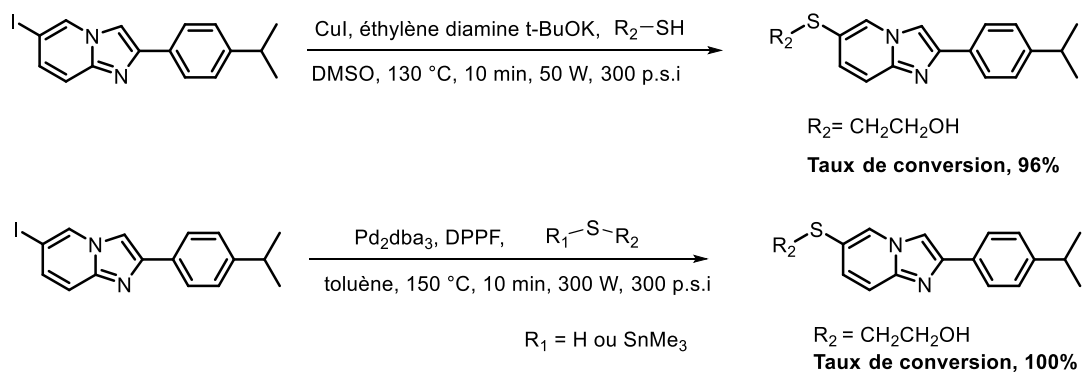


Schéma 79: Thioalkylations des dérivés du [¹²⁵I]IMPY

D'autres publications font référence à l'application de métaux de transition pour catalyser des réactions de couplage croisé. On peut noter l'utilisation de catalyseur cuivré (CuI) pour la formation de thioethers sur l'indole iodé en position C3 ou encore l'utilisation de Pd (J009-Pd-G3) pour des thioéthérifications du noyau bromoindazole (Schéma 80).^{261,262,263} Le noyau 1,2,3 triazole (*N*-oxydé) a fait l'objet lui aussi d'une fonctionnalisation en présence d'un catalyseur Métallique (NiSO₄) révélant l'intérêt de la C-S activation pour former des liaisons thioéthers.²⁶⁴

²⁶⁰ Cai, L.; Cuevas, J.; Peng, Y.-Y.; Pike, V. W. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47 (26), 4449–4452.

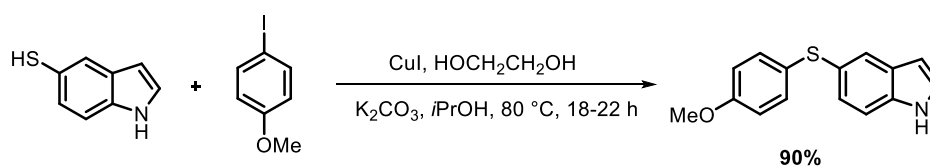
²⁶¹ Liu, K. G.; Robichaud, A. J.; Greenfield, A. A.; Lo, J.; *et al.* *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19 (1), 650–662.

²⁶² Kwong, F. Y.; Buchwald, S. L. *Org. Lett.* **2002**, 4 (20), 3517–3520.

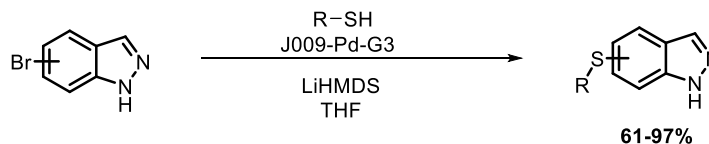
²⁶³ Ganley, J. M.; Yeung, C. S. *J. Org. Chem.* **2017**, 82 (24), 13557–13562.

²⁶⁴ Zhu, J.; Chen, Y.; Lin, F.; Wang, B.; Chen, Z.; Liu, L. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13 (12), 3711–3720.

Buchwald *et al.*



Ganley *et al.*



Zhu *et al.*

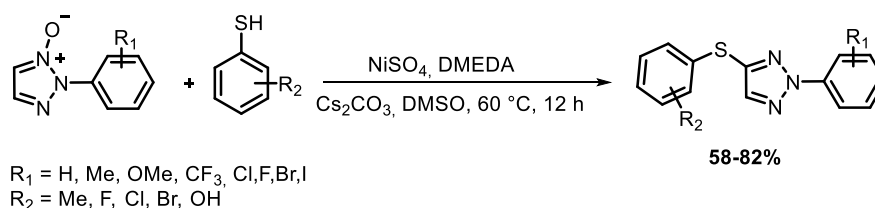


Schéma 80: Application des réactions de couplage croisés sur le noyau indole, indazole et 1,2,3 triazole

Les réactions de couplage croisé *via* l'emploi de métaux de transition demeurent une méthode d'intérêt puisqu'elles sont applicables aux transformations stéréo-, régio-, chimio- et énantiosélectives de composés organiques. De plus, elles ont permis d'accéder à de nombreux composés thiolés sur des hétérocycles azotés. Toutefois, la formation de liaisons C-S est bien moins développée comparativement aux liaisons C-C. La principale cause étant que le soufre agit comme un poison des catalyseurs contraignant la mise au point de techniques bien spécifiques pour ces séries. En effet, il a été rapporté qu'une concentration très faible de ces espèces sulfurées (R-SH, R₂S₂) pouvait désactiver rapidement et irréversiblement le catalyseur.^{265,266,267} De plus, cette méthode impose de synthétiser des chaînes sulfurées variables pouvant être contraignantes en cas d'une large synthèse de composés.

1.3 Utilisation de réactifs de Grignard et de sels de Bunte

La troisième méthode d'obtention de composés thioéthers a été décrite récemment par Reeves *et al.* et fait intervenir d'une part des réactifs de Grignard (R-MgX) et d'autre part des sels de Bunte (R-SSO₃Na) (Schéma 81).²⁶⁸

²⁶⁵ Chang, J. R.; Chang, S.-L.; Lin, T.-B. *J. Catal.* **1997**, *169* (1), 338–346.

²⁶⁶ Paál, Z.; Matusek, K.; Muhler, M. *Appl. Catal. A Gen.* **1997**, *149* (1), 113–132.

²⁶⁷ Nasri, N. S.; Jones, J. M.; Dupont, V. A.; Williams, A. *Energy and Fuels* **1998**, *12* (6), 1130–1134.

²⁶⁸ Reeves, J. T.; Camara, K.; Han, Z. S.; Xu, Y.; Lee, H.; *et al.* *Org. Lett.* **2014**, *16* (4), 1196–1199.

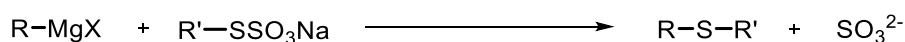


Schéma 81: Méthode générale de thioétherification via des réactifs de Grignard et des sels de Bunte

La première étape consiste à former les sels de Bunte à partir de précurseurs halogénés qui vont réagir en présence de thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$) dans un mélange MeOH/H₂O.²⁶⁹ Ainsi, le sel de Bunte formé pourra réagir directement avec les réactifs de Grignard présentés (RMgCl). Cette méthode a permis de former des liaisons thioéthers alkyles et aryles sur divers cycles comme les benzothiazoles, les naphthalènes ou encore les quinoléines (Schéma 82).

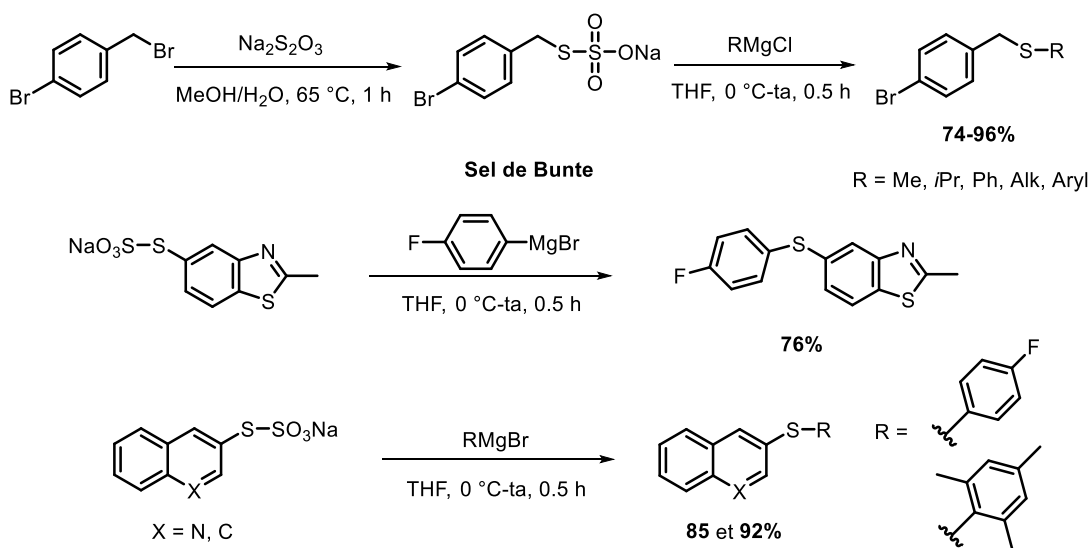


Schéma 82: Synthèse de liaisons thioéthers via l'utilisation de sels de Bunte

Cette technique présente de nombreux avantages puisque la formation de sels de Bunte peut être réalisée sur des composés aliphatiques et aromatiques (conditions différentes en présence de CuI), offrent des cristaux blancs non odorants et permet de former les liaisons thioéthers avec de très bons rendements (74-92%). En contrepartie, elle présente un inconvénient majeur puisqu'elle impose de former un grand nombre de chaînes portant ce sel de Bunte et les réactifs de Grignard indispensables à l'obtention des produits finaux.

1.4 Métallation des cycles aromatiques et addition de chaînes disulfures

La dernière méthode de formation de composés thioéthers met en avant l'utilisation de superbases organométalliques (organolithiens et organomagnésiens) permettant de déprotoner les cycles aromatiques et ainsi de favoriser les mécanismes de S_N2 sur des chaînes disulfures (Schéma 83). Plusieurs bases ont été utilisées dans ce sens comme le *n*-butyllithium (*n*-BuLi), le *tert*-butyllithium (*t*-BuLi) ou le TMPMgCl.LiCl.

²⁶⁹ Distler, H. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1967**, 6 (6), 544–553.

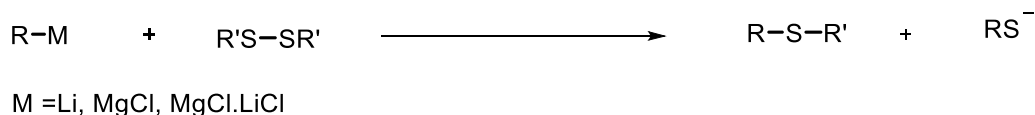


Schéma 83: Méthode générale de formation de liaisons thioéthers via les superbases organométalliques

En 1989, Katritzky *et al.* décrivent la lithiation du pyrazole protégé en position 1 via l'utilisation de *n*-BuLi mais aussi de *tert*-butyllithium (*t*-Buli) permettant de fonctionnaliser sélectivement la position-5 du cycle. Les chaînes disulfures utilisées ont été la cible d'un mécanisme de S_N2 engendrant la formation de pyrazoles thiolés (Schéma 84).²⁷⁰

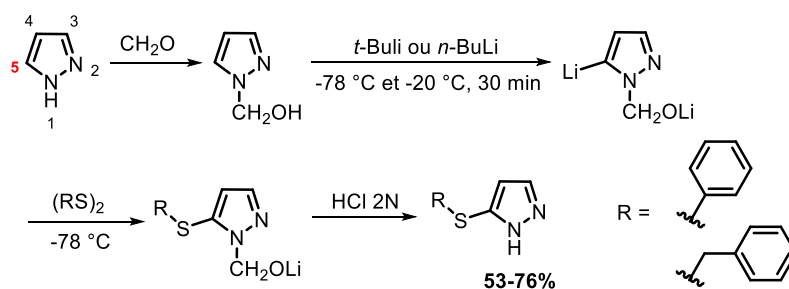


Schéma 84: Thioalkylation et thioarylation sur un noyau pyrazole par Katritzky *et al.*

Cette méthode a été réutilisée en 2008 par Hanamoto *et al.* pour fonctionnaliser un pyrazole portant un groupement stannylé (Bu₃Sn) (position 5) avec une différence notable dans le choix des chaînes employées (chaîne disulfure oxydée) (Schéma 85).²⁷¹

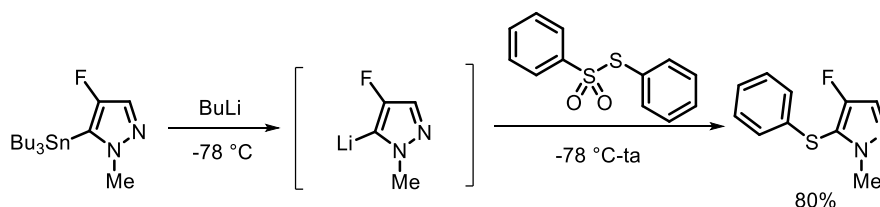


Schéma 85: Thioarylation du pyrazole par Hanamoto *et al.*

D'autres agents de métallation ont fait l'objet d'études pour fonctionnaliser des hétérocycles azotés. En 2009, l'équipe de Knochel utilisa la base portant son nom (TMPMgCl.LiCl) pour former des liaisons thioéthers sur un noyau pyrazole portant un groupement directeur SEM (2-(triméthylsilyl)éthoxyméthyl) ou un méthyl sur l'azote en position 1 du cycle. Cette méthode donna de bons résultats avec des rendements de réactions compris entre 72 et 84% mais nécessite la formation préalable de chaînes disulfures (Schéma 86).²⁷²

²⁷⁰ Katritzky, A. R.; Lue, P.; Akutagawa, K. *Tetrahedron* **1989**, *45* (13), 4253–4262.

²⁷¹ Hanamoto, T.; Hashimoto, E.; Miura, M.; Furuno, H.; Inanaga, J. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (12), 4736–4739.

²⁷² Despotopoulou, C.; Klier, L.; Knochel, P. *Org. Lett.* **2009**, *11* (15), 3326–3329.

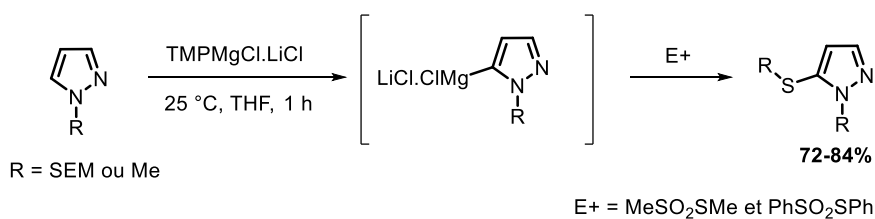


Schéma 86: Thioarylation et thioalkylation par Knochel et al.

Elle fut optimisée en série iodoindazole par le Dr. Lam et le Dr. Berhault permettant d'obtenir plusieurs composés *S*-méthylés et *S*-phénylés *via* la métallation sélective de la position C3 en présence de TMPMgCl.LiCl et du groupement directeur THP (Schéma 87).¹⁹⁷

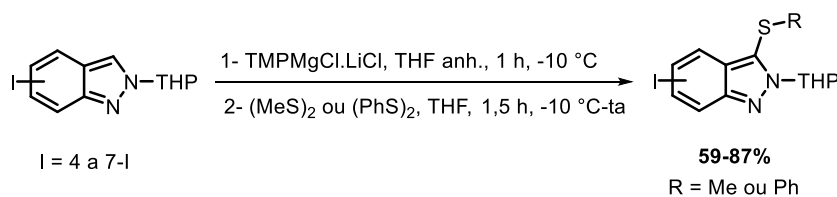


Schéma 87: Thioalkylation et arylation du noyau indazole par Lam et Berhault

Cette méthode présente de nombreux avantages puisqu'en plus d'avoir de bons rendements de conversion, elle n'implique pas la formation préalable de précurseurs thiolés et permet de fonctionnaliser régiosélectivement les cycles aromatiques. Toutefois, elle implique encore une fois la préparation préalable des chaînes disulfures qui peut s'avérer être une étape contraignante.

2. Développement d'une nouvelle méthode de thiofonctionnalisation des hétérocycliques azotés

Comme nous avons pu l'observer précédemment, les différentes méthodes de thioéthérifications des hétérocycles azotés décrites dans la littérature présentent toutes des avantages et des inconvénients. Nous avons souhaité développer une méthode convergente s'affranchissant de la synthèse fastidieuse de chaînes disulfures et de la formation préalable de précurseurs thiolés.

D'une part, nous avons repris les travaux qui avaient été effectués précédemment par le Dr. Lam et le Dr. Berhault utilisant la base de Knochel-Hauser et permettant de fonctionnaliser régiosélectivement la position C3 du cycle indazole. D'autres part, nous avons étudié une deuxième méthode testée par le Dr. Berhault permettant d'accéder en une seule étape aux composés *S*-alkylés en série indazole. Celle-ci implique l'utilisation du TMPMgCl.LiCl suivi de l'addition de soufre (S₈) et se terminant par l'ajout d'une chaîne électrophile (R-X) (Schéma 88).

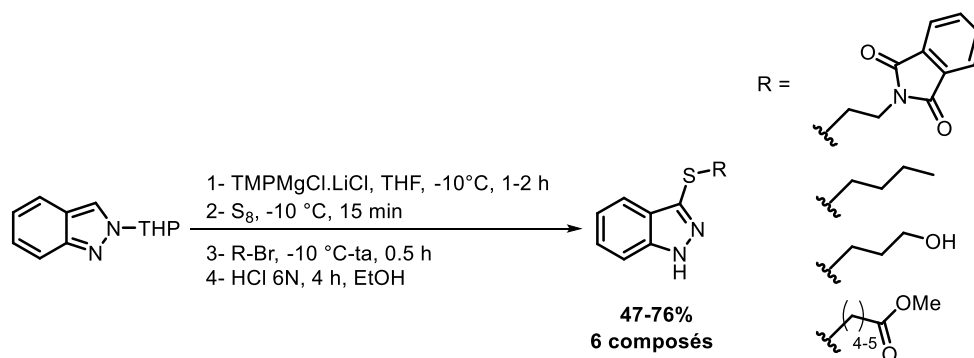


Schéma 88: Méthode de S-alkylation développée par le Dr. Berhaut

Cette méthode a démontré une bonne efficacité mais s'est limitée au développement de composés indazoles S-alkylés. C'est pourquoi, nous avons décidé d'étendre cette technique à d'autres cycles aromatiques (imidazole, benzimidazole, indole) et de varier les liaisons en proposant notamment des liaisons thioesters, thioaryles, thioalkyles mais aussi des formes oxydées comme les sulfoxides et les sulfones.

Ce travail se divise en 3 parties. Dans un premier temps, nous effectuerons des thioétherifications sur plusieurs cycles aromatiques sélectionnés préalablement. Nous avons décidé d'insérer pour chacun d'entre eux une chaîne propyle fixe à l'aide du 1-bromopropane commercial. Puis nous sélectionnerons l'hétérocycle azoté présentant les meilleurs résultats et feront varier les fonctionnalisations. Enfin, nous choisirons une molécule d'intérêt décrite dans la littérature pour démontrer l'efficacité de cette nouvelle méthode en optimisant notamment le nombre d'étape permettant d'accéder à ce composé.

2.1 Thioétherification d'hétérocycles azotés variés

La première étape consista à appliquer la méthode décrite précédemment sur un certain nombre d'hétérocycles azotés sélectionnés préalablement. Notre choix se dirigea sur douze hétérocycles azotés pouvant porter un groupement directeur THP impliquant la présence d'un azote sous la forme NH (Figure 59).

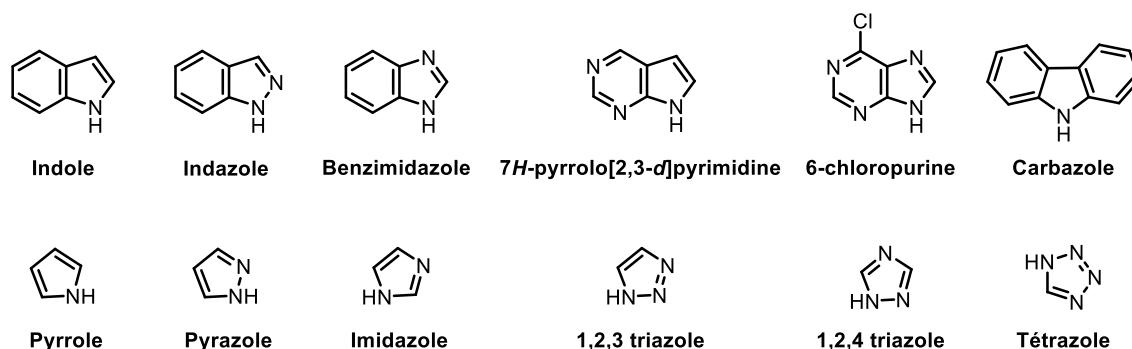
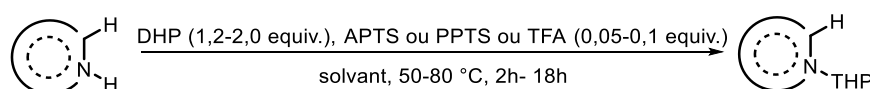


Figure 59: Hétérocycles azotés sélectionnés pour la thioétherification

Nous avons procédé à la *N*-fonctionnalisation de ces hétérocycles azotés par le groupement directeur THP en *ortho* du carbone ciblé. Le carbazole est une exception dans cette série puisque nous souhaitons thioalkyler le carbone en *Péri* de l'azote portant le THP. Plusieurs méthodes ont été envisagées puisqu'il n'existe actuellement aucune méthode convergente d'obtention de ces composés.

Dans un premier temps, nous avons appliqué un protocole mettant en jeu l'utilisation du DHP (1,5-2 equiv.) en présence d'une quantité catalytique d'acide paratoluènesulfonique (APTS), de pyridinium-*p*-toluènesulfonate (PPTS) ou de TFA.^{273,274,275} Neuf hétérocycles ont fait l'objet d'une fonctionnalisation *via* cette méthode (Tableau 41).

Nous avons obtenu sept précurseurs-THP avec des rendements variables compris entre 18 et 100% (entrées **1- 8** et **9**) qui feront l'objet d'une optimisation ultérieure. Nous n'avons pas observé la formation du composé désiré à partir de l'imidazole puisque nous avons récupéré principalement la matière première (entrée **6**). Pour l'indole, nous avons observé la formation de plusieurs produits correspondant à une pluri-addition du THP en position 1,2 et 1,3 et 1,2,3 (entrée **3**).



Entrée	Identifiant	M1	Acide	Produit final	Rendement (%)
1	128		APTS		18
2	129		APTS		57
3	130		APTS		nd (Mélange)
4	131		APTS		40
5	132		APTS		43
6	133		APTS		0 (M1)

²⁷³ Joo, J. M.; Guo, P.; Sames, D. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (2), 738–743.

²⁷⁴ Hu, E.; Andrews, K.; Chmait, S.; Zhao, X.; Davis, C.; *et al.* *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (6), 700–705.

²⁷⁵ Nagasawa, N.; Kumashiro, I.; Takenishi, T. *J. Org. Chem.* **1966**, *31* (8), 2685–2688.

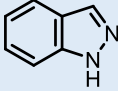
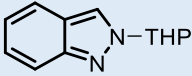
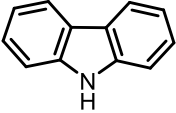
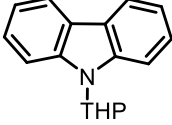

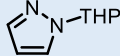
7	134		PPTS		70
8	135		PPTS		100
9	136		TFA		89

Tableau 41: Formations des précurseurs THP en présence de DHP et d'APTS

Au vu de ces résultats, nous avons décidé de modifier ce protocole en favorisant la *N*-alkylation en présence d'une base forte et par l'utilisation d'une espèce réactive permettant un mécanisme de S_N2 : le 2-chlorotétrahydro-2*H*-pyran (Cl-THP). Nous avons synthétisé cette chaîne à partir du DHP incubé dans une solution HCl 2M dans EtO₂ (Schéma 89).²⁷⁶

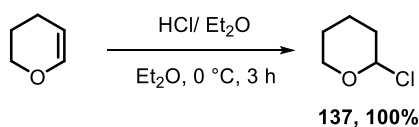
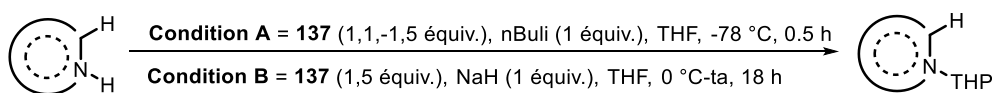
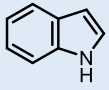
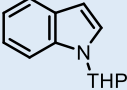
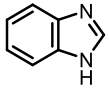
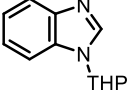




Schéma 89: Formation du 2-chloro-THP

Nous avons utilisé le produit **137** sur six hétérocycles azotés en présence d'une quantité stœchiométrique de *n*-BuLi à -78°C ou de NaH à 0°C pendant 30 minutes puis 18 h à ta (Tableau 42).^{277,278} Cette deuxième méthode nous a permis d'accéder à cinq précurseurs portant le THP (entrées **1**, **2**, **3**, **4** et **6**). Le noyau pyrole fut abandonné en raison d'une polymérisation importante du précurseur à température ambiante.



Entrée	Identifiant	M1	Condition	Produit final	Rendement (%)
1	130		A		41
2	128				31
3	138				15

²⁷⁶ Wang, Y.; Vaismaa, M. J. P.; Rissanen, K.; Franzén, R. *European J. Org. Chem.* **2012**, 2012 (8), 1569–1576.

²⁷⁷ Lee, T. D.; Pickering, M. V.; Daves, G. D. *J. Org. Chem.* **1974**, 39 (8), 1106–1109.

²⁷⁸ Rault, S.; Primas, N.; Bouillon, A.; Lancelot, J.-C.; Santos, J.; Lohier, J.-F. *Lett. Org. Chem.* **2008**, 5 (1), 8–10.

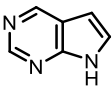
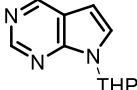

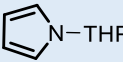

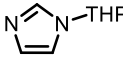
4	139				10
5	-				Polymérisation
6	133		B		15

Tableau 42: Formation des précurseurs THP à l'aide du Cl-THP

Ainsi, nous avons synthétisé onze précurseurs portant le groupement directeur THP. Nous avons appliqué la méthode de thioalkylation à plusieurs de ces cycles afin de faire la preuve du concept et ainsi de vérifier si elle était applicable sur un large spectre de noyaux aromatiques. Dans un premier temps, nous avons sélectionné le noyau pyrazole, 1,2,4 triazole et le benzimidazole (Schéma 90). Les premiers essais sur le noyau pyrazole nous ont permis d'apprécier la formation du composé thioalkylé **140** avec un rendement de 55%. En revanche, le rendement était plus modéré pour le noyau 1,2,4 triazole **141** avec un rendement de 25%. De plus, nous n'avons pas observé la formation du benzimidazole thioalkylé **142**.

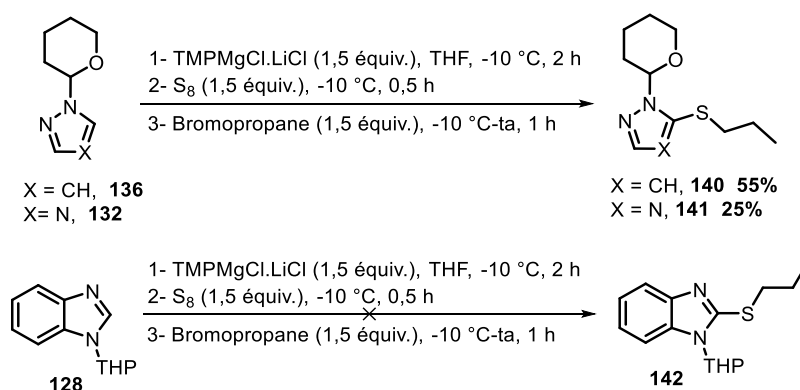


Schéma 90: Premier essais de Thioalkylations sur des noyaux aromatiques

Les RMN ^1H de ce dernier, nous ont confirmé la fixation du soufre en position 2 du cycle mais l'absence de fonctionnalisation par le 1-bromopropane. Cette propriété était probablement liée à la présence d'une forme tautomère du thiol avec l'azote en position 3 du cycle entraînant la désactivation du caractère nucléophile (Schéma 91). Cette propriété avait été décrite précédemment dans les travaux de Bespalov *et al.*²⁵⁷

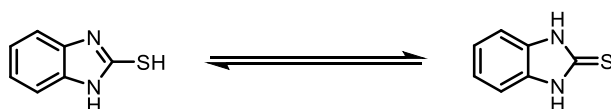
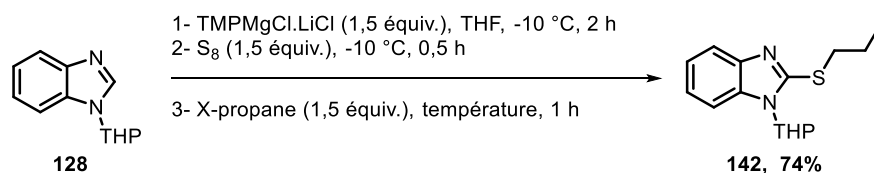


Schéma 91: Formes tautomères du 1H-benzimidazole-2-thiol

Par conséquent, nous avons adapté le protocole en remplaçant le 1-bromopropane par du 1-iodopropane. De plus, nous avons accéléré la cinétique de la réaction en augmentant la température de façon modérée (45°C) limitant le risque d'altération du groupement THP. Nous avons appliqué ce nouveau protocole au noyau benzimidazole nous permettant d'apprécier une augmentation significative des rendements à 74% (Tableau 43).



Entrée	X	Température	Rendement (%)
1	Br	ta	0
2	I	ta	5
3	I	45°C	74

Tableau 43: Mise au point de la thioalkylation sur le noyau benzimidazole

Cette même propriété a été observée sur plusieurs précurseurs nous permettant de les diviser en 3 groupes distincts (Figure 60):

- Le système N-C=N nécessitant un chauffage pour la thioalkylation
- Le système N-N-C fonctionnalisé à température ambiante
- Le système N-C=C appartenant à aucune des autres classes.

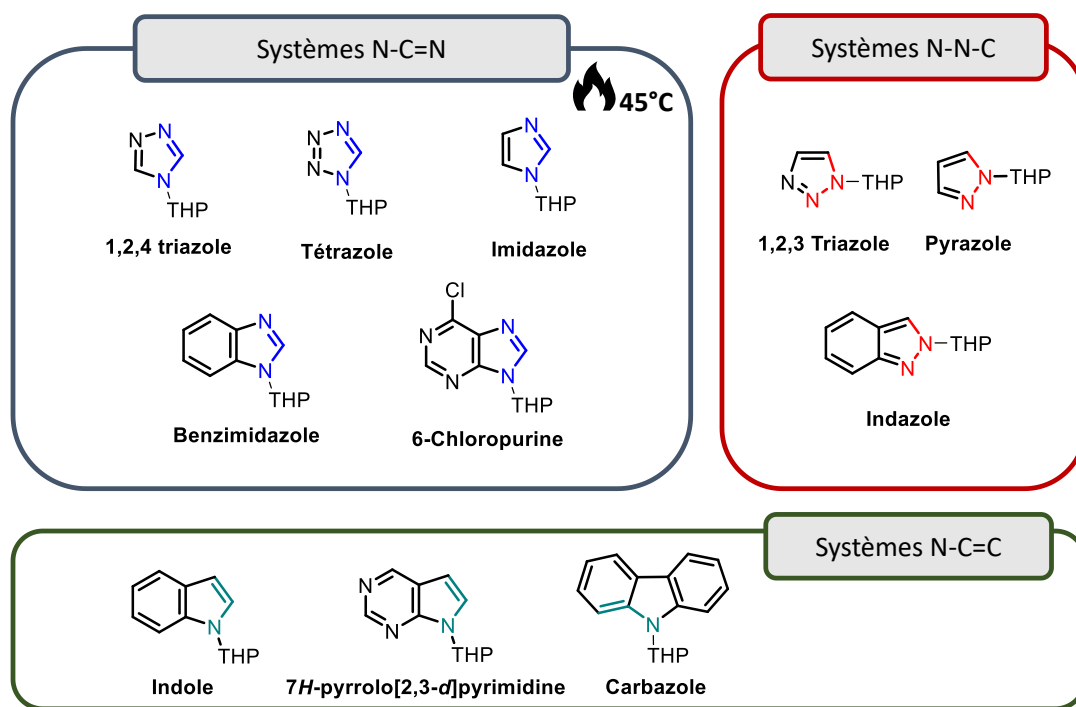
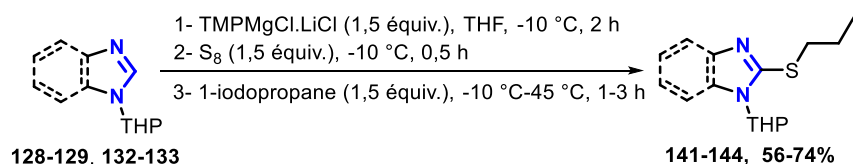


Figure 60: Classement des hétérocycles azotés en 3 systèmes différents

Ainsi nous avons appliqué le protocole associé aux composés N-C=N. Pour l'ensemble de ces hétérocycles (1,2,4 triazole, tétrazole, imidazole, benzimidazole, 6-chloropurine), nous avons introduit une chaîne 1-iodopropane et favorisé la cinétique de la réaction en chauffant à 45°C (Tableau 44). Parmi les cinq hétérocycles étudiés, nous avons isolé quatre composés finaux thioalkylés avec de bons rendements compris entre 56 et 74% (entrées **1**, **2**, **3** et **4**). Nous avons observé une disparition totale de la matière première pour trois d'entre eux (entrées **1**, **2** et **3**) avec des taux de conversion à 100%. Les taux de conversion ont été déterminés en faisant le *ratio* des intégrations des protons présents en C1 des THP des matières premières comparativement aux produits finaux. En effet, nos études ont permis de mettre en évidence un déblindage de ce dernier lorsque le carbone adjacent est fonctionnalisé. De plus, cette fonctionnalisation entraîne la disparition du proton porté directement sur ce carbone et la modification générale du profil aromatique en RMN ^1H (Figure 61). Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure de purifier le tétrazole thioalkylé (entrée **5**). Les RMN ^1H ont révélé la disparition de la matière première avec formation d'un composé qui n'a pas pu être identifié.



Entrée	Identifiant	M1	Produit final	Taux de conversion	Rendement (%)
1	142	<chem>C1=NC2=CC=CC=C2N1C3=CC=CC=C3</chem>	<chem>C1=NC2=CC=CC=C2N1C3=CC=CC=C3SCC</chem>	100%	74
2	143	<chem>C1=NC2=CC=CC=C2N1C3=CC=CC=C3Cl</chem>	<chem>C1=NC2=CC=CC=C2N1C3=CC=CC=C3SCC</chem>	100%	65
3	141	<chem>C1=NC2=CC=CC=C2N1C3=CC=CC=C3</chem>	<chem>C1=NC2=CC=CC=C2N1C3=CC=CC=C3SCC</chem>	100%	56
4	144	<chem>C1=NC2=CC=CC=C2N1C3=CC=CC=C3</chem>	<chem>C1=NC2=CC=CC=C2N1C3=CC=CC=C3SCC</chem>	81%	63
5	-	<chem>C1=NC2=CC=CC=C2N1C3=CC=CC=C3</chem>	<chem>C1=NC2=CC=CC=C2N1C3=CC=CC=C3SCC</chem>	nd	0

nd =non déterminé

Tableau 44: Thioalkylation des hétérocycles azotés du système N-C=N

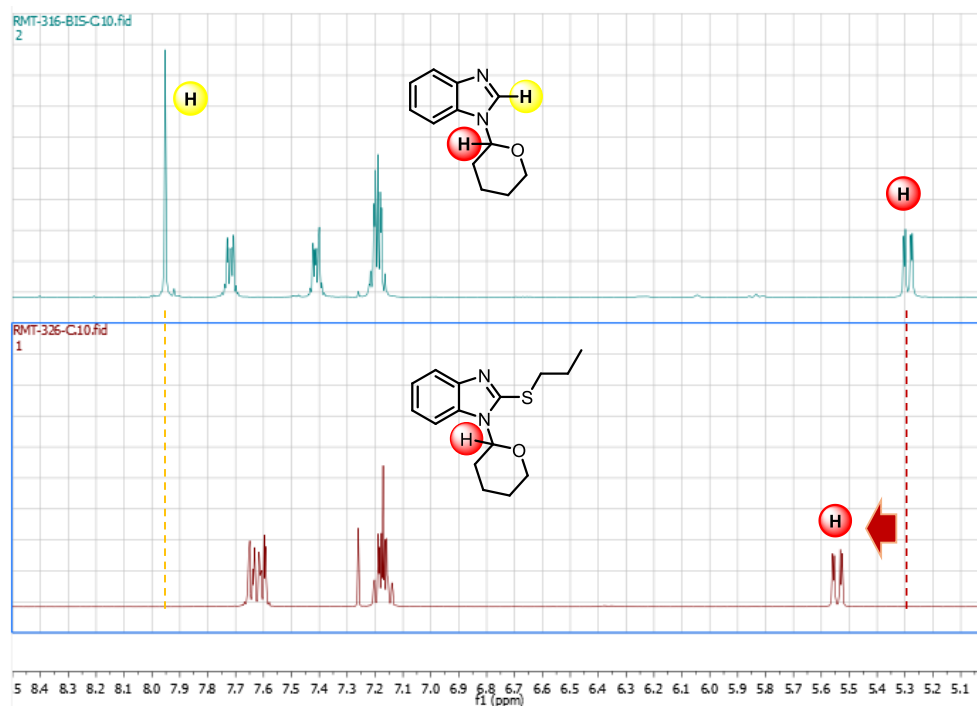
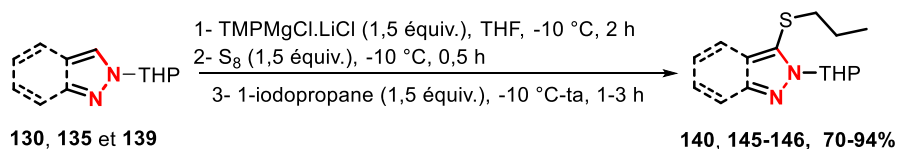


Figure 61: Comparaison des protons en RMN ¹H avant et après thioalkylation

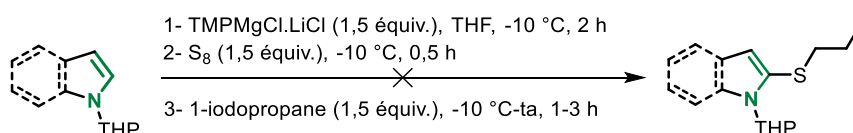
Dans un deuxième temps, nous avons appliqué la procédure de thioalkylation aux hétérocycles azotés appartenant au système N-N-C. L'addition du 1-iodopropane a été réalisée à -10°C suivie d'une incubation pendant 1 à 3 h à température ambiante (Tableau 45). Les analyses RMN ¹H nous ont permis d'apprécier de très bons taux de conversion pour ces 3 hétérocycles azotés. De plus, nous avons réussi à isoler les produits finaux avec d'excellents rendements compris entre 70 et 94% (entrées **1**, **2** et **3**).



Entrée	Identifiant	M1	Produit final	Conversion RMN ¹ H	Rendement (%)
1	145			100%	70%
2	140			100%	94%
3	146			89%	73%

Tableau 45: Thioalkylation des hétérocycles azotés du système N-N-C

Enfin, nous avons appliqué le protocole de thioalkylation aux hétérocycles azotés appartenant au système N-C=C (Tableau 46). Malheureusement, aucun hétérocycle azoté de ce système n'a permis d'aboutir aux composés thioalkylés souhaités (entrées **1**, **2** et **3**). En effet, les analyses RMN ¹H ont révélé l'absence de fixation du soufre sur les cycles et par conséquent l'impossibilité de les fonctionnaliser. Au vu de ces résultats, nous n'avons pas souhaité approfondir les recherches sur le système N-C=C.



Entrée	Identifiant	M1	Produit final	Taux de conversion	Rendement (%)
1	-			0%	0% (M1)

2	-		0%	0% (M1)
3	-		0%	0% (M1)

Tableau 46: Thiolalkylation des hétérocycles azotés appartenant au système N-C=C

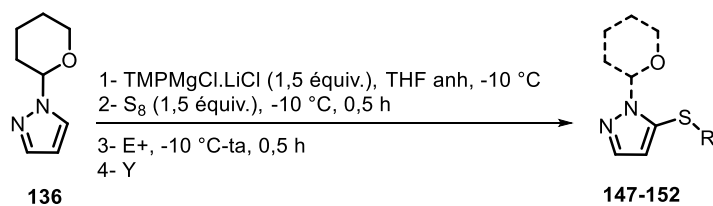
En conclusion, nous avons mis au point une méthode de thioéthérisation applicable sur de nombreux hétérocycles azotés du système N-C=N et N-N-C. Cette nouvelle méthode présente un intérêt certain puisqu'un grand panel de composés thioalkylés peut être synthétisé par simple changement de la chaîne électrophile.

2.2 Variations des thiofonctionnalisations du cycle pyrazole

La deuxième étape de ce projet consista à déterminer s'il était possible de varier les fonctionnalisations sur un même cycle. En effet, en modifiant la nature de l'électrophile ajouté dans le milieu réactionnel, il était potentiellement possible d'accéder à de nouveaux types de liaisons comme des thioéthers aryliques, des thioesters ou des liaisons sulfones et sulfoxydes par l'introduction additionnelle d'un agent oxydant. Nous avons sélectionné le cycle pyrazole en raison du fort rendement (94%) obtenu dans la première étape de ce projet (Tableau 47). Les différents essais appliqués au cycle pyrazole nous ont permis d'apprécier la grande variabilité des composés accessibles *via* cette nouvelle méthode. D'une part, nous avons déprotégé le THP présent sur l'azote par un ajout additionnel d'HCl 3N dans le milieu réactionnel nous permettant d'obtenir en « one pot » le composé **147** avec un rendement de 85% (entrée **1**). D'autre part, nous avons oxydé le soufre en présence de periodate de sodium (NaIO₄) nous permettant d'isoler en deux étapes le composé sulfoxide **148** (entrée **2**). En présence d'acide métachloroperbenzoïque (mCPBA), nous avons constaté une double oxydation offrant la sulfone **149** (entrée **3**).^{279,280} Enfin, nous avons démontré la possibilité d'accéder aux thioéthers arylés (entrée **4**) en présence d'un sel de tétrafluoroborate de benzènediazonium préparé extemporanément et des thioesters par l'utilisation de chlorure de benzoyle (entrée **6**). Actuellement, nous mettons au point une méthode « one pot » permettant d'obtenir les dérivés sulfones et sulfoxydes. Les premiers essais nous ont permis d'isoler l'aryle sulfone **151** avec un rendement modéré de 17% (entrée **5**).

²⁷⁹ Markovic, T.; Murray, P. R. D.; Rocke, B. N.; *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (46), 15916–15923.

²⁸⁰ Peruncheralathan, S.; Khan, T. A.; Ila, H.; Junjappa, H. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (24), 10030–10035.



Entrée	Identifiant	E+	Etape additionnelle Y	Produit final	Rendement (%)
1	147		HCl (3N), 50°C, 3 h		85
2	148		NaIO ₄ (1,1 équiv.), ta, 18h		50
3	149		mCPBA (2,2 équiv.), ta, 24 h		97 ^a
4	150		HCl (3N), 50°C, 5 h		70
5	151		mCPBA (4 équiv.), ta, 2 h HCl (3N), 50°C, 5 h		17
6	152		-		53

^a en deux étapes distinctes

Tableau 47: Thiofonctionnalisation du noyau pyrazole

Notre deuxième objectif consista à réaliser une double thio-addition sur le cycle pyrazole. Pour cela, nous avons utilisé le composé **140** synthétisé préalablement puis nous avons provoqué le déplacement du groupement THP en présence d'une quantité catalytique de TFA et de DHP (Schéma 92).²⁸¹ Puis, nous avons réalisé une deuxième fonctionnalisation du cycle pyrazole en présence de 1-iodométhane nous permettant d'accéder au composé **154**.

²⁸¹ McLaughlin, M.; Marcantonio, K.; Chen, G. Y.; Davies, I. W. *J. Org. Chem.* **2008**, 73 (11), 4309–4312.

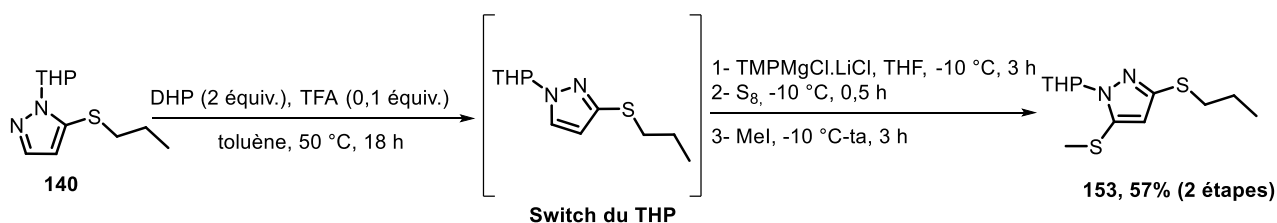


Schéma 92: Double thiofonctionnalisation du noyau pyrazole

Enfin, nous concentrerons nos efforts sur la synthèse d'une molécule décrite dans la littérature. Notre choix préliminaire se porta sur la synthèse de la cerlapirdine en raison de l'intérêt qu'elle suscita notamment dans la MA.¹⁵³ Actuellement, ce composé fait l'objet d'une synthèse contraignante (7 étapes) qui pourrait être optimisée par l'utilisation de notre méthode de thiofonctionnalisation (

Schéma 93 et 94).²⁸² De plus, nous envisagerons la synthèse de ligands indazoliques affins et sélectifs des 5-HT₄R en série sulfoxyde et sulfone.

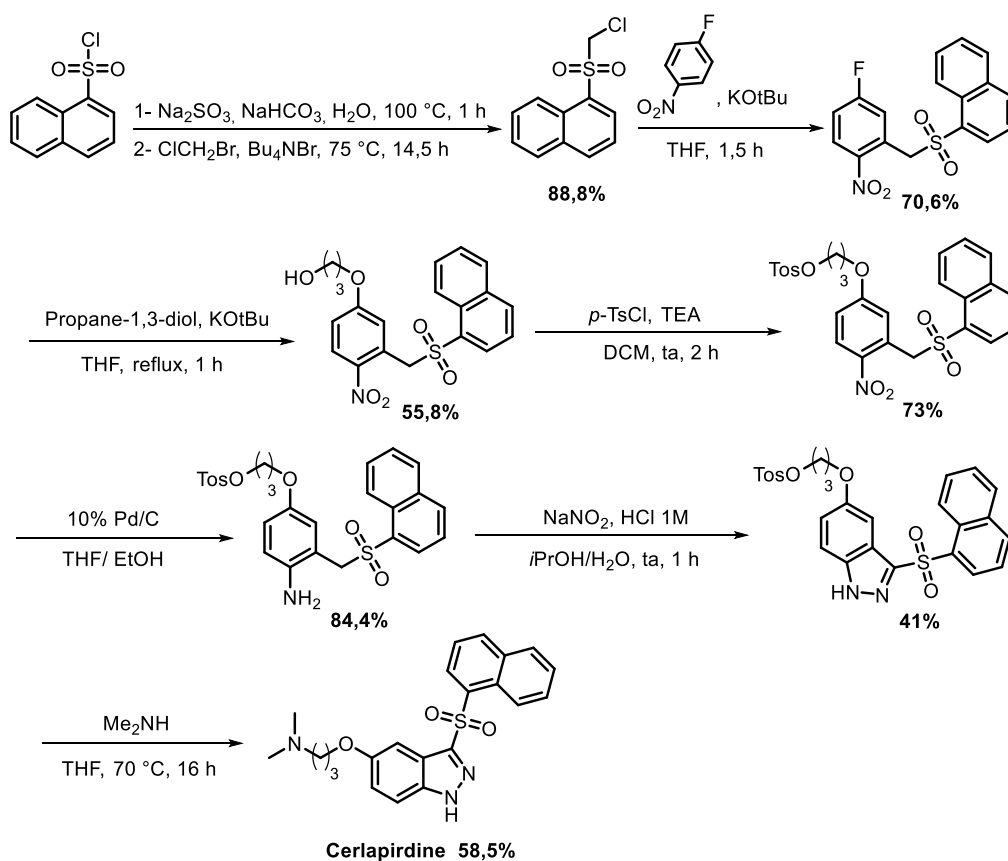


Schéma 93: Synthèse de la Cerlapirdine décrite dans la littérature

²⁸² Elokdah, H. M.; Greenfield, A. A.; Liu, K.; McDevitt, R. E.; *et al.*, **2007**. US20070037802A1

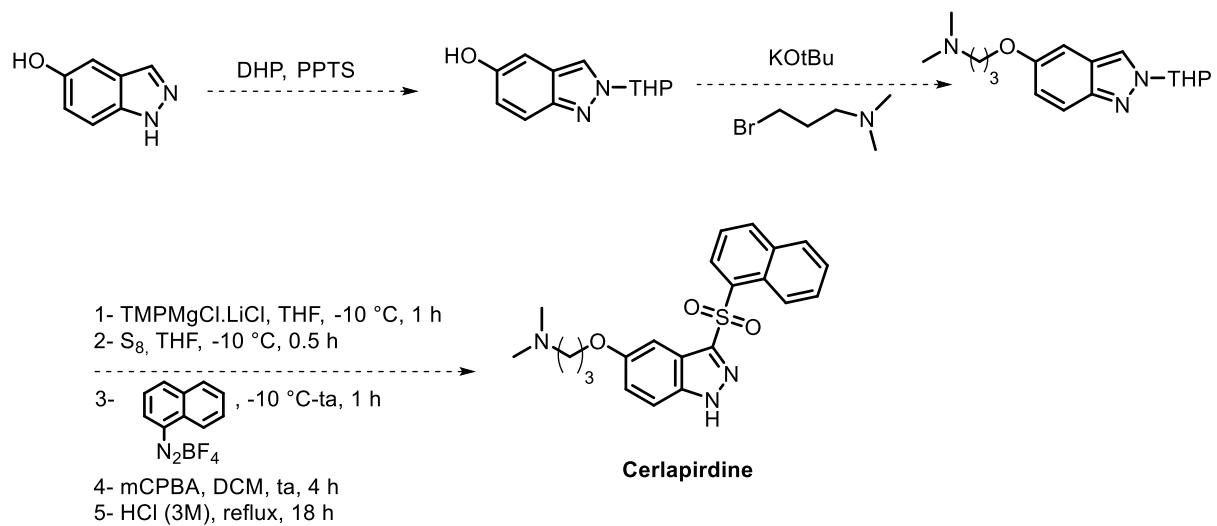


Schéma 94: Synthèse de la cerlapirdine envisagée par nos équipes

Conclusions et perspectives

Le développement de nouveaux radioligands affins et sélectifs des récepteurs 5-HT₄R constitue à ce jour un axe majeur de recherche et de santé publique. En effet, la découverte d'un potentiel outil diagnostique serait un réel bénéfice dans la prise en charge des démences et des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. De plus, associée aux nouvelles thérapies en cours de développement, elle permettrait d'augmenter la précocité des soins et limiter les séquelles invalidantes et définitives pour les patients.

Au cours de ces trois années de thèse, nous avons concentré nos efforts sur plusieurs projets réunis autour d'un thème général impliquant la synthèse de nouveaux ligands affins des 5-HT₄R en vue d'une utilisation en imagerie médicale TEP et TEMP. Nos expertises sur le sujet, nous ont amenés à mettre au point de nouvelles voies de synthèse des ligands indazoliques en série fluorée et iodée débouchant sur la constitution d'une large bibliothèque chimique.

En série fluorée, nous avons développé une voie de synthèse nous permettant d'accéder, en un minimum d'étape, à presque une trentaine de nouveaux ligands affins vis-à-vis des 5-HT₄R.

Dans un premier temps, nos efforts se sont concentrés sur la détermination d'une méthode permettant d'accéder sélectivement aux composés *N1*-alkylés. En effet, les résultats (tests *in vitro*) préliminaires, nous ont rapidement confirmé l'effondrement de l'affinité vis-à-vis des 5-HT₄R des ligands *N2*-alkylés, nous révélant le besoin majeur de trouver une méthode optimisée de formation des composés *N1*-alkylés. Celle-ci fut déterminée lors de la synthèse des ligands en série 6-fluoroindazole mettant en exergue l'intérêt de chaînes encombrantes en position C3 du cycle indazole et nous orientant vers une modification de notre voie de synthèse. Ces observations constituent une perspective intéressante notamment en série 4 et 5-fluoroindazole et sera au cœur des futures études au sein de notre laboratoire (Schéma 95).

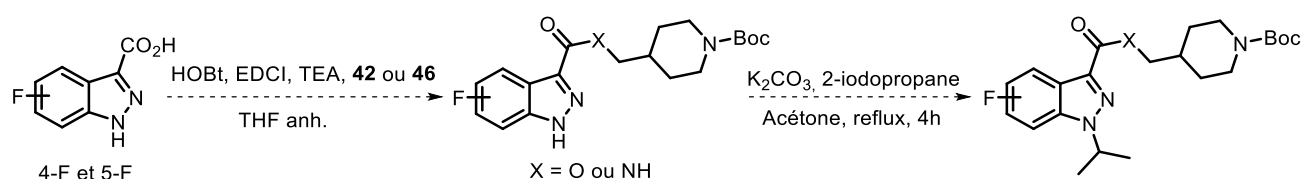


Schéma 95: Nouvelle voie de synthèse envisagée en série 4 et 5-fluoroindazole

Dans un deuxième temps, nos recherches se sont dirigées vers l'obtention d'une nouvelle méthode d'obtention des composés cétoniques mettant en jeu l'utilisation du TMPMgCl.LiCl et d'une chaîne portant un amide de Weinreb. Ces travaux nous ont permis d'obtenir nos précurseurs cétoniques avec des rendements bien supérieurs à ceux décrits précédemment en série iodoindazole (Schéma 96).

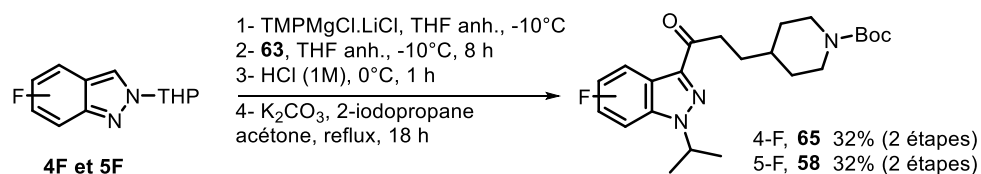


Schéma 96: Nouvelle voie d'obtention des composés cétoniques des séries 4 et 5-fluoroindazoles

Enfin, nous nous sommes orientés sur la formation des précurseurs convergents permettant d'accéder *via* une unique étape de fonctionnalisation de la pipéridine à une large gamme de molécules. Cette méthode fut utilisée pour synthétiser des esters, des amides et des cétones en série indazole. Elle compléta le panel de ligands *N*-propylé synthétisé préalablement par une voie non convergente (Schéma 97).

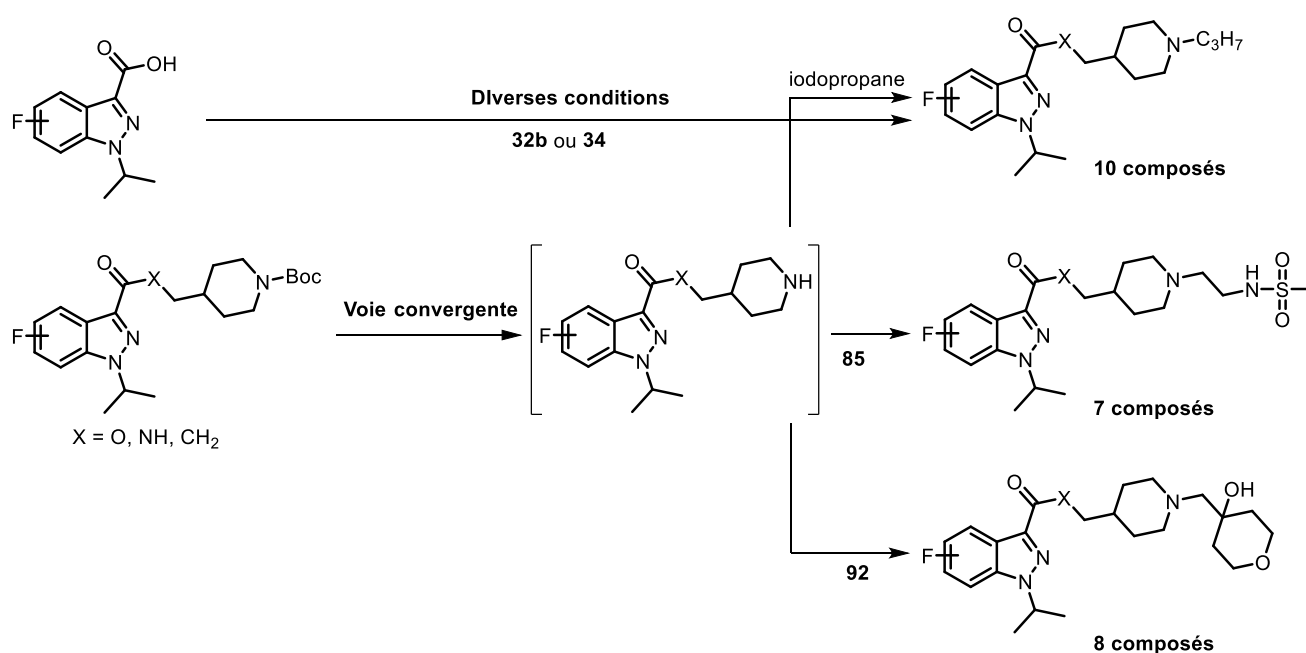


Schéma 97: Voie convergente et non convergente d'obtention des ligands en série fluoroindazole

Parmi ces ligands, treize d'entre eux ont présenté une excellente affinité pour les 5-HT₄R (<10 nM). Les analyses complémentaires nous ont orienté sur la sélection de trois leads en vue d'un radiomarquage au fluor-18. Actuellement, le **MR35806** constitue notre choix primaire puisqu'en plus de posséder des propriétés remarquables, ce dernier est facile d'accès *via* une voie de synthèse passant par des précurseurs bromés et aboutissant à l'obtention d'un précurseur Bpin. Le [¹⁸F]MR35806 est en cours de radiomarquage par nos collaborateurs du CEA d'Orsay.

De nombreuses perspectives sont en cours d'études concernant ce projet. D'une part, nous procéderons à la formation des précurseurs indispensables à l'obtention des radiotraceurs ayant une structure analogue aux deux autres leads sélectionnés : **MR35815** et **MR35821** (Schéma 98).

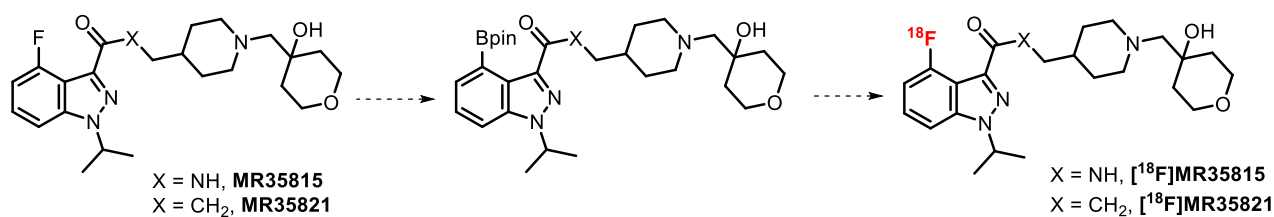


Schéma 98: Perspectives de synthèse de nouveaux radiotraceurs en série 4-fluoroindazole

De plus, nous envisagerons de déplacer le fluor sur la chaîne latérale afin de proposer une nouvelle série de radiotraceurs utilisable en imagerie TEP.

En série iodoindazole, nous avons complété les travaux initiés par le Dr. Lam permettant d'accéder à cinq nouveaux ligands des 5-HT₄R portant une chaîne oxane. Cette démarche multiparamétrique avait pour objectif d'optimiser la valeur de lipophilie tout en conservant l'affinité pour les 5-HT₄R. Nos recherches ont permis d'aboutir à un nouveau lead (**MR35824**) qui fera prochainement l'objet d'un radiomarquage à l'iode-125.

Enfin, nous avons mis au point une nouvelle méthode de thioétherification applicable à de nombreux hétérocycles azotés. Cette méthode a fait l'objet d'une extension vers des thioestérifications et l'obtention des composés sulfones et sulfoxydes sur le noyau pyrazole. Ce travail sera complété très prochainement et aboutira d'une part à la publication d'un article et d'autre part sera appliqué en série indazole afin de diversifier la bibliothèque de ligands affins des 5-HT₄R (Figure 62).

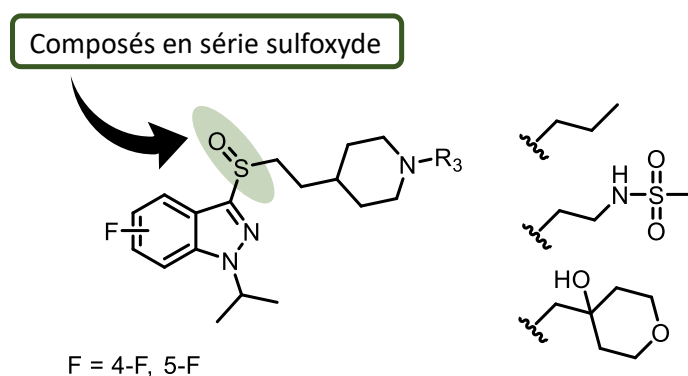


Figure 62: Nouvelle série proposée pour les 4- et 5-fluoroindazoles

Experimental section

Materials and methods

- **Reactants and reagents**

Chemical reagents were obtained from commercial sources and used without further purification, unless stated otherwise. Anhydrous solvents were distilled prior to use, with the exception of anhydrous DMF and THF which were purchased in sealed containers from commercial sources. Water or air sensitive reactions were performed under inert atmosphere, using dry solvents and all glassware were flame-dried under vacuum and flushed under N₂ prior to use. Column chromatography was performed on silica gel (60 Å, particle size 35-70 µm) or RP-18 (50 µm). All reported solvent mixture are volume measures. Flash chromatography was conducted on a VWR SPOT II Essential instrument with silica gel 60 (40-63 µm). Column size and flow rate followed the manufacturer's recommendations.

- **¹H, ¹³C NMR spectrometer**

¹H and ¹³C spectra were recorded, respectively, at 400 MHz and 100 MHz with a Jeol Lambda 400 MHz NMR spectrometer and a Bruker Advance 400 MHz spectrometer. CDCl₃ or DMSO-d₆ or CD₃OD or CD₃CN were used as solvents. ¹H and ¹³C chemical shift (δ) are quoted in parts per million (ppm) relative to residual solvent peaks as appropriate. The coupling constants (*J*) are given in Hertz (Hz). The NMR signals were designated as follows: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), h (heptuplet) m (multiplet), or a combination of the above.

- **Melting Point and Infra-Red apparatus**

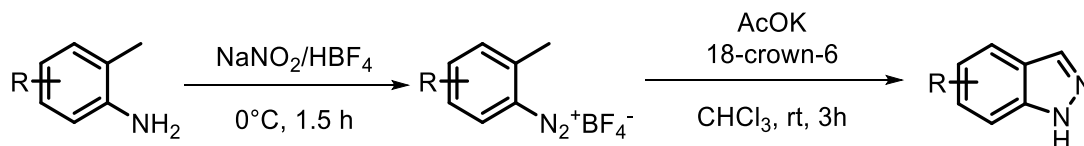
Melting points were determined on a Kofler melting point apparatus or measured on a Stuart Automatic Melting point SMP-50 apparatus. IR spectra were recorded on KBr discs with Perkin Elmer BX FT-IR. Absorptions are reported in wavenumbers (cm⁻¹) and only peaks of interest are reported.

- **Mass spectrometer**

High resolution mass spectra were recorder on a Waters Acquity UPLC H-ClassXevo G2-XS spectrometer using positive electrospray ionization (HRMS/ESI).

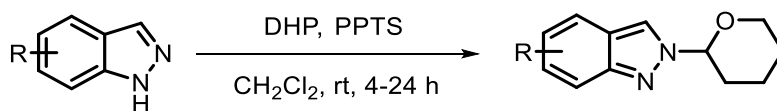
GENERAL PROCEDURES

General procedure A: Preparation of substituted indazoles from *o*-toluidine derivatives:



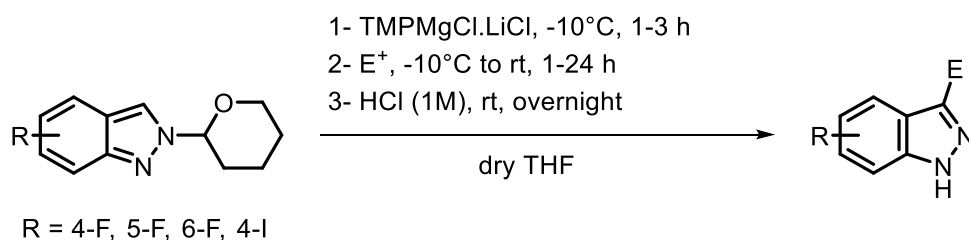
To a solution of *o*-toluidine derivative (1 equiv.) in fluoroboric acid (50% solution in water, 0.3 mL by mmol) was added dropwise a cooled solution of sodium nitrite (1.1 equiv.) in a minimum of water at 0°C. After the end of the addition, the mixture was stirred at 0°C for 1.5 h. The resulting precipitate was filtered, washed with diethyl ether and dried in a vacuum desiccator to obtain the diazonium tetrafluoroborate salt intermediate. The salt (1 equiv.) was added in one portion to a stirred mixture of dried potassium acetate (2 equiv.) and dicyclohexano-18-crown-6 (0.05 equiv.) in anhydrous chloroform (10 mL by mmol of salt). After 1.5 h, the reaction mixture was filtered, the precipitate was washed with chloroform and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel to afford the desired product.

General procedure B: Preparation of substituted tetrahydro-2*H*-pyrano-2-yl)-2*N*-indazole:



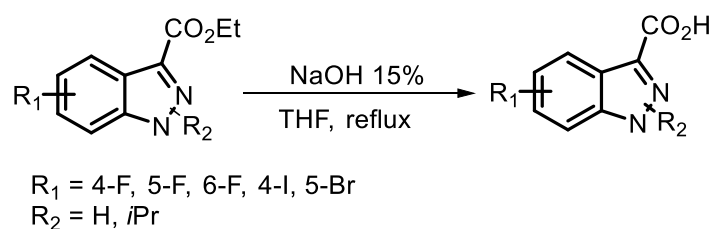
To a solution of substituted indazole (1 equiv.) in CH_2Cl_2 (10 ml/mmol) were added 3,4-dihydro-*H*-pyran (DHP) (2 equiv.) and pyridinium *p*-toluenesulfonate (PPTS) (0.1 equiv) under nitrogen. The mixture was stirred at RT for 4 - 24 h whereupon TLC analysis showed a complete conversion. The reaction was quenched with a saturated solution of sodium bicarbonate. The aqueous layer was extracted twice with CH_2Cl_2 . The organic layer was evaporated and purified by column chromatography on silica gel to give the *N*2- protected indazole.

General procedure C: Functionalization of *N*2-THP indazole at position 3 by TMPMgCl·LiCl :



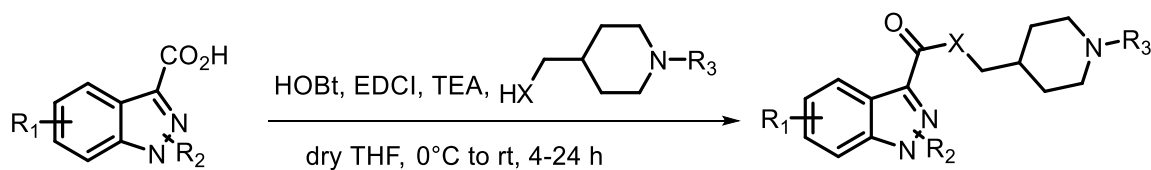
A dry and nitrogen flushed sealed tube, equipped with a magnetic stirrer, was charged with the protected indazole in anhydrous THF (2 mL by mmol). After cooling to -10 °C, TMPMgCl·LiCl (1.5 equiv., 1M in THF) was added dropwise. The mixture was stirred for 1-3 h at -10°C (the completion metalation was checked by LC-MS analysis (addition of a I₂ solution in THF)) and the corresponding electrophile (1.1-2.0 equiv.) was slowly added. After stirring for 30 min, the mixture was warmed up to RT and stirred for 1-24 h. 1M HCl was added carefully and the resulting mixture was stirred for 1-24 h. THF was removed by evaporation *in vacuo*, the residue was extracted by EtOAc. The organic layer was washed with NaHCO₃ and water, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel to afford the desired product.

General procedure D : Saponification of indazole-3-carboxylates :



In a round bottom flask were introduced a solution of indazole 3 carboxylate in THF and 15% NaOH (5 mL / mmol). The mixture was heated at reflux for 20 h. 2 M HCl was added dropwise until pH 2-3 was reached. The mixture was concentrated *in vacuo*, the precipitate was filtered and dried in a vacuum dryer.

General procedure E : Preparation of indazole esters and amides using EDCI and HOBt :



X = O, NH

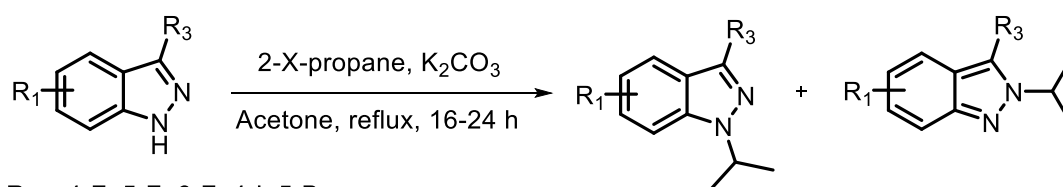
R₁ = 4-F, 5-F, 6-F, 4-I, 5-Br

R₂ = H, *i*Pr

R₃ = Boc, various chains

In a dry and nitrogen flushed bottom flask were introduced a solution of the corresponding 1*H*-indazole-3-carboxylic acid in anhydrous THF and TEA (1.1-2.6 equiv.) The mixture was cooled to 0°C, then EDCI or EDCI HCl (1.5-2 equiv.) was added and stirred for 5 min at 0°C. Then, HOBt (1.5-2 equiv.) was introduced and after 15 additional minutes at 0°C the corresponding amino or alcohol chain (1.1-1.5 equiv.) was introduced in a minimum of anhydrous THF. The resulting mixture was stirred at RT for 1-24h or heated at 50 - 60 °C. The advancement of the reaction was checked by TLC. The solvent was removed and the crude was purified by column chromatography on silica or alumina gel to afford the desired product.

General procedure F : Alkylation of 1*H*-indazole derivatives



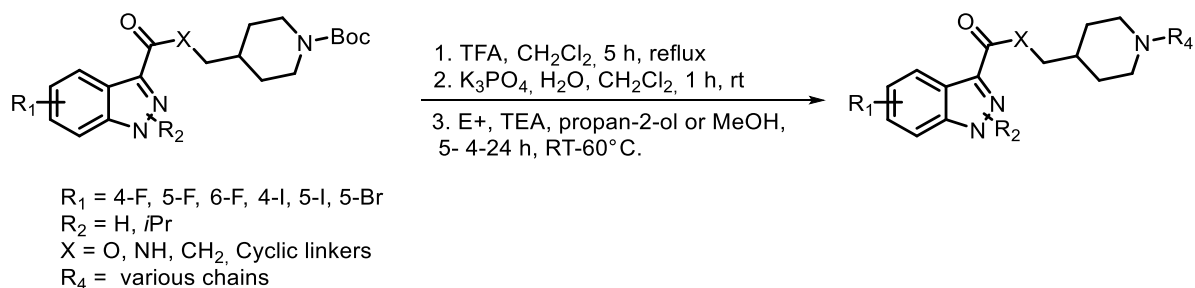
R₁ = 4-F, 5-F, 6-F, 4-I, 5-Br

R₃ = COOEt, I, Variable chain

X = Br or I

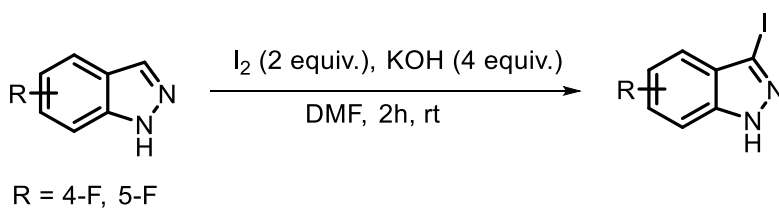
In a round bottom flask a solution of corresponding indazole in acetone (3-10 mL by mmol) was added K₂CO₃ (1.5-3 equiv.), and alkyl halide (2-4 equiv.). The mixture was stirred under reflux for 5-18 h. The advancement of the reaction was checked by TLC. When the reaction was complete, the mixture was cooled to RT, filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The crude was purified by column chromatography on silica gel to afford the expected N₁- or N₂-alkylated product.

General procedure G : Fonctionalization of NH-terminal piperidine



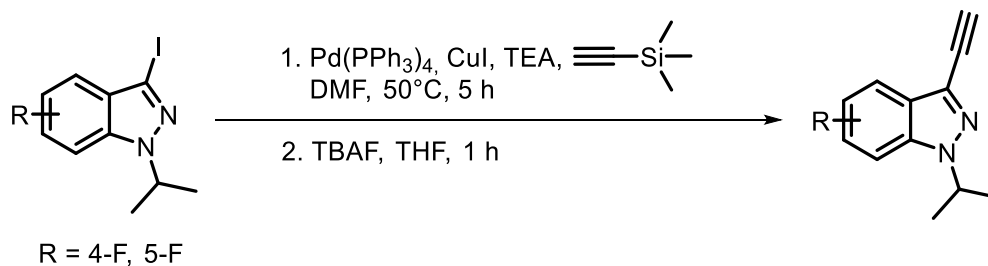
To a stirred solution of the precursor *tert*-butyl piperidine- indazole-3- carboxylate intermediate (1 equiv.) in CH₂Cl₂ was added TFA (10 equiv.). The mixture was refluxed for 0.5 -2 h and the solvent was removed *in vacuo*. The residue was taken up in CH₂Cl₂ and K₃PO₄ (10 equiv.) diluted in a minimum of H₂O was added. The mixture was stirred at RT for 1 h. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (3 times), and the combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated *in vacuo*. To the residue was added MeCN or propan-2-ol, the appropriate chain (1.1-3 equiv), TEA (1.5-2.2 equiv.) and the mixture was stirred at 60°C for 4-24 h. After cooling to RT, the solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel to give the expected product.

General procedure H : Iodination of indazole precursors



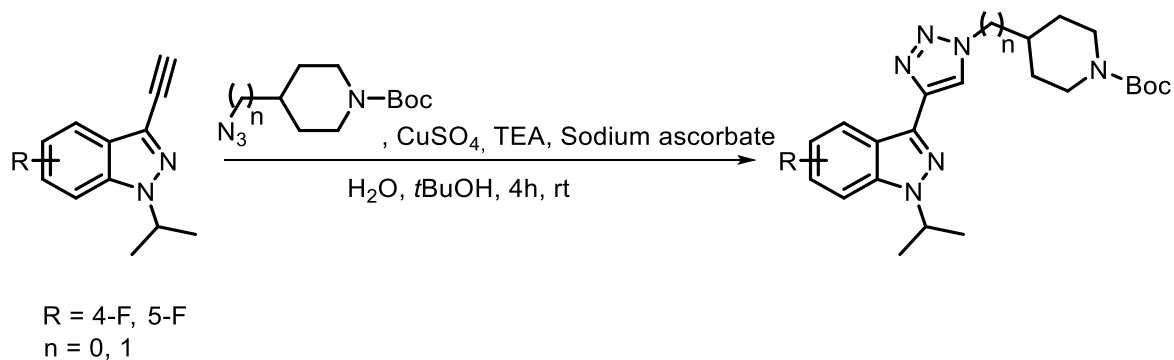
To a solution of indazole precursor (1 equiv.) in DMF (15 mL) were added successively I₂ (2 equiv.) and KOH (4 equiv.) at RT. After 2 h, the reaction mixture was poured into a sat. aq. NaHS₂O₃ solution and extracted with EtOAc (3 x 15 mL). The organic layers were washed with H₂O and brine, dried over Mg₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by column chromatography on silica gel to give the expected 3-iodoindazole compound.

General procedure I : Synthesis of alkyne indazole derivatives



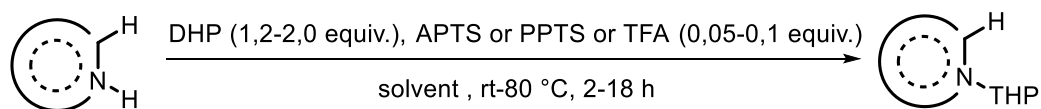
In a dry and nitrogen flushed bottom flask were introduced the iodo-indazole precursor (1 equiv.) in DMF (3 mL/ mmol), Pd(PPh₃)₄ (0.05 equiv.), CuI (0.1 equiv.) and TEA (1.5 equiv.). Then, after stirring for 15 min at RT, ethynyltrimethylsilane (3 equiv.) was added and the mixture was heated at 50°C for 5h. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by column chromatography on silica gel to give the TMS-alkyne intermediate which was deprotected with TBAF in THF (3 equiv.) and stirred at RT until the deprotection was complete (checked by LC-MS). Then, the solvent was evaporated and the residue was extracted with EtOAc (3 x 50 mL). The organic layer was washed with water, dried over MgSO₄, filtered and evaporated *in vacuo* to obtain the alkyne-indazole compound.

General procedure J: Click chemistry



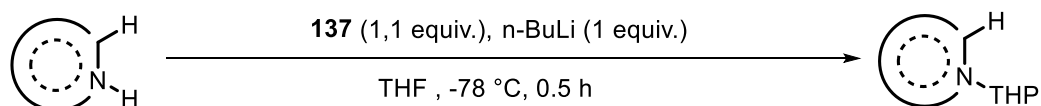
In a round bottom flask placed under N₂, were introduced 3-ethynyl-indazole precursor (1 equiv.) in a mixture of *t*BuOH (1 mL / 0.2 mmol) and water (1 mL / 0.2 mmol), azide chain (1.5 equiv.), CuSO₄ (0.35 equiv.), TEA (1,2 equiv.) and sodium ascorbate (0.5-2 equiv.). The mixture was stirred at RT for 4 h, then the organic solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was extracted with EtOAc (3 x 10 mL) and the organic layers were washed with water, dried over MgSO₄, filtered and evaporated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel affording the desired compound.

General procedure K: Functionalization of THP-on nitrogenous heterocycles with DHP



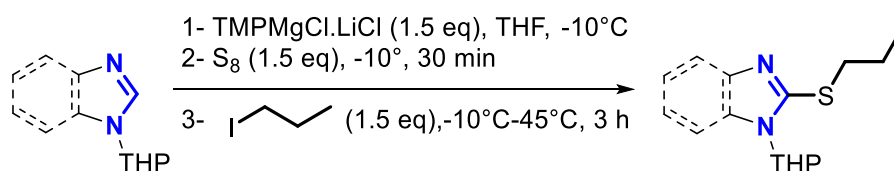
In a round bottom flask were added the nitrogenous heterocycle (1 equiv.), DHP (1,2-2 equiv.) and a catalytic quantity of APTS or PPTS or TFA (0,05-0,1 equiv) in various solvent. The mixture was stirred 2- 18h at 50-80°C and the solvent was evaporated *in vacuo*. The residue was extracted 3 in EtOAc/water (3 x 10 mL) and the combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The crude was purified by column chromatography on silica gel to afford the desired THP-product.

General procedure L: Functionalization of THP-on nitrogenous heterocycles with Cl-THP **137**



In a round bottom flask was added the nitrogenous heterocycle (1 equiv.) in THF (2.5 mL/ 1 mmol). The reaction was cooled to -78°C, then n-BuLi (1 equiv.) was added. After 15 min of stirring at -78°C, Cl-THP **137** (1.1 equiv.) was added slowly and the reaction was stirred 0.5 h at -78°C. The crude mixture was warmed up to RT and it was quenched with a sat. aq. of NH₄Cl (5 mL). The solvent was evaporated *in vacuo* and the aqueous layer was extracted three times in DCM/H₂O. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel to afford the desired THP product.

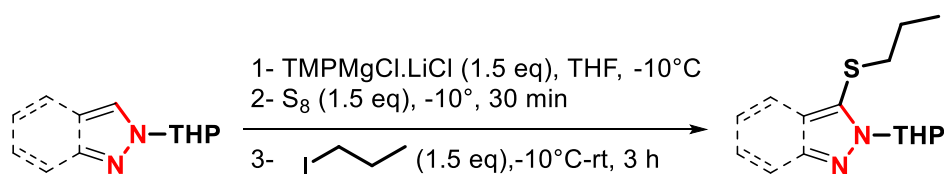
General method M: Preparation of thioether derivatives in N=C-N system.



A dry and nitrogen flushed sealed tube, equipped with a magnetic stirrer, was charged with the protected nitrogen heterocycles (N=C-N system) in anhydrous THF (1 mL by 100 mg). After cooling to

-10 °C, $\text{TMPMgCl}\cdot\text{LiCl}$ (1.5 equiv., 1M in THF) was added dropwise. The mixture was stirred for 1-3 h (The completion metalation was checked by NMR analysis after addition of a I_2 solution in THF) at -10°C and S_8 (1.5 equiv.) was added. After 0.5h of stirring at -10°C, 1-iodopropane (1.5 equiv) was added and the mixture was stirred during 30 min at -10°C. Then, the mixture was warmed up to 45°C and stirred for 2-24 h. The reaction was quenched with water (2 ml) and THF was removed by evaporation *in vacuo*. The residue was extracted by EtOAc (3 times). The organic layer was washed with water, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel to afford the desired product.

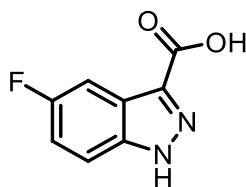
General method N: Preparation of thioether derivatives in **N–N–C** system.



A dry and nitrogen flushed sealed tube, equipped with a magnetic stirrer, was charged with the protected nitrogen heterocycles (**N–N–C** system) in anhydrous THF (1 mL by mmol). After cooling to -10 °C, $\text{TMPMgCl}\cdot\text{LiCl}$ (1.5 equiv., 1M in THF) was added dropwise. The mixture was stirred for 1-3 h (The completion metalation was checked by NMR analysis after addition of a I_2 solution in THF) at -10°C and the S_8 (1.5 equiv.) was added. After 0.5 h of stirring at -10°C, 1-iodopropane (1.5 equiv) was added and the mixture was stirred during 30 min at -10°C. Then, the mixture was warmed up to RT and stirred for 2-24 h. The reaction was quenched with water (2 ml) and THF was removed by evaporation *in vacuo*. The residue was extracted by EtOAc. The organic layer was washed with water, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel to afford the desired product.

Description and analytical data

5-fluoro-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **12**



Molecular Weight: 180,14 g.mol⁻¹

Formula: C₈H₅FN₂O₂

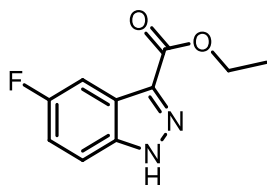
A solution of 5-fluoro-isatin **10** (3.0 g, 18.2 mmol) in NaOH (800 mg, 19.1 mmol) in 30 ml of water was stirred at 50°C for 10 min. The solution was cooled to 0°C, sodium nitrite (1.2 g, 18.2 mmol) was added and the mixture was stirred for 20 min. A solution of concentrated sulfuric acid (1.8 ml, 34.5 mmol) in water (30 mL) was added so that the temperature remained between 0 and 4°C. The mixture was stirred at 0 - 5°C for 20 min, then a solution of SnCl₂ (8.3 g, 43.7 mmol) in concentrated HCl (16 mL) was added dropwise. The mixture was stirred for 30min at 0°C then at RT for 24 h. The crystals were filtered off, washing with water, to obtain the desired 5-fluoro-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **12** (3.17 g, 97 %) as a yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.97 (s, 1H), 7.77-7.70 (m, 2H), 7.33 (td, *J* = 9.1, 2.1 Hz, 1H). COOH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.7, 158.4 (*J* = 238 Hz) 138.3, 136.2, 122.7 (*J* = 11 Hz), 116.3 (*J* = 28 Hz), 113.2 (*J* = 9 Hz), 105.2 (*J* = 24 Hz).

Data are consistent with literature values. Schmidt, A.; Snovydyvych, B.; Habeck, T.; Dröttboom, P.; Gjika, M.; Adam, A. *N*-Heterocyclic Carbenes of 5-Haloindazoles Generated by Decarboxylation of 5-Haloindazolium-3-Carboxylates. *European J. Org. Chem.* **2007**, 29, 4909–4916.

Ethyl 5-fluoro-1*H*-indazole-3-carboxylate **13**



Molecular Weight: 208,19 g.mol⁻¹

Formula: C₁₀H₉FN₂O₂

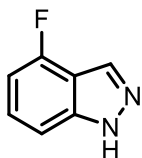
In a round bottom flask were introduced 5-fluoro-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **12** (1.2 g, 6.66 mmol) in ethanol (35 mL) and a catalytic quantity of sulfuric acid (10 drops). The mixture was heated at 65 °C for 5 h. Ethanol was concentrated *in vacuo*, the residue was taken up in EtOAc, washed with water and the organic layer was dried on MgSO₄, filtered and evaporated *in vacuo*. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 3/1) to give ethyl 5-fluoro-1*H*-indazole-3-carboxylate **13** (1.0 g, 72%) as a yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 11.39 – 11.30 (m, 1H), 7.85 (dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, 1H), 7.64 (dd, *J* = 9.1, 4.1 Hz, 1H), 7.31 – 7.20 (m, 1H), 4.54 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.50 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 163.1, 159.4 (d, *J* = 241Hz), 138.6, 136.3 (d, *J* = 5 Hz), 122.5 (d, *J* = 11 Hz), 117.2 (d, *J* = 27 Hz), 113.5 (d, *J* = 9 Hz), 105.7 (d, *J* = 25 Hz), 61.3, 14.4.

Data are consistent with literature values. Buu-Hoi, N. P.; Hoeffinger, J. P.; Jacquignon, P. Indazole-3-Carboxylic Acids and Their Derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* **1964**, *1* (5), 239–241.

4-fluoro-1*H*-indazole **22a**



Molecular Weight: 136,13 g.mol⁻¹

Formula: C₇H₅FN₂

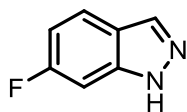
Starting from 3-fluoro-2-methyl-aniline **21a** (5.0 g, 40.0 mmol), and using the General procedure A, the crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 6/1) to afford the desired product **22a** as an orange solid (2.4 g, 44 %).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 11.21 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.39 – 7.29 (m, 2H), 6.82 (ddd, *J* = 10.0, 6.6, 1.6 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 156.1 (d, *J* = 252 Hz), 142.9 (d, *J* = 10 Hz), 131.6, 129.3, 128.1 (d, *J* = 8 Hz), 105.9 (d, *J* = 4 Hz), 105.5 (d, *J* = 18 Hz).

Data are consistent with literature values. Boulouard, M.; Schumann-Bard, P.; Butt-Gueulle, S.; Lohou, E.; Stiebing, S.; Collot, V.; Rault, S. 4-Substituted Indazoles as New Inhibitors of Neuronal Nitric Oxide Synthase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17 (11), 3177–3180

6-fluoro-1*H*-indazole **22b**



Molecular Weight: 136,13 g.mol⁻¹

Formula: C₇H₅FN₂

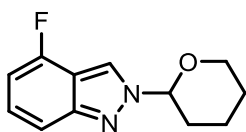
Starting from 5-fluoro-2-methylaniline **21b** (6.2 g, 49.5 mmol), and using the General procedure A, the crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/ EtOAc 6/1) to afford the desired product **22b** as brown solid (3.81 g, 56 %).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 10.54 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.71 (dd, *J* = 8.8, 5.1 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.96 (td, *J* = 9.0, 2.1 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.7 (d, *J* = 245 Hz), 140.5 (d, *J* = 13 Hz), 135.2, 122.5 (d, *J* = 11 Hz), 120.3, 111.3 (d, *J* = 26 Hz), 95.6 (d, *J* = 26 Hz).

Data are consistent with literature values. Slade, D. J.; Pelz, N. F.; Bodnar, W.; Lampe, J. W.; Watson, P. S. Indazoles: Regioselective Protection and Subsequent Amine Coupling Reactions. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (16), 6331–6334.

4-fluoro-2-(oxan-2-yl)-2*H*-indazole **23a**



Molecular Weight: 220,24 g.mol⁻¹

Formula: C₁₂H₁₃FN₂O

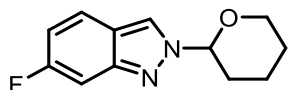
Starting from 4-fluoro-1*H*-indazole **22a** (1.0 g, 7.34 mmol), using the General procedure B, the crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 6/1) to afford the product **23a** as an orange oil (1.31 g, 81 %).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.24 (s, 1H), 7.50 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.19 (ddd, *J* = 8.7, 7.4, 5.3 Hz, 1H), 6.68 (dd, *J* = 10.4, 7.4 Hz, 1H), 5.68 (dd, *J* = 8.7, 3.4 Hz, 1H), 4.13 (ddd, *J* = 10.4, 4.3, 2.5 Hz, 1H), 3.78 (ddd, *J* = 13.6, 9.0, 3.0 Hz, 1H), 2.28 – 2.13 (m, 2H), 2.10 – 2.00 (m, 1H), 1.85 – 1.61 (m, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 155.9 (d, *J* = 253 Hz), 151.0 (d, *J* = 6 Hz), 126.5 (d, *J* = 7 Hz), 118.6 (d, *J* = 4 Hz), 114.0 (d, *J* = 5 Hz), 113.5 (d, *J* = 20 Hz), 104.5 (d, *J* = 17 Hz), 89.2, 68.1, 31.6, 25.0, 22.1.

Data are consistent with literature values. Slade, D. J.; Pelz, N. F.; Bodnar, W.; Lampe, J. W.; Watson, P. S. Indazoles: Regioselective Protection and Subsequent Amine Coupling Reactions. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (16), 6331–6334.

6-fluoro-2-(oxan-2-yl)-2*H*-indazole **23b**



Molecular Weight: 220,24 g.mol⁻¹

Formula: C₁₂H₁₃FN₂O

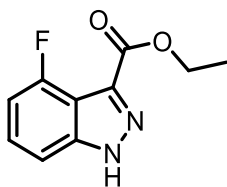
Starting from 6-fluoro-1*H*-indazole **22b** (2.25 g, 16.5 mmol), using the General procedure B, the crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 10/1) to afford the desired product **23b** as an orange solid (2.46 g, 67 %).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.15 (s, 1H), 7.63 (dd, *J* = 9.1, 5.4 Hz, 1H), 7.29 (dd, *J* = 10.1, 2.2 Hz, 1H), 6.88 (td, *J* = 9.2, 2.2 Hz, 1H), 5.63 (dd, *J* = 8.5, 3.8 Hz, 1H), 4.18–4.03 (m, 1H), 3.81–3.69 (m, 1H), 2.25–2.13 (m, 2H), 2.09–1.99 (m, 1H), 1.79–1.70 (m, 2H), 1.68–1.62 (m, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 162.0 (d, *J* = 243 Hz), 148.6 (d, *J* = 13 Hz), 122.6 (d, *J* = 11 Hz), 121.8, 118.9, 113.9 (d, *J* = 28 Hz), 101.1 (d, *J* = 23 Hz), 89.1, 68.2, 31.4, 25.0, 22.2.

Data are consistent with literature values. Slade, D. J.; Pelz, N. F.; Bodnar, W.; Lampe, J. W.; Watson, P. S. Indazoles: Regioselective Protection and Subsequent Amine Coupling Reactions. *J. Org. Chem.* 2009, 74 (16), 6331–6334.

Ethyl 4-fluoro-1*H*-indazole-3-carboxylate **24a**



Molecular Weight: 208,19 g.mol⁻¹

Formula: C₁₀H₉FN₂O₂

Starting from 4-fluoro-2-(oxan-2-yl)-2*H*-indazole **23a** (1.2 g, 5.45 mmol) using the General procedure C, after 1 h of metalation at -10°C, ethyl chloroformate (0.78 ml, 8.18 mmol) was added slowly and the mixture was warmed up to RT and stirred for 2 h. A solution of 1 M HCl was added (10 mL) and the mixture was stirred for 24 h. Then, the general procedure was applied. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 6/1) to afford the desired product **24a** as an orange solid (1.13 g, 99 %).

Mp: 143 °C

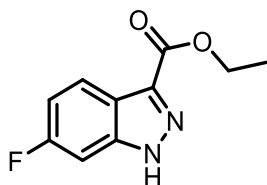
IR (KBr) ν 3292, 2981, 2927, 1723, 1638, 1587, 1523, 1482, 1450, 1425, 1387, 1352, 1282, 1260, 1234, 1155, 1041, 1025, 872, 777, 698, 618 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14.16 (s, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.44 (td, *J* = 8.3, 7.4, 4.4 Hz, 1H), 7.04 (dd, *J* = 10.9, 7.4 Hz, 1H), 4.36 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.3, 154.3 (d, *J* = 254 Hz), 143.9 (d, *J* = 8 Hz), 134.2, 128.0 (d, *J* = 7 Hz), 111.2 (d, *J* = 22 Hz), 107.7, 107.5, 60.6, 14.2.

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₁₀H₉FN₂O₂Na [M+Na]⁺ 231,0546 found 231,0546.

Ethyl 6-fluoro-1*H*-indazole-3-carboxylate **24b**



Molecular Weight: 208,19 g.mol⁻¹

Formula: C₁₀H₉FN₂O₂

Starting from 6-fluoro-2-(oxan-2-yl)-2*H*-indazole **23b** (1.67 g, 7.6 mmol) , using the General procedure C, after 1 h of metalation, ethyl chloroformate (1.1 mL, 11.4 mmol) was slowly added, warmed up to RT and stirred for 1.5 h. After addition of 2M HCl (10 mL) the mixture was stirred overnight. After the work up follow the general procedure and the residue was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/ EtOAc 10/1) to afford the desired product **24b** as beige solid (1.0 g, 63 %).

Mp: 180 °C.

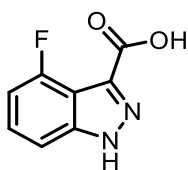
IR (KBr) ν 3283, 2982, 2940, 2907, 1721, 1630, 1510, 1478, 1466, 1423, 1387, 1332, 1284, 1259, 1225, 1134, 1112, 1063, 861, 813, 735, 618 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 11.77 (s, 1H), 8.18 (dd, *J* = 8.8, 5.2 Hz, 1H), 7.37 (dd, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 1H), 7.11 (td, *J* = 9.1, 2.1 Hz, 1H), 4.55 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.50 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 163.1, 162.6 (d, *J* = 246 Hz), 142.0 (d, *J* = 13 Hz), 136.7, 123.4 (d, *J* = 10 Hz), 119.2, 113.5 (d, *J* = 26 Hz), 97.4 (d, *J* = 27 Hz), 61.5, 14.6.

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₁₀H₉FN₂O₂ [M+H]⁺ 209.0726 found 209.0728.

4-fluoro-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **25a**



Molecular Weight: 180,14 g.mol⁻¹

Formula: C₈H₅FN₂O₂

Starting from ethyl 4-fluoro-1*H*-indazole-3-carboxylate **24a** (800 mg, 3.8 mmol) and using the General procedure D, the desired product **25a** was obtained as a beige solid (690 mg, 99 %)

Mp: >266°C.

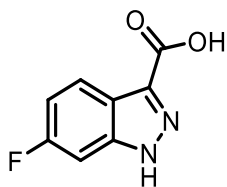
IR (KBr) ν 3200, 2920, 1694, 1640, 1590, 1532, 1370, 1285, 1250, 1174, 1043, 875, 777 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 9.01 – 8.93 (m, 2H), 8.52 (ddd, *J* = 10.8, 4.9, 3.5 Hz, 1H). NH and COOH signals are missing.

¹³C NMR (100 MHz, Methanol-*d*₄) δ 163.4, 155.3 (d, *J* = 256 Hz), 144.4 (d, *J* = 9 Hz), 135.0, 128.0 (d, *J* = 8 Hz), 111.5 (d, *J* = 22 Hz), 107.3 (d, *J* = 20 Hz), 106.6 (d, *J* = 5 Hz).

HRMS/ESI *m/z* calcd C₈H₆FN₂O₂ [M+H]⁺ 181,0413 found 181,0413.

6-fluoro-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **25b**



Molecular Weight: 180,14 g.mol⁻¹

Formula: C₈H₅FN₂O₂

According to the general procedure D, the saponification of ethyl 6-fluoro-1*H*-indazole-3-carboxylate **24b** (180 mg, 0.86 mmol) afford the desired product **25b** as a white solid. (135 mg, 87 %).

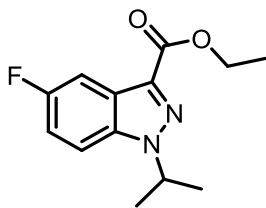
IR (KBr) ν 2832, 1803, 1636, 1527, 1440, 1272, 1230, 1114, 852, 833 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.19 (dd, J = 8.8, 5.2 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 9.2, 2.0 Hz, 1H), 7.13 (td, J = 9.1, 2.4 Hz, 1H). signals due to COOH and NH are missing,

¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 164.5, 162.6 (d, J = 243 Hz), 141.7, (d, 13 Hz), 137.1, 123.3 (d, J = 11 Hz), 119.2, 113.5 (d, J = 26 Hz), 95.6 (d, J = 27 Hz).

HRMS/ESI: m/z calcd C₈H₆FN₂O₂ [M+H]⁺ 181.0413 found 181.0412.

Ethyl 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1H-indazole-3-carboxylate **26**



Molecular Weight: 250,27 g.mol⁻¹

Formula: C₁₃H₁₅FN₂O₂

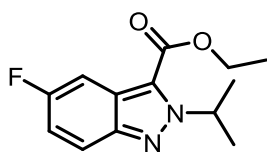
Ethyl 5-fluoro-1H-indazole-3-carboxylate **13** (2.90 g, 14.0 mmol) in acetone (50 ml) was reacted with K₂CO₃ (2.87 g, 20.8 mmol) and 2-bromopropane (3.92 mL, 41.8 mmol) as described in the general procedure F for 15 h. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 6/1) to afford the desired product **26** as a yellow oil (1.55 g, 45 %).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.73 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 7.39 (dd, *J* = 9.2, 4.1 Hz, 1H), 7.09 (td, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 4.84 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.55 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.39 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.5, 159.1 (d, *J* = 241 Hz), 136.5, 134.4 (d, *J* = 5 Hz), 124.1 (d, *J* = 11 Hz), 116.1 (d, *J* = 28 Hz), 110.9 (d, *J* = 10 Hz), 106.4 (d, *J* = 24 Hz), 60.8, 52.1, 21.8 (2C), 14.4.

Data are consistent with literature values. Ishibashi, A.; Kato, T.; Kawamura, K.; Mihara S. *et al.* Indazole Derivatives, **2011**. WO2007010390A1

Ethyl 5-fluoro-2-(propan-2-yl)-2H-indazole-3-carboxylate **27**



Molecular Weight : 250,27 g.mol⁻¹

Formula : C₁₃H₁₅FN₂O₂

Ethyl 5-fluoro-1H-indazole-3-carboxylate **13** (500 mg, 2.4 mmol) in acetone (17 ml) was reacted with K₂CO₃ (0.50 g, 3.6 mmol) and 2-bromopropane (0.68 mL, 7.2 mmol) as described in the General procedure F for 15 h. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 6/1) to afford the desired product **27** as a yellow solid (360 mg, 60 %).

Mp : 67.5 °C.

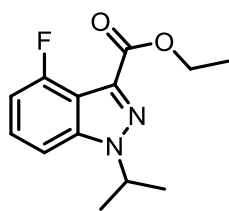
IR (KBr) ν 2973, 1709, 1512, 1458, 1428, 1386, 1316, 1250, 1200, 1173, 1093, 1072, 983, 859, 809, 774, 750, cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.77 (ddd, *J* = 9.4, 4.7, 0.7 Hz, 1H), 7.60 (ddd, *J* = 9.4, 2.5, 0.7 Hz, 1H), 7.12 (td, *J* = 9.1, 2.5 Hz, 1H), 5.95 (hept, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.47 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.61 (s, 6H), 1.49 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 160.4 (d, *J* = 241 Hz), 160.1, 144.5, 123.6 (d, *J* = 13 Hz), 123.5 (d, *J* = 16 Hz), 120.5 (d, *J* = 10 Hz), 117.2 (d, *J* = 29 Hz), 104.8 (d, *J* = 26 Hz), 61.1, 53.9, 22.9 (2C), 14.4.

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₁₃H₁₆FN₂O₂ [M+H]⁺ 251.1196 found 251.1195

Ethyl 4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **28**



Molecular Weight: 250,27 g.mol⁻¹

Formula: C₁₃H₁₅FN₂O₂

Ethyl 4-fluoro-1*H*-indazole-3-carboxylate **24a** (2.2 g, 10.5 mmol) was reacted with K₂CO₃ (2.18 g, 15.85 mmol) and 2-iodopropane (1.58 mL, 15.85 mmol) as described in the General procedure F for 15 h. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 6/1) to afford the desired product **28** as an orange oil (1.4 g, 53 %).

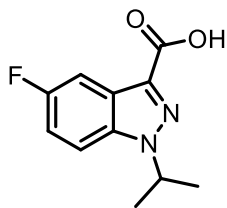
IR (KBr) ν 2982, 2937, 1725, 1626, 1507, 1207, 1153, 1073, 772 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.36 – 7.21 (m, 2H), 6.89 (ddd, *J* = 10.6, 7.5, 0.9 Hz, 1H), 4.88 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.46 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.61 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.42 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.0, 155.5 (d, *J* = 258 Hz), 142.4 (d, *J* = 8 Hz), 133.7 (d, *J* = 5 Hz), 127.3 (d, *J* = 8 Hz), 113.1 (d, *J* = 21 Hz), 107.9 (d, *J* = 21 Hz), 105.7 (d, *J* = 5 Hz), 61.3, 52.1, 21.8 (2C), 14.3.

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₁₃H₁₅FN₂O₂Na [M+ Na]⁺ 273.1015 found 273.1015.

5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **29**



Molecular Weight : 222,22 g.mol⁻¹

Formula : C₁₁H₁₁FN₂O₂

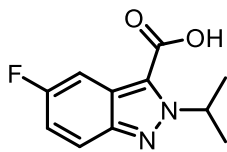
According to the General procedure D, the saponification of ethyl 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **26** (800 mg, 3.2 mmol) afford the product **29** as a white solid (700 mg, 98 %).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.88 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.49 (dd, *J* = 9.1, 4.0 Hz, 1H), 7.29 – 7.18 (m, 1H), 4.94 (hept, *J* = 6.6 Hz, 1H), 1.67 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H). OH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 166.5, 159.5 (d, *J* = 242 Hz), 136.9, 133.6, 124.51 (d, *J* = 11 Hz), 116.6 (d, *J* = 28 Hz), 111.1 (d, *J* = 10 Hz), 106.6 (d, *J* = 25 Hz), 52.2, 22.0 (2C).

Data are consistent with literature values. Ishibashi, A.; Kato, T.; Kawamura, K.; Mihara S. *et al.* Indazole Derivatives, **2011**. WO2007010390A1

5-fluoro-2-(propan-2-yl)-2H-indazole-3-carboxylic acid **30**



Molecular Weight : 222.22 g.mol⁻¹

Formula : C₁₁H₁₁FN₂O₂

According to the General method D, the saponification of ethyl 5-fluoro-2-(propan-2-yl)-2H-indazole-3-carboxylate **27** (860 mg, 3.4 mmol) afford the product **30** as a light beige solid (740 mg, 97 %).

Mp : 179°C.

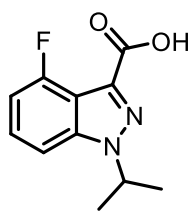
IR (KBr) ν 2982, 2935, 2711, 1679, 1515, 1487, 1197, 1281, 1073, 863 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.91 (dd, *J* = 9.5, 4.7, 0.7 Hz, 1H), 7.79 (dd, *J* = 9.5, 2.6, 0.8 Hz, 1H), 7.33 (td, *J* = 9.5, 2.6 Hz, 1H), 6.18 (h, *J* = 6.6 Hz, 1H), 1.75 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H). OH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Methanol-*d*₄) δ 161.1, 160.1 (d, *J* = 241 Hz), 144.5, 124.4 (d, *J* = 8 Hz), 123.5 (d, *J* = 12 Hz), 119.8 (d, *J* = 10 Hz), 116.9 (d, *J* = 29 Hz), 104.3 (d, *J* = 26 Hz), 53.5, 21.7 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₁₁H₁₂FN₂O₂ [M+H]⁺ 223.0883 found 223.0886.

4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **31**



Molecular Weight: 222,22 g.mol⁻¹

Formula: C₁₁H₁₁FN₂O₂

According to the General procedure D, the saponification of ethyl 4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **28** (400 mg, 1.6 mmol) afford the product 4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **31** as a white solid (300 mg, 84 %).

Mp: 166°C.

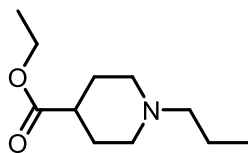
IR (KBr) ν 3448, 2978, 2944, 2916, 1681, 1626, 1225, 1044, 769 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.44 – 7.35 (m, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.06 – 6.90 (m, 1H), 4.94 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 1.66 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H). OH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 163.7, 155.5 (d, *J* = 258 Hz), 143.0 (d, *J* = 8 Hz), 132.7 (d, *J* = 5 Hz), 128.0 (d, *J* = 8 Hz), 113.1 (d, *J* = 22 Hz), 108.5 (d, *J* = 20 Hz), 105.8 (d, *J* = 5 Hz), 52.1, 21.9 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₁₁H₁₂FN₂O₂ [M+H]⁺ 223.0883 found 223.0880.

Ethyl 1-propylpiperidine-4-carboxylate **32a**



Molecular Weight: 199.29 g.mol⁻¹

Formula: C₁₁H₂₁NO₂

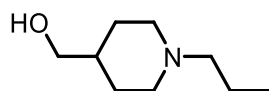
To a stirred solution of ethyl isonipecotate (4.9 g, 31.4 mmol) in EtOH (80 mL) was added K₂CO₃ (8.3 g, 60.0 mmol) and 1-iodopropane (4.8 mL, 50.0 mmol). The mixture was heated at 70°C for 18h, cooled to RT and filtered. The filtrate was evaporated and the residue was taken up in EtOAc, washed with water, dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure affording the ethyl 1-propylpiperidine-4-carboxylate **32a** as an orange oil (5.2 g, 83 %).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.11 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.87 (d, *J* = 11.6 Hz, 2H), 2.32 – 2.19 (m, 3H), 2.01 – 1.93 (m, 2H), 1.88 (dd, *J* = 13.2, 3.5 Hz, 2H), 1.75 (qd, *J* = 11.4, 3.6 Hz, 2H), 1.49 (dq, *J* = 15.0, 7.4 Hz, 2H), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 175.3, 61.1, 60.4, 53.2 (2C), 41.4, 28.4 (2C), 20.3, 14.4, 12.1.

Data consistent with literature values. Fresneau, N.; Dumas, N.; Tournier, B. B.; Fossey, C.; Ballandonne, C.; Lesnard, A.; Millet, P.; Charnay, Y.; Cailly, T.; Bouillon, J.-P.; Fabis, F. Design of a Serotonin 4 Receptor Radiotracer with Decreased Lipophilicity for Single Photon Emission Computed Tomography. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *94*, 386–396.

(1-propylpiperidin-4-yl)methanol **32b**



Molecular Weight : 157.26 g.mol⁻¹

Formula : C₉H₁₉NO

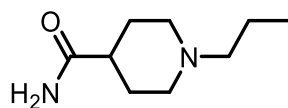
Ethyl 1-propylpiperidine-4-carboxylate **32a** (3.1 g, 15.5 mmol) was diluted in dry THF (80 mL) and cooled to 0°C. LiAlH₄ (645 mg, 17.0 mol) was added slowly in small portions and the mixture was stirred for 2 h at 0°C. The mixture was quenched by sequential addition of water (0.7 mL), 15% NaOH solution (0.7 mL) and water (2.1 mL). The mixture was stirred at RT for 3 h, then the precipitate was filtered through in celite pad and washed with THF. The filtrate was concentrated to give the desired product (1-propylpiperidin-4-yl)methanol **32b** as a white solid (2.4 g, 98 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.46 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.93 (d, *J* = 11.6 Hz, 2H), 2.31 – 2.21 (m, 2H), 2.16 (s, 1H), 1.89 (td, *J* = 11.8, 2.4 Hz, 2H), 1.71 (d, *J* = 13.7 Hz, 2H), 1.55 – 1.41 (m, 3H), 1.33 – 1.20 (m, 2H), 0.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 67.9, 61.3, 53.7 (2C), 38.8, 28.9 (2C), 20.3, 12.2

Data consistent with literature values. Fresneau, N.; Dumas, N.; Tournier, B. B.; Fossey, C.; Ballandonne, C.; Lesnard, A.; Millet, P.; Charnay, Y.; Cailly, T.; Bouillon, J.-P.; Fabis, F. Design of a Serotonin 4 Receptor Radiotracer with Decreased Lipophilicity for Single Photon Emission Computed Tomography. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *94*, 386–396.

1-propylpyridine-4-carboxamide **33**



Molecular Weight: 170,26 g.mol⁻¹

Formula: C₉H₁₈N₂O

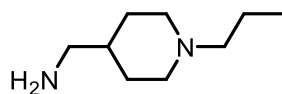
In a round bottom flask were introduced isonipecotamide (2.6 g, 20.0 mmol) and K₂CO₃ (5.5 g, 40 mmol) in EtOH (40 mL). 1-iodopropane (2.4 mL, 25 mmol) was added and the resulting mixture was heated at reflux for 24 h, then cooled to RT and filtered. The filtrate was evaporated and the residue was taken up in CH₂Cl₂ and filtered. The filtrate was evaporated once again under reduced pressure and the residue was washed with petroleum ether to give the 1-propylpyridine-4-carboxamide **33** as a white solid. (2.86 g, 85 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.20 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 2.82 (d, *J* = 11.3 Hz, 2H), 2.25 – 2.08 (m, 2H), 2.00 (tt, *J* = 11.5, 3.8 Hz, 1H), 1.79 (td, *J* = 11.7, 1.9 Hz, 2H), 1.63 (d, *J* = 10.5 Hz, 2H), 1.56 – 1.45 (m, 2H), 1.40 (td, *J* = 14.6, 7.3 Hz, 2H), 0.82 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 176.9, 60.2, 53.0 (2C), 42.0, 28.6 (2C), 19.6, 11.9.

Data are consistent with literature values. Thèse de Lam, B. V. Synthèse de Ligands Iodés En Série Indazole : Application En Imagerie TEMP Des Récepteurs 5-HT 4 Centraux, 2015.

1-(1-propylpiperidin-4-yl)methanamine **34**



Molecular Weight: 156,268 g.mol⁻¹

Formula : C₉H₂₀N₂

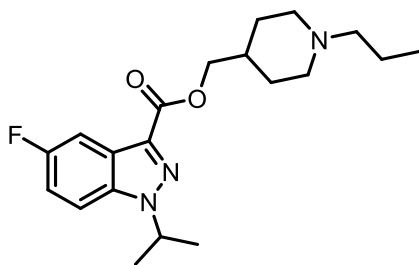
1-propylpyridine-4-carboxamide **33** (2.86 g, 17.2 mmol) was diluted in dry THF (60 mL) and cooled to 0°C. LiAlH₄ (1.90 g, 50.0 mmol) was added slowly in small portions and the mixture was stirred for 2 h at RT. The mixture was quenched at 0°C by sequential addition of water (1.9 mL), 15% NaOH solution (1.9 mL), and water (5.7 mL). The mixture was stirred at RT for 1 h, then the precipitate was filtered through in celite pad and washed with THF. The filtrate was concentrated to give the product 1-(1-propylpiperidin-4-yl)methanamine **34** as colorless oil (2.42 g, 90 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.81 (d, *J* = 11.4 Hz, 2H), 2.37 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.17 (dd, *J* = 7.8, 7.1 Hz, 2H), 1.86 – 1.68 (m, 2H), 1.63 (d, *J* = 10.7 Hz, 2H), 1.40 (tt, *J* = 10.1, 5.1 Hz, 2H), 1.26 – 0.93 (m, 3H), 0.82 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). NH₂ signal are missing.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 79.3, 60.4, 53.5 (2C), 47.9, 29.9 (2C), 19.8, 11.9.

Data are consistent with literature values. Thèse de Lam, B. V. Synthèse de Ligands Iodés En Série Indazole : Application En Imagerie TEMP Des Récepteurs 5-HT 4 Centraux, 2015.

(1-propylpiperidin-4-yl)methyl 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **35**



Molecular Weight: 361,46 g.mol⁻¹

Formula: C₂₀H₂₈FN₃O₂

According to the General procedure E and starting from 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **29** (400 mg, 1.8 mmol) in THF (10 mL) were added EDCl.HCl (517 mg, 2.7 mmol), HOBT (413 mg, 2.7 mmol) and (1-propyl-4-piperidyl)methanol **32b** (420 mg, 2.7 mmol, in 1 mL THF). The mixture was stirred at RT for 24h. The crude product was purified by column chromatography on alumina (CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂/MeOH 99/1) to afford the desired (1-propylpiperidin-4-yl)methyl 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **35** (423 mg, 65 %) as a yellow solid.

Mp: 54.1°C.

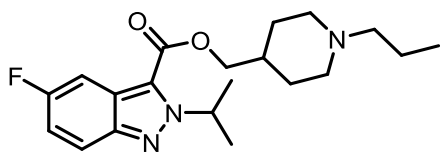
IR (KBr) ν 2937, 2770, 1731, 1494, 1417, 1256, 1175, 1071 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.71 (dd, *J* = 9.0, 2.1 Hz, 1H), 7.40 (dd, *J* = 9.0, 4.0 Hz, 1H), 7.13 (td, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 4.86 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.27 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.99 (d, *J* = 11.3 Hz, 2H), 2.42 – 2.24 (m, 2H), 2.10 – 1.94 (m, 2H), 1.94 – 1.85 (m, 1H), 1.82 (m, 2H), 1.58 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.54 – 1.39 (m, 4H), 0.84 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.6, 159.2 (d, *J* = 241 Hz), 136.6, 134.4 (d, *J* = 5 Hz), 124.1 (d, *J* = 11 Hz), 116.2 (d, *J* = 28 Hz), 111 (d, *J* = 10 Hz), 106.5 (d, *J* = 24 Hz), 69.0, 60.8, 53.1 (2C), 52.2, 35.3, 28.6 (2C), 22.0 (2C), 19.8, 11.9.

HRMS/ESI: *m/z* calcd. under investigation

(1-propylpiperidin-4-yl)methyl 5-fluoro-2-(propan-2-yl)-2H-indazole-3-carboxylate **36**



Molecular Weight : 361,45 g.mol⁻¹

Formula : C₂₀H₂₈FN₃O₂

According to the General procedure E and starting from 5-fluoro-2-(propan-2-yl)-2H-indazole-3-carboxylic acid **30** (100 mg, 0.45 mmol), in THF (3 mL) were added EDCI.HCl (130 mg, 0.67 mmol), HOBT (103 mg, 0.67 mmol) and (1-propyl-4-piperidyl)methanol **32b** (90 mg, 0.58 mmol, in 1 mL THF). The mixture was stirred at RT for 24h. The crude product was purified by column chromatography on alumina (CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂/MeOH 99/1) to afford the desired (1-propylpiperidin-4-yl)methyl 5-fluoro-2-(propan-2-yl)-2H-indazole-3-carboxylate **36** (77 mg, 47 %) as a yellow solid.

Mp: 78°C.

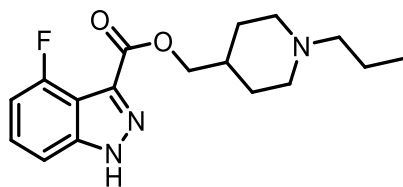
IR (KBr) ν 3425, 2939, 1708, 1519, 1458, 1366, 1265, 1205, 1168, 1068, 986, 821 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.80 (ddd, *J* = 9.4, 4.7, 0.7 Hz, 1H), 7.58 (ddd, *J* = 9.4, 2.5, 0.7 Hz, 1H), 7.14 (td, *J* = 9.4, 2.5 Hz, 1H), 5.96 (hept, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.30 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.05-2.95 (m, 2H), 2.36–2.24 (m, 2H), 2.02 – 1.85 (m, 4H), 1.85 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 1.63 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 1.61 – 1.38 (m, 4H), 0.91 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 159.4 (d, *J* = 242 Hz), 159.11, 143.5, 122.5 (d, *J* = 19 Hz), 122.4, 119.5 (d, *J* = 11Hz), 111 (d, *J* = 10 Hz), 103.6 (d, *J* = 29 Hz), 68.4, 60.0, 52.9, 52.2 (2C), 34.6, 28.2 (2C), 21.9 (2C), 19.2, 11.0.

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₀H₂₉FN₃O₂ [M+H]⁺ 362.2244 found 362.2256.

(1-propylpiperidin-4-yl)methyl 4-fluoro-1*H*-indazole-3-carboxylate **37**



Molecular Weight: 319,37 g.mol⁻¹

Formula: C₁₇H₂₂FN₃O₂

Starting from 4-fluoro-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **25a** (100 mg, 0.55 mmol) in THF (2 mL), using the General procedure E, TEA (0.15 mL, 1.11 mmol), EDCI.HCl (172 mg, 0.90 mmol), HOBT (126 mg, 0.90 mmol) and (1-propylpiperidin-4-yl)methanol **32b** (113 mg, 0.72 mmol). The reaction was stirred at RT for 15 h. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH 90/10/0.5) to afford the desired product **37** as a white solid (24 mg, 14 %).

Mp: >250 °C.

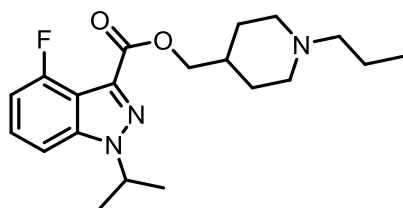
IR (KBr) ν 3435, 1733, 1711, 1633, 1453, 1384, 1226, 1159, 1040, 777 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.46 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.43 – 7.33 (m, 1H), 6.93 (dd, *J* = 10.6, 7.6 Hz, 1H), 4.33 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.14 – 3.02 (m, 2H), 2.46 – 2.35 (m, 2H), 2.16 – 2.03 (m, 2H), 1.97 – 1.84 (m, 2H), 1.64 – 1.40 (m, 5H), 0.91 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). NH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.1, 155.4 (d, *J* = 256 Hz), 142.3 (d, *J* = 8 Hz), 135.0, 127.4 (d, *J* = 8 Hz), 111.9 (d, *J* = 21 Hz), 108.1 (d, *J* = 21 Hz), 107.1 (d, *J* = 5 Hz), 69.4, 60.8, 53.3, 52.1, 35.1, 28.3, 19.8, 12.0 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₁₇H₂₃FN₃O₂ [M+H]⁺ 320.1774 found 320.1786

(1-propylpiperidin-4-yl)methyl 4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **38**



Molecular Weight: 361,45 g.mol⁻¹

Formula: C₂₀H₂₈FN₃O₂

According to the General procedure E and starting from 4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **31** (100 mg, 0.45 mmol), in THF (5 mL) were added TEA (0.07 mL, 0.50 mmol), EDCI.HCl (133 mg, 0.70 mmol), HOBT (103 mg, 0.70 mmol) and (1-propylpiperidin-4-yl)methanol **32b** (110 mg, 0.70 mmol, in 1 mL THF). The mixture was stirred at RT for 24 h. The crude product was purified by column chromatography on alumina (CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂/MeOH 99/1) to afford the desired (1-propylpiperidin-4-yl)methyl 4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **38** (41 mg, 25 %) as a yellow oil.

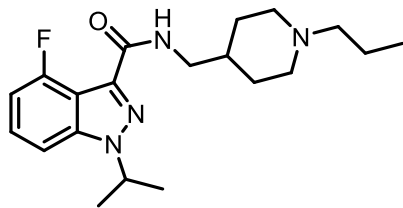
IR (KBr) ν 3426, 2935, 2769, 1723, 1409, 1207, 1042, 772 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.35 – 7.27 (m, 1H), 7.24 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.88 (td, *J* = 10.6, 7.7 Hz, 1H), 4.87 (hept, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.26 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.09 – 2.96 (m, 2H), 2.42 – 2.31 (m, 2H), 2.14 – 1.97 (m, 2H), 1.92 – 1.80 (m, 3H), 1.61 – 1.45 (m, 10H), 0.86 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.0, 155.4 (d, *J* = 257 Hz), 142.4 (d, *J* = 8 Hz), 133.4 (d, *J* = 4 Hz), 127.4 (d, *J* = 8 Hz), 112.9 (d, *J* = 21 Hz), 107.9 (d, *J* = 21 Hz), 105.8 (d, *J* = 5 Hz), 69.3, 60.7, 53.1 (2C), 52.1, 35.1, 28.3 (2C), 21.8 (2C), 19.6, 11.9.

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₀H₂₉FN₃O₂ [M+H]⁺ 362.2244 found 362.2259.

4-fluoro-1-(propan-2-yl)-*N*-[(1-propylpiperidin-4-yl)methyl]-1*H*-indazole-3-carboxamide **39**



Molecular Weight: 360,47 g.mol⁻¹

Formula: C₂₀H₂₉FN₄O

According to the General procedure E and starting from 4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **31** (100 mg, 0.45 mmol), in THF (3 mL) were added TEA (0.07 mL, 0.50 mmol), EDCl.HCl (133 mg, 0.70 mmol), HOBt (103 mg, 0.70 mmol) and (1-propyl-4-piperidyl)methanamine **34** (103 mg, 0.70 mmol, in 1 mL THF). The mixture was stirred at RT for 4h. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 2/3) to afford the desired compound **39** (8 mg, 5 %) as a yellow oil.

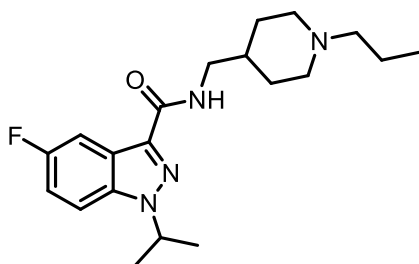
IR (KBr) ν 3429, 2954, 2928, 1655, 1624, 1573, 1540, 1506, 1392, 1363, 1150, 1098, 1050 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.38 – 7.29 (m, 1H), 7.26 – 7.18 (m, 2H), 6.92 (dd, *J* = 10.5, 7.6 Hz, 1H), 4.86 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.48 – 3.38 (m, 2H), 3.17 – 3.06 (m, 2H), 2.48 – 2.37 (m, 2H), 2.18 – 2.06 (m, 2H), 1.92 – 1.77 (m, 3H), 1.68 – 1.53 (m, 10H), 0.91 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 161.4, 155.7 (d, *J* = 257 Hz), 142.9 (d, *J* = 8 Hz), 136.6, 127.5 (d, *J* = 8 Hz), 112.0 (d, *J* = 22 Hz), 107.6 (d, *J* = 21 Hz), 105.5 (d, *J* = 5 Hz), 60.5, 53.1 (2C), 51.3, 44.6, 35.5, 29.1 (2C), 22.0 (2C), 19.4, 11.9.

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₀H₃₀FN₄O [M+H]⁺ 361.2404 found 361.2410.

5-fluoro-1-(propan-2-yl)-*N*-[(1-propylpiperidin-4-yl)methyl]-1*H*-indazole-3-carboxamide **40**



Molecular Weight : 360,47 g.mol⁻¹

Formula : C₂₀H₂₉FN₄O

In a round bottom flask under nitrogen atmosphere were added 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **29** (100 mg, 0.45 mmol) in anhydrous THF (10mL), (COCl)₂ (0.08 mL, 0.95 mmol) and one drop of anhydrous DMF at 0°C. The mixture was stirred at RT for 3h and the solvent was evaporated *in vacuo*. The residue was dissolved in anhydrous THF (10 mL) and a solution of (1-propyl-4-piperidyl)methanamine **34** (85 mg, 0.54 mmol) in THF (1mL) and TEA (0.07 mL, 0.54 mmol) were added and the mixture was allowed to stirring at RT for 18 h. The mixture was concentrated *in vacuo* and the residue was purified by column chromatography on alumina (CH₂Cl₂/MeOH 99/1) to afford the desired 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-*N*-[(1-propylpiperidin-4-yl)methyl]-1*H*-indazole-3-carboxamide **40** (75 mg, 46 %) as a yellow oil.

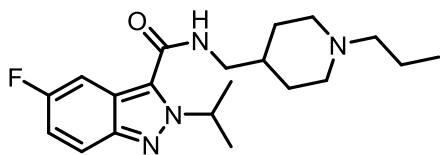
IR (KBr) ν 3426, 2926, 2771, 1651, 1548, 1494, 1255, 1201 cm⁻¹.

NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.00 (ddd, *J* = 8.9, 2.5, 0.6 Hz, 1H), 7.40 – 7.33 (m, 1H), 7.21 – 7.05 (m, 2H), 4.82 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.39 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.02 – 2.89 (m, 2H), 2.34 – 2.24 (m, 2H), 2.03 – 1.91 (m, 2H), 1.85 – 1.75 (m, 2H), 1.75 – 1.65 (m, 1H), 1.58 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H), 1.56 – 1.37 (m, 4H), 0.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.7, 158.8 (d, *J* = 240 Hz), 136.9, 136.8 (d, *J* = 6 Hz), 123.1 (d, *J* = 11 Hz), 116.2 (d, *J* = 28 Hz), 110.3 (d, *J* = 10 Hz), 107.0 (d, *J* = 24 Hz), 60.9, 53.4 (2C), 51.2, 44.4, 36.3, 29.8 (2C), 22.1 (2C), 20.0, 12.0.

HRMS/ESI: *m/z* calcd. C₂₀H₃₀FN₄O [M+H]⁺ 361,2404 found 361.2418.

5-fluoro-2-(propan-2-yl)-*N*-[(1-propylpiperidin-4-yl)methyl]-2*H*-indazole-3-carboxamide **41**



Chemical Formula: C₂₀H₂₉FN₄O

Molecular Weight: 359,48 g.mol⁻¹

Formula: C₂₀H₃₀FN₄O

In a round bottom flask under nitrogen atmosphere were added to a solution of 5-fluoro-2-(propan-2-yl)-2*H*-indazole-3-carboxylic acid **30** (110 mg, 0.5 mmol) in anhydrous CHCl₃ (10mL) (COCl)₂ (0.17 mL, 2.0 mmol) and one drop of anhydrous DMF at 0°C. The mixture was stirred at RT for 4 h and the solvent was evaporated *in vacuo*. The residue was dissolved in CHCl₃ (10 mL) and a solution of (1-propyl-4-piperidyl)methanamine **34** (80 mg, 0.5 mmol) in CHCl₃ (3mL) and K₂CO₃ (140 mg, 1.0 mmol) in water (0.5 mL) were added and the mixture was allowed to stir at RT for 4 h. The mixture was concentrated *in vacuo* and the residue was purified by column chromatography on alumina (CH₂Cl₂/MeOH 99/1) to afford the desired 5-fluoro-2-(propan-2-yl)-*N*-[(1-propylpiperidin-4-yl)methyl]-2*H*-indazole-3-carboxamide **41** (45 mg, 25 %) as a white solid.

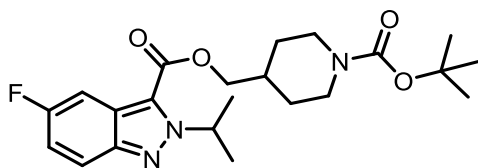
IR (KBr) ν 3314, 2922, 1645, 1547, 1466, 1282, 1175, 1088 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.80 (ddd, *J* = 9.3, 4.8, 0.7 Hz, 1H), 7.24 (ddd, *J* = 9.3, 2.4, 0.7 Hz, 1H), 7.13(dd, *J* = 6.4, 2.4 Hz, 1H), 6.15 (s, 1H), 5.70 (hept, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.45 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.07 – 2.91 (m, 2H), 2.38 – 2.25(m, 2H), 1.99 (dt, *J* = 11.7, 2.5 Hz, 3H), 1.81 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H), 1.73 (ddt, *J* = 11.3, 7.7, 3.8 Hz, 1H), 1.63 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 1.60 - 1.39 (m, 4H), 0.91 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 159.3, 158.8 (d, *J* = 241 Hz), 143.5, 126.4 (d, *J* = 4 Hz), 120.0 (d, *J* = 10 Hz), 118.7 (d, *J* = 12 Hz), 116.0 (d, *J* = 28 Hz), 100.6 (d, *J* = 26 Hz), 59.9, 52.7, 52.3 (2C), 44.5, 35.1, 29.0 (2C), 22.1 (2C), 19.1, 11.0.

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₀H₃₁FN₄O [M+H]⁺ 361.2404 found 361.2403.

{1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]piperidin-4-yl}methyl 5-fluoro-2-(propan-2-yl)-2*H*-indazole-3-carboxylate **43**



Molecular Weight: 419,49 g.mol⁻¹

Formula: C₂₂H₃₀FN₃O₄

In a round bottom flask under nitrogen atmosphere were introduced 5-fluoro-2-(propan-2-yl)-2*H*-indazole-3-carboxylic acid **30** (120 mg, 0.54 mmol), in anhydrous THF (2 mL) and CDI (97 mg, 0.6 mmol). The reaction mixture was stirred for 30 min at RT, then *tert*-butyl 4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate **42** (130 mg, 0.6 mmol) and NaH (14 mg, 0.6 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at RT for 1 h, diluted with CH₂Cl₂, washed several times with water, dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 6/1) to afford the desired {1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]piperidin-4-yl}methyl 5-fluoro-2-(propan-2-yl)-2*H*-indazole-3-carboxylate **43** (94 mg, 42 %) as a colourless oil.

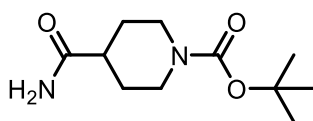
IR (KBr) ν 2927, 2854, 1695, 1456, 1426, 1365, 1242, 1169, 1063, 976, 862, 767 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.79 (ddd, *J* = 9.4, 4.7, 0.7 Hz, 1H), 7.54 (ddd, *J* = 9.4, 2.6, 0.8 Hz, 1H), 7.14 (td, *J* = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 5.93 (hept, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.30 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.26 – 4.08 (m, 2H), 2.77 (t, *J* = 12.0 Hz, 2H), 2.11 – 1.99 (m, 1H), 1.87 – 1.79 (m, 2H), 1.62 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.46 (s, 9H), 1.38 – 1.26 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 160.5 (d, *J* = 243 Hz), 160.1, 154.8, 144.5, 123.5 (d, *J* = 12 Hz), 123.3 (d, *J* = 8 Hz), 120.7 (d, *J* = 10 Hz), 117.3 (d, *J* = 29 Hz), 104.5 (d, *J* = 26 Hz), 79.6, 69.00, 54.1, 43.6 (2C), 35.8, 29.0 (2C), 28.4 (3C), 23.0 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₂H₃₀FN₃O₄Na [M+Na]⁺ 442.2118 found 442.2119

tert-butyl 4-carbamoylpiperidine-1-carboxylate **44**



Molecular Weight: 228,29 g.mol⁻¹

Formula: C₁₁H₂₀N₂O₃

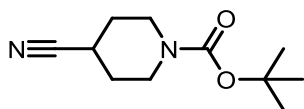
In a round bottom flask was introduced isonipecotamide (5,6 g, 12.7 mmol) in H₂O (20 mL). The solution was cooled to 0°C, NaOH 1 N (64 mL) and Boc₂O (9.75 g, 12,7 mmol) in dioxane (20mL) were added slowly. The mixture was stirred overnight at RT then the reaction was extracted with EtOAc and washed with H₂O. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated in *vacuo*. The crude product *tert*-butyl 4-carbamoylpiperidine-1-carboxylate **44** (7,06 g, 71 %) as a white solid was used without further purification for the next step.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 5.58 – 5.39 (m, 2H), 4.12 (dd, *J* = 8.0, 6.4 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 12.1 Hz, 2H), 2.37 – 2.24 (m, 1H), 1.90 – 1.79 (m, 2H), 1.62 (qd, *J* = 12.0, 4.4 Hz, 2H), 1.45 (s, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 177.5, 154.8, 80.2, 43.2, 41.3 (2C), 28.8 (2C), 28.5 (3C).

Data are consistent with literature values. Davies, J. R.; Kane, P. D.; Moody, C. J. N–H Insertion Reactions of Rhodium Carbenoids. Part 5: A Convenient Route to 1,3-Azoles. *Tetrahedron* **2004**, *60* (18), 3967–3977.

tert-butyl 4-cyanopiperidine-1-carboxylate **45**



Molecular Weight: 210,28 g.mol⁻¹

Formula: C₁₁H₁₈N₂O₂

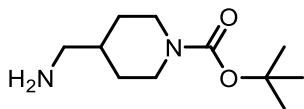
In a round bottom flask were introduced *tert*-butyl 4-carbamoylpiperidine-1-carboxylate **44** (7,06 g, 30,9 mmol) and TEA (8,8 mL, 57,7 mmol) in CH₂Cl₂ (100 mL). The solution was cooled to 0°C and POCl₃ (3,18 mL, 34,0 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL) was added drop by drop. The mixture was stirred for 1,5 h at RT then the reaction was quenched with a slow addition of NaHCO₃ (60 mL) at 0°C. The mixture was stirred overnight at RT then the aqueous layer was separated and extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with a solution of citric acid 5%, dried over MgSO₄, filtered and evaporated in *vacuo*. The crude product *tert*-butyl 4-cyanopiperidine-1-carboxylate **45** (5,73 g, 88 %) as a white oil was used without further purification for the next step.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 3.74 – 3.52 (m, 2H), 3.39 – 3.19 (m, 2H), 2.84 – 2.68 (m, 1H), 1.95 – 1.66 (m, 4H), 1.44 (s, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 154.4, 121.1, 80.1, 42.6 (2C), 28.4 (2C), 28.4 (3C), 26.3.

Data are consistent with literature values. Augustine, J.; Bombrun, A.; Atta, R. A Practical and Cost-Efficient, One-Pot Conversion of Aldehydes into Nitriles Mediated by 'Activated DMSO.' *Synlett* **2011**, (15), 2223–2227.

tert-butyl 4-(aminomethyl)piperidine-1-carboxylate **46**



Molecular Weight: 214,31 g.mol⁻¹

Formula : C₁₁H₂₂N₂O₂

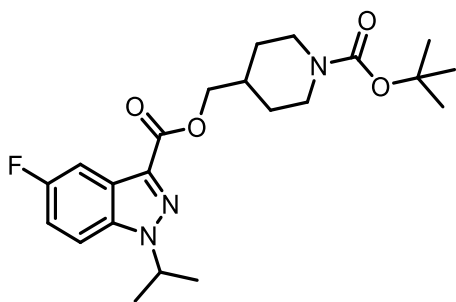
tert-butyl 4-cyanopiperidine-1-carboxylate **45** (5,72 g, 27,3 mmol) was diluted in Et₂O (100 mL) and cooled to 0°C. LiAlH₄ (2,28 g, 60.0 mmol) was added slowly in small portions and the mixture was stirred for 2 h at 0°C then overnight at RT. The mixture was quenched at 0°C by sequential addition of water (2,3 mL), 15% NaOH solution (2,3 mL), and then water (6,9 mL). The mixture was stirred at RT for 2 h, then the precipitate was filtered through in celite pad and washed with THF. the filtrate was concentrated *in vacuo* and the residue was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 95/5) to afford *tert*-butyl 4-(aminomethyl)piperidine-1-carboxylate **46** (3,86 g, 48 %) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.16 – 3.87 (m, 2H), 2.66 – 2.52 (m, 2H), 2.50 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 1.71 (s, 3H), 1.69 – 1.54 (m, 2H), 1.36 (d, *J* = 4.5 Hz, 9H), 1.00 (qd, *J* = 12.6, 4.5 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 154.8, 79.2, 47.8, 43.7 (2C), 39.3, 29.7 (2C), 28.4 (3C).

Data are consistent with literature values. Sonda, S. Design and Synthesis of Orally Active Benzamide Derivatives as Potent Serotonin 4 Receptor Agonist. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11* (19), 4225–4234.

{1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]piperidin-4-yl}methyl 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **47**



Molecular Weight : 419,49 g.mol⁻¹

Formula : C₂₂H₃₀FN₃O₄

According to the General procedure E and starting from 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **29** (300 mg, 1.35 mmol), in THF (8 mL) were added TEA (0.21 mL, 1.5 mmol), EDCl.HCl (382 mg, 2.0 mmol), HOBt (310 mg, 2.0 mmol) and *tert*-butyl 4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate **42** (430 mg, 2.0 mmol, in 1 mL THF). The mixture was heated at 60°C for 4 h. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂/MeOH 98/2) to afford the desired compound **47** (310 mg, 55 %) as a yellow oil

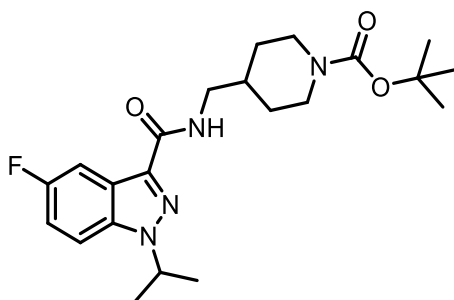
IR (KBr) ν 2980, 2932, 1719, 1686, 1420, 1406, 1258, 1201, 1129 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.75 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 7.46 (dd, *J* = 9.1, 4.0 Hz, 1H), 7.18 (td, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 4.91 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.31 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 4.23 – 4.01 (m, 2H), 2.73 (t, *J* = 11.3 Hz, 2H), 2.11 – 1.98 (m, 1H), 1.81 (d, *J* = 12.1 Hz, 2H), 1.63 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.44 (s, 9H), 1.29 (qd, *J* = 12.7, 4.5 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.6, 159.2 (d, *J* = 241 Hz), 154.8, 136.6, 134.3 (d, *J* = 6 Hz), 124.1 (d, *J* = 11 Hz), 116.2 (d, *J* = 28 Hz), 111.0 (d, *J* = 10 Hz), 106.4 (d, *J* = 24 Hz), 79.4, 68.8, 52.2, 43.5 (2C), 35.8 (2C), 28.9, 28.4 (3C), 22.0 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₂H₃₀FN₃O₄Na [M+Na]⁺ 442.2118 found 442.2115.

Tert-butyl 4-({[5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido}methyl)piperidine-carboxylate **48**



Molecular Weight: 418,50 g.mol⁻¹

Formula: C₂₂H₃₁FN₄O₃

According to the General procedure E and starting from 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **29** (500 mg, 2.25 mmol) in THF (12 mL), were added TEA (0.35 mL, 2.5 mmol), EDCI (0.58 mL, 3.3 mmol), HOBT (516 mg, 3.3 mmol) and *tert*-butyl 4-(aminomethyl)piperidine-1-carboxylate **46** (707 mg, 3.3 mmol, in 1 mL THF). The mixture was stirred at RT for 4 h. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂/MeOH 98/2) to afford the desired *tert*-butyl 4-({[5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido}methyl)piperidine-carboxylate **48** (800 mg, 85 %) as a yellow oil.

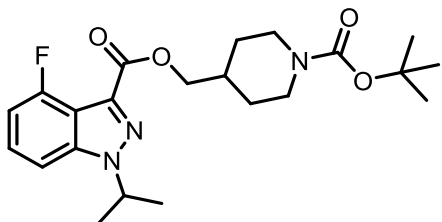
IR (KBr) ν 3439, 2977, 2929, 1681, 1652, 1543, 1494, 1172, 733 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.01 (dd, *J* = 9.0, 2.1 Hz, 1H), 7.39 (dd, *J* = 9.0, 4.0 Hz, 1H), 7.17 (td, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 7.14 – 7.07 (m, 1H), 4.84 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.20 – 4.07 (m, 2H), 3.46 – 3.32 (m, 2H), 2.80 – 2.64 (m, 2H), 1.90 – 1.81 (m, 1H), 1.81 – 1.74 (m, 2H), 1.60 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.45 (s, 9H), 1.23 (qd, *J* = 12.6, 4.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.7, 158.9 (d, *J* = 240 Hz), 154.8, 136.9, 136.7 (d, *J* = 6 Hz), 123.2 (d, *J* = 11 Hz), 116.3 (d, *J* = 28 Hz), 110.3 (d, *J* = 10 Hz), 107.0 (d, *J* = 24 Hz), 79.3, 51.2, 44.4, 43.6 (2C), 36.8, 29.9 (2C), 28.4 (3C), 22.1 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₂H₃₁FN₄O₃Na [M+Na]⁺ 441.2278 found 441.2282

{1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]piperidin-4-yl}methyl 4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **49**



Molecular Weight: 419,49 g.mol⁻¹

Formula: C₂₂H₃₀FN₃O₄

According to the General procedure E and starting from 4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **31** (300 mg, 1.35 mmol), in THF (8 mL) were added TEA (0.37 mL, 2.70 mmol), EDCI.HCl (436 mg, 2.25 mmol), HOBT (310 mg, 2.02 mmol) and *tert*-butyl 4-(hydroxymethyl) piperidine-1-carboxylate **42** (436 mg, 2.02 mmol, in 1 mL THF). The mixture was heated at 60°C for 1 h. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 3/1) to afford the desired {1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]piperidin-4-yl}methyl 4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **49** as a yellow oil (315 mg, 56 %).

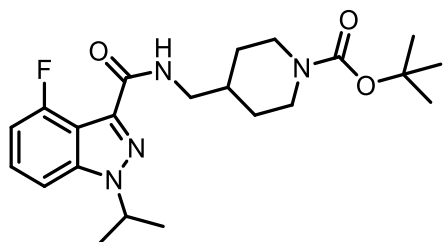
IR (KBr) ν 2977, 2936, 1726, 1691, 1507, 1470, 1415, 1208, 1156, 1072, 772 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.31 (ddd, *J* = 8.5, 7.4, 4.3 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H) 6.88 (ddd, *J* = 10.6, 7.5, 1.0 Hz, 1H), 4.87 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.25 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 4.10 (d, *J* = 12.7 Hz, 2H), 2.77 – 2.58 (m, 2H), 2.08 – 1.90 (m, 1H), 1.84 – 1.72 (m, 2H), 1.60 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.41 (s, 9H), 1.25 (qd, *J* = 12.5, 4.5 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.1, 154.8, 155.4 (d, *J* = 257 Hz), 142.5 (d, *J* = 8 Hz), 133.3 (d, *J* = 4 Hz), 127.4 (d, *J* = 8 Hz), 112.9 (d, *J* = 21 Hz), 108.0 (d, *J* = 21 Hz), 105.8 (d, *J* = 4 Hz), 79.3, 69.2, 52.1, 43.5 (2C), 35.7 (2C), 28.7, 28.4 (3C), 21.9 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₂H₃₀FN₃O₄Na [M+Na]⁺ 442.2118, found 442.2121.

tert-butyl 4-({[4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido}methyl)piperidine-1-carboxylate
50



Molecular Weight: 418,50 g.mol⁻¹

Formula: C₂₂H₃₁FN₄O₃

Starting from 4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **31** (300 mg, 1.35 mmol) in anhydrous THF (8 mL) and following the General procedure E were introduced TEA (0.47 mL, 3.40 mmol) EDCI.HCl (400 mg, 2.10 mmol), HOBt (310 mg, 2.02 mmol) and *tert*-butyl 4-(aminomethyl)piperidine-1-carboxylate **46** (430 mg, 2.02 mmol, 1 mL THF). The mixture was stirred at RT for 4 h. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 6/1) to afford the desired *tert*-butyl 4-({[4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido}methyl)piperidine-1-carboxylate **50** (462 mg, 84 %) as a yellow oil.

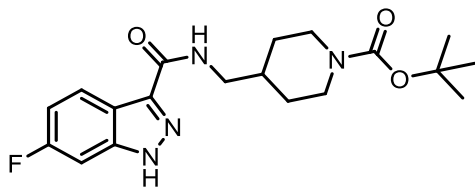
IR (KBr) ν 3429, 3329, 2977, 2931, 2852, 2244, 1682, 1532, 1504, 1366, 1171, 958, 770, 732 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.34 – 7.27 (m, 1H), 7.26 – 7.19 (m, 2H), 6.91 – 6.83 (m, 1H), 4.84 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.18 – 4.0 (m, 2H), 3.38 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.69 (td, *J* = 12.9, 2.7 Hz, 2H), 1.89 – 1.80 (m, 1H), 1.80 – 1.70 (m, 2H), 1.57 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.42 (s, 9H), 1.20 (qd, *J* = 12.4, 4.4 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 161.3, 155.6 (d, *J* = 257 Hz), 154.7, 142.8 (d, *J* = 9 Hz), 136.5 (d, *J* = 6 Hz), 127.4 (d, *J* = 8 Hz), 111.8 (d, *J* = 22 Hz), 107.4 (d, *J* = 21 Hz), 105.5 (d, *J* = 4 Hz), 79.2, 51.2, 44.7, 43.6 (2C), 36.5 (2C), 29.8, 28.4 (3C), 21.9 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₂H₃₁FN₄O₃Na [M+Na]⁺ 441.2278 found 441.2276.

Tert-butyl 4-[3-(6-fluoro-1*H*-indazol-3-yl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate **51**



Molecular Weight: 376,42 g.mol⁻¹

Formula: C₁₉H₂₅FN₄O₃

The compound was prepared according to the General procedure E, using 6-fluoro-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **25b** (70 mg, 0.4 mmol), TEA (0.14 ml, 1.0 mmol), EDCI (0.1 ml, 0.6 mmol) and HOBt (91 mg, 0.6 mmol) and *tert*-butyl 4-(aminomethyl)piperidine-1-carboxylate **46** (128 mg, 0.6mmol). The mixture was stirred at RT for 15 h. The solvent was evaporated and the residue was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH 95/5/0.5) to afford the desired product **51** as a white solid (137 mg, 94 %).

Mp: 160°C

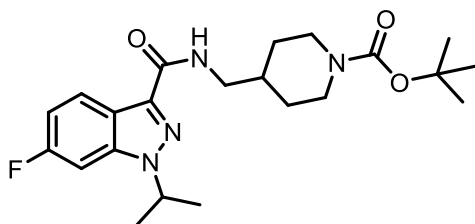
IR (KBr) ν 3207, 2929, 1662, 1546, 1430, 1228, 1170, 732.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 11.56 (s, 1H), 8.34 (dd, *J* = 8.9, 5.3 Hz, 1H), 7.28 – 7.22 (m, 1H), 7.18 – 7.13 (m, 1H), 7.05 (td, *J* = 9.1, 2.2 Hz, 1H), 4.27 – 4.04 (m, 2H), 3.56 – 3.25 (m, 2H), 2.80 – 2.61 (m, 2H), 1.88 – 1.74 (m, 3H), 1.48 (s, 9H), 1.26 – 1.14 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.8, 162.5 (d, *J* = 246 Hz), 155.1, 141.8 (d, *J* = 13 Hz), 139.1, 124.1 (d, *J* = 11 Hz), 118.8, 112.8 (d, *J* = 26 Hz), 95.7 (d, *J* = 26 Hz), 79.8, 60.5, 44.4 (2C), 36.6 (2C), 29.8, 28.5 (3C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₁₉H₂₅FN₄O₃Na [M+Na]⁺ 399.1808 found 399.1810.

Tert-butyl 4-({[6-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido}methyl)piperidine-1-carboxylate
52



Molecular Weight: 418,50 g.mol⁻¹

Formula: C₂₂H₃₁FN₄O₃

Starting from *tert*-butyl 4-[3-(6-fluoro-1*H*-indazol-3-yl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate **51** (110 mg, 0.29 mmol) and 2-iodopropane (0.12 mL, 1.17 mmol) as described in the General procedure F. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 10/1) to afford the desired product **52** as a colorless oil (100 mg, 82 %).

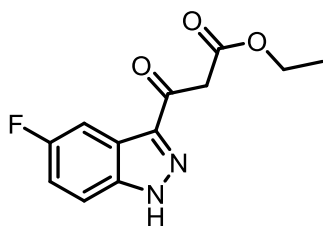
IR (KBr) ν 3426, 2978, 2932, 1682, 1539, 1424, 1366, 1202, 1172, 952, 732 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.31 (ddd, *J* = 8.9, 5.4, 0.6 Hz, 1H), 7.12 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.08 - 6.95 (m, 2H), 4.74 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.12 (m, 2H), 3.37 (m, 2H), 2.69 (t, *J* = 12.9 Hz, 2H), 1.86 - 1.72 (m, 3H), 1.57 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.44 (s, 9 H), 1.30 - 1.14 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.7, 162.1 (d, *J* = 246 Hz), 154.84, 140.3 (d, *J* = 12 Hz), 137.1, 124.6 (d, *J* = 11 Hz), 119.7, 112.5 (d, *J* = 26 Hz), 95.0 (d, *J* = 27 Hz), 79.4, 51.1, 44.4 (2C), 43.5, 36.8, 29.9 (2C), 28.5 (3C), 22.0 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₂₂H₃₁FN₄O₃Na [M+Na]⁺ 441.2278 found 441.2277.

Ethyl 3-(5-fluoro-1*H*-indazol-3-yl)-3-oxopropanoate **56**



Molecular Weight: 250,22

Formula: C₁₂H₁₁FN₂O₃

To a stirred solution of 5-fluoro-1*H*-indole-3-carboxylic acid **12** (500 mg, 2.8 mmol) in anhydrous THF (15 mL) was added carbonyldiimidazole (500 mg, 3.1 mmol), and the mixture was stirred 20 h at RT. TEA (0.5 mL, 3.3 mmol), 4-ethoxy-3-oxopropanoate (600 mg, 3.4 mmol) and magnesium chloride (300 mg, 3.3 mmol) were added in small portions, and the mixture was stirred at 40 °C for 20 h. The solvent was evaporated *in vacuo*. The residue was extracted with EtOAc (3 x 100 mL), the combined organic layers were washed with sat. aq. NaHCO₃ and with brine, then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated and the crude product was purified by chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 3/1) to give ethyl 3-(5-fluoro-1*H*-indazol-3-yl)-3-oxopropanoate **56** as a yellow solid (130 mg, 19 %).

Mp: 149 °C.

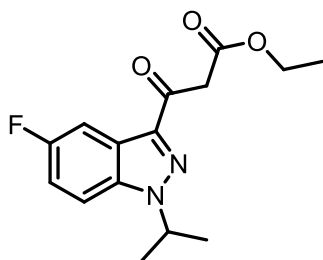
IR (KBr) ν 3268, 1724, 1665, 1503, 1438, 1401, 1370, 1319, 1228, 1160, 1082, 1030, 994, 954, 878, 585, 804, 723, 668, 623, 611, 548 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 11.12 (s, 1H), 7.95 (ddd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H), 7.55 (ddd, *J* = 9.1, 4.1 Hz, 1H), 7.22 (td, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 4.24 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.19 (s, 2H), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 188.5, 168.4, 159.9 (d, *J* = 242 Hz), 143.2 (d, *J* = 6 Hz), 138.1, 122.3 (d, *J* = 11 Hz), 117.5 (d, *J* = 28 Hz), 111.6 (d, *J* = 10 Hz), 106.9 (d, *J* = 25 Hz), 61.6, 46.3, 14.1.

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₁₂H₁₁FN₂O₃Na [M+Na]⁺ 273.0654 found 273.0651.

Ethyl 3-[5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1H-indazol-3-yl]-3-oxopropanoate 57



Molecular Weight: 292,30 g.mol⁻¹

Formula: C₁₅H₁₇FN₂O₃

To a stirred solution of ethyl 3-(5-fluoro-1H-indazol-3-yl)-3-oxopropanoate **56** (130 mg, 0.5 mmol) in acetone (5 mL) were added K₂CO₃ (110 mg, 0.8 mmol) and 2-bromopropane (0.20 mL, 2.1 mmol). The mixture was heated overnight at reflux. The completion of reaction was checked by TLC. The solvent was evaporated *in vacuo*, the residue was taken up in CH₂Cl₂ and washed with water. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 3/1). ethyl 3-[5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1H-indazol-3-yl]-3-oxopropanoate **57** was obtained as a yellow solid (80 mg, 53 %).

Mp: 50 °C.

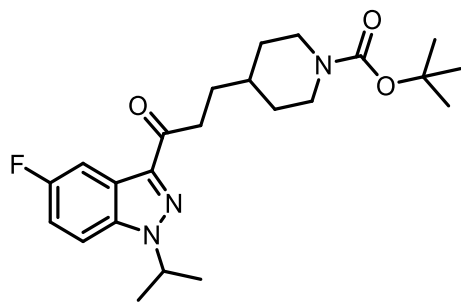
IR (KBr) ν 3445, 3366, 2987, 2937, 1736, 1676, 1631, 1499, 1466, 1413, 1317, 1265, 1189, 1169, 1093, 1027, 902, 803 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.98 (dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 7.44 (dd, *J* = 9.1, 3.9 Hz, 1H), 7.20 (td, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 4.88 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.22 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.16 (s, 2H), 1.62 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 188.5, 168.1, 159.8 (d, *J* = 242 Hz), 140.9 (d, *J* = 6 Hz), 137.1, 123.4 (d, *J* = 11 Hz), 116.5 (d, *J* = 29 Hz), 110.7 (d, *J* = 10 Hz), 107.2 (d, *J* = 25 Hz), 61.2, 51.8, 45.8, 22.1 (2C), 14.2.

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₁₅H₁₈FN₂O₃ [M+H]⁺ 293.1301 found 293.1299.

Tert-butyl 4-{3-[5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-oxopropyl}piperidine-1-carboxylate **58**



Molecular Weight: 417,52 g.mol⁻¹

Formula: C₂₃H₃₂FN₃O₃

First method:

To a solution of ethyl 3-[5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-oxopropanoate **57** (80 mg, 0.27 mmol) in DMF (3mL) were added K₂CO₃ (76 mg, 0.55 mmol) and *tert*-butyl 4-(iodomethyl)piperidine-1-carboxylate **59** (107 mg, 0.33 mmol). The mixture was stirred at RT for 24 h, the solvent was evaporated and the residue was taken up in CH₂Cl₂ and washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and evaporated *in vacuo*. The residue was taken up in EtOH (5 mL) and water (1mL), KOH (70 mg, 1.23 mmol) was added and the mixture was heated at reflux for 7 h. The end of the reaction was monitored by TLC. The solvent was evaporated and the residue was diluted in EtOAc, washed with water, dried over MgSO₄, filtered and evaporated *in vacuo*. The crude product *tert*-butyl 4-{3-[5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-oxopropyl}piperidine-1-carboxylate **58** (103 mg, 90 %) as a yellow oil was used without further purification for the next step.

Second method:

In a dry round bottom flask under nitrogen, were added 5-fluoro-2-(oxan-2-yl)-2*H*-indazole (600 mg, 2.7 mmol) in THF (5 mL) and TMPMgCl.LiCl (3.8 mL, 4.1 mmol) at -10°C. The reaction was stirred at -10°C for 2 h and *tert*-butyl 4-{2-[methoxy(methyl)carbamoyl]ethyl}piperidine-1-carboxylate **63** (1.22 g, 4.1 mmol) was added. The mixture was stirred 8 h at -10°C and the reaction was warmed up at RT. The next day, an additional quantity of TMPMgCl.LiCl (3.8 mL, 4.1 mmol) was added and stirred for 8 h at -10°C (2 times). HCl 1M was added and the mixture was stirred 30 min at 0°C, then THF was evaporated *in vacuo* and the mixture was extracted with EtOAc (3 times). The solvent was evaporated and the residue was taken to the next step without purification (430 mg). The residue was dissolved in acetone (15 mL), K₂CO₃ (580 mg, 4.2 mmol) and 2-iodopropane (0.28 ml, 2.8 mmol) were added. After 18 h of stirring at reflux, the solvent was evaporated and the residue was purified by column chromatography

on silica gel (Cyclohexane/ EtOAc 6/1) to afford the desired compound **58** (350 mg, 32 %) as a yellow oil.

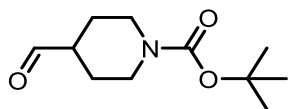
IR (KBr) ν 3434, 2977, 2930, 1682, 1497, 1472, 1412, 1366, 1245, 1100, 1097, 1047, 8.38, 860, 808, 761 cm^{-1}

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) 8.00 (dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, 1H), 7.43 (dd, 9.1, 4.0 Hz, 1H), 7.18 (td, $J = 8.8, 2.5$ Hz, 1H), 4.88 (hept, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.09 (d, $J = 13.2$ Hz, 2H), 3.17 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.68 (t, $J = 12.4$ Hz, 2H), 1.75 (q, $J = 8.1$ Hz, 4H), 1.63 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H), 1.46 (m, 10H), 1.26-1.04 (m, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 197.2, 159.6 (d, $J = 241$ Hz), 154.9, 141.5 (d, $J = 6$ Hz), 136.8, 123.3 (d, $J = 11$ Hz), 116.1 (d, $J = 29$ Hz), 110.5 (d, $J = 10$ Hz), 107.2 (d, $J = 24$ Hz), 79.2, 51.6, 44.0 (2C), 35.8, 35.6, 32.0 (2C), 31.1, 28.5 (3C), 22.1 (2C).

HRMS/ESI: m/z calcd $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{FN}_3\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 440.2325 found 440.2328.

tert-butyl 4-formylpiperidine-1-carboxylate **59**



Molecular Weight: 213.28 g.mol⁻¹

Formula: C₁₁H₁₉NO₃

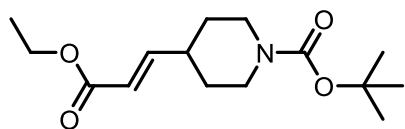
In a round bottom flask at -78°C were added, (COCl)₂ (5.7 mL, 67.0 mmol) in CH₂Cl₂ (140 mL), DMSO (9.5 mL, 134.0 mmol) drop by drop and *tert*-butyl 4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate **42** (8.0 g, 37.2 mmol) in CH₂Cl₂. After 30 min of stirring at -78°C, was added slowly TEA (21.2 mL, 152.0 mmol) and the mixture was stirred additional 30 min at -78°C. The reaction was warmed up to RT and the CH₂Cl₂ was washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo* to afford *tert*-butyl 4-formylpiperidine-1-carboxylate **59** (7.9 g, 99%).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.62 (s, 1H), 4.01 – 3.82 (m, 2H), 2.97 – 2.84 (m, 2H), 2.44 – 2.32 (m, 1H), 1.92 – 1.80 (m, 2H), 1.60 – 1.45 (m, 2H), 1.41 (s, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 203.0, 154.6, 79.7, 48.0 (2C), 42.9, 28.4 (2C), 25.1 (3C).

Data are consistent with literature values. Thèse de Lam, B. V. Synthèse de Ligands Iodés En Série Indazole : Application En Imagerie TEMP Des Récepteurs 5-HT 4 Centraux, 2015.

tert-butyl 4-[(1*E*)-3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl]piperidine-1-carboxylate **60**



Molecular Weight: 283.36 g.mol⁻¹

Formula: C₁₅H₂₅NO₄

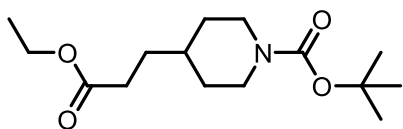
To a suspension of NaH (1.8 g of a 60% dispersion in oil, 44.5 mmol) in anhydrous THF (60 mL) at 0 °C under nitrogen atmosphere was added dropwise triethylphosphonoacetate (8.8 mL, 44.5 mmol). After 30 min of stirring, a solution of *tert*-butyl 4-formylpiperidine-1-carboxylate **59** (7.9 g, 37.0 mmol) in THF (50 mL) was added dropwise. The resulting mixture was stirred vigorously at RT for 3 h. Water (50 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 3/1) to afford the product **60** as a colourless oil (9.35 g, 90 %).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 6.91 (dd, *J* = 15.8, 6.6 Hz, 1H), 5.81 (dd, *J* = 15.8, 1.5 Hz, 1H), 4.26 – 4.05 (m, 4H), 2.86 – 2.67 (m, 2H), 2.35 – 2.26 (m, 1H), 1.79 – 1.71 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.41 – 1.28 (m, 5H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 166.7, 154.7, 151.7, 120.0, 79.5, 60.3, 43.5 (2C), 38.6, 30.62 (2C), 28.4 (3C), 14.3.

Data are consistent with literature values. Thèse de Lam, B. V. Synthèse de Ligands Iodés En Série Indazole : Application En Imagerie TEMP Des Récepteurs 5-HT 4 Centraux, 2015.

Tert-butyl 4-(3-ethoxy-3-oxopropyl)piperidine-1-carboxylate **61**



Molecular Weight: 285.38 g.mol⁻¹

Formula: C₁₅H₂₇NO₄

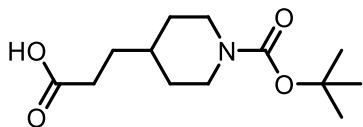
In a round bottom flask at RT under nitrogen atmosphere were charged with *tert*-butyl 4-[(1*E*)-3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl]piperidine-1-carboxylate **60** (9.35 g, 33.0 mmol) in EtOH (300 mL) and Pd/C (0.35 g, 3.3 mmol). The flask was filled with hydrogen and stirred at RT for 3 h. The mixture was filtered through a pad of Celite, washed with EtOH and concentrated *in vacuo* to afford the product **61** as a colourless oil (9.4 g, 99 %).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.18 – 3.97 (m, 4H), 2.72 – 2.58 (m, 2H), 2.31 (t, *J* = 8.2, 7.3 Hz, 2H), 1.67 – 1.52 (m, 4H), 1.46 – 1.37 (m, 10H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.08 (qd, *J* = 12.5, 4.4 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 173.7, 154.8, 79.3, 60.3, 43.7 (2C), 35.5, 31.8 (2C), 31.6, 31.4, 28.5 (3C), 14.2.

Data are consistent with literature values. Thèse de Lam, B. V. Synthèse de Ligands Iodés En Série Indazole : Application En Imagerie TEMP Des Récepteurs 5-HT 4 Centraux, 2015.

3-{1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]piperidin-4-yl}propanoic acid **62**



Molecular Weight: 257.33 g.mol⁻¹

Formula: C₁₃H₂₃NO₄

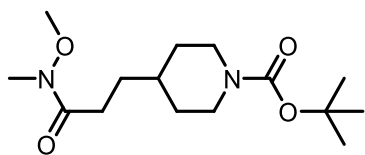
The compound **61** (4.9 g, 17.2 mmol) and 1 M NaOH solution (65 mL) were stirred in MeOH (100 mL) at 40 °C for 2.5 h. The mixture was allowed to cool to RT and was adjusted to pH 6 with 3 M HCl and evaporated down. The residue was dissolved in EtOAc and the mixture was washed with H₂O (2 times). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo* to afford 3-{1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]piperidin-4-yl}propanoic acid **62** as a beige solid in quantitatively

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.17 – 3.96 (m, 2H), 2.73 – 2.61 (m, 2H), 2.38 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 1.71 – 1.56 (m, 4H), 1.49 – 1.39 (m, 10H), 1.09 (qd, *J* = 12.6, 4.4 Hz, 2H). OH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 179.1, 154.9, 79.4, 43.5 (2C), 35.4, 31.8 (2C), 31.2, 31.1, 28.5 (3C).

Data are consistent with literature values. Thèse de Lam, B. V. Synthèse de Ligands Iodés En Série Indazole : Application En Imagerie TEMP Des Récepteurs 5-HT 4 Centraux, 2015.

Tert-butyl 4-{2-[methoxy(methyl)carbamoyl]ethyl}piperidine-1-carboxylate **63**



Molecular Weight: 300.4 g.mol⁻¹

Formula: C₁₅H₂₈N₂O₄

In a round bottom flask under nitrogen atmosphere, were added 3-{1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]piperidin-4-yl}propanoic acid **62** (2 g, 7.8 mmol), TEA (1.3 mL, 9.3 mmol) in anhydrous THF (15 mL). The mixture was cooled at 0°C and EDCI (2.83 mL, 16.0 mmol), HOBt (1.83 g, 12.0 mmol) and *N,O*-Dimethylhydroxylamine hydrochloride (1.2 g, 11.7 mmol) were added. The mixture was warmed up to RT and stirred for 20 h. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 2/3) to afford *tert*-butyl 4-{2-[methoxy(methyl)carbamoyl]ethyl}piperidine-1-carboxylate **63** (2.15 g, 92 %) as a yellow oil.

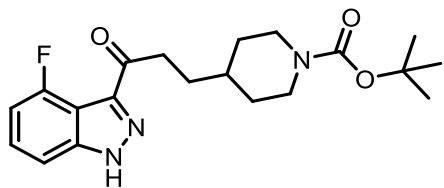
IR (KBr) ν 3483, 2974, 2931, 2852, 1692, 1422, 1389, 1276, 1245, 1166, 998, 967, 865, 769 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.13 – 3.92 (m, 2H), 3.62 (s, 3H), 3.11 (s, 3H), 2.69 – 2.53 (m, 2H), 2.38 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 1.66 – 1.58 (m, 2H), 1.52 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.42 – 1.33 (m, 10H), 1.04 (qd, *J* = 12.5, 4.4 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 174.4, 154.8, 79.1, 61.2, 43.8 (2C), 35.5, 32.1, 31.9 (2C), 31.0, 29.10, 28.42 (3C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. C₁₅H₂₈N₂O₄Na [M+Na]⁺ 323.1947 found 323.1948.

Tert-butyl 4-[3-(4-fluoro-1*H*-indazol-3-yl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate **64**



Molecular Weight : 375.44 g.mol⁻¹

Formula : C₂₀H₂₆FN₃O₃

Starting from 4-fluoro-2-(oxan-2-yl)-2*H*-indazole **23a** (600 mg, 2.72 mmol) using the General procedure C, after 1 h of metalation at -10°C, *tert*-butyl 4-{2-[methoxy(methyl)carbamoyl]ethyl}piperidine-1-carboxylate **63** (1.23 g, 4.10 mmol) was added and the mixture was stirred for 8 h. The next day, additional TMPMgCl.LiCl (3.2 mL, 3.20 mmol) was added and the reaction was stirred 8 h at -10°C (2 times). A solution of 1 M HCl was added (10 mL) and the mixture was stirred 1 h at 0°C. Then, the general procedure was applied. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 6/1) to afford the desired product **64** as a yellow oil (430 mg, 43 %).

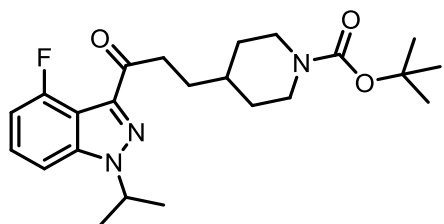
IR (KBr) ν 3231, 2973, 2928, 2858, 1692, 1666, 1438, 1366, 1163, 953, 786 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 12.28 – 11.99 (m, 1H), 7.31 – 7.26 (m, 2H), 6.87 (ddd, *J* = 10.4, 5.0, 3.4 Hz, 1H), 4.19 – 3.91 (m, 2H), 3.17 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.64 (t, *J* = 12.5 Hz, 2H), 1.73 – 1.59 (m, 4H), 1.43 – 1.39 (m, 10H), 1.09 (qd, *J* = 12.5, 4.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 195.7, 155.8 (d, *J* = 257 Hz), 155.3, 144.4 (d, *J* = 8.9 Hz), 143.1 (d, *J* = 7 Hz), 128.3 (d, *J* = 8 Hz), 111.1 (d, *J* = 23 Hz), 108.3 (d, *J* = 21 Hz), 106.4 (d, *J* = 5 Hz), 79.7, 44.5 (2C), 36.5 (d, *J* = 2.2 Hz), 35.5, 32.0 (2C), 30.7, 28.5 (3C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₂₀H₂₆FN₃O₃Na [M+Na]⁺ 398.1856 found 398.1859.

Tert-butyl 4-{3-[4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-oxopropyl}piperidine-1-carboxylate **65**



Molecular Weight: 417.53 g.mol⁻¹

Formula: C₂₃H₃₂FN₃O₃

Tert-butyl 4-[3-(4-fluoro-1*H*-indazol-3-yl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate **64** (340 mg, 0.90 mmol) in acetone (4 mL) was reacted with K₂CO₃ (373 mg, 2.70 mmol) and 2-iodo-propane (0.18 mL, 1.80 mmol) as described in the General procedure F for 15 h. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/ EtOAc 6/1) to afford the desired product **65** as an orange oil (280 mg, 74 %).

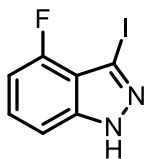
IR (KBr) ν 2977, 2930, 2851, 1690, 1453, 1423, 1247, 1164, 1138, 964, 785 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.36 – 7.29 (m, 1H), 7.24 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.91 (ddd, *J* = 10.2, 7.6, 0.7 Hz, 1H), 4.87 (hept, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.12 – 3.98 (m, 2H), 3.19 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.72 – 2.59 (m, 2H), 1.78 – 1.67 (m, 4H), 1.60 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 1.53 – 1.45 (m, 1H), 1.43 (s, 9H), 1.13 (qd, *J* = 12.5, 4.4 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 195.23, 155.94 (d, *J* = 258.2 Hz), 154.89, 142.89 (d, *J* = 9.1 Hz), 141.33 (d, *J* = 7.2 Hz), 127.66 (d, *J* = 7.6 Hz), 112.00 (d, *J* = 23.3 Hz), 108.23 (d, *J* = 21.2 Hz), 105.40 (d, *J* = 4.7 Hz), 79.16, 51.48, 43.95 (2C), 36.35, 35.53, 32.06 (2C), 31.03, 28.47 (3C), 21.99 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₂₃H₃₂FN₃O₃Na [M+ Na]⁺ 440.2325 found 440.2324.

4-fluoro-3-iodo-1*H*-indazole **66**



Molecular Weight: 262,02 g.mol⁻¹

Formula: C₇H₄FIN₂

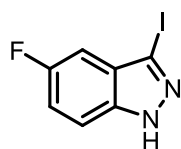
To a solution of 4-fluoroindazole **22a** (1.0 g, 7.3 mmol) in DMF (15 mL) were added I₂ (3.7 g, 14.6 mmol) and KOH (1.5 g, 27.5 mmol) at RT as described in the General procedure H. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 2/3) to give the expected 4-fluoro-3-iodo-1*H*-indazole **66** as a yellow solid (1.4 g, 73 %).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 11.20 – 10.95 (m, 1H), 7.42 – 7.31 (m, 2H), 6.84 (ddd, *J* = 10.4, 7.1, 1.2 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 155.5 (d, *J* = 255 Hz), 143.4 (d, *J* = 7 Hz), 128.8 (d, *J* = 8 Hz), 117.0 (d, *J* = 21 Hz), 106.4 (d, *J* = 19 Hz), 106.3 (d, *J* = 5 Hz), 85.9 (d, *J* = 5 Hz).

Data are consistent with literature values. Zhang, H.; Lapointe, B. T.; Anthony, N.; Azevedo, R.; Cals, J. *et al.*. Discovery of N -(Indazol-3-yl)Piperidine-4-Carboxylic Acids as RORγt Allosteric Inhibitors for Autoimmune Diseases. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11* (2), 114–119.

5-fluoro-3-iodo-1*H*-indazole **67**



Molecular Weight: 262,03 g.mol⁻¹

Formula: C₇H₅FIN₂

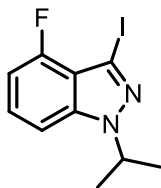
To a solution of 5-fluoroindazole **22c** (700 mg, 5.1 mmol) were added I₂ (2.6 g, 10.2 mmol) and KOH (1.0 g, 19.3 mmol) as described in the General procedure H. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 2/3) to give the expected 5-fluoro-3-iodo-1*H*-indazole **67** as a brown solid (1.12 g, 84 %).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 13.62 (s, 1H), 7.6 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz 1H), 7.32 (td, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 7.2 (dd, *J* = 9.0, 2.5, 0.5 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 157.5 (d, *J* = 237 Hz), 137.6; 127.0 (d, *J* = 10 Hz), 116.8 (d, *J* = 27 Hz), 112.4 (d, *J* = 10 Hz), 104.4 (d, *J* = 24 Hz), 92.7 (d, *J* = 6 Hz).

Data are consistent with literature values. Vera, G.; Diethelm, B.; Terraza, C.; Recabarren-Gajardo, G. Suzuki-Type Cross-Coupling Reaction of Unprotected 3-Iodoindazoles with Pinacol Vinyl Boronate: An Expeditive C-3 Vinylation of Indazoles under Microwave Irradiation. *Molecules* **2018**, 23 (8), 2051.

4-fluoro-3-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole **68**



Molecular Weight : 304,10 g.mol⁻¹

Formula : C₁₀H₁₀FIN₂

4-fluoro-3-iodo-1*H*-indazole **66** (1.2 g, 4.6 mmol) was reacted with K₂CO₃ (1.14 g, 6.9 mmol, 1.5 equiv.) and 2-bromopropane (1.3 mL, 13.8 mmol, 3 equiv.) as described in General method F for 18 h. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/ EtOAc 30/1) to afford the desired product 4-fluoro-3-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole **68** as a yellow oil (0.52 g, 37 %).

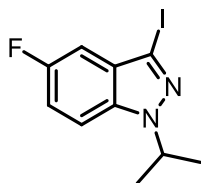
IR (KBr) ν 3434, 2981, 1630, 1572, 1298, 1228, 1155, 777, 733 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.33 – 7.27 (m, 1H), 7.21 (dd, *J* = 8.6, 0.7 Hz, 1H), 6.77 (ddd, *J* = 10.4, 7.6, 0.7 Hz, 1H), 4.79 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 1.58 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 155.5 (d, *J* = 255 Hz), 142.3 (d, *J* = 7 Hz), 127.5 (d, *J* = 7 Hz), 117.6 (d, *J* = 19 Hz), 105.7 (d, *J* = 18 Hz), 105.4 (d, *J* = 5 Hz), 82.4 (d, *J* = 5 Hz), 51.58, 22.19 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₁₀H₁₁FIN₂ [M+H]⁺ 304.9953, found 304.9951.

5-fluoro-3-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole **69**



Molecular Weight: 304,10 g.mol⁻¹

Formula: C₁₀H₁₀FIN₂

5-fluoro-3-iodo-1*H*-indazole **67** (1.1 g, 4.3 mmol) was reacted with K₂CO₃ (885 mg, 6.3 mmol.) and 2-bromopropane (1.2 mL, 12.8 mmol) as described in the General procedure F for 18 h. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/ EtOAc 30/1) to afford the desired product 5-fluoro-3-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole **69** as a yellow oil (670 mg, 52 %).

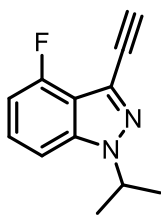
IR (KBr) ν 3433, 2979, 2933, 1495, 1446, 1286, 1203, 1047, 843, 797, 595 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.34 (dd, *J* = 9.0, 4.0 Hz, 1H), 7.16 (td, *J* = 9.0, 2.4 Hz, 1H), 7.09 (dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 4.78 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 1.57 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 158.1 (d, *J* = 240 Hz), 136.3, 128.5 (d, *J* = 10 Hz), 116.8 (d, *J* = 27 Hz), 110.4 (d, *J* = 9 Hz), 105.7 (d, *J* = 24 Hz), 89.4 (d, *J* = 6 Hz), 51.5, 22.3 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₁₀H₁₁FIN₂ [M+H]⁺ 304.9953, found 304.9951

3-ethynyl-4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole **70**



Molecular Weight : 202,23 g.mol⁻¹

Formula : C₁₂H₁₁FN₂

In a solution of 4-fluoro-3-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole **68** (350 mg, 1.15 mmol) in DMF (3 mL), were added Pd(PPh₃)₄ (66 mg, 0.06 mmol), CuI (22 mg, 0.11 mmol), TEA (0.24 mL, 1.72 mmol) and ethynyltrimethylsilane (0.48 mL, 3.45 mmol) as described in the General procedure I. the TMS-alkyne intermediate was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 6/1) and it was deprotected by an addition of TBAF in THF (10 mL, 3.9 mmol). The reaction was stirred for 1 h at RT. Then, as described in the General procedure was obtained 3-ethynyl-4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole **70** (0.22 g, 95%) as a brown oil.

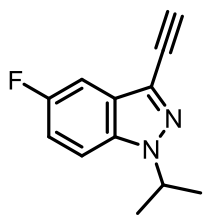
IR (KBr) ν 3436, 3297, 2982, 1631, 1578, 1346, 1242, 1095, 781 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.30 (ddd, *J* = 8.5, 7.6, 4.7 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.82 (ddd, *J* = 10.1, 7.6, 0.7 Hz, 1H), 4.82 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.36 (s, 1H), 1.60 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 156.0 (d, *J* = 254 Hz), 141.5 (d, *J* = 8 Hz), 127.5 (d, *J* = 8 Hz), 124.0 (d, *J* = 2 Hz), 115.4 (d, *J* = 20 Hz), 106.0 (d, *J* = 18 Hz), 105.5 (d, *J* = 4 Hz), 80.3, 75.9, 51.4, 22.1 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₁₂H₁₁FN₂ [M+H]⁺ 203.0985 found 203.0983.

3-ethynyl-5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole **71**



Molecular Weight: 202,23 g.mol⁻¹

Formula: C₁₂H₁₁FN₂

In a solution of 5-fluoro-3-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole **69** (500 mg, 1.64 mmol) in DMF (3 mL), were added Pd(PPh₃)₄ (94 mg, 0.08 mmol), CuI (31 mg, 0.16 mmol), TEA (0.34 mL, 2.5 mmol) and ethynyltrimethylsilane (0.69 mL, 4.9 mmol) as described in the General procedure I. the TMS-alkyne intermediate was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 6/1) and it was deprotected by an addition of TBAF in THF (10 mL, 2.5 mmol). The reaction was stirred for 1 h at RT. Then, as described in the General procedure I, was obtained 3-ethynyl-5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole **71** (181 mg, 54 %) as a brown oil.

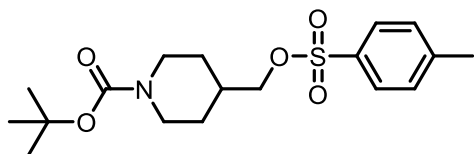
IR (KBr) ν 3434, 2978, 2923, 2853, 1631, 1488, 1471, 1235, 1085, 800 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.44 – 7.36 (m, 2H), 7.17 (td, *J* = 9.0, 2.4 Hz, 1H), 4.81 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.39 (s, 1H), 1.59 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 158.4 (d, *J* = 240 Hz), 135.7, 126.5 (d, *J* = 6 Hz), 125.8 (d, *J* = 10 Hz), 116.3 (d, *J* = 28 Hz), 110.6 (d, *J* = 10 Hz), 104.7 (d, *J* = 24 Hz), 81.2, 75.2, 51.3, 22.1(2C).

HRMS/ESI: in progress

Tert-butyl 4-[[4-methylbenzenesulfonyl]oxy]methyl]piperidine-1-carboxylate **72**



Molecular Weight: 369.48 g.mol⁻¹

Formula: C₁₈H₂₇NO₅S

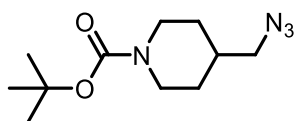
To a solution of *tert*-butyl 4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate **42** (1.0 g, 4.6 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL), TEA (1.0 mL, 7.0 mmol) and 4-toluenesulfonyl chloride (1.0 g, 5.6 mmol) were added slowly at 0°C. The reaction was stirred at RT for 12 h. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was extracted in EtOAc and washed succinctly with H₂O, HCl 1N and sat. aq. NaHCO₃. The solvent was evaporated and the residue was dried over MgSO₄, filtered and evaporated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 3/1) to give *tert*-butyl 4-[[4-methylbenzenesulfonyl]oxy]methyl]piperidine-1-carboxylate **72** as a yellow oil. (500 mg, 29 %).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.76 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.18 – 3.96 (m, 2H), 3.83 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.73 – 2.52 (m, 2H), 2.43 (s, 3H), 1.85 – 1.72 (m, 1H), 1.66 – 1.53 (m, 2H), 1.42 (s, 9H), 1.08 (qd, *J* = 12.4, 4.5 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 154.6, 144.9, 132.9, 129.9 (2C), 127.8 (2C), 79.5, 74.0, 43.1 (2C), 35.8, 28.4 (3C), 28.17 (2C), 21.7.

Data are consistent with literature values. Vankayalapati, H.; Sharma, S.; Kaadige, M.; Weston, A.; Thode, T. Substituted-3H-Imidazo[4,5-*c*]Pyridine and 1H-Pyrrolo [2,3-*c*]Pyridine Series of Novel Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase-1 (ENPP1) and Stimulator for Interferon Genes (STING) Modulators as Cancer Immunotherapeutics, **2020**. [WO 2020028724](#)

tert-butyl 4-(azidomethyl)piperidine-1-carboxylate **73**



Molecular Weight : 240,30 g.mol⁻¹

Formula : C₁₁H₂₀N₄O₂

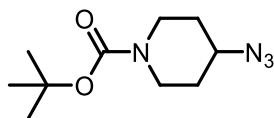
To a solution of *tert*-butyl 4-[[4-methylbenzenesulfonyl]oxy]methyl]piperidine-1-carboxylate **72** (450 mg, 1.22 mmol) in dry DMF (15 mL), NaN₃ (95 mg, 1.46 mmol) was added slowly at RT. The mixture was stirred for 18 h at 80°C. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was extracted 5 times in EtOAc/H₂O. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated *in vacuo* to afford the *tert*-butyl 4-(azidomethyl)piperidine-1-carboxylate **73** (274 mg, 94 %) as a yellow oil which was used without further purification.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.12 (d, *J* = 12.9 Hz, 2H), 3.18 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.75 – 2.60 (m, 2H), 1.75 – 1.60 (m, 3H), 1.44 (s, 9H), 1.15 (qd, *J* = 13.1, 4.1 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 154.8, 79.5, 57.0, 43.4 (2C), 36.5, 29.6 (2C), 28.4 (3C).

Data are consistent with literature values. Vallone, A.; D'Alessandro, S.; Brogi, S.; Brindisi, M.; Chemi, G.; Alfano, G.; Lamponi, S.; Lee, S. G.; Jez, J. M.; Koolen, K. J. M.; Dechering, K. J.; Saponara, S.; Fusi, F.; Gorelli, B.; Taramelli, D.; Parapini, S.; Caldelari, R.; Campiani, G.; Gemma, S.; Butini, S. Antimalarial Agents against Both Sexual and Asexual Parasites Stages: Structure-Activity Relationships and Biological Studies of the Malaria Box Compound 1-[5-(4-Bromo-2-Chlorophenyl)Furan-2-Yl]-N-[(Piperidin-4-Yl)Methyl]Methanamine (MMV019918) and Analog. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *150*, 698–718.

Tert-butyl 4-azidopiperidine-1-carboxylate **74**



Molecular Weight: 226.28 g.mol⁻¹

Formula: C₁₀H₁₈N₄O₅

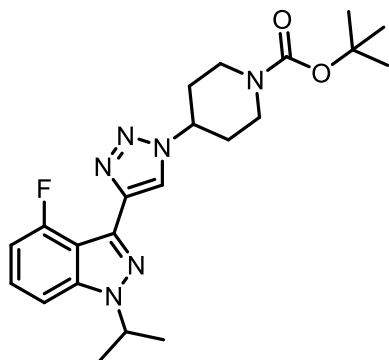
To a solution of *tert*-butyl 4-hydroxypiperidine-1-carboxylate **42** (500 mg, 2.5 mmol) in CH₂Cl₂ (4 mL), TEA (0.52 mL, 3.72 mmol) and 4-toluenesulfonyl chloride (0.29 mL, 3.72 mmol) were added slowly at 0°C. The reaction was stirred at RT for 1 h. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was extracted in EtOAc and washed 2 times with H₂O. The solvent was evaporated and the residue was dried over MgSO₄, filtered and evaporated *in vacuo*. DMF (3 mL) and NaN₃ (193 mg, 3.0 mmol) were added and the mixture was stirred for 18 h at reflux. The reaction was extracted 2 times with EtOAc/H₂O and organic layers were dried over MgSO₄, filtered, evaporated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 3/1) to give *tert*-butyl 4-azidopiperidine-1-carboxylate **74** as a colorless oil. (370 mg, 66 %).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 3.81 – 3.64 (m, 2H), 3.49 (tt, *J* = 9.0, 3.9 Hz, 1H), 3.06 – 2.93 (m, 2H), 1.82 – 1.71 (m, 2H), 1.51 – 1.40 (m, 2H), 1.37 (s, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 154.5, 79.6, 57.5, 41.3 (2C), 30.5 (2C), 28.3 (3C).

Data are consistent with literature values. Divakaran, A.; Talluri, S. K.; Ayoub, A. M.; Mishra, N. K.; Cui, H.; Widen, J. C.; Berndt, N.; Zhu, J.-Y.; Carlson, A. S.; Topczewski, J. J.; Schonbrunn, E. K.; Harki, D. A.; Pomerantz, W. C. K. Molecular Basis for the N-Terminal Bromodomain-and-Extra-Terminal-Family Selectivity of a Dual Kinase–Bromodomain Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (20), 9316–9334.

Tert-butyl 4-{4-[4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl}piperidine-1-carboxylate **75**



Molecular Weight : 428,50 g.mol⁻¹

Formula : C₂₂H₂₉FN₆O₂

Following the General procedure J, were introduced 3-ethynyl-4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole **70** (130 mg, 0.64 mmol), *tert*-butyl 4-azidopiperidine-1-carboxylate **74** (189 mg, 0.84 mmol), CuSO₄ (31 mg, 0.19 mmol), TEA (0.1 mL, 0.7 mmol) and sodium ascorbate (62 mg, 0.32 mmol). Then, the work up follow the general procedure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/ EtOAc 1/3) affording the expected *tert*-butyl 4-{4-[4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl}piperidine-1-carboxylate **75** as a yellow oil (120 mg, 44%).

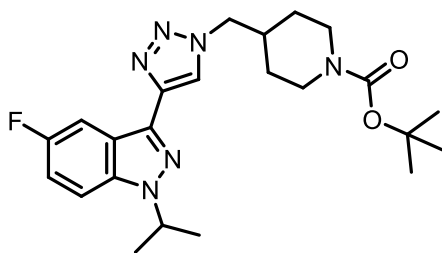
IR (KBr) ν 3433, 2977, 2925, 259, 1689, 1632, 1423, 1233, 1061, 783 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.06 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.34 – 7.27 (m, 1H), 7.27 – 7.23 (m, 1H), 6.82 (ddd, *J* = 11.1, 7.4, 0.9 Hz, 1H), 4.89 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.72 (tt, *J* = 11.6, 4.0 Hz, 1H), 4.42 – 4.17 (m, 2H), 3.05 – 2.89 (m, 2H), 2.33 – 2.21 (m, 2H), 2.14 – 1.94 (m, 2H), 1.65 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.49 (s, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) 155.9 (d, *J* = 251 Hz), 154.5, 142.4 (d, *J* = 9 Hz), 141.1, 133.1 (d, *J* = 3 Hz), 127.0 (d, *J* = 8 Hz), 120.5 (d, *J* = 13 Hz), 111.4 (d, *J* = 21 Hz), 105.6 (d, *J* = 4 Hz), 105.5 (d, *J* = 20 Hz), 80.1, 58.2, 51.3 (2C), 42.6 (2C), 32.5, 28.4 (3C), 22.0 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₂H₃₀FN₆O₂ [M+H]⁺ 429.2414 found 429.2416

tert-butyl 4-({4-[5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-1*H*-1,2,3-triazol-5-yl)methyl) piperidine-1-carboxylate **76**



Molecular Weight: 442,53 g.mol⁻¹

Formula: C₂₃H₃₁FN₆O₂

Following the General procedure J, were introduced 3-ethynyl-5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole **71** (190 mg, 0.94 mmol), *tert*-butyl 4-(azidomethyl)piperidine-1-carboxylate **73** (340 mg, 1.41 mmol), CuSO₄ (45 mg, 0.29 mmol), TEA (0.16 mL, 1.13 mmol) and sodium ascorbate (90 mg, 0.47 mmol). Then, the work up follow the general procedure and the crude product was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/ EtOAc 3/2) affording the expecting *tert*-butyl 4-({4-[5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-1*H*-1,2,3-triazol-5-yl)methyl) piperidine-1-carboxylate **76** as a yellow oil (210 mg, 50 %).

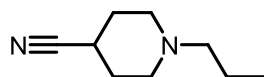
IR (KBr) ν 3433, 2977, 2925, 259, 1689, 1632n 1423, 1233, 1061, 783 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.08 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.33 (dd, *J* = 9.1, 4.0 Hz, 1H), 7.12 (td, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 4.79 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.27 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.09 (s, 2H), 2.72 – 2.54 (m, 2H), 2.17 – 2.02 (m, 1H), 1.64 – 1.49 (m, 8H), 1.40 (s, 9H), 1.27 – 1.13 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 158.1 (d, *J* = 238 Hz), 154.6, 142.9, 136.6, 135.3 (d, *J* = 6 Hz), 121.8 (d, *J* = 10 Hz), 120.7, 115.9 (d, *J* = 27 Hz), 110.0 (d, *J* = 10 Hz), 106.7 (d, *J* = 24 Hz), 79.5, 55.5, 50.8, 43.3 (2C), 37.3 (2C), 29.5, 28.4 (3C), 22.1 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃H₃₂FN₆O₂ [M+H]⁺ 443.2571 found 443.2592.

1-propylpiperidine-4-carbonitrile **77**



Molecular Weight: 152,24 g.mol⁻¹

Formula: C₉H₁₆N₂

In a round bottom flask were introduced 1-propylpyridine-4-carboxamide **32a** (200 mg, 1,18 mmol), TEA (0,66 mL, 4,7 mmol), anhydrous TFA (0.26 mL, 1,88 mmol) in anhydrous THF (5mL) at 0°C. The solution was stirred at 0°C for 2 h, then the reaction was quenched with an addition of H₂O. The crude mixture was extracted 3 times with EtOAc. The combined organic layers were washed with H₂O and brine, dried over MgSO₄, filtered and evaporated in *vacuo*. The crude product 1-propylpiperidine-4-carbonitrile **77** (175 mg, 98 %) as a white oil was used without further purification for the next step.

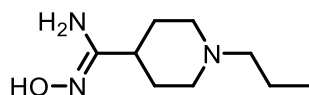
IR (KBr) in progress

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 2.66 – 2.51 (m, 3H), 2.30 – 2.14 (m, 4H), 1.93 – 1.73 (m, 4H), 1.47 – 1.36 (m, 2H), 0.81 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 121.7, 60.6, 51.3 (2C), 28.7, 26.1 (2C), 19.9, 11.8.

HRMS/ESI: *m/z* calcd. In progress

N'*-hydroxy-1-propylpiperidine-4-carboximidamide **78*



Molecular Weight: 185,27 g.mol⁻¹

Formula: C₉H₁₉N₃O

In a round bottom flask were introduced 1-propylpiperidine-4-carbonitrile **77** (500 mg, 3,3 mmol), TEA (0,55 mL, 3,9 mmol), NH₂OH.HCl (342 mg, 1,88 mmol) in EtOH (4 mL). The solution was stirred overnight at RT, then the solvent was evaporated *in vacuo*. The residue was extracted 3 times in EtOAc and a sat. solution of NaHCO₃. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on alumina gel (CH₂Cl₂/MeOH 95/5) to afford *N'*-hydroxy-1-propylpiperidine-4-carboximidamide **78** (127 mg, 21 %) as a white oil.

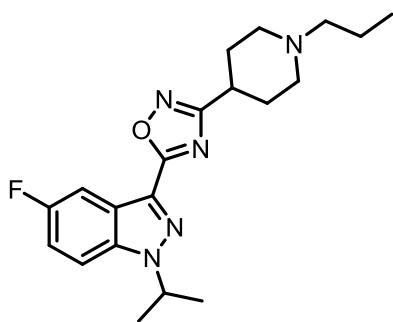
IR (KBr) In progress

¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 4.87 (s, 3H), 3.02 – 2.91 (m, 2H), 2.33 – 2.23 (m, 2H), 2.10 – 1.92 (m, 3H), 1.74 – 1.65 (m, 4H), 1.56 – 1.43 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Methanol-*d*₄) δ 159.7, 61.9, 54.6, 40.0 (2C), 30.1, 20.6 (2C), 12.2.

HRMS/ESI: *m/z* calcd. In progress

5-fluoro-1-(propan-2-yl)-3-[3-(1-propylpiperidin-4-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-1H-indazole **79**



Molecular Weight: 371,45 g.mol⁻¹

Formula: C₂₀H₂₆FN₅O

In a round bottom flask were added to a solution of 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-indazole-3-carboxylic acid **29** (150 mg, 0.67 mmol) in anhydrous THF (1 mL) (COCl)₂ (117 μL, 1.3 mmol) and DMF (3 drops). The mixture was stirred at RT for 3 h, then the solvent was evaporated *in vacuo*. The residue was dissolved in pyridine (2 mL) and *N'*-hydroxy-1-propylpiperidine-4-carboximidamide **78** (150 mg, 0.81 mmol) was added. The reaction was heated at 100°C for 4 h, water was added and the mixture was extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated *in vacuo*. The crude was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 99/1) to give the expected product 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-3-[3-(1-propylpiperidin-4-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-1H-indazole **79** (50 mg, 20 %) as a yellow oil.

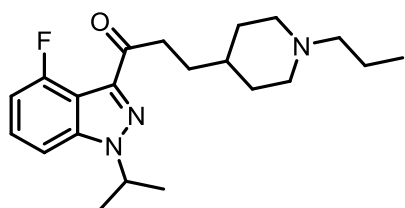
IR (KBr) ν 3368, 2958, 2806, 1725, 1602, 1496, 1455, 1257, 1201, 1072, 850 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.93 (ddd, *J* = 8.5, 2.5, 0.7 Hz, 1H), 7.50 (ddd, *J* = 9.0, 4.0, 0.7 Hz, 1H), 7.24 (td, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 4.94 (h, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.10 – 2.93 (m, 3H), 2.41 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 2.33 – 2.03 (m, 6H), 1.66 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.58 (dd, *J* = 13.5, 5.9 Hz, 2H), 0.92 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 173.2, 170.5, 159.3 (d, *J* = 242 Hz), 136.6, 129.6 (d, *J* = 6 Hz), 123.3 (d, *J* = 11 Hz), 116.9 (d, *J* = 28 Hz), 111.1 (d, *J* = 10 Hz), 106.1 (d, *J* = 25 Hz), 60.7, 52.8 (2C), 52.2, 33.7 (2C), 29.2, 22.1 (2C), 19.7, 11.9.

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₀H₂₇FN₅O [M+H]⁺ 372.2200 found 372.2197

1-[4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-(1-propylpiperidin-4-yl)propan-1-one **80**



Molecular Weight: 359.49 g.mol⁻¹

Formula: C₂₁H₃₀FN₃O

According to the General procedure G, starting from *tert*-butyl 4-{3-[4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-oxopropyl}piperidine-1-carboxylate **65** (130 mg, 0.31 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL), using TFA (0.24 mL, 3.10 mmol), K₃PO₄ (658 mg, 3.10 mmol) in water (2 mL), then 1-iodopropane (153 mg, 0.90 mmol), TEA (0.10 mL, 0.70 mmol) in propan-2-ol (2 mL). The mixture was stirred at 60°C for 18 h. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 95/5) affording the expected 1-[4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-(1-propylpiperidin-4-yl)propan-1-one **80** (39 mg, 35 %) as a yellow oil.

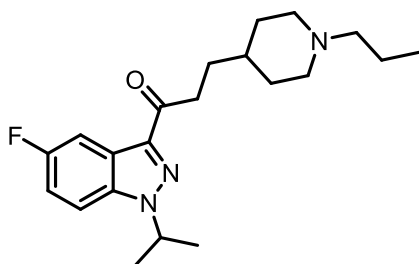
IR (KBr) ν 3436, 2959, 2930, 1686, 1506, 1454, 1384, 1246, 1136, 970, 787 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.39 – 7.31 (m, 1H), 7.25 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.92 (ddt, *J* = 10.2, 8.0, 0.7 Hz, 1H), 4.87 (hept, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.26 – 3.14 (m, 4H), 2.60 – 2.50 (m, 2H), 2.36 – 2.24 (m, 2H), 1.94 – 1.85 (m, 2H), 1.81 – 1.52 (m, 13H), 0.91 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 194.1, 154.9 (d, *J* = 258 Hz), 141.9 (d, *J* = 9 Hz), 140.2 (d, *J* = 7 Hz), 126.7 (d, *J* = 7 Hz), 111.0 (d, *J* = 23 Hz), 107.2 (d, *J* = 21 Hz), 104.4 (d, *J* = 4 Hz), 59.0, 52.2 (2C), 50.5, 35.2, 35.1, 33.1, 29.4 (2C), 21.0 (2C), 17.8, 10.7.

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₁H₃₁FN₃O [M+H]⁺ 360.2451 found 360.2466

1-[5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-(1-propylpiperidin-4-yl)propan-1-one **81**



Molecular Weight : 359,48 g.mol⁻¹

Formula : C₂₁H₃₀FN₃O

According to the General procedure G, starting from *tert*-butyl 4-{3-[5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-oxopropyl}piperidine-1-carboxylate **58** (100 mg, 0.24 mmol), CH₂Cl₂ (5 mL), TFA (0.18 mL, 2.40 mmol), K₃PO₄ (510 mg, 2.40 mmol) in water (2 mL), then, 1-iodopropane (0.05 mL, 0.48 mmol), TEA (0.10 mL, 0.70 mmol) in propan-2-ol (2mL). The mixture was stirred at 60 °C for 4 h. The solvent was removed and the crude product was purified by column chromatography on alumina (CH₂Cl₂/MeOH 99/1 to 95/5) to give 1-[5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-(1-propylpiperidin-4-yl)propan-1-one **81** (5 mg , 6 %) as a yellow solid.

Mp: 128°C

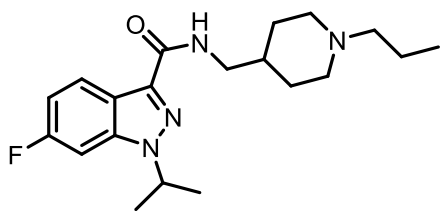
IR (KBr) ν 3433, 2928, 1669, 1496, 1467, 1412, 1389, 1266, 1188, 1094, 1042, 896, 805 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.00 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 7.42 (dd, *J* = 9.1, 4.0 Hz, 1H), 7.18 (td, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 4.87 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.16 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.98 – 2.88 (m, 2H), 2.30 – 2.21 (m, 2H), 1.94 – 1.86 (m, 2H), 1.80 – 1.72 (m, 6H), 1.62 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 1.53 – 1.46 (m, 1H), 1.38 – 1.32 (m, 2H), 0.89 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 197.5, 159.6 (d, *J* = 241 Hz), 141.5 (d, *J* = 5 Hz), 136.8, 123.3 (d, *J* = 11 Hz), 116.1 (d, *J* = 28 Hz), 110.4 (d, *J* = 10 Hz), 107.3 (d, *J* = 24 Hz), 61.1, 53.9 (2C), 51.6, 36.0, 35.4, 32.0 (2C), 31.2, 22.1 (2C), 20.0, 12.1.

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₂₁H₃₁FN₃O [M+H]⁺ 360.2451 found 360.2454.

6-fluoro-1-(propan-2-yl)-*N*-[(1-propylpiperidin-4-yl)methyl]-1*H*-indazole-3-carboxamide **82**



Molecular Weight: 360.48 g.mol⁻¹

Formula: C₂₀H₂₉FN₄O

According to the General procedure G, starting from *tert*-butyl 4-([6-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido)methyl)piperidine-1-carboxylate **52** (150 mg, 0.36 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) using TFA (0.3 mL, 3.6 mmol), K₃PO₄ (762 mg, 3.6 mmol) in water (2 mL). The residue was taken up in propan-2-ol (4 mL), 1-iodopropane (0.06 mL, 0.54 mmol) and TEA (0.1 mL, 0.7 mmol) were added. The mixture was stirred for 24 h at reflux. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by flash column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc/NH₄OH 95/5/0.5) to give 6-fluoro-1-(propan-2-yl)-*N*-[(1-propylpiperidin-4-yl)methyl]-1*H*-indazole-3-carboxamide **82** (13 mg, 10 %) as a yellow oil.

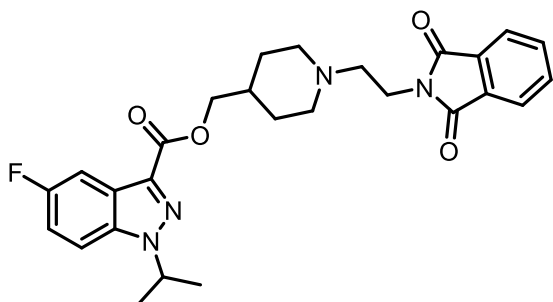
IR (KBr) ν 3425, 2931, 2876, 1654, 1628, 1541, 1463, 1367, 1202, 1123, 955, 830 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.30 (ddd, *J* = 8.9, 5.4, 0.6 Hz, 1H), 7.21 – 7.13 (m, 1H), 7.10 – 6.99 (m, 2H), 4.74 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.40 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.23 – 3.13 (m, 2H), 2.56 – 2.47 (m, 2H), 2.31 – 2.21 (m, 2H), 1.95 – 1.83 (m, 3H), 1.69 (tdd, *J* = 15.0, 11.0, 4.9 Hz, 4H), 1.58 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 0.92 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.8, 162.1 (d, *J* = 246 Hz), 140.2 (d, *J* = 12 Hz), 137.0, 124.5 (d, *J* = 11 Hz), 119.7, 112.5 (d, *J* = 26 Hz), 95.0 (d, *J* = 26 Hz), 60.3, 53.0, 51.2 (2C), 44.1, 35.3, 28.6 (2C), 22.0 (2C), 19.1, 11.8.

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₀H₂₉FN₄O [M+H]⁺ 361.2404 found 361.2405

{1-[2-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-2-yl)ethyl]piperidin-4-yl}methyl 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **83**



Molecular Weight: 492,54 g.mol⁻¹

Formula: C₂₇H₂₉FN₄O₄

According to the General procedure G, starting from {1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]piperidin-4-yl}methyl 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **47** (200 mg, 0.5 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) using TFA (0.4 mL, 5.0 mmol), K₃PO₄ (1.04 g, 5.0 mmol) in water (2 mL). The residue was taken up in acetonitrile (4 mL), (2-(2-bromoethyl)isoindoline-1,3-dione (152 mg, 0.6 mmol) and TEA (0.13 mL, 1.0 mmol) were added. The mixture was stirred for 24 h at reflux. The solvent was evaporated and the residue was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 3/1) to give the expected **83** (90 mg, 37 %) as a yellow oil.

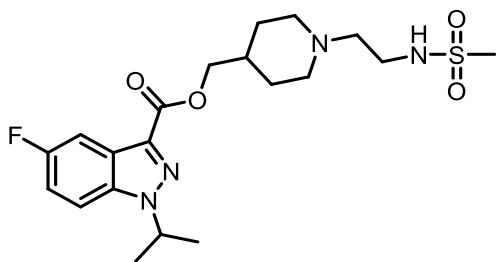
IR (KBr) ν 3445, 2939, 1712, 1467, 1396, 1255, 1176, 1070; 719 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.84 (dd, *J* = 5.3, 3.1 Hz, 2H), 7.76 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 7.70 (dd, *J* = 5.5, 3.0 Hz, 2H), 7.46 (dd, *J* = 9.0, 4.0 Hz, 1H), 7.19 (td, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 4.92 (hept, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.28 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.83 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.04 (d, *J* = 1.3 Hz, 2H), 2.64 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.08 (t, *J* = 10.7 Hz, 2H), 1.95 – 1.85 (m, 1H), 1.85 – 1.75 (m, 2H), 1.64 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H), 1.35 (qd, *J* = 12.0, 3.7 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 168.3 (2C), 162.6, 159.2 (d, *J* = 241 Hz), 158.0, 136.6, 134.4 (d, *J* = 6 Hz), 133.8 (2C), 132.2 (2C), 124.1 (d, *J* = 11 Hz), 123.2 (2C), 116.2 (d, *J* = 28 Hz), 110.9 (d, *J* = 10 Hz), 106.5 (d, *J* = 24 Hz), 69.2, 55.9, 53.2, 52.2, 35.5 (2C), 35.4, 29.1, 22.0 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₇H₃₀FN₄O₄ [M+H]⁺ 493.2251 found 493.2250

[1-(2-methanesulfonamidoethyl)piperidin-4-yl]methyl 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **84**



Molecular Weight : 440,53 g.mol⁻¹

Formula : C₂₀H₂₉FN₄O₄S

In a round bottom flask was dissolved {1-[2-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-2-yl)ethyl]piperidin-4-yl}methyl 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **83** (200 mg, 0.4 mmol) in propan-2-ol (4 mL). Hydrazine was added (0.3 mL, 6.0 mmol) and the mixture was stirred at 60°C for 2h and it was cooled down to RT and filtered. The filtrate was evaporated *in vacuo*, the residue was dissolved in chloroform and filtered 2 times at 0°C. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ (7 mL), TEA (0.08 mL, 0.6 mmol) and methanesulfonyl chloride (0.02 mL, 0.6 mmol) were added. The mixture was stirred at RT for 0.5 h, the organic layer was washed with water (7 mL), dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude was purified by chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 98/2) affording the [1-(2-methanesulfonamidoethyl)piperidin-4-yl]methyl 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **84** (5 mg, 3 %) as a yellow oil.

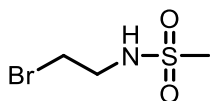
IR (KBr) ν 3436, 2977, 2918, 2852, 1720, 1632, 1479, 1423, 1324, 1180, 1072 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.77 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 7.48 (dd, *J* = 9.0, 4.0 Hz, 1H), 7.20 (td, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 4.93 (hept, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.33 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.24 – 3.15 (m, 2H), 2.97 (s, 3H), 2.94 – 2.87 (m, 2H), 2.58 – 2.50 (m, 2H), 2.14 – 2.02 (m, 2H), 1.98 – 1.89 (m, 1H), 1.89 – 1.80 (m, 2H), 1.65 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.41 (qd, *J* = 12.4, 3.8 Hz, 2H). NH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.5, 159.2 (d, *J* = 241 Hz), 136.6, 134.2 (d, *J* = 5 Hz), 124.1 (d, *J* = 10 Hz), 116.3 (d, *J* = 28 Hz), 111.1 (d, *J* = 10 Hz), 106.4 (d, *J* = 25 Hz), 68.4, 57.3 (2C), 53.2, 52.3, 40.1, 39.2, 34.8 (2C), 28.1, 22.0 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₀H₃₀FN₄O₄S [M+H]⁺ 441.1972 found 441.1974.

N-(2-bromoethyl)methanesulfonamide **85**



Molecular Weight: 202,07 g.mol⁻¹

Formula: C₃H₈BrNO₂S

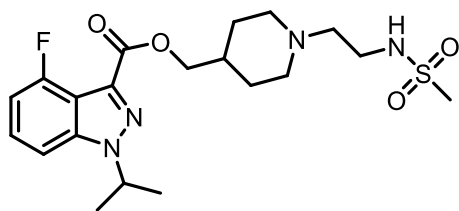
In a round bottom flask were introduced 2-bromoethylamine hydrobromide (1,2 mg, 5,8 mmol) and TEA (1,6 mL, 10,6 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL). Then, MeSO₂Cl (0,45 ml, 5,8 mmol) was added slowly at 0°C and the reaction was stirred at RT for 18 h. The mixture was extracted 3 times with CH₂Cl₂ and water. The combined organic layers were dried under MgSO₄, filtered and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 3/1) to afford *N*-(2-bromoethyl)methanesulfonamide **85** (450 mg, 38 %) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 5.35 – 5.23 (m, 1H), 3.52 – 3.43 (m, 4H), 2.98 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 44.7, 40.9, 32.0.

Data are consistent with literature values. Gaster, L. M.; Wyman, P. A. Condensed Indole Derivatives as 5HT₄-Receptor Antagonists, **1998**. US005852014A

[1-(2-methanesulfonamidoethyl)piperidin-4-yl]methyl 4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-carboxylate **86**



Molecular Weight: 440.53 g.mol⁻¹

Formula: C₂₀H₂₉FN₄O₄S

According to the General procedure G, starting from {1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]piperidin-4-yl}methyl 4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **49** (150 mg, 0.36 mmol), CH₂Cl₂ (3 mL), using TFA (0.27 mL, 3.60 mmol), K₃PO₄ (764 mg, 3.60 mmol) in water (2 mL), then *N*-(2-bromoethyl)methanesulfonamide **85** (112 mg, 0.60 mmol), TEA (0.10 mL, 0.7 mmol) in propan-2-ol (2mL). The mixture was stirred at 60°C for 4 h. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH 95/5/0.5) affording the expected compound **86** (33 mg, 21 %) as a yellow oil.

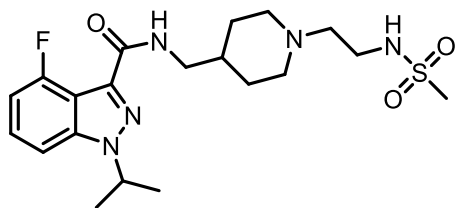
IR (KBr) ν 3286, 2939, 2816, 1719, 1627, 1507, 1318, 1210, 1155, 773 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.39 – 7.32 (m, 1H), 7.31 – 7.27 (m, 1H), 6.94 (ddd, *J* = 10.7, 7.5, 0.9 Hz, 1H), 4.92 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.30 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.25 – 3.17 (m, 2H), 2.96 (s, 3H), 2.95 – 2.87 (m, 2H), 2.60 – 2.49 (m, 2H), 2.09 (td, *J* = 11.8, 2.4 Hz, 2H), 1.94 – 1.80 (m, 3H), 1.64 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.43 (qd, *J* = 15.3, 8.7, 3.3 Hz, 2H). NH signal is missing

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.1, 155.4 (d, *J* = 257 Hz), 142.5 (d, *J* = 8 Hz), 133.4 (d, *J* = 4 Hz), 127.4 (d, *J* = 8 Hz), 112.9 (d, *J* = 21 Hz), 108.0 (d, *J* = 21 Hz), 105.8 (d, *J* = 4 Hz), 69.3, 56.8, 53.1 (2C), 52.1, 40.0, 39.7, 35.3, 28.7 (2C), 21.9 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₀H₃₀FN₄O₄S [M+H]⁺ 441.1972 found 441.1975

4-fluoro-*N*-{[1-(2-methanesulfonamidoethyl)piperidin-4-yl]methyl}-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **87**



Molecular Weight : 439.55 g.mol⁻¹

Formula : C₂₀H₃₀FN₅O₃S

According to the General procedure G, starting from *tert*-butyl 4-([4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido)methyl)piperidine-1-carboxylate **50** (150 mg, 0.36 mmol), CH₂Cl₂ (3 mL), using TFA (0.27 mL, 3.60 mmol), K₃PO₄ (764 mg, 3.60 mmol) in water (2 mL), then *N*-(2-bromoethyl)methanesulfonamide **85** (112 mg, 0.60 mmol), TEA (0.10 mL, 0.7 mmol) in propan-2-ol (2mL). The mixture was stirred at 60°C for 4 h. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH 95/5/0.5) affording the expected compound **87** (28 mg, 18 %) as a yellow oil.

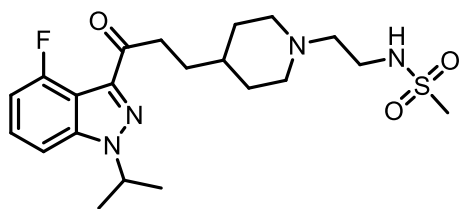
IR (KBr) ν 3368, 2926, 2849, 1664, 1536, 1318, 1230, 1148, 772, 521 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.37 – 7.30 (m, 1H), 7.26 – 7.14 (m, 2H), 6.92 (ddd, *J* = 10.6, 7.6, 0.7 Hz, 1H), 4.85 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.40 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.25 – 3.19 (m, 2H), 2.99 – 2.91 (m, 5H), 2.62 – 2.57 (m, 2H), 2.12 (td, *J* = 11.7, 2.4 Hz, 2H), 1.85 – 1.72 (m, 3H), 1.60 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.39 (qd, 2H). NH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 161.4, 155.7 (d, *J* = 257 Hz), 142.9 (d, *J* = 9 Hz), 136.6 (d, *J* = 6 Hz), 127.5 (d, *J* = 8 Hz), 111.9 (d, *J* = 22 Hz), 107.6 (d, *J* = 21 Hz), 105.5 (d, *J* = 5 Hz), 56.9, 53.2 (2C), 51.4, 44.7, 40.0, 39.5, 35.9, 29.6 (2C), 22.0 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₀H₃₁FN₅O₃S [M+H]⁺ 440.2132 found 440.2135.

N-[2-(4-{3-[4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-oxopropyl}piperidin-1-yl)ethyl]methanesulfonamide **88**



Molecular Weight: 438.56 g.mol⁻¹

Formula: C₂₁H₃₁FN₄O₃S

According to the General procedure G, starting from *tert*-butyl 4-{3-[4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-oxopropyl}piperidine-1-carboxylate **65** (130 mg, 0.31 mmol), CH₂Cl₂ (3 mL), using TFA (0.24 mL, 3.10 mmol), K₃PO₄ (658 mg, 3.10 mmol) in water (2 mL), then *N*-(2-bromoethyl)methanesulfonamide **85** (93 mg, 0.50 mmol), TEA (0.1 mL, 0.70 mmol) in propan-2-ol (2mL). The mixture was stirred at 60°C for 18 h. The solvent was evaporated and the crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH 95/5/0.5) affording the expected *N*-[2-(4-{3-[4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-oxopropyl}piperidin-1-yl)ethyl]methanesulfonamide **88** (45 mg, 33 %) as a yellow oil.

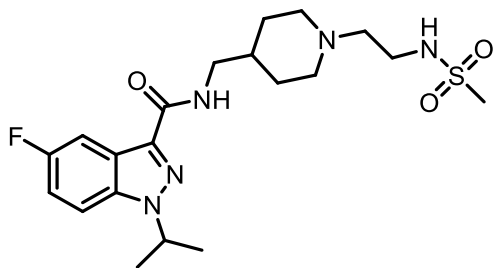
IR (KBr) ν 3296, 2976, 2930, 2851, 2806, 1685, 1577, 1506, 1453, 1319, 1246, 1145, 970, 785 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.40 – 7.30 (m, 1H), 7.25 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.93 (ddd, *J* = 10.2, 7.6, 0.7 Hz, 1H), 4.88 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.23 – 3.14 (m, 4H), 2.96 (s, 3H), 2.90 – 2.82 (m, 2H), 2.56 – 2.48 (m, 2H), 2.08 – 1.96 (m, 2H), 1.82 – 1.70 (m, 4H), 1.63 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 1.44 – 1.33 (m, 1H), 1.27 (qd, *J* = 11.8, 11.2, 3.5 Hz, 2H). NH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 195.4, 156.0 (d, *J* = 258 Hz), 142.9 (d, *J* = 9 Hz), 141.3 (d, *J* = 7 Hz), 127.6 (d, *J* = 7 Hz), 112.0 (d, *J* = 23 Hz), 108.2 (d, *J* = 21 Hz), 105.4 (d, *J* = 5 Hz), 56.8, 53.6 (2C), 51.5, 40.0, 39.7, 36.5, 35.1, 32.1 (2C), 31.0, 22.0 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. For C₂₁H₃₂FN₄O₃S [M+H]⁺ 439.2179 found 439.2183.

5-fluoro-*N*-{[1-(2-methanesulfonamidoethyl)piperidin-4-yl]methyl}-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **89**



Molecular Weight : 439,55 g.mol⁻¹

Formula : C₂₀H₃₀FN₅O₃S

According to the General procedure G, starting from *tert*-butyl 4-({[5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido)methyl)piperidine-carboxylate **48** (150 mg, 0.36 mmol), CH₂Cl₂ (3 mL), using TFA (0.3 mL, 3.6 mmol), K₃PO₄ (762 mg, 3.6 mmol) in water (2 mL), then (2-bromoethyl)methanesulfonamide **85** (110 mg, 0.54 mmol), TEA (0.1 mL, 0.72 mmol) in propan-2-ol (2mL). The mixture was stirred at 60°C for 18 h. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH 95/5/0.5) affording the expected product 5-fluoro-*N*-{[1-(2-methanesulfonamidoethyl)piperidin-4-yl]methyl}-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **89** (17 mg g, 11 %) as a yellow oil.

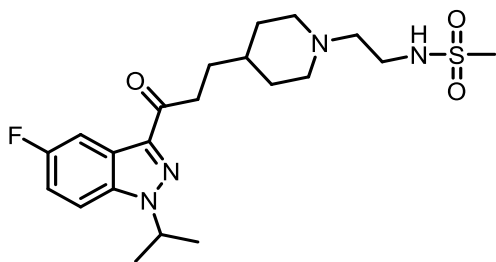
IR (KBr) ν 3428, 2923, 2849, 1651, 1552, 1493, 1383, 1317, 1148, 806 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.00 (ddd, *J* = 9.0, 2.4, 0.7 Hz, 1H), 7.39 (ddd, *J* = 9.0, 4.1, 0.7 Hz, 1H), 7.20 – 7.07 (m, 2H), 4.84 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.39 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.26 – 3.17 (m, 2H), 2.99 – 2.91 (m, 5H), 2.61 – 2.56 (m, 2H), 2.16 – 2.07 (m, 2H), 1.87 – 1.79 (m, 2H), 1.79 – 1.69 (m, 1H), 1.60 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.39 (qd, *J* = 12.2, 3.7 Hz, 2H). NH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.8, 158.9 (d, *J* = 240 Hz), 137.0, 136.7 (d, *J* = 6 Hz), 123.2 (d, *J* = 11 Hz), 116.3 (d, *J* = 28 Hz), 110.4 (d, *J* = 10 Hz), 107.0 (d, *J* = 24 Hz), 56.9, 53.2 (2C), 51.3, 44.3, 40.0, 39.5, 36.1, 29.7 (2C), 22.1 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₀H₃₁FN₅O₃S [M+H]⁺ 440.2132 found 440.2129.

N-[2-(4-{3-[5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-oxopropyl}piperidin-1-yl)ethyl]methanesulfonamide **90**



Molecular Weight: 438.56 g.mol⁻¹

Formula: C₂₁H₃₁FN₄O₃S

According to the General procedure G, starting from *tert*-butyl 4-{3-[5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-oxopropyl}piperidine-1-carboxylate **58** (130 mg, 0.31 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL), using TFA (0.24 mL, 3.10 mmol), K₃PO₄ (658 mg, 3.10 mmol) in water (2 mL), then *N*-(2-bromoethyl)methanesulfonamide **85** (95 mg, 0.47 mmol), TEA (0.09 mL, 0.62 mmol) in propan-2-ol (2 mL). The mixture was stirred at 60°C for 2 h. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH 99/1/0.5) affording the expected *N*-[2-(4-{3-[5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-oxopropyl}piperidin-1-yl)ethyl]methanesulfonamide **90** (45 mg, 33 %) as a yellow oil.

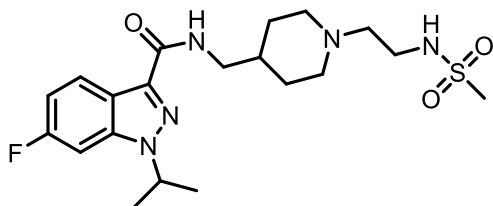
IR (KBr) ν 3436, 2980, 2928, 2851, 1702, 1669, 1495, 1472, 1320, 1263, 1148, 1090, 980, 799 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.99 (ddd, *J* = 8.8, 2.5, 0.6 Hz, 1H), 7.42 (dd, *J* = 9.2, 4.1, 0.6 Hz, 1H), 7.17 (td, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 4.88 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.20 – 3.11 (m, 4H), 2.96 (s, 3H), 2.88 – 2.79 (m, 2H), 2.53 – 2.46 (m, 2H), 2.04 – 1.94 (m, 2H), 1.81 – 1.68 (m, 4H), 1.62 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.41 – 1.31 (m, 1H), 1.24 (qd, *J* = 12.0, 3.6 Hz, 2H). NH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 197.3, 159.6 (d, *J* = 241 Hz), 141.5 (d, *J* = 6 Hz), 136.8, 123.3 (d, *J* = 11 Hz), 116.2 (d, *J* = 28 Hz), 110.5 (d, *J* = 10 Hz), 107.2 (d, *J* = 24 Hz), 56.8, 53.5 (2C), 51.6, 40.0, 39.8, 36.0, 35.3, 32.2 (2C), 31.1, 22.1 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₂₁H₃₂FN₄O₃S [M+H]⁺ 439.2179 found 439.2179

6-fluoro-*N*-{[1-(2-methanesulfonamidoethyl)piperidin-4-yl]methyl}-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **91**



Molecular Weight: 439.55 g.mol⁻¹

Formula: C₂₀H₃₀FN₅O₃S

According to the General procedure G, starting from *tert*-butyl 4-({[6-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido)methyl)piperidine-1-carboxylate **52** (150 mg, 0.36 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) using TFA (0.3 mL, 3.6 mmol), K₃PO₄ (762 mg, 3.6 mmol) in water (2 mL). The residue was taken up in propan-2-ol (4 mL), *N*-(2-bromoethyl)methanesulfonamide **85** (110 mg, 0.54 mmol) and TEA (0.1 mL, 0.7 mmol) were added. The mixture was stirred for 24 h at reflux. The residue was evaporated *in vacuo* and purified by flash column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc/NH₄OH 95/5/0.5) to give 6-fluoro-*N*-{[1-(2-methanesulfonamidoethyl)piperidin-4-yl]methyl}-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **91** (48 mg, 31 %) as a yellow solid.

Mp: 148°C.

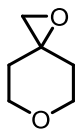
IR (KBr) ν 3300, 2981, 2932, 2815, 1654, 1543, 1323, 1202, 1148, 975, 522 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.31 (ddd, *J* = 8.9, 5.4, 0.6 Hz, 1H), 7.13 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.07 (ddd, *J* = 9.2, 2.2, 0.6 Hz, 1H), 7.01 (td, *J* = 9.1, 2.1 Hz, 1H), 5.22 – 4.93 (m, 1H), 4.74 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.36 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.20 – 3.12 (m, 2H), 2.95 (s, 3H), 2.86 (dt, *J* = 11.8, 3.3 Hz, 2H), 2.55 – 2.45 (m, 2H), 2.02 (td, *J* = 11.7, 2.5 Hz, 2H), 1.83 – 1.76 (m, 2H), 1.74 – 1.63 (m, 1H), 1.57 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.31 (qd, *J* = 12.1, 3.6 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.7, 162.1 (d, *J* = 246 Hz), 140.3 (d, *J* = 12 Hz), 137.1, 124.5 (d, *J* = 11 Hz), 119.7, 112.5 (d, *J* = 26 Hz), 95.0 (d, *J* = 27 Hz), 56.8, 53.1 (2C), 51.1, 44.4, 40.0, 39.7, 36.4, 30.0 (2C), 22.0 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₀H₃₁FN₅O₃S [M+H]⁺ 440.2132 found 440.2136

1,6-dioxaspiro[2.5]octane **92**



Molecular Weight: 114,14 g.mol⁻¹

Formula: C₆H₁₀O₂

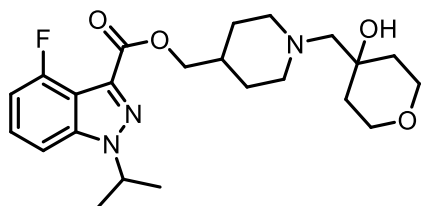
Starting from tetrahydro-4*H*-pyrane -4-one (3.0 g, 30.0 mmol), 1,6-dioxaspiro[2.5]octane **92** was obtained according to the literature procedure as a colorless oil (2.2 g, 64 %).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 3.79–3.71 (m, 4H), 2.61 (s, 2H), 1.85–1.71 (m, 2H), 1.50–1.34 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 66.7 (2C), 56.6, 54.0, 34.0 (2C).

Data are consistent with literature. Gensini, M.; Altamura, M.; Dimoulas, T.; Fedi, V.; Giannotti, D.; Giuliani, S.; Guidi, A.; Harmat, N. J. â. S.; Meini, S.; Nannicini, R.; Pasqui, F.; Tramontana, M.; Triolo, A.; Maggi, C. A. Modulation on C- and N-Terminal Moieties of a Series of Potent and Selective Linear Tachykinin NK 2 Receptor Antagonists. *ChemMedChem* **2010**, 5 (1), 65–78.

{1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl 4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **93**



Molecular Weight: 433,52 g.mol⁻¹

Formula: C₂₃H₃₂FN₃O₄

According to the General procedure G, starting from {1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]piperidin-4-yl)methyl 4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **49** (100 mg, 0.24 mmol), CH₂Cl₂ (3 mL), using TFA (0.18 mL, 2.40 mmol), K₃PO₄ (509 mg, 2.40 mmol) in water (2 mL), then 1,6 dioxaspiro[2,5]octane **92** (58 mg, 0.50 mmol), TEA (0.04 mL, 0.30 mmol) in propan-2-ol (2mL). The mixture was stirred at 60°C for 4 h. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 99/1 to 95/5) affording the expected compound **93** (34 mg, 33 %) as a brown oil.

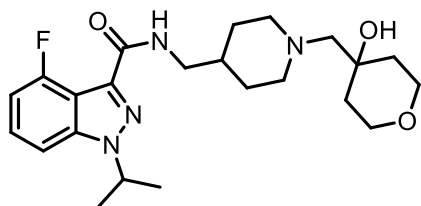
IR (KBr) ν 3436, 2944, 1721, 1507, 1208, 1072, 733 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) 7.38 – 7.31 (m, 1H), 7.30 – 7.27 (m, 1H), 6.92 (ddd, *J* = 10.7, 7.5, 0.9 Hz, 1H), 4.91 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.28 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.83 – 3.68 (m, 4H), 2.95 – 2.82 (m, 2H), 2.45 – 2.35 (m, 2H), 2.32 (s, 2H), 1.92 – 1.76 (m, 3H), 1.67 – 1.52 (m, 8H), 1.48 – 1.38 (m, 4H). OH is missing

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.1, 155.4 (d, *J* = 257 Hz), 142.5 (d, *J* = 8 Hz), 133.4 (d, *J* = 4 Hz), 127.4 (d, *J* = 8 Hz), 112.8 (d, *J* = 21 Hz), 108.0 (d, *J* = 21 Hz), 105.8 (d, *J* = 4 Hz), 69.4, 68.2, 67.3, 64.0 (2C), 56.1 (2C), 52.1, 37.0 (2C), 34.8, 29.3 (2C), 21.9 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃H₃₂FN₃O₄ [M+H]⁺ 434.2455 found 434.2463.

4-fluoro-*N*-({1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl)-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **94**



Molecular Weight: 432,53 g.mol⁻¹

Formula: C₂₃H₃₃FN₄O₃

According to the General procedure G, starting from *tert*-butyl 4-({[4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido)methyl)piperidine-1-carboxylate **50** (100 mg, 0.24 mmol), CH₂Cl₂ (3 mL), using TFA (0.18 mL, 2.40 mmol), K₃PO₄ (509 mg, 2.40 mmol) in water (2 mL), then 1,6 dioxaspiro[2,5]octane **92** (58 mg, 0.50 mmol), TEA (0.04 mL, 0.3 mmol) in propan-2-ol (2mL). The mixture was stirred at 60°C for 4 h. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 99/1) affording the expected 4-fluoro-*N*-({1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl)-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide (47 mg, 45 %) **94** as a brown oil.

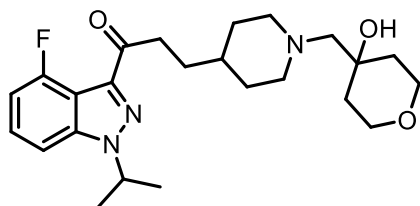
IR (KBr) ν 3423, 2938, 2863, 1663, 1535, 1233, 1103, 1020, 844, 732 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.36 – 7.29 (m, 1H), 7.23 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.21 – 7.12 (m, 1H), 6.91 (dd, *J* = 10.6, 7.6 Hz, 1H), 4.85 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.82 – 3.70 (m, 4H), 3.42 – 3.33 (m, 2H), 2.93 – 2.83 (m, 2H), 2.42 – 2.27 (m, 4H), 1.80 – 1.72 (m, 2H), 1.72 – 1.63 (m, 1H), 1.63 – 1.50 (m, 8H), 1.49 – 1.33 (m, 4H). OH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 161.3, 155.7 (d, *J* = 257 Hz), 142.9 (d, *J* = 8 Hz), 136.6 (d, *J* = 6 Hz), 127.5 (d, *J* = 8 Hz), 111.9 (d, *J* = 22 Hz), 107.5 (d, *J* = 22 Hz), 105.5 (d, *J* = 5 Hz), 68.2, 67.3, 63.9, 63.7, 56.2 (2C), 51.3, 44.8, 37.0 (2C), 35.7, 30.4 (2C), 22.0 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃H₃₄FN₄O₃ [M+H] 433.2615 found 433.2627

1-[4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-{1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl}propan-1-one **95**



Molecular Weight: 431.55 g.mol⁻¹

Formula: C₂₄H₃₄FN₃O₃

According to the General procedure G, starting from *tert*-butyl 4-{3-[4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-oxopropyl}piperidine-1-carboxylate **65** (130 mg, 0.31 mmol), CH₂Cl₂ (3 mL), using TFA (0.24 mL, 3.10 mmol), K₃PO₄ (658 mg, 3.10 mmol) in water (2 mL), then 1,6-dioxaspiro[2.5]octane **92** (102 mg, 0.90 mmol), TEA (0.10 mL, 0.70 mmol) in propan-2-ol (2 mL). The mixture was stirred at 60°C for 18 h. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 95/5) affording the expected 1-[4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-{1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl}propan-1-one **95** (40 mg, 30 %) as a yellow oil.

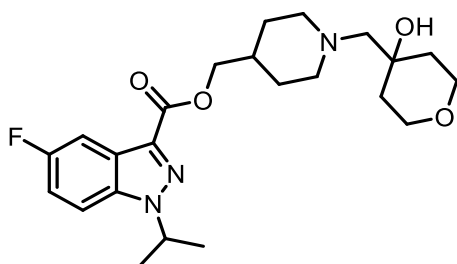
IR (KBr) ν 3435, 2932, 2857, 2797, 1686, 1453, 1246, 1103, 969, 784 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.40 – 7.31 (m, 1H), 7.28 – 7.19 (m, 1H), 6.94 (td, *J* = 10.1, 7.6, 0.7 Hz, 1H), 4.88 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.85 – 3.69 (m, 4H), 3.23 – 3.14 (m, 2H), 2.92 – 2.83 (m, 2H), 2.43 – 2.29 (m, 4H), 1.80 – 1.67 (m, 4H), 1.62 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.58 – 1.42 (m, 4H), 1.38 – 1.22 (m, 3H). OH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 195.4, 156.0 (d, *J* = 258 Hz), 142.9 (d, *J* = 9 Hz), 141.4 (d, *J* = 7 Hz), 127.6 (d, *J* = 7 Hz), 112.0 (d, *J* = 23 Hz), 108.2 (d, *J* = 21 Hz), 105.4 (d, *J* = 5 Hz), 68.3, 67.2, 63.9 (2C), 56.7 (2C), 51.5, 37.1 (2C), 36.52, 34.6, 32.5 (2C), 31.0, 22.0 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₄H₃₅FN₃O₃ [M+H]⁺ 432.2662 found 432.2659.

{1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl}5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1H-indazole-3-carboxylate **96**



Molecular Weight : 433,52 g.mol⁻¹

Formula : C₂₃H₃₂FN₃O₄

According to the General procedure G, starting from {1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]piperidin-4-yl)methyl}5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1H-indazole-3-carboxylate **47** (150 mg, 0.36 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL), using TFA (0.29 mL, 3.6 mmol), K₃PO₄ (760 mg, 3.6 mmol) in water (2 mL), then 1,6-dioxaspiro[2,5]octane **92** (81 mg, 0.72 mmol), TEA (0.07 mL, 0.54 mmol) in propan-2-ol (2 mL). The mixture was stirred at 60°C for 2h. The crude product was purified by chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 99/1) affording the expected {1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl}5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1H-indazole-3-carboxylate **96** (73 mg, 47 %) as a yellow oil.

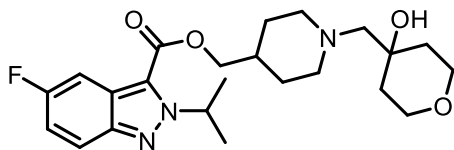
IR (KBr) ν 3440, 2942, 1728, 1493, 1480, 1417, 1192, 1178, 1071 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, chloroform-*d*) δ 7.77 (dd, *J* = 8.9, 2.1 Hz, 1H), 7.48 (dd, *J* = 6.6 Hz, 1H), 7.20 (td, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 4.93 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.32 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.84 - 3.72 (m, 4H), 2.92 (d, *J* = 11.7 Hz, 2H), 2.41 (t, *J* = 11.7 Hz, 2H), 2.34 (s, 2H), 1.97-1.86 (m, 1H), 1.82 (d, *J* = 14.3 Hz, 2H), 1.65 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.63 - 1.54 (m, 2H), 1.46 (d, *J* = 12.6 Hz, 4H), OH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.6, 159.2 (d, *J* = 241 Hz), 136.6, 134.4 (d, *J* = 6 Hz), 124.1 (d, *J* = 11 Hz), 116.1, 111 (d, *J* = 10 Hz), 106.5 (d, *J* = 25 Hz), 69.0, 68.2, 67.4, 63.9 (2C), 56.0 (2C), 52.2, 37.0 (2C), 35.0, 29.5 (2C), 22.0 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃H₃₃FN₃O₄ [M+H]⁺ 434.2455 found 434.2463.

{1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl}methyl 5-fluoro-2-(propan-2-yl)-2H-indazole-3-carboxylate **97**



Molecular Weight : 433,52 g.mol⁻¹

Formula : C₂₃H₃₂FN₃O₄

According to the General procedure G, starting from {1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]piperidin-4-yl}methyl 5-fluoro-2-(propan-2-yl)-2H-indazole-3-carboxylate **43** (100 mg, 0.24 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL), using TFA (0.3 mL, 2.4 mmol), K₃PO₄ (509 mg, 2.4 mmol) in water (2 mL), then 1,6-dioxaspiro[2,5]octane **92** (67 mg, 0.48 mmol), TEA (0.05 ml, 0.36 mmol) in propan-2-ol (2 mL). The mixture was stirred at 60°C for 3h. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 99/1) affording the expected product **97** (40 mg, 38 %) as a white solid.

Mp: 92°C.

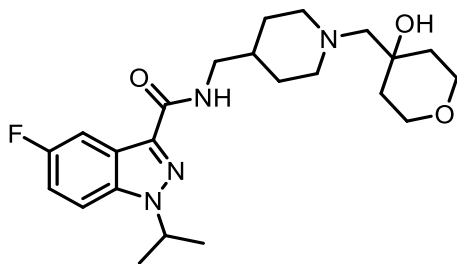
IR (KBr) ν 3422, 2930, 2851 1715, 1519,1468,1458, 1385,1171, 1062 852, 821, 770, 545 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.79 (dd, *J* = 9.3, 4.7 Hz, 1H), 7.57 (dd, *J* = 9.4, 2.5 Hz, 1H), 7.14 (td, *J* = 9.2, 2.5 Hz, 1H), 5.93 (h, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.29 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.85 – 3.72 (m, 4H), 3.00 – 2.86 (m, 2H), 2.44 (t, *J* = 11.6 Hz, 2H), 2.36 (s, 2H), 1.82 (d, *J* = 13.8 Hz, 3H), 1.62 (d, *J* = 6.6 Hz, 8H), 1.48 (d, *J* = 12.5 Hz, 4H). OH signal is missing

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 160.5 (d, *J* = 243 Hz), 160.1, 144.5, 123.5 (d, *J* = 12 Hz), 123.3 (d, *J* = 7 Hz), 120.6 (d, *J* = 10 Hz), 117.3 (d, *J* = 28 Hz), 104.5 (d, *J* = 26 Hz), 69.2, 68.3, 67.4, 63.9 (2C), 56.0 (2C), 54.5, 37.0 (2C), 34.9, 29.5 (2C), 23.0 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃H₃₃FN₃O₄ [M+H]⁺434.2455 found 434.2457

5-fluoro-*N*-({1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl)-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **98**



Molecular Weight : 432,53 g.mol⁻¹

Formula : C₂₃H₃₃FN₄O₃

According to the General procedure G, starting from *tert*-butyl 4-({[5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido)methyl)piperidine-carboxylate **48** (150 mg, 0.36 mmol), CH₂Cl₂ (3 mL), using TFA (0.3 mL, 3.6 mmol), K₃PO₄ (760 mg, 3.6 mmol) in water (2 mL), then 1,6 dioxaspiro[2,5]octane **92** (62 mg, 0.54 mmol), TEA (0.1 mL, 0.7 mmol) in propan-2-ol (3 mL). The mixture was stirred at 60°C for 18 h. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 95/5) affording the expected 5-fluoro-*N*-({1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl)-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **98** (60 mg, 39 %) as a yellow oil.

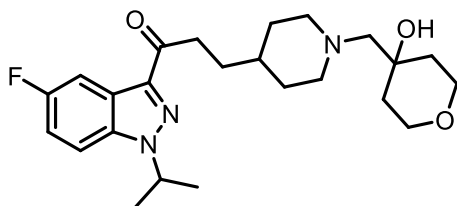
IR (KBr) ν 3428, 2918, 1649, 1545, 1494, 1255, 1201, 1102, cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.99 (dd, *J* = 9.0, 2.4 Hz, 1H), 7.38 (dd, *J* = 9.0, 3.9 Hz, 1H), 7.19 – 7.05 (m, 2H), 4.82 (hept, *J* = 8.0 Hz 1H), 3.82 – 3.69 (m, 4H), 3.36 (t, *J* = 8 Hz, 2H), 2.90 (d, *J* = 11.4 Hz, 2H), 2.44 – 2.28 (m, 4H), 1.80 – 1.72 (d, *J* = 12, 2H), 1.71 – 1.63 (m, 1H), 1.58 (d, *J* = 8 Hz, 6H), 1.52-1.36 (m, 6H). OH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.7, 158.9 (d, *J* = 240 Hz), 136.9, 136.7 (d, *J* = 6 Hz), 123.1 (d, *J* = 11 Hz), 116.3 (d, *J* = 28 Hz), 110.4 (d, *J* = 10 Hz), 106.9 (d, *J* = 24 Hz), 68.2, 67.3, 63.9 (2C), 56.2 (2C), 51.2, 44.4, 37.0 (2C), 35.8, 30.4 (2C), 22.1 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃H₃₄FN₄O₃ [M+H]⁺ 433.2615 found 433.2625

1-[5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-{1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl}propan-1-one **99**



Molecular Weight: 431,54 g.mol⁻¹

Formula: C₂₄H₃₄FN₃O₃

According to the General procedure G, starting from *tert*-butyl 4-{3-[5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-oxopropyl}piperidine-1-carboxylate **58** (70 mg, 0.17 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL), using TFA (0.13 mL, 1.70 mmol), K₃PO₄ (360 mg, 1.70 mmol) in water (2 mL) and 1,6-dioxaspiro[2,5]octane **92** (40 mg, 0.34 mmol), TEA (0.04 mL, 0.25 mmol) in propan-2-ol (2 mL). The mixture was stirred at 60°C overnight. The solvent was removed and the crude product was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 99/1 to 95/5) to give 1-[5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-{1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl}propan-1-one **99** (31 mg, 43 %) as a yellow solid.

Mp: 128°C.

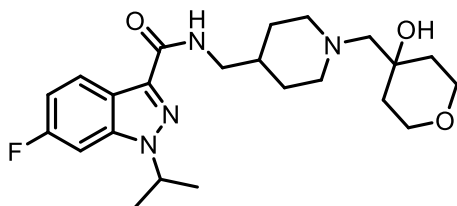
IR (KBr) ν 3463, 2958, 2917, 1657, 1178, 1383, 1260, 1094, 1020, 901, 850, 796, 738, 541 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.00 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 7.43 (dd, *J* = 9.0, 4.0 Hz, 1H), 7.18 (td, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 4.88 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.85 – 3.70 (m, 4H), 3.18 – 3.09 (m, 2H), 2.97 – 2.81 (m, 2H), 2.45 – 2.28 (m, 4H), 1.80 – 1.69 (m, 4H), 1.63 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.60 – 1.42 (m, 5H), 1.42 – 1.21 (m, 2H). OH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 197.3, 159.6 (d, *J* = 241 Hz), 141.5 (d, *J* = 6 Hz), 136.8, 123.3 (d, *J* = 11.4 Hz), 116.2 (d, *J* = 27 Hz), 110.5 (d, *J* = 10 Hz), 107.3 (d, *J* = 25 Hz), 68.3, 67.2, 63.7 (2C), 56.7, 51.6 (2C), 37.1 (2C), 35.9, 34.7, 32.5 (2C), 31.0, 22.1 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₂₄H₃₅FN₃O₃ [M+H]⁺ 432.2662 found 432.2680.

6-fluoro-*N*-({1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl)-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **100**



Molecular Weight: 432,53 g.mol⁻¹

Formula: C₂₃H₃₃FN₄O₃

According to the general procedure G, starting from *tert*-butyl 4-({[6-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido)methyl)piperidine-1-carboxylate **52** (150 mg, 0.36 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) using TFA (0.3 mL, 3.6 mmol), K₃PO₄ (762 mg, 3.6 mmol) in water (2 mL). The residue was taken up in propan-2-ol (4 mL), 1,6-dioxaspiro[2.5]octane **92** (62 mg, 0.54 mmol) and TEA (0.1 mL, 0.7 mmol) were added. The mixture was stirred for 24 h at reflux. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by flash column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc/NH₄OH 95/5/0.5) to give 6-fluoro-*N*-({1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl)-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **100** (48 mg, 31 %) as a yellow solid.

Mp: 148°C.

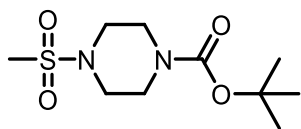
IR (KBr) ν 3422, 2939, 2862, 1652, 1541, 1411, 1201, 1103, 844 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.32 (dd, *J* = 8.9, 5.3 Hz, 1H), 7.15 – 6.95 (m, 3H), 4.74 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.81 – 3.71 (m, 4H), 3.37 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.93 – 2.84 (m, 2H), 2.40 – 2.29 (m, 4H), 1.80 – 1.73 (m, 2H), 1.70 – 1.64 (m, 1H), 1.60 – 1.52 (m, 8H), 1.48 – 1.33 (m, 4H). OH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.7, 162.1 (d, *J* = 246 Hz), 140.3 (d, *J* = 12 Hz), 137.2, 124.6 (d, *J* = 11 Hz), 119.7, 112.5 (d, *J* = 26 Hz), 94.9 (d, *J* = 27 Hz), 68.2, 67.3, 64.0 (2C), 56.2 (2C), 51.1, 44.4, 37.0 (2C), 35.9, 30.5 (2C), 22.0 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃H₃₄FN₄O₃ [M+H]⁺ 433.2615 found 433.2614.

tert-butyl 4-(methylsulfonyl)piperazine-1-carboxylate **101**



Molecular Weight: 264,34 g.mol⁻¹

Formula: C₁₀H₂₀N₂O₄S

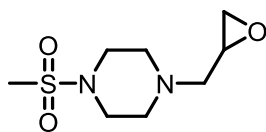
In a round bottom flask were introduced slowly *tert*-butyl piperazine-1-carboxylate (1.0 g, 5,37 mmol), TEA (1.5 mL, 10,7 mmol), MeSO₂Cl (0.62 ml, 8,1 mmol) in CH₂Cl₂ (15 mL) at 0°C. The solution was stirred for 2 h at RT. The mixture was washed 3 times with H₂O, then the organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated in *vacuo*. The crude product *tert*-butyl 4-(methylsulfonyl)piperazine-1-carboxylate **101** (1.34 g, 95 %) as a white solid was used without further purification for the next step.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 3.59 – 3.48 (m, 4H), 3.21 – 3.11 (m, 4H), 2.78 (s, 3H), 1.46 (s, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, Methanol-*d*₄) δ 154.2, 80.4, 45.6 (2C), 43,2 (2C), 34.5 (3C), 28.27

Data are consistent with literature values. Naito, H.; Hata, T.; Urabe, H. Selective Deprotection of Methanesulfonamides to Amines. *Org. Lett.* **2010**, 12 (6), 1228–1230.

1-(methylsulfonyl)-4-(oxiran-2-ylmethyl)piperazine **102**



Molecular Weight: 220,29 g.mol⁻¹

Formula: C₈H₁₆N₂O₃S

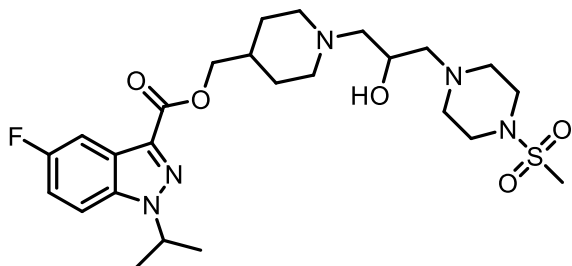
In a round bottom flask were introduced *tert*-butyl 4-(methylsulfonyl)piperazine-1-carboxylate **101** (500 mg, 1,9 mmol) and TFA (1,55 mL, 19 mmol) in CH₂Cl₂ (6 mL). The solution was stirred for 2 h at reflux and the solvent was evaporated *in vacuo*. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ (3 mL) and K₃PO₄ (4,03 g, 19 mmol, in a minimum quantity of H₂O) was added. After 0,5 h of stirring at RT, the organic layer was separated and evaporated *in vacuo*. The residue was dissolved in anhydrous THF then TEA (0,53 mL, 3,8 mmol) and epichlorohydrin (0,18 mL, 2,3 mmol) were added. After 4 h of stirring at RT, the solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 95/5) to afford 1-(methylsulfonyl)-4-(oxiran-2-ylmethyl)piperazine **102** (117 mg, 28 %) as a white oil.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 3.28 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H), 3.09 (ddt, *J* = 7.0, 4.1, 2.8 Hz, 1H), 2.88 – 2.77 (m, 5H), 2.74 – 2.69 (m, 2H), 2.65 – 2.57 (m, 2H), 2.53 – 2.48 (m, 1H), 2.28 (dd, *J* = 13.4, 7.1 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 72.2, 64.5, 56.8 (2C), 51.2, 49.5 (2C), 36.8.

Data are consistent with literature values. McKinnell, R. M.; Armstrong, S. R.; Beattie, D. T.; Fatheree, P. R.; Long, D. D.; Marquess, D. G.; Shaw, J.-P.; Vickery, R. G. Discovery of TD-8954, a Clinical Stage 5-HT₄ Receptor Agonist with Gastrointestinal Prokinetic Properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (14), 4210–4215.

{1-[2-hydroxy-3-(4-methanesulfonylpiperazin-1-yl)propyl]piperidin-4-yl}methyl 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **103**



Molecular Weight: 539,67 g.mol⁻¹

Formula: C₂₅H₃₈FN₅O₅S

According to the General procedure G, starting from {1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]piperidin-4-yl}methyl 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **47** (200 mg, 0.47 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) using TFA (0.36 mL, 4.7 mmol), K₃PO₄ (1.0 g, 4.7 mmol) in water (2 mL). The residue was taken up in propan-2-ol (2 mL), 1-(methylsulfonyl)-4-(oxiran-2-ylmethyl)piperazine **102** (197 mg, 0.94 mmol) and TEA (0.10 mL, 0.71 mmol) were added. The mixture was stirred for 24 h at reflux. The residue was purified by chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 90/10) to give {1-[2-hydroxy-3-(4-methanesulfonylpiperazin-1-yl)propyl]piperidin-4-yl}methyl 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **103** (6 mg, 2 %) as a yellow oil.

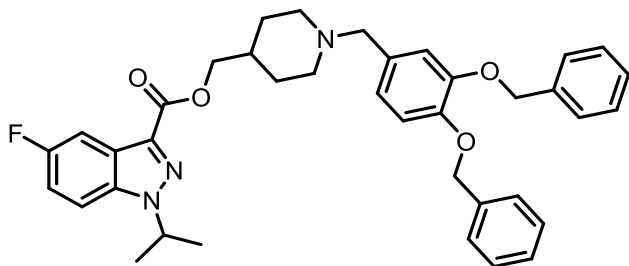
IR (KBr) ν 3434, 2920, 1620, 1565, 1416, 1324, 1160, 781 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.77 (ddd, *J* = 8.9, 2.5, 0.7 Hz, 1H), 7.48 (dd, 1H), 7.20 (td, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 4.93 (hept, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.33 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.95 – 3.86 (m, 1H), 3.31 – 3.20 (m, 4H), 3.04 (s, 1H), 2.95 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 2.78 (s, 3H), 2.74 – 2.59 (m, 4H), 2.50 – 2.27 (m, 6H), 2.12 – 2.01 (m, 1H), 2.01 – 1.82 (m, 3H), 1.65 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 1.57 – 1.40 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.6, 159.2 (d, *J* = 241 Hz), 136.6, 134.4 (d, *J* = 6 Hz), 124.1 (d, *J* = 11 Hz), 116.3 (d, *J* = 28 Hz), 111.0 (d, *J* = 10 Hz), 106.5 (d, *J* = 24 Hz), 68.9, 64.3, 62.5, 62.4, 54.7, 52.9 (2C), 52.4, 52.3, 45.9, 35.3, 34.1, 29.2, 29.1, 28.9, 22.0 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₅H₃₉FN₅O₅S [M+H]⁺ 540.2656 found 540.2662.

(1-([3,4-bis(benzyloxy)phenyl]methyl)piperidin-4-yl)methyl 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **104**



Molecular Weight : 621.75 g.mol⁻¹

Formula : C₃₈H₄₀FN₃O₄

According to the General procedure G, starting from {1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]piperidin-4-yl}methyl 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **47** (200 mg, 0.48 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) using TFA (0.39 mL, 4.8 mmol), K₃PO₄ (1.0 g, 4.8 mmol) in water (2 mL). The residue was taken up in acetonitrile (4 mL), 1,2-bis(benzyloxy)-4-(bromomethyl)benzene (275 mg, 0.7 mmol) and TEA (0.14 mL, 1.0 mmol) were added. The mixture was stirred for 24 h at reflux. The residue was evaporated *in vacuo* and purified by flash column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc/NH₄OH 95/5/0.5) to give (1-([3,4-bis(benzyloxy) phenyl]methyl)piperidin-4-yl)methyl 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **104** (217 mg, 73 %) as a yellow oil.

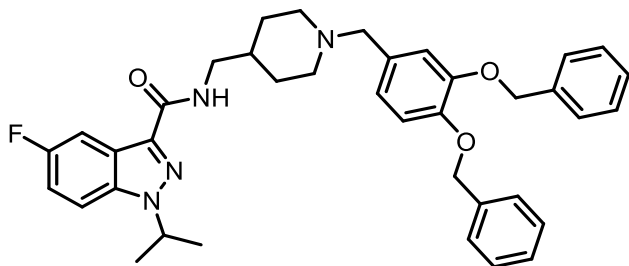
IR (KBr) ν 3436, 3037, 2916, 1711, 1631, 1516, 1422, 1255, 1176, 1071 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.76 (dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, 1H), 7.52 – 7.42 (m, 5H), 7.39 – 7.17 (m, 8H), 6.96 – 6.83 (m, 2H), 5.27 (s, 2H), 5.16 (s, 2H), 4.92 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.33 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.91 – 3.76 (m, 2H), 3.24 – 3.04 (m, 2H), 2.48 – 2.26 (m, 2H), 2.06 – 1.80 (m, 5H), 1.64 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.4, 159.3 (d, *J* = 241 Hz), 149.4, 148.6, 137.1, 137.0, 136.6, 134.1 (d, *J* = 5 Hz), 128.5 (2C), 128.4 (2C), 127.9, 127.7, 127.5 (2C), 127.2 (2C), 124.1 (d, *J* = 10 Hz), 123.6, 117.2, 116.3 (d, *J* = 28 Hz), 114.4, 111.1 (d, *J* = 10 Hz), 106.3 (d, *J* = 25 Hz), 71.1, 71.0, 67.9, 61.2, 52.2, 51.6 (2C), 34.1 (2C), 26.8 (2C), 22.0 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₃₈H₄₁FN₃O₄ [M+H]⁺ 622.3081 found 622.3110.

N-[1-([3,4-bis(benzyloxy)phenyl]methyl)piperidin-4-yl)methyl]-5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **105**



Molecular Weight : 621.75 g.mol⁻¹

Formula : C₃₈H₄₀FN₃O₄

According to the General procedure G, starting from *tert*-butyl 4-([5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido)methyl)piperidine-carboxylate **48** (250 mg, 0.6 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) using TFA (0.49 mL, 6.0 mmol), K₃PO₄ (1.27 g, 6.0 mmol) in water (2 mL). The residue was taken up in acetonitrile (4 mL), 1,2-bis(benzyloxy)-4-(bromomethyl)benzene (345 mg, 0.9 mmol) and TEA (0.17 mL, 1.2 mmol) were added. The mixture was stirred 24 h at reflux. The residue was evaporated *in vacuo* and purified by flash column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc/NH₄OH 95/5/0.5) to give *N*-[1-([3,4-bis(benzyloxy)phenyl]methyl)piperidin-4-yl)methyl]-5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **105** (100 mg, 27 %) as a yellow oil.

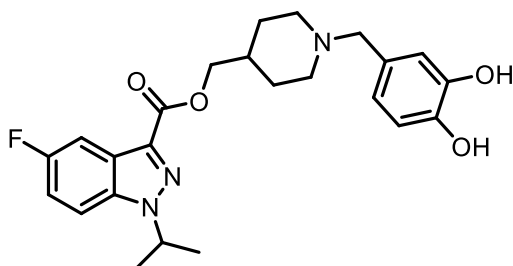
IR (KBr) ν 3419, 2928, 2529, 1655, 1541, 1494, 1267, 1200, 734 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.88 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 7.43 – 7.06 (m, 14H), 6.89 – 6.77 (m, 2H), 5.22 (s, 2H), 5.09 (s, 2H), 4.75 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.94 – 3.84 (m, 2H), 3.36 – 3.26 (m, 2H), 3.25 – 3.10 (m, 2H), 2.54 – 2.25 (m, 2H), 2.01 – 1.74 (m, 5H), 1.51 (d, *J* = 6.7 Hz, 5H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 163.0, 159.0 (d, *J* = 240 Hz), 150.0, 148.7, 137.0, 136.9, 136.8 (2C), 136.3 (d, *J* = 5 Hz), 128.6 (2C), 128.4 (2C), 127.9, 127.7, 127.5 (2C), 127.2 (2C), 124.3, 123.0 (d, *J* = 11 Hz), 117.6, 116.4 (d, *J* = 28 Hz), 114.4, 110.5 (d, *J* = 10 Hz), 106.7 (d, *J* = 24 Hz), 71.0, 70.9, 60.8, 51.8 (2C), 51.3, 43.7, 33.7, 26.9 (2C), 22.1 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₃₈H₄₁FN₃O₃ [M+H]⁺ 621.3241 found 621.3245.

{1-[(3,4-dihydroxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl)methyl}5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **106**



Molecular Weight: 441.5 g.mol⁻¹

Formula: C₂₄H₂₈FN₃O₄

In a round bottom flask was added HBr in acetic acid (2.5 mL). (1-[[3,4-bis(benzyloxy)phenyl]methyl]piperidin-4-yl)methyl 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **104** (180 mg, 0.3 mmol) was added at 0°C and stirred 4 h at RT. The solvent was evaporated and the crude was purified by flash column chromatography on silica gel using (CH₂Cl₂/MeOH 99/1) as eluent to give {1-[(3,4-dihydroxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl)methyl 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **106** (40 mg, 30 %) as a yellow oil.

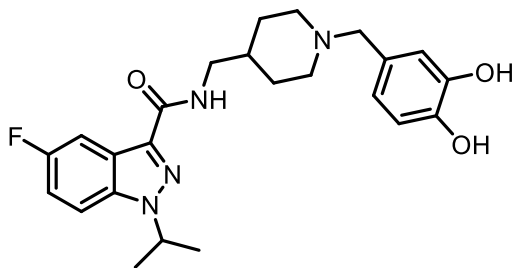
IR (KBr) ν 3444, 2985, 2940, 1713, 1494, 1257, 1180, 1072, 733 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.73 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 7.45 (dd, *J* = 9.2, 4.0 Hz, 1H), 7.18 (td, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 6.79 – 6.68 (m, 1H), 6.68 – 6.49 (m, 2H), 5.15 (s, 2H), 4.90 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.25 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.45 (s, 2H), 3.11 – 2.96 (m, 2H), 2.19 – 2.04 (m, 2H), 1.96 – 1.86 (m, 1H), 1.85 – 1.74 (m, 2H), 1.62 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.57 – 1.42 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 161.5, 158.2 (d, *J* = 241 Hz), 144.2, 143.8, 135.5, 133.2 (d, *J* = 6 Hz), 125.4, 123.0 (d, *J* = 10 Hz), 121.1, 116.2, 115.3 (d, *J* = 28 Hz), 113.8, 110.0 (d, *J* = 10 Hz), 105.4 (d, *J* = 25 Hz), 67.6, 61.5, 51.4 (2C), 51.2, 33.8, 26.6 (2C), 20.9 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₄H₂₉FN₃O₄ [M+H]⁺ 442.2142 found 442.2142.

N-({1-[(3,4-dihydroxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl)methyl}-5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-Carboxamide **107**



Molecular Weight : 440.52 g.mol⁻¹

Formula : C₂₄H₂₉FN₄O₃

In a round bottom flask was added HBr in acid acetiq (2.5 mL). *N*-[(1-[(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)methyl]piperidin-4-yl)methyl]-5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **105** (75 mg, 0.13 mmol) was added at 0°C and stirred for 4 h at RT. The solvent mixture was evaporated and the residue was purified by flash column chromatography on silica gel using (CH₂Cl₂/MeOH 99/1) to give *N*-({1-[(3,4-dihydroxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl)methyl}-5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **107** (19 mg, 33 %) as a yellow oil.

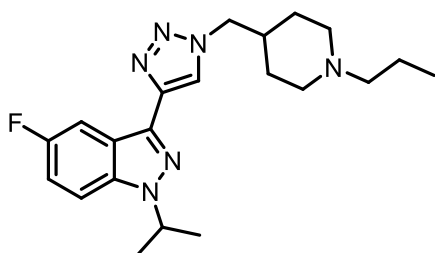
IR (KBr) ν 3414, 2976, 2927, 1649, 1545, 1494, 1256, 1201, 803, 731 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.97 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 7.37 (dd, *J* = 9.2, 4.0 Hz, 1H), 7.23 – 7.18 (m, 1H), 7.14 (td, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 6.73 – 6.62 (m, 2H), 6.56 – 6.48 (m, 1H), 4.81 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.38 (s, 2H), 3.31 – 3.22 (m, 2H), 3.00 – 2.89 (m, 2H), 2.06 – 1.93 (m, 2H), 1.74 – 1.61 (m, 3H), 1.56 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 1.44 – 1.29 (m, 2H). OH signals are missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.9, 158.9 (d, *J* = 240 Hz), 145.2, 145.1, 137.0, 136.6 (d, *J* = 6 Hz), 126.7, 123.1 (d, *J* = 10 Hz), 121.8, 117.3, 116.3 (d, *J* = 28 Hz), 114.8, 110.5 (d, *J* = 10 Hz), 106.9 (d, *J* = 24 Hz), 62.5, 52.6 (2C), 51.3, 44.2, 35.7, 28.7 (2C), 22.1 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₄H₃₀FN₄O₃ [M+H]⁺ 441.2302 found 441.2302.

5-fluoro-1-(propan-2-yl)-3-{1-[(1-propylpiperidin-4-yl)methyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}-1H-indazole **108**



Molecular Weight: 384,49 g.mol⁻¹

Formula: C₂₁H₂₉FN₆

According to General method G, starting from *tert*-butyl 4-({4-[5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1H-indazol-3-yl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)piperidine-1-carboxylate **76** (100 mg, 0.23 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) using TFA (0.17 mL, 2.3 mmol), K₃PO₄ (480 mg, 2.3 mmol) in water (2 mL). The residue was taken up in acetonitrile (4 mL), 1-iodopropane (27 μL, 0.27 mmol) and TEA (63 μL, 0.45 mmol) were added. The mixture was stirred for 24 h at reflux and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 95/5) to give 5-fluoro-1-(propan-2-yl)-3-{1-[(1-propylpiperidin-4-yl)methyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}-1H-indazole **108** (44 mg, 50 %) as a yellow oil.

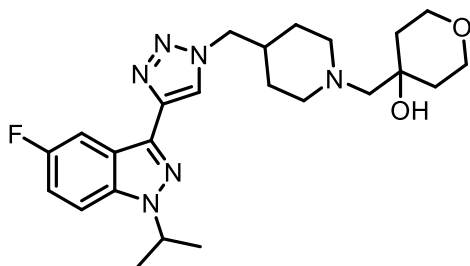
IR (KBr) ν 3434, 2956, 2921, 1627, 1497, 1379, 1217, 1046, 852, 735 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.12 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.36 (dd, *J* = 9.0, 4.0 Hz, 1H), 7.16 (td, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 4.83 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.30 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.00 – 2.86 (m, 2H), 2.30 – 2.22 (m, 2H), 2.04 – 1.94 (m, 1H), 1.94 – 1.85 (m, 2H), 1.71 – 1.62 (m, 2H), 1.59 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.53 – 1.30 (m, 4H), 0.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 158.1 (d, *J* = 238 Hz), 142.7, 136.6, 135.5 (d, *J* = 6 Hz), 121.8 (d, *J* = 10 Hz), 120.7, 116.0 (d, *J* = 28 Hz), 109.9 (d, *J* = 10 Hz), 106.9 (d, *J* = 24 Hz), 60.8, 55.9 (2C), 53.1, 50.8, 37.2 (2C), 29.8, 22.2 (2C), 20.1, 12.0.

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₁H₃₀FN₆ [M+H]⁺ 385.2516 found 385.2525.

4-{{4-{{4-{{5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1H-indazol-3-yl}-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl}piperidin-1-yl)methyl}oxan-4-ol **109**



Molecular Weight: 456,56 g.mol⁻¹

Formula: C₂₄H₃₃FN₆O₂

According to the General procedure G, starting from *tert*-butyl 4-{{4-{{4-{{5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1H-indazol-3-yl}-1H-1,2,3-triazol-5-yl)methyl}piperidine-1-carboxylate **76** (100 mg, 0.23 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) using TFA (0.17 mL, 2.3 mmol), K₃PO₄ (480 mg, 2.3 mmol) in water (2 mL). The residue was taken up in acetonitrile (4 mL), 1,6-dioxaspiro[2.5]octane **92** (52 mg, 0.45 mmol) and TEA (63 μL, 0.45 mmol) were added. The mixture was stirred for 24 h at reflux. The residue was evaporated *in vacuo* and purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 1/1) to give 4-{{4-{{4-{{5-fluoro-1-(propan-2-yl)-1H-indazol-3-yl}-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl}piperidin-1-yl)methyl}oxan-4-ol **109** (20 mg, 20 %) as a yellow oil.

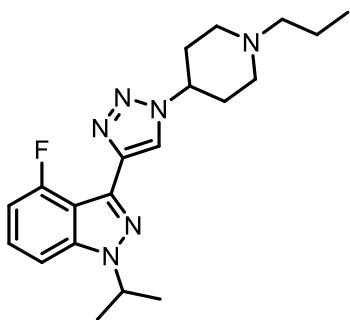
IR (KBr) ν 3433, 2931, 2851, 2340, 1623, 1497, 1287, 1217, 1100, 848 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 15 – 8.09 (m, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.38 (dd, *J* = 9.1, 4.0 Hz, 1H), 7.18 (td, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 4.84 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.31 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.85 – 3.68 (m, 4H), 2.97 – 2.82 (m, 2H), 2.40 – 2.26 (m, 4H), 2.04 – 1.92 (m, 1H), 1.68 – 1.49 (m, 10H), 1.49 – 1.33 (m, 4H). OH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 158.1 (d, *J* = 238 Hz), 142.8, 136.6, 135.4 (d, *J* = 6 Hz), 121.9 (d, *J* = 10 Hz), 120.7, 116.1 (d, *J* = 28 Hz), 109.9 (d, *J* = 10 Hz), 106.9 (d, *J* = 24 Hz), 68.1, 67.4, 63.9 (2C), 55.8 (2C), 55.7, 50.9, 36.9 (2C), 36.5, 30.2 (2C), 22.2 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₄H₃₄FN₆O₂ [M+H]⁺ 457.2727 found 457.2730.

4-fluoro-1-(propan-2-yl)-3-[1-(1-propylpiperidin-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-1H-indazole **110**



Molecular Weight: 370,47 g.mol⁻¹

Formula: C₂₀H₂₇FN₆

According to the General procedure G, starting from *tert*-butyl 4-{4-[4-fluoro-1-(propan-2-yl)-1H-indazol-3-yl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}piperidine-1-carboxylate **75** (118 mg, 0.28 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) using TFA (0.21 mL, 2.80 mmol), K₃PO₄ (594 mg, 2.80 mmol) in water (2 mL). The residue was taken up in acetonitrile (4 mL), 1-iodopropane (33 μL, 0.33 mmol) and TEA (83 μL, 0.56 mmol) were added. The mixture was stirred 24 h at reflux. The residue was evaporated *in vacuo* and purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 95/5) to give 4-fluoro-1-(propan-2-yl)-3-[1-(1-propylpiperidin-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-1H-indazole **110** (15 mg, 15%) as a yellow oil.

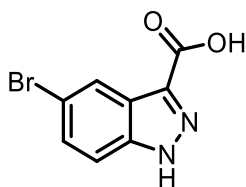
IR (KBr) ν 3466, 2919, 2849, 2355, 2320, 1629, 1381, 1239, 1122, 666 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.09 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 7.35 – 7.28 (m, 1H), 7.26 – 7.22 (m, 1H), 6.82 (ddd, *J* = 11.2, 7.5, 0.8 Hz, 1H), 4.89 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.70 – 4.56 (m, 1H), 3.18 – 3.06 (m, 2H), 2.44 – 2.33 (m, 2H), 2.33 – 2.11 (m, 6H), 1.66 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.61 – 1.50 (m, 2H), 0.93 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 154.9 (d, *J* = 251 Hz), 141.4 (d, *J* = 9.0 Hz), 140.0, 132.2, 125.9 (d, *J* = 9 Hz), 119.2 (d, *J* = 14 Hz), 110.4 (d, *J* = 21 Hz), 104.5, 104.5 (d, *J* = 25 Hz), 59.3, 57.2, 51.3 (2C), 50.3, 31.7 (2C), 21.0 (2C), 19.2, 10.9.

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₀H₂₈FN₆ [M+H]⁺ 371.2359 found 371.2356

5-bromo-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **111**



Molecular Weight: 241.04 g.mol⁻¹

Formula: C₈H₅BrN₂O₂

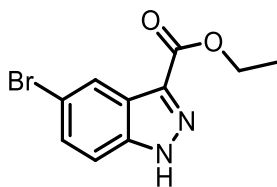
A solution of 5-bromo-isatin (5 g, 22.1 mmol) in NaOH (0.75g, 19.1 mmol) in 30 ml water was stirred at 50°C. for 10 min. The solution was cooled to 0°C and sodium nitrite (929 mg, 23.2 mmol, 1 equiv.) was added, and the mixture stirred for 20 min. A solution of concentrated sulfuric acid (2.25 ml, 42.0 mmol) in water (70 mL) was added so that the temperature remained between 0 and 4°C. The mixture was stirred at 0 - 5°C for 20 min, then a solution of SnCl₂ (10.0 g, 53.1 mmol) in concentrated HCl (10 mL) was added dropwise. The mixture was left for 30min at 0°C then at room temperature overnight. The crystals were filtered off, washing with water, to yield 5-bromo-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **111** (3.86 g, 72 %) as a brown solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 14.01 (s, 1H), 8.21 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.56 (dd, *J* = 8.9, 1.9 Hz, 1H). COOH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 163.4, 139.8, 135.5, 129.2, 123.8, 123.3, 115.1, 113.3

Data are consistent with literature values. Schmidt, A.; Snovydovych, B.; Habeck, T.; Dröttboom, P.; Gjikaj, M.; Adam, A. *N*-Heterocyclic Carbenes of 5-Haloindazoles Generated by Decarboxylation of 5-Haloindazolium-3-Carboxylates. *European J. Org. Chem.* **2007**, 29, 4909–4916.

Ethyl 5-bromo-1*H*-indazole-3-carboxylate **112**



Molecular Weight: 269,10 g.mol⁻¹

Formula: C₁₀H₉BrN₂O₂

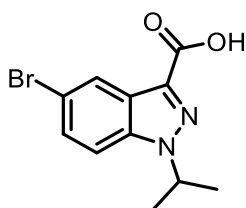
In a round bottom flask was introduced 5-bromo-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **111** (1.2 g, 5.0 mmol) in ethanol (35 mL) and a catalytic quantity of sulfuric acid (10 drops). The mixture was heated at 65 °C for 5 h. Ethanol was concentrated *in vacuo*, the residue was taken up in EtOAc, washed with water and the organic layer was dried on MgSO₄, filtered and evaporated *in vacuo*. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 3/1) to give ethyl 5-bromo-1*H*-indazole-3-carboxylate **112** (1.0 g, 74 %) as a yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14.11 (s, 1H), 8.18 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.67 – 7.62 (m, 1H), 7.57 (dd, *J* = 8.9, 1.8 Hz, 1H), 4.39 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.3, 140.1, 135.1, 130.0, 124.0, 123.5, 116.0, 113.8, 61.0, 14.7.

Data are consistent with literature values. Buu-Hoi, N. P.; Hoeffinger, J. P.; Jacquignon, P. Indazole-3-Carboxylic Acids and Their Derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* **1964**, *1* (5), 239–241.

5-bromo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **113**



Molecular Weight: 283,12 g.mol⁻¹

Formula: C₁₁H₁₁BrN₂O₂

Ethyl 5-bromo-1*H*-indazole-3-carboxylate **112** (1.35 g, 5.6 mmol) in acetone (20 ml) was reacted with K₂CO₃ (1.16 g, 8.4 mmol) and 2-iodopropane (1.7 mL, 16.7 mmol) as described in the General procedure F for 15 h. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 6/1) to afford the intermediate product ethyl 5-bromo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate (800 mg, 45 %) as a yellow solid. Then, according to the General procedure D, the saponification of ethyl 5-bromo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate (1.1 g, 3.54 mmol) afford the product **113** as a yellow solid (0.84 g, 84 %). (38% for two steps)

MP 181 °C

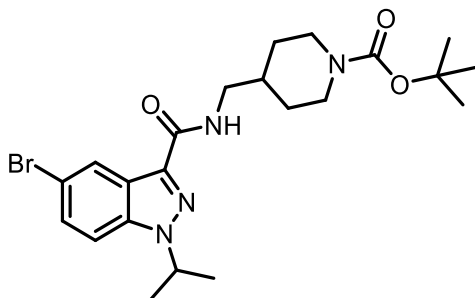
IR (KBr) ν 3429, 2976, 2938, 1686, 1494, 1462, 1199, 1045, 801 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.43 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.54 (dd, *J* = 8.9, 1.8 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.93 (hept, *J* = 13.4, 6.7 Hz, 1H), 1.66 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H). OH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 166.2, 138.6, 133.1, 130.0, 125.4, 124.9, 117.1, 111.2, 52.2, 22.0 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₁₁H₁₂BrN₂O₂ [M+H]⁺ 283.0082 found 283.0080.

Tert-butyl 4-([5-bromo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido)methyl)piperidine-carboxylate **114**



Molecular Weight: 479,42 g.mol⁻¹

Formula: C₂₂H₃₁BrN₄O₃

According to the General procedure E and starting from 5-bromo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **113** (850 mg, 3.0 mmol) in THF (15 mL), were added TEA (0.46 mL, 3.3 mmol), EDCI.HCl (860 mg, 4.5 mmol), HOBt (689 mg, 4.5 mmol) and *tert*-butyl 4-(aminomethyl)piperidine-1-carboxylate **46** (960 mg, 4.5 mmol, in 1 mL THF). The mixture was stirred at RT for 4 h. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 3/1) to afford the desired *tert*-butyl 4-([5-bromo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido)methyl)piperidine-carboxylate **114** (1.2 g, 83 %) as a yellow powder.

Mp: 91°C

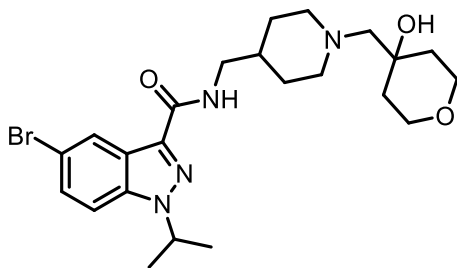
IR (KBr) ν 3429, 2976, 2938, 1686, 1494, 1462, 1199, 1045, 801 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.56 (dd, *J* = 1.8, 0.7 Hz, 1H), 7.47 (dd, *J* = 9.0, 1.8 Hz, 1H), 7.32 (dd, *J* = 9.0, 0.7 Hz, 1H), 7.13 – 7.08 (m, 1H), 4.83 (hept, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.19 – 4.08 (m, 2H), 3.43 – 3.35 (m, 2H), 2.78 – 2.63 (m, 2H), 1.88 – 1.73 (m, 3H), 1.59 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.45 (s, 9H), 1.23 (qd, *J* = 13.3, 12.5, 5.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.5, 154.8, 138.6, 136.3, 129.7, 125.4, 124.3, 116.0, 110.6, 79.4, 51.2, 44.4, 43.6 (2C), 36.8, 29.9 (2C), 28.5 (3C), 22.1 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₂H₃₁BrN₄O₃Na [M+Na]⁺ 501.1477 found 501.1481.

5-bromo-*N*-({1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl}-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **115**



Molecular Weight: 493,45 g.mol⁻¹

Formula: C₂₃H₃₃BrN₄O₃

According to the General procedure G, starting from *tert*-butyl 4-({[5-bromo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido)methyl)piperidine-carboxylate **114** (500 mg, 1.0 mmol), CH₂Cl₂ (3 mL), using TFA (0.81 mL, 10.0 mmol), K₃PO₄ (2.21 g, 10.0 mmol) in water (2 mL), then 1,6 dioxaspiro[2,5]octane **92** (238 mg, 2.1 mmol), TEA (0.17 mL, 1.25 mmol) in propan-2-ol (2 mL). The mixture was stirred at 60°C for 4 h. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 99/1 to 90/10) affording the expected 5-bromo-*N*-({1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl}-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **115** (237 mg, 46 %) as a yellow oil.

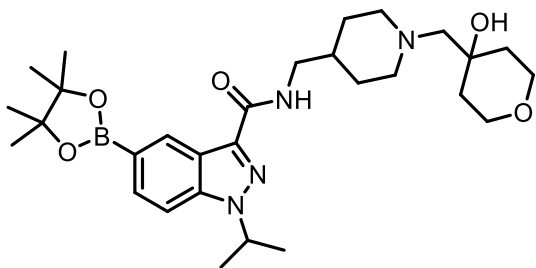
IR (KBr) ν 3412, 2936, 2868, 1651, 1541, 1464, 1387, 1240, 1200, 1104, 1019, 732 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.56 (dd, *J* = 1.9, 0.7 Hz, 1H), 7.46 (dd, *J* = 9.0, 1.9 Hz, 1H), 7.32 (dd, *J* = 9.0, 0.7 Hz, 1H), 7.12 – 7.06 (m, 1H), 4.81 (h, *J* = 13.3, 6.6 Hz, 1H), 3.84 – 3.68 (m, 4H), 3.37 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.92 – 2.81 (m, 2H), 2.41 – 2.28 (m, 4H), 1.80 – 1.72 (m, 2H), 1.71 – 1.61 (m, 1H), 1.61 – 1.52 (m, 8H), 1.48 – 1.31 (m, 4H). OH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.5, 138.7, 136.3, 129.7, 125.4, 124.3, 115.9, 110.6, 68.2, 67.3, 64.0 (2C), 56.2 (2C), 51.2, 44.4, 37.1, 36.0 (2C), 30.5 (2C), 22.1 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃H₃₄BrN₄O₃ [M+H]⁺ 493.1814 found 493.1814.

N-({1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl)-1-(propan-2-yl)-5-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **116**



Molecular Weight: 540.51 g.mol⁻¹

Formula: C₂₉H₄₅BN₄O₅

In a round bottom flask were added, 5-bromo-*N*-({1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl)-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **115** (230 mg, 0.47 mmol), Bis(pinacolato) diboron (136 mg, 0.54 mmol) and KOAc (210 mg, 2.14 mmol) in 1,4 dioxane (2 mL). After nitrogen degassing, PdCl₂(dppf)CH₂Cl₂ (31 mg, 0.04 mmol) was added at RT and the mixture was degassed an additional time. After 30 min of stirring at RT, The solvent was evaporated *in vacuo* and the crude was purified by flash column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 99/1 to 90/10) affording the expected product **116** (40 mg, 16 %) as a yellow oil.

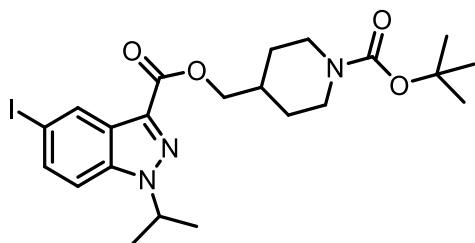
IR (KBr) ν 3425, 2976, 2931, 2868, 1657, 1538, 1354, 1296, 1240, 1198, 1142, 848, 731 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.91 (s, 1H), 7.77 (dd, *J* = 8.5, 1.0 Hz, 1H), 7.40 (dd, *J* = 8.5, 1.0 Hz, 1H), 7.18 – 7.01 (m, 1H), 4.85 (hept, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.25 – 3.93 (m, 1H), 3.84 – 3.69 (m, 4H), 3.38 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.04 – 2.89 (m, 2H), 2.47 – 2.33 (m, 4H), 1.82 – 1.68 (m, 3H), 1.62 – 1.39 (m, 12H), 1.32 (s, 12H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.8, 141.4, 137.5, 131.8, 131.3, 122.7, 108.4, 83.7 (2C), 68.3 (2C), 67.3, 63.8 (2C), 56.1 (2C), 50.9, 44.3, 37.0, 35.5 (2C), 29.9 (2C), 24.9 (4C), 22.1 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₉H₄₆BN₄O₅ [M+H]⁺ 541.3561 found 541.3566.

{1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]piperidin-4-yl}methyl 5-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **117**



Molecular Weight: 527,4 g.mol⁻¹

Formula: C₂₂H₃₀IN₃O₄

Starting from 5-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **21a** (200 mg, 0.6 mmol) in anhydrous THF (5 mL) and following the General procedure E were introduced TEA (0.21 mL, 1.52 mmol) EDCI (0,16 mL, 0.91 mmol), HOBt (140 mg, 0.91 mmol) and *tert*-butyl 4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate **42** (196 mg, 0.91 mmol, 1 mL THF). The mixture was stirred at 60°C for 4 h. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 4/1) to afford the desired {1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]piperidin-4-yl}methyl 5-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **117** (271 mg, 85 %) as a white solid.

Mp: 109°C

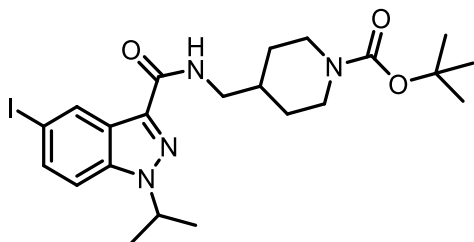
IR (KBr) ν in progress

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.54 (dd, *J* = 1.6, 0.7 Hz, 1H), 7.64 (dd, *J* = 8.9, 1.6 Hz, 1H), 7.29 (dd, *J* = 8.9, 0.7 Hz, 1H), 4.90 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.31 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 4.26 – 4.06 (m, 2H), 2.81 – 2.68 (m, 2H), 2.11 – 1.97 (m, 1H), 1.84 – 1.75 (m, 2H), 1.62 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.45 (s, 9H), 1.29 (qd, *J* = 12.4, 4.4 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.4, 154.8, 138.7, 134.8, 133.5, 131.3, 126.0, 111.5, 87.1, 79.4, 68.8, 52.2, 43.4 (2C), 35.8, 28.9 (2C), 28.5 (3C), 22.0 (2C).

HRMS/ESI: in progress

tert-butyl 4-({[5-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido}methyl)piperidine-1-carboxylate
118



Molecular Weight: 526,42 g.mol⁻¹

Formula: C₂₂H₃₁IN₄O₃

Starting from 5-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **21a** (215 mg, 0.65 mmol) in anhydrous THF (6 mL) and following the General procedure E were introduced TEA (240 μL, 0.8 mmol) EDCI (172 μL, 0.98 mmol), HOBT (150 mg, 0.98 mmol) and *tert*-butyl 4-(aminomethyl)piperidine-1-carboxylate **46** (210 mg, 0.98 mmol, 1 mL THF). The mixture was stirred at RT for 4 h. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 4/1) to afford the desired *tert*-butyl 4-({[5-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido}methyl)piperidine-1-carboxylate **118** (312 mg, 91 %) as a yellow solid.

Mp: 122°C

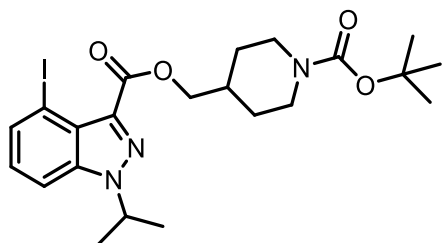
IR (KBr) ν 2976, 2926, 2849, 1687, 1537, 1461, 1423, 1355, 1199, 1171, 1141, 795, 782 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.79 (dd, *J* = 1.7, 0.7 Hz, 1H), 7.63 (dd, *J* = 8.9, 1.7 Hz, 1H), 7.23 (dd, *J* = 8.9, 0.7 Hz, 1H), 7.13 – 7.07 (m, 1H), 4.82 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.14 (d, *J* = 13.1 Hz, 2H), 3.44 – 3.33 (m, 2H), 2.76 – 2.62 (m, 2H), 1.89 – 1.73 (m, 3H), 1.59 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.45 (s, 9H), 1.23 (qd, *J* = 12.8, 4.4 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.5, 154.8, 139.0, 136.0, 134.9, 131.9, 125.0, 110.9, 86.4, 79.4, 51.2, 44.4, 43.5 (2C), 36.8, 29.9 (2C), 28.5 (3C), 22.1 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. In progress

{1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]piperidin-4-yl}methyl 4-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **119**



Molecular Weight: 527,4 g.mol⁻¹

Formula: C₂₂H₃₀IN₃O₄

Starting from 4-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **21d** (200 mg, 0.6 mmol) in anhydrous THF (5 mL) and following the General procedure E were introduced TEA (0.21 mL, 1.52 mmol) EDCI (0,16 mL, 0.91 mmol), HOBt (140 mg, 0.91 mmol) and *tert*-butyl 4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate **42** (196 mg, 0.91 mmol, 1 mL THF). The mixture was stirred at 60°C for 4 h. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 4/1) to afford the desired {1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]piperidin-4-yl}methyl 4-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **119** (110 mg, 34 %) as a white solid.

Mp: 109°C

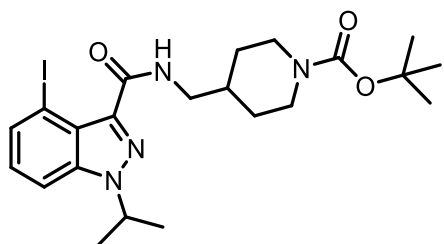
IR (KBr) ν 2990, 2928, 2864, 1727, 1680, 1443, 1423, 1370, 1220, 1180, 1143, 1027, 806, 774 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.77 (dd, *J* = 7.3, 0.7 Hz, 1H), 7.49 (dd, *J* = 8.5, 0.7 Hz, 1H), 7.07 (dd, *J* = 8.5, 7.3 Hz, 1H), 4.87 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.33 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.24 – 4.00 (m, 2H), 2.82 – 2.60 (m, 2H), 2.14 – 1.96 (m, 1H), 1.88 – 1.73 (m, 2H), 1.60 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.45 (s, 9H), 1.28 (qd, *J* = 12.6, 4.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 163.2, 154.8, 139.3, 137.0, 134.5, 127.3, 125.0, 109.6, 85.0, 79.41, 69.4, 51.6, 43.3 (2C), 35.6, 28.89 (2C), 28.5 (3C), 21.9 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. In progress

tert-butyl 4-({[4-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido}methyl)piperidine-1-carboxylate
120



Molecular Weight: 526,42 g.mol⁻¹

Formula: C₂₂H₃₁IN₄O₃

Starting from 4-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylic acid **21d** (200 mg, 0.6 mmol) in anhydrous THF (5 mL) and following the General procedure E were introduced TEA (0.21 mL, 1.52 mmol) EDCI (0,16 mL, 0.91 mmol), HOBt (140 mg, 0.91 mmol) and *tert*-butyl 4-(aminomethyl)piperidine-1-carboxylate (195 mg, 0.91 mmol, 1 mL THF). The mixture was stirred at RT for 4 h. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 6/1) to afford the desired *tert*-butyl 4-({[4-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido}methyl)piperidine-1-carboxylate **120** (285 mg, 90 %) as a yellow oil.

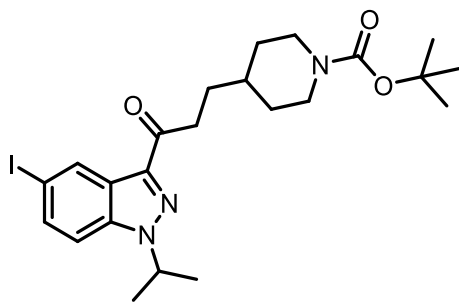
IR (KBr) ν in progress

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.67 (dd, *J* = 7.3, 0.7 Hz, 1H), 7.41 – 7.34 (m, 1H), 6.94 (dd, *J* = 8.5, 7.3 Hz, 1H), 6.91 – 6.82 (m, 1H), 4.74 (hept, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.11 – 3.92 (m, 2H), 3.40 – 3.21 (m, 2H), 2.69 – 2.52 (m, 2H), 1.83 – 1.74 (m, 1H), 1.74 – 1.65 (m, 2H), 1.47 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 1.36 (s, 9H), 1.12 (qd, *J* = 12.4, 4.4 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.7, 154.7, 139.8, 139.1, 134.6, 127.2, 124.8, 109.3, 85.2, 79.2, 50.8, 44.9, 43.7 (2C), 36.3, 29.8 (2C), 28.4 (3C), 22.0 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. In progress

Tert-butyl 4-{3-[5-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-oxopropyl}piperidine-1-carboxylate **121**



Molecular Weight: 525.43 g.mol⁻¹

Formula: C₂₃H₃₂IN₃O₃

In a dry round bottom flask under nitrogen, were added 5-iodo-2-(oxan-2-yl)-2*H*-indazole **19a** (300 mg, 0.91 mmol) in THF (3 mL) and TMPMgCl.LiCl (1.4 mL, 1.4 mmol) at -10°C. The reaction was stirred at -10°C for 1.5 h and *tert*-butyl 4-{2-[methoxy(methyl)carbamoyl]ethyl}piperidine-1-carboxylate **63** (410 mg, 1.4 mmol) was added. The mixture was stirred 8 h at 0°C and the reaction was warmed up at RT. The next day, an additional quantity of TMPMgCl.LiCl (1.4 mL, 1.4 mmol) was added and stirred 8 h at -10°C (2 times). HCl 1N was added and the mixture was stirred 30 min at 0°C, then THF was evaporated *in vacuo* and the mixture was extracted with EtOAc (3 times). The solvent was evaporated and the residue was taken to the next step without purification (0.15 g). The residue was dissolved in acetone (7 mL), K₂CO₃ (77 mg, 0.56 mmol) and 2-iodopropane (0.11 ml, 1.1 mmol) were added. After 18 h of stirring at reflux, the solvent was evaporated and the residue was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 6/1) to afford the desired compound **121** (98 mg, 20 %)

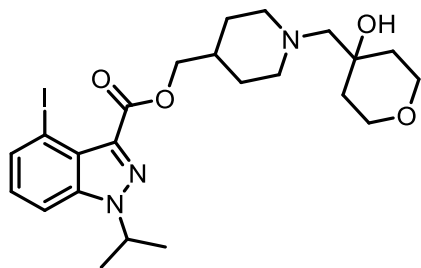
IR (KBr) ν 3434, 2977, 2930, 1682, 1497, 1472, 1366, 1245, 1100, 1097, 1047, 860, 808, 761 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.77 (dd, *J* = 1.6, 0.6 Hz, 1H), 7.65 (dd, *J* = 8.8, 1.6 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.87 (hept, *J* = 13.3, 6.7 Hz, 1H), 4.18 – 3.99 (m, 2H), 3.16 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.75 – 2.63 (m, 2H), 1.83 – 1.69 (m, 4H), 1.62 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.54 – 1.42 (m, 10H), 1.15 (qd, *J* = 12.5, 4.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 197.2, 154.9, 140.6, 139.0, 135.0, 132.0, 125.0, 111.0, 87.6, 79.23, 51.5, 43.9 (2C), 35.9, 35.6, 32.0 (2C), 31.1, 28.5 (3C), 22.1 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃ H₃₂IN₃O₃Na [M+Na]⁺ 548.1386 found 548.1383.

{1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl}methyl 4-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **122**



Molecular Weight: 541.43 g.mol⁻¹

Formula: C₂₃H₃₂IN₃O₄

According to the General procedure G, starting from {1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]piperidin-4-yl}methyl 4-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **119** (110 mg, 0.21 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL), using TFA (0.16 mL, 2.1 mmol), K₃PO₄ (442 mg, 2.1 mmol) in water (2 mL), then 1,6-dioxaspiro[2,5]octane **92** (70 mg, 0.63 mmol), TEA (0.06 ml, 0.42 mmol) in propan-2-ol (2 mL). The mixture was stirred at 60°C for 2h. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 99/1) affording the expected {1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl}methyl 4-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **122** (30 mg, 27 %) as a yellow oil.

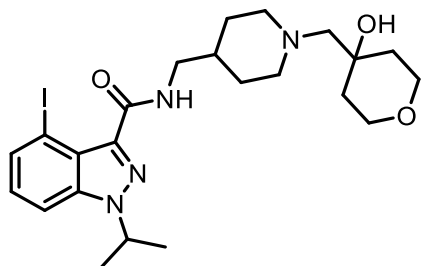
IR (KBr) ν 3436, 2917, 1728, 1535, 1450, 1392, 1232, 1168, 1107, 1085, 1017, 771 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.77 (dd, *J* = 7.3, 0.7 Hz, 1H), 7.49 (dd, *J* = 8.5, 0.7 Hz, 1H), 7.07 (dd, *J* = 8.5, 7.3 Hz, 1H), 4.87 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.33 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.82 – 3.71 (m, 4H), 2.90 (d, *J* = 11.6 Hz, 2H), 2.44 – 2.28 (m, 4H), 1.97 – 1.89 (m, 1H), 1.85 – 1.77 (m, 2H), 1.64 – 1.53 (m, 8H), 1.49 – 1.37 (m, 4H). OH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 163.3, 139.3, 137.2, 134.5, 127.3, 125.0, 109.6, 85.1, 69.6, 68.3, 67.3, 64.0 (2C), 56.1 (2C), 51.6, 37.0 (2C), 34.7, 29.5 (2C), 21.9 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃ H₃₃IN₃O₄ [M+H]⁺ 542.1516 found 542.1520.

N-({1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl)-4-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **123**



Molecular Weight: 540.45 g.mol⁻¹

Formula: C₂₃H₃₃IN₄O₃

According to the General procedure G, starting from *tert*-butyl 4-({[4-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido)methyl)piperidine-1-carboxylate **120** (200 mg, 0.38 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL), using TFA (0.29 mL, 3.8 mmol), K₃PO₄ (806 mg, 3.8 mmol) in water (2 mL), then 1,6-dioxaspiro[2,5]octane **92** (130 mg, 1.1 mmol), TEA (0.1 ml, 0.76 mmol) in propan-2-ol (2 mL). The mixture was stirred at 60°C for 2 h. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 98/2) affording the expected. *N*-({1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl)-4-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **123** (15 mg, 7 %) as a yellow oil.

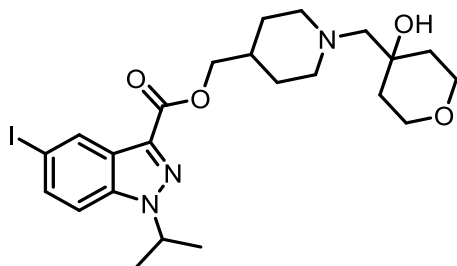
IR (KBr) ν 3425, 3308, 2930, 2864, 2800, 2239, 1657, 1551, 1448, 1240, 1189, 1102, 844, 730 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.80 (dd, *J* = 7.3, 0.7 Hz, 1H), 7.44 (dd, *J* = 8.6, 0.7 Hz, 1H), 7.05 (dd, *J* = 8.6, 7.3 Hz, 1H), 6.79 – 6.68 (m, 1H), 4.83 (hept, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.82 – 3.71 (m, 4H), 3.41 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.00 – 2.82 (m, 2H), 2.47 – 2.28 (m, 4H), 1.86 – 1.72 (m, 3H), 1.60 – 1.33 (m, 12H). OH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.7, 140.0, 139.1, 134.9, 127.3, 125.0, 109.3, 85.3, 68.2, 67.3, 63.9 (2C), 56.2 (2C), 50.9, 45.0, 37.0 (2C), 35.4, 30.5 (2C), 22.0 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃H₃₄IN₄O₃ [M+H]⁺ 541.1676 found 541.1680.

{1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl}methyl 5-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **124**



Molecular Weight: 541.43 g.mol⁻¹

Formula: C₂₃H₃₂IN₃O₄

According to the General procedure G, starting from {1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]piperidin-4-yl}methyl 5-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **117** (100 mg, 0.2 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL), using TFA (0.15 mL, 2.0 mmol), K₃PO₄ (403 mg, 2.0 mmol) in water (2 mL), then 1,6-dioxaspiro[2,5]octane **92** (65 mg, 0.6 mmol), TEA (0.06 mL, 0.4 mmol) in propan-2-ol (2 mL). The mixture was stirred at 60°C for 2h. The crude product was purified by chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 99/1) affording the expected {1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl}methyl 5-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxylate **124** (19 mg, 19 %) as a yellow oil.

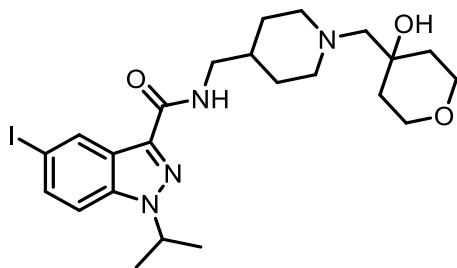
IR (KBr) ν 3437, 2940, 2862, 2798, 1729, 1705, 1478, 1410, 1235, 1180, 1084, 995, 783 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.56 (dd, *J* = 1.7, 0.7 Hz, 1H), 7.65 (dd, *J* = 8.9, 1.6 Hz, 1H), 7.30 (dd, *J* = 8.9, 0.7 Hz, 1H), 4.90 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.32 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.83 – 3.72 (m, 4H), 3.00 – 2.88 (m, 2H), 2.46 – 2.32 (m, 4H), 1.93 – 1.78 (m, 3H), 1.67 – 1.43 (m, 12H). OH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.4, 138.7, 134.8, 133.6, 131.4, 125.9, 111.5, 87.1, 69.1, 68.3, 67.4, 63.9 (2C), 56.1 (2C), 52.2, 37.0 (2C), 35.0, 29.5 (2C), 22.0 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃H₃₃IN₃O₄ [M+H]⁺ 542.1516 found 542.1526.

N-({1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl)-5-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **125**



Molecular Weight: 540.45 g.mol⁻¹

Formula: C₂₃H₃₃IN₄O₃

According to the General procedure G, starting from *tert*-butyl 4-({[5-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]formamido)methyl)piperidine-1-carboxylate **118** (200 mg, 0.38 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL), using TFA (0.31 mL, 3.8 mmol), K₃PO₄ (805 mg, 3.8 mmol) in water (2 mL), then 1,6-dioxaspiro[2,5]octane **92** (65 mg, 0.57 mmol), TEA (0.1 ml, 0.76 mmol) in propan-2-ol (2 mL). The mixture was stirred at 60°C for 2 h. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 99/1) affording the expected. *N*-({1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl)-5-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazole-3-carboxamide **125** (103 mg, 50 %) as a yellow oil.

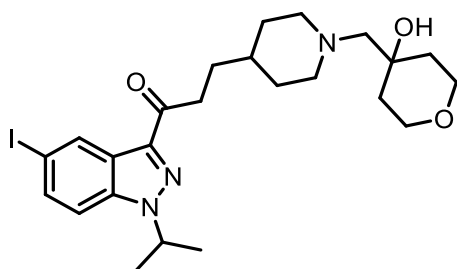
IR (KBr) ν 3419, 2934, 2858, 2797, 1654, 1540, 1460, 1383, 1241, 1199, 1103, 1017, 845, 731 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.77 (dd, *J* = 1.6, 0.7 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J* = 8.8, 1.6 Hz, 1H), 7.21 (dd, *J* = 8.9, 0.7 Hz, 1H), 7.14 – 7.04 (m, 1H), 4.80 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.82 – 3.70 (m, 4H), 3.35 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.93 – 2.83 (m, 2H), 2.40 – 2.28 (m, 4H), 1.79 – 1.70 (m, 2H), 1.70 – 1.49 (m, 9H), 1.48 – 1.31 (m, 4H). OH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 162.5, 139.0, 136.0, 134.9, 131.9, 125.0, 111.0, 86.4, 68.2, 67.3, 63.9 (2C), 56.2 (2C), 51.2, 44.4, 37.0 (2C), 35.9, 30.5 (2C), 22.1 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃ H₃₄IN₄O₃ [M+H]⁺ 541.1676 found 541.1681.

3-{1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl}-1-[5-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]propan-1-one **126**



Molecular Weight: 539.16 g.mol⁻¹

Formula: C₂₄H₃₄IN₃O₃

According to the General procedure G, starting from *tert*-butyl 4-{3-[5-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]-3-oxopropyl}piperidine-1-carboxylate **121** (80 mg, 0.15 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL), using TFA (0.12 mL, 1.5 mmol), K₃PO₄ (323 mg, 1.5 mmol) in water (2 mL), then 1,6-dioxaspiro[2,5]octane **92** (30 mg, 0.23 mmol), TEA (0.04 ml, 0.3 mmol) in propan-2-ol (2 mL). The mixture was stirred at 60°C for 4 h. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 98/2) affording the expected 3-{1-[(4-hydroxyoxan-4-yl)methyl]piperidin-4-yl}-1-[5-iodo-1-(propan-2-yl)-1*H*-indazol-3-yl]propan-1-one. **126** (27 mg, 33 %) as a yellow oil.

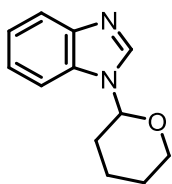
IR (KBr) ν 3431, 2933, 2859, 1670, 1461, 1389, 1302, 1270, 1226, 1103, 1028, 845, 792 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.76 (dd, *J* = 1.6, 0.7 Hz, 1H), 7.64 (dd, *J* = 8.5, 1.6 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.85 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.82 – 3.72 (m, 4H), 3.14 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.96 – 2.83 (m, 2H), 2.45 – 2.21 (m, 4H), 1.80 – 1.69 (m, 4H), 1.65 – 1.44 (m, 10H), 1.41 – 1.28 (m, 3H). OH signal is missing.

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 197.2, 140.6, 138.9, 134.9, 131.9, 125.0, 111.0, 87.6, 68.3, 67.2, 63.9 (2C), 56.6 (2C), 51.5, 37.1 (2C), 36.0, 34.7, 32.5 (2C), 31.00, 22.1 (2C).

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₄ H₃₅IN₃O₃ [M+H]⁺ 540.1723 found 540.1722.

1-(oxan-2-yl)-1*H*-1,3-benzodiazole **128**



Molecular Weight: 202,26 g.mol⁻¹

Formula: C₁₂H₁₄N₂O

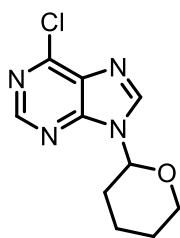
Starting from benzimidazole (1 g, 8.47 mmol), using the General procedure L, the crude was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 99/1) to afford the expected 1-(oxan-2-yl)-1*H*-1,3-benzodiazole **128** as a colorless oil (532 mg, 31 %).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.95 (s, 1H), 7.76 – 7.68 (m, 1H), 7.47 – 7.36 (m, 1H), 7.25 – 7.08 (m, 2H), 5.29 (dd, *J* = 10.0, 2.4 Hz, 1H), 3.97 – 3.88 (m, 1H), 3.65 – 3.48 (m, 1H), 2.06 – 1.83 (m, 3H), 1.67 – 1.45 (m, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 143.8, 140.4, 133.0, 123.1, 122.4, 120.2, 111.0, 83.2, 67.9, 30.5, 24.9, 22.6.

Data are consistent with literature values. Wu, X.; Qiao, K.; Qin, H.; Zhang, D.; Gao, D.; Yang, Z.; Fang, Z.; Guo, K. Silver(*scp*)-Mediated Oxidative C(sp³)-H Amination of Ethers with Azole Derivatives under Mild Conditions. *Org. Chem. Front.* **2019**, 6 (15), 2672–2677

6-chloro-9-(oxan-2-yl)-9H-purine **129**



Molecular Weight: 238,68 g.mol⁻¹

Formula: C₁₀H₁₁ClN₄O

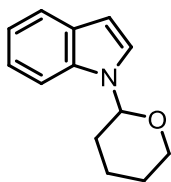
6-chloro-9H-purine (1.0 g, 6.5 mmol) in EtOAc (5 mL) was reacted with APTS (116 mg, 0.65 mmol) and DHP (985 μ l, 9.72 mmol) as described in the general procedure K at 80°C for 18 h. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 5/1) to afford the desired 6-chloro-9-(oxan-2-yl)-9H-purine **129** (880 mg, 57 %) as a yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.63 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 5.69 (dd, *J* = 10.3, 2.7 Hz, 1H), 4.07 (ddt, *J* = 11.8, 4.2, 1.9 Hz, 1H), 3.68 (td, *J* = 11.6, 2.9 Hz, 1H), 2.15 – 1.86 (m, 3H), 1.81 – 1.48 (m, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 151.8, 150.9, 150.8, 143.1, 131.6, 82.4, 68.8, 31.7, 24.7, 22.5.

Data are consistent with literature values. Klemm, L. H.; Johnstone, S.; Tran, L. K. Synthesis and Tautomerism of Ethyl 2-(2-Benzothiazolyl)-2-(6-Purinyl)Acetate and Related Compounds. *J. Heterocycl. Chem.* **2009**, 26 (6), 1519–1522.

1-(oxan-2-yl)-1*H*-indole **130**



Molecular Weight: 201,27 g.mol⁻¹

Formula: C₁₃H₁₅NO

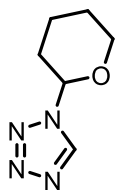
Starting from 1*H*-indole (500 mg, 4.3 mmol), using the General procedure L, the crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 10/1) to afford the expected 1-(oxan-2-yl)-1*H*-indole **130** as a yellow oil (350 mg, 41 %).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.67 (dt, *J* = 7.8, 1.0 Hz, 1H), 7.51 (dd, *J* = 8.3, 1.0 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 7.27 (ddd, *J* = 8.3, 7.0, 1.2 Hz, 1H), 7.23 – 7.09 (m, 1H), 6.58 (dd, *J* = 3.4, 0.8 Hz, 1H), 5.53 (dd, *J* = 10.2, 2.4 Hz, 1H), 4.21 – 4.09 (m, 1H), 3.78 (td, *J* = 11.5, 2.7 Hz, 1H), 2.26 – 2.03 (m, 3H), 1.85 – 1.61 (m, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 135.9, 129.0, 124.1, 121.9, 121.0, 120.1, 110.1, 102.6, 83.5, 68.12, 30.8, 25.3, 23.4.

Data are consistent with literature values. Lee, T. D.; Pickering, M. V; Daves, G. D. Reaction of 3-[2'-Tetrahydropyranyl(Furanyl)Thio]Indole with Silver Ion. *J. Org. Chem.* **1974**, 39 (8), 1106–1109.

1-(oxan-pyran-2-yl)-1*H*-1,2,3,4-tetrazole **131**



Molecular Weight: 154,17 g.mol⁻¹

Formula: C₆H₁₀N₄O

1*H*-tetrazole (570 mg, 8.1 mmol) in MeCN (5 mL) was reacted with APTS (204 mg, 0.81 mmol) and DHP (962 μ l, 0.97 mmol) as described in the general procedure K at 50°C for 3 h. The crude was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 99/1) to afford the desired 1-(oxan-pyran-2-yl)-1*H*-tetrazole **131** (500 mg, 40%) as a yellow oil.

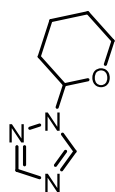
IR (KBr) ν in progress

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.78 (s, 1H), 5.78 (dd, *J* = 8.5, 3.1 Hz, 1H), 4.07 – 3.91 (m, 1H), 3.84 – 3.67 (m, 1H), 2.30 – 2.18 (m, 1H), 2.14 – 1.97 (m, 2H), 1.84 – 1.64 (m, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 141.2, 85.4, 67.3, 30.6, 24.5, 21.0.

HRMS/ESI: in progress

1-(oxan-2-yl)-1*H*-1,2,4-triazole **132**



Molecular Weight: 153,19 g.mol⁻¹

Formula: C₇H₁₁N₃O

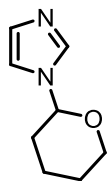
1*H*-1,2,4-triazole (3.45 g, 50 mmol) in THF anh. (25 mL) was reacted with APTS (950 mg, 5.0 mmol) and DHP (9.1 ml, 100 mmol) as described in the general procedure K at 70°C for 2 h. The crude was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc) to afford the desired product 1-(oxan-2-yl)-1*H*-1,2,4-triazole **132** (3,3 g, 43 %) as a colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.25 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 5.44 (dd, *J* = 8.3, 3.7 Hz, 1H), 4.12 – 3.96 (m, 1H), 3.77 – 3.61 (m, 1H), 2.13 – 1.94 (m, 3H), 1.77 – 1.53 (m, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 151.6, 142.0, 85.9, 67.6, 30.4, 24.7, 21.8.

Data are consistent with literature values. Joo, J. M.; Guo, P.; Sames, D. C-H Bonds as Ubiquitous Functionality: Preparation of Multiple Regioisomers of Arylated 1,2,4-Triazoles via C-H Arylation. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (2), 738–743.

1-(oxan-2-yl)-1*H*-imidazole **133**



Molecular Weight: 152,20 g.mol⁻¹

Formula: C₈H₁₂N₂O

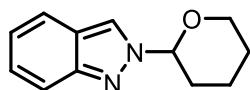
In a round bottom flask was added NaH (1.06 g, 44 mmol) in anh. THF (10 mL). The reaction was cooled to 0°C and imidazole (1 g, 14.7 mmol) was added. After 0.5 h of stirring at 0°C, Cl-THP **137** (2,66 g, 22 mmol) was added and the mixture was stirred 18 h at RT. The reaction was quenched by an addition of H₂O (5 mL), the solvent was evaporated *in vacuo* and aqueous layer was extracted with Et₂O (20 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered, evaporated and the residue was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 95/5) to afford the product **133** as a colorless oil (335 mg, 15 %).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.73 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 5.70 (dd, *J* = 8.4, 3.5 Hz, 1H), 4.04 – 3.92 (m, 1H), 3.76 – 3.65 (m, 1H), 2.17 – 1.92 (m, 3H), 1.77 – 1.54 (m, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 133.7, 121.7, 86.2, 67.4, 30.7, 24.7, 21.6

Data are consistent with literature values. Rault, S.; Primas, N.; Bouillon, A.; Lancelot, J.-C.; Santos, J.; Lohier, J.-F. A New Methodology to Prepare 2-Halogenoimidazoles via a N-THP Protection. *Lett. Org. Chem.* **2008**, 5 (1), 8–10.

2-(oxan-2-yl)-2*H*-indazole **134**



Molecular Weight: 202,26 g.mol⁻¹

Formula: C₁₂H₁₄N₂O

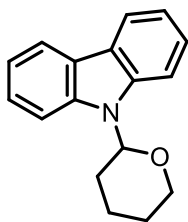
1*H*-indazole (2.0 g, 17 mmol) in CH₂Cl₂ (70 mL) was reacted with PPTS (425 mg, 1.7 mmol) and DHP (3.1 ml, 34 mmol) as described in the general procedure K at RT for 8 h. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 10/1) to afford the desired product 2-(oxan-2-yl)-2*H*-indazole **134** (2,39 g, 70 %) as a colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.09 (s, 1H), 7.75 (dd, *J* = 0.3 Hz, 8.7 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.25 (dt, *J* = 0.9 Hz, 6.6 Hz, 1H), 7.03 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.58 (m, 1H), 4.03 (dd, *J* = 3 Hz, 11.7 Hz, 1H), 3.66 (dt, *J* = 3 Hz, 11.4 Hz, 1H), 2.16 (m, 2H), 1.93 (m, 1H), 1.59 (m 3H)

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 148.7, 126.4, 122.1, 121.7, 121.3, 120.8, 118.1, 89.1, 68.1, 31.6, 25.1, 22.3

Data are consistent with literature values. Slade, D. J.; Pelz, N. F.; Bodnar, W.; Lampe, J. W.; Watson, P. S. Indazoles: Regioselective Protection and Subsequent Amine Coupling Reactions. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (16), 6331–6334.

9-(oxan-2-yl)-9H-carbazole **135**



Molecular Weight : 251,33 g.mol⁻¹

Formula : C₁₇H₁₇NO

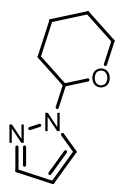
9H-carbazole (1.0 g, 6 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was reacted with PPTS (150 mg, 0.6 mmol) and DHP (1.21 ml, 12 mmol) as described in the general procedure K at reflux for 18 h. The crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 1/1) to afford the desired product 9-(oxan-2-yl)-9H-carbazole **135** (1.51 g, 100 %) as a colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.09 (dt, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 2H), 7.74 – 7.62 (m, 2H), 7.45 (ddd, *J* = 8.4, 7.2, 1.2 Hz, 2H), 7.25 (ddd, *J* = 7.9, 7.2, 0.9 Hz, 2H), 5.81 (dd, *J* = 11.2, 2.5 Hz, 1H), 4.33 (ddt, *J* = 11.7, 4.2, 1.8 Hz, 1H), 3.82 (td, *J* = 11.8, 2.3 Hz, 1H), 2.51 (tdd, *J* = 13.6, 10.8, 4.2 Hz, 1H), 2.11 (ddt, *J* = 9.9, 5.6, 2.6 Hz, 1H), 2.01 – 1.75 (m, 3H), 1.75 – 1.67 (m, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 139.1 (2C), 125.6 (2C), 123.6 (2C), 120.2 (2C), 119.4 (2C), 110.9 (2C), 84.4, 69.4, 29.6, 25.4, 23.6.

Data are consistent with literature values. Balasubramanian, G.; Gharat, L.; Lakdawala, A.; Anupindi, R. Novel Tricyclic Compounds Useful for the Treatment of Inflammatory and Allergic Disorders: Process for Their Preparation and Pharmaceutical Compositions Containing Them, **2004**. WO 2004/037805 A1.

1-(oxan-2-yl)-1H-pyrazole **136**



Molecular Weight: 152,20 g.mol⁻¹

Formula: C₈H₁₂N₂O

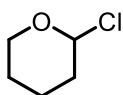
1H-pyrazole (10 g, 147 mmol) in hexane. (200 mL) was reacted with TFA (67 μ l, 7.3 mmol) and DHP (20 ml, 220 mmol) as described in the general procedure K at reflux for 4.5 h. The crude was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 95/5) to afford the desired 1-(oxan-2-yl)-1H-pyrazole **136** (19.92 g, 89 %) as a colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.58 (dd, *J* = 2.5, 0.7 Hz, 1H), 7.53 (dd, 1H), 6.28 (dd, *J* = 2.5, 1.8 Hz, 1H), 5.37 (dd, *J* = 9.7, 2.6 Hz, 1H), 4.10 – 3.94 (m, 1H), 3.72 – 3.59 (m, 1H), 2.16 – 1.97 (m, 3H), 1.73 – 1.53 (m, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 139.6, 127.6, 106.1, 87.6, 67.9, 30.6, 25.0, 22.5.

Data are consistent with literature values. Velankar, A. D.; Quintini, G.; Prabhu, A.; Weber, A.; Hunaeus, G.; Volland, B.; Wuest, M.; Orjeda, C.; Harel, D.; Varghese, S. Synthesis and Biological Evaluation of Novel (4 or 5-Aryl)Pyrazolyl-Indoles as Inhibitors of Interleukin-2 Inducible T-Cell Kinase (ITK). *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (12), 4547–4559.

2-chlorotetrahydropyran **137**



Molecular Weight: 120,58 g.mol⁻¹

Formula: C₅H₉ClO

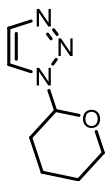
In a round bottom flask was added a mixture HCl 2N/Et₂O (19 mL). The reaction was cooled to 0°C and 3,4-dihydro-2*H*-pyrane (1.15 mL, 11.2 mmol, in 5 mL of Et₂O) was added drop by drop. After 3 h of stirring at 0°C, the solvent was evaporated *in vacuo* at RT offering the desired 2-chlorotetrahydropyran **137** in quantity without further purification.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 6.35 – 6.21 (m, 1H), 4.05 (td, *J* = 11.8, 2.8 Hz, 1H), 3.87 – 3.70 (m, 1H), 2.13 – 1.97 (m, 3H), 1.75 – 1.59 (m, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 98.0, 65.0, 36.6, 26.9, 19.0.

Data are consistent with literature values Eliel, E. L.; Manoharan, M.; Pietrusiewicz, K. M.; Hargrave, K. D. Carbon-13 NMR Spectra of Saturated Heterocycles: XI—Tetrahydropyrans (Oxanes). *Org. Magn. Reson.* **1983**, 21 (2), 94–107.

1-(oxan-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazole **138**



Molecular Weight: 153,19 g.mol⁻¹

Formula: C₇H₁₁N₃O

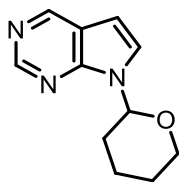
Starting from 1*H*-1,2,3-triazole (300 mg, 4.3 mmol), using the General procedure L, the crude was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 6/1) to afford the desired 1-(oxan-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazole **138** as a colorless oil (100 mg, 15 %).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.73 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 5.70 (dd, *J* = 8.4, 3.5 Hz, 1H), 4.04 – 3.92 (m, 1H), 3.76 – 3.65 (m, 1H), 2.17 – 1.92 (m, 3H), 1.77 – 1.54 (m, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 133.7, 121.7, 86.2, 67.4, 30.7, 24.7, 21.6

Data are consistent with literature values. Davey, P. R. J.; Delouvrié, B.; Dorison-Duval, D.; Germain, H.; Harris, C. S.; Magnien, F.; Ouvry, G.; Tricotet, T. Facile Preparation and Suzuki–Miyaura Cross-Coupling of *N*-2-Alkylated 2*H*-1,2,3-Triazole 4-Boronates. *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53 (50), 6849–6852.

7-(oxan-2-yl)-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine **139**



Molecular Weight: 203,25 g.mol⁻¹

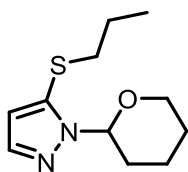
Formula: C₁₁H₁₃N₃O

Starting from 7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine (300 mg, 2.51 mmol), using the General procedure L, the crude was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 99/1) to afford the expected 7-(oxan-2-yl)-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine **139** as a colorless oil (60 mg, 11 %).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.93 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 7.44 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 6.57 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 5.99 (dd, *J* = 9.5, 3.4 Hz, 1H), 4.18 – 4.03 (m, 1H), 3.79 (td, *J* = 11.7, 2.6 Hz, 1H), 2.14 – 1.89 (m, 3H), 1.84 – 1.59 (m, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 151.5, 150.1, 149.5, 125.7, 119.2, 100.5, 80.8, 68.8, 31.6, 25.1, 23.2.

1-(oxan-2-yl)-5-(propylsulfanyl)-1*H*-pyrazole **140**



Molecular Weight: 226.34 g.mol⁻¹

Formula: C₁₁H₁₈N₂OS

Starting from 1-(oxan-2-yl)-1*H*-pyrazole **136** (200 mg, 1.31 mmol), using the general procedure N, after 1 h of metallation at -10°C, S₈ (505 mg, 2.0 mmol) was added and the mixture was stirred for 30 min at -10°C. 1-iodopropane (194 μl, 2.0 mmol) was added at -10°C and the reaction was warmed up at RT and stirred for 1 h. Then, the general protocol was applied. The crude was purified by flash column chromatography on deactivated silica (Cyclohexane/EtOAc 6/1) to afford the desired 1-(oxan-2-yl)-5-(propylsulfanyl)-1*H*-pyrazole **140** (279 mg, 94 %) as a yellow oil.

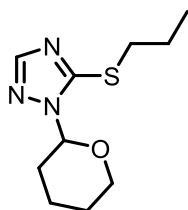
IR (KBr) ν 2962, 2935, 2870, 1495, 1418, 1404, 1087, 1058, 1043, 912, 877, 786, 557 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.55 (dd, *J* = 1.8, 0.5 Hz, 1H), 6.35 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 5.66 (dd, *J* = 10.2, 2.5 Hz, 1H), 4.08 – 3.94 (m, 1H), 3.66 (td, *J* = 11.4, 2.6 Hz, 1H), 2.85 – 2.60 (m, 2H), 2.53 – 2.38 (m, 1H), 2.13 – 2.03 (m, 1H), 1.90 – 1.82 (m, 1H), 1.75 – 1.66 (m, 2H), 1.60 – 1.52 (m, 3H), 0.96 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 139.8, 134.7, 111.8, 83.5, 67.9, 38.3, 29.6, 25.0, 22.9, 22.6, 13.1.

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₁₁H₁₈N₂ONaS [M+Na]⁺ 249.1038 found 249.1037.

1-(oxan-2-yl)-5-(propylsulfanyl)-1*H*-1,2,4-triazole **141**



Molecular Weight: 227.33 g.mol⁻¹

Formula: C₁₀H₁₇N₃OS

Starting from 1-(oxan-2-yl)-1*H*-1,2,4-triazole **132** (170 mg, 1.11 mmol), using the general procedure M, after 2 h of metallation at -10°C, S₈ (426 mg, 1.66 mmol) was added and the mixture was stirred for 30 min at -10°C. 1-iodopropane (162 μl, 1.66 mmol) was added at -10°C and the reaction was warmed up at 45°C and stirred for 4 h. Then, the general procedure was applied. The crude product was purified by flash column chromatography on silica (Cyclohexane/EtOAc 3/1) to afford the desired 1-(oxan-2-yl)-5-(propylsulfanyl)-1*H*-1,2,4-triazole **141** (142 mg, 56 %) as an orange oil.

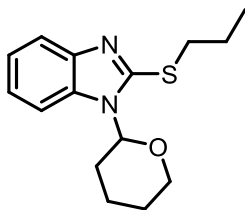
IR (KBr) ν 2963, 2871, 1483, 1421, 1366, 1273, 1205, 1087, 1045, 1003, 914, 880, 700 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.85 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 5.39 (dd, *J* = 9.4, 2.8 Hz, 1H), 4.05 – 3.96 (m, 1H), 3.68 (ddd, *J* = 11.5, 10.4, 3.0 Hz, 1H), 3.30 – 3.10 (m, 2H), 2.45 – 2.26 (m, 1H), 2.18 – 2.04 (m, 1H), 2.00 – 1.88 (m, 1H), 1.85 – 1.58 (m, 5H), 1.03 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 153.2, 151.1, 83.8, 67.6, 35.1, 29.1, 24.7, 22.9, 22.1, 13.2.

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₁₀H₁₇N₃OSNa [M+Na]⁺ 250.0990 found 250.0988.

1-(oxan-2-yl)-2-(propylsulfanyl)-1*H*-1,3-benzodiazole **142**



Molecular Weight: 276,40 g.mol⁻¹

Formula: C₁₅H₂₀N₂OS

Starting from 1-(oxan-2-yl)-1*H*-1,3-benzodiazole **128** (170 mg, 0.84 mmol), using the general procedure M, after 1h of metallation at -10°C, S₈ (323 mg, 1.26 mmol) was added and the mixture was stirred for 30 min at -10°C. 1-iodopropane (123 µl, 1.26 mmol) was added at -10°C and the reaction was warmed up at 45°C and stirred for 4 h. Then, the general protocol was applied. The crude product was purified by flash column chromatography on deactivated silica (Cyclohexane /EtOAc 3/1) to afford the desired 1-(oxan-2-yl)-2-(propylsulfanyl)-1*H*-1,3-benzodiazole **142** (171 mg, 74%) as an orange oil.

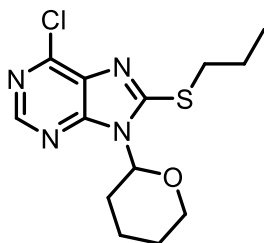
IR (KBr) ν 2960, 2860, 1442, 1301, 1279, 1085, 1043, 997, 740 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.78 – 7.62 (m, 2H), 7.31 – 7.18 (m, 2H), 5.63 (dd, *J* = 11.0, 2.5 Hz, 1H), 4.39 – 4.25 (m, 1H), 3.81 (td, *J* = 11.9, 2.4 Hz, 1H), 3.54 – 3.35 (m, 2H), 2.49 – 2.30 (m, 1H), 2.21 – 2.09 (m, 1H), 1.98 – 1.79 (m, 5H), 1.78 – 1.68 (m, 1H), 1.16 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 150.6, 144.0, 134.4, 121.9, 121.8, 118.3, 111.8, 84.6, 69.2, 34.8, 30.2, 25.1, 23.1, 22.6, 13.4.

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₁₅H₂₁N₂OS [M+H]⁺ 277.1375 found 277.1376

6-chloro-9-(oxan-2-yl)-8-(propylsulfanyl)-9H-purine **143**



Molecular Weight: 312,82 g.mol⁻¹

Formula: C₁₃H₁₇ClN₄OS

Starting from 6-chloro-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purine **129** (170 mg, 0.71 mmol), using the general procedure M, after 2 h of metallation at -10°C, S₈ (273 mg, 1.07 mmol) was added and the mixture was stirred for 30 min at -10°C. 1-iodopropan (105 µl, 1.07 mmol) was added at -10°C and the reaction was warmed up at 45°C and stirred for 4 h. Then, the general procedure was applied. The crude product was purified by flash column chromatography on deactivated silica (DCM /MeOH 99/1) to afford the desired 6-chloro-9-(oxan-2-yl)-8-(propylsulfanyl)-9H-purine **143** (144 mg, 65 %) as an orange oil.

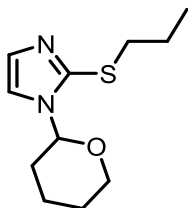
IR (KBr) ν 2961, 2928, 2854, 1582, 1558, 1452, 1332, 1245, 1208, 1149, 1087, 1046, 980 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.57 (s, 1H), 5.66 (dd, *J* = 11.2, 2.5 Hz, 1H), 4.26 – 4.13 (m, 1H), 3.71 (td, *J* = 11.9, 2.3 Hz, 1H), 3.51 – 3.30 (m, 2H), 2.89 – 2.72 (m, 1H), 2.14 – 2.03 (m, 1H), 1.95 – 1.63 (m, 6H), 1.09 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 157.2, 153.6, 150.2, 146.9, 131.9, 83.6, 69.3, 34.3, 29.0, 24.7, 23.1, 22.3, 13.5.

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₁₃H₁₈ClN₄OS [M+H]⁺ 313.0890 found 313.0887

1-(oxan-2-yl)-2-(propylsulfanyl)-1*H*-imidazole **144**



Molecular Weight : 226,34 g.mol⁻¹

Formula : C₁₁H₁₈N₂OS

Starting from 1-(oxan-2-yl)-1*H*-imidazole **133** (150 mg, 0.98 mmol), using the general procedure M, after 2 h of metallation at -10°C, S₈ (379 mg, 1.48 mmol) was added and the mixture was stirred for 30 min at -10°C. 1-iodopropane (144 μl, 1.48 mmol) was added at -10°C and the reaction was warmed up at 45°C and stirred for 2 h. Then, the general procedure was applied. The residue was purified by flash column chromatography on silica (Cyclohexane/EtOAc 3/1) to afford the desired 1-(oxan-2-yl)-2-(propylsulfanyl)-1*H*-imidazole **144** (141 mg, 63%) as an orange oil.

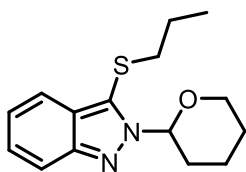
IR (KBr) ν 2962, 2940, 2852, 1439, 1403, 1266, 1208, 1083, 1046, 998, 917 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.13 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 5.38 (dd, *J* = 10.0, 2.9 Hz, 1H), 4.14 – 4.06 (m, 1H), 3.68 (td, *J* = 11.5, 2.9 Hz, 1H), 3.11 – 2.98 (m, 2H), 2.03 (ddd, *J* = 10.0, 3.9, 1.9 Hz, 1H), 1.93 – 1.76 (m, 2H), 1.75 – 1.57 (m, 5H), 1.00 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 141.5, 129.6, 117.5, 83.2, 68.5, 36.4, 31.7, 24.9, 23.0, 23.0, 13.3.

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₁₁H₁₉N₂OS [M+H]⁺ 227.1218 found 227.1219.

2-(oxan-2-yl)-3-(propylsulfanyl)-2H-indazole **145**



Molecular Weight: 276.40 g.mol⁻¹

Formula: C₁₅H₂₀N₂OS

Starting from 2-(oxan-2-yl)-2H-indazole **134** (200 mg, 1.0 mmol), using the general procedure N, after 1 h of metallation at -10°C, S₈ (380 mg, 1.5 mmol) was added and the mixture was stirred for 30 min at -10°C. 1-iodopropane (145 µl, 1.5 mmol) was added at -10°C and the reaction was warmed up at RT and stirred for 4h. Then, the general procedure was applied. The crude product was purified by flash column chromatography on deactivated silica (Cyclohexane/EtOAc 6/1) to afford the desired 2-(oxan-2-yl)-3-(propylsulfanyl)-2H-indazole **145** (190 mg, 70 %) as a yellow oil.

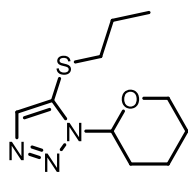
IR (KBr) ν 2961, 2928, 2847, 1621, 1453, 1302, 1197, 1085, 1043, 1007, 916, 745 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 7.75 (dd, J = 13.6, 8.8 Hz, 2H), 7.30 (ddd, J = 8.8, 6.6, 1.0 Hz, 1H), 7.14 (ddd, J = 8.8, 6.6, 1.0 Hz, 1H), 6.21 (dd, J = 10.4, 2.5 Hz, 1H), 4.21 – 4.08 (m, 1H), 3.78 (td, J = 11.5, 2.5 Hz, 1H), 2.88 – 2.59 (m, 3H), 2.23 – 2.11 (m, 1H), 1.98 – 1.89 (m, 1H), 1.90 – 1.77 (m, 2H), 1.68 – 1.59 (m, 1H), 1.59 – 1.47 (m, 2H), 0.98 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-d) δ 148.4, 126.7, 126.4, 125.9, 122.8, 120.3, 118.8, 84.7, 68.4, 39.4, 30.4, 24.9, 23.2, 22.9, 13.1.

HRMS/ESI: m/z calcd C₁₅H₂₀N₂ONaS [M+Na]⁺ 299.1194 found 299.1193.

1-(oxan-2-yl)-5-(propylsulfanyl)-1*H*-1,2,3-triazole **146**



Molecular Weight: 227.33 g.mol⁻¹

Formula: C₁₀H₁₇N₃OS

Starting from 1-(oxan-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazole **138** (200 mg, 1.3 mmol), using the general procedure N, after 1 h of metallation at -10°C, S₈ (502 mg, 1.96 mmol) was added and the mixture was stirred for 30 min at -10°C. 1-iodopropane (190 μl, 1.96 mmol) was added at -10°C and the reaction was warmed up at RT and stirred for 1 h. Then, the general protocol was applied. The crude product was purified by flash column chromatography on deactivated silica (Cyclohexane/EtOAc 6/1) to afford the desired 1-(oxan-2-yl)-5-(propylsulfanyl)-1*H*-1,2,3-triazole **146** (215 mg, 73 %) as a yellow oil.

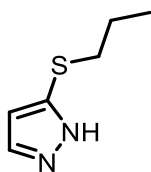
IR (KBr) ν 2962, 2932, 2869, 1459, 1411, 1378, 1274, 1207, 1090, 1043, 1002, 972, 914, 836 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.65 (s, 1H), 5.73 (dd, *J* = 8.8, 3.1 Hz, 1H), 4.04 – 3.93 (m, 1H), 3.78 – 3.64 (m, 1H), 2.89 – 2.71 (m, 2H), 2.64 – 2.53 (m, 1H), 2.25 – 2.15 (m, 1H), 2.10 – 2.01 (m, 1H), 1.78 – 1.56 (m, 5H), 1.00 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 136.7, 131.4, 83.5, 67.1, 37.7, 28.9, 24.8, 22.6, 21.9, 13.1.

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₁₀H₁₇N₃ONaS [M+Na]⁺ 250.0990 found 250.0990.

5-(propylsulfanyl)-1H-pyrazole **147**



Molecular Weight: 142.22 g.mol⁻¹

Formula: C₆H₁₀N₂S

In a dry round bottom flask under N₂, was added 1-(oxan-2-yl)-1H-pyrazole **136** (200 mg, 1.31 mmol) in THF (3 mL). TMPMgCl.LiCl (1.8 mL, 1.97 mmol) was added slowly and the reaction was stirred at -10°C for 1.5 h (metallation monitoring is checked by NMR). Then, S₈ (505 mg, 1.97 mmol) was added and the reaction was stirred for 30 min at -10°C following by an addition of 1-iodopropane (192 ml, 1.97 mmol). It was stirred for 30 min at -10°C and 2 h at RT. HCl 3N (10 mL) was added and the reaction was stirred for 18 h at RT. Solvent was removed *in vacuo* and the crude mixture was extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 1/3) affording the expected 5-(propylsulfanyl)-1H-pyrazole **147** (158 mg, 85 %) as an orange oil.

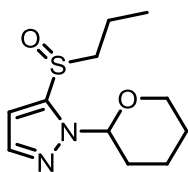
IR (KBr) ν 3176, 2966, 2921, 2873, 1455, 1400, 1090, 1048, 765 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 11.10 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.34 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 2.84 (t, 2H), 1.64 (h, *J* = 7.4 Hz, 2H), 0.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 142.34, 132.62, 108.45, 37.23, 23.12, 13.22.

HRMS/ESI: *m/z* calcd in progress.

1-(oxan-2-yl)-5-(propane-1-sulfinyl)-1*H*-pyrazole **148**



Molecular Weight : 242.34 g.mol⁻¹

Formula : C₁₁H₁₈N₂O₂S

In a dry round bottom flask under N₂, was added 1-(oxan-2-yl)-1*H*-pyrazole (300 mg, 1.97 mmol) in THF (3 mL). The reaction was cooled to -10°C and TMPMgCl.LiCl (2.96 mL, 2.96 mmol) was added slowly. After 3 h of stirring at -10°C (metallation monitoring was checked by NMR), S₈ (759 mg, 2.96 mmol) was added and the reaction was stirred for 0.5 h at -10°C following by an addition of 1-iodopropane (290 μl, 2.96 mmol). The mixture was stirred for 0.5 h at -10°C and 18 h at RT. H₂O (2 mL) was added and the mixture was filtered and extracted in EtOAc/H₂O (20 mL x 3). The organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated *in vacuo*. The residue was dissolved in THF (5 mL), then H₂O (10 mL) and NaIO₄ (465 mg, 2.2 mmol) were added. After 18 h of stirring at RT, the solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was extracted with EtOAc (10 mL x 3). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 3/1) affording the expected 1-(oxan-2-yl)-5-(propane-1-sulfinyl)-1*H*-pyrazole **148** (238 mg, 50 %) as an orange oil.

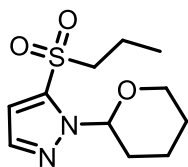
IR (KBr) ν 2963, 2939, 2873, 1456, 1372, 1085, 1043, 911, 793, 564, 538 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.57 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.72 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 5.79 (dd, *J* = 9.7, 2.4 Hz, 1H), 4.13 – 3.99 (m, 1H), 3.78 – 3.62 (m, 1H), 3.20 – 2.99 (m, 2H), 2.40 – 2.25 (m, 1H), 2.09 – 1.91 (m, 2H), 1.80 – 1.59 (m, 5H), 1.06 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 141.8, 139.0, 108.9, 87.1, 67.88, 57.5, 30.1, 24.8, 22.2, 16.4, 13.1.

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₁₁H₁₈N₂O₃NaS [M+Na]⁺ 265.0987 found 265.0989.

1-(oxan-2-yl)-5-(propane-1-sulfonyl)-1*H*-pyrazole **149**



Molecular Weight : 258.1 g.mol⁻¹

Formula : C₁₁H₁₈N₂O₃S

In a round bottom flask, was added 1-(oxan-2-yl)-5-(propylsulfanyl)-1*H*-pyrazole **140** (200 mg, 0.88 mmol) in anh. CH₂Cl₂ (10 mL). mCPBA (327 mg, 1.9 mmol) was added slowly at 0°C and the reaction was stirred 24 h at RT. The mixture was extracted in DCM/H₂O and the combined organic layers were evaporated, dried over MgSO₄ and filtered. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 6/1) to afford the desired 1-(oxan-2-yl)-5-(propane-1-sulfonyl)-1*H*-pyrazole **149** (223 mg, 97 %) as a yellow oil.

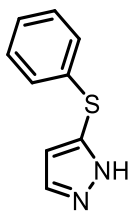
IR (KBr) ν 2936, 2862, 1459, 1352, 1315, 1181, 1128, 1085, 1042, 983, 911, 775, 718, 537 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.71 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 5.47 (dd, *J* = 9.0, 2.9 Hz, 1H), 4.09 – 3.93 (m, 1H), 3.77 – 3.62 (m, 1H), 3.26 – 3.12 (m, 2H), 2.17 – 2.08 (m, 1H), 2.06 – 1.95 (m, 2H), 1.87 – 1.76 (m, 2H), 1.74 – 1.59 (m, 3H), 1.01 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 150.0, 129.3, 107.9, 88.5, 67.8, 57.2, 30.8, 24.7, 21.8, 16.2, 13.0.

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₁₁H₁₈N₂O₃NaS [M+Na]⁺ 281.0936 found 281.0941.

5-(phenylsulfanyl)-1*H*-pyrazole **150**



Molecular Weight: 176.24 g.mol⁻¹

Chemical Formula: C₉H₈N₂S

In a dry round bottom flask under N₂ was added 1-(oxan-2-yl)-1*H*-pyrazole **136** (300 mg, 1.97 mmol) in THF (3 mL). The reaction was cooled to -10°C and TMPMgCl.LiCl (2.96 mL, 2.96 mmol) was added slowly. After 2 h of stirring at -10°C (metallation monitoring was checked by NMR), S₈ (759 mg, 2.96 mmol) was added and the reaction was stirred for 0,5 h at -10°C following by an addition of benzenediazonium tetrafluoroborate (568 mg, 2.96 mmol) at -10°C. The reaction mixture was stirred during 30 min at -10°C and 2 h at RT. HCl 3N (10 mL) was added and the mixture was stirred for 6 h at 50°C. THF was removed *in vacuo* and the reaction was extracted with EtOAc (3x 10 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH 95/5/0.5) affording the expected 5-(phenylsulfanyl)-1*H*-pyrazole **150** (240 mg, 70 %) as an orange oil.

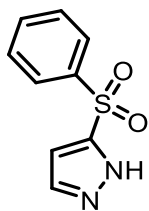
IR (KBr) ν 2955, 2914, 2856, 1623, 1583, 1472, 1391, 1053, 762, 740, 685 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.50 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 4.5 Hz, 4H), 7.14 – 7.05 (m, 1H), 6.37 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H). NH signal is missing

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 147.0, 135.9, 129.1 (2C), 128.6 (2C), 126.5, 110.8, 97.0.

HRMS/ESI: In progress

5-(phenylsulfonyl)-1H-pyrazole **151**



Molecular Weight : 208.24 g.mol⁻¹

Formula : C₉H₈N₂O₂S

In a dry round bottom flask under N₂ was added 1-(oxan-2-yl)-1H-pyrazole **136** (300 mg, 1.97 mmol) in THF (3 mL). The reaction was cooled to -10°C and TMPMgCl.LiCl (2.96 mL, 2.96 mmol) was added slowly. After 2 h of stirring at -10°C (metallation monitoring was checked by NMR), S₈ (759 mg, 2.96 mmol) was added and the reaction was stirred for 0,5 h at -10°C following by an addition of benzenediazonium tetrafluoroborate (568 mg, 2.96 mmol) at -10°C. The reaction mixture was stirred during 30 min at -10°C and 2 h at RT. Then, the reaction was quenched by an addition of H₂O (2mL), THF was removed *in vacuo* and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The residue was dissolved in anhydrous DCM (10 mL), mCPBA (1.36 g, 7.8 mmol) was added and the reaction was stirred for 2 h at RT. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was dissolved in THF (3 mL). HCl 3N (10 mL) was added and the reaction was stirred 5 h at 50°C. Then, THF was removed and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH 95/5/0.5) affording the expected 5-(phenylsulfonyl)-1H-pyrazole **151** (70 mg, 17 %) as a brown oil.

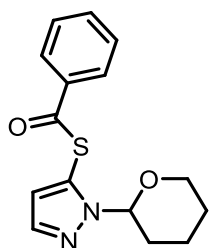
IR (KBr) ν 3285, 3142, 2914, 2585, 1446, 1319, 1248, 1147, 1087, 729, 687, 616, 552 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 13.68 (s, 1H), 8.01 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.00 – 7.95 (m, 2H), 7.62 – 7.56 (m, 1H), 7.53 – 7.48 (m, 2H), 6.82 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 151.9, 140.9, 133.6 (2C), 132.5 (2C), 129.3, 127.5, 106.7.

HRMS/ESI: In progress

{[1-(oxan-2-yl)-1H-pyrazol-5-yl]sulfanyl}(phenyl)methanone **152**



Molecular Weight: 288,37 g.mol⁻¹

Formula: C₁₅H₁₆N₂O₂S

In a dry round bottom flask under N₂, were added 1-(oxan-2-yl)-1H-pyrazole **136** (200 mg, 1.31 mmol), THF (3 mL), TMPMgCl.LiCl (2.59 mL, 1.96 mmol) and the reaction was stirred at -10°C for 1 h (metallation monitoring is checked by NMR). Then, S₈ (505 mg, 1.96 mmol) was added and stirred for 30 min at -10°C following by an addition of benzoyl chloride (230 μl, 1.96 mmol). The reaction was stirred during 30 min at -10°C and 4 h at RT. It was quenched with an addition of H₂O (2 mL), THF was removed *in vacuo* and the mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 10/1) affording the expected {[1-(oxan-2-yl)-1H-pyrazol-5-yl]sulfanyl}(phenyl)methanone **152** (200 mg, 53 %) as a yellow oil.

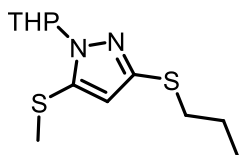
IR (KBr) ν 3121, 2943, 2856, 1685, 1492, 1447, 1204, 1085, 1043, 987, 771, 688, 645 cm⁻¹

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.03 (dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz, 2H), 7.75 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.70 – 7.62 (m, 1H), 7.57 – 7.45 (m, 2H), 6.59 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 5.45 (dd, *J* = 9.8, 2.7 Hz, 1H), 4.10 – 3.98 (m, 1H), 3.62 (td, *J* = 11.3, 2.5 Hz, 1H), 2.55 – 2.40 (m, 1H), 2.16 – 2.04 (m, 1H), 2.04 – 1.91 (m, 1H), 1.75 – 1.52 (m, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 187.6, 140.2, 135.5, 134.3, 129.0 (2C), 127.9 (2C), 125.3, 115.2, 84.1, 67.91, 29.8, 24.9, 22.6.

HRMS/ESI: *m/z* calcd C₁₅H₁₆N₂O₂NaS [M+Na]⁺ 311.0830 found 311.0836.

5-(methylsulfanyl)-1-(oxan-2-yl)-3-(propylsulfanyl)-1H-pyrazole **153**



Molecular Weight: 272.43 g.mol⁻¹

Chemical Formula: C₁₂H₂₀N₂OS₂

In a round bottom flask, were added 1-(oxan-2-yl)-5-(propylsulfanyl)-1H-pyrazole **140** (200 mg, 0.9 mmol), 3,4-dihydro-2H-pyran (0.16 ml, 1.8 mmol), TFA (10 μ l, 0.09 mmol) and toluène (5 mL). The mixture was stirred for 24 h at 65°C. The solvent and excess of 3,4-dihydro-2H-pyran was evaporated *in vacuo* and the crude product was putted in a dry round bottom flask under N₂. Then, anh. THF (3 mL) and TMPMgCl.LiCl (1.7 mL, 1.35 mmol) were added and the reaction was stirred at -10°C for 3 h. Then, S₈ (500 mg, 2.0 mmol) was added and the mixture was stirred for 30 min at -10°C following by an addition of iodomethane (90 μ l, 1.35 mmol) at -10°C. The reaction was stirred overnight and the crude was concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 6/1) affording the expected 5-(methylsulfanyl)-1-(oxan-2-yl)-3-(propylsulfanyl)-1H-pyrazole **154** (138 mg, 57 %) as an orange oil.

IR (KBr) ν In progress

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 6.24 (s, 1H), 5.50 (dd, *J* = 9.8, 2.7 Hz, 1H), 4.03 (ddt, *J* = 13.3, 4.3, 2.2 Hz, 1H), 3.66 (td, *J* = 11.2, 2.7 Hz, 1H), 3.00 – 2.78 (m, 2H), 2.41 (s, 3H), 2.10 (ddd, *J* = 8.8, 4.1, 1.8 Hz, 1H), 1.93 – 1.82 (m, 1H), 1.78 – 1.54 (m, 6H), 1.00 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 146.4, 138.3, 110.5, 84.1, 67.6, 35.6, 29.2, 24.9, 23.1, 22.7, 18.8, 13.4.

HRMS/ESI: m/z In progress

Bibliographie

- (1) Erspamer, V.; Assero, B. Identification of Enteramine, the Specific Hormone of the Enterochromaffin Cell System, as 5-Hydroxytryptamine. *Nat. Publ. Gr.* **1952**, *169*, 800–801.
- (2) Erspamer, V. Active Substances in the Posterior Salivary Glands of Oetopoda . *Acta Pharmacol.* **1948**, *4*, 213–223.
- (3) Erspamer, V.; Ghiretti, F. The Action of Enteramine on the Heart of Molluscs. *J. Physiol.* **1951**, *115* (4), 470–481.
- (4) Rapport, M. M.; Green, A. A.; Page, I. H. Serum Vasoconstrictor, Serotonin; Isolation and Characterization. *J. Biol. Chem* **1948**, *176*, 1243–1251.
- (5) Walther, D. J.; Bader, M. A Unique Central Tryptophan Hydroxylase Isoform. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66* (9), 1673–1680.
- (6) Stone, T. W.; Darlington, L. G. Endogenous Kynurenines as Targets for Drug Discovery and Development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1* (8), 609–620.
- (7) Fidalgo, S.; Ivanov, D. K.; Wood, S. H. Serotonin: From Top to Bottom. *Biogerontology* **2013**, *14* (1), 21–45.
- (8) David, D. J.; Gardier, A. M. Les Bases de Pharmacologie Fondamentale Du Système Sérotoninergique : Application à La Réponse Antidépressive. *Encephale.* **2016**, *42* (3), 255–263.
- (9) Kvols, L. K.; Buck, M. Chemotherapy of Metastatic Carcinoid and Islet Cell Tumors: A Review. *Am. J. Med.* **1987**, *82* (5), 77–83.
- (10) Meneses, A.; Liy-Salmeron, G. Serotonin and Emotion, Learning and Memory. *Rev. Neurosci.* **2012**, *23* (5–6), 543–553.
- (11) Yohn, C. N.; Gergues, M. M.; Samuels, B. A. The Role of 5-HT Receptors in Depression. *Mol. Brain* **2017**, *10* (1), 28.
- (12) Nichols, D. E.; Nichols, C. D. Serotonin Receptors. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (5), 1614–1641.
- (13) Hoyer, D.; Clarke, D. E.; Fozard, J. R.; Hartig, P. R.; Martin, G. R.; Mylecharane, E. J.; Saxena, P. R.; Humphrey, P. P. International Union of Pharmacology Classification of Receptors for 5-Hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.* **1994**, *46* (2), 157–203.
- (14) Fredriksson, R.; Lagerström, M. C.; Lundin, L.-G.; Schiöth, H. B. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon

- Groups, and Fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63* (6), 1256–1272.
- (15) Venkatakrisnan, A. J. Structure and Activation Mechanism of GPCRs. In *Top Med Chem*; **2019**; Vol. 9, pp 53–64.
- (16) Bockaert, J.; Roussignol, G.; Bécamel, C.; Gavarini, S.; Joubert, L.; Dumuis, A.; Fagni, L.; Marin, P. GPCR-Interacting Proteins (GIPs): Nature and Functions. *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32* (5), 851–855.
- (17) Bockaert, J.; Marin, P.; Dumuis, A.; Fagni, L. The ‘Magic Tail’ of G Protein-Coupled Receptors: An Anchorage for Functional Protein Networks. *FEBS Lett.* **2003**, *546* (1), 65–72.
- (18) Gilman, A. G.; Rodbell, M. Les Protéines G, Relais de Transmission Du Signal Entre Récepteur et Second Messenger Cellulaire. *Médecine/science* **1994**, *10*, 1183–1884.
- (19) Murbartian, J.; Lei, Q.; Sando, J. J.; Bayliss, D. A. Sequential Phosphorylation Mediates Receptor- and Kinase-Induced Inhibition of TREK-1 Background Potassium Channels. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (34), 30175–30184.
- (20) Reisine, T. Pertussis Toxin in the Analysis of Receptor Mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *39* (10), 1499–1504.
- (21) Conn, P. J.; Sanders-Bush, E. Selective 5HT-2 Antagonists Inhibit Serotonin Stimulated Phosphatidylinositol Metabolism in Cerebral Cortex. *Neuropharmacology* **1984**, *23* (8), 993–996.
- (22) Sah, V. P.; Seasholtz, T. M.; Sagi, S. A.; Brown, J. H. The Role of Rho in G Protein-Coupled Receptor Signal Transduction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2000**, *40* (1), 459–489.
- (23) Lester, H.; Dibas, M.; Dahan, D.; Leite, J.; Dougherty, D. Cys-Loop Receptors: New Twists and Turns. *Trends Neurosci.* **2004**, *27* (6), 329–336.
- (24) Thompson, A. J.; Lummis, S. C. R. The 5-HT₃ Receptor as a Therapeutic Target. *Expert Opin. Ther. Targets* **2007**, *11* (4), 527–540.
- (25) Jansen, M.; Bali, M.; Akabas, M. H. Modular Design of Cys-Loop Ligand-Gated Ion Channels: Functional 5-HT₃ and GABA_A P1 Receptors Lacking the Large Cytoplasmic M3M4 Loop. *J. Gen. Physiol.* **2008**, *131* (2), 137–146.
- (26) Dumuis, A.; Bouhelal, R.; Sebben, M.; Cory, R.; Bockaert, J. A Nonclassical 5-Hydroxytryptamine Receptor Positively Coupled with Adenylate Cyclase in the Central Nervous System. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34* (6), 880–887.

- (27) Bockaert, J.; Claeysen, S.; Compan, V.; Dumuis, A. 5-HT₄ Receptors. *Curr. Drug Targets - CNS Neurol. Disord.* **2004**, 39–51.
- (28) Gerald, C.; Adham, N.; Kao, H. T.; Olsen, M. A.; Laz, T. M.; Schechter, L. E.; Bard, J. A.; Vaysse, P. J.; Hartig, P. R.; Branchek, T. A. The 5-HT₄ Receptor: Molecular Cloning and Pharmacological Characterization of Two Splice Variants. *EMBO J.* **1995**, 14 (12), 2806–2815.
- (29) Van den Wyngaert, I.; Gommeren, W.; Verhasselt, P.; Jurzak, M.; Leysen, J.; Luyten, W.; Bender, E. Cloning and Expression of a Human Serotonin 5-HT₄ Receptor cDNA. *J. Neurochem.* **2002**, 69 (5), 1810–1819.
- (30) Hiroi, T.; Hayashi-Kobayashi, N.; Nagumo, S.; Ino, M.; Okawa, Y.; Aoba, A.; Matsui, H. Identification and Characterization of the Human Serotonin-4 Receptor Gene Promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 289 (2), 337–344.
- (31) Claeysen, S.; Sebben, M.; Journot, L.; Bockaert, J.; Dumuis, A. Cloning, Expression and Pharmacology of the Mouse 5-HT_{4L} Receptor. *FEBS Lett.* **1996**, 398 (1), 19–25.
- (32) Claeysen, S.; Sebben, M.; Becamel, C.; Bockaert, J.; Dumuis, A. Novel Brain-Specific 5-HT₄ Receptor Splice Variants Show Marked Constitutive Activity: Role of the C-Terminal Intracellular Domain. *Mol. Pharmacol.* **1999**, 55 (5), 910–920.
- (33) Blondel, O.; Vandecasteele, G.; Gastineau, M.; Leclerc, S.; Dahmoune, Y.; Langlois, M.; Fischmeister, R. Molecular and Functional Characterization of a 5-HT₄ Receptor Cloned from Human Atrium. *FEBS Lett.* **1997**, 412 (3), 465–474.
- (34) Brattelid, T.; Kvingedal, A. M.; Krobert, K. A.; Andressen, K. W.; Bach, T.; Hystad, M. E.; Kaumann, A. J.; Levy, F. O. Cloning, Pharmacological Characterisation and Tissue Distribution of a Novel 5-HT₄ Receptor Splice Variant, 5-HT_{4(l)}. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2004**, 369 (6), 616–628.
- (35) Berque-Bestel, I.; Lezoualc'h, F. Chapter 23. Serotonin 5-HT₄ Receptors as Pharmacological Targets for the Treatment of Alzheimer's Disease. In *Emerging Drugs and Targets for Alzheimer's disease*; **2010**; pp 169–190.
- (36) de Rooij, J.; Zwartkruis, F. J. T.; Verheijen, M. H. G.; Cool, R. H.; Nijman, S. M. B.; Wittinghofer, A.; Bos, J. L. Epac Is a Rap1 Guanine-Nucleotide-Exchange Factor Directly Activated by Cyclic AMP. *Nature* **1998**, 396 (6710), 474–477.
- (37) Lezoualc'h, F.; Robert, S. J. The Serotonin 5-HT₄ Receptor and the Amyloid Precursor Protein

- Processing. *Exp. Gerontol.* **2003**, *38* (1–2), 159–166.
- (38) Bockaert, J.; Claeyssen, S.; Compan, V.; Dumuis, A. 5-HT₄ Receptors: History, Molecular Pharmacology and Brain Functions. *Neuropharmacology* **2008**, *55* (6), 922–931.
- (39) Barthe, G.; Gaven, F.; Pellissier, L.; Reiter, E.; Claeyssen, S.; Dumuis, A.; F-, M. 5-Hydroxytryptamine 4 Receptor Activation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway Depends on Src Activation but Not on G Protein or β -Arrestin *Re. Mol. Biol. Cell* **2007**, *18* (June), 1979–1991.
- (40) Gill, R. K.; Saksena, S.; Tyagi, S.; Alrefai, W. A.; Malakooti, J.; Sarwar, Z.; Turner, J. R.; Ramaswamy, K.; Dudeja, P. K. Serotonin Inhibits Na⁺/H⁺ Exchange Activity via 5-HT₄ Receptors and Activation of PKC α in Human Intestinal Epithelial Cells. *Gastroenterology* **2005**, *128* (4), 962–974.
- (41) Hegde, S. S.; Eglon, R. M. Peripheral 5-HT₄ Receptors. *FASEB J.* **1996**, *10* (12), 1398–1407.
- (42) Gershon, M. D. Nerves, Reflexes, and the Enteric Nervous System. *J. Clin. Gastroenterol.* **2005**, *39* (Supplement 3), S184–S193.
- (43) Irving, H. R.; Tan, Y. Y.; Tochon-Danguy, N.; Liu, H.; Chetty, N.; Desmond, P. V.; Pouton, C. W.; Coupar, I. M. Comparison of 5-HT₄ and 5-HT₇ Receptor Expression and Function in the Circular Muscle of the Human Colon. *Life Sci.* **2007**, *80* (13), 1198–1205.
- (44) Kale-Pradhan, P. B.; Wilhelm, S. M. Tegaserod for Constipation-Predominant Irritable Bowel Syndrome. *Pharmacotherapy* **2007**, *27* (2), 267–277.
- (45) Shoemaker, R. G.; Du, X. Y.; Bax, W. A.; Bos, E.; Saxena, P. R. 5-Hydroxytryptamine Stimulates Human Isolated Atrium but Not Ventricle. *Eur. J. Pharmacol.* **1993**, *230* (1), 103–105.
- (46) Sanders, L.; Kaumann, A. A 5-HT₄-like Receptor in Human Left Atrium. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1992**, *345* (4), 382–386.
- (47) Lefebvre, H. Effect of the Serotonin-4 Receptor Agonist Zacopride on Aldosterone Secretion from the Human Adrenal Cortex: In Vivo and in Vitro Studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1993**, *77* (6), 1662–1666.
- (48) Lefebvre, H.; Contesse, V.; Delarue, C.; Feuilloley, M.; Hery, F.; Grise, P.; Raynaud, G.; Verhofstad, A. A. J.; Wolf, L. M.; Vaudry, H. Serotonin-Induced Stimulation of Cortisol Secretion from Human Adrenocortical Tissue Is Mediated through Activation of a Serotonin₄ Receptor Subtype. *Neuroscience* **1992**, *47* (4), 999–1007.

- (49) Doménech, T.; Beleta, J.; Fernández, A. G.; Gristwood, R. W.; Sánchez, F. C.; Tolosa, E.; Palacios, J. M. Identification and Characterization of Serotonin 5-HT₄ Receptor Binding Sites in Human Brain: Comparison with Other Mammalian Species. *Mol. Brain Res.* **1994**, *21* (1–2), 176–180.
- (50) Bonaventure, P.; Hall, H.; Gommeren, W.; Cras, P.; Langlois, X.; Jurzak, M.; Leysen, J. E. Mapping of Serotonin 5-HT₄ Receptor mRNA and Ligand Binding Sites in the Post-Mortem Human Brain. *Synapse* **2000**, *36* (1), 35–46.
- (51) Varnäs, K.; Halldin, C.; Pike, V. W.; Hall, H. Distribution of 5-HT₄ Receptors in the Postmortem Human Brain—an Autoradiographic Study Using [125I]SB 207710. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2003**, *13* (4), 228–234.
- (52) King, M.; Marsden, C.; Fone, K. C. F. A Role for the 5-HT_{1A}, 5-HT₄ and 5-HT₆ Receptors in Learning and Memory. *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, *29* (9), 482–492.
- (53) Kemp, A.; Manahan-Vaughan, D. The 5-Hydroxytryptamine₄ Receptor Exhibits Frequency-Dependent Properties in Synaptic Plasticity and Behavioural Metaplasticity in the Hippocampal CA1 Region In Vivo. *Cereb. Cortex* **2005**, *15* (7), 1037–1043.
- (54) Rosel, P.; Arranz, B.; Urretavizcaya, M.; Oros, M.; San, L.; Navarro, M. A. Altered 5-HT_{2A} and 5-HT₄ Postsynaptic Receptors and Their Intracellular Signalling Systems IP₃ and cAMP in Brains from Depressed Violent Suicide Victims. *Neuropsychobiology* **2004**, *49* (4), 189–195.
- (55) Reynolds, G. P.; Mason, S. L.; Meldrum, A.; Keczer, S.; Parties, H.; Eglen, R. M.; Wong, E. H. F. 5-Hydroxytryptamine (5-HT)₄ Receptors in Post Mortem Human Brain Tissue: Distribution, Pharmacology and Effects of Neurodegenerative Diseases. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *114* (5), 993–998.
- (56) Jean, A.; Conductier, G.; Manrique, C.; Bouras, C.; Berta, P.; Hen, R.; Charnay, Y.; Bockaert, J.; Compan, V. Anorexia Induced by Activation of Serotonin 5-HT₄ Receptors Is Mediated by Increases in CART in the Nucleus Accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (41), 16335–16340.
- (57) Bureau, R.; Boulouard, M.; Dauphin, F.; Lezoualc’h, F.; Rault, S. Review of 5-HT_{4R} Ligands: State of Art and Clinical Applications. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10* (5), 527–553.
- (58) www.theriaque.org.
- (59) Dumuis, A.; Sebben, M.; Bockaert, J. The Gastrointestinal Prokinetic Benzamide Derivatives Are Agonists at the Non-Classical 5-HT Receptor (5-HT₄) Positively Coupled to Adenylate Cyclase in

- Neurons. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **1989**, *340* (4), 403–410.
- (60) Nirogi, R.; Kandikere, V.; Bhyrapuneni, G.; Saralaya, R.; Ajjala, D. R.; Aleti, R. R.; Rasheed, M. A. In-Vivo Rat Striatal 5-HT₄ Receptor Occupancy Using Non-Radiolabelled SB207145. *J. Pharm. Pharmacol.* **2013**, *65* (5), 704–712.
- (61) Bender, E.; Pindon, A.; Van Oers, I.; Zhang, Y. Bin; Gommeren, W.; Verhasselt, P.; Jurzak, M.; Leysen, J.; Luyten, W. Structure of the Human Serotonin 5-HT₄ Receptor Gene and Cloning of a Novel 5-HT₄ Splice Variant. *J. Neurochem.* **2000**, *74* (2), 478–489.
- (62) <https://alzheimer-recherche.org>.
- (63) Moser, P. C.; Bergis, O. E.; Jegham, S.; Lochead, A.; Duconseille, E.; Terranova, J.; Caille, D.; Berque-bestel, I.; H, F. L.; Fischmeister, R.; Dumuis, A.; Bockaert, J.; George, P.; E, P. S.; Recherche, S.; France, P. C. M. Agonist with Potent Cognition-Enhancing Properties. *Pharmacology* **2002**, *302* (2), 731–741.
- (64) Spencer, J. P.; Brown, J. T.; Richardson, J. C.; Medhurst, A. D.; Sehmi, S. S.; Calver, A. R.; Randall, A. D. Modulation of Hippocampal Excitability by 5-HT₄ Receptor Agonists Persists in a Transgenic Model of Alzheimer's Disease. *Neuroscience* **2004**, *129* (1), 49–54.
- (65) Micale, V.; Marco Leggio, G.; Mazzola, C.; Drago, F. Cognitive Effects of SL65.0155, a Serotonin 5-HT₄ Receptor Partial Agonist, in Animal Models of Amnesia. *Brain Res.* **2006**, *1121* (1), 207–215.
- (66) Restivo, L.; Roman, F.; Dumuis, A.; Bockaert, J.; Marchetti, E.; Ammassari-Teule, M. The Promnesic Effect of G-Protein-Coupled 5-HT₄ Receptors Activation Is Mediated by a Potentiation of Learning-Induced Spine Growth in the Mouse Hippocampus. *Neuropsychopharmacology* **2008**, *33* (10), 2427–2434.
- (67) Marchetti, E.; Jacquet, M.; Jeltsch, H.; Migliorati, M.; Nivet, E.; Cassel, J. C.; Roman, F. S. Complete Recovery of Olfactory Associative Learning by Activation of 5-HT₄ Receptors after Dentate Granule Cell Damage in Rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* **2008**, *90* (1), 185–191.
- (68) Marchetti, E.; Jacquet, M.; Escoffier, G.; Miglioratti, M.; Dumuis, A.; Bockaert, J.; Roman, F. S. Enhancement of Reference Memory in Aged Rats by Specific Activation of 5-HT₄ Receptors Using an Olfactory Associative Discrimination Task. *Brain Res.* **2011**, *1405*, 49–56.
- (69) Tamburella, A.; Micale, V.; Navarria, A.; Drago, F. Antidepressant Properties of the 5-HT₄ Receptor Partial Agonist, SL65.0155: Behavioral and Neurochemical Studies in Rats. *Prog.*

Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry **2009**, *33* (7), 1205–1210.

- (70) Uto, Y. 1,2-Benzisoxazole Compounds: A Patent Review (2009 – 2014). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2015**, *25* (6), 643–662.
- (71) Nicholas, T.; Duvvuri, S.; Leurent, C.; Raunig, D.; Rapp, T.; Iredale, P.; Rowinski, C.; Carr, R.; Roberts, P.; Spiros, A.; Geerts, H. Systems Pharmacology Modeling in Neuroscience: Prediction and Outcome of PF-04995274, a 5-HT₄ Partial Agonist, in a Clinical Scopolamine Impairment Trial. *Adv. Alzheimer's Dis.* **2013**, *02* (03), 83–98.
- (72) Lecoutey, C.; Hedou, D.; Freret, T.; Giannoni, P.; Gaven, F.; Since, M.; Bouet, V.; Ballandonne, C.; Corvaisier, S.; Malzert Freon, A.; Mignani, S.; Cresteil, T.; Boulouard, M.; Claeysen, S.; Rochais, C.; Dallemagne, P. Design of Donecopride, a Dual Serotonin Subtype 4 Receptor Agonist/Acetylcholinesterase Inhibitor with Potential Interest for Alzheimer's Disease Treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (36), 3825–3830.
- (73) Rochais, C.; Lecoutey, C.; Hamidouche, K.; Giannoni, P.; Gaven, F.; Cem, E.; Mignani, S.; Baranger, K.; Freret, T.; Bockaert, J.; Rivera, S.; Boulouard, M.; Dallemagne, P.; Claeysen, S. Donecopride, a Swiss Army Knife with Potential against Alzheimer's Disease. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177* (9), 1988–2005.
- (74) Bureau, R.; Daveu, C.; Lemaître, S.; Dauphin, F.; Landelle, H.; Lancelot, J. C.; Rault, S. Molecular Design Based on 3D-Pharmacophore. Application to 5-HT₄ Receptor. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, *42* (4), 962–967.
- (75) Curtet, S.; Soulier, J.-L.; Zahradnik, I.; Giner, M.; Berque-Bestel, I.; Mialet, J.; Lezoualc'h, F.; Donzeau-Gouge, P.; Sicsic, S.; Fischmeister, R.; Langlois, M. New Arylpiperazine Derivatives as Antagonists of the Human Cloned 5-HT₄ Receptor Isoforms. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (20), 3761–3769.
- (76) Jakeman, L. B.; To, Z. P.; Eglén, R. M.; Wong, E. H. F.; Bonhaus, D. W. Quantitative Autoradiography of 5-HT₄ Receptors in Brains of Three Species Using Two Structurally Distinct Radioligands, [³H]GR113808 and [³H]BIMU-1. *Neuropharmacology* **1994**, *33* (8), 1027–1038.
- (77) Wong, E. H. F.; Reynolds, G. P.; Bonhaus, D. W.; Hsu, S.; Eglén, R. M. Characterization of [³H]GR 113808 Binding to 5-HT₄ Receptors in Brain Tissues from Patients with Neurodegenerative Disorders. *Behav. Brain Res.* **1995**, *73* (1–2), 249–252.
- (78) Gale, J. D.; Grossman, C. J.; Whitehead, J. W. F.; Oxford, A. W.; Bunce, K. T.; Humphrey, P. P. A. GR113808: A Novel, Selective Antagonist with High Affinity at the 5-HT₄ Receptor. *Br. J.*

- Pharmacol.* **1994**, *111* (1), 332–338.
- (79) Gaster, L. M.; Jennings, A. J.; Joiner, G. F.; King, F. D.; Mulholland, K. R.; Rahman, S. K.; Starr, S.; Wyman, P. A.; Wardle, K. A. (1-Butyl-4-Piperidinyl)Methyl 8-Amino-7-Chloro-1,4-Benzodioxane-5-Carboxylate Hydrochloride: A Highly Potent and Selective 5-HT₄ Receptor Antagonist Derived from Metoclopramide. *J. Med. Chem.* **1993**, *36* (25), 4121–4123.
- (80) Wardle, K. A.; Ellis, E. S.; Baxter, G. S.; Kennett, G. A.; Gaster, L. M.; Sanger, G. J. The Effects of SB 204070, a Highly Potent and Selective 5-HT₄ Receptor Antagonist, on Guinea-pig Distal Colon. *Br. J. Pharmacol.* **1994**, *112* (3), 789–794.
- (81) Bingham, S.; King, B. F.; Rushant, B.; Smith, M. I.; Gaster, L.; Sanger, G. J. Antagonism by SB 204070 of 5-HT-Evoked Contractions in the Dog Stomach: An In-Vivo Model of 5-HT₄ Receptor Function. *J. Pharm. Pharmacol.* **1995**, *47* (3), 219–222.
- (82) Yoshida, A.; S.-Yamashita, Y.; Kaibara, M.; Taniyama, K.; Tanaka, N. 5-Hydroxytryptamine Receptors, Especially the 5-HT₄ Receptor, in Guinea Pig Urinary Bladder. *Jpn. J. Pharmacol.* **2002**, *89* (4), 349–355.
- (83) Wardle, K. A.; Bingham, S.; Ellis, E. S.; Gaster, L. M.; Rushant, B.; Smith, M. I.; Sanger, G. J. Selective and Functional 5-Hydroxytryptamine₄ Receptor Antagonism by SB 207266. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *118* (3), 665–670.
- (84) Beattie, D. T.; Smith, J. A. M.; Marquess, D.; Vickery, R. G.; Armstrong, S. R.; Pulido-Rios, T.; McCullough, J. L.; Sandlund, C.; Richardson, C.; Mai, N.; Humphrey, P. P. A. The 5-HT₄ Receptor Agonist, Tegaserod, Is a Potent 5-HT_{2B} Receptor Antagonist in Vitro and in Vivo. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *143* (5), 549–560.
- (85) <https://www.clinicaltrials.gov/>.
- (86) Kjekshus, J. K.; Torp-Pedersen, C.; Gullestad, L.; Køber, L.; Edvardsen, T.; Olsen, I. C.; Sjaastad, I.; Qvigstad, E.; Skomedal, T.; Osnes, J. B.; Levy, F. O. Effect of Piboserod, a 5-HT₄ Serotonin Receptor Antagonist, on Left Ventricular Function in Patients with Symptomatic Heart Failure. *Eur. J. Heart Fail.* **2009**, *11* (8), 771–778.
- (87) Lanthier, C.; Dallemagne, P.; Lecoutey, C.; Claeysen, S.; Rochais, C. Therapeutic Modulators of the Serotonin 5-HT₄ Receptor: A Patent Review (2014-Present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2020**, *30* (7), 495–508.
- (88) Röntgen, W. *Über Eine Neue Art von Strahlen*; **1895**.

- (89) Dubois, P. A History of Scintigraphy. *Irbm* **2009**, *30* (2), 40–46.
- (90) Pallardy, G.; Pallardy, M.-J. *Histoire Abrégée Du Radiodiagnostic et de l'imagerie Médicale*; **2007**.
- (91) Belhocine, T.; Spaepen, K.; Dusart, M.; Castaigne, C.; Muylle, K.; Bourgeois, P.; Bourgeois, D.; Dierickx, L.; Flamen, P. 18FDG PET in Oncology: The Best and the Worst (Review). *Int. J. Oncol.* **2006**, *28* (5), 1249–1261.
- (92) Hoegerle, S.; Althoefer, C.; Ghanem, N.; Koehler, G.; Waller, C. F.; Scheruebl, H.; Moser, E.; Nitzsche, E. Whole-Body 18 F Dopa PET for Detection of Gastrointestinal Carcinoid Tumors. *Radiology* **2001**, *220* (2), 373–380.
- (93) Villemagne, V. L.; Ong, K.; Mulligan, R. S.; Holl, G.; Pejoska, S.; Jones, G.; O'Keefe, G.; Ackerman, U.; Tochon-Danguy, H.; Chan, J. G.; Reiningner, C. B.; Fels, L.; Putz, B.; Rohde, B.; Masters, C. L.; Rowe, C. C. Amyloid Imaging with 18F-Florbetaben in Alzheimer Disease and Other Dementias. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52* (8), 1210–1217.
- (94) <http://www.cea.fr/>.
- (95) Talbot, J.-N.; Petegnief, Y.; de Beco, V.; Nataf, V.; Balard, M. Bases de La TEP et de La TEP/TDM: Machines et Médicaments Radiopharmaceutiques Pour Le Diagnostic Clinique. *Presse Med.* **2006**, *35* (9), 1331–1337.
- (96) <http://www.ordre.pharmacien.fr/>.
- (97) Talbot, J.; Montravers, F.; Grahek, D.; Kerrou, K.; Gutman, F.; Cailleux, N. L'examen TEP Au Fluorodésoxyglucose-(18F) et Son Impact Sur La Décision Thérapeutique En Cancérologie. *Presse Med.* **2006**, *35* (9), 1339–1346.
- (98) Pike, V. W. PET Radiotracers: Crossing the Blood-Brain Barrier and Surviving Metabolism. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30* (8), 431–440.
- (99) Paterson, L. M.; Kornum, B. R.; Nutt, D. J.; Pike, V. W.; Knudsen, G. M. 5-HT Radioligands for Human Brain Imaging with PET and SPECT. *Med. Res. Rev.* **2013**, *33* (1), 54–111.
- (100) Van de Bittner, G. C.; Ricq, E. L.; Hooker, J. M. A Philosophy for CNS Radiotracer Design. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47* (10), 3127–3134.
- (101) Kah, M.; Brown, C. D. LogD: Lipophilicity for Ionisable Compounds. *Chemosphere* **2008**, *72* (10), 1401–1408.

- (102) Waterhouse, R. Determination of Lipophilicity and Its Use as a Predictor of Blood–Brain Barrier Penetration of Molecular Imaging Agents. *Mol. Imaging Biol.* **2003**, *5* (6), 376–389.
- (103) Parent, E. E.; Schuster, D. M. Update on 18 F-Fluciclovine PET for Prostate Cancer Imaging. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (5), 733–739.
- (104) Berrouschot, J.; Barthel, H.; Hesse, S.; Köster, J.; Knapp, W. H.; Schneider, D. Differentiation between Transient Ischemic Attack and Ischemic Stroke within the First Six Hours after Onset of Symptoms by Using 99mTc-ECD- SPECT. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1998**, *18* (8), 921–929.
- (105) Rabiner, E. A.; Messa, C.; Sargent, P. A.; Husted-Kjaer, K.; Montgomery, A.; Lawrence, A. D.; Bench, C. J.; Gunn, R. N.; Cowen, P.; Grasby, P. M. A Database of [11C]WAY-100635 Binding to 5-HT1A Receptors in Normal Male Volunteers: Normative Data and Relationship to Methodological, Demographic, Physiological, and Behavioral Variables. *Neuroimage* **2002**, *15* (3), 620–632.
- (106) Sullivan, G. M.; Ogden, R. T.; Oquendo, M. A.; Kumar, J. S. D.; Simpson, N.; Huang, Y.; Mann, J. J.; Parsey, R. V. Positron Emission Tomography Quantification of Serotonin-1A Receptor Binding in Medication-Free Bipolar Depression. *Biol. Psychiatry* **2009**, *66* (3), 223–230.
- (107) Penttilä, J.; Hirvonen, J.; Tuominen, L.; Lumme, V.; Ilonen, T.; Någren, K.; Hietala, J. Verbal Memory and 5-HT1A Receptors in Healthy Volunteers – A PET Study with [Carbonyl-11C]WAY-100635. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2016**, *26* (3), 570–577.
- (108) Metts, A. V.; Rubin-Falcone, H.; Ogden, R. T.; Lin, X.; Wilner, D. E.; Burke, A. K.; Sublette, M. E.; Oquendo, M. A.; Miller, J. M.; Mann, J. J. Antidepressant Medication Exposure and 5-HT 1A Autoreceptor Binding in Major Depressive Disorder. *Synapse* **2019**, *73* (6), 1–10.
- (109) Pierson, M. E.; Andersson, J.; Nyberg, S.; McCarthy, D. J.; Finnema, S. J.; Varnäs, K.; Takano, A.; Karlsson, P.; Gulyás, B.; Medd, A. M.; Lee, C.-M.; Powell, M. E.; Heys, J. R.; Potts, W.; Seneca, N.; Mrzljak, L.; Farde, L.; Halldin, C. [11C]AZ10419369: A Selective 5-HT1B Receptor Radioligand Suitable for Positron Emission Tomography (PET). Characterization in the Primate Brain. *Neuroimage* **2008**, *41* (3), 1075–1085.
- (110) Maier, D. L.; Sobotka-Briner, C.; Ding, M.; Powell, M. E.; Jiang, Q.; Hill, G.; Heys, J. R.; Elmore, C. S.; Pierson, M. E.; Mrzljak, L. [N-Methyl-3H3]AZ10419369 Binding to the 5-HT 1B Receptor: In Vitro Characterization and in Vivo Receptor Occupancy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *330* (1), 342–351.
- (111) Tiger, M.; Farde, L.; Rück, C.; Varrone, A.; Forsberg, A.; Lindefors, N.; Halldin, C.; Lundberg, J.

- Low Serotonin_{1B} Receptor Binding Potential in the Anterior Cingulate Cortex in Drug-Free Patients with Recurrent Major Depressive Disorder. *Psychiatry Res. Neuroimaging* **2016**, *253*, 36–42.
- (112) Varrone, A.; Svenningsson, P.; Forsberg, A.; Varnäs, K.; Tiger, M.; Nakao, R.; Halldin, C.; Nilsson, L.-G.; Farde, L. Positron Emission Tomography Imaging of 5-Hydroxytryptamine_{1B} Receptors in Parkinson's Disease. *Neurobiol. Aging* **2014**, *35* (4), 867–875.
- (113) Biver, F.; Goldman, S.; Luxen, A.; Monclus, M.; Forestini, M.; Mendlewicz, J.; Lotstra, F. Multicompartmental Study of Fluorine-18 Altanserin Binding to Brain 5HT₂ Receptors in Humans Using Positron Emission Tomography. *Eur. J. Nucl. Med.* **1994**, *21* (9), 937–946.
- (114) Talbot, P. S.; Slifstein, M.; Hwang, D.-R.; Huang, Y.; Scher, E.; Abi-Dargham, A.; Laruelle, M. Extended Characterisation of the Serotonin 2A (5-HT_{2A}) Receptor-Selective PET Radiotracer ¹¹C-MDL100907 in Humans: Quantitative Analysis, Test–Retest Reproducibility, and Vulnerability to Endogenous 5-HT Tone. *Neuroimage* **2012**, *59* (1), 271–285.
- (115) Da Cunha-Bang, S.; Ettrup, A.; Mc Mahon, B.; Skibsted, A. P.; Schain, M.; Lehel, S.; Dyssegaard, A.; Jørgensen, L. M.; Møller, K.; Gillings, N.; Svarer, C.; Knudsen, G. M. Measuring Endogenous Changes in Serotonergic Neurotransmission with [¹¹C]Cimbi-36 Positron Emission Tomography in Humans. *Transl. Psychiatry* **2019**, *9* (1), 134.
- (116) Busatto, G. F.; Pilowsky, L. S.; Costal, D. C.; Mertens, J.; Terrierel, D.; Ell, P. J.; Mulligan, R.; Travis, M. J.; Leysen, J. E.; Lui, D.; Gacinovic, S.; Waddington, W.; Lingford-Hughes, A.; Kerwin, R. W. Initial Evaluation Of ¹²³I-5-I-R91150, a Selective 5-HT_{2A} Ligand for Single-Photon Emission Tomography, in Healthy Human Subjects. *Eur. J. Nucl. Med.* **1997**, *24* (6), 707–707.
- (117) Blanckaert, P. B. M.; Burvenich, I.; Wyffels, L.; De Bruyne, S.; Moerman, L.; De Vos, F. In Vivo Evaluation in Rodents of [¹²³I]-3-I-CO as a Potential SPECT Tracer for the Serotonin 5-HT_{2A} Receptor. *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35* (8), 861–867.
- (118) Radhakrishnan, R.; Nabulsi, N.; Gaiser, E.; Gallezot, J.-D.; Henry, S.; Planeta, B.; Lin, S.; Ropchan, J.; Williams, W.; Morris, E.; D'Souza, D. C.; Huang, Y.; Carson, R. E.; Matuskey, D. Age-Related Change in 5-HT₆ Receptor Availability in Healthy Male Volunteers Measured with ¹¹C-GSK215083 PET. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (9), 1445–1450.
- (119) Emery, S.; Fieux, S.; Vidal, B.; Courault, P.; Bouvard, S.; Tourvieille, C.; Lecker, T.; Billard, T.; Zimmer, L.; Lancelot, S. Preclinical Validation of [¹⁸F]2FNQ1P as a Specific PET Radiotracer of 5-HT₆ Receptors in Rat, Pig, Non-Human Primate and Human Brain Tissue. *Nucl. Med. Biol.*

2020, 82–83, 57–63.

- (120) L 'Estrade, E. T.; Shalgunov, V.; Edgar, F. G.; Strebl-Bantillo, M. G.; Xiong, M.; Crestey, F.; Neelamegam, R.; Dyssegaard, A.; Lehel, S.; Erlandsson, M.; Ohlsson, T.; Hooker, J. M.; Knudsen, G. M.; Herth, M. M.; Hansen, H. D. Radiosynthesis and Preclinical Evaluation of [¹¹C]Cimbi-701 - Towards the Imaging of Cerebral 5-HT₇ Receptors. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2020**, *63* (2), 46–55.
- (121) Lemoine, L.; Andries, J.; Le Bars, D.; Billard, T.; Zimmer, L. Comparison of 4 Radiolabeled Antagonists for Serotonin 5-HT₇ Receptor Neuroimaging: Toward the First PET Radiotracer. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52* (11), 1811–1818.
- (122) Pike, V. W.; Halldin, C.; Nobuhara, K.; Hiltunen, J.; Mulligan, R. S.; Swahn, C.-G.; Karlsson, P.; Olsson, H.; Hume, S. P.; Hirani, E.; Whalley, J.; Pilowsky, L. S.; Larsson, S.; Schnell, P.-O.; Ell, P. J.; Farde, L. Radioiodinated SB 207710 as a Radioligand in Vivo: Imaging of Brain 5-HT₄ Receptors with SPET. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30* (11), 1520–1528.
- (123) Kornum, B. R.; Lind, N. M.; Gillings, N.; Marner, L.; Andersen, F.; Knudsen, G. M. Evaluation of the Novel 5-HT₄ Receptor PET Ligand [¹¹C]SB207145 in the Göttingen Minipig. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2009**, *29* (1), 186–196.
- (124) Marner, L.; Gillings, N.; Comley, R. A.; Baare, W. F. C.; Rabiner, E. A.; Wilson, A. A.; Houle, S.; Hasselbalch, S. G.; Svarer, C.; Gunn, R. N.; Laruelle, M.; Knudsen, G. M. Kinetic Modeling of ¹¹C-SB207145 Binding to 5-HT₄ Receptors in the Human Brain In Vivo. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50* (6), 900–908.
- (125) Marner, L.; Gillings, N.; Madsen, K.; Erritzoe, D.; Baaré, W. F. C.; Svarer, C.; Hasselbalch, S. G.; Knudsen, G. M. Brain Imaging of Serotonin 4 Receptors in Humans with [¹¹C]SB207145-PET. *Neuroimage* **2010**, *50* (3), 855–861.
- (126) Madsen, K.; Marner, L.; Haahr, M.; Gillings, N.; Knudsen, G. M. Mass Dose Effects and in Vivo Affinity in Brain PET Receptor Studies — a Study of Cerebral 5-HT₄ Receptor Binding with [¹¹C]SB207145. *Nucl. Med. Biol.* **2011**, *38* (8), 1085–1091.
- (127) Haahr, M. E.; Fisher, P. M.; Jensen, C. G.; Frokjaer, V. G.; Mahon, B. M.; Madsen, K.; Baaré, W. F. C.; Lehel, S.; Norremolle, A.; Rabiner, E. A.; Knudsen, G. M. Central 5-HT₄ Receptor Binding as Biomarker of Serotonergic Tonus in Humans: A [¹¹C]SB207145 PET Study. *Mol. Psychiatry* **2014**, *19* (4), 427–432.
- (128) Jakobsen, G. R.; Fisher, P. M.; Dyssegaard, A.; McMahon, B.; Holst, K. K.; Lehel, S.; Svarer, C.;

- Jensen, P. S.; Knudsen, G. M.; Frokjaer, V. G. Brain Serotonin 4 Receptor Binding Is Associated with the Cortisol Awakening Response. *Psychoneuroendocrinology* **2016**, *67*, 124–132.
- (129) Deen, M.; Hansen, H. D.; Hougaard, A.; Nørgaard, M.; Eiberg, H.; Lehel, S.; Ashina, M.; Knudsen, G. M. High Brain Serotonin Levels in Migraine between Attacks: A 5-HT₄ Receptor Binding PET Study. *NeuroImage Clin.* **2018**, *18*, 97–102.
- (130) Perfalk, E.; Cunha-Bang, S. da; Holst, K. K.; Keller, S.; Svarer, C.; Knudsen, G. M.; Frokjaer, V. G. Testosterone Levels in Healthy Men Correlate Negatively with Serotonin 4 Receptor Binding. *Psychoneuroendocrinology* **2017**, *81*, 22–28.
- (131) Caillé, F.; Morley, T. J.; Tavares, A. A. S.; Papin, C.; Twardy, N. M.; Alagille, D.; Lee, H. S.; Baldwin, R. M.; Seibyl, J. P.; Barret, O.; Tamagnan, G. D. Synthesis and Biological Evaluation of Positron Emission Tomography Radiotracers Targeting Serotonin 4 Receptors in Brain: [¹⁸F]MNI-698 and [¹⁸F]MNI-699. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (23), 6243–6247.
- (132) Tavares, A. A. S.; Caillé, F.; Barret, O.; Papin, C.; Lee, H.; Morley, T. J.; Fowles, K.; Holden, D.; Seibyl, J. P.; Alagille, D.; Tamagnan, G. D. Whole-Body Biodistribution and Dosimetry Estimates of a Novel Radiotracer for Imaging of Serotonin 4 Receptors in Brain: [¹⁸F]MNI-698. *Nucl. Med. Biol.* **2014**, *41* (5), 432–439.
- (133) Tavares, A. A. S.; Caille, F.; Barret, O.; Papin, C.; Lee, H.; Morley, T. J.; Fowles, K.; Holden, D.; Seibyl, J. P.; Alagille, D.; Tamagnan, G. D. In Vivo Evaluation of 18F-MNI698: An 18F-Labeled Radiotracer for Imaging of Serotonin 4 Receptors in Brain. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55* (5), 858–864.
- (134) Atta-ur-Rahman; Malik, S.; Cun-heng, H.; Clardy, J. Isolation and Structure Determination of Nigellicine, a Novel Alkaloid from the Seeds Of. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26* (23), 2759–2762.
- (135) Liu, Y.-M.; Yang, J.-S.; Liu, Q.-H. A New Alkaloid and Its Artificial Derivative with an Indazole Ring from *Nigella Glandulifera*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **2004**, *52* (4), 454–455.
- (136) Kaumann, A. J.; King, F. D.; Young, R. C. Indazole as an Indole Bioisostere: 5-HT₄ Receptor Antagonism. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2* (5), 419–420.
- (137) Alkorta, I.; Elguero, J. Theoretical Estimation of the Annular Tautomerism of Indazoles. *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, *18* (8), 719–724.
- (138) Sonpavde, G.; Hutson, T. E. Pazopanib: A Novel Multitargeted Tyrosine Kinase Inhibitor. *Curr. Oncol. Rep.* **2007**, *9* (2), 115–119.
- (139) <https://www.has-sante.fr/>.

- (140) Rixe, O.; Bukowski, R. M.; Michaelson, M. D.; Wilding, G.; Hudes, G. R.; Bolte, O.; Motzer, R. J.; Bycott, P.; Liau, K. F.; Freddo, J.; Trask, P. C.; Kim, S.; Rini, B. I. Axitinib Treatment in Patients with Cytokine-Refractory Metastatic Renal-Cell Cancer: A Phase II Study. *Lancet Oncol.* **2007**, *8* (11), 975–984.
- (141) Ardini, E.; Menichincheri, M.; Banfi, P.; Bosotti, R.; De Ponti, C.; Pulci, R.; Ballinari, D.; Ciomei, M.; Texido, G.; Degrassi, A.; Avanzi, N.; Amboldi, N.; Saccardo, M. B.; Casero, D.; Orsini, P.; Bandiera, T.; Mologni, L.; Anderson, D.; Wei, G.; Harris, J.; Vernier, J.-M.; Li, G.; Felder, E.; Donati, D.; Isacchi, A.; Pesenti, E.; Magnaghi, P.; Galvani, A. Entrectinib, a Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor with Activity in Multiple Molecularly Defined Cancer Indications. *Mol. Cancer Ther.* **2016**, *15* (4), 628–639.
- (142) Mirza, M. R.; Monk, B. J.; Herrstedt, J.; Oza, A. M.; Mahner, S.; Redondo, A.; Fabbro, M.; Ledermann, J. A.; Lorusso, D.; Vergote, I.; Ben-Baruch, N. E.; Marth, C.; Mądry, R.; Christensen, R. D.; Berek, J. S.; Dørum, A.; Tinker, A. V.; du Bois, A.; González-Martín, A.; Follana, P.; Benigno, B.; Rosenberg, P.; Gilbert, L.; Rimel, B. J.; Buscema, J.; Balser, J. P.; Agarwal, S.; Matulonis, U. A. Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375* (22), 2154–2164.
- (143) Morrow, G. R.; Hickok, J. T.; Rosenthal, S. N. Progress in Reducing Nausea and Emesis. Comparisons of Ondansetron (Zofran), Granisetron (Kytril), and Tropisetron (Navoban). *Cancer* **1995**, *76* (3), 343–357.
- (144) Di Stefano, A. F. D.; Radicioni, M. M.; Vaccani, A.; Caccia, G.; Focanti, F.; Salvatori, E.; Pelacchi, F.; Picollo, R.; Rosignoli, M. T.; Olivieri, S.; Bovi, G.; Comandini, A. Phase I Study in Healthy Women of a Novel Antimycotic Vaginal Ovule Combining Econazole and Benzydamine. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **2020**, *2020*, 1–11.
- (145) Alcalde, M.; Garcia-Diaz, M.; Najarro, F.; Donoso, M. S.; Cebria, L.; Pascasio, J. M. Hepatotoxicity Due to Lysine Salt of Bendazac. *Scand. J. Gastroenterol.* **1996**, *31* (2), 206–208.
- (146) Nath, K.; Guo, L.; Nancolas, B.; Nelson, D. S.; Shestov, A. A.; Lee, S.-C.; Roman, J.; Zhou, R.; Leeper, D. B.; Halestrap, A. P.; Blair, I. A.; Glickson, J. D. Mechanism of Antineoplastic Activity of Lonidamine. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **2016**, *1866* (2), 151–162.
- (147) Sarker, D.; Ang, J. E.; Baird, R.; Kristeleit, R.; Shah, K.; Moreno, V.; Clarke, P. A.; Raynaud, F. I.; Levy, G.; Ware, J. A.; Mazina, K.; Lin, R.; Wu, J.; Fredrickson, J.; Spoerke, J. M.; Lackner, M. R.; Yan, Y.; Friedman, L. S.; Kaye, S. B.; Derynck, M. K.; Workman, P.; de Bono, J. S. First-in-Human Phase I Study of Pictilisib (GDC-0941), a Potent Pan-Class I Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)

- Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21* (1), 77–86.
- (148) Schmid, P.; Pinder, S. E.; Wheatley, D.; Macaskill, J.; Zammit, C.; Hu, J.; Price, R.; Bundred, N.; Hadad, S.; Shia, A.; Sarker, S.-J.; Lim, L.; Gazinska, P.; Woodman, N.; Korbie, D.; Trau, M.; Mainwaring, P.; Gendreau, S.; Lackner, M. R.; Derynck, M.; Wilson, T. R.; Butler, H.; Earl, G.; Parker, P.; Purushotham, A.; Thompson, A. Phase II Randomized Preoperative Window-of-Opportunity Study of the PI3K Inhibitor Pictilisib Plus Anastrozole Compared With Anastrozole Alone in Patients With Estrogen Receptor–Positive Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34* (17), 1987–1994.
- (149) Schöffski, P.; Cresta, S.; Mayer, I. A.; Wildiers, H.; Damian, S.; Gendreau, S.; Rooney, I.; Morrissey, K. M.; Spoerke, J. M.; Ng, V. W.; Singel, S. M.; Winer, E. A Phase Ib Study of Pictilisib (GDC-0941) in Combination with Paclitaxel, with and without Bevacizumab or Trastuzumab, and with Letrozole in Advanced Breast Cancer. *Breast Cancer Res.* **2018**, *20* (1), 109.
- (150) Sampson, P. B.; Liu, Y.; Forrest, B.; Cumming, G.; Li, S.-W.; Patel, N. K.; Edwards, L.; Laufer, R.; Feher, M.; Ban, F.; Awrey, D. E.; Mao, G.; Plotnikova, O.; Hodgson, R.; Beletskaya, I.; Mason, J. M.; Luo, X.; Nadeem, V.; Wei, X.; Kiarash, R.; Madeira, B.; Huang, P.; Mak, T. W.; Pan, G.; Pauls, H. W. The Discovery of Polo-Like Kinase 4 Inhibitors: Identification of (1*R*,2*S*)-2-(3-((*E*)-4-(((*Cis*)-2,6-Dimethylmorpholino)methyl)styryl)-1*H*-indazol-6-yl)-5'-methoxy Spiro [Cyclopropane-1,3'-indolin]-2'-one (CFI-400945) as a Potent, Orally Active Antitumor. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (1), 147–169.
- (151) Yu, B.; Yu, Z.; Qi, P.-P.; Yu, D.-Q.; Liu, H.-M. Discovery of Orally Active Anticancer Candidate CFI-400945 Derived from Biologically Promising Spirooxindoles: Success and Challenges. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *95*, 35–40.
- (152) Veitch, Z. W.; Cescon, D. W.; Denny, T.; Yonemoto, L.-M.; Fletcher, G.; Brokx, R.; Sampson, P.; Li, S.-W.; Pugh, T. J.; Bruce, J.; Bray, M. R.; Slamon, D. J.; Mak, T. W.; Wainberg, Z. A.; Bedard, P. L. Safety and Tolerability of CFI-400945, a First-in-Class, Selective PLK4 Inhibitor in Advanced Solid Tumours: A Phase 1 Dose-Escalation Trial. *Br. J. Cancer* **2019**, *121* (4), 318–324.
- (153) Ferrero, H.; Solas, M.; Francis, P. T.; Ramirez, M. J. Serotonin 5-HT₆ Receptor Antagonists in Alzheimer's Disease: Therapeutic Rationale and Current Development Status. *CNS Drugs* **2017**, *31* (1), 19–32.
- (154) Rezvani, A. H.; Kholdebarin, E.; Brucato, F. H.; Callahan, P. M.; Lowe, D. A.; Levin, E. D. Effect of R3487/MEM3454, a Novel Nicotinic A7 Receptor Partial Agonist and 5-HT₃ Antagonist on Sustained Attention in Rats. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **2009**, *33* (2),

269–275.

- (155) Haydar, S.; Dunlop, J. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors - Targets for the Development of Drugs to Treat Cognitive Impairment Associated with Schizophrenia and Alzheimers Disease. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10* (2), 144–152.
- (156) Dunkel, P.; Chai, C. L.; Sperlágh, B.; Huleatt, P. B.; Mátyus, P. Clinical Utility of Neuroprotective Agents in Neurodegenerative Diseases: Current Status of Drug Development for Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's Diseases, and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2012**, *21* (9), 1267–1308.
- (157) Marcelin, A.-G.; Charpentier, C.; Jary, A.; Perrier, M.; Margot, N.; Callebaut, C.; Calvez, V.; Descamps, D. Frequency of Capsid Substitutions Associated with GS-6207 in Vitro Resistance in HIV-1 from Antiretroviral-Naive and -Experienced Patients. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, *75* (6), 1588–1590.
- (158) McArthur, C.; Gallazzi, F.; Quinn, T. P.; Singh, K. HIV Capsid Inhibitors Beyond PF74. *Diseases* **2019**, *7* (4), 56.
- (159) Maccone, A.; Tepper, S. J. Calcitonin Gene-Related Peptide: The New Era of Migraine Therapy. *Futur. Drug Discov.* **2019**, *1* (2), FDD14.
- (160) Poduri, R.; Joshi, G.; Jagadeesh, G. Drugs Targeting Various Stages of the SARS-CoV-2 Life Cycle: Exploring Promising Drugs for the Treatment of Covid-19. *Cell. Signal.* **2020**, *74*, 109721.
- (161) Lacava, V.; Pellicanò, V.; Ferrajolo, C.; Cernaro, V.; Visconti, L.; Conti, G.; Buemi, M.; Santoro, D. Novel Avenues for Treating Diabetic Nephropathy: New Investigational Drugs. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2017**, *26* (4), 445–462.
- (162) Tesch, G. H. MCP-1/CCL2: A New Diagnostic Marker and Therapeutic Target for Progressive Renal Injury in Diabetic Nephropathy. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2008**, *294* (4), F697–F701.
- (163) Deshmukh, V.; Hu, H.; Barroga, C.; Bossard, C.; KC, S.; Dellamary, L.; Stewart, J.; Chiu, K.; Ibanez, M.; Pedraza, M.; Seo, T.; Do, L.; Cho, S.; Cahiwat, J.; Tam, B.; Tambiah, J. R. S.; Hood, J.; Lane, N. E.; Yazici, Y. A Small-Molecule Inhibitor of the Wnt Pathway (SM04690) as a Potential Disease Modifying Agent for the Treatment of Osteoarthritis of the Knee. *Osteoarthr. Cartil.* **2018**, *26* (1), 18–27.
- (164) Yuan, X.; Gavriilaki, E.; Thanassi, J. A.; Yang, G.; Baines, A. C.; Podos, S. D.; Huang, Y.; Huang, M.; Brodsky, R. A. Small-Molecule Factor D Inhibitors Selectively Block the Alternative Pathway of

- Complement in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Haematologica* **2017**, *102* (3), 466–475.
- (165) Kikuchi, H.; Satoh, H.; Suzuki, M.; Fukutomi, R.; Ueno, M. 5-HT₄ Receptors Agonists, **1997**. US 005684003A.
- (166) Schaus, J. M.; Thompson, D. C.; Bloomquist, W. E.; Susemichel, A. D.; Calligaro, D. O.; Cohen, M. L. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Potent and Orally Active 5-HT₄ Receptor Antagonists: Indazole and Benzimidazolone Derivatives. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (11), 1943–1955.
- (167) Schaus, J. M.; Cohen, M. L.; Thompson, D. C. 5-HT₄ Agonists and Antagonists, **2000**. US006069152A.
- (168) Becker, D. P.; Flynn, D. L.; Moormann, A. E.; Nosal, R.; Villamil, C. I.; Loeffler, R.; Gullikson, G. W.; Moumami, C.; Yang, D.-C. Pyrrolizidine Esters and Amides as 5-HT₄ Receptor Agonists and Antagonists. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (3), 1125–1139.
- (169) Marquess, D.; Choi, S.-K.; Fatheree, P.; Gendron, R. Indazole-Carboxamide Compounds as 5-HT₄ Receptor Agonists, **2008**. US 7,351,704 B2.
- (170) Choi, S.-K.; Goldblum, A. A.; Long, D. D. Indazole-Carboxamide Compounds as 5-HT₄ Receptors Agonists, **2010**. US007674908B2.
- (171) McKinnell, R. M.; Armstrong, S. R.; Beattie, D. T.; Choi, S.-K.; Fatheree, P. R.; Gendron, R. A. L.; Goldblum, A.; Humphrey, P. P.; Long, D. D.; Marquess, D. G.; Shaw, J. P.; Smith, J. A. M.; Turner, S. D.; Vickery, R. G. A Multivalent Approach to the Design and Discovery of Orally Efficacious 5-HT₄ Receptor Agonists. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (17), 5330–5343.
- (172) Furlotti, G.; Alisi, M. A.; Apicella, C.; Capezzone de Joannon, A.; Cazzolla, N.; Costi, R.; Cuzzucoli Crucitti, G.; Garrone, B.; Iacovo, A.; Magarò, G.; Mangano, G.; Miele, G.; Ombrato, R.; Pescatori, L.; Polenzani, L.; Rosi, F.; Vitiello, M.; Di Santo, R. Discovery and Pharmacological Profile of New 1 H -Indazole-3-Carboxamide and 2 H -Pyrrolo[3,4- c]Quinoline Derivatives as Selective Serotonin 4 Receptor Ligands. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (22), 9446–9466.
- (173) Nirogi, R.; Mohammed, A. R.; Jasti, V. Process for Large Scale Production of 1-Isopropyl-3-{5-[1-(3-Methoxypropyl)Piperidin-4-yl]-[1,3,4]Oxadiazol-2-yl}-1h-Indazole Oxalate., **2016**. US010005711B2.
- (174) Nirogi, R.; Mohammed, A. R.; Yarlagadda, S.; Ravella, S. R.; Shinde, A. K. Heteroaryl Compounds

- as 5-HT₄ Receptors Ligands, **2017**. US009636335B2.
- (175) Nirogi, R.; Rasheed, M. A.; Shinde, A. K.; Gagginapally, R.; Jasti, V. Indazole Compounds as 5-HT₄ Receptors Agonists, **2018**. US009951045B2.
- (176) Rault, S.; Lancelot, J.-C.; Prunier, H.; Robba, M.; Renard, P.; Delagrangé, P.; Pfeiffer, B.; Caignard, D.-H.; Guardiola-Lemaitre, B.; Hamon, M. Novel Selective and Partial Agonists of 5-HT₃ Receptors. Part 1. Synthesis and Biological Evaluation of Piperazinopyrrolothienopyrazines. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (10), 2068–2080.
- (177) Hirschberger, A.; Butt, S.; Lelong, V.; Boulouard, M.; Dumuis, A.; Dauphin, F.; Bureau, R.; Pfeiffer, B.; Renard, P.; Rault, S. New Benzo[*h*][1,6]Naphthyridine and Azepino[3,2-*c*]Quinoline Derivatives as Selective Antagonists of 5-HT₄ Receptors: Binding Profile and Pharmacological Characterization. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (1), 138–147.
- (178) Lemaître, S.; Lepailleur, A.; Bureau, R.; Butt-Gueulle, S.; Lelong-Boulouard, V.; Duchatelle, P.; Boulouard, M.; Dumuis, A.; Daveu, C.; Lezoualc'h, F.; Pfeiffer, B.; Dauphin, F.; Rault, S. Novel Antagonists of Serotonin-4 Receptors: Synthesis and Biological Evaluation of Pyrrolothienopyrazines. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (6), 2607–2622.
- (179) Cailly, T.; Dumas, N.; Millet, P.; Lemaître, S.; Fabis, F.; Charnay, Y.; Rault, S. Synthesis and Characterization of a Iodine-125-Labeled Pyrrolo[1,2-*a*]Thieno[3,2-*e*]Pyrazine and Evaluation as a Potential 5-HT₄R SPECT Tracer. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (11), 5465–5467.
- (180) Dubost, E.; Dumas, N.; Fossey, C.; Magnelli, R.; Butt-Gueulle, S.; Ballandonne, C.; Caignard, D. H.; Dulin, F.; Sopkova de-Oliveira Santos, J.; Millet, P.; Charnay, Y.; Rault, S.; Cailly, T.; Fabis, F. Synthesis and Structure–Affinity Relationships of Selective High-Affinity 5-HT₄ Receptor Antagonists: Application to the Design of New Potential Single Photon Emission Computed Tomography Tracers. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (22), 9693–9707.
- (181) Fresneau, N.; Dumas, N.; Tournier, B. B.; Fossey, C.; Ballandonne, C.; Lesnard, A.; Millet, P.; Charnay, Y.; Cailly, T.; Bouillon, J.-P.; Fabis, F. Design of a Serotonin 4 Receptor Radiotracer with Decreased Lipophilicity for Single Photon Emission Computed Tomography. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *94*, 386–396.
- (182) Babin, V.; Tournier, B. B.; Davis, A.; Dubost, E.; Pigrée, G.; Lohier, J.-F.; Reboul, V.; Cailly, T.; Bouillon, J.-P.; Millet, P.; Fabis, F. Design of Iodinated Radioligands for SPECT Imaging of Central Human 5-HT₄R Using a Ligand Lipophilicity Efficiency Approach. *Bioorg. Chem.* **2020**, *96*, 103582.

- (183) Lam, B. V. Synthèse de Ligands Iodés En Série Indazole : Application En Imagerie TEMP Des Récepteurs 5-HT 4 Centraux, **2015**.
- (184) Krasovskiy, A.; Krasovskaya, V.; Knochel, P. Mixed Mg/Li Amides of the Type R₂NMgCl·LiCl as Highly Efficient Bases for the Regioselective Generation of Functionalized Aryl and Heteroaryl Magnesium Compounds. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2006**, *45* (18), 2958–2961.
- (185) Schad, P. Synthese Ringförmiger Verbindungen Aus Benzolderivaten Mit Offenen Seitenketten. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1893**, *26* (1), 216–224.
- (186) Buu-Hoi, N. P.; Hoeffinger, J. P.; Jacquignon, P. Indazole-3-Carboxylic Acids and Their Derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* **1964**, *1* (5), 239–241.
- (187) Ferrari, M.; Ripa, A.; Ripa, G.; Sisti, M. An Improved Synthesis of Indazole-3-Carboxylic Acid. *J. Heterocycl. Chem.* **1989**, *26* (2), 531–532.
- (188) Sandmeyer, T. Über Isonitrosoacetanilide Und Deren Kondensation Zu Isatinen. *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2* (1), 234–242.
- (189) Kuang, S.-M.; Zhang, P. Methods for the Preparations of Indazole-3-Carboxylic Acid and N-(S)-Azabicyclo[2.2.2]Oct-3-Yl-1H-Indazole-3-Carboxamide Salt, **2011**. US 20110172428A1.
- (190) Jacobson, P.; Huber, L. Über Bildung von Indazolkörpern Aus Orthomethylierten Anilinbasen. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1908**, *41* (1), 660–671.
- (191) Borchardt, A. J.; Kania, R. S.; Palmer, C. L. Indazole Compounds and Pharmaceutical Compositions for Inhibiting Protein Kinases and Methodes for Their Use, **2004**. US 20040192735A1.
- (192) Schumacher, R.; Danca, M. D.; Ma, J.; Herbert, B.; Nguyen, T. M.; Xie, W.; Tehim, A. Indazoles, Benzothiazoles, Benzoisothiazoles, Benzisoxazoles, Pyrazolopyridines, Isothiazolopyridines, and Preparation and Uses Thereof, **2007**. WO 2007/038367A1.
- (193) Ryono, D. E.; Cheng, P. T. W.; Bolton, S. A.; Chen, S.; Shi, Y.; Meng, W.; Tino, J. A.; Sulsky, R. B. Novel Glucokinase Activators and Methods of Using Same, **2012**. US 20120142636A1.
- (194) Georg, I. G.; Tash, J. S.; Chakrasali, R.; Jakkaraj, S. R.; Roby, K. Lonidamine Analogues for Fertility Management, **2013**. US 008377958B2
- (195) Jin, T.; Yamamoto, Y. An Efficient, Facile, and General Synthesis of 1H-Indazoles by 1,3-Dipolar Cycloaddition of Arynes with Diazomethane Derivatives. *Angew. Chemie* **2007**, *119* (18), 3387–3389.

- (196) Liu, Z.; Shi, F.; Martinez, P. D. G.; Raminelli, C.; Larock, R. C. Synthesis of Indazoles by the [3+2] Cycloaddition of Diazo Compounds with Arynes and Subsequent Acyl Migration. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (1), 219–226.
- (197) Lam, B. V.; Berhault, Y.; Stiebing, S.; Fossey, C.; Cailly, T.; Collot, V.; Fabis, F. Iodoindazoles with Selective Magnesium at Position 3: A Route to Highly Functionalized Indazoles. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22* (13), 4440–4446.
- (198) Gérard, A.-L.; Bouillon, A.; Mahatsekake, C.; Collot, V.; Rault, S. Efficient and Simple Synthesis of 3-Aryl-1H-Pyrazoles. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (27), 4665–4669.
- (199) Slade, D. J.; Pelz, N. F.; Bodnar, W.; Lampe, J. W.; Watson, P. S. Indazoles: Regioselective Protection and Subsequent Amine Coupling Reactions. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (16), 6331–6334.
- (200) Haag, B.; Mosrin, M.; Ila, H.; Malakhov, V.; Knochel, P. Regio- and Chemoselective Metalation of Arenes and Heteroarenes Using Hindered Metal Amide Bases. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2011**, *50* (42), 9794–9824.
- (201) Hunt, K. W.; Moreno, D. A.; Suiter, N.; Clark, C. T. Selective Synthesis of 1-Functionalized-Alkyl-1H-Indazoles. *Org. Lett.* **2009**, *11* (21), 5054–5057.
- (202) Marquess, D.; Choi, S.-K.; Fatheree, P. R.; Gendron, R.; Goldblum, A. A.; Long, D. D., **2005**. WO2005080389A1.
- (203) Yang, X.; Li, F.; Konze, K. D.; Meslamani, J.; Ma, A.; Brown, P. J.; Zhou, M.-M.; Arrowsmith, C. H.; Kaniskan, H. Ü.; Vedadi, M.; Jin, J. Structure–Activity Relationship Studies for Enhancer of Zeste Homologue 2 (EZH2) and Enhancer of Zeste Homologue 1 (EZH1) Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (16), 7617–7633.
- (204) Angapelly, S.; Sri Ramya, P. V.; Angeli, A.; Supuran, C. T.; Arifuddin, M. Sulfocoumarin-, Coumarin-, 4-Sulfamoylphenyl-Bearing Indazole-3-Carboxamide Hybrids: Synthesis and Selective Inhibition of Tumor-Associated Carbonic Anhydrase Isozymes IX and XII. *ChemMedChem* **2017**, *12* (19), 1578–1584.
- (205) Mitsunobu, O.; Wada, M.; Sano, T. Stereospecific and Stereoselective Reactions. I. Preparation of Amines from Alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94* (2), 679–680.
- (206) Procopiou, P. A.; Barrett, J. W.; Barton, N. P.; Begg, M.; Clapham, D.; Copley, R. C. B.; Ford, A. J.; Graves, R. H.; Hall, D. A.; Hancock, A. P.; Hill, A. P.; Hobbs, H.; Hodgson, S. T.; Jumeaux, C.; Lacroix, Y. M. L.; Miah, A. H.; Morriss, K. M. L.; Needham, D.; Sheriff, E. B.; Slack, R. J.; Smith, C.

- E.; Sollis, S. L.; Staton, H. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Indazole Arylsulfonamides as Allosteric CC-Chemokine Receptor 4 (CCR4) Antagonists. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (5), 1946–1960.
- (207) Dunetz, J. R.; Magano, J.; Weisenburger, G. A. Large-Scale Applications of Amide Coupling Reagents for the Synthesis of Pharmaceuticals. *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20* (2), 140–177.
- (208) Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. Protection for the Amino Group. In *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, **2006**; pp 696–926.
- (209) Choudhary, A.; Raines, R. T. An Evaluation of Peptide-Bond Isosteres. *ChemBioChem* **2011**, *12* (12), 1801–1807.
- (210) Lalut, J.; Tournier, B. B.; Cailly, T.; Lecoutey, C.; Corvaisier, S.; Davis, A.; Ballandonne, C.; Since, M.; Millet, P.; Fabis, F.; Dallemagne, P.; Rochais, C. Synthesis and Evaluation of Novel Serotonin 4 Receptor Radiotracers for Single Photon Emission Computed Tomography. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *116*, 90–101.
- (211) Crestey, F.; Stiebing, S.; Legay, R.; Collot, V.; Rault, S. Design and Synthesis of a New Indazole Library: Direct Conversion of N-Methoxy-N-Methylamides (Weinreb Amides) to 3-Keto and 3-Formylindazoles. *Tetrahedron* **2007**, *63* (2), 419–428.
- (212) Mancuso, A. J.; Swern, D. Activated Dimethyl Sulfoxide: Usefull Reagents for Synthesis. *Synthesis (Stuttg)*. **1981**, *3*, 165–185.
- (213) Mancuso, A. J.; Huang, S.-L.; Swern, D. Oxidation of Long-Chain and Related Alcohols to Carbonyls by Dimethyl Sulfoxide "Activated" by Oxalyl Chloride. *J. Org. Chem.* **1978**, *43* (12), 2480–2482.
- (214) Horner, L.; Hoffmann, H.; Wippel, H. G.; Klahre, G. Phosphororganische Verbindungen, XX. Phosphinoxyde Als Olefinierungsreagenzien. *Chem. Ber.* **1959**, *92* (10), 2499–2505.
- (215) Wadsworth, W. S.; Emmons, W. D. The Utility of Phosphonate Carbanions in Olefin Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83* (7), 1733–1738.
- (216) Bonandi, E.; Christodoulou, M. S.; Fumagalli, G.; Perdicchia, D.; Rastelli, G.; Passarella, D. The 1,2,3-Triazole Ring as a Bioisostere in Medicinal Chemistry. *Drug Discov. Today* **2017**, *22* (10), 1572–1581.
- (217) Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. Click Chemistry Reactions in Medicinal Chemistry : Applications of the 1 , 3-Dipolar Cycloaddition Between

- Azides and Alkynes. *Med. Res. Rev.* **2007**, *28* (2), 278–308.
- (218) Valverde, I. E.; Bauman, A.; Kluba, C. A.; Vomstein, S.; Walter, M. A.; Mindt, T. L. 1,2,3-Triazoles as Amide Bond Mimics: Triazole Scan Yields Protease-Resistant Peptidomimetics for Tumor Targeting. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52* (34), 8957–8960.
- (219) Gil, M.; Arévalo, M.; López, Ó. Click Chemistry - What's in a Name? Triazole Synthesis and Beyond. *Synthesis (Stuttg.)* **2007**, *2007* (11), 1589–1620.
- (220) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596–2599.
- (221) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (1), 210–216.
- (222) Chinchilla, R.; Nájera, C. The Sonogashira Reaction: A Booming Methodology in Synthetic Organic Chemistry. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (3), 874–922.
- (223) Schmidt, A.; Beutler, A.; Snovydovych, B. Recent Advances in the Chemistry of Indazoles. *European J. Org. Chem.* **2008**, No. 24, 4073–4095.
- (224) Meanwell, N. A. Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosteres in Drug Design. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (8), 2529–2591.
- (225) Brodney, M. A.; Johnson, D. E.; Sawant-Basak, A.; Coffman, K. J.; Drummond, E. M.; Hudson, E. L.; Fisher, K. E.; Noguchi, H.; Waizumi, N.; McDowell, L. L.; Papanikolaou, A.; Pettersen, B. A.; Schmidt, A. W.; Tseng, E.; Stutzman-Engwall, K.; Rubitski, D. M.; Vanase-Frawley, M. A.; Grimwood, S. Identification of Multiple 5-HT₄ Partial Agonist Clinical Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (21), 9240–9254.
- (226) Gensini, M.; Altamura, M.; Dimoulas, T.; Fedi, V.; Giannotti, D.; Giuliani, S.; Guidi, A.; Harmat, N. J. â. S.; Meini, S.; Nannicini, R.; Pasqui, F.; Tramontana, M.; Triolo, A.; Maggi, C. A. Modulation on C- and N-Terminal Moieties of a Series of Potent and Selective Linear Tachykinin NK₂ Receptor Antagonists. *ChemMedChem* **2010**, *5* (1), 65–78.
- (227) Long, D. D.; Armstrong, S. R.; Beattie, D. T.; Choi, S.-K.; Fatheree, P. R.; Gendron, R. A. L.; Goldblum, A. A.; Humphrey, P. P.; Marquess, D. G.; Shaw, J.-P.; Smith, J. A. M.; Derek Turner, S.; Vickery, R. G. Discovery, Oral Pharmacokinetics and in Vivo Efficacy of a Highly Selective 5-HT₄

- Receptor Agonist: Clinical Compound TD-2749. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (14), 4849–4853.
- (228) McKinnell, R. M.; Armstrong, S. R.; Beattie, D. T.; Fatheree, P. R.; Long, D. D.; Marquess, D. G.; Shaw, J.-P.; Vickery, R. G. Discovery of TD-8954, a Clinical Stage 5-HT₄ Receptor Agonist with Gastrointestinal Prokinetic Properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (14), 4210–4215.
- (229) Lanthier, C.; Payan, H.; Liparulo, I.; Hatat, B.; Lecoutey, C.; Since, M.; Davis, A.; Bergamini, C.; Claeysen, S.; Dallemagne, P.; Bolognesi, M.-L.; Rochais, C. Novel Multi Target-Directed Ligands Targeting 5-HT₄ Receptors with in Cellulo Antioxidant Properties as Promising Leads in Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *182*, 111596.
- (230) Grossman, C. J.; Kilpatrick, G. J.; Bunce, K. T. Development of a Radioligand Binding Assay for 5-HT₄ Receptors in Guinea-pig and Rat Brain. *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *109* (3), 618–624.
- (231) Hopkins, A. L.; Keserü, G. M.; Leeson, P. D.; Rees, D. C.; Reynolds, C. H. The Role of Ligand Efficiency Metrics in Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13* (2), 105–121.
- (232) Leeson, P. D.; Springthorpe, B. The Influence of Drug-like Concepts on Decision-Making in Medicinal Chemistry. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6* (11), 881–890.
- (233) Young, R. J.; Green, D. V. S.; Luscombe, C. N.; Hill, A. P. Getting Physical in Drug Discovery II: The Impact of Chromatographic Hydrophobicity Measurements and Aromaticity. *Drug Discov. Today* **2011**, *16* (17–18), 822–830.
- (234) Palumbo, P.; Picchini, U.; Beck, B.; Van Gelder, J.; Delbar, N.; DeGaetano, A. A General Approach to the Apparent Permeability Index. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* **2008**, *35* (2), 235–248.
- (235) Mensch, J.; Melis, A.; Mackie, C.; Verreck, G.; Brewster, M. E.; Augustijns, P. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Evaluation of Various PAMPA Models to Identify the Most Discriminating Method for the Prediction of BBB Permeability. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, *74* (3), 495–502.
- (236) Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (7), 1007–1010.
- (237) Nickles, R. J.; Gatley, S. J.; Votaw, J. R.; Kornguth, M. L. Production of Reactive Fluorine-18. *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part A. Appl. Radiat. Isot.* **1986**, *37* (8), 649–661.
- (238) Casella, V.; Wolf, A. P.; Fowler, J. S.; MacGregor, R. R.; Ruth, T. J. Anhydrous F-18 Labeled

- Elemental Fluorine for Radiopharmaceutical Preparation. *J. Nucl. Med.* **1980**, *2*, 750–757.
- (239) Coenen, H. H. Fluorine-18 Labeling Methods: Features and Possibilities of Basic Reactions. In *PET Chemistry*; Springer Berlin Heidelberg, **2007**; pp 15–50.
- (240) Teare, H.; Robins, E. G.; Årstad, E.; Luthra, S. K.; Gouverneur, V. Synthesis and Reactivity of [18 F]-N-Fluorobenzenesulfonimide. *Chem. Commun.* **2007**, No. 23, 2330–2332.
- (241) Gu, Y.; Huang, D.; Liu, Z.; Huang, J.; Zeng, W. Labeling Strategies with F-18 for Positron Emission Tomography Imaging. *Med. Chem. (Los. Angeles)*. **2011**, *7* (5), 334–344.
- (242) Miller, P. W.; Long, N. J.; Vilar, R.; Gee, A. D. Synthesis of 11 C, 18 F, 15 O, and 13 N Radiolabels for Positron Emission Tomography. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, *47* (47), 8998–9033.
- (243) Dolle, F.; Demphel, S.; Hinnen, F.; Fournier, D.; Vaufrey, F.; Crouzel, C. 6-[18F]Fluoro-L-DOPA by Radiofluorodestannylation: A Short and Simple Synthesis of a New Labelling Precursor. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1998**, *41* (2), 105–114.
- (244) Hamacher, K.; Coenen, H. H.; Stoecklin, G. Efficient Stereospecific Synthesis of No-Carrier-Added 2-[18F]-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose Using Aminopolyether Supported Nucleophilic Substitution. *J. Nucl. Med.* **1986**, No. 2, 235–238.
- (245) Lee, S. J.; Oh, S. J.; Chi, D. Y.; Kang, S. H.; Kil, H. S.; Kim, J. S.; Moon, D. H. One-Step High-Radiochemical-Yield Synthesis of [18F]FP-CIT Using a Protic Solvent System. *Nucl. Med. Biol.* **2007**, *34* (4), 345–351.
- (246) Vaulina, D.; Nasirzadeh, M.; Gomzina, N. Automated Radiosynthesis and Purification of [18F]Flumazenil with Solid Phase Extraction. *Appl. Radiat. Isot.* **2018**, *135*, 110–114.
- (247) Windhorst, A. D.; Klok, R. P.; Koolen, C. L.; Visser, G. W. M.; Herscheid, J. D. M. Labeling of [18F]Flumazenil via Instant Fluorination, a New Nucleophilic Fluorination Method. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2001**, *44* (S1), S930–S932.
- (248) Moon, B. S.; Kil, H. S.; Park, J. H.; Kim, J. S.; Park, J.; Chi, D. Y.; Lee, B. C.; Kim, S. E. Facile Aromatic Radiofluorination of [18 F]Flumazenil from Diaryliodonium Salts with Evaluation of Their Stability and Selectivity. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (24), 8346–8355.
- (249) Tredwell, M.; Preshlock, S. M.; Taylor, N. J.; Gruber, S.; Huiban, M.; Passchier, J.; Mercier, J.; Génicot, C.; Gouverneur, V. A General Copper-Mediated Nucleophilic 18F Fluorination of Arenes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53* (30), 7751–7755.
- (250) Preshlock, S.; Calderwood, S.; Verhoog, S.; Tredwell, M.; Huiban, M.; Hienzsch, A.; Gruber, S.;

- Wilson, T. C.; Taylor, N. J.; Cailly, T.; Schedler, M.; Collier, T. L.; Passchier, J.; Smits, R.; Mollitor, J.; Hoepping, A.; Mueller, M.; Genicot, C.; Mercier, J.; Gouverneur, V. Enhanced Copper-Mediated 18 F-Fluorination of Aryl Boronic Esters Provides Eight Radiotracers for PET Applications. *Chem. Commun.* **2016**, 52 (54), 8361–8364.
- (251) Crestey, F.; Lohou, E.; Stiebing, S.; Collot, V.; Rault, S. Protected Indazole Boronic Acid Pinacolyl Esters: Facile Syntheses and Studies of Reactivities in Suzuki-Miyaura Cross-Coupling and Hydroxydeboronation Reactions. *Synlett* **2009**, 4, 615–619.
- (252) Boulouard, M.; Schumann-Bard, P.; Butt-Gueulle, S.; Lohou, E.; Stiebing, S.; Collot, V.; Rault, S. 4-Substituted Indazoles as New Inhibitors of Neuronal Nitric Oxide Synthase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17 (11), 3177–3180.
- (253) Griбанov, P. S.; Golenko, Y. D.; Topchiy, M. A.; Minaeva, L. I.; Asachenko, A. F.; Nechaev, M. S. Stannylation of Aryl Halides, Stille Cross-Coupling, and One-Pot, Two-Step Stannylation/Stille Cross-Coupling Reactions under Solvent-Free Conditions. *European J. Org. Chem.* **2018**, 2018 (1), 120–125.
- (254) Farina, V.; Krishnamurthy, V.; Scott, W. J. The Stille Reaction. *Organic Reactions.* **1997**, pp 1–652.
- (255) Brown, D.; Grigg, G.; Iwai, Y.; McAndrew, K.; Nagamatsu, T.; Heeswyck, R. Purine Analogues as Amplifiers of Phleomycin. V. Thioethers of Several Heterocyclic Systems with One or Two Rings. *Aust. J. Chem.* **1979**, 32 (12), 2713–2726.
- (256) Yin, J.; Pidgeon, C. A Simple and Efficient Method for Preparation of Unsymmetrical Sulfides. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38 (34), 5953–5954.
- (257) Bepalov, A. Y.; Gorchakova, T. L.; Ivanov, A. Y.; Kuznetsov, M. A.; Kuznetsova, L. M.; Pankova, A. S.; Prokopenko, L. I.; Avdontceva, M. S. Alkylation and Aminomethylation of 1,3-Dihydro-2H-Benzimidazole-2-Thione. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2015**, 50 (11), 1547–1558.
- (258) Chen, X.; Hao, X. S.; Goodhue, C. E.; Yu, J. Q. Cu(II)-Catalyzed Functionalizations of Aryl C-H Bonds Using O₂ as an Oxidant. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (21), 6790–6791.
- (259) Schopfer, U.; Schlapbach, A. A General Palladium-Catalysed Synthesis of Aromatic and Heteroaromatic Thioethers. *Tetrahedron* **2001**, 57 (15), 3069–3073.
- (260) Cai, L.; Cuevas, J.; Peng, Y.-Y.; Pike, V. W. Rapid Palladium-Catalyzed Cross-Coupling in the Synthesis of Aryl Thioethers under Microwave Conditions. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47 (26),

4449–4452.

- (261) Liu, K. G.; Robichaud, A. J.; Greenfield, A. A.; Lo, J. R.; Grosanu, C.; Mattes, J. F.; Cai, Y.; Zhang, G. M.; Zhang, J. Y.; Kowal, D. M.; Smith, D. L.; Di, L.; Kerns, E. H.; Schechter, L. E.; Comery, T. A. Identification of 3-Sulfonylindazole Derivatives as Potent and Selective 5-HT₆ Antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19* (1), 650–662.
- (262) Kwong, F. Y.; Buchwald, S. L. A General, Efficient, and Inexpensive Catalyst System for the Coupling of Aryl Iodides and Thiols. *Org. Lett.* **2002**, *4* (20), 3517–3520.
- (263) Ganley, J. M.; Yeung, C. S. Unprotected Indazoles Are Resilient to Ring-Opening Isomerization: A Case Study on Catalytic C-S Couplings in the Presence of Strong Base. *J. Org. Chem.* **2017**, *82* (24), 13557–13562.
- (264) Zhu, J.; Chen, Y.; Lin, F.; Wang, B.; Chen, Z.; Liu, L. NiSO₄-Catalyzed C–H Activation/C–S Cross-Coupling of 1,2,3-Triazole N-Oxides with Thiols. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (12), 3711–3720.
- (265) Chang, J.-R.; Chang, S.-L.; Lin, T.-B. γ -Alumina-Supported Pt Catalysts for Aromatics Reduction: A Structural Investigation of Sulfur Poisoning Catalyst Deactivation. *J. Catal.* **1997**, *169* (1), 338–346.
- (266) Paál, Z.; Matusek, K.; Muhler, M. Sulfur Adsorbed on Pt Catalyst: Its Chemical State and Effect on Catalytic Properties as Studied by Electron Spectroscopy and n-Hexane Test Reactions. *Appl. Catal. A Gen.* **1997**, *149* (1), 113–132.
- (267) Nasri, N. S.; Jones, J. M.; Dupont, V. A.; Williams, A. A Comparative Study of Sulfur Poisoning and Regeneration of Precious-Metals Catalysts. *Energy and Fuels* **1998**, *12* (6), 1130–1134.
- (268) Reeves, J. T.; Camara, K.; Han, Z. S.; Xu, Y.; Lee, H.; Busacca, C. A.; Senanayake, C. H. The Reaction of Grignard Reagents with Bunte Salts: A Thiol-Free Synthesis of Sulfides. *Org. Lett.* **2014**, *16* (4), 1196–1199.
- (269) Distler, H. The Chemistry of Bunte Salts. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1967**, *6* (6), 544–553.
- (270) Katritzky, A. R.; Lue, P.; Akutagawa, K. Formaldehyde: A Reagent for Simultaneous Protection of Heterocyclic NH and Activation of Alternative Locations to Electrophilic Attack. Part II. A New Synthetic Method for the 5(3)-Substitution of N-Unsubstituted Pyrazoles. *Tetrahedron* **1989**, *45* (13), 4253–4262.
- (271) Hanamoto, T.; Hashimoto, E.; Miura, M.; Furuno, H.; Inanaga, J. Reaction of N-Methyl-5-Tributylstannyl-4-Fluoro-1H-Pyrazole and Its Application to N-Methyl-Chromeno[2,3-d

-]Pyrazol-9-One Synthesis. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (12), 4736–4739.
- (272) Despotopoulou, C.; Klier, L.; Knochel, P. Synthesis of Fully Substituted Pyrazoles via Regio- and Chemoselective Metalations. *Org. Lett.* **2009**, *11* (15), 3326–3329.
- (273) Joo, J. M.; Guo, P.; Sames, D. C-H Bonds as Ubiquitous Functionality: Preparation of Multiple Regioisomers of Arylated 1,2,4-Triazoles via C-H Arylation. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (2), 738–743.
- (274) Hu, E.; Andrews, K.; Chmait, S.; Zhao, X.; Davis, C.; Miller, S.; Hill Della Puppa, G.; Dovlatyan, M.; Chen, H.; Lester-Zeiner, D.; Able, J.; Biorn, C.; Ma, J.; Shi, J.; Treanor, J.; Allen, J. R. Discovery of Novel Imidazo[4,5- b]Pyridines as Potent and Selective Inhibitors of Phosphodiesterase 10A (PDE10A). *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (6), 700–705.
- (275) Nagasawa, N.; Kumashiro, I.; Takenishi, T. Tetrahydro-2-Pyranyl Derivatives of Purines. *J. Org. Chem.* **1966**, *31* (8), 2685–2688.
- (276) Wang, Y.; Vaismaa, M. J. P.; Rissanen, K.; Franzén, R. N1-Functionalized Indole-Phosphane Oxazoline (IndPHOX) Ligands in Asymmetric Allylic Substitution Reactions. *European J. Org. Chem.* **2012**, *2012* (8), 1569–1576.
- (277) Lee, T. D.; Pickering, M. V; Daves, G. D. Reaction of 3-[2'-Tetrahydropyranyl(Furanyl)Thio]Indole with Silver Ion. *J. Org. Chem.* **1974**, *39* (8), 1106–1109.
- (278) Rault, S.; Primas, N.; Bouillon, A.; Lancelot, J.-C.; Santos, J.; Lohier, J.-F. A New Methodology to Prepare 2-Halogenoimidazoles via a N-THP Protection. *Lett. Org. Chem.* **2008**, *5* (1), 8–10.
- (279) Markovic, T.; Murray, P. R. D.; Rocke, B. N.; Shavnya, A.; Blakemore, D. C.; Willis, M. C. Heterocyclic Allylsulfones as Latent Heteroaryl Nucleophiles in Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (46), 15916–15923.
- (280) Peruncheralathan, S.; Khan, T. A.; Ila, H.; Junjappa, H. Regioselective Synthesis of 1-Aryl-3,4-Substituted/Annulated-5-(Methylthio)Pyrazoles and 1-Aryl-3-(Methylthio)-4,5-Substituted/Annulated Pyrazoles. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (24), 10030–10035.
- (281) McLaughlin, M.; Marcantonio, K.; Chen, G. Y.; Davies, I. W. A Simple, Modular Method for the Synthesis of 3,4,5-Trisubstituted Pyrazoles. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (11), 4309–4312.
- (282) Elokdah, H. M.; Greenfield, A. A.; Liu, K.; McDevitt, R. E.; McFarlane, G. R.; Grosanu, C.; Lo, J. R.; Li, Y.; Robichaud, A. J.; Bernotas, R. C. Substituted-3-Sulfonylindazole Derivatives as 5-Hydroxytryptamine-6 Ligands, **2007**. US20070037802A1

Synthèse de ligands iodés et fluorés en série indazole : application en imagerie des récepteurs 5-HT₄ centraux

Depuis leur découverte en 1988, les récepteurs sérotoninergiques de type 4 (5-HT₄R) sont devenus une cible de choix dans le développement de nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques. En effet, leur implication dans certains désordres neuropsychiatriques comme la dépression ou l'anorexie et dans certaines pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (MA) ont poussé de nombreuses équipes de recherche à les caractériser *via* le développement de radiotraceurs affins et spécifiques de cette cible. Actuellement, aucun d'entre eux n'est utilisable chez l'homme limitant les perspectives d'un diagnostic précoce de ces pathologies.

Ainsi, nous avons décidé de développer une nouvelle série de ligands affins des 5-HT₄R en série fluoroindazole avec pour objectif final de mettre au point un radiotracer utilisable en imagerie TEP (Tomodensitométrie par Emission de Positrons). Nous avons établi une nouvelle voie convergente et efficiente de synthèse nous permettant d'accéder, en un minimum d'étape, à plus d'une vingtaine de nouveaux ligands affins pour les 5-HT₄R. Parmi eux, nous avons sélectionné trois composés d'intérêt « lead » en vue d'un radiomarquage au fluor-18. Cette sélection est issue d'une approche multiparamétrique mettant en évidence les propriétés remarquables des composés les plus prometteurs.

Actuellement, le **MR35806** est en cours de radiomarquage au CEA, nous offrant un espoir d'obtenir le premier radiotracer affiné et sélectif vis-à-vis des 5-HT₄R utilisable en imagerie TEP.

Mots clés : Récepteur sérotoninergique – Radiotracer – Imagerie médicale – Indazole – Tomodensitométrie par émission de positrons

Synthesis of iodinated and fluorinated ligands in indazole series: application in imaging of 5-HT₄ receptors

Since their discovery in 1989, type 4 serotonin receptors (5-HT₄R) have become a target of choice in the development of new diagnostic and therapeutic tools. Indeed, their involvement in neuropsychiatric disorders such as depression or anorexia and in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD) have motivated many research teams to characterize them via the development of radiotracers that are potent and specific toward this target.

Currently, none of them can be used in humans, limiting the prospects for early diagnosis of these pathologies. Thus, we decided to develop a new series of ligands with affinity toward 5-HT₄R on the fluoroindazole series with the final objective to develop a new radiotracer that can be used in PET imaging (Positron Emission Tomodensitometry). We have established a new convergent and efficient synthetic pathway allowing us to access, in a minimum of steps, more than twenty new ligands with nanomolar affinity for 5-HT₄R. Among them, we selected three compounds of interest as "lead" for radiolabelling with fluorine-18. This selection is the result of a multiparametric approach highlighting the remarkable properties of the best compounds.

Currently, **MR35806** is in the process for radiolabelling, giving us hope of obtaining the first potent and selective 5-HT₄R radiotracer for PET imaging.

Keywords: Serotonin receptor – Radiotracer – Medical imaging – indazole ring – TEP imaging