



**HAL**  
open science

# Ligands Photo-Actifs pour l'imagerie de fluorescence du VEGFr

Margot Boujut

► **To cite this version:**

Margot Boujut. Ligands Photo-Actifs pour l'imagerie de fluorescence du VEGFr. Chimie organique. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMR063 . tel-03841227

**HAL Id: tel-03841227**

**<https://theses.hal.science/tel-03841227>**

Submitted on 7 Nov 2022

**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 Chimie

Préparé au sein de l'Université de Rouen Normandie

### Ligands Photo-Actifs pour l'Imagerie de Fluorescence du VEGFr

Présentée et soutenue par  
**Margot BOUJUT**

Thèse soutenue publiquement le 6 novembre 2020  
devant le jury composé de

Mme Chantal ANDRAUD	Directrice de Recherche CNRS, ENS Lyon	Rapporteure
Mme Laurence GRIMAUD	Directrice de Recherche CNRS, ENS Paris	Rapporteure
M. Pascal BONNET	Professeur, Université d'Orléans	Examineur
Mme Valérie COLLOT	Professeure, Université de Caen	Examinatrice
M. Xavier FRANCK	Directeur de Recherche CNRS, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
M. Thibault GALLAVARDIN	Chargé de Recherche CNRS, Université de Rouen Normandie	Co-Encadrant de thèse
M. Cédric SCHNEIDER	Maître de Conférences, Université de Rouen Normandie	Membre invité

Thèse dirigée par le Dr Xavier FRANCK, laboratoire COBRA (UMR 6014)







*« Mieux vaut balbutier des vérités naissantes que d'affirmer avec facilité des vérités conquises par nos aînés. »*

Andry-Farcy, 1921



Je remercie sincèrement les Dr Chantal Andraud (directrice de recherche, laboratoire de chimie, ENS Lyon), Dr Laurence Grimaud (directrice de recherche, département de chimie, ENS Paris), Pr. Pascal Bonnet (institut de chimie organique et analytique, Université d'Orléans) et Pr. Valérie Collot (centre d'études et de recherche sur le médicament de Normandie, Université de Caen) d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.





# Remerciements

Je commencerais par adresser mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui ont contribué à mes travaux de thèse. Je pense d'abord au Pr. Pascal Bonnet, pour son travail de modélisation qui a joué un rôle charnière dans le projet, et au Dr Ludovic Galas et à Magalie Bénard et Damien Schapman de la plate-forme Primacen, qui ont réalisé l'ensemble des images de microscopie biologique du projet. Je tiens ensuite à remercier le service d'analyse du laboratoire et, en particulier, Françoise Ringot, Albert Marcual, Laetitia Bailly pour sa magie et Emilie Petit pour le temps qu'elle a passé à me former. J'adresse enfin un clin d'œil à Claire Déjardin et Justine Burel qui m'ont aidée dans mon travail durant leurs stages respectifs, et au Dr Arnaud Chevalier et à Alexandre Arnaud pour leurs travaux préliminaires sur le projet.

Bien sûr, tout ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide que j'ai reçue de mon directeur de thèse, Dr Xavier Franck, et mon encadrant, Dr Thibault Gallavardin. Je les remercie chaleureusement pour leur patience, leur disponibilité et leurs conseils avisés. Je retiendrai la rigueur scientifique, la précision et la clarté de l'écrit que Xavier aura essayé de me faire passer tout au long de ma thèse, et la quantité de choses que j'ai pu apprendre de Thibault en spectroscopie. Ceci étant dit, je ne suis pas sûre de regretter les spectres à n'y plus rien comprendre et les heures passées qu'ils nous ont fait passer dans le noir, si je peux me permettre l'expression.

Je remercie plus généralement l'ensemble du personnel de l'IRCOF que j'ai pu croiser à divers degrés tout au long de ma thèse. J'aimerais également saisir l'occasion pour leur présenter quelques excuses pour les avoir harcelés avec les mails de l'ADCR (Association des Doctorants en Chimie de Rouen) pendant près de deux ans. Oui, l'asso va bien, non, le barbecue ne sera probablement pas maintenu en cette belle année qu'est 2020. Notre plus grande tristesse à tous, j'en suis consciente.

Plus particulièrement, je remercie les « massistes » (Estelle, Julien, Clément et toi aussi Johann, même si tu soutiens les Dragons) pour leur implication de plus ou moins lointaine dans la grande aventure de l'asso. Je pense aussi à la famille grandissante des « fluoristes » (de mon année : Pauline qui a vécu les mêmes galères de contrats COMUE que moi, Augustin et Pan ; et les petits-nouveaux : Mélissa (Paris V rpz !), Thibaud, Fabien, et tous ceux que je connais peu ou pas) et aux infiltrés du premier étage (C'est de toi que je parle Sandra ! Quoi qu'on en dise, les petites personnes peuvent être grandes par le cœur, je suis contente de t'avoir croisée en thèse malgré les difficultés). Enfin, je ne peux pas ne pas mentionner le gang du troisième pour l'ambiance, restez comme vous êtes (et là, excusez le tir groupé, il y a du monde : Arthur, Julien, Steven, Thomas G. (je veux de la poire du grand-père pour ma thèse), Thomas M. (Salut ! Est-ce que Claire est là ?), Alexia (à tous ces restos et ces après-midi entre filles), Romain (l'oublié peinard au fond de son couloir) et la meilleure pour la gin- heu fin (faute de frappe impromptue, comme quoi, un lapsus à l'écrit, ça arrive) : Claire, parce que la thèse aurait été éminemment

plus longue sans toi, ma grande. Et ce n'est pas parce que cette phrase est courte que c'est tout ce que j'ai à dire sur toi, mais le reste j'espère que tu le sais et que je n'aurais pas à m'épancher sur ma thèse, violons, petits mouchoirs et compagnie.)

Je termine mon tour du bâtiment par la maison. Honneur aux anciens donc je vais commencer par remercier en vrac : Samuel, Sara, Kathleen, Laura, Nawel, Kévin, Morgane (et ouais, les copains, la tradition des surnoms s'est perdue quelque part au milieu de tout ça, sauf pour Romain) et, bien sûr, papi Mougeot qui m'aura supportée avec son grand chill de papa ours et à qui je volerais toujours bien un peu de longueur de jambe pour pouvoir voir dans ma hotte. Parmi ceux qu'on n'a pas encore enterré, je remercie : Steven, Pierre, Maxime, Solène, Thomas, Mathieu, Batoul & Dorra (un peu plus et vous étiez dans le club des anciens, mais il paraît que ce n'est pas poli de demander l'âge d'une dame), Katia (je porte un toast à nos soirées jeux de sociétés, et à l'avenir pense à prendre un pull pour aller à la mer normande !), Victor (quoi que tu dises, je préfère toujours les petits princes aux BN...) et Madeleine (le labo aurait été beaucoup moins drôle sans toi, et je ne dis pas ça que parce que tu mets les « Avez-vous déjà vu ? » en fond sonore). Et puis, bah, Alexis, je n'ai que trois choses à te dire : force et honneur, merci d'avoir supporté mes gesticulations quand je parle toute seule dans le bureau (par contre, les marsiens n'ont pas encore reçu mon message) et tu feras attention, j'ai l'impression qu'il y a quinze nouveaux articles qui sont sortis le temps que tu lises ces remerciements.

Et merci à toutes les personnes au deuxième étage qui ont fait du laboratoire un endroit où il a fait bon venir travailler.

Pour donner dans l'originalité, je finirais en remerciant ma famille qui m'a permis d'en arriver ici aujourd'hui, les potos « parisiens » (et les sudistes expatriés) pour l'énorme soutien moral qu'ils m'ont apporté au jour le jour, et Gaspard pour être là. Je vous aime, les gens !





# Abréviations

4-DMAP	4-DiMéthylAminoPyridine
A (ou GEA)	Accepteur d'électrons (groupe électroattracteur)
Ac	Acétate
AcOH	acide acétique
ADN	Acide DéoxyriboNucléique
AIBN	AzoBisIsobutyroNitrile
Al	alkyle, substituant alyphatique
APTS	Acide ParaToluèneSulfonique
aq.	aqueux
Ar	aryle, substituant aromatique
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BINAP	2,2'-bis(diphénylphosphino)-1,1'-BINAPtyle
Bn	Benzyle
Boc	tert-ButOxyCarbonyle
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CIS	Croisement InterSystème
D (ou GED)	Donneur d'électrons (groupe électrodonneur)
DCE	1,2-DiChloroEthane
DCJV	9-(dicyanovinyl)julolidine
DCM	DiChloroMéthane
DCP	DiCyanoPyrane
DIAD	<i>DiIsopropyl AzoDicarboxylate</i> (azodicarboxylate de diisopropyle)
DMABN	4- <i>N,N</i> -diméthylaminobenzonitrile
DMDCA	<i>N,N'</i> -DiMéthylCyclohexane-1,2-DiAmine
DMF	<i>N,N'</i> -DiMéthylFormamide
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge

DMN	<i>para</i> -diméthylalaninemalononitrile
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
dppf	1,1'-bis(DiPhénylPhosphino)Ferrocène
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée)
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (agence européenne des médicaments)
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
Flt-1	Autre nom couramment employé dans la littérature pour le VEGFr-1
FRET	<i>Förster Resonance Energy Transfer</i> (transfert d'énergie par résonance de type Förster)
GEA	Groupe ElectroAttracteur
GED	Groupe ElectroDonneur
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GP	Groupe Protecteur
Hb	Hémoglobine
HMDS	HexaMéthylDiSilazane (ou Bis(triméthylsilyl)amine)
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital (orbitale moléculaire la plus haute occupée)
IR	InfraRouge
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
JM	Juxtamembranaire
KDR	Autre nom couramment employé dans la littérature pour le VEGFr-2
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital (orbitale moléculaire la plus basse vacante)
MAO	MonoAmine Oxydase
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MET	Microscopie Electronique en Transmission
MFA	Microscopie à Force Atomique
Ms	Mésyle
MW	<i>MicroWave</i> (microonde)
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NBS	<i>N</i> -BromoSuccinimide
NMP	<i>N</i> -Méthyl-2-Pyrrolidone

NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i> (effet Overhauser nucléaire)
NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i> (oxyde nitrique synthase)
PDGFr	<i>Platelet Derived Growth Factor receptors</i> (récepteurs des facteurs de croissance dérivés des plaquettes)
PET	<i>Photoinduced Electron Transfer</i> (transfert d'électron photoinduit)
Phen	Phénantroline
PMB	<i>Para-MéthoxyBenzyle</i>
PPTS	<i>Pyridinium Para-TolueneSulfonate</i> (para-toluènesulfonate de pyridinium)
quant.	quantitatif
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (espèces réactives de l'oxygène)
STED	<i>STimulated Emission Depletion</i> (déplétion par émission stimulée)
t.a.	température ambiante (t.a. = 20°C pour l'ensemble du manuscrit)
TCF	TriCyanoFurane
TCI	Transfert de Charge Intramoléculaire (ou transfert de charge photoinduit)
TEBAC	<i>TriEthylBenzylAmmonium Chloride</i> (chlorure de triéthylbenzylammonium)
TEP	Tomographie par Emission de Positons
Tf	Triflate
TFA	<i>TriFluoroacétique Acid</i> (acide trifluoroacétique)
TFP	Tri(2-Furyl)Phosphine
THF	TetraHydroFurane
THP	TetraHydroPyrane
TIPS	TriIsoPropylSilyle
TMS	TriMéthylSilane
Ts	Tosyle
UV	UltraViolet
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (facteur de croissance de l'endothélial vasculaire)
VEGFr	<i>Vascular Endothelial Growth Factor receptors</i> (récepteurs du facteur de croissance de l'endothélial vasculaire)
VPF	<i>Vascular Permeability Factor</i> (facteur de perméabilité vasculaire), autre nom historique des VEGF-A





# Sommaire

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>21</b>
<b>CHAPITRE 1 INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>23</b>
1) IMAGERIE DE FLUORESCENCE DANS LE DOMAINE BIOMEDICAL.....	23
1.1) <i>Enjeux, avantages, inconvénients et contraintes de l'imagerie de fluorescence en biologie et en médecine.....</i>	23
1.1.1) Imagerie biologique .....	23
1.1.2) Imagerie médicale .....	24
1.1.3) Imagerie de fluorescence : avantages, inconvénients et contraintes .....	26
1.2) <i>Outils de détection en imagerie de fluorescence .....</i>	28
1.2.1) Fluorophores intrinsèques et protéines fluorescentes.....	28
1.2.2) Fluorophores extrinsèques covalents : les rapporteurs bioconjugués .....	32
1.2.3) Fluorophores extrinsèques non-covalents : une approche de la cible à la molécule par criblage haut-débit de fluorescence .....	33
1.3) <i>Sondes pro-fluorescentes.....</i>	35
1.3.1) Des sondes par couplage ligand-fluorophore.....	35
1.3.2) Des sondes par modification de molécules bioactives .....	44
1.4) <i>Particularités mécanistiques des sondes conformationnelles .....</i>	46
2) FONCTIONS BIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES DES VEGFR ET ENJEUX LIES AUX TRAITEMENTS ACTUELS ET A LEUR RECHERCHE.....	50
2.1) <i>Les récepteurs des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire.....</i>	50
2.1.1) Localisations et fonctions de ces récepteurs .....	50
2.1.2) Activité enzymatique des VEGFr .....	51
2.1.3) Structures des VEGFr .....	52
2.1.4) Implications des VEGFr et des facteurs de croissance associés dans les maladies liées à une néovascularisation néfaste .....	53
2.2) <i>Traitements actuels contre la croissance pathologique de l'endothélium vasculaire et développement de nouveaux inhibiteurs .....</i>	54
2.2.1) La coagulation directe des vaisseaux sanguins : des thérapies laser pour soigner la DMLA exsudative .....	54
2.2.2) L'approche « anti-VEGF » pour inhiber l'angiogenèse.....	56
2.2.3) Les inhibiteurs des VEGFr : le développement des petites molécules.....	57
<b>CHAPITRE 2 FLUOROPHORES AVEC UN DONNEUR INDAZOLE : SYNTHESSES, PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES ET IMAGERIE DE FLUORESCENCE.....</b>	<b>63</b>
1) BIBLIOGRAPHIE AUTOUR DES INDAZOLES .....	65
1.1) <i>Propriétés physicochimiques intrinsèques des indazoles.....</i>	66
1.2) <i>Synthèses des indazoles substitués en position C3 .....</i>	68
1.2.1) Par substitution directe.....	69
1.2.2) Par cyclisation du noyau indazole.....	71
2) SYNTHESE DES FLUOROPHORES AVEC UN DONNEUR INDAZOLE « SIMPLE ».....	78

2.1) Synthèse des donneurs .....	79
2.1.1) 1H-indazole-3-carboxaldéhyde .....	79
2.1.2) 1- & 2-méthylindazole-3-carboxaldéhyde .....	81
2.2) Condensations Knoevenagel.....	83
2.2.1) Synthèse des accepteurs .....	83
2.2.2) Synthèse des sondes par condensation de Knoevenagel .....	86
2.3) Réactions de Wittig .....	87
2.3.1) Synthèse des accepteurs .....	87
2.3.2) Synthèse des sondes par réaction de Wittig .....	89
2.4) Couplages de Heck .....	94
2.4.1) Synthèse des accepteurs : styryles.....	94
2.4.2) Synthèse des sondes par couplage de Heck .....	96
3) ÉTUDES PHOTOPHYSIQUES.....	100
3.1) Solvatochromisme.....	100
3.1.1) Comparaison des différents groupements électroaccepteurs.....	100
3.1.2) Effet de la méthylation sur les azotes N1 ou N2 de l'indazole .....	105
3.1.3) Évaluation de l'indazole comme groupement électrodonneur .....	107
3.1.4) Études de la variation des moments dipolaires : modèle de Lippert-Mataga.....	110
3.1.5) Mécanismes d'extinction de photoblanchiment : discussion et pistes de réflexion .....	112
3.2) Études en viscosité.....	117
3.2.1) Étude en gamme de solvants et limitations .....	117
3.2.2) Étude en gamme de température .....	119
4) IMAGERIE SUR CELLULES VIVANTES & COLOCALISATION .....	122
4.1) Fluorophores avec accepteurs chargés .....	122
4.2) Fluorophores avec accepteurs neutres.....	127
5) CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	128
<b>CHAPITRE 3 SYNTHÈSES DE LIGANDS PHOTO-ACTIFS SELECTIFS DU VEGFR ET ETUDES PHOTOPHYSIQUES .....</b>	<b>133</b>
1) DEFIS SYNTHETIQUES DES SONDES SELECTIVES PAR COUPLAGE DE BUCHWALD-HARTWIG .....	134
1.1) Réaction de Buchwald-Hartwig sur les indoles et les indazoles : bibliographie & expérience acquise .....	134
1.1.1) Contrôler la régiosélectivité de la réaction sur les indoles .....	135
1.1.2) Contrôler la régiosélectivité de la réaction sur les indazoles .....	137
1.2) Résultats de synthèse .....	137
1.2.1) Optimisation de deux voies de synthèse .....	138
1.2.2) Tentatives de couplages avec des substrats plus complexes .....	147
1.2.3) Exploration de synthèses alternatives .....	148
2) SYNTHÈSE DE SONDES SELECTIVES PAR COUPLAGE DE MIGITA .....	151
2.1) Le couplage de Migita dans la synthèse de l'axitinib .....	151
2.2) Résultats de synthèse .....	153
2.2.1) Sur le 6-bromo-1H-indazole .....	154
2.2.2) Sur le 6-bromoindazole-3-carboxaldéhyde .....	159
3) ETUDES PHOTOPHYSIQUES.....	163
3.1) Influence de la substitution du donneur indazole .....	163
3.1.1) Solvatochromisme.....	163
3.1.2) Études du photoblanchiment .....	167
3.1.3) Études en viscosité .....	170

3.2) <i>Influence de la nature du lien D-<math>\pi</math>-A</i> .....	172
3.2.1) Solvatochromisme.....	172
3.2.2) Études en viscosité.....	174
4) CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	176
<b>CONCLUSION GENERALE &amp; PERSPECTIVES.....</b>	<b>179</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>185</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE.....</b>	<b>193</b>



## Introduction générale

L'imagerie de fluorescence est un domaine actif de recherche à l'interface entre les chimies organiques et théoriques, la physique et, dans le cas du biomédicale, de la biologie ou de la médecine. Comme la plupart des techniques d'imagerie biomédicale, l'imagerie de fluorescence repose sur l'emploi d'un agent de contraste : ici, ce sont des sondes fluorescentes. Les sondes fluorescentes sont des outils puissants car elles permettent de donner de nombreuses informations spatiales et dynamiques dans des tissus vivants au cours du temps. Elles possèdent cependant quelques inconvénients comme une pénétration tissulaire modérée qui limite encore l'application de l'imagerie de fluorescence dans le domaine médical. Cependant, la facilité d'analyse, la haute résolution de la technique et la possibilité de l'utiliser en temps réel lors qu'une opération chirurgicale (chirurgie guidée par fluorescence) en font une technique d'imagerie particulièrement attractive.

Cette thèse s'inscrit dans un projet de synthèse de sondes pour l'imagerie de fluorescence spécifique des VEGFr (*Vascular Endothelium Growth Factor receptors*). Les VEGFr sont des protéines de la famille tyrosine kinase et sont notamment responsables de l'angiogenèse, c'est-à-dire la croissance et la prolifération des vaisseaux sanguins. De fait, les VEGFr sont impliqués dans les maladies liées à une vascularisation néfaste comme dans la croissance des tumeurs cancéreuses ou les maladies de néovascularisation rétinienne. Dans un cas comme dans l'autre, traiter spécifiquement ces vaisseaux sans atteindre les tissus sains est un enjeu. Pour y parvenir, il est d'abord nécessaire d'imager spécifiquement et précisément les vaisseaux. Ces deux critères sont remplis par l'imagerie de fluorescence grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes spécifiques comme agent de contraste.

Cette thèse porte sur la synthèse de ces sondes. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à un ligand connu du récepteur : l'axitinib ; dont la fluorescence intrinsèque n'est pas exploitable pour des applications biologiques. Ces travaux de thèse se sont axés sur la contribution de l'indazole dans la fluorescence de l'axitinib et l'amélioration de ses propriétés de fluorescence. Le présent manuscrit est donc divisé en trois parties :

- 1) La première partie rappelle la place de l'imagerie de fluorescence dans le domaine de l'imagerie biomédicale, ainsi que la nature des différents outils fluorescents actuels et des mécanismes de pro-fluorescence.
- 2) La deuxième partie traitera de la synthèse et de l'étude de fluorophores à cœur indazole, afin de mieux appréhender son rôle en tant que groupement donneur d'électrons.
- 3) La troisième partie sera consacrée à l'étude de l'influence de la nature des substituants du noyau indazole sur leurs propriétés spectroscopiques et leur activité biologique.



# Chapitre 1

## Introduction bibliographique

### 1) Imagerie de fluorescence dans le domaine biomédical

#### 1.1) Enjeux, avantages, inconvénients et contraintes de l'imagerie de fluorescence en biologie et en médecine

L'imagerie de fluorescence est un domaine actif de recherche à l'interface entre les chimies organiques et théoriques, la physique et, dans le cas du biomédicale, de la biologie ou de la médecine. Afin de comprendre l'effervescence de la recherche en imagerie de fluorescence, il est important de discuter des autres techniques d'imageries biologique et médicale ainsi que leurs limites actuelles qui font naître le besoin de développer d'autres modalités d'imagerie.

##### *1.1.1) Imagerie biologique*

L'imagerie biologique peut être divisée entre deux grandes spécialités : l'imagerie cellulaire et tissulaire. L'imagerie cellulaire a pour but de visualiser l'intérieur ou l'extérieur des cellules et d'étudier leur fonctionnement tandis que l'imagerie tissulaire cherche à visualiser et comprendre les rôles des tissus ou des organes à l'échelle d'un individu. Une meilleure compréhension des processus biologiques à toutes ces échelles est un enjeu de taille qui peut permettre de mieux appréhender le développement d'une pathologie ou son évolution et éventuellement d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Des dispositifs de microscopie sont nécessaires afin d'aller sonder ces échantillons, ils reposent sur différents principes physiques avec les avantages et les inconvénients qui en découlent respectivement (**Tableau 1**).<sup>[1]</sup>



**Tableau 1 : Les différents types de microscopies et exemples des modalités les plus fréquemment utilisées en imagerie cellulaire, mise évidence de leurs principaux avantages et inconvénients.<sup>[1,2]</sup>**

Microscopie	Phénomène physique	Phénomènes étudiés	Echelle	Image	Résolution	Agent de contraste	Préparation échantillons
Optique	Absorption	Topologie (dans le temps)	Cellule, tissu	2D	100 nm	non (oui)	En culture ou en coupe
	Fluorescence	Topologie, physiologie (dans le temps)	Cellule à individu	2D	100 nm	oui	En culture ou en coupe
Electronique	Transmission d'électrons	Géométrie	Molécule à cellule	2D	< 1 Å	oui	En coupe cryofixée ou lyophilisée
	Réflexion d'électrons	Surfaces	Cellule, tissu	3D	< 1 nm	oui	Cryofixé ou lyophilisé
Force atomique	Contact	Surfaces, forces	Molécule à cellule	3D	< 1 nm	non	Ancré sur une surface

Les microscopies optiques et électronique par transmission (MET) permettent d'étudier la topologie cellulaire (formes, arrangements, compositions ; **Tableau 1**). La microscopie optique est limitée en résolution par la longueur d'onde du rayonnement incident, la résolution des mesures ne pouvant pas être inférieure à la longueur d'onde de la lumière utilisée pour irradier l'échantillon (quelques centaines de nanomètre). Cependant, la faible valeur énergétique de ce rayon permet de travailler sur des échantillons vivants tant qu'ils transmettent suffisamment la lumière. À l'inverse, la MET possède une très haute résolution, pouvant aller jusqu'à des distances subatomiques, mais l'utilisation d'un flux d'électrons nécessite des conditions expérimentales délicates et surtout des échantillons secs, inertes et contrastés aux métaux lourds.

La microscopie à force atomique (MFA) par contact intermittent et la microscopie électronique à balayage (MEB) ne se font pas par transmission et permettent donc d'aller sonder des surfaces (**Tableau 1**). En biologie cellulaire, elles permettent toutes les deux de constituer une image tridimensionnelle des cellules et des interactions à leur surface avec une résolution atomique, voire même de visualiser les forces de ces interactions pour la MFA.<sup>[2]</sup> Elles sont toutes deux limitées par la préparation des échantillons, bien que la MFA présente l'avantage de pouvoir travailler avec des échantillons dans un milieu de culture.

Les différentes forces et faiblesses de ces microscopies permettent d'alterner entre elles selon le besoin, voire de les combiner pour obtenir des images complémentaires.<sup>[1]</sup> Aucune de ces microscopies n'est cependant en capacité de sonder de façon concomitante la topologie et les interactions dans ces cellules, et surtout aucune ne permet de visualiser leur physiologie. Ce sont les raisons principales du grand succès de l'imagerie de fluorescence en biologie (**Tableau 1**).

### 1.1.2) Imagerie médicale

L'imagerie médicale a pour but de visualiser l'intérieur du corps humain de façon non-invasive afin d'aider le diagnostic et de guider ou suivre un traitement. L'imagerie médicale

repose sur de plusieurs modalités complémentaires qui sont traditionnellement rassemblées en quatre catégories principales : transmission de rayons X, réflexion d'ondes sonores, résonance magnétique et émission de radiations (**Tableau 2**). Les modalités d'une catégorie reposent sur les mêmes principes fondamentaux et permettent d'étudier les mêmes phénomènes, leurs applications diffèrent généralement d'une catégorie à l'autre. Le choix d'une modalité plutôt qu'une autre repose alors sur un ensemble de paramètres en commençant par le besoin, la pertinence de l'information acquise et les risques associés à la méthode notamment en termes d'exposition aux rayonnements ou aux radiations.

**Tableau 2 : Les grandes catégories d'imagerie médicale et exemples des modalités les plus fréquemment utilisées, mise évidence de leurs principaux avantages et inconvénients.<sup>[3]</sup>**

Imagerie	Modalité	Rayonnement	Phénomènes étudiés	Echelle	Image	Résolution / contraste	Agent de contraste	Temps acquisition
Transmission de rayons X	Radio-graphie	Rayons X	Os, tissus	Organe, corps	2D	+ / +	non (oui)	< 10 min
	Scanner	Rayons X	Os, tissus	Organe, corps	3D	+ / +	non (oui)	10 - 20 min
Réflexion d'ondes	Echo-graphie	Ondes sonores	Tissus (temps réel)	Organe	2D	- / +	non	15 - 45 min
Résonance magnétique	IRM	Champs magnétique	Tissus	Organe, corps	3D	+ / +	oui	15 - 90 min
Emission de radiations	TEP	Positons	Physiologie	Organe, corps	3D	+ / ++	oui	30 min
Fluorescence	Photo-diagnostic	Visible - proche IR	Tissus, physiologie (de surface)	Tissu, organe	2D	++ / ++	oui	n.r. <sup>a</sup>

<sup>a</sup> n.r. = non renseigné

Idéalement, plus le risque d'exposition à des rayonnements néfastes est grand, plus le temps d'analyse doit être court. C'est le cas des modalités reposant sur la transmission de rayon X qui permettent d'obtenir rapidement des images en fonction de la densité des tissus, ne nécessitant un agent de contraste que dans de rares cas (contraster le système vasculaire lors d'une angiographie, par exemple ; **Tableau 2**). Malgré le risque d'exposition, elles sont aujourd'hui encore les modalités les plus utilisées en routine.<sup>[3]</sup> L'enregistrement des images par émission de radiations est également rapide et permet d'accumuler des données complémentaires des rayons X en imageant la physiologie d'un tissu (vitesses et zones d'accumulation de l'agent de contraste) sans limite de pénétration dans le corps. Elles sont cependant moins usitées car elles reposent sur des agents de contraste radioactifs et instables dans le temps qui nécessitent donc d'être synthétisés peu de temps avant leur administration.

La deuxième modalité d'imagerie la plus utilisée en médecine est l'échographie.<sup>[3]</sup> Contrairement aux autres modalités d'imagerie, c'est la seule qui ne repose pas sur les rayonnements, elle est donc sans danger pour les personnes fragiles (**Tableau 2**). La haute fréquence d'analyse permet également de visionner les images et les mouvements en temps réel, cependant, la pénétration des ondes sonores ne se fait pas au travers de tout le corps humain, limitant l'analyse aux organes, avec une résolution spatiale moins bonne que pour d'autres modalités. À l'inverse, l'imagerie par résonance magnétique (IRM), également considérée

sans danger, n'est pas limitée en termes de profondeur d'analyse et donne des informations avec une meilleure résolution spatiales mais non résolues dans le temps. L'IRM est malheureusement coûteuse en matériel et en temps d'analyse et nécessite l'utilisation d'un agent de contraste sans lequel les analyses seraient plus longues encore.

Il est également possible de combiner plusieurs de ces modalités d'imagerie pour obtenir des informations supplémentaires, comme mentionné pour le scanner-TEP. Toutefois, aucune des modalités présentées ne permet de visionner rapidement, précisément et avec une bonne résolution spatiale et temporelle la localisation d'un tissu et/ou sa physiologie. Ces informations peuvent être apportées par l'imagerie de fluorescence et c'est une des raisons du développement rapide des photo-diagnostics qui reposent sur l'imagerie de fluorescence (**Tableau 2**).

### 1.1.3) Imagerie de fluorescence : avantages, inconvénients et contraintes

Il existe une très large variété de phénomènes à étudier en imagerie biomédicale, qu'ils soient anatomiques (structure) ou physiologiques (fonction). En biologie cellulaire, l'imagerie de fluorescence permet d'aller étudier la localisation et la temporalité de phénomènes à l'échelle cellulaire et éventuellement la réponse de ces cellules à des stimuli extérieurs. En médecine, l'imagerie de fluorescence trouve actuellement une grande partie de son application en chirurgie guidée par fluorescence<sup>[4]</sup> mais a pour ambition de permettre des diagnostics ou des suivis thérapeutiques simples, rapides, précis, non-invasif et non-radioactifs.<sup>[5]</sup> De la même manière, il est envisagé d'imager la distribution d'un principe actif en cours de développement pour étudier l'évolution de son profil pharmacologique. Dans ce cas-là, ces molécules fluorescentes pharmacologiquement actives qui accompagneraient un traitement sont dites « compagnons ».

L'imagerie de fluorescence pour le domaine biomédical présente de nombreux avantages qui expliquent son développement actif (en vert, **Tableaux 1 & 2**). Tout d'abord, l'utilisation de la lumière visible (ou proche visible) permet de mettre au point des modalités d'imagerie non-invasives et non-radiatives, favorable à l'imagerie *in vivo*. L'acquisition de l'ensemble de ces images *in vivo* rendent la méthode transposable de l'imagerie biologique à médicale, en théorie, contrairement à la plupart des autres modalités d'imagerie cellulaire.

Bien que l'utilisation d'un agent de contraste (ou marquage) ne soit pas toujours un avantage, dans le cas présent, elle permet d'étiqueter un plus grand nombre de phénomènes structurels ou fonctionnels différents que la majorité des autres modalités d'imagerie biomédicale. Ce marquage se faisant à l'échelle cellulaire, sa résolution atteinte en imagerie médicale est généralement supérieure à celle des autres modalités. De plus, ce marquage étant idéalement stable dans le temps, il est aussi possible d'en faire un suivi temporel pour étudier l'évolution de sa distribution ou sa réponse à un stimulus extérieur, ce qui n'est pas envisageable en imagerie par émission de radiation où il est favorable que le temps de demi-vie des agents de contraste soit relativement court pour limiter les temps d'exposition du patient et du personnel médical. L'imagerie de fluorescence est surtout la seule modalité d'imagerie médicale où il est envisageable d'utiliser une même machine pour détecteur plusieurs marqueurs simultanément, rendant compte de l'environnement de chacun.

L'imagerie de fluorescence biomédicale présente également des limites (en rouge, **Tableaux 1 & 2**). En médecine, sa plus grande limite et le défi qui se pose constamment aux chercheurs est liée à l'absorption et à la diffusion dans les tissus de la lumière à ces longueurs d'ondes, limitant drastiquement la profondeur de l'analyse. Actuellement, l'imagerie de fluorescence médicale ne permet pas de pénétrer à plus de quelques millimètres dans les tissus, à leur surface donc, ce qui est loin d'être le cas pour les autres modalités. En imagerie biologique, le principal désavantage de l'imagerie de fluorescence naît de sa résolution limitée par l'utilisation de la lumière visible comme pour les autres procédés de microscopie optique. Cependant, grâce à un appareillage différent et à d'autres méthodes traitements des données, de nouveaux procédés de microscopie de fluorescence voient le jour, permettant maintenant d'atteindre des résolutions de quelques dizaines de nanomètres seulement.<sup>[1]</sup> Ces procédés d'imagerie de fluorescence « super résolution » apportent également un nouveau lot d'avantages et de limites, notamment en termes de synthèses de sondes fluorescentes, et ne seront donc pas discutés ici.

Une autre limite importante de l'imagerie de fluorescence biomédicale est qu'elle ne peut se faire sans une sonde fluorescente dont va dépendre la majorité des paramètres de l'image : profondeur du champs, contraste, rapport signal-sur-bruit, spécificité du marquage. La réponse fluorescente d'une sonde dépend également de son environnement (concentration locale de la sonde, composition et épaisseur de l'échantillon, intensité lumineuse incidente), l'imagerie de fluorescence renseigne donc le plus souvent de manière qualitative (comme pour toutes les autres modalités d'imagerie). Il est malgré tout possible de contourner cette dernière limite en synthétisant des sondes dites « ratiométriques » ; ce sont des plateformes qui comportent deux fluorophores dont les signaux ne se recouvrent pas, le premier fluorophore doit être insensible à son environnement tandis que l'autre est sensible au phénomène à étudier. Le rapport des deux intensités de fluorescence permet alors de quantifier le phénomène étudié indépendamment de la concentration locale de sonde.

Afin de synthétiser cette sonde idéale, il existe un certain nombre de contraintes : la sonde doit (i) être sélective ; (ii) ne pas être toxique ; (iii) être soluble et performante dans un milieu physiologique ; (iv) être stable et photo-stable, c'est-à-dire ni dégradée en milieu biologique, ni blanchie trop rapidement à la lumière et ni réactive depuis son état excité  $S_1$  ; enfin (v) avoir un bon rapport signal-sur-bruit, ce qui est souvent atteint par synthèse d'une sonde pro-fluorescente, dont la longueur d'onde d'émission ou l'intensité de fluorescence ne varient qu'en présence de la cible étudiée.

## 1.2) Outils de détection en imagerie de fluorescence

L'une des plus grandes contraintes et limites de l'imagerie de fluorescence telle que décrite précédemment est la nécessaire sélectivité. Cette sélectivité est introduite par un outil, que ce soit un rapporteur ou une sonde fluorescente, qui permet d'enregistrer des informations spatiales et temporelles par accumulation d'un signal de fluorescence. Ces outils de détection, détaillés ci-dessous, fonctionnent sur différents principes : ils peuvent être naturellement présents dans le milieu biologique, encodés génétiquement dans la structure d'une protéine, ou encore fixés de façon covalente ou non à une cible. Le fonctionnement de ces outils non-covalents, dits « sondes fluorescentes », sera plus amplement détaillé et exemplifié par la suite.

### 1.2.1) Fluorophores intrinsèques et protéines fluorescentes

Certains tissus sont naturellement fluorescents du fait de leur composition, cette autofluorescence est due à des molécules aromatiques capables d'absorber puis de réémettre la lumière. Ces fluorophores intrinsèques, sont majoritairement les acides aminés aromatiques des protéines (**Figure 1**) et des cofacteurs enzymatiques, comme le NADH ou le FAD (**Figure 1**), et sont donc ubiquitaires.

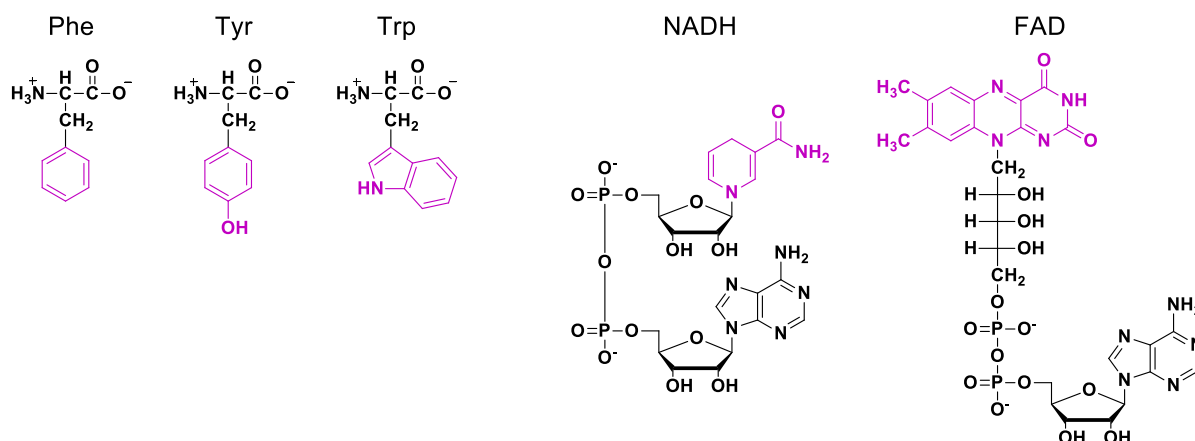


Figure 1 : Structures des acides aminés aromatiques phénylalanine (Phe), tyrosine (Tyr) et tryptophane (Trp) et des co-facteurs enzymatiques NADH et FAD ; mise en évidence de la structure des fluorophores (violet).

Cette fluorescence intrinsèque ubiquitaire peut interférer avec les mesures d'imagerie de fluorescence et, à l'inverse, peut aussi servir d'indicateur. Des études tirent profit de cette fluorescence naturelle car, ces fluorophores intrinsèques étant sensibles à divers paramètres environnementaux (polarité, pH, présence ou non d'autres cofacteurs), ils peuvent servir de rapporteurs sur la localisation et la temporalité de variations dans leurs environnements.<sup>[6]</sup>

Dans le cas de l'étude de la fluorescence intrinsèque des protéines, elle s'effectue en cuve et la fluorescence des tryptophanes est généralement la seule enregistrée (**Figure 2**). En effet, il a été reporté que la faible fluorescence des phénylalanines est principalement éteinte par transfert d'énergie vers les tryptophanes, eux-mêmes éteints par transfert d'énergie vers d'autres tryptophanes. Utiliser les tryptophanes pour sonder les protéines est intéressant dans la mesure où leur fluorescence est sensible à de nombreux paramètres environnementaux.<sup>[7]</sup> Ces données permettent d'accumuler des informations sur de fines modifications de leurs

environnements mais la lecture de ces données est rapidement compliquée par la quantité de variables qui influencent ces spectres, en particulier lorsque la protéine en possède plus d'un tryptophane.<sup>[6]</sup>

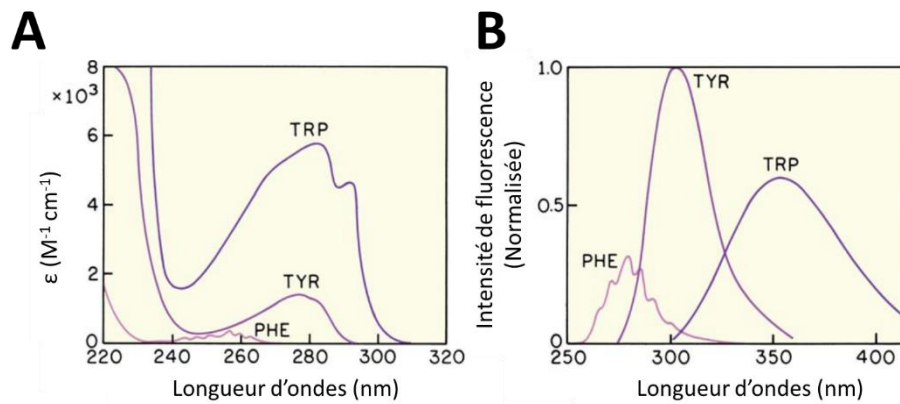


Figure 2 : Spectres A) d'absorption et B) émission des acides aminés aromatiques phénylalanine (Phe), tyrosine (Tyr) et tryptophane (Trp).<sup>[6]</sup>

Les cofacteurs enzymatiques NADH et FAD existent tous deux sous une forme oxydée et une forme réduite mais seule l'une de ces deux formes est fluorescente (réduite pour le NADH et oxydée pour le FAD, **Figure 3**). Dans un tissu sain, l'oxydation et la réduction de ces cofacteurs sont en équilibre permanent, une accumulation d'une des formes est donc un marqueur de disfonctionnement. Le NADH est notamment accumulé dans les tissus en hypoxie et peut donc y être imagé de façon sélective par rapport à sa forme oxydée, non fluorescente. Entre autres, sa fluorescence intrinsèque a été exploitée en imagerie médicale pour visualiser les tumeurs.<sup>[8]</sup>

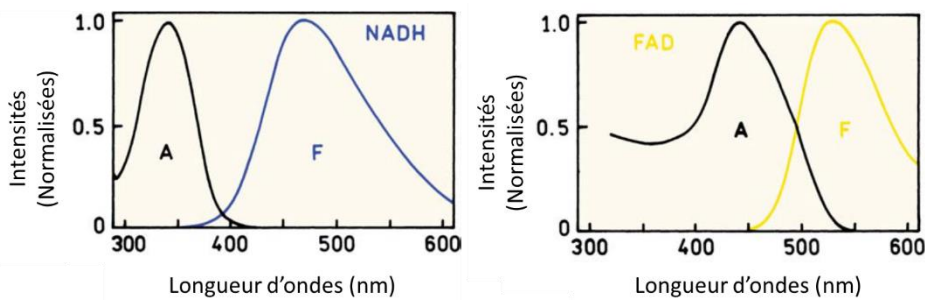


Figure 3 : Spectres d'absorption (A) et d'émission (F) respectifs des cofacteurs NADH et FAD.<sup>[6]</sup>

Le plus gros désavantage associé à ces fluorophores intrinsèques est la faible pénétration des tissus lors de leur utilisation en imagerie de fluorescence médicale. Cette limite est due aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission employées ( $\lambda_{exc}^{max}$  et  $\lambda_{em}^{max}$ ) qui se situent majoritairement dans l'UV ( $< 300$  nm) et le bleu (300 – 450 nm) et sont donc hors de la fenêtre de transparence du milieu biologique (650 nm – 950 nm, Figure 4).

La fenêtre de transparence du milieu biologique correspond aux longueurs d'ondes pour lesquelles le corps humain absorbe le moins la lumière. En dessous de ces longueurs d'ondes, les UV et la lumière visible sont principalement absorbés par la mélanine (peau) et l'hémoglobine, chargée ou non en oxygène (sang). Au-dessus de ces longueurs d'ondes, l'hémoglobine continue à absorber une partie des rayonnements (non représenté) mais les IR

sont principalement absorbés par l'eau (**Figure 4**). En travaillant dans cette fenêtre de transparence, il est donc possible d'atteindre une meilleure pénétration de la lumière dans les tissus et donc de la mesure d'imagerie.

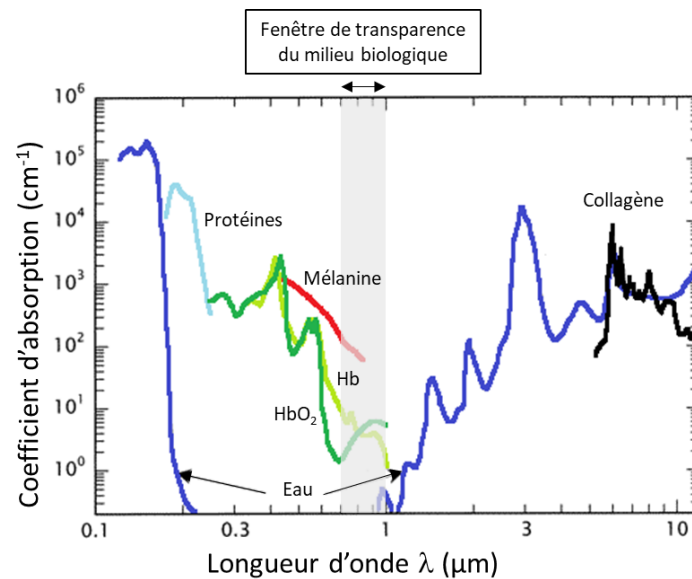


Figure 4 : Spectres d'absorption des tissus biologiques de l'UV à l'IR lointain.<sup>[9]</sup>

Lorsqu'il est question d'utiliser une sonde en milieu biologique, il est donc important de se poser la question du phénomène à imager et de sa localisation afin de choisir ou, le cas échéant, développer l'outil le plus adapté. Malheureusement, tous les composants cellulaires naturellement fluorescents ne sont pas les seuls sujets d'études des biologistes cellulaires. Les biologistes ont contourné ce problème en encodant des fluorophores sur des protéines d'intérêt.

Parmi ces fluorophores, les plus couramment utilisés sont les dérivés de la GFP (*Green Fluorescence Protein*) dont la découverte par Osamu Shimomura, l'encodage par Martin Chalfie et les nombreux dérivés (**Figure 5**) et applications proposés par Roger Tsien ont été récompensés d'un prix Nobel en 2008.<sup>[10]</sup> Lors de la conférence qu'il a donnée à la réception de son prix, R. Tsien a expliqué que son but lors du développement de ces dérivés de GFP était de pouvoir aller étudier les cellules vivantes avec un minimum de deux fluorophores possédant des longueurs d'ondes d'absorption et d'émission distinctes, de préférence dans le visible.<sup>[11]</sup>

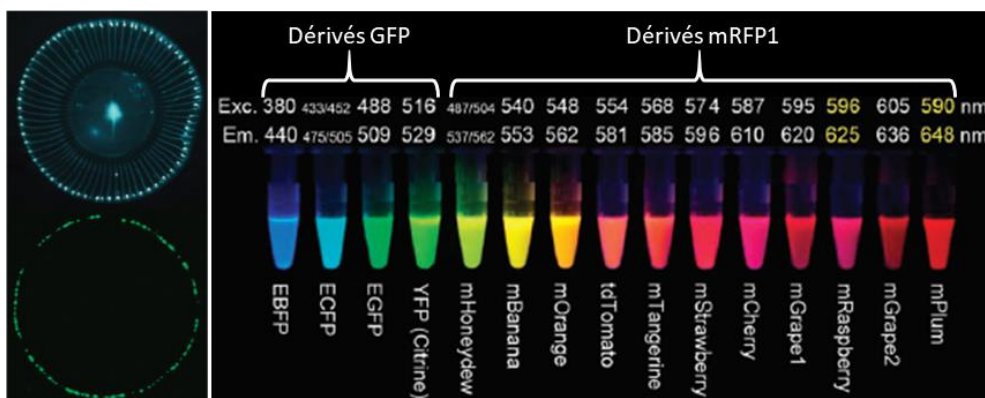


Figure 5 : (gauche) Photographie de la méduse *Aequorea victoria* d'où a été extraite la GFP, sous lumières blanches (haut) et UV (bas). Images d'O. Shimomura. (droite) Dérivés fluorescents des protéines GFP et mRFP1, série des « mFruits ». Image tirée de la conférence de la remise des prix Nobel donnée par R. Tsien.<sup>[11]</sup>

Grâce à leur structure en tonneau, les dérivés de GFP génèrent spontanément un fluorophore par cyclisation puis par oxydation en présence d'oxygène (**Figure 6**). Les suivis de ces fluorophores sont à l'origine d'importantes avancées en biologie cellulaire, ayant permis d'étudier l'expression de nombreux gènes et la localisation d'innombrables protéines dans l'espace et dans le temps. Cette méthode d'analyse est puissante car elle ne laisse pas la place au doute : l'apparition de la fluorescence des dérivés de GFP correspond à l'activation du gène ou à l'encodage de la protéine cibles sans quoi elles ne sont pas présentes dans le milieu biologique.

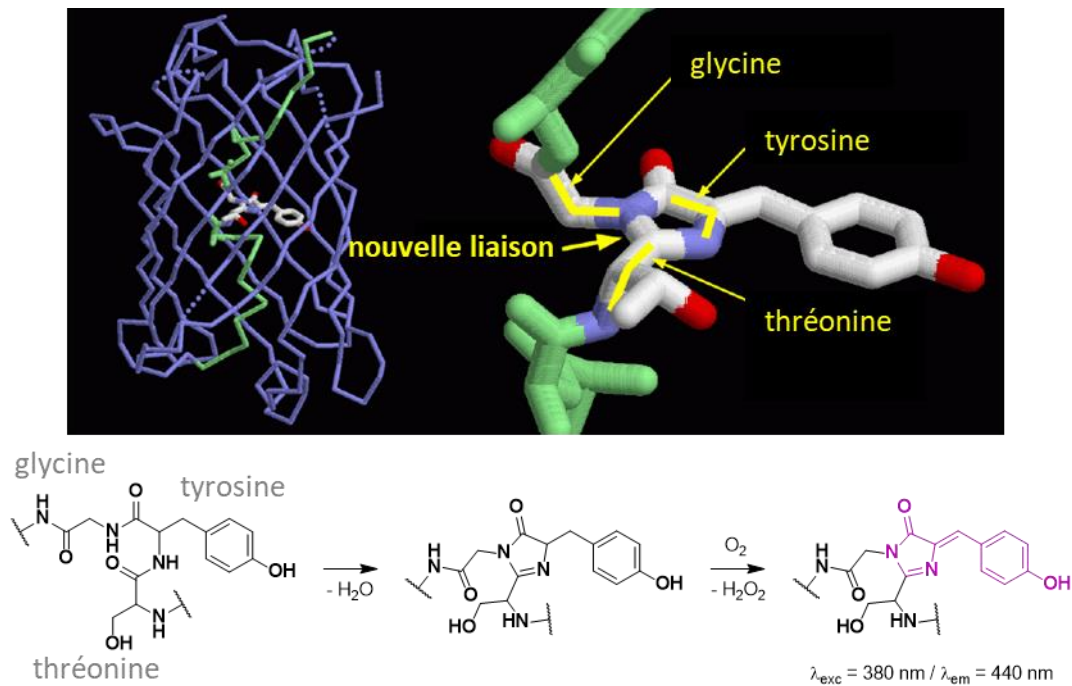


Figure 6 : Structures en baril de la GFP et de son fluorophore<sup>[12]</sup> et réactions de cyclisation puis d'oxydation spontanées pour la formation dudit fluorophore (en violet).<sup>[11]</sup>

Travailler avec une protéine garantit la compatibilité de la sonde fluorescente avec le milieu biologique mais, bien qu'il ait un intérêt incontestable en recherche fondamentale, l'emploi des dérivés de GFP est limité à l'imagerie cellulaire. Premièrement, une protéine aussi grande ne peut diffuser au travers de la membrane cellulaire, il est nécessaire que ces protéines soient directement encodées dans les cellules à étudier ce qui requiert de solides connaissances en génétique et en biologie et qui limite une fois encore son champ d'applications aux cellules. Deuxièmement, la taille des dérivés de GFP (environ 230 acides aminés, soit 27 kDa) peut encombrer les protéines auxquelles ils sont greffés et potentiellement interférer avec leur environnement et donc leur bon fonctionnement.<sup>[11]</sup> Troisièmement, si les protéines peuvent être modifiées par encodage d'un fluorophore directement dans leurs structures, ce n'est pas le cas de toutes les biomolécules.

Le développement d'autres outils fluorescents a donc été une nécessité pour élargir le champ d'applications de l'imagerie de fluorescence.



### 1.2.2) Fluorophores extrinsèques covalents : les rapporteurs bioconjugués

Si les protéines peuvent être modifiées par encodage d'un fluorophore directement dans leur structure, il est aussi envisageable de le faire de façon chimique. En effet, il existe plusieurs types de fonctions réactives dans les acides aminés des protéines qui peuvent servir à greffer un ou plusieurs fluorophores à leur surface où ces fonctions réactives sont accessibles au solvant.<sup>[13-15]</sup> Les modifications chimiques des biomolécules par un fluorophore extrinsèque présentent les avantages d'introduire une faible perturbation tardive dans la structure des biomolécules (en y greffant de « petits » fluorophores) et de pouvoir travailler avec un large ensemble de molécules dont les propriétés spectroscopiques sont modulables indépendamment de la cible à étudier.

Pour que cette approche soit viable, il est préférable que les propriétés du fluorophore utilisé ne varient pas une fois couplé à la biomolécule, que ce fluorophore soit facilement synthétisé (voire commercial) et qu'il soit lié de façon forte à sa cible, donc généralement de façon covalente. Ces modifications covalentes de biomolécules reposent sur les réactions dites « click ». Elles sont caractérisées par de bons rendements, des régiosélectivités et idéalement des stéréosélectivités importantes, des cinétiques de réaction rapides, leurs compatibilités et leurs stabilités en le milieu biologique (dans l'eau, à pH neutre et à 37°C) et de faibles quantités de sous-produits, non-toxiques de préférence.<sup>[16]</sup>

Parmi ces réactions click, se retrouvent principalement des réactions de la chimie du soufre (réactions de substitution, thio-maléimide ou encore d'échange entre des ponts disulfures), de l'azote (réactions de substitution, oxime, ou encore avec un isocyanate) et éventuellement de l'oxygène (réactions de substitution).<sup>[13-15]</sup>

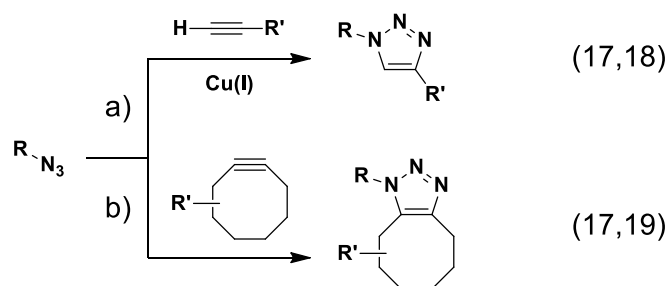
Les fonctions chimiques des biomolécules sont cependant ubiquitaires et limitées, résultant en un marquage potentiellement hétérogène, peu spécifique. Les réactions bioorthogonales ont alors été développées pour pallier ce problème.<sup>[16,17]</sup> Par définition, ce sont des réactions chimiques « transparentes » au milieu biologique, c'est-à-dire qu'elles se font de façon chimiosélective entre deux fonctions chimiques discrètes (qui n'interagissent pas) en milieu biologique. Parmi les réactions de click bioorthogonales, se retrouvent entre autres les cycloadditions de Huisgen (avec et surtout sans cuivre), les réactions de Diels-Alder, ou encore les réductions de Staudinger (**Schéma 1**).

Ces méthodes de marquage fluorescent plus sélectives requièrent cependant la modification préalable et spécifique d'un site biologique donné. En effet, les fonctions chimiques réactives étant toutes deux extérieures aux systèmes biologiques, l'une d'elle doit d'abord être introduite sur la cible à étudier avant de pouvoir y greffer un fluorophore possédant l'autre fonction. Cette introduction peut se faire de façon chimique, *via* les réactions click mentionnées ci-dessus,<sup>[13,15]</sup> ou de façon enzymatique en tirant parti de sélectivité de la machinerie moléculaire des milieux biologiques.<sup>[16]</sup>

**Cycloadditions de Huisgen :**

a) catalysée au cuivre

b) promue par cycle contraint

**Réactions de Diels-Alder :**

a) à demande normale

b) à demande inverse

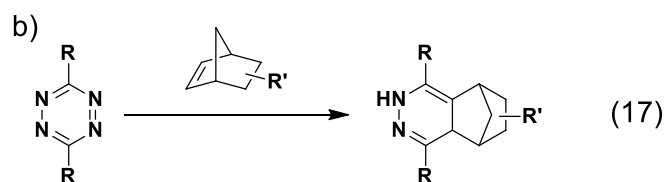
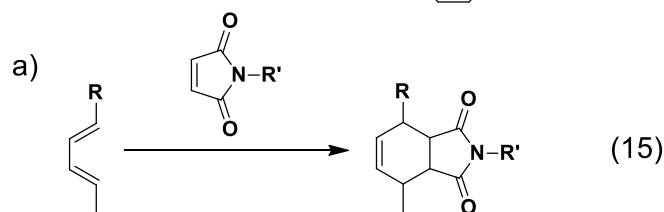
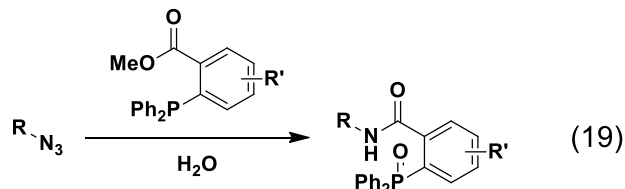
**Réduction de Staudinger**

Schéma 1 : Exemples de réactions click bioorthogonales.

Ces réactions sont particulièrement utilisées pour le marquage covalent des protéines mais également pour le marquage d'autres biomolécules comme les bases azotées de l'ADN, les lipides ou les glycanes.<sup>[16-19]</sup>

### 1.2.3) Fluorophores extrinsèques non-covalents : une approche de la cible à la molécule par criblage haut-débit de fluorescence

Pour parvenir à un marquage fluorescence spécifique dans les milieux biologiques, il est nécessaire que le fluorophore soit directement lié à sa cible, comme pour les dérivés des GFP qui sont encodé sur cette cible, ou qu'il soit greffé à une molécule responsable de la sélectivité. Dans ce second cas, les propriétés de fluorescence et de sélectivité sont généralement modulées indépendamment ; les sondes sont alors conçues comme le produit de couplage chimique entre un fluorophore et un ligand sélectif de la cible à étudier, séparés par un bras espaceur.

Par exemple, les anticorps sont des biomolécules dont la fonction principale est la reconnaissance spécifique dans les milieux complexes des êtres vivants. Les immuno-essais fluorescents tirent profit de cette biocompatibilité et de cette très haute spécificité des anticorps auxquels ont été préalablement conjugués des fluorophores pour en faire des sondes fluorescentes performantes en milieu complexe (**Figure 7**). Ces méthodes de détections précises peuvent être automatisées, cependant, les anticorps ne pouvant traverser la membrane des

cellules, leurs applications sont limitées à des marquages fluorescents en cuvette ou à l'extérieurs des cellules.

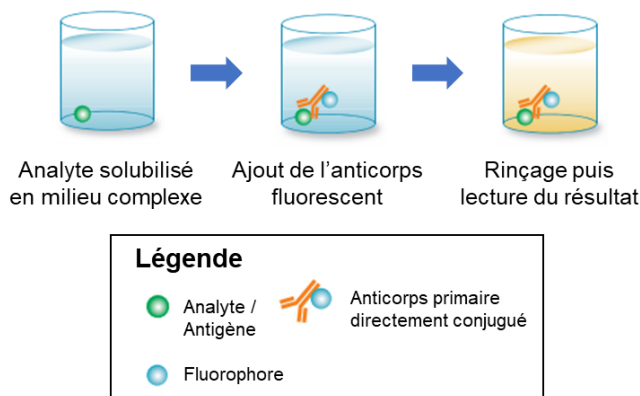


Figure 7 : Principe de détection des analytes par les immuno-essais fluorescents.

Pour réaliser un marquage fluorescent intra-cellulaire, seules les sondes covalentes ont été évoquées jusqu'à présent, or ces approches covalentes nécessitent la modification préalable de la cible (par la protéine fluorescente ou par une fonction chimique) ce qui ne les rend pas transposable à l'imagerie médicale. Il est donc nécessaire de développer de petites molécules fluorescentes capables de diffuser dans tout le sujet d'étude puis au travers des membranes cellulaires, contrairement aux anticorps, avant de s'accumuler à un point donné de la cellule grâce à des interactions ou des mécanismes spécifiques.

Comme pour les immuno-essais fluorescents, la qualité d'un marquage repose sur la sélectivité du ligand pour sa cible. En suivant ce raisonnement, il est nécessaire qu'un ligand sélectif de la cible ait été décrit préalablement dans la littérature et c'est la grande limite de cette approche. Il existe pourtant des études qui s'affranchissent de ce problème, en étudiant des cibles pour lesquelles aucun ligand sélectif n'est décrit dans la littérature. Ces sondes sont construites *via* une approche par fragments divergents.<sup>[20]</sup> La synthèse de sondes par fragments divergents repose sur la construction d'une librairie de petites molécules en trois étapes. Un fragment fluorescent comportant un groupement chimique facilement fonctionnalisable est dérivé en plusieurs molécules avec une grande variété de fonctions chimiques jusqu'à obtention de la librairie, ou « kit », de sondes multi-usage. Cette librairie est ensuite confrontée à un vaste ensemble d'analytes par criblage haut-débit (**Figure 8**).

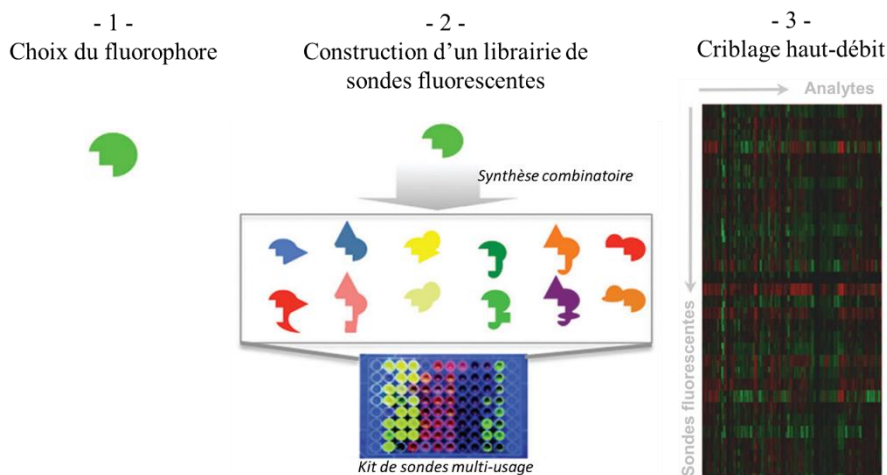


Figure 8 : Grandes étapes du développement de sondes fluorescentes par l'approche criblage haut-débit.<sup>[20]</sup>

Ces approches par fragments divergents présentent l'avantage de pouvoir mettre en évidence des ligands multi-cibles ou de mettre en lumière de nouvelles relations structures-fonctions chez des protéines en proposant des structures de ligands inédites pour celles-ci. Ces découvertes sont possibles car l'approche table sur la grande variété des analytes étudiés par criblage haut-débit automatisé et la diversité structurelle des librairies. Son grand défaut est donc qu'elle nécessite la synthèse d'un vaste ensemble de molécules pour une même étude et en fait une approche minoritaire des synthèses de sondes fluorescentes de la littérature.

### 1.3) Sondes pro-fluorescentes

Les outils fluorescents décrits précédemment sont puissants car ils permettent de donner de nombreuses informations spatiales sur des phénomènes structurels à diverses échelles (de la cellule au corps entier). Cependant, ils ne permettent pas d'obtenir d'informations sur la fonction des cibles ni sur d'éventuelles variations dans le temps.

Contrairement aux outils fluorescents, les sondes pro-fluorescentes sont sensibles à un phénomène environnemental, cette sensibilité se traduit généralement par une variation de l'intensité de fluorescence ou de la longueur d'onde maximum d'émission de la sonde. Ces variations permettent de collecter des informations à la fois sur la topologie (structure) et sur la physiologie (fonction et fonctionnement) des milieux où elles sont enregistrées. La pertinence des informations collectées, donc de la mesure, repose sur le choix du phénomène auquel est sensible cette sonde.

Les images enregistrées à l'aide de sondes pro-fluorescentes ont également de meilleurs rapports signal-sur-bruit et donc, dans le cas de la biologie cellulaire, leur utilisation ne nécessite aucun lavage des milieux de culture après incubation avec la sonde. Pour ces raisons, l'emploi des sondes pro-fluorescentes est envisagée en imagerie médicale, souvent mentionnées comme « *smart probes* ». Leur développement est cependant plus lent et laborieux qu'en biologie à cause du nombre plus important de contraintes associées à l'imagerie médicale.<sup>[4]</sup>

Ces sondes pro-fluorescentes ont largement fait leurs preuves en recherche fondamentale en biologie cellulaire et tissulaire. Cette introduction ne cherche donc en aucun cas à dresser une liste exhaustive des sondes de la littérature ; elle vise à mettre en avant les principaux modes de pro-fluorescence mis au service de l'imagerie cellulaire ainsi que la grande diversité de ces phénomènes biologiques à imager.

#### 1.3.1) Des sondes par couplage ligand-fluorophore

Pour parvenir à un marquage fluorescent sélectif dans un milieu complexe, les « petites » sondes doivent comporter un motif de reconnaissance responsable de cette sélectivité. Ces sondes sont généralement conçues comme le produit de couplage chimique entre un fluorophore et un ligand sélectif de la cible à étudier, tous deux séparés par un bras espaceur, permettant ainsi de moduler indépendamment la fluorescence de la sélectivité de la sonde.

Pour que les mécanismes de pro-fluorescence soient efficaces, la reconnaissance du ligand par sa cible doit être à l'origine des variations des propriétés de fluorescence de la sonde. L'ensemble des mécanismes de pro-fluorescence peuvent être rassemblés en deux catégories selon la façon dont le ligand interagit avec sa cible (**Figure 9**) : soit par formation d'un complexe stable entre le ligand et la cible (approche coordination), soit par un changement dans la structure chimique de la sonde induit par cible (approche réactivité).

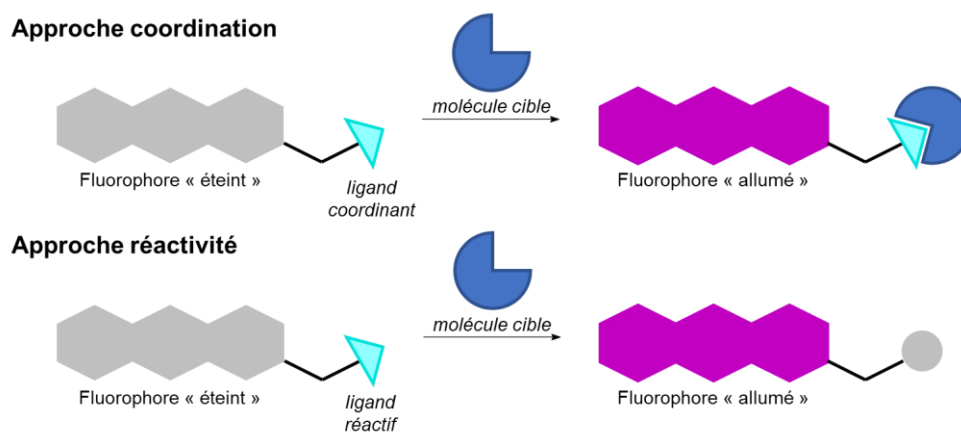


Figure 9 : Approches générales de la pro-fluorescence : coordination et réactivité.

En se basant sur ces deux approches générales de la fluorescence, la suite de cette introduction cherchera à expliciter les mécanismes de pro-fluorescence les plus récurrents de la littérature, illustrés par quelques exemples de sondes sélectives pour démontrer la variété des combinaisons possibles entre le mode de pro-fluorescence et les cibles biologiques étudiées.

### 1.3.1.1) Transferts d'énergie par résonance de type Förster

Un mode de pro-fluorescence récurrent est basé sur le transfert d'énergie par résonance de type Förster (*Förster Resonance Energy Transfer*, FRET).<sup>[21]</sup> Le principe du FRET repose sur l'emploi d'au moins une paire de chromophores, comprenant un donneur et un accepteur, et pour laquelle au moins le donneur est un fluorophore, l'accepteur pouvant être un fluorophore comme un quencher. Pour que le transfert d'énergie soit possible, il doit y avoir recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et celui d'absorption de l'accepteur (**Figure 10**).

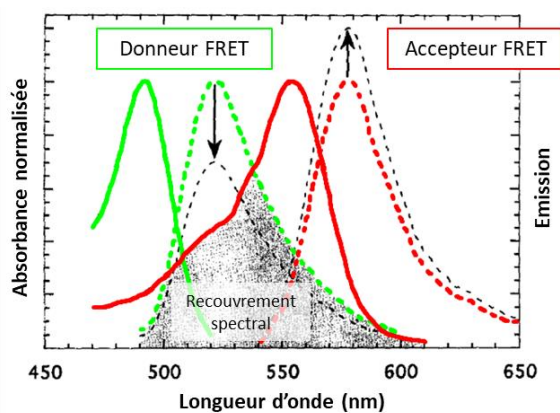


Figure 10 : Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (pointillés) d'une paire FRET : exemple de la fluorescéine (vert) et de la rhodamine (rouge). Représentation du recouvrement spectral entre l'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur (aire grise) et de l'influence de leur rapprochement spatial sur leurs spectres d'émission respectifs (flèches et traits pointillés noir).<sup>[21]</sup>

L'efficacité du FRET est dépendante de l'orientation relative des deux chromophores et surtout de leur proximité spatiale (d'une à quelques dizaines d'angströms selon les paires). Au cours du rapprochement des deux chromophores, le transfert d'énergie se caractérise par l'extinction progressive de la fluorescence du donneur (intensité et temps de vie) et, dans le cas où l'accepteur est également un fluorophore, cette diminution se fait au profit de l'augmentation de la fluorescence de l'accepteur (**Figure 10**).

Ce mode de transfert d'énergie a permis de nombreuses études des distances au sein du milieu biologique ainsi que des études de colocalisation, de repliement moléculaire ou de forces atomiques.<sup>[21-23]</sup> Dans ces cas-là, l'approche de la pro-fluorescence est basée sur la coordination ligand-cible et donc le rapprochement spatial de deux éléments du complexe chacun libellé avec le donneur ou l'accepteur FRET, se traduisant généralement par une augmentation de la fluorescence de l'accepteur et l'extinction éventuelle de celle du donneur (**Figure 11**).

Heyduk et Lee ont, par exemple, proposé une sonde ADN pro-fluorescente pour l'étude de la formation du complexe entre le récepteur à AMP cyclique (cAMP) et une séquence ADN sélective (**Figure 11**). La sonde **1** est substituée par une coumarine commerciale dont l'intensité de fluorescence est augmentée par FRET depuis les tryptophanes de la protéine cible lors de la formation du complexe protéine-ADN. Outre la difficulté synthétique des ADN, les auteurs estiment que leur méthode de synthèse de sondes pro-fluorescentes est généralisable pour l'étude de la complexation protéine-ADN.<sup>[24]</sup>

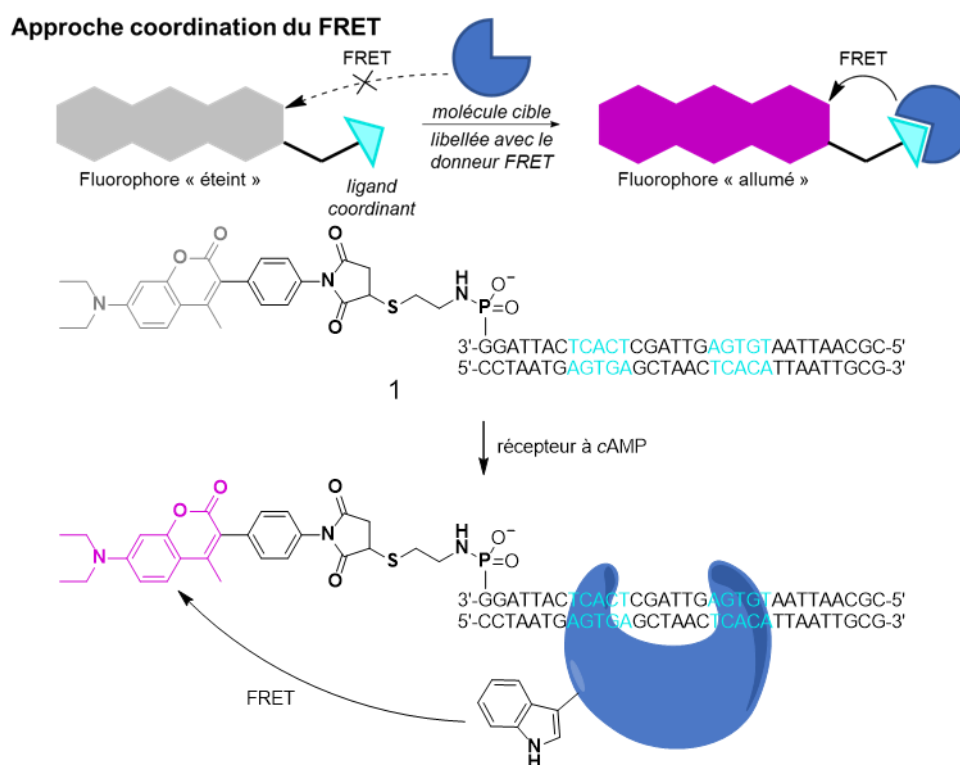


Figure 11 : Principe de fonctionnement d'une sonde pro-fluorescente par FRET selon l'approche coordination et exemple pour l'étude de la complexation protéine-ADN.

À l'inverse, certains accepteurs de FRET ne sont pas fluorescents. Cette capacité à éteindre la fluorescence d'un système est plus particulièrement exploitée pour la construction des sondes pro-fluorescentes selon une approche réactivité. Pour ces sondes, la fluorescence est restaurée

par modification de la structure de l'accepteur ou rupture du bras espaceur de la sonde et éloignement spatial des chromophores (**Figure 12**).

Dans un milieu biologique, les réactions chimiques sont catalysées et contrôlées par des enzymes. Tout comme les autres protéines, elles peuvent être étudiées à l'aide de rapporteurs fluorescents comme décrit précédemment (cf. **1.2**) p. 28) mais, les enzymes n'étant pas actives en permanence, l'emploi d'un rapporteur fluorescent conduit à une perte d'information aussi bien sur la localité que sur la temporalité de son activité catalytique. Cette perte d'informations a pu être compensée en imageant ces enzymes à l'aide de sondes pro-fluorescentes, et notamment grâce à l'approche décrite ci-dessus, expliquant le nombre important et toujours croissant de ces études.<sup>[25–27]</sup>

Pour ne citer qu'un exemple, l'équipe de Zhang a synthétisé une sonde pro-fluorescence **2** pour imager les cellules cancéreuses par colocalisation spatiotemporelle de deux enzymes : la caspase-3 et la métalloprotéinase matricielle 2 (MMP-2, **Figure 12**). Cette sonde est le résultat de l'accolement de deux séquences peptidiques spécifiques de l'une ou l'autre des enzymes, ainsi que trois chromophores distincts, dont deux fluorophores éteints par FRET en cascade. Cette sonde **2** permet la restauration du signal de l'un ou l'autre ou des deux fluorophores en fonction de la présence ou non de ces enzymes actives qui clivent sélectivement la sonde.<sup>[28]</sup>

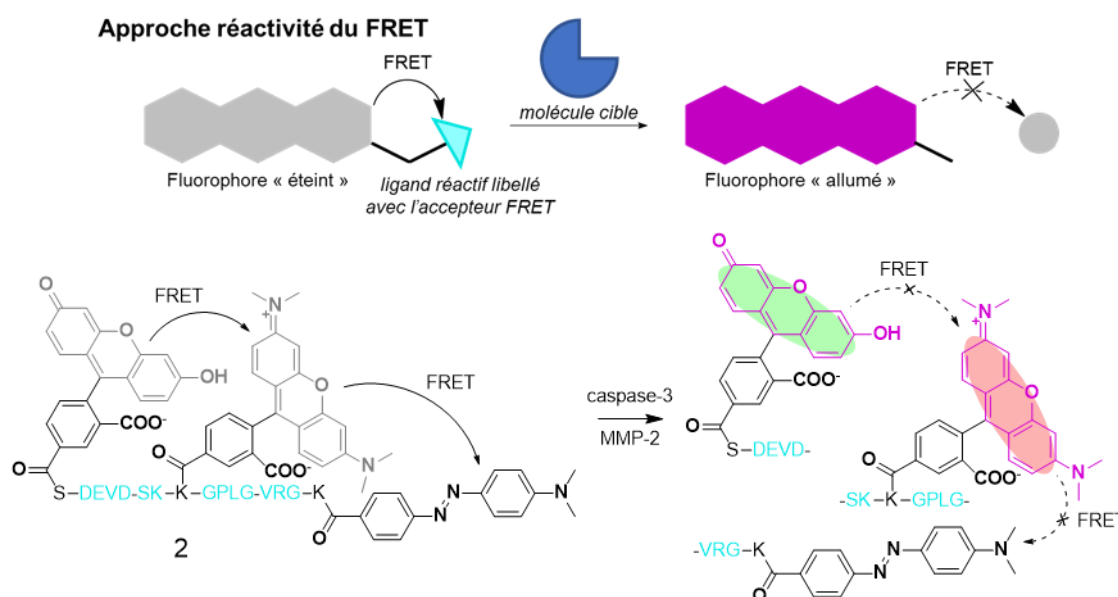


Figure 12 : Principe de fonctionnement d'une sonde pro-fluorescente par FRET selon l'approche réactivité et exemple pour la colocalisation de l'activité enzymatique de caspase-3 et MMP-2.

### 1.3.1.2) Transferts d'électron photoinduits

Le transfert d'électron photoinduit (*Photoinduced Electron Transfer*, PET) repose sur une réaction d'oxydo-réduction à l'état excité, nécessitant sur une paire de donneur-accepteur pour laquelle le potentiel énergétique du donneur doit être légèrement supérieur à celui de l'accepteur. Contrairement au FRET, dans cette paire, un seul fluorophore est nécessaire. Que le fluorophore soit le donneur ou l'accepteur de PET, la réduction ou l'oxydation qui a lieu depuis son état excité entre en compétition avec les autres voies de désexcitation, notamment la fluorescence, résultant en un mécanisme d'extinction plus ou moins efficace de ces autres voies dépendant de l'efficacité du PET.

Les cellules sont composées d'un ensemble très large d'ions, qu'ils aient un rôle de maintien du potentiel électrostatique du milieu et de son pH, ou qu'ils aient un rôle signalétique ou encore catalytique au sein d'enzymes. Cependant, il existe de nombreux métaux de transition présents hors de complexes protéiques dont les fonctions dans les milieux biologiques sont peu connues, les chercheurs s'intéressent donc depuis longtemps à l'imagerie sélective des métaux circulants qui reste aujourd'hui encore un défi pour certains.<sup>[29-31]</sup>

Les réactions d'oxydo-réductions reposent sur des concepts familiers pour les chimistes, notamment lorsqu'il est question de la réactivité des complexes organométalliques. Pour synthétiser des sondes pro-fluorescentes sélectives, il a été question de coordonner ces ions cellulaires, et plus particulièrement les métaux.

Pour construire une sonde sélective de l'ion cuivreux, Zeng *et al.* ont retenu l'approche coordination en couplant un complexant sélectif de ce dernier à un fluorophore de type BodyPy (**Figure 13**). La pro-fluorescence de cette sonde **3** repose sur un mécanisme de transfert d'électron à l'état excité : en absence de l'ion cuivreux, la fluorescence du complexe de bore **3a** est éteinte par PET depuis l'atome d'azote du ligand ; en présence de l'ion, le doublet non liant de l'atome d'azote est impliqué dans la coordination du métal, diminuant l'efficacité du PET et restaurant la fluorescence de la BodyPy **3b** (**Figure 13**).<sup>[32]</sup>

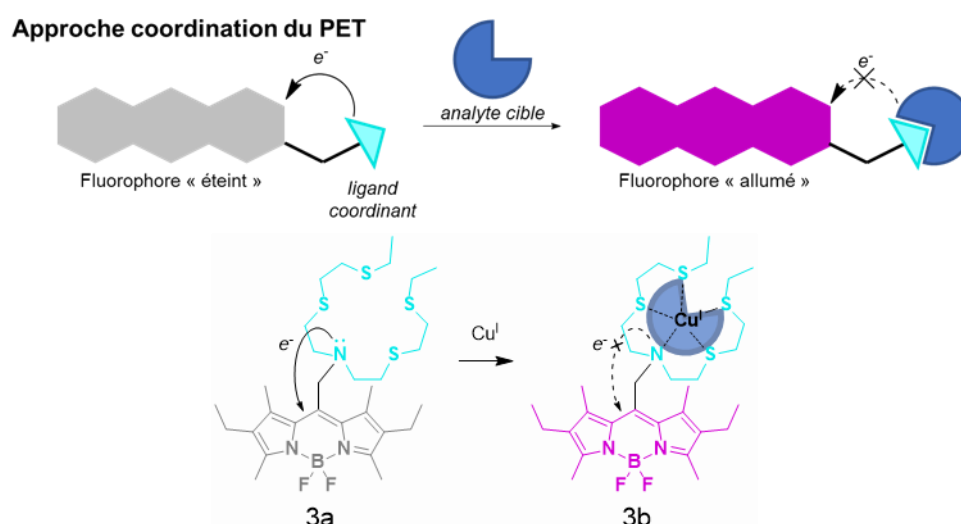


Figure 13 : Principe de fonctionnement d'une sonde pro-fluorescente par PET selon l'approche coordination et exemple pour la détection spécifique de l'ion cuivreux.

Outre les enzymes qui catalysent les réactions, il existe également des petites molécules réactives en milieu biologique, comme les métaux mentionnés précédemment ou encore les espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS), de l'azote et du soufre. Ces dernières sont hautement réactives vis-à-vis de leur environnement proche et sont normalement synthétisées de façon extrêmement contrôlée par le milieu. Étudier ces molécules réactives est un enjeu en biologie car, leurs concentrations étant strictement régulées, une variation de ces concentrations peut être un marqueur de déséquilibre ou l'origine d'une pathologie.<sup>[25,29,33,34]</sup>

Entre les années 2000 et 2010, l'équipe de Nagano a rationalisé et synthétisé une grande variété de sondes réactives pro-fluorescentes à partir de fluorescéines ou de rhodamines dans le but d'imager les ROS responsables des stress oxydants. Pour imager le peroxyde d'hydrogène,



leur sonde **4** a été construite autour d'une fluorescéine dont les substituants réagissent sélectivement par clivage oxydant avec celui-ci. La fluorescence de la sonde **4a** est éteinte par PET de la fluorescéine vers ses substituants puis restaurée après réaction (**Figure 14**).<sup>[35]</sup>

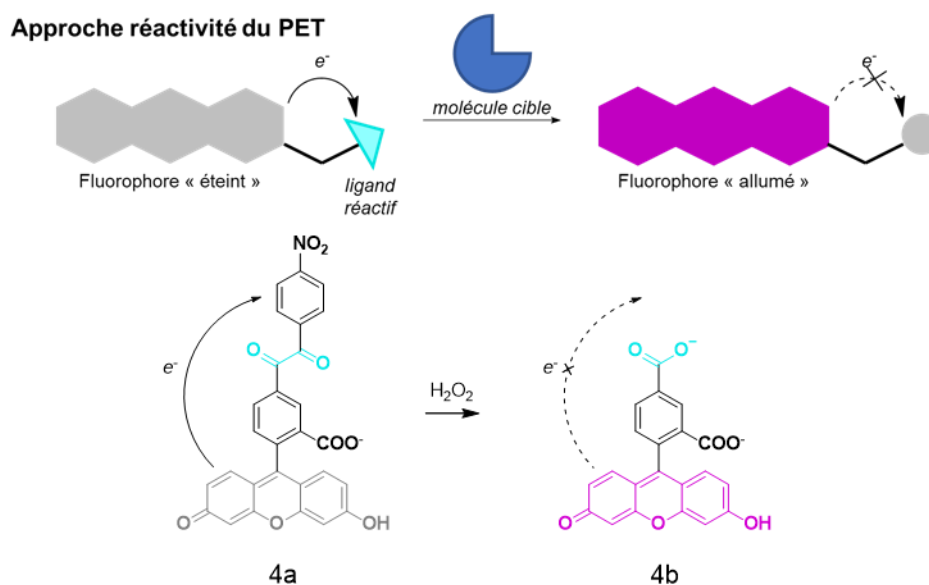


Figure 14 : Principe de fonctionnement d'une sonde pro-fluorescente par PET selon l'approche réactivité et exemple pour la détection spécifique du peroxyde d'hydrogène.

### 1.3.1.3) Réarrangements intramoléculaires

Contrairement aux deux modes de pro-fluorescence précédents, l'approche réarrangement moléculaire ne peut reposer que sur l'approche réactivité. Ces sondes fonctionnent sur le principe de rupture d'une à plusieurs liaisons covalentes de la sonde, conduisant à des réarrangements intramoléculaires et à une augmentation de la fluorescence de la sonde par retour de conjugaison ou par réaromatation du système.

Comme mentionné précédemment, l'équipe de Nagano a synthétisé une grande variété de sondes pro-fluorescentes par l'approche réactivité pour l'imagerie sélective des ROS. Un des modes de pro-fluorescence qu'ils ont notamment exploité est le réarrangement intramoléculaire. Une série de sondes avec un fluorophore rhodamine a été développée, sélectives grâce à leurs potentiels d'oxydo-réduction variés en fonction de leurs substituants. La conjugaison de ces rhodamines est coupée par spirocyclisation et restaurée par réaction sélective de la cible sur ce bicycle, ce retour de conjugaison s'accompagnant d'une augmentation de fluorescence. Une sonde **5** spécifique de l'acide hypochloreux a notamment été synthétisée de la sorte (**Figure 15**).<sup>[36]</sup>

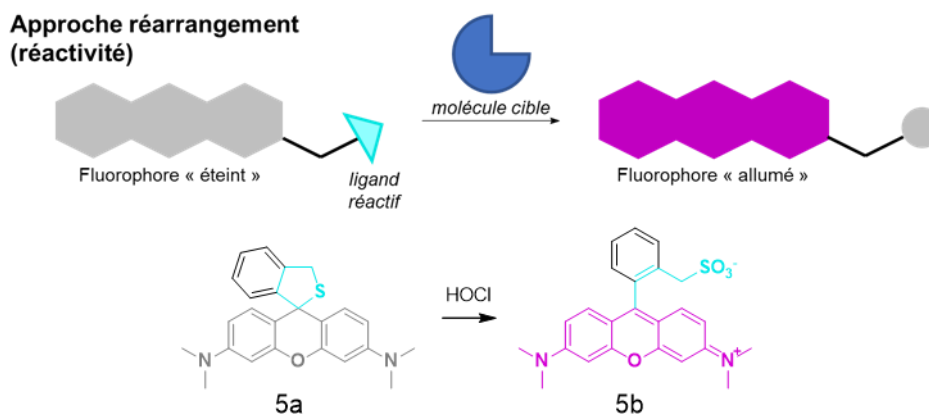


Figure 15 : Principe de fonctionnement d'une sonde pro-fluorescente par réarrangement moléculaire et exemple pour la détection spécifique de l'acide hypochloreux.

#### 1.3.1.4) Transferts de charge intramoléculaires

Pour la majorité des fluorophores organiques, la fluorescence repose sur un transfert de charge intramoléculaire (TCI) entre l'état fondamental et les états excités de la molécule. Ce transfert de charge est possible car ce sont des molécules conjuguées et dont le système  $\pi$  est polarisés par un groupement donneur d'électrons et un groupement accepteur d'électrons et il se caractérise donc par un changement dans moment dipolaire de la molécule. Ces fluorophores sont particulièrement sensibles à la polarité de leur environnement qui peut plus ou moins stabiliser l'un et/ou l'autre de ces états. Ces différences de stabilisation, et donc des écarts énergétiques entre les états fondamentaux et excités, se traduisent par du solvatochromisme, c'est-à-dire par la variation de la longueur d'onde maximum d'émission du fluorophore en fonction du solvant. La pro-fluorescence de ces sondes ne se traduit donc pas par une augmentation de l'intensité de fluorescence mais par une variation dans la longueur d'onde maximum d'émission de la sonde.

Ce mécanisme peut être à la fois employé dans l'approche réactivité de la pro-fluorescence, en augmentant chimique la force du donneur ou de l'accepteur, et dans l'approche coordination. Lors de la coordination du ligand à la cible, la variation de fluorescence est permise par la modification de l'environnement et de la polarité locale de la sonde qui passe d'un milieu aqueux à un milieu plus apolaire lorsqu'elle est coordonnée aux biomolécules cibles (**Figure 16**). Cette approche coordination de la pro-fluorescence peut être utilisée que la cible biologique soit réactive ou non. En effet, il existe de nombreux composants cellulaires et certaines ne sont notamment pas réactifs comme les protéines qui n'ont pas d'activité enzymatique, les lipides (qui composent les membranes) ou les oses (qui composent les peptidoglycanes, l'ADN ou encore l'ARN).

Ainsi, Danylchuk *et al.* ont été capable d'imager à haute résolution l'ordre lipidique à la surface des membranes plasmiques. Pour ce faire, ils ont couplé le rouge de Nile (*Nile red*), un fluorophore absorbant et émettant autour de 600 – 650 nm, à un surfactant à chaîne carbonée courte. Cette chaîne courte permet l'échange de la sonde à la surface membranaire, permettant d'acquérir leurs images en haute résolution (**6, Figure 16**).<sup>[37]</sup>

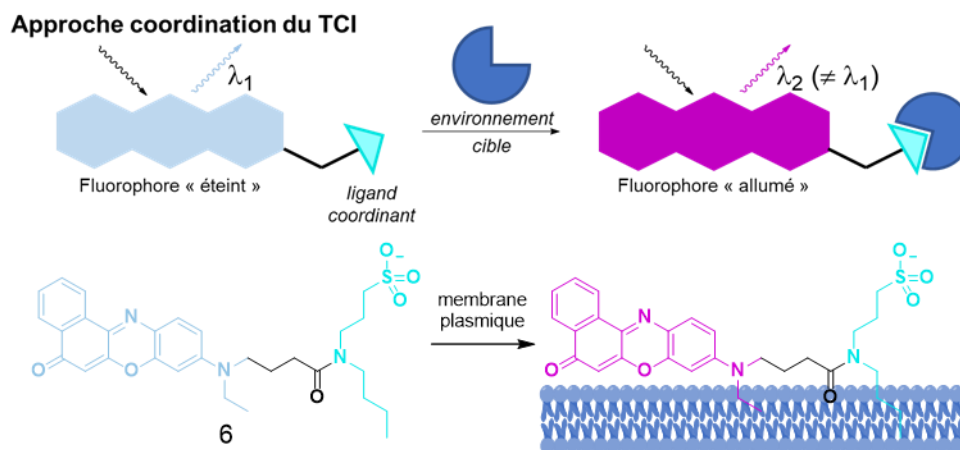


Figure 16 : Principe de fonctionnement d'une sonde pro-fluorescente par TCI selon l'approche coordination et exemple pour l'imagerie de l'organisation membranaire.

Comme mentionné précédemment, ce mode de pro-fluorescence peut être aussi employé dans l'approche réactivité de la pro-fluorescence en augmentant la force du donneur ou de l'accepteur par modification chimique (**Figure 17**). Cette approche a notamment été exploitée pour sonder le pH intracellulaire. Ces sondes à pH sont principalement inspirées de la structure des tyrosines dont le  $pK_a$  peut varier entre 9 et 4 en fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent. En greffant un groupement électro attracteur et en jouant sur la substitution du phénol, il est ainsi possible d'obtenir une sonde fluorescente telle que **7a** dont le  $pK_a$  est proche de la neutralité et qui est déprotonée en milieu plus basique, augmentant la densité électronique de la sonde et donc la force de son transfert de charge (**Figure 17**).<sup>[38]</sup>

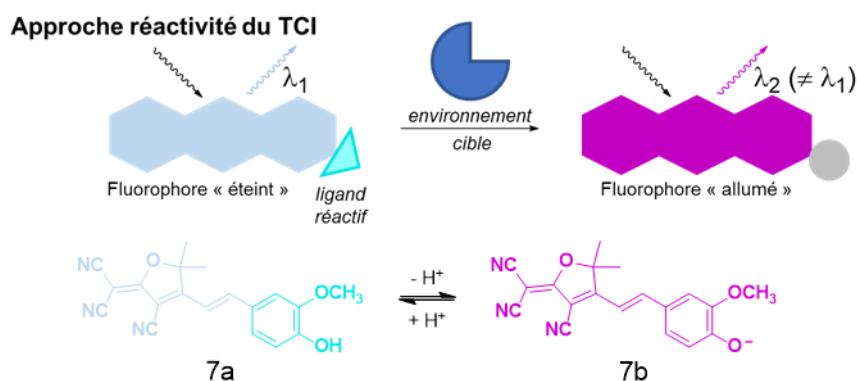


Figure 17 : Principe de fonctionnement d'une sonde pro-fluorescente par TCI selon l'approche réactivité et exemple pour l'imagerie de fluorescence du pH intracellulaire.

### 1.3.1.5) Sondes conformationnelles

Enfin, il existe un dernier mode de pro-fluorescence reposant sur la planéité du système  $\pi$  conjugué du fluorophore, cette approche de la pro-fluorescence étant basée uniquement sur la coordination entre la sonde et sa cible. Les sondes pro-fluorescentes construites sur ce principe sont sensibles à la viscosité et à l'encombrement stérique de leur environnement. Ces molécules, aussi appelées « sondes conformationnelles », possèdent au minimum une liaison (et éventuellement une liaison double) exocyclique autour de laquelle les substituants peuvent tourner en absence de contrainte, favorisant des voies de désexcitation non-radiatives qui éteignent leur fluorescence. Ces voies seront plus amplement développées par la suite

(cf. **1.4**) p. 46). La fluorescence de ces sondes est restaurée lorsque leurs rotations sont restreintes par la viscosité ou l'encombrement de leur environnement local (**Figure 18**).<sup>[39]</sup>

Il existe plusieurs sondes pro-fluorescentes commerciales fonctionnant de la sorte parmi lesquels se trouvent la Thioflavine T **8** (ThT), pour l'imagerie sélective des fibrilles et des plaques amyloïdes impliquées dans de nombreuses pathologies (dont la maladie d'Alzheimer),<sup>[40]</sup> et la sonde PicoGreen<sup>®</sup> **9** développée par l'équipe de Geddes, pour l'imagerie de fluorescence sélective de l'ADN (**Figure 18**).<sup>[41]</sup> Il est intéressant de noter que dans ces deux cas, la nature chargée et aromatique des fluorophores joue un rôle quant à l'implication totale (ThT **8**) ou partielle (PicoGreen<sup>®</sup> **9**) du fluorophore dans la coordination de la sonde à la cible.

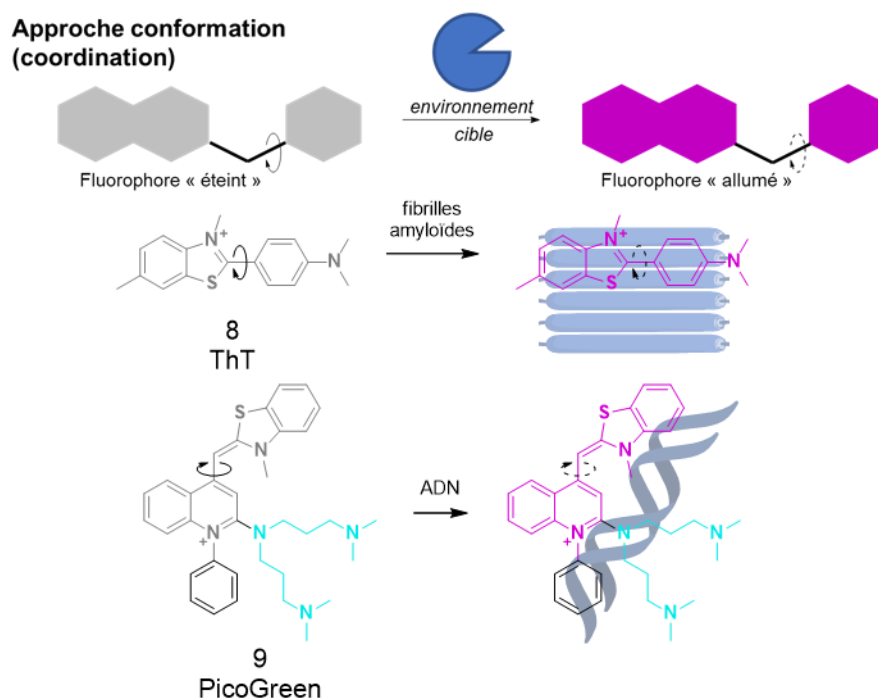


Figure 18 : Principe de fonctionnement et exemples de sondes conformationnelles pro-fluorescentes.

Le motif responsable de la fluorescence de PicoGreen<sup>®</sup> **9** est le thiazole orange. En se basant sur ses propriétés de pro-fluorescence en milieu restreint, Lai *et al.* proposent une approche plus générale de construction de sondes pro-fluorescentes **10** par couplage d'un ligand spécifique et du thiazole orange par une liaison amide. Leur preuve de concept a permis de synthétiser une sonde pro-fluorescente spécifique de l'enzyme anhydrase carbonique II (CA(II), **Figure 19**).<sup>[42]</sup>

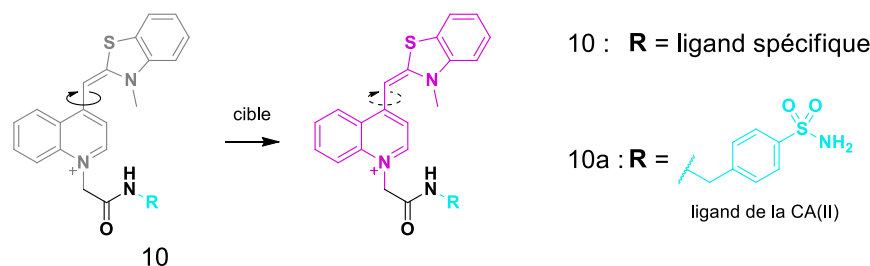


Figure 19 : Approche générale de la synthèse de sondes conformationnelles pro-fluorescentes à partir du thiazole orange et preuve de concept pour détection spécifique de la CA(II).

Pour conclure, il existe de nombreux mécanismes de pro-fluorescences que les chimistes peuvent mettre au service de l'imagerie de fluorescence cellulaire ou tissulaire et il existe une

variété encore plus grande de phénomènes biologiques à imager. Afin de déterminer la ou les combinaisons les plus efficaces pour synthétiser une sonde, il est nécessaire d'avoir à la fois un certain nombre d'informations sur la cible biologique et son environnement, des connaissances sur les réactions chimiques sélectives servant à déclencher ces sondes, ainsi que les propriétés optiques des fluorophores en milieu organique. Le rassemblement de ces connaissances nécessaires à la synthèse de sondes pro-fluorescentes ne fait généralement pas sans collaborations interdisciplinaires.

### 1.3.2) Des sondes par modification de molécules bioactives

Si les outils fluorescents présentés précédemment étaient limités par leurs longueurs d'onde d'absorption et d'émission (trop éloignées de la fenêtre de transparence du milieu biologique) ou la taille conséquente du rapporteur, il en va de même pour les sondes pro-fluorescentes décrites ci-dessus. L'introduction d'un fluorophore sur un ligand spécifique peut conduire à un certain nombre de modifications de son métabolisme, de sa distribution, de sa perméabilité membranaire, de ses constantes d'association ou d'activité *in vivo* ou encore sur sa toxicité. De plus, le ligand peut également influencer les propriétés du fluorophore. Ces constats sont d'autant plus marqués sur les petites molécules comme, par exemple, PicoGreen® **9** dont le fluorophore est partiellement impliqué dans l'interaction avec l'ADN. Ainsi, bien que l'approche couplage ligand-fluorophore paraisse simple, efficace et généralisable, les exemples de la littérature sont souvent revus au cas par cas du fait de ces nouvelles interactions et ces modifications de métabolisme difficilement rationalisables.

Pour ces raisons entre autres, une approche différente de la construction de sondes pro-fluorescentes a été envisagée pour mon projet de thèse.

La construction de sondes par modification de molécules bioactives repose sur l'amélioration des propriétés photophysiques d'une molécule déjà sélective pour en faire une sonde fluorescente. Ces modifications doivent être minimisées, et donc pertinentes, de sorte à ne pas altérer l'activité biologique d'origine de la sonde. Ainsi, ces sondes sont généralement des isomorphes de la molécule bioactive, c'est-à-dire que leurs tailles et leurs géométries sont aussi similaires que possible.

Ce concept a été largement exploité pour la modification de molécules biologiques initialement peu ou pas fluorescentes comme les lipides, les oses, les acides aminés et les bases azotées.<sup>[43,44]</sup> Les nombreuses avancées qui ont été possibles en biologie grâce à ces sondes ont permis de valider le concept de modification de ligands bioactifs pour en faire des sondes.

Un exemple de cette approche modification de biomolécules a notamment permis d'imager l'accumulation puis la sécrétion des neurotransmetteurs dans les neurones.<sup>[45]</sup> Gubernator *et al.* ont synthétisés une sonde fluorescente **11** qui, même si elle paraît structurellement éloignée des hormones parentes (dopamine et sérotonine), conserve les caractéristiques essentielles à leur reconnaissance par les récepteurs synaptiques : une plateforme centrale de nature aromatique, un site de nature basique et la chaîne éthylamine (**11**, **Figure 20**). Ainsi, ils ont mis en évidence un certain nombre de stimuli extérieurs provoquant la libération de ces hormones avec une bonne résolution spatiale et temporelle (de l'ordre de grandeur du temps de la sécrétion).<sup>[45]</sup>



Figure 20 : Structures de la dopamine, la sérotonine et la sonde fluorescente dérivée.

Il est également envisageable de modifier des principes actifs pour jouer le rôle de sonde fluorescente, voire pro-fluorescente. Synthétiser des sondes par modification de principes actifs doit permettre d'imager directement la distribution et la localisation de l'action de ce dernier. Ces fluorophores utilisés pour suivre l'efficacité d'un traitement ou de mieux le comprendre grâce à l'imagerie sont appelés « molécules compagnons ».

Une façon de s'assurer de la sélectivité d'une sonde est de les synthétiser selon l'approche « *drug design* » de la chimie médicinale, c'est-à-dire concevoir entièrement l'inhibiteur, tout en anticipant la fluorescence du principe actif par sa structure ou celle des substituants, et ne garder que les molécules avec le meilleur compromis fluorescence-activité. Par exemple, Mah *et al.* ont obtenus des sondes fluorescentes en étudiant l'influences de la substitution de coumarines par divers hétérocycles puis divers groupement électrodonneurs sur l'affinité pour leur cible. Ainsi, ils ont pu sélectionner deux sondes avec les meilleurs compromis fluorescence-activité (**12**, **Figure 21**) et imager la distribution des récepteurs cibles à la surface membranaire.<sup>[46]</sup>

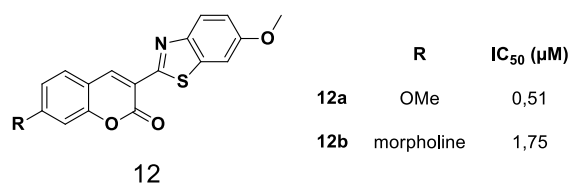


Figure 21 : Structure de la sonde **12** avec le meilleur compromis fluorescence-inhibition.

Bien que cette approche « *drug design* » puisse apparaître comme un bon compromis pour s'assurer de la sélectivité et la fluorescence de la sonde, l'approche est particulièrement coûteuse en énergie étant donné que, par définition, il est nécessaire de construire une large librairie de molécule dont il faut tester les propriétés biologiques puis y ajouter une caractérisation photo-physique complète. De plus, les exemples existants sont le plus souvent des sondes fluorescentes,<sup>[46-48]</sup> n'étant que rarement pro-fluorescentes.<sup>[49,50]</sup>

Enfin, il est envisageable de modifier des principes actifs déjà existant pour en faire des sondes compagnons. Cette approche est à ce jour moins développée dans la littérature car elle repose sur la modification de principes actifs déjà longuement optimisés et généralement brevetés. Cette optimisation intensive de la sélectivité des principes actifs est pourtant ce qui devrait permettre de pallier tout ou partie des problèmes cités pour les sondes obtenues par couplage ligand-fluorophore.

En effet, les principes actifs développés dans l'industrie pharmaceutique sont majoritairement des petites molécules, avec une grande sélectivité pour une cible donnée, construites autour de noyaux aromatiques (ou hétéroaromatiques) substitués et éventuellement

allongés par d'autres systèmes  $\pi$ . Ces groupements aromatiques sont suffisamment hydrophobes pour que la molécule puisse pénétrer et agir efficacement dans les cellules et jouent des rôles cruciaux dans leur affinité pour leur cible. Ces systèmes  $\pi$  sont également un bon point de départ pour la construction de fluorophores.

En modifiant le principe actif de façon à polariser et éventuellement étendre son système  $\pi$  conjugué avec un minimum de changements structuraux et sans altération sur les fragments responsables de sa sélectivité, il est envisageable d'obtenir une molécule à la fois ligand et fluorophore (comme la Thioflavine T **8** dont l'entièreté du système  $\pi$  est impliquée dans sa fluorescence et ses interactions, par exemple). Pour ce faire, les modifications structurales du principe actif peuvent être guidées par la modélisation moléculaire des interactions ligand-cible qui permettent de visualiser à la fois les espaces disponibles et les interactions essentielles qui ne peuvent être altérées.<sup>[51]</sup>

C'est dans cette optique que l'équipe de Wilson a développé un certain nombre de dérivés du motif 4-aminoquinazoline (en cyan, **Figure 22**), largement exploité dans la pharmacopée des inhibiteurs de protéines tyrosines kinases, comme dans le lapatinib, par exemple. Les propriétés optiques des molécules **13** ont été améliorées par ajout d'un groupement électrodonneur dans la structure et une élongation du système  $\pi$  de la sonde. La rotation possible autour de la liaison entre les groupements donneur et accepteur font de ces sondes des pro-fluorophores, dont le mécanisme sera expliqué plus loin. L'équipe de Wilson a également pu démontrer que l'altération de la structure des fluorophores à ces positions n'influence pas sur la cible biologique, ainsi, ces fluorophores inhibent bien les mêmes cibles que le lapatinib.<sup>[51]</sup>

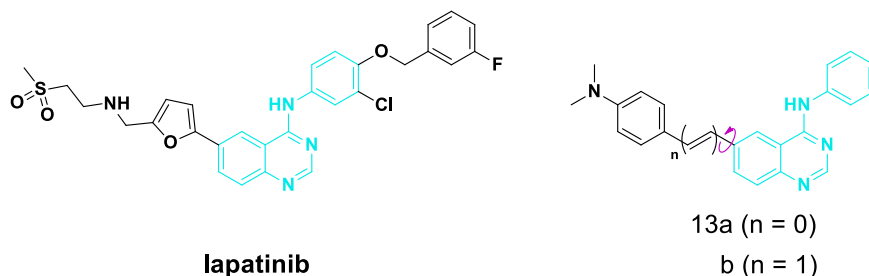


Figure 22 : Structures du lapatinib et des sondes conformationnelles dérivées, 4-aminoquinazoline (en cyan).

#### 1.4) Particularités mécanistiques des sondes conformationnelles

Un des critères d'efficacité d'une sonde fluorescente est son rendement quantique  $\Phi$  (compris entre 0 et 1), qui correspond au rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés ; plus son rendement quantique s'approche de 1, plus la sonde est dite efficace. Pour les sondes pro-fluorescentes, un critère plus important encore est la variation de son rendement quantique entre l'absence et la présence de sa cible afin de pouvoir aisément distinguer ces deux états. Dans ce cas, une grande partie de l'efficacité de leur pro-fluorescence repose sur l'efficacité des mécanismes d'extinction de leur fluorescence, c'est-à-dire la cinétique des mécanismes de désexcitation non-radiatives qui entrent en compétition avec cette dernière. En effet, le rendement quantique de fluorescence d'une molécule s'exprime également comme suit :

$$(1) \quad \Phi = \frac{k(r)}{k(r) + k(nr)}$$

Avec  $k(r)$  la constante de vitesse associée aux processus de désexcitation radiatifs (fluorescence) du fluorophore et  $k(nr)$  celle des processus non-radiatifs. Cette **Equation 1** permet facilement de mettre en évidence l'influence de la cinétique des processus non-radiatifs sur le rendement quantique de fluorescence d'une sonde. Les processus non-radiatifs englobent à la fois un retour à l'état fondamental *via* dégagement de chaleur mais aussi le phénomène de croisement intersystème qui conduit à la formation d'un état excité de multiplicité de spin triplet ( $T_1$ ) qui est généralement non-émissif pour les molécules purement organiques.

Le choix de l'emploi d'un mécanisme de pro-fluorescence plutôt qu'un autre repose principalement sur la structure et les propriétés photophysiques de la molécule de départ. Parmi les mécanismes de pro-fluorescence cités ci-dessus, celui des sondes conformationnelles (*cf.* 1.3.1.5) p. 42) peut notamment être employé pour la conception des sondes pro-fluorescentes par modification de molécules bioactives. En effet, ce mode de pro-fluorescence reposant uniquement sur la coordination de la sonde à la cible, il permet d'exploiter les caractéristiques structurales responsables de la sélectivité se retrouvant déjà sur les molécules bioactives. C'est par exemple le cas des sondes **10** présentées **Figure 19**, ou des sondes **13**, **Figure 22**.<sup>[51]</sup> C'est ce mode de pro-fluorescence qui a également retenu notre attention tout au long de ma thèse et il sera donc plus amplement détaillé dans cette partie.

La pro-fluorescence de ces sondes conformationnelles est possible grâce à l'existence d'un état excité où la molécule est « coudée » (*Twisted Intramolecular Charge Transfer, TICT*). Cette état TICT peut donner lieu à deux phénomènes physiques distincts : émission double de fluorescence ou extinction de cette dernière. L'émission double de fluorescence a d'abord été mise en évidence par l'équipe de Lippert en 1962. Ils observaient deux bandes d'émission distinctes dans le spectre de fluorescence du 4-*N,N*-diméthylaminobenzonitrile (DMABN), dont une bande à des longueurs d'ondes supérieures à celles attendues pour ce fluorophore (bande A, **Figure 23**).<sup>[52]</sup> Ce phénomène provient de la rotation du groupement diméthylamino par rapport au reste de la molécule qui donne naissance à une conformation « coudée » (**Figure 23**).

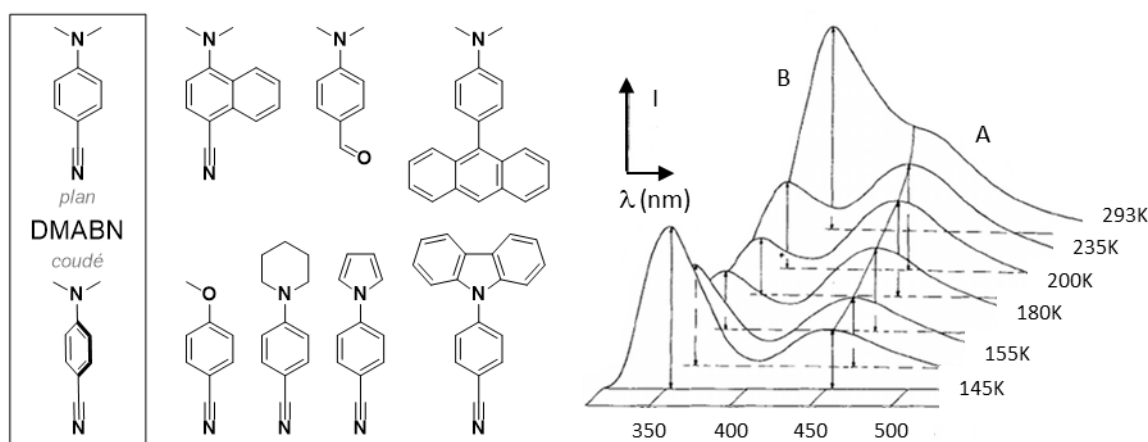


Figure 23 : Structure de molécules à double émission de fluorescence et spectre d'émission du DMABN en fonction de la température (augmentations des  $\lambda$  de la bande A et de son intensité relative à B avec, respectivement, la polarité et la viscosité du solvant).<sup>[52]</sup>



Ce phénomène de double émission a été plus amplement étudié et rationalisé par l'équipe de Grabowski dans les années 80 qui a notamment travaillé sur un ensemble de dérivés du DMABN plus ou moins contraints.<sup>[53]</sup> Leurs travaux ont permis de mettre en évidence un certain nombre de critères structurels pour ces sondes. Comme expliqué brièvement auparavant (cf. 1.3.1.5) p. 42), ces molécules possèdent au minimum une liaison autour de laquelle leurs substituants peuvent tourner librement (éventuellement accompagnée d'une liaison double exocyclique, dans le cas plus précis des sondes conformationnelles) et qui doit être impliquée dans un fort transfert de charge entre leur état fondamental  $S_0$  et leur état excité  $S_1$  (représenté par des charges partielles entre des groupements électrodonneur D et électroaccepteur A, **Figure 24**).<sup>[52,53]</sup>

Ainsi, à l'état fondamental  $S_0$  de ces molécules, ils ont proposé un profil énergétique avec un minimum où les groupements donneur et accepteur d'électrons de la molécule sont dans un même plan et un maximum qui correspond à une séparation effective des charges en tordant ces deux groupements perpendiculairement l'un de l'autre. À l'état excité  $S_1$ , en revanche, un second minimum se situe à l'angle de la liaison entre les groupements phényle et diméthylamino de  $\theta = 90^\circ$  avec une barrière énergétique plus faible entre ses deux minimums (**Figure 24**). La rotation autour de cette liaison est donc favorisée à l'état excité de la molécule qui peut alors se désexciter par émission d'un photon depuis l'un ou l'autre de ces minimums. L'écart énergétique entre les états  $S_1$  et  $S_0$  étant cependant plus faible pour  $\theta = 90^\circ$ , la longueur d'onde d'émission du photon est donc supérieure à celle pour  $\theta = 0^\circ$  ( $\lambda_0 < \lambda_{90}$ , **Figure 24**).<sup>[53]</sup>

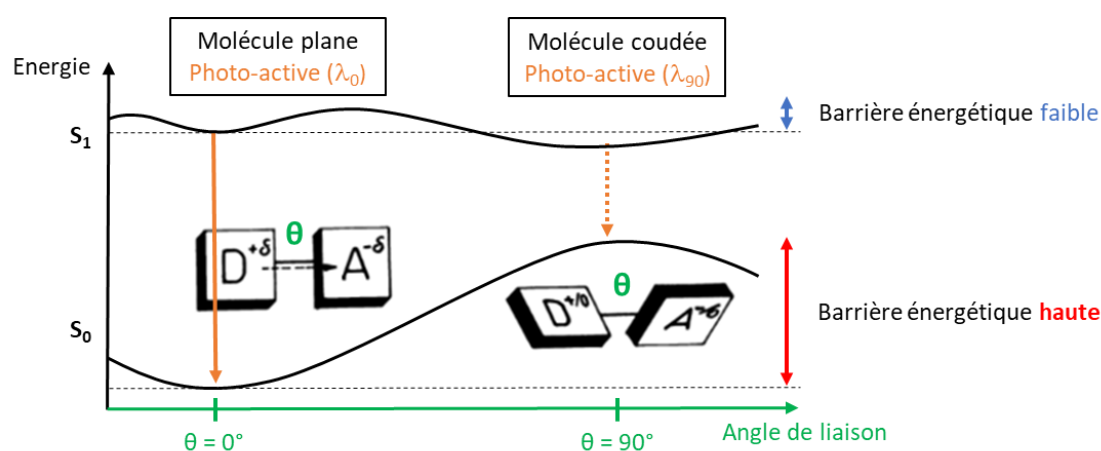


Figure 24 : Représentation des niveaux énergétiques d'un fluorophore à double émission.

Les sondes conformationnelles sont des cas particuliers de ces molécules possédant un état TICT. Dans ce cas précis, leur barrière énergétique à l'état fondamental  $S_0$  est plus haute encore et, l'écart énergétique entre les états  $S_1$  et  $S_0$  à  $\theta = 90^\circ$  étant suffisamment réduit, les voies de désexcitation non-radiatives sont favorisées (exemple des stilbènes, **Figure 25**). L'état TICT est alors surnommé état « fantôme » car son temps de vie est particulièrement court lorsque la rotation est possible. À l'inverse, quand la rotation de la molécule est limitée par la viscosité ou de l'encombrement stérique de son environnement, la désexcitation radiative de la molécule devient plus compétitive et un retour de fluorescence est donc observé. Les sondes conformationnelles sont donc des sondes capables d'imager la viscosité de leur environnement.

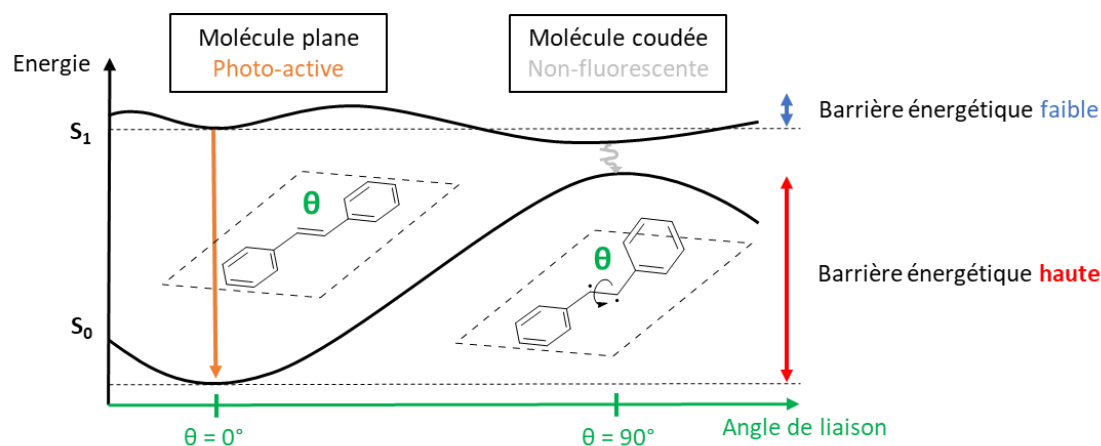


Figure 25 : Représentation des niveaux énergétiques d'une sonde conformationnelle de type stilbène.

L'augmentation nécessaire de la barrière énergétique à l'état fondamental peut être atteinte grâce à l'ajout d'au moins une double liaison exocyclique dans la structure de la molécule (l'isomérisation d'une double liaison étant particulièrement défavorable). Parmi les structures les plus récurrente de ce type de sonde, se trouvent des dérivés du DMABN comme le *para*-diméthylanalinemalononitrile (DMN)<sup>[54]</sup> ou, plus particulièrement encore, la 9-(dicyanovinyl)-julolidine (DCVJ, **Figure 26**).<sup>[55]</sup>

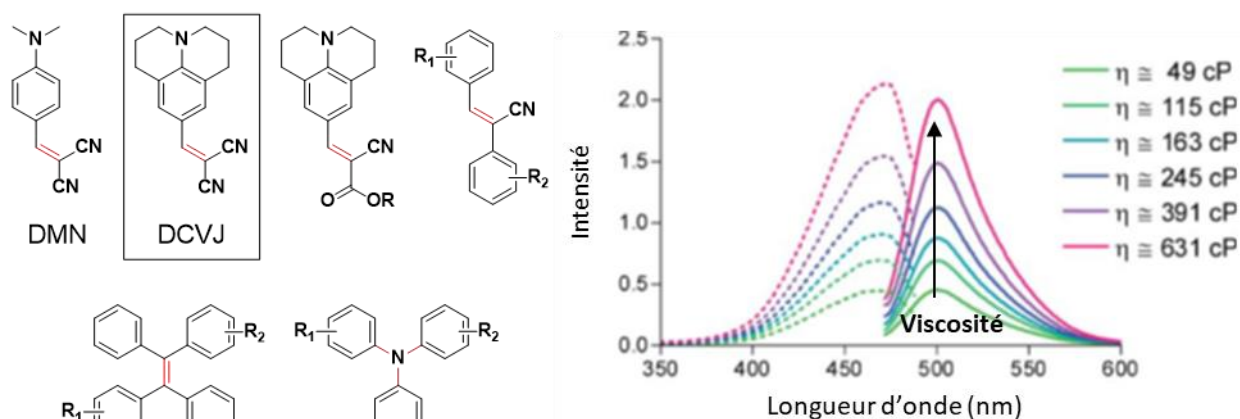


Figure 26 : Structures de sondes conformationnelles et spectres d'excitation et d'émission du DCJV dans des mélanges éthylène glycol/glycérol de viscosité croissante.<sup>[55]</sup>

Aujourd'hui, les particularités optiques découlant de l'état TICT ont de nombreuses applications que ce soit en science des matériaux ou en imagerie de fluorescence où l'existence de l'état « fantôme » permet de synthétiser des sondes pro-fluorescence.<sup>[52,55,56]</sup>

## 2) Fonctions biologiques et pathologiques des VEGFr et enjeux liés aux traitements actuels et à leur recherche

### 2.1) Les récepteurs des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire

#### 2.1.1) Localisations et fonctions de ces récepteurs

La famille des protéines kinases est une vaste famille qui comporte plus de 500 enzymes chez l'Homme, elle est parfois mentionnée sous le nom de « kinome ». Les récepteurs tyrosines kinases en sont une sous-famille de protéines transmembranaires capables de transduire les signaux de l'extérieur vers l'intérieur d'une cellule. Sous l'action d'un stimulus extérieur, ces récepteurs peuvent catalyser la phosphorylation rapide d'une, voire de plusieurs de leurs tyrosines en présence d'ATP et ce sont ces phosphorylations qui permettent la continuité du signal en déclenchant différentes cascades de signalisation intracellulaires.

La famille des récepteurs des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (*Vascular Endothelial Growth Factor receptors*, VEGFr) est composée de trois récepteurs tyrosines kinases de plus de 1300 acides aminés (environ 151 kDa) chacun : VEGFr-1, -2 et -3.<sup>[57-59]</sup> Comme leur nom l'indique, les VEGFr sont capables de reconnaître et fixer sélectivement les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) et sont impliqués dans la transduction des signaux d'angiogenèse et de perméabilité des vaisseaux sanguins (pour les VEGFr-1 et -2, **Figure 27**), de vasculogenèse et de lymphangiogenèse (pour le VEGFr-3). L'angiogenèse se définit comme la croissance de l'endothélium vasculaire, la vasculogenèse comme la croissance des systèmes vasculaire et lymphatique embryonnaires et la lymphangiogenèse comme la croissance de l'endothélium lymphatique. Les VEGFr se retrouvent donc à la surface des cellules de l'endothélium vasculaire mais aussi à la surface des macrophages et des cellules de la moelle osseuse.<sup>[60,61]</sup>

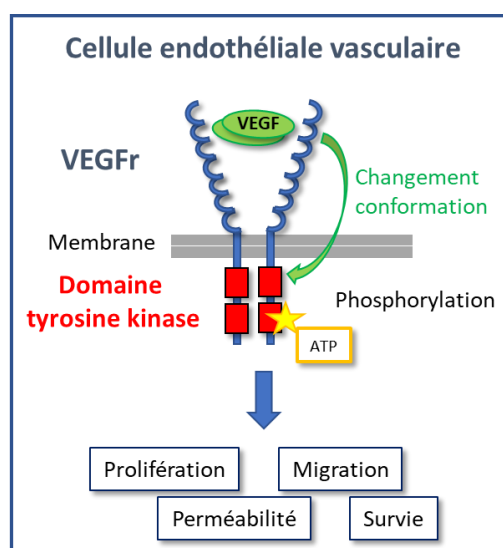


Figure 27 : Transduction des signaux de croissance et de perméabilité des cellules endothéliales vasculaires par autophosphorylation des dimères de VEGFr-1 ou -2 en présence d'ATP et de VEGF, protéine homodimérique à l'origine de cette dimérisation des VEGFr.

Les cellules endothéliales vasculaires tapissent la lumière des vaisseaux sanguins, c'est-à-dire qu'elles en composent la paroi intérieure (**Figure 28**). Ce sont des cellules jointes entre elles de façon étanche et qui sont polarisées. Elles possèdent un apex tourné vers la lumière des vaisseaux et une base qui les ancre et les structure. C'est la recherche des facteurs responsables de la perméabilité des vaisseaux sanguins qui a permis d'isoler les premiers VEGF en 1983, sous le nom de facteurs de perméabilité vasculaire (*Vascular Permeability Factors*, VPF), avant d'identifier leur rôle également central dans l'angiogenèse en 1989 puis de mettre en évidence les récepteurs associés (VEGFr-1 et -2) en 1992.

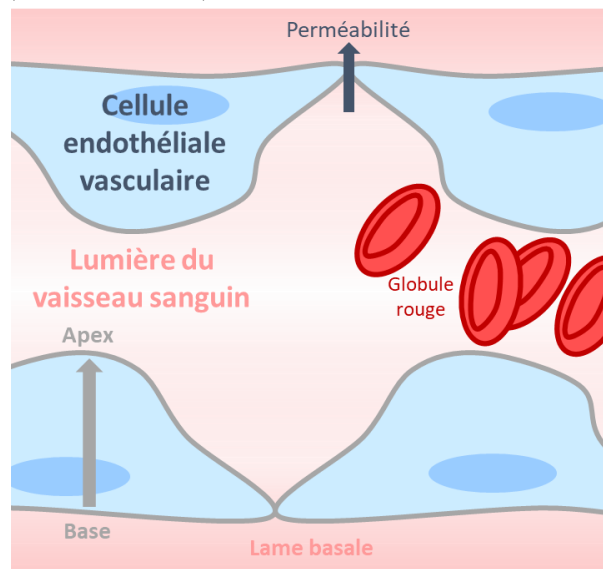


Figure 28 : Représentation schématique des vaisseaux sanguins.

Dans le cadre de cette thèse, les récepteurs des facteurs de croissance des vaisseaux sanguins nous intéressent pour leur rôle central dans l'angiogenèse. Sauf mention contraire, nous ne considérerons donc que les VEGFr-1 et -2 lorsqu'il sera question des VEGFr en général.

### 2.1.2) Activité enzymatique des VEGFr

Bien qu'ils soient tous les deux responsables de la croissance des cellules endothéliales vasculaires et de la perméabilité des vaisseaux sanguins, les VEGFr-1 et -2 n'ont pas la même activité tyrosine kinase. Le VEGFr-2 (plus souvent mentionné sous le nom de KDR dans la littérature) joue un rôle large dans l'angiogenèse, régulant la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales vasculaires ainsi que la perméabilité des vaisseaux sanguins. Le VEGFr-1 (ou Flt-1), quant à lui, fixe les VEGF avec plus d'affinité que KDR mais il est intéressant de noter que son activité tyrosine kinase est inférieure.<sup>[62]</sup> L'explication communément acceptée est que Flt-1 a principalement un rôle de régulateur négatif de l'activité de KDR en modulant la disponibilité des VEGF dans le milieu.

La régulation, positive comme négative, de l'activité des VEGFr est contrôlée par trois principaux paramètres : la présence de VEGF dans le milieu, la phosphorylation des récepteurs et leur présence à la surface des cellules. En effet, les VEGFr étant des récepteurs spécifiques des VEGF, leur activité est d'abord régulée par la disponibilité de ces derniers. L'activité des VEGFr peut également être régulée par des phosphatases, protéines responsables de la

déphosphorylation rapide des tyrosines, en équilibre avec l'autophosphorylation des récepteurs. Enfin, la présence même des récepteurs à la surface des cellules constitue un mécanisme de régulation. Leur recrutement est, comme les VEGF, principalement associé à des facteurs d'hypoxie. À l'inverse, leur dégradation est possible par internalisation des récepteurs puis leur digestion par les lysosomes, ce dernier mécanisme dépendant d'une cascade initialisée par une phosphorylation spécifique au niveau du domaine C-terminal des VEGFr.<sup>[60,62]</sup>

### 2.1.3) Structures des VEGFr

L'ensemble des récepteurs des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire sont de larges glycoprotéines transmembranaires. Structurellement parlant, les VEGFr sont tous composées de cinq domaines : extracellulaire, transmembranaire, juxtamembranaire, tyrosine kinase (séparé en deux fragments par un insert inactif) et C-terminal, qui permet de moduler l'activité des récepteurs. Comme pour la plupart des protéines d'une même famille, c'est dans le site actif (domaine tyrosine kinase) que se retrouve la plus grande homologie entre leurs séquences avec 70% des acides aminés conservés entre les VEGFr-1 et -2. À l'inverse, leurs domaines extracellulaires et C-terminal ne présentent que 33% et 28% d'homologie respectivement.<sup>[62]</sup>

Leurs domaines extracellulaires sont composés de sept sous-domaines compacts ; la reconnaissance des VEGF circulants s'effectue au niveau des sous-domaines 2 des VEGFr. La formation de ce complexe protéine-ligand permet de stabiliser des dimères de VEGFr et induit un changement conformationnel pour le récepteur (**Figure 29**). Ce changement conformationnel se transmet du domaine extracellulaire du récepteur au domaine transmembranaire, qui ancre la protéine à la membrane, jusqu'aux domaines juxtamembranaire puis tyrosine kinase. Ces modifications de la structure tridimensionnelle du récepteur rendent possibles la fixation de l'ATP au site actif puis l'autophosphorylation de la protéine.<sup>[62]</sup> C'est cette phosphorylation qui permet la continuité des signaux extracellulaires à l'intérieur de la cellule en déclenchant la suite de la cascade de prolifération, de migration ou de survie de l'endothélium vasculaire ou de perméabilité des vaisseaux sanguins.

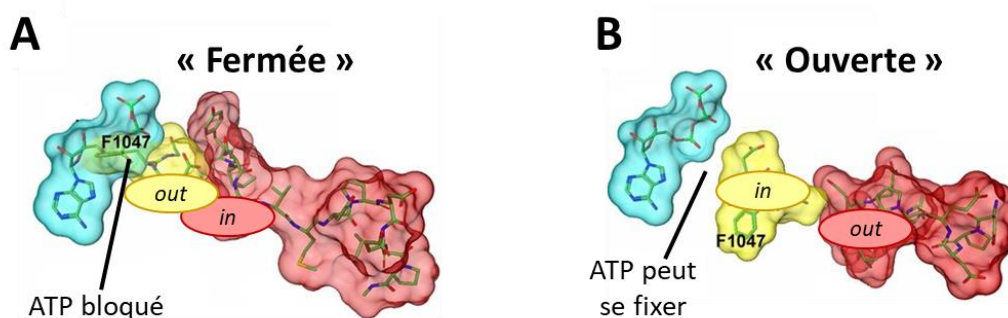


Figure 29 : Modélisation de l'ATP (bleu) par rapport à la triade DFG (jaune) et au domaine juxtamembranaire (JM, rouge) dans les positions respectivement A « fermée » et B « ouverte » du site catalytique de KDR.<sup>[63]</sup>

En 2012, des chercheurs travaillant pour Pfizer ont résolu les structures cristallographiques de co-cristaux entre les domaines intra-cellulaires de recombinants de KDR et plusieurs de leurs

inhibiteurs.<sup>[63]</sup> Ces travaux ont permis de mettre en évidence deux changements conformationnels essentiels au niveau du site catalytique. En absence de VEGF, la triade DFG (D – acide aspartique, F – phénylalanine, G – glycine), située dans le domaine tyrosine kinase et hautement conservée dans la famille VEGFr, pointe vers l'extérieur de la protéine (DFG<sub>out</sub>) tandis que le domaine juxtamembranaire pointe vers l'intérieur (JM<sub>in</sub>). Cette conformation « fermée » empêche la reconnaissance de l'ATP à cause de l'occlusion partielle de son site de fixation par la phénylalanine F1047 (**Figure 29 A**). En présence de VEGF, la protéine « s'ouvre » : la triade DFG se replie vers l'intérieur de la protéine (DFG<sub>in</sub>) et le domaine JM vers l'extérieur (JM<sub>out</sub>), formant ainsi l'entrée du sillon qui fixe l'ATP (**Figure 29 B**).

#### *2.1.4) Implications des VEGFr et des facteurs de croissance associés dans les maladies liées à une néovascularisation néfaste*

Les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) sont des protéines sécrétées d'environ 200 à 400 acides aminés. Ce sont des homodimères positionnés de manière antiparallèles, dont les structures tertiaires et quaternaires sont stabilisées par des ponts disulfures conservés.<sup>[60]</sup> Les VEGF humains sont composés de quatre familles qui se lient avec différentes affinités aux récepteurs présentés précédemment : les VEGF A qui correspondent aux premiers facteurs identifiés (bonne affinité pour Flt-1, affinité pour le KDR), les VEGF B (affinité pour Flt-1) et les VEGF C et D (affinités pour le VEGFr-3, faibles affinités pour le KDR). Ces facteurs de croissance peuvent subir des épissages à l'intérieur d'une même famille, donnant naissance à plusieurs isoformes d'un même facteur, ce qui module naturellement leurs activités respectives.

Chez l'Homme adulte, la production et la libération des VEGF sont principalement régulées par la stabilisation de marqueurs d'inflammation ou d'hypoxie, comme le NADH. Cette réponse permet la régénération des tissus ou de combler un manque de vascularisation en stimulant la cascade signalétique de l'angiogenèse au niveau des VEGFr. Cependant, les VEGF et les VEGFr sont également impliqués dans des maladies liées à une vascularisation néfaste comme le développement des tumeurs cancéreuses ou à des maladies de néovascularisation rétinienne. Dans ces cas-là, la libération constante de VEGF conduit à une prolifération non-contrôlée des vaisseaux sanguins et à leur perméabilité accrue qui crée des œdèmes.<sup>[60,61]</sup>

Dans le cas des cellules cancéreuses, la production de VEGF est stimulée par des facteurs génétiques liés à la suppression de leurs gènes de contrôle et épigénétiques comme, par exemple, l'hypoxie caractéristique des tumeurs solides. Bloquer de manière efficace la cascade signalétique de la croissance des vaisseaux sanguins est rapidement devenu un enjeu majeur dans le traitement des cancers afin de limiter l'expansion des tumeurs.<sup>[64]</sup> L'avantage de cette approche est qu'il est possible de cibler sélectivement les cellules endothéliales vasculaires, les cellules cancéreuses n'exprimant pas (ou peu) les VEGFr à leur surface, et donc en de limiter les risques d'apparition de résistances aux traitements car les cellules endothéliales vasculaires sont génétiquement plus stables. Cette approche n'est malheureusement pas généralisable à l'ensemble des cancers mais, seules ou en cocktail avec de la chimiothérapie conventionnelle,



En photothérapie dynamique de manière générale, la destruction de la cible passe par la génération d'espèces réactives cytotoxiques sous irradiation lumineuse. Le passage des photosensibilisateurs à un état excité singulet puis à un état excité triplet, plus stable que les états excités singulets, par croisement inter système (CIS), permet de déclencher des cascades radicalaires par transfert d'un électron ou de générer des espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS) ou de l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) par transfert d'énergie. Ces espèces peuvent alors réagir avec les protéines voisines soit par oxydation directe, soit par cycloaddition sur les acides aminés aromatiques (histidine, tyrosine ou tryptophane), déstabilisant la structure tertiaire de ces protéines et altérant ainsi leur fonction (**Figure 31**).

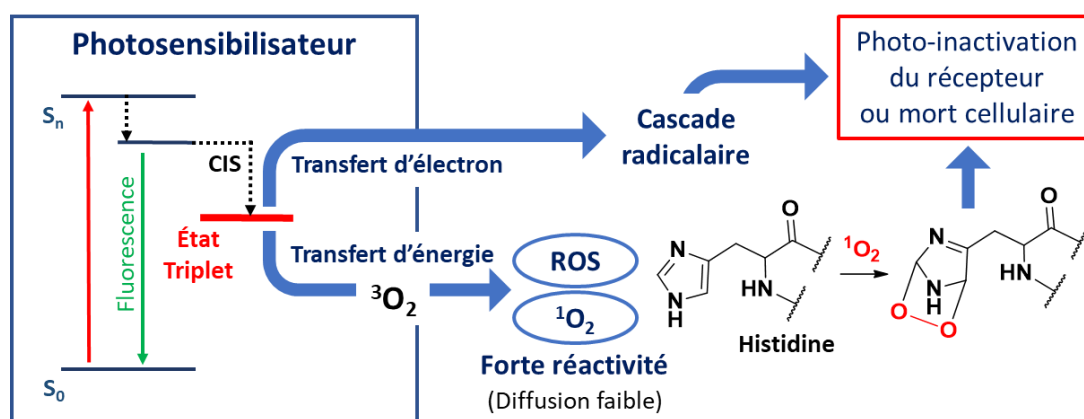


Figure 31 : Phototoxicité des photosensibilisateurs, via leur état triplet, par mécanismes de transfert d'électron ou de transfert d'énergie, créant des espèces réactives avec les protéines.

Ces thérapies laser sont cependant destructives, elles entraînent plusieurs complications du fait de l'utilisation du laser lui-même et de leur absence de sélectivité. En effet, l'utilisation d'un laser induit une marge d'erreur sur la profondeur de la focale et peut endommager des couches plus profondes du tissu que celles à traiter. De plus, lors de cette irradiation non-sélective, les cellules des vaisseaux sanguins comme celles responsables de la vision sont détruites ce qui peut entraîner une diminution voire une perte de la vision centrale chez le patient. Pour la photothérapie dynamique, il existe également des risques liés à l'utilisation de l'oxygène naturellement présent dans les tissus comme intermédiaire pour détruire les cellules de l'endothélium vasculaire. Cette destruction passant principalement par la génération de ROS (ou de  $^1\text{O}_2$ ), l'opération comporte des risques d'inflammation. En outre, la consommation de l'oxygène dans les tissus pendant l'irradiation conduit à une hypoxie, accentuée par la diminution de la vascularisation de la zone, qui favorise la production indirecte de VEGF et de VEGFr et donc de nouveaux vaisseaux sanguins. Ce dernier problème a pu être contourné combinant la photothérapie dynamique avec l'administration d'inhibiteurs de l'angiogenèse.<sup>[72]</sup>

Cette approche de photocoagulation directe des vaisseaux sanguins pour contrôler la néovascularisation des tissus reste malgré tout séduisante car elle offre des solutions qui permettraient de lutter sur le long terme contre la néovascularisation néfaste. De ce fait, elle a également été envisagée dans le cadre des traitements contre certains cancers. Cependant, si l'emploi d'une irradiation laser est possible dans le cas de la DMLA car le tissu à traiter se trouve dans l'œil et est donc transparent aux longueurs d'ondes employées, dans le cas des



cancers, les tissus à traiter sont souvent profondément enfouis et la thérapie laser rencontre donc les mêmes limites de pénétration des tissus que celles décrites précédemment pour l'imagerie de fluorescence.

### 2.2.2) L'approche « anti-VEGF » pour inhiber l'angiogenèse

Le développement d'inhibiteurs de la croissance de l'endothélium vasculaire est un domaine actif de la recherche académique comme industrielle, en oncologie et en ophtalmologie.<sup>[65,66]</sup> L'idée d'empêcher la croissance d'une tumeur cancéreuse par inhibition de son angiogenèse date des années 70 mais a dû attendre la fin des années 80 avec d'abord, la mise en évidence des facteurs responsables de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et de ses récepteurs (VEGFr), puis la preuve de leur importance dans la vascularisation des tumeurs.<sup>[64]</sup> Ces découvertes ont été rapidement suivies par l'identification du rôle clé de ces mêmes facteurs et récepteurs dans les maladies ophtalmologiques liées à la néovascularisation rétinienne.

L'inhibition des signaux de croissance des vaisseaux sanguins peut se faire selon deux modes : soit par inhibition du VEGF circulant,<sup>[65]</sup> soit par inhibition des VEGFr.<sup>[66,67]</sup> Afin de reconnaître sélectivement les VEGF et de les piéger de manière efficace, les principes actifs développés sont des macromolécules comme les anticorps ou des protéines de fusion. Les VEGFr, en revanche, peuvent être inhibés par des anticorps comme des petites molécules. À noter que, les VEGF et les VEGFr étant identiques pour toutes les cellules endothéliales vasculaires peu importe où elles se situent dans le corps, un certain nombre de principes actifs se retrouve en oncologie comme en ophtalmologie.

Les premières cibles de l'inhibition de l'angiogenèse ont été les facteurs de croissance, caractérisés avant leurs récepteurs et dont les séquences ont été rapidement identifiées. Dès le milieu des années 90, il a été démontré que l'utilisation d'anticorps ciblant les VEGF provoque une inhibition de la croissance de tumeurs cancéreuse chez la souris et une suppression de la néovascularisation rétinienne par injection intravitréenne chez le singe.<sup>[65]</sup> Ces preuves de concept ont permis de valider cette approche « anti-VEGF » par des macromolécules dont font partis les premiers inhibiteurs d'angiogenèse approuvés par l'agence européenne des médicaments (*European Medicines Agency, EMA*) : le bevacizumab en 2005 (anticorps, Avastin<sup>®</sup>) suivi du pegaptanib en 2006 (oligonucléotide, Macugen<sup>®</sup>), qui sont des traitements contre certains cancers et la DMLA humide respectivement. Bien que le pegaptanib ait été retiré du marché en 2011 car son efficacité a été jugée de trop courte durée, l'approche « anti-VEGF » pour combattre la DMLA exsudative reste en cours de développement avec l'apparition régulière de nouveaux principes actifs sur le marché : ranibizumab approuvé en 2007 (anticorps, Lucentis<sup>®</sup>, leader du marché), aflibercept en 2012 (protéine de fusion, Eylea<sup>®</sup>) et brolucizumab en 2020 (anticorps, Boevu<sup>®</sup>).

Aujourd'hui, les thérapies laser initialement employées pour soigner la DMLA exsudative jugées trop destructives ne sont plus qu'employées en absence de réponse aux autres traitements. La DMLA humide est maintenant traitée par l'administration intravitréenne de molécules « anti-VEGF » qui piègent les VEGF, inhibant ainsi la croissance des néovaisseaux. Ces

traitements moins destructifs que les lasers permettent un ralentissement de la maladie, voire une amélioration dans les premiers mois, sous condition d'être effectués régulièrement (plusieurs injections par an). Malheureusement, des études montrent que l'effet de ces traitements est souvent en-deçà des effets démontrés lors des tests cliniques, probablement dû à un sous traitement lié à la rigueur nécessaire pour suivre régulièrement un traitement désagréable et particulièrement onéreux.<sup>[65]</sup> D'après un rapport publié par la Cour des Comptes, en France, ces molécules « anti-VEGF » ont coûté 583 M€ à la sécurité sociale en 2016.<sup>[70]</sup>

Dans le contexte actuel où la population mondiale est vieillissante, donc de plus en plus à même de contacter des maladies telles que la DMLA,<sup>[69]</sup> la nécessité de développer des traitements efficaces sur long terme et moins coûteux apparaît comme évidente.

### 2.2.3) Les inhibiteurs des VEGFr : le développement des petites molécules

Les autres cibles thérapeutiques évidentes afin d'inhiber l'angiogenèse sont les récepteurs des facteurs de croissance. Il existe plusieurs approches afin d'inhiber efficacement une protéine, que ce soit de manière réversible ou non : par fixation au(x) site(s) actif(s), par compétition avec ses ligands ou ses cofacteurs, par blocage de la protéine dans une conformation inactive ou par inhibition allostérique. Dans le cas présent, toutes ces approches rationnelles ont d'abord été limitées par l'absence de données sur la structure tridimensionnelle exacte des sites d'interaction des VEGFr. En absence de rationalisation, il est malgré tout possible d'envisager de cribler des bibliothèques entières de petites molécules jusqu'à trouver des « hits ». Cette méthode facilement automatisable a d'ailleurs permis de reporter les premiers inhibiteurs de VEGFr dès 1996.<sup>[73]</sup>

Aujourd'hui, la modélisation moléculaire *in silico* à partir de données cristallographiques du site actif des VEGFr permet de rationaliser la synthèse d'inhibiteurs tout en conservant l'automatisation possible de la méthode. Dans une approche similaire à celle *in vitro*, il est possible de définir un certain nombre de paramètres qui font des inhibiteurs connus des VEGFr de bons inhibiteurs<sup>[74]</sup> puis de réaliser des criblages virtuels de larges bases de données de molécules à la recherche de nouveaux « hits ». Il est également possible de mener des études par fragment, en isolant *in silico* des fragments d'inhibiteurs connus qui conservent une bonne affinité pour le récepteur puis en utilisant leur placement spatial comme point de départ pour rationaliser la synthèse de nouveaux fragments inédits.<sup>[75]</sup>

Il existe aujourd'hui douze inhibiteurs des VEGFr sur le marché européen, dont un anticorps : le ramucirumab (Cyramza<sup>®</sup>, approuvé en 2014 par l'EMA) ; et neuf petites molécules actives : sorafenib (Nexavar<sup>®</sup>, 2006), sunitinib (Sutent<sup>®</sup>, 2006), pazobanib (Votrient<sup>®</sup>, 2010), vandetanib (Caprelsa<sup>®</sup>, 2012), axitinib **15** (Inlyta<sup>®</sup>, 2012), ponatinib (Iclusig<sup>®</sup>, 2013), regorafenib (Stivarga<sup>®</sup>, 2013), nintedanib (Vargatef<sup>®</sup>, 2014), cabozantinib (Cometriq<sup>®</sup>, 2014), lenvatinib (Lenvima<sup>®</sup>, 2015), tivozanib (Fotivda<sup>®</sup>, 2017) (**Figure 32**). Le ramucirumab agit par compétition directe avec le VEGF à son site de reconnaissance extracellulaire tandis que les petites molécules, capables de diffuser au travers de la membrane cellulaire, agissent au site de fixation de l'ATP. De nombreux autres inhibiteurs sont en cours de développement, tels que l'anlotinib et le rivoceranib par exemple.<sup>[76]</sup>

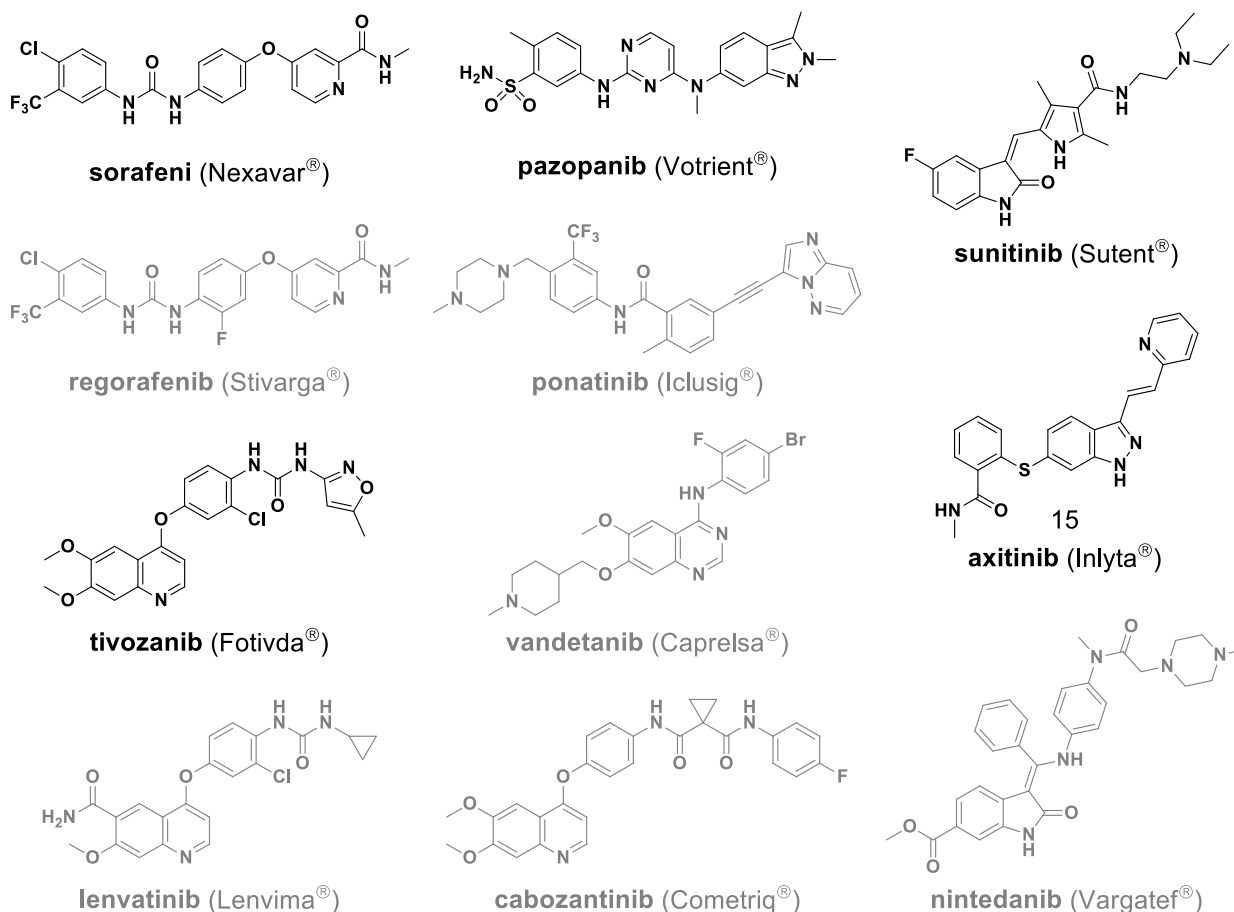


Figure 32 : Structures des « petits » inhibiteurs des VEGFr commercialisées, dont cinq co-cristallisés avec des recombinants de KDR (noir).<sup>[63]</sup>

Ces principes actifs sont utilisés dans les traitements de divers cancers mais présentent presque tous la même limite. En effet, il est difficile de prédire leur profil pharmacocinétique chez les patients ce qui peut induire des risques de perte d'efficacité à cause d'un sous-dosage ou de toxicité par surdosage. De plus, les sites catalytiques, qui fixent l'ATP, sont hautement conservés dans la famille des récepteurs tyrosine kinases, la plupart de ces inhibiteurs sont donc multi-cibles. L'intérêt de cette approche « multi-kinase » est un effet synergique lié à l'inhibition d'un ensemble de récepteurs,<sup>[77]</sup> tels que les récepteurs du facteur de croissance dérivé des plaquettes (*Platelet Derived Growth Factor receptors*, PDGFr), tous impliqués dans le développement cellulaire mais c'est aussi sa faiblesse. La toxicité des petits inhibiteurs des VEGFr naît d'évènements *off-target* qui peuvent conduire à de l'hypertension chez le patient, notamment en cas de surdosage.<sup>[66,67,77]</sup> La communauté s'accorde malgré tout à dire que ces petites molécules présentent moins de risques que la chimiothérapie conventionnelle et que des traitements dose-dépendants pourraient améliorer significativement leur efficacité.<sup>[66]</sup>

De manière générale, il est possible de classer l'ensemble des inhibiteurs des récepteurs tyrosine kinases en deux grandes catégories selon leur mode d'action : soit par compétition au site de fixation de l'ATP (type I), soit en bloquant la protéine dans une conformation inactive (type II). L'ensemble des inhibiteurs présentés ci-dessous fonctionnent en bloquant les VEGFr dans une conformation inactive, cependant, ils présentent des profils pharmacologiques divers avec des quantités, des durées et des fréquences d'exposition différentes. Ces différences de

cinétiques ne sont pas expliquées par les protéines modèles ne comportant que le domaine tyrosine kinase de KDR, l'inhibition de l'activité des VEGFr étant plus faible dans ce cas-là que celle observée *in vivo*. Seuls les modèles recombinants possédant également le domaine juxtamembranaire des récepteurs ont permis de reproduire les ordres de grandeur d'inhibition observés *in vivo*.<sup>[78]</sup> Ces résultats sont appuyés par des données cristallographiques pour cinq des composés présentés ci-dessus (composés noir, **Figure 32**).<sup>[63]</sup>

La résolution de ces structures a pu mettre en évidence deux modes d'inhibition liés aux changements conformationnels des VEGFr présentés précédemment (cf. **2.1** **Figure 29** p. 52). Le sorafenib et le tivozanib par exemple, se comportent comme des inhibiteurs de type II : ils bloquent la triade DFG dans sa conformation inactive ( $DFG_{out}$ ). La taille de leurs substituants entraîne cependant une gêne stérique avec le domaine juxtamembranaire qui se replie hors de sa position d'auto-inhibition ( $JM_{out}$ ). En revanche, le sunitinib, le pazopanib et l'axitinib **15** bloquent KDR dans sa conformation entièrement « fermée » ( $DFG_{out} JM_{in}$ ) en créant notamment des interactions avec différents acides aminés du domaine juxtamembranaire.

De tous les composés présentés ci-dessus, l'axitinib **15** est le plus affiné et le plus sélectif des VEGFr (**Figure 33 A**) avec une activité inférieure au nanomolaire. Cette affinité est explicable par le nombre d'interactions qu'il est capable de créer avec les VEGFr dans leur conformation « fermée », inactive.<sup>[74]</sup>

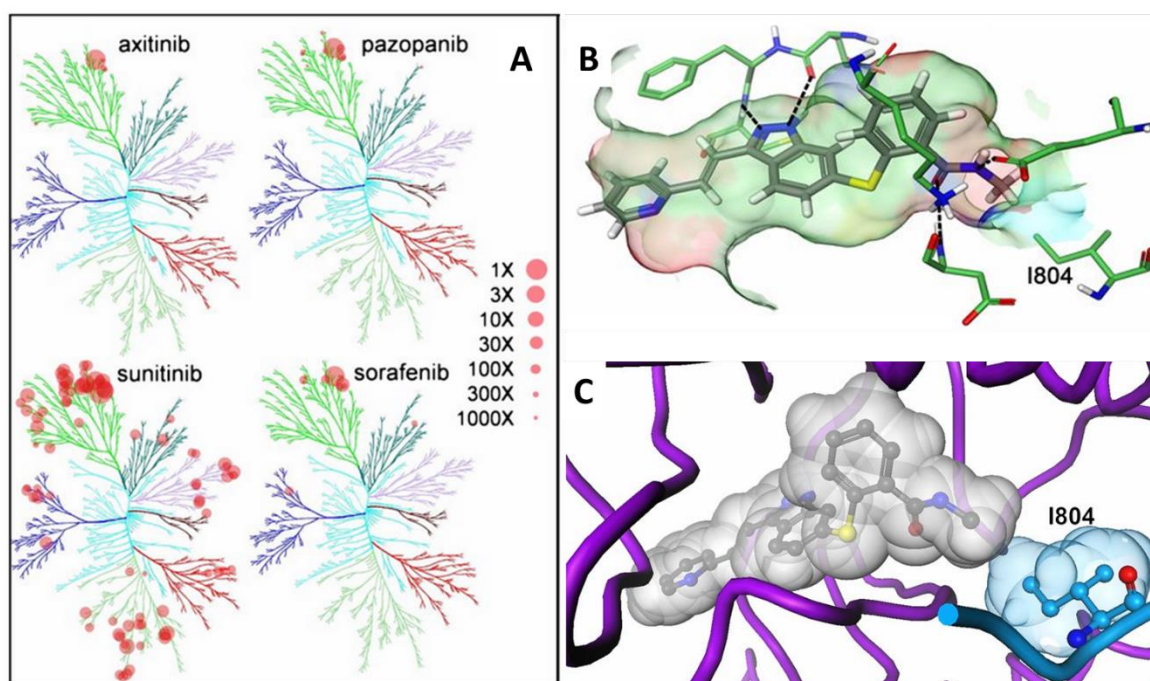


Figure 33 : A) Arbres de sélectivité des inhibiteurs tyrosine kinase (la taille des cercles est inversement proportionnelle au rapport : constante d'inhibition de la kinase sur constante d'inhibition de modèle KDR) ; B) représentation des liaisons hydrogène entre l'axitinib **15** et KDR (noir) ; C) représentation des volumes de Van der Waals de l'axitinib **15** (gris) et de KDR (violet et bleu).<sup>[63]</sup>

Premièrement, l'axitinib **15** peut former deux liaisons hydrogènes entre les azotes de son cycle indazole et le site de reconnaissance de l'ATP (sur les chaînes principales de l'acide glutamique D917 et de la cystéine C919). Ces interactions non-spécifiques sont communes à tous les inhibiteurs cristallisés dans cette étude, le design rationnel d'un inhibiteur autour de ce

site de reconnaissance conduit un excellent inhibiteur non-spécifique capable de bloquer les sites de fixation de l'ATP d'un large ensemble de tyrosine kinases (sunitinib, **Figure 33 A**). Deuxièmement, l'axitinib **15** est capable de faire deux autres liaisons hydrogène grâce à sa fonction amide dans une poche hydrophobe plus enfouie, une avec le domaine juxtamembranaire (acide glutamique E885) et une directement avec la chaîne principale d'un des acides aminés de la triade DFG (acide aspartique D1046, **Figure 33 B**). Cette dernière liaison, inégalée chez les autres inhibiteurs, assure une grande partie de la spécificité de l'axitinib **15** pour les VEGFr au sein de la famille récepteur tyrosine kinase. Troisièmement, la formation du complexe VEGFr-axitinib **15** est favorisée par le remplissage optimal de l'espace de la cavité du VEGFr par son inhibiteur. En effet, le méthyl de l'amide de l'axitinib **15** respecte parfaitement le rayon de Van der Waals de l'isoleucine qui forme le fond de la cavité (I804, **Figure 33 C**) et un certain nombre d'interactions hydrophobes peuvent se former avec les différents systèmes  $\pi$  de la molécule.

Il est intéressant de noter que le système  $\pi$  conjugué de l'axitinib **15** adopte une forme plane dans le récepteur (**Figure 34**). Cette planéité est possible grâce à la liaison hydrogène indirecte entre le groupement pyridyle de l'axitinib qui pointe hors de la cavité et le VEGFr, *via* une molécule d'eau. C'est cette conformation caractéristique qui a retenue l'attention de l'équipe pour ce projet. En effet, ce système  $\pi$  est inédit : plan donc conjugué, mais uniquement dans le récepteur, et polarisé par un donneur (D) et un accepteur (A) d'électron à chaque extrémité du système  $\pi$  (respectivement, les azotes du cycle indazole et le groupement pyridyle). En résumé, l'axitinib **15** possède un système électronique délocalisé, ce qui correspond par définition à un fluorophore et, dans le cas présent, un fluorophore actif uniquement en présence des VEGFr qui contraignent sa planéité.

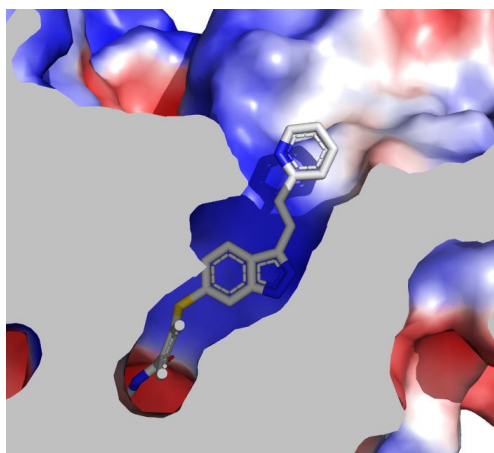


Figure 34 : Conformation plane du système  $\pi$  de l'axitinib **15** à l'intérieur du VEGFr-2 (KDR, référence PDB : 4AG8) et surfaces électrostatiques (données qualitatives ; bleu : positives, rouge : négatives).

Dans une approche similaire à celle décrite précédemment (cf. 1.3.2) p. 44),<sup>[51]</sup> il a été envisagé de détourner l'axitinib **15** en sonde pro-fluorescente sélective des VEGFr. Cette sonde pourrait d'abord permettre d'imager les VEGFr mais également jouer le rôle de photosensibilisateur en photothérapie dynamique afin de s'affranchir de l'aspect trop destructif de l'approche et de détruire les vaisseaux sanguins plus sélectivement en ne photosensibilisant que les cellules de l'endothélium vasculaire qui expriment les VEGFr.

Cependant, l'axitinib **15** ne peut être utilisé tel quel en tant que fluorophore ; sa fluorescence se situant dans l'UV (excitation à  $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 290 \text{ nm}$  et émission à  $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 330 \text{ nm}$ ), il est difficile de la dissocier de la fluorescence naturelle des protéines. De plus, exciter un fluorophore à une telle longueur d'onde risque d'endommager les échantillons biologiques. Cette absorption et cette fluorescence restreintes à l'UV sont le produit de la faible étendue et de la faible polarisation de son système  $\pi$  qui ne permettent qu'une délocalisation limitée des électrons. En effet, l'accepteur pyridyle de la molécule n'est pas un accepteur fort et l'indazole n'étant que peu décrit dans la littérature en tant que donneur dans des fluorophores, il est difficile d'apprécier sa contribution électronique à la fluorescence de l'axitinib.

Le but de ma thèse a donc été de synthétiser des ligands pro-fluorescents sélectifs pour l'imagerie de fluorescence des récepteurs membranaires VEGFr par dérivation de la structure de l'axitinib **15**. Ces modifications (élongation du système  $\pi$  et changement d'accepteur) sont envisageables grâce au positionnement de l'axitinib **15** dans le récepteur, dont le groupement pyridyle pointe hors de la cavité (**Figure 35**).

Ma thèse s'est ainsi déroulée en deux phases : une première phase d'étude des systèmes D- $\pi$ -A avec le noyau indazole comme groupement électrodonneur, puisque trop peu de renseignements sont disponibles dans la littérature à son sujet, puis une seconde phase visant à restaurer l'affinité des fluorophores pour les VEGFr par ajout de substituants clés (**Figure 35**). Le premier projet a pour ambition de synthétiser une première génération d'indazoles fonctionnalisés en position C3 par divers groupements accepteurs puis d'étudier leurs propriétés photophysiques, leur compatibilité et leur efficacité en imagerie de fluorescence en culture cellulaire. Le deuxième projet a pour ambition de synthétiser une seconde génération d'indazoles fonctionnalisés en position C3 par divers groupements accepteurs et en position C6 par divers donneurs fonctionnalisés, inspirés des études de relation structure-activité de l'axitinib **15**.

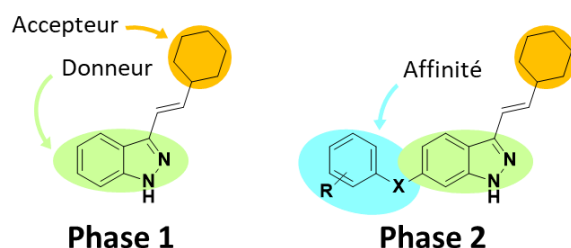


Figure 35 : Structures des molécules des phases 1 et 2 de ma thèse ( $X = S, NH$  ;  $R = \text{amides}$ ).



## Chapitre 2

# Fluorophores avec un donneur indazole : synthèses, propriétés photophysiques et imagerie de fluorescence

Comme exposé précédemment, l'axitinib **15** (Inlyta<sup>®</sup>) est un principe actif commercialisé depuis 2012 en Europe dans le cadre de la lutte contre le cancer. Il ralentit et régularise la croissance néfaste des vaisseaux sanguins dans les tumeurs par inhibition sélective des récepteurs cellulaires responsables de la transduction de ces signaux de croissance : les VEGFr. L'axitinib **15** est une petite molécule capable de diffuser au travers de la membrane cellulaire et qui agit au site de fixation de l'ATP des VEGFr pour les bloquer dans une conformation inactive. Au sein de la poche où il est fixé, l'axitinib **15** forme des interactions spécifiques qui garantissent sa sélectivité pour les VEGFr et contraignent son système  $\pi$  polarisé par un donneur et un accepteur d'électrons dans une conformation plane.

Ainsi, l'axitinib **15** est en théorie une molécule pro-fluorescente et sélective qui peut jouer le rôle d'une sonde sélective des VEGFr. Sa fluorescence n'étant cependant pas adaptée à cette application, ma thèse a consisté à améliorer ses propriétés de fluorescence.

Nos études préliminaires ont permis de mettre en évidence les propriétés de fluorescence de l'axitinib **15**. Sa fluorescence se fait autour  $\lambda_{em}^{max} \approx 400$  nm, pouvant se superposer à la fluorescence naturelle des tryptophanes des protéines. Ses longueurs d'ondes d'absorption sont relativement invariables selon le solvant :  $\lambda_{exc}^{max} = 330$  nm ; mais un léger solvatochromisme peut être observé pour la bande principale de son émission, indiquant qu'il y existe bien un transfert de charge entre un groupement donneur et un groupement accepteur dans la molécule (**Figure 36**). Le spectre de fluorescence de l'axitinib possède en effet la particularité d'avoir une seconde bande d'émission bien distincte de la bande principale mentionnée ci-dessus, dont la raison sera plus amplement discutée dans la partie dédiée aux études photophysiques de nos molécules (cf. **Chapitre 1 1.4**) p. 46). Son rendement quantique de fluorescence est faible dans



des solvants peu visqueux ( $\Phi_{\text{MeCN}} = 2\%$ , par exemple), mais augmente proportionnellement à la viscosité du solvant, permettant d'appréhender le comportement de la sonde une fois incluse dans un environnement contraint (**Figure 36**).

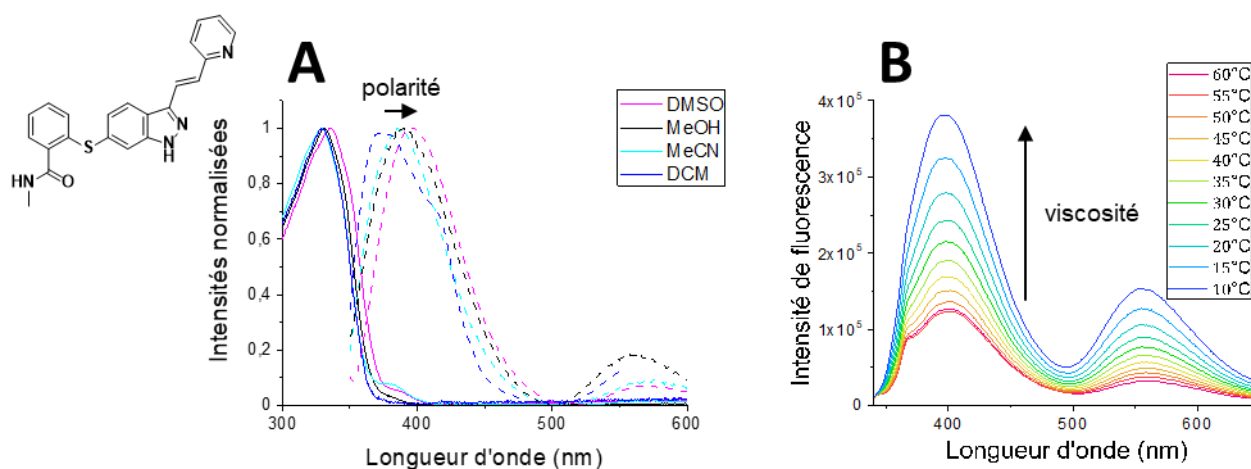


Figure 36 : Propriétés photophysiques de l'axitinib : A) spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (traits pointillés) dans divers solvants, B) émission à différentes températures (éthylène glycol,  $\lambda_{exc} = 320 \text{ nm}$ ).

Toutes ces études nous ont permis de démontrer qu'il est envisageable de construire une sonde pro-fluorescente pour l'imagerie des VEGFr à partir du squelette de l'axitinib **15**, à condition d'augmenter les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission de la sonde finale pour la distinguer de la fluorescence intrinsèque des protéines. Pour se faire, il sera envisagé d'augmenter la longueur du système  $\pi$  de la molécule et/ou de jouer sur la force des groupements donneur (D) et accepteur (A) d'électrons.

Le noyau indazole est essentiel pour la sélectivité de l'axitinib **15** pour les VEGFr car il permet de former deux liaisons hydrogènes avec la conformation inactive de l'enzyme. Il fait également office de donneur d'électrons lors des transferts de charge qui s'opèrent entre l'état fondamental ( $S_0$ ) et les états excités ( $S_n$ ) du fluorophore. Cependant, il n'existe que très peu d'exemples de fluorophores comportant un cycle indazole en tant que donneur dans la littérature et l'influence du noyau l'indazole sur leur propriétés photophysiques y est peu discutée.<sup>[79,80]</sup>

Mes efforts se sont d'abord concentrés sur la synthèse de systèmes D- $\pi$ -A, où D et A sont respectivement des groupements électrodonneur et électroaccepteur et  $\pi$  une liaison alcène. Le choix de notre donneur s'est porté sur l'hétérocycle indazole afin d'étudier leur comportement en tant que donneur de fluorescence, trop peu renseigné dans la littérature. Ces synthèses ont débuté par celle de la plateforme indazole fonctionnalisée stratégiquement en position C3 pour pouvoir le substituer par la suite par divers groupements accepteurs. S'en sont suivis les études des propriétés photophysiques de ces sondes inédites puis, celles de leur compatibilité et leur efficacité en imagerie de fluorescence en culture cellulaire.

## 1) Bibliographie autour des indazoles

Les indazoles sont peu récurrents dans la nature, n'étant présents que chez quelques espèces de plantes (*Nigella sativa* et *glandulifera*, **Figure 37 A**)<sup>[81]</sup> et de bactéries marines (*Vibrio* esp. WMBA, **Figure 37 B**)<sup>[82]</sup> mais ils sont activement développés en chimie médicinale dans de nombreux domaines comme anti-inflammatoires, anti-microbiens, ou encore inhibiteurs de diverses familles protéiques, par exemples (**Figure 38**)<sup>[83,84]</sup>

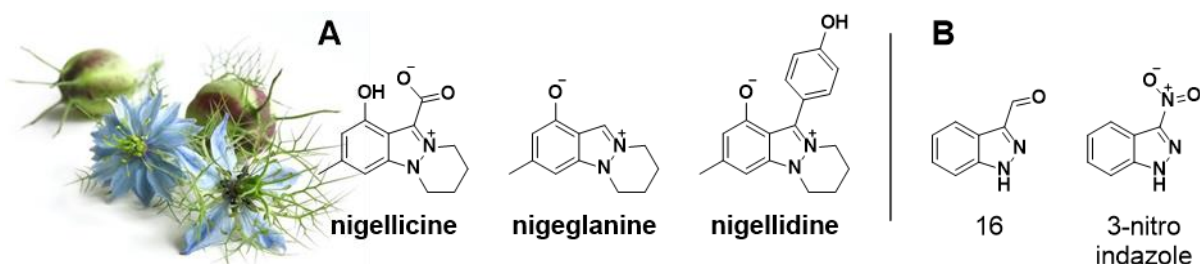


Figure 37 : Indazoles naturels : A) fleurs de nigelle et indazoles correspondants ; B) indazoles d'origine bactérienne.

Cet engouement vient de leur capacité à former des liaisons hydrogènes, donc des interactions fortes avec une cible, et de leur stabilité en milieu biologique. Bien que l'indazole soit un motif similaire à l'indole, ubiquitaire et très utilisé en chimie médicinale, leurs métabolismes diffèrent, conférant plus de stabilité à l'indazole qui est moins bien reconnu et pris en charge par l'organisme.

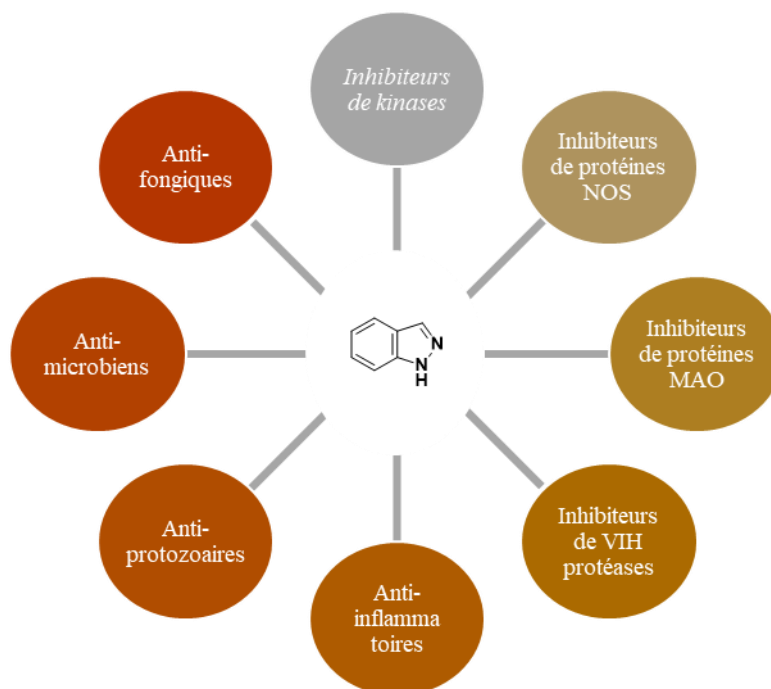


Figure 38 : Domaines d'applications actuels et en développement des indazoles en chimie médicinale.

### 1.1) Propriétés physicochimiques intrinsèques des indazoles

L'hétérocycle indazole est un bicyclic aromatique comportant deux atomes d'azote adjacents (**Figure 39**). Il existe sous deux formes tautomères dont la forme *1H* est majoritaire car plus stable thermodynamiquement ; il a été calculé qu'en solution, le 1-méthylindazole est plus stable de 2,4 kcal/mol que le 2-méthylindazole.<sup>[85]</sup> En effet, les *1H*-indazoles présentent un caractère aromatique plus fort, avec une répartition relativement égale de leurs électrons sur le système  $\pi$ , tandis que les *2H*-indazoles ont des structures de type base quinonique, avec des contributions plus fortes de leurs formes zwitterioniques.<sup>[86]</sup> Ces différences de distribution électronique influencent la géométrie, la nucléophilie, l'acidité, la basicité et la densité électronique de l'indazole, aux états fondamentaux et excités.

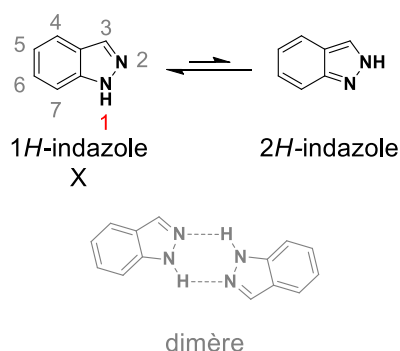


Figure 39 : Tautomérie et nomenclature des indazoles.

À l'état solide, comme en solution, les indazoles peuvent former des dimères par liaisons hydrogène entre le proton labile de l'un et l'azote N2 de l'autre et inversement (**Figure 40**) ; ces dimères sont en effet possibles car l'indazole possède à la fois un site acide et un site basique. Ces dimères sont favorisés par la baisse de polarité et de température des solvants et influencent les propriétés spectroscopiques des indazoles. Cependant, ils ne permettent pas la tautomérisation du *1H*-indazole en *2H*-indazole aux états fondamentaux et excités ; seule la formation de complexes avec des donneurs ou des accepteurs de protons permet de tautomériser le *1H*-indazole à l'état excité.<sup>[85]</sup>

Contrairement aux indoles qui peuvent réagir par leur atome d'azote N1 ou leur carbone C3, les indazoles sont peu nucléophiles par leur carbone C3. En revanche, leur réactivité est bien centrée sur les atomes d'azote. La méthylation des indazoles augmente la densité électronique disponible sur l'atome d'azote méthylé, augmentant le caractère donneur d'électrons de ce cycle aromatique. De plus, la tautomérisation du 1-méthylindazole vers le 2-méthylindazole n'étant pas possible, les propriétés physicochimiques des deux molécules peuvent être directement comparées, notamment en termes de répartition de densité électronique et de basicité. D'après les modèles calculés *in silico*, la méthylation en position N1 de l'indazole augmente la densité électronique sur le cycle indazole sans modifier sa répartition par rapport au *1H*-indazole. La méthylation en N2, en revanche, renforce notamment la densité électronique sur les atomes d'azote N1 et de carbone C3 ce qui participe à l'augmentation de la basicité et de la force du donneur  $\pi$  du 2-méthylindazole par rapport à son isomère (**Figure 40**).<sup>[86]</sup>

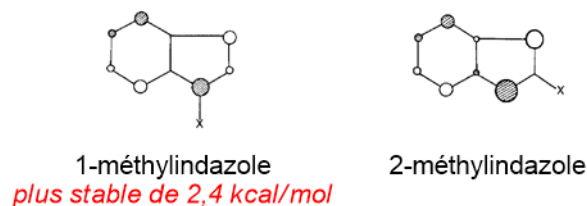


Figure 40 : Représentation des HOMO des 1- et 2-méthylindazoles ( $X = \text{Me}$ ) : la taille des cercles correspond aux probabilités relatives de population des orbitales.<sup>[86]</sup>

Des études de fluorescence réalisées pour les formes neutres et protonées de l'indazole et des 1-méthylindazole et 2-méthylindazole ont permis de démontrer que le rendement quantique de fluorescence du 1-méthylindazole neutre est similaire à celui du 1*H*-indazole neutre. En revanche, ceux du 2-méthylindazole neutre et protoné sont un ordre de grandeur plus faible, se rapprochant de celui du 1*H*-indazole protoné (**Figure 41**). Ces résultats mettent en évidence que, bien que la méthylation en position N2 des indazoles améliore leurs propriétés chromophoriques et leur capacité de transfert de charge, elle n'améliore pas leur efficacité de fluorescence ; ce qui est cohérent avec le fait que la fluorescence de l'indazole « simple » ne résulte pas d'un mécanisme de transfert de charge à l'état excité.<sup>[85]</sup>

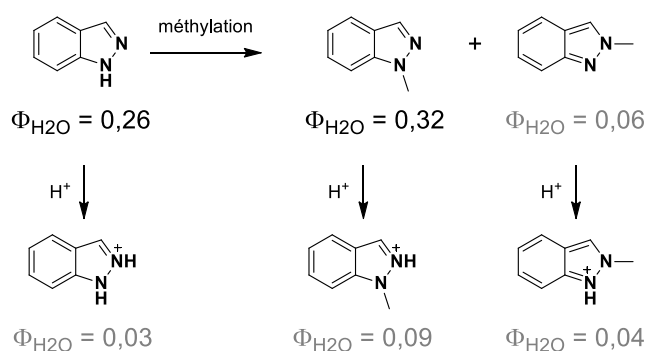


Figure 41 : Rendements quantiques de fluorescence des 1- et 2-méthylindazoles dans l'eau à pH neutre et acide, comparaison au 1*H*-indazole.<sup>[85]</sup>

Cette hypothèse sur le mécanisme de fluorescence des indazoles « simples » est appuyée par d'autres études sur la fluorescence du 1*H*-indazole et du 1-méthylindazole qui mettent en évidence que la fluorescence de ces molécules n'est pas sensible à la polarité des solvants mais à leur polarisabilité. Ainsi, il a été calculé qu'en absence d'autres substituants leur moment dipolaire ne varie pas au passage de leur état fondamental à leur état excité, démontrant que leur fluorescence ne repose pas sur un mécanisme de transfert de charge.<sup>[87]</sup>

En absence de substituants, les indazoles sont de bons fluorophores dans l'UV, et leur fluorescence ne repose pas sur un mécanisme de transfert de charge. Cependant, et notamment lorsqu'ils sont méthylés, les indazoles ont le potentiel de devenir des donneurs d'électron  $\pi$  et plus particulièrement s'ils sont substitués sur leur position C3 par des accepteurs. Ces données sont intéressantes car elles démontrent aussi que l'indazole « simple » n'est pas un inhibiteur de fluorescence, il devrait donc être possible d'obtenir des composés fluorescents à partir de cet hétérocycle.

## 1.2) Synthèses des indazoles substitués en position C3

Les indazoles sont très présents en chimie médicinale pour de nombreuses applications et sont substitués de manières très variée pour créer une grande diversité d'interactions spécifiques avec les molécules biologiques (**Figure 42**).

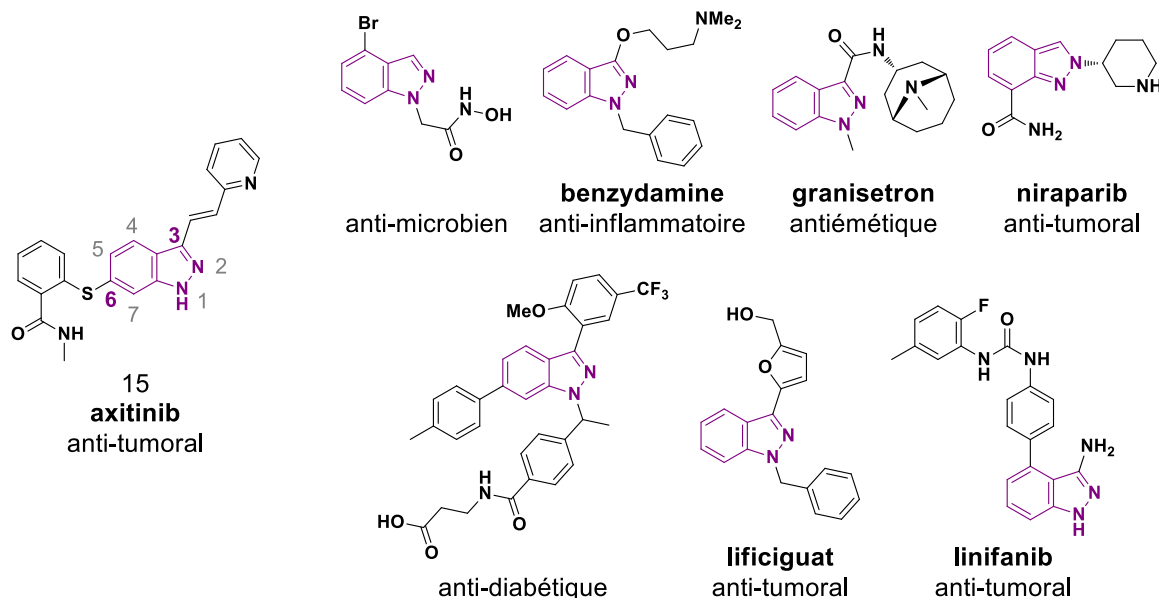


Figure 42 : Exemples de pharmacophores commerciaux et en développement comportant un indazole (violet).

Mes travaux de thèse portant plus précisément sur la substitution des indazoles en positions C3, puis C6 dans un second temps, nous nous limiterons à la synthèse des indazoles substitués en position C3 dans cette introduction. Ces substitutions peuvent se faire par couplage direct sur la position C3 des indazoles ou par formation du cycle indazole, avec ou sans formation de la liaison entre les deux azotes du cycle (**Schéma 2**).

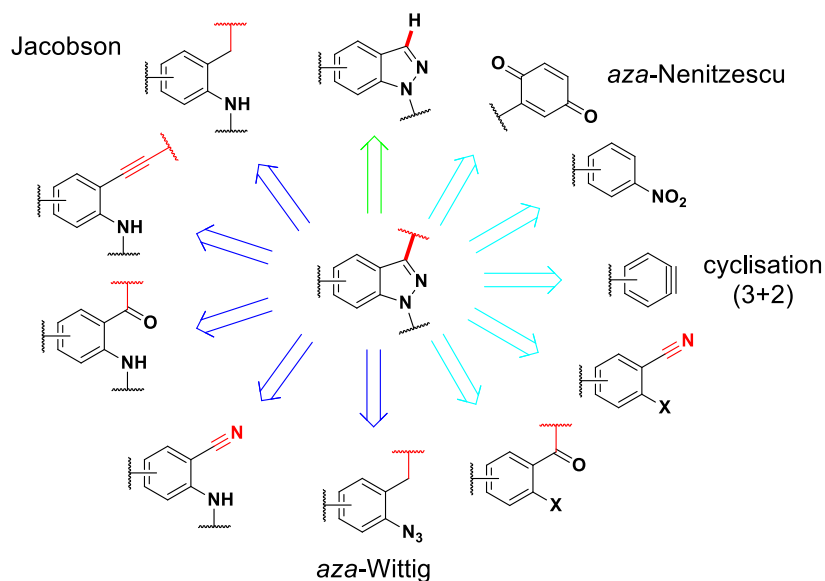


Schéma 2 : Synthons de départ pour la synthèse d'indazoles substitués en position C3 (par substitution directe, vert, ou par cyclisation du noyau avec et sans formation de la liaison N-N, bleu et cyan, respectivement)

## 1.2.1) Par substitution directe

Contrairement aux indoles, il n'est pas possible d'envisager de substitutions électrophiles directes sur les carbones C3 des indazoles car la position est trop peu réactive, les indazoles étant plus nucléophiles par leurs atomes d'azotes. Seules les halogénations semblent y faire exception, de nombreux protocoles dans la littérature permettant l'introduction d'un atome de brome ou d'iode sur la position C3 des indazoles. Ainsi, la substitution en C3 sera vue par la suite comme le produit d'un couplage catalysée par des métaux de transition.<sup>[88,89]</sup> Pour limiter les risques de pluri-halogénéation, de plus en plus de protocoles se penchent également sur la possibilité d'introduire directement ces substituants par activation C-H. Cette substitution directe des indazoles par couplage oxydatif catalysé aux métaux permet de l'envisager comme une étape tardive d'assemblage de deux fragments dans une voie de synthèse convergente.

En se penchant plus précisément sur ces protocoles, il est intéressant de noter que les conditions réactionnelles varient généralement entre la substitution directe des indazoles fonctionnalisés en position N1 ou N2, avec des conditions réactionnelles plus douces pour ces derniers. Les premières réactions d'arylations directes catalysées aux métaux de transition ont d'ailleurs été publiées sur des indazoles protégés en position N2, de façon intramoléculaire par l'équipe de Lautens<sup>[90]</sup> puis de façon intermoléculaire par l'équipe de Greaney (**Schéma 3 a**).<sup>[91]</sup> Dans les deux cas, une source de palladium et avec une phosphine sont employés pour catalyser la réaction, cependant ces systèmes catalytiques diffèrent par le rôle des additifs. Dans le cas de la réaction intramoléculaire, le norbornène est un co-catalyseur qui favorise la disponibilité du palladium II pour l'insertion dans la liaison C-H,<sup>[92]</sup> bien qu'il soit ici présent en quantité stœchiométrique. Tandis que pour la version intermoléculaire, un sel d'argent joue le rôle de base et d'oxydant stœchiométrique, permettant de diminuer température et temps de réaction et d'utiliser un bromo comme un iodoaryle sans modification significative du rendement.

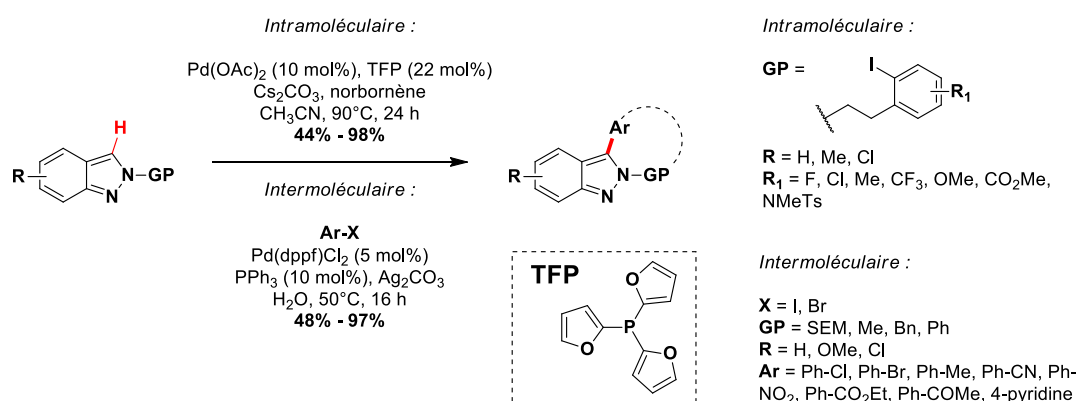


Schéma 3 : Substitutions directes des indazoles en position C3 par catalyse aux métaux de transition : arylations directes des indazoles protégés en position N2.<sup>[90,91]</sup>

La première arylation directe des indazoles protégés en position N1 a été proposée plus tardivement par l'équipe de Yu (**Schéma 4**).<sup>[93]</sup> Une source de palladium II est également employée mais en présence d'un ligand azoté bidenté qui limiterait l'ouverture de l'indazole,

<sup>a</sup> Pour l'ensemble du manuscrit, il a été considéré qu'en absence d'équivalence explicite des réactifs sur les schémas réactionnels, lesdits réactifs étaient présents en quantités stœchiométriques ou sur-stœchiométriques dans les milieux.

réaction secondaire de l'activation C-H des 1*H*-indazoles. Comme mentionné précédemment, des températures et des temps de réaction plus élevés que pour les indazoles N2-substitués sont nécessaires pour atteindre des rendements équivalents. Ce protocole est cependant relativement tolérant envers le type et la position des substituants sur le groupement aryle.

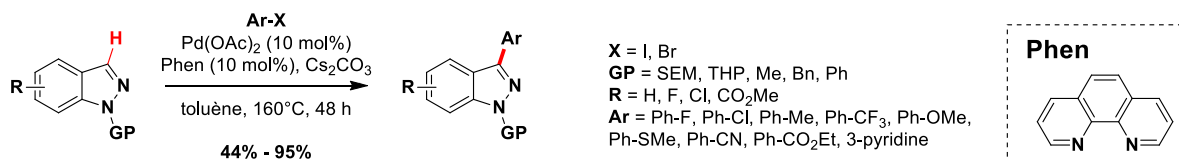


Schéma 4 : Substitutions directes des indazoles en position C3 par catalyse aux métaux de transition : arylations directes des indazoles protégés en position N1.<sup>[93]</sup>

Peu après, un protocole pour un couplage de Heck oxydatif en position C3 des 1- comme des 2-méthylindazoles a été publié par l'équipe de Guillaumet, avec des rendements supérieurs observés pour ces derniers.<sup>[94]</sup> Comme pour l'arylation directe des indazoles protégés en position N2 présentée ci-dessus, la réaction s'effectue en présence d'un catalyseur au palladium et d'un sel d'argent (base et oxydant), mais à plus haute température (Schéma 5).

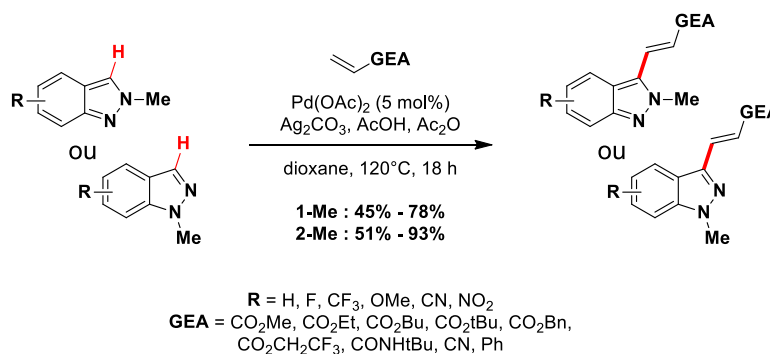


Schéma 5 : Substitutions directes des indazoles en position C3 par catalyse aux métaux de transition : couplage de Heck direct en position C3 des méthylindazoles.<sup>[94]</sup>

Ces approches bien que séduisantes présentent malgré tout un certain nombre de limites. Premièrement, ces catalyses nécessitent l'utilisation de métaux de transition et, pour la plupart, plusieurs équivalents de sels d'argent dont le coût est élevé et l'impact environnemental controversé. Les études plus récentes visent à pallier ces problèmes en changeant le mode d'activation pour permettre de travailler à des températures moins élevées,<sup>[95]</sup> en remplaçant le palladium ou l'argent par des métaux moins précieux comme le cuivre,<sup>[96]</sup> ou en s'affranchissant complètement de ces métaux de transitions pour travailler avec des alcalinoterreux. L'équipe de Fabis a notamment développé une méthode de magnésiation sélective de la position C3 des iodoindazoles protégés en position N2 (Schéma 6).<sup>[97]</sup> Cette synthèse permet d'introduire sélectivement divers groupements électroaccepteurs (GEA) avant de substituer l'atome d'iode, s'affranchissant ainsi des éventuels problèmes de réactivité causés par d'autres substituants.

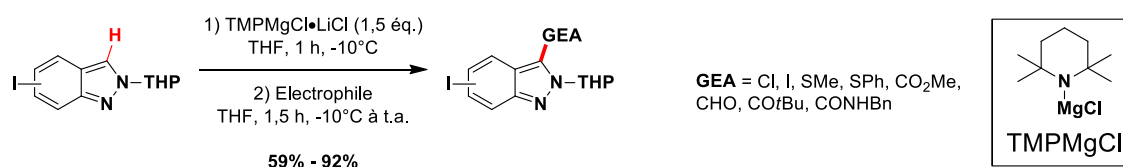


Schéma 6 : Substitutions directes des indazoles en position C3 via la formation d'organomagnésiens.

Deuxièmement, l'ensemble de ces synthèses nécessitent de protéger les azotes des indazoles, préférentiellement en position N2 pour diminuer leur caractère aromatique, augmenter leur réactivité et limiter les sous-produits d'ouverture de cycle. La protection permet aussi et surtout de limiter l'empoisonnement du catalyseur par l'indazole. Ce problème d'empoisonnement se retrouve sur l'ensemble des catalyses aux métaux de transition en présence d'indazoles, pour lesquelles une substitution en absence de groupement protecteur représente à ce jour un réel défi synthétique.

Troisièmement, l'ensemble des substrats présentés dans ces articles sont peu substitués (indazoles comme aryles) permettant difficilement d'évaluer l'applicabilité réelle de ces synthèses à de la modification tardive revendiquée par les auteurs. Néanmoins, ces réactions permettent la synthèse rapide de petits indazoles substitués en positions N1 et C3 comme le licifigat (**Figure 42**)<sup>[94,95]</sup> et elles permettent d'accéder efficacement à des 2*H*-indazoles substitués dont les autres voies de synthèse sont plus délicates.

### 1.2.2) Par cyclisation du noyau indazole

Les indazoles n'étant que peu commerciaux et généralement onéreux, la substitution directe de ces derniers correctement fonctionnalisés n'est pas toujours envisageable. Il est donc souvent nécessaire de synthétiser le bicycle en ayant pris soin d'insérer auparavant un ou plusieurs substituants clés à des positions stratégiques. Il existe plusieurs voies de synthèse décrites dans la littérature pour accéder aux cycles indazoles en partant d'un aryle substitué de façon adéquate.<sup>[84,98]</sup> Il est possible de rassembler ces réactions en deux grandes catégories selon si la cyclisation implique la formation de la liaison azote-azote, ou non.

#### 1.2.2.1) Avec formation de la liaison N-N

Dans le cas d'une cyclisation impliquant la formation de la liaison entre les deux azotes du cycle indazole, l'apport d'azote se fait généralement par la plateforme aromatique de départ combinée à une source extérieure. L'ion nitrosonium  $\text{NO}^+$  est la source extérieure d'azote historique. Les intermédiaires clés de ces réactions sont des molécules nitrosées, voire des sels de diazonium lorsque l'aniline de départ n'est pas substituée (formation de la liaison N-N), sur lesquels se fait l'attaque intramoléculaire (formation de la liaison C-N) avant restauration de l'aromaticité par déshydratation de la molécule ou par isomérisation du 3*H*-indazole résultant vers le 1*H*-indazole final (**Schéma 7**). Cette première cyclisation, mise en évidence par Jacobson au début du XX<sup>ème</sup> siècle<sup>[99]</sup> puis optimisée dans les années 80,<sup>[100]</sup> est aujourd'hui encore utilisée pour la cyclisation des indazoles riches en électrons. Elles sont principalement limitées par l'impossibilité de produire à grande échelle, les sels de diazonium étant potentiellement explosifs, mais restent parmi les plus tolérantes pour synthétiser des indazoles substitués par des alkyles en position C3, permettant même la rétention de leurs conformations absolues pour des composés de départ chiraux (**Schéma 7**).<sup>[98,101]</sup>



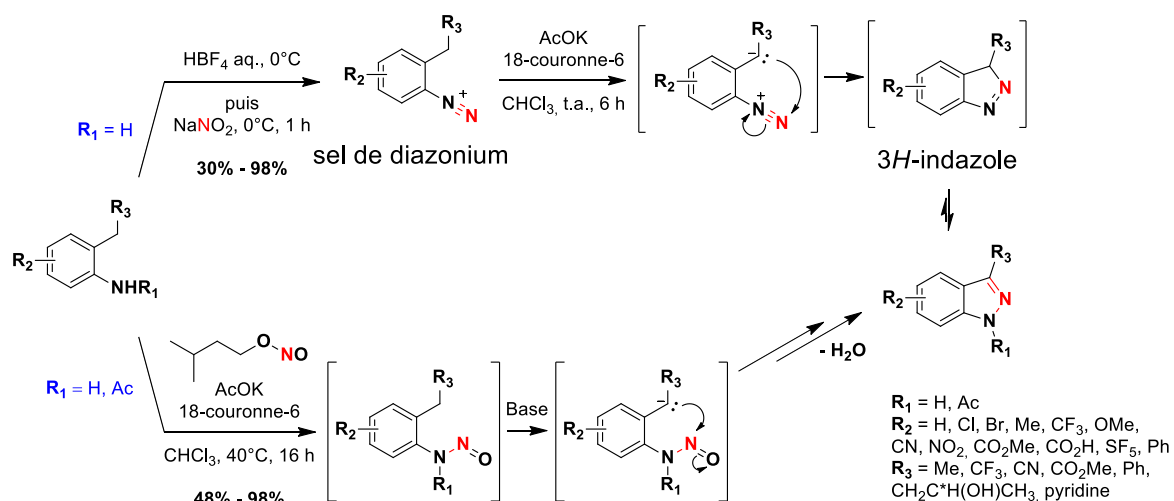


Schéma 7 : Voies générales de cyclisation des 1H-indazoles substitués en position C3 par formation de la liaison N-N en présence d'agent nitrosant par la modification de Jacobson.<sup>[98-101]</sup>

La cyclisation des *ortho*-éthynylanilines substituées en 1H-indazol-3-ones aromatiques peut se faire selon le même principe réactionnel : un sel de diazonium est formé en présence d'agent nitrosant puis la cyclisation de l'indazole est promue par l'attaque de l'eau sur l'alcyne avant isomérisation de l'énol obtenu vers la cétone finale (**Schéma 8**).<sup>[102]</sup> De la même manière que pour la modification de Jacobson, une variation de la source d'ion nitrosonium peut éventuellement permettre la cyclisation d'un indazole substitué en position N1 en partant de l'aniline correspondante (non représenté, voir **Schéma 7** Jacobson).

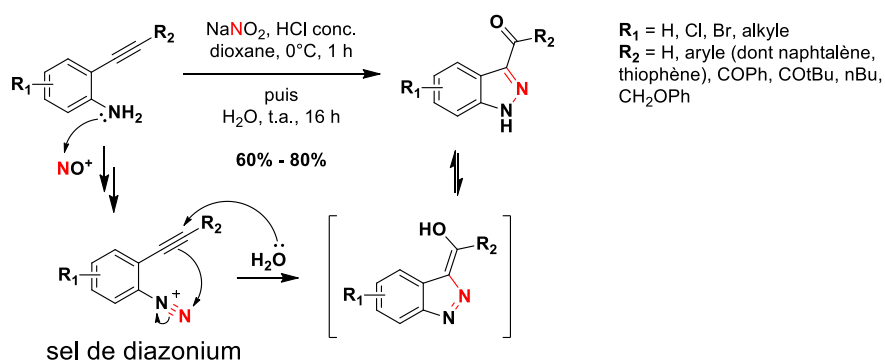


Schéma 8 : Voies générales de cyclisation des 1H-indazoles substitués en position C3 par formation de la liaison N-N en présence d'agent nitrosant : cyclisation des 1H-indazol-3-ones aromatiques.<sup>[102]</sup>

Les amines sont d'autres sources d'atome azote pour lesquelles la formation la liaison C-N est antérieure à la liaison N-N, *via* la synthèse d'une imine intermédiaire. Par exemple, il est possible de condenser l'hydroxylamine sur des  $\alpha$ -anilino-cétones, puis les oximes obtenues peuvent ensuite être activées au chlorure de mésyle<sup>[103]</sup> ou par réaction de Mitsunobu,<sup>[104]</sup> pour promouvoir la cyclisation de l'indazole final par attaque nucléophile intramoléculaire (**Schéma 9**).

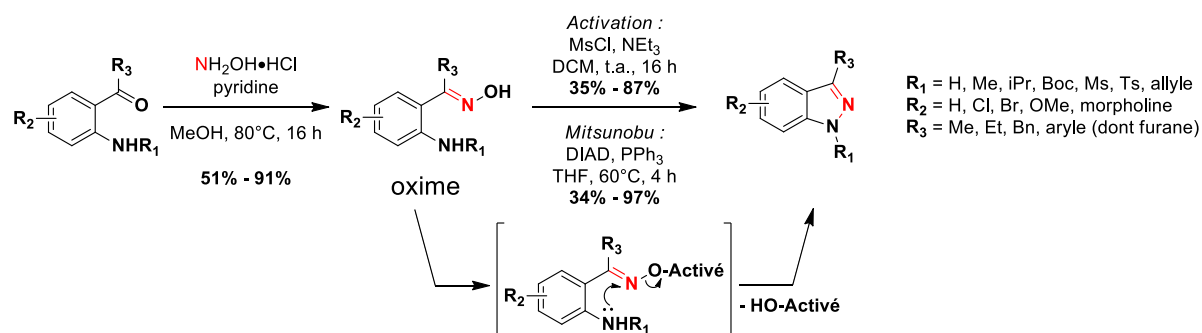


Schéma 9 : Voies générales de cyclisation des 1H-indazoles substitués en position C3 par formation de la liaison N-N à partir d'une imine par activation d'une oxime.<sup>[103,104]</sup>

Dans ce dernier exemple de cyclisation, les cétones de départ sont quant à elles synthétisées par addition d'organomagnésiens ou lithiens sur des *ortho*-cyanoanilines, suivi de l'hydrolyse des imines intermédiaires. Des protocoles tirant avantage de la formation et de la possibilité d'isoler cette imine intermédiaire ont ensuite été développés. L'addition d'organomagnésiens sur des *ortho*-cyanoanilines permet la synthèse d'imines intermédiaires qui, une fois mises en présence d'un catalyseur cuivrique et d'un oxydant (ici, l'oxygène de l'air), peuvent cycliser en indazoles substitués en position C3 (Schéma 10).<sup>[105]</sup>

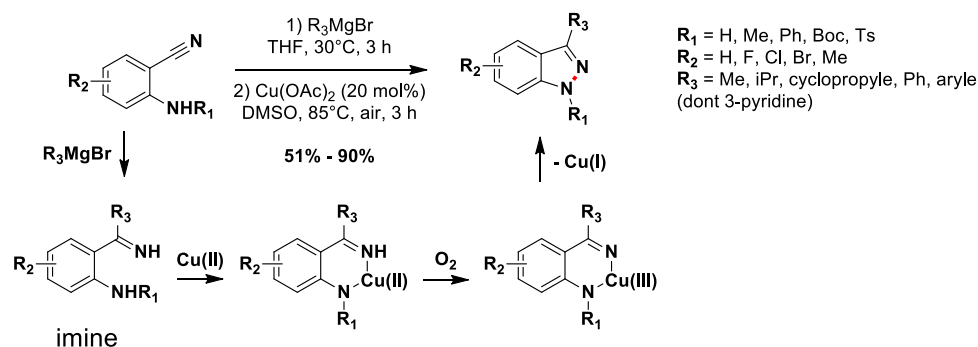


Schéma 10 : Voies générales de cyclisation des 1H-indazoles substitués en position C3 par formation de la liaison N-N à partir d'une imine par catalyse au cuivre.<sup>[105]</sup>

Enfin, il existe des synthèses pour lesquelles l'ordre de formation des liaisons N-N et C-N est moins défini.

En partant d'un azoture aromatique correctement substitué, un premier atome d'azote est activé en présence d'une phosphine selon le mécanisme de la réduction de Staudinger puis deux mécanismes réactionnels sont envisageables après ajout de l'agent nitrosant et de la base (Schéma 11). Dans la voie A, la base génère un carbanion qui peut s'additionner sur l'agent nitrosant (formation de la liaison C-N), l'intermédiaire résultant peut cycliser en un diazaoxaphosphétane transitoire selon un mécanisme (2+2) comme pour les réactions de Wittig et *Wittig-like* (formation de la liaison N-N). À l'inverse, dans la voie B, la liaison N-N est formée en première par nitrosation de l'azote de l'ylure puis l'attaque nucléophile du carbanion sur l'azote permet la formation de la liaison C-N et la cyclisation du diazaoxaphosphétane. Dans les deux cas, la perte de l'oxyde de phosphine est la force motrice de cette réaction qui génère un 3H-indazole intermédiaire qui s'isomérise en 1H-indazole final (Schéma 11).

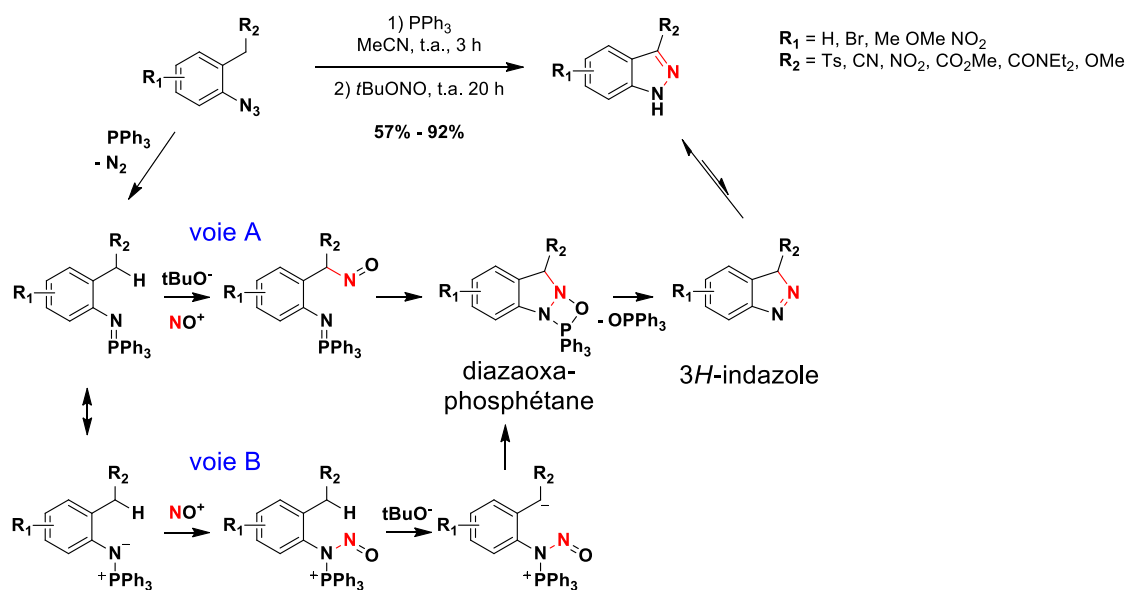


Schéma 11 : Voie générale de cyclisation des 1H-indazoles substitués en position C3 par formation de la liaison N-N par réduction de Staudinger suivie d'une réaction d'aza-Wittig.<sup>[106]</sup>

Contrairement aux voies de synthèse présentées précédemment, cette dernière permet d'accéder à des cycles indazoles appauvris en électrons.

### 1.2.2.2) Sans formation de la liaison N-N

Dans le cas où la cyclisation de l'indazole passe uniquement par la formation de nouvelles liaisons carbone-azote et éventuellement carbone-carbone, il est nécessaire de faire réagir la plateforme aromatique de départ avec un partenaire di-azoté. Parmi ces partenaires, substitués ou non, les hydrazines et les hydrazones sont majoritairement représentées.<sup>[84,98]</sup>

Il existe de nombreux exemples dans la littérature rapportant la condensation des hydrazines sur des cétones  $\alpha$ -aromatiques puis leur cyclisation en indazoles par substitution aromatique. Tout comme pour les cyclisations par activation des oximes présentées précédemment, les substituants sur la position C3 de l'indazole sont principalement limités par l'accès à la cétone de départ. Les premières substitutions aromatiques ont été proposés par catalyse aux métaux de transition sur le principe d'une réaction de Buchwald-Hartwig (catalyse métallique, **Schéma 12**)<sup>[107]</sup> ou d'une réaction de Ullmann<sup>[108]</sup> puis en s'affranchissant des métaux par substitution nucléophile aromatique d'un atome de fluor sous activation thermique.<sup>[109,110]</sup>

Les températures plutôt élevées ( $> 100^\circ\text{C}$ ) de ces protocoles limitant les substituants possibles sur l'indazole final, des améliorations ont été proposées en variant la nature du groupement partant lors des activations thermiques<sup>[111]</sup> ou en variant la nature des catalyseurs (**Schéma 12**). L'équipe de Bolm décrit notamment plusieurs exemples de cyclisations en présence de carbonate de potassium et d'une quantité catalytique de *N,N'*-diméthylcyclohexane-1,2-diamine (DMCDA, catalyse basique, **Schéma 12**). Ils expliquent cette réactivité singulière du couple  $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{DMCDA}$  par une combinaison de facteurs liés à la basicité, l'encombrement stérique et la capacité de stabilisation des ions de cette diamine.<sup>[112]</sup>

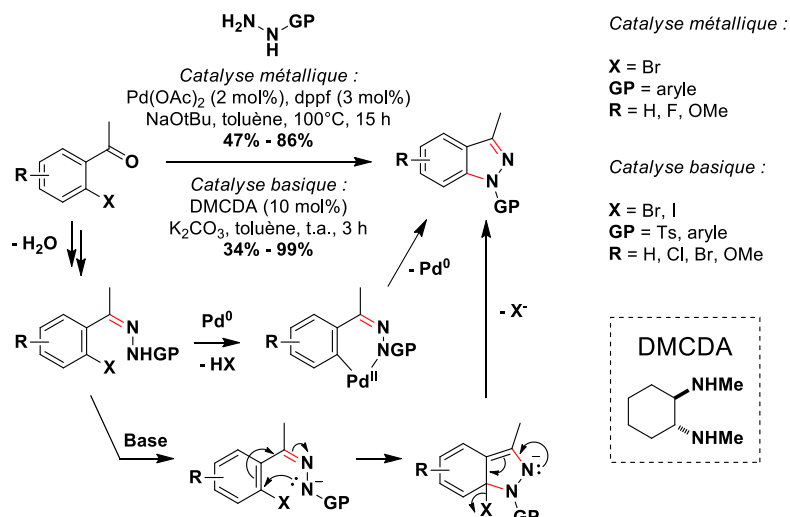


Schéma 12 : Voies générales de cyclisation des 1H-indazoles substitués en position C3 par formation de liaisons C-N par condensation d'une hydrazine sur une cétone aromatique.<sup>[107,112]</sup>

En partant d'un cyanobenzène en présence d'une hydrazine éventuellement substituée et protégée, il est possible de synthétiser des 3-aminoindazoles qui se retrouvent dans de nombreux inhibiteurs protéiques, comme le linifanib par exemple (**Figure 42**).<sup>[113]</sup> Ici encore, la substitution aromatique peut être réalisée thermiquement<sup>[109,110,113]</sup> ou par catalyse aux métaux de transition.<sup>[114]</sup> L'activation thermique est particulièrement efficace lorsque l'hydrazine n'est pas substituée mais ces rendements chutent dans le cas d'une hydrazine substituées (**Schéma 13**, rendement quantitatif<sup>[109,113]</sup> contre 25% à 64% pour la méthylhydrazine<sup>[110]</sup>). L'activation de la réaction par catalyse proposée par l'équipe de Rault peut permettre de pallier ce problème grâce à un protocole en deux étapes en partant d'une hydrazone. Après la réaction de couplage catalysée au palladium, l'hydrazone intermédiaire peut être N-alkylée avant sa déprotection puis la cyclisation de l'hydrazine conduisant à l'indazole disubstitué désiré.<sup>[114]</sup>

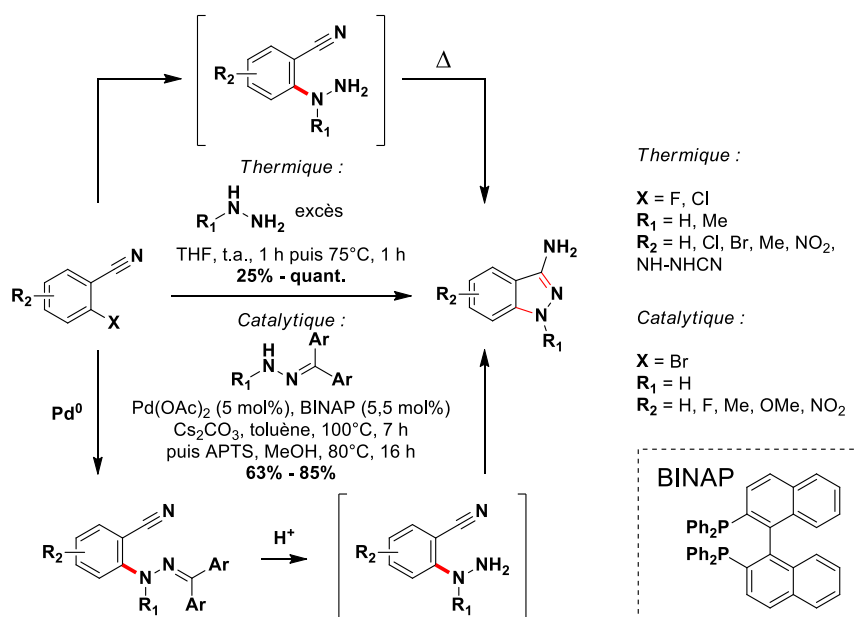


Schéma 13 : Voies générales de cyclisation des 1H-indazoles substitués en position C3 par formation de liaisons C-N : cyclisation des 3-aminoindazoles à partir de cyanobenzènes et d'hydrazines.<sup>[109,110,114]</sup>

L'emploi d'hydrazones comme source d'azote permet également d'accéder à des indazoles substitués, notamment en position N1 et C3, voire uniquement en C3 dans le cas où l'hydrazone est protégée par un groupement tosylé ( $R_1 = Ts$ , **Schéma 14**). Il est possible de faire réagir ces hydrazones avec des *o*-triméthylsilylphényl triflate en présence de fluorure et d'un catalyseur de transfert de phase. Dans ces conditions réactionnelles, le silane de départ est déprotégé, provoquant le départ du triflate et conduisant la formation de l'intermédiaire aryne hautement réactif. Le fluorure présent en solution joue également le rôle de base capable de déprotoner l'hydrazone qui peut potentiellement conduire à un sel de diazonium intermédiaire dans le cas où l'hydrazone est protégée par un groupement tosylé. Ces intermédiaires peuvent réagir entre eux selon un mode de cyclisation (3+2) pseudo-concerté pour conduire, après réaromatisation ou isomérisation au 1*H*-indazole final (**Schéma 14**).<sup>[115]</sup>

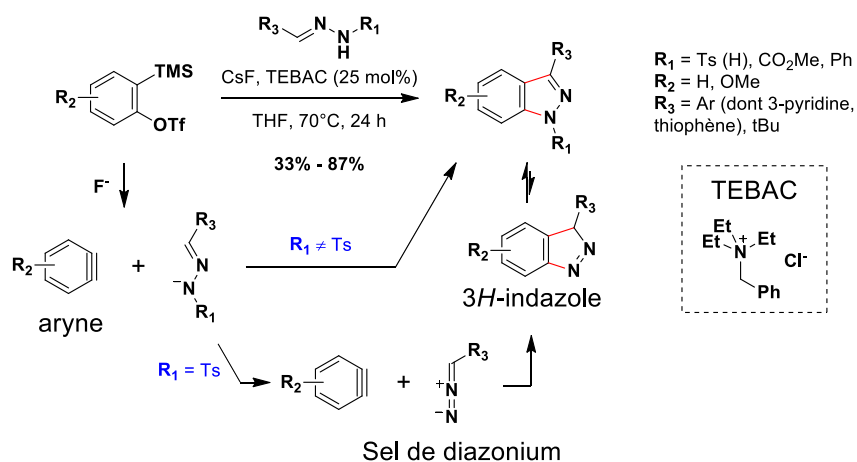


Schéma 14 : Voie générale de cyclisation des 1*H*-indazoles substitués en position C3 par la formation de liaisons C-N et C-C : par réaction d'hydrazones sur des arynes.<sup>[115]</sup>

À noter que deux régioisomères peuvent être formés lors de cette réaction en fonction du site électrophile attaqué préférentiellement sur l'aryne et c'est une des raisons pour lesquelles les substituants y sont limités (groupements  $R_2$ , **Schéma 14**). Dans les exemples développés ici, l'emploi d'un groupement suffisamment riche en électrons comme le groupement méthoxy permet de diriger la régiosélectivité de l'attaque et donc de la cyclisation.<sup>[115]</sup>

Toutes ces réactions nécessitent cependant des conditions de chauffe à des températures élevées, l'emploi de métaux de transition pour les catalyser et/ou de composés hautement réactifs, limitant les substituants qu'il est possible d'introduire sur la plateforme aromatique avant cyclisation. Des conditions de réactions plus tolérantes sont donc toujours en cours de développement. De façon analogue aux réactions avec les arynes, par exemple, il a été démontré qu'il est possible d'accéder à un panel plus large de substituants sur l'indazole final (carbones C4 à C7) ainsi que sur la position C3 en partant de nitrobenzènes et d'hydrazones protégées (**Schéma 15**).<sup>[116]</sup>

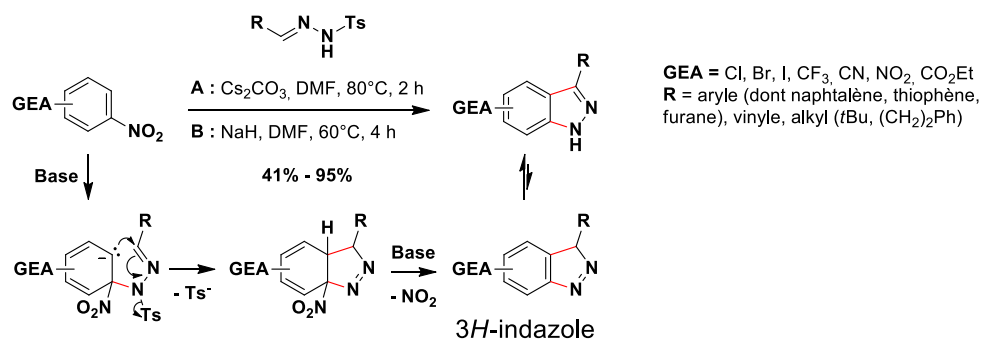


Schéma 15 : Voies générales de cyclisation des 1H-indazoles substitués en position C3 par la formation de liaisons C-N et C-C par substitution sur des nitrobenzènes.<sup>[116]</sup>

Il existe également des voies de synthèse permettant d'accéder à des substitutions plus inédites comme des groupements hydroxyles sur les positions C5 des indazoles. Les indazoles résultants sont d'ailleurs de bons chromophores grâce à l'introduction d'un donneur électronique à la position C5 des indazoles permettant un important transfert de charge vers les groupements en position C3, ce qui leur confère leur coloration.<sup>[80]</sup> Cette synthèse analogue à la synthèse des indoles de Nenitzescu a été optimisée en présence d'un excès de quinone de départ ou d'un oxydant extérieur pour permettre l'oxydation de l'hydroxyquinone intermédiaire, stable, puis de la réduction du produit de condensation de l'hydrazone sur la quinone en 5-hydroxyindazole final (**Schéma 16**).<sup>[80,117]</sup>

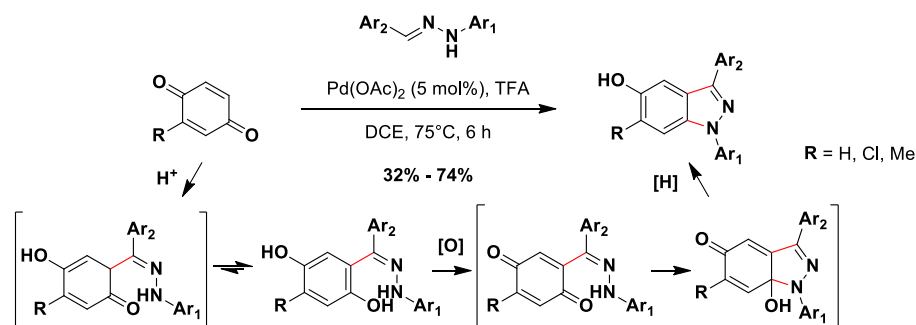


Schéma 16 : Voies générales de cyclisation des 1H-indazoles substitués en position C3 par la formation de liaisons C-N et C-C par réaction d'aza-Nenitzescu.<sup>[80]</sup>

Les hydrazones substituées sont aujourd'hui les réactifs préférés lors des cyclisations des indazoles car elles permettent de travailler sur de plus grandes échelles avec des réactifs moins dangereux (nitrosants, explosifs...) et des conditions réactionnelles plus douces mais, une fois encore, les substituants qu'il est possible d'introduire en C3 sont limités à des groupements stables, généralement aromatiques. Pour ces raisons, une méthode de synthèse alternative a été développée au laboratoire à partir d'indoles, molécules plus accessibles commercialement (et financièrement) que les indazoles, ou à défaut, dont les synthèses sont plus décrites dans la littérature.

## 2) Synthèse des fluorophores avec un donneur indazole « simple »

Nos études photophysiques préliminaires ont montré que l'axitinib **15** est une molécule pro-fluorescente et sélective qui pourrait jouer le rôle d'une sonde sélective des VEGFr. Sa fluorescence n'étant cependant pas adaptée à cette application, car trop peu différenciée de celle des protéines, ma thèse a consisté à améliorer ses propriétés de fluorescence.

Le noyau indazole étant clé pour la sélectivité de l'axitinib **15** pour les VEGFr et faisant office de donneur d'électrons lors des transferts de charge du fluorophore, il est essentiel dans nos structures. Cependant, il n'existe que très peu d'exemples de fluorophores comportant un cycle indazole en tant de donneur dans la littérature, mes efforts se sont donc d'abord concentrés sur la synthèse de systèmes D- $\pi$ -A, où D est un hétérocycle indazole donneur,  $\pi$  une liaison alcène et A un groupement électroaccepteur (**Figure 43**).

La première étape de synthèse a débuté par celle de la plateforme indazole fonctionnalisée stratégiquement en position C3 par un aldéhyde qui peut être substitué par divers groupements accepteurs *via* une unique étape de condensation de Knoevenagel ou de réaction de Wittig (**Figure 43**). Ces deux étapes correspondent à la phase 1 de synthèse. Elles ont été retenues et rendues possible grâce à l'expertise de l'équipe qui a développé la synthèse d'indazole-3-carboxaldéhydes à partir des indoles (respectivement **16** & **17**, **Figure 43**), peu avant mon arrivée au laboratoire.

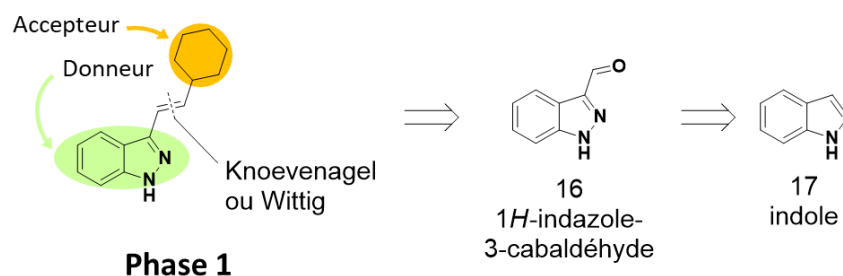


Figure 43 : Rétrosynthèse du groupement donneur des sondes de phase 1.

Une fois cette plateforme indazole obtenue, plusieurs groupements électroattracteurs ont été sélectionnés de sorte à pouvoir être introduits soit par condensation de Knoevenagel, soit par réaction de Wittig (**Figure 44**). Deux critères principaux de sélection ont été établis, l'accepteur devant être suffisamment : (i) stable et (ii) déficient en électron pour que les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de la sonde soient ou, au mieux, s'approchent de la fenêtre de transparence du milieu biologique. Enfin, une voie de synthèse de sondes avec des groupements aromatiques moins attracteurs a été explorée *via* une réaction de Heck palladocatalysée (**Figure 44**), pour établir un point de comparaison entre la fluorescence de nos sondes et celle de l'axitinib et débiter l'étude de l'influence des substituants en position C6 sur les propriétés de fluorescence de l'axitinib (cf. **Chapitre 3**).

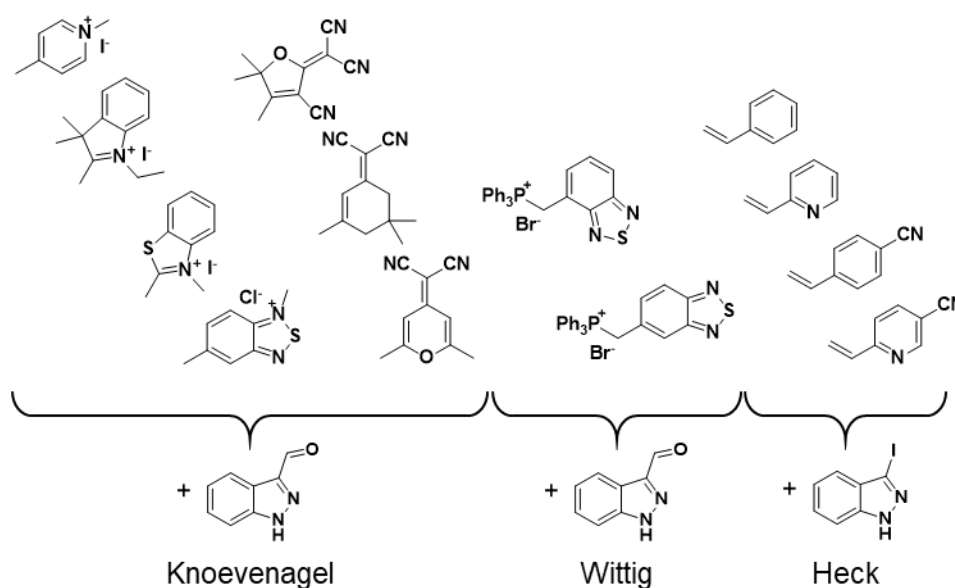


Figure 44 : Structure des accepteurs synthétisés pour ces sondes de phase 1 et partenaires de réaction.

## 2.1) Synthèse des donneurs

### 2.1.1) 1H-indazole-3-carboxaldéhyde

L'optimisation des conditions expérimentales pour la synthèse des 1H-indazole-3-carboxaldéhydes est née du besoin d'introduire une plus large variété de substituants sur la position C3 des indazoles que celle proposée dans la littérature (cf. **Chapitre 2 1.2**) p. 68). En effet, parmi les réactions présentées précédemment, les substituants introduits sur la position C3 des indazoles se limite à des groupements stables, principalement aromatiques.

Cette synthèse des 1H-indazole-3-carboxaldéhydes avait d'abord été envisagée par une réaction de Vilsmeier-Haack directement sur l'indazole, de façon analogue aux indoles. L'absence de littérature fait état de l'impossibilité de faire cette réaction de Vilsmeier-Haack sur les indazoles non-protégés, hormis une publication qui décrit d'excellents rendements sur le 5-nitroindazole mais dont la partie expérimentale étrangement peu détaillée laisse planer le doute quant à la faisabilité réelle de la réaction.<sup>[118]</sup> Cette différence de réactivité entre les indazoles et les indoles peut s'expliquer par la différence de nucléophilie, et donc de réactivité, qui existe au niveau de leurs carbones C3. Une autre approche est donc nécessaire pour pouvoir réaliser cette synthèse.

Une recherche approfondie de la littérature a permis de mettre en évidence une voie de synthèse du 1H-indazole-3-carboxaldéhyde **16** en partant de l'indole **17**. Cette réaction en conditions acides, publiée par Büchi en 1986, se fait avec de bons rendements pour des indoles de départ appauvris en électrons mais ces rendements chutent dès lors que cet indole est enrichi électroniquement.<sup>[119]</sup> Une optimisation réalisée au laboratoire a permis de mettre au point la réaction dans des conditions neutres et qui, par ajout lent de l'indole de départ, donne accès à des 1H-indazole-3-carboxaldéhydes substitués à partir d'indoles pauvres comme riches en électrons (conditions A, **Schéma 17**). Seules des conditions particulières pour les indazoles très



appauvris persistent car, leurs intermédiaires réactionnels étant stables, moins de précautions sont nécessaires lors de la mise en place de la réaction, requérant même un léger chauffage après addition de l'indole de départ au milieu réactionnel (conditions B, **Schéma 17**).<sup>[120]</sup>

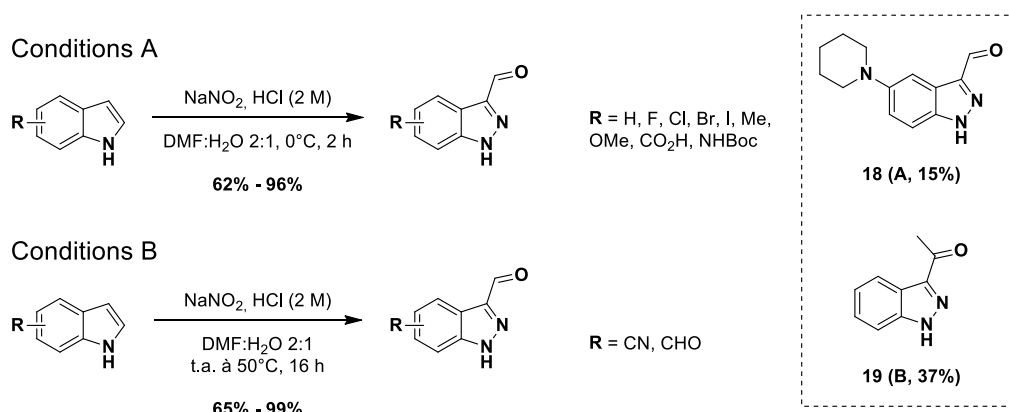


Schéma 17 : Conditions réactionnelles de la nitrosation optimisée au laboratoire.<sup>[120]</sup>

Cette réaction est simple à mettre en œuvre, rapide et relativement tolérante avec de bons rendements (**Tableau 3**). Un des intérêts de cette réaction optimisée par rapport à celle de Büchi est le pH neutre du milieu réactionnel qui permet de travailler avec des fonctions chimiques ou des groupements protecteurs sensibles à l'acide, comme le groupement Boc. Dans les conditions de réaction B, il est également possible d'accéder au 3-acétyl-1*H*-indazole **19**, en partant du 2-méthylindole. Bien que le rendement de la réaction soit modeste, sa synthèse se fait en une unique étape à partir d'un réactif peu coûteux. Seuls les indoles substitués par des amines susceptibles de se nitroser et de promouvoir une sous-réaction de nitration des cycles aromatiques peuvent induire des chutes de rendements, comme la pipéridine par exemple (**18**, **Schéma 17**).<sup>[120]</sup>

Tableau 3 : Comparaison des rendements de la nitrosation selon les conditions de réaction développées par Büchi et optimisées au laboratoire.

Conditions de Büchi	31%	26% <sup>[121]</sup>	R = Ph : 25% <sup>[122]</sup>	15%	Non testé
Conditions optimisées	96%	84%	R = Me : 91% R = Bn : 91%	Non testé	78%

D'un point de vue mécanistique, la réaction passe par une première étape d'addition nucléophile de l'indole en position C3 sur l'ion nitrosonium formé *in situ*, conduisant à un premier intermédiaire **20** à partir duquel deux réactions concurrentes peuvent se produire (**Schéma 18**). Dans le cas d'une addition rapide de l'indole de départ **17**, ce dernier peut piéger l'intermédiaire **20** et former un dimère **21** qui s'hydrolyse en présence d'eau, et forme les sous-produits **22a** et **22b**. Dans le cas d'une addition lente d'indole réalisée en deux heures à l'aide d'un pousse-seringue mécanique, l'intermédiaire **20** peut réagir avec l'eau et les ions nitrosonium présents en excès dans le milieu. Cette réaction conduit à l'ouverture du cycle

indole et l'intermédiaire **23** peut alors recycler pour conduire à un 3*H*-indazole **24** qui se réaromatise pour former le 1*H*-indazole-3-carboxaldéhyde **16** souhaité (**Schéma 18**).

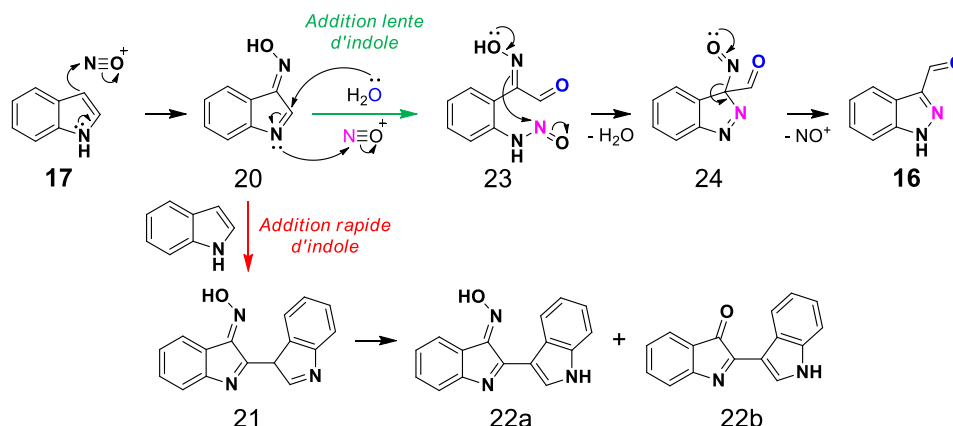


Schéma 18 : Mécanisme de la nitrosation des indoles (en vert) et sous-réaction possible (en rouge).<sup>[120]</sup>

### 2.1.2) 1- & 2-méthylindazole-3-carboxaldéhyde

Afin de compléter cette série d'indazoles substitués uniquement en position C3, quelques analogues méthylés en position N1 et N2 ont également été synthétisés (respectivement **25** et **26**, **Schéma 19**). Comme pour les études spectroscopiques publiées sur l'indazole « simple » (cf. **Chapitre 2 1.1**) p. 66), ces deux substitutions doivent me permettre d'établir des points de comparaison en spectroscopie avec la molécule analogue non-méthylée. Ainsi, il me sera possible d'estimer la forme tautomère majoritaire de la molécule non-substituée à l'état fondamental (par <sup>1</sup>H RMN et spectroscopie d'absorption) et à l'état excité (par spectroscopie de fluorescence).

Cette synthèse a été envisagée *via* une unique étape de méthylation du 1*H*-indazole-3-carboxaldéhyde **16**, de façon sélective ou non. Un premier test a donc été réalisé en présence d'iodométhane et d'une base inorganique (carbonate de potassium) à température ambiante puis en chauffant jusqu'à reflux du solvant. Dans le THF, aucune substitution n'a été observée, contrairement à la réaction réalisée dans l'acétonitrile. Au bout de 16 heures, l'avancement de la réaction dans l'acétonitrile est complet et un mélange de produits méthylés en N1 ou en N2 est obtenu avec un rapport de 75% de **25** contre 25% de **26** (déterminé par <sup>1</sup>H RMN du brut réactionnel, **Schéma 19**). Ces isomères ont pu être isolés par colonne sur gel de silice, entraînant cependant des pertes de produits dues à la difficulté de la séparation ( $\Delta R_f = 0,06$ ).

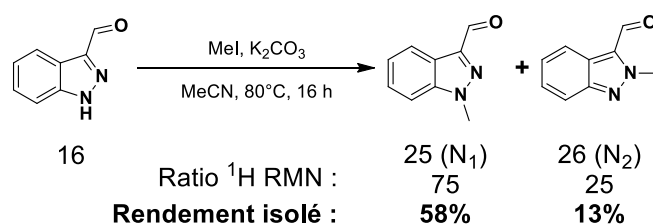


Schéma 19 : Conditions réactionnelles pour la méthylation non-sélective du 1*H*-indazole-3-carboxaldéhyde.

Cette séparation de deux isomères étant particulièrement délicate et ne permettant d'isoler qu'une faible quantité de 2-méthylindazole-3-carboxaldéhyde, des protocoles de méthylation sélective en position N2 ont ensuite été testés afin de le synthétiser sélectivement (**Tableau 4**).

**Tableau 4 : Conditions non-sélectives (entrées 1 & 2) et sélectives (entrées 3–5) pour la méthylation des 1H-indazole-3-carboxaldéhydes.**

#	Agent alkylant	Base	Solvant	T (°C)	t (h)	Rendement 25 (N <sub>1</sub> )		Rendement 26 (N <sub>1</sub> )	
						<sup>1</sup> H RMN	Isolé	<sup>1</sup> H RMN	Isolé
1	MeI	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	THF	75°C	16 h	<i>pas de conversion</i>	--	<i>pas de conversion</i>	--
2	MeI	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	MeCN	80°C	16 h	75%	<b>58%</b>	25%	<b>13%</b>
3	MeI	NaH	THF	-78°C	1 h 15	100	<b>9%</b>	0%	--
4	Me <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	--	DMSO/ HCl	50°C	6 h	<i>mélange complexe</i>	--	<i>mélange complexe</i>	<b>8%</b>

Dans un premier temps, la base a été remplacée par une base plus forte afin de favoriser une attaque nucléophile par l'azote N2 du cycle en théorie plus réactif que le N1 en conditions cinétiques (cf. **Chapitre 2 1.1**) p. 66 ; **Tableau 4** entrée 3). L'amidure a donc été préalablement formé en présence d'hydrure de sodium, dans le THF à basse température, avant ajout d'iodométhane. L'avancement total de la réaction a été confirmé par analyse <sup>1</sup>H RMN qui a également révélé la formation d'un unique isomère : le 1-méthylindazole-3-carboxaldéhyde **25**. De plus, seul 9% de produit final a pu être isolé après purification, laissant penser que la formation de l'anion entraîne la dégradation du produit de départ. Ces deux constats m'ont donc incitée à tester d'autres agents alkylants plutôt que différentes bases pour tenter de métyler préférentiellement la position N2 du 1H-indazole-3-carboxaldéhyde **16**.

Inspirée par un protocole breveté pour la préparation du pazopanib, un principe actif à cœur 2-méthylindazole,<sup>[123]</sup> le 1H-indazole-3-carboxaldéhyde **16** a été traité par un autre agent alkylant (**Tableau 4** entrée 4). Des produits de méthylation ont pu être observés par analyse <sup>1</sup>H RMN des bruts réactionnels, cependant le mélange complexe obtenu ne permet pas de conclure sur leurs proportions relatives ni sur la nature des sous-produits de la réaction. Le 2-méthylindazole-3-carboxaldéhyde **26** a malgré tout pu être isolé majoritairement mais son rendement isolé est inférieur à la méthylation non-sélective présentée précédemment.

Cette réactivité complexe de l'indazole-3-carboxaldéhyde **16** et qui diffère de celle des indazoles « simples » ne peut être que due à la présence du groupement aldéhyde qui substitue sa position C3. Cet aldéhyde peut influencer sur la réactivité (site électrophile), sur la coordination (atome d'oxygène pouvant former une pince avec l'azote N2) ou encore sur la répartition de la densité électronique du cycle et donc sur la nucléophilie relative des deux atomes d'azotes.

Face à ces résultats peu encourageants pour la synthèse sélective de méthylindazole-3-carboxaldéhydes et par soucis d'économie de temps, la voie de synthèse non-sélective initiale a été retenue (**Schéma 19**). Cette synthèse reste malgré tout facile à mettre en œuvre et a pu être

réalisée sur une échelle de plusieurs grammes au cours d'un stage de découverte du laboratoire de M1 (stage de 3 semaines) sans perte significative de rendement.

## 2.2) Condensations Knoevenagel

La condensation de Knoevenagel est une réaction de couplage entre un aldéhyde (ou une cétone) et un méthylène en  $\alpha$  d'un groupement électroattracteur et est donc particulièrement adapté à la synthèse de fluorophores.<sup>[39,80]</sup> Pour la synthèse de mes sondes, l'introduction d'un panel varié de groupements accepteurs a été effectuée afin de pouvoir établir la comparaison la plus large possible et ne retenir que les motifs les plus pertinents pour la suite du projet.

### 2.2.1) Synthèse des accepteurs

Plusieurs accepteurs récurrents de la littérature ont été retenus puis synthétisés avant d'être assemblés sur le donneur indazole. Les synthèses de ces accepteurs chargés ou neutres se font généralement en une seule étape et sont faciles à mettre en œuvre sur d'importantes quantités (testées jusqu'à 50 millimoles au laboratoire).

#### 2.2.1.1) Accepteurs chargés

Trois premiers accepteurs chargés positivement ont été synthétisés par quaternarisation d'un azote aromatique en présence d'agent alkylant. Dans chacun de ces cas-là, l'emploi d'un solvant adéquat a permis de précipiter le produit brut au cours de la réaction, facilitant grandement leur purification.

Le 1,4-diméthylpyridinium **27** a été obtenu sous forme de poudre blanche par addition d'iodométhane sur la 4-méthylpyridine dans le toluène avec un rendement acceptable de 64%. De la même manière, l'indolinium **28** a précipité quantitativement sous forme de poudre rose fuchsia après réaction de l'indolénine correspondante et d'iodoéthane au reflux du toluène (**Schéma 20**). Enfin, le benzothiazolium **29** a été obtenu sous forme de poudre blanche dans le toluène avec seulement 3% de rendement contre 90% dans l'acétonitrile (**Schéma 20**). Ces derniers résultats sont assez surprenants étant donné que le toluène est décrit dans la littérature au même titre que l'acétonitrile ou l'éthanol comme solvant de cette réaction.

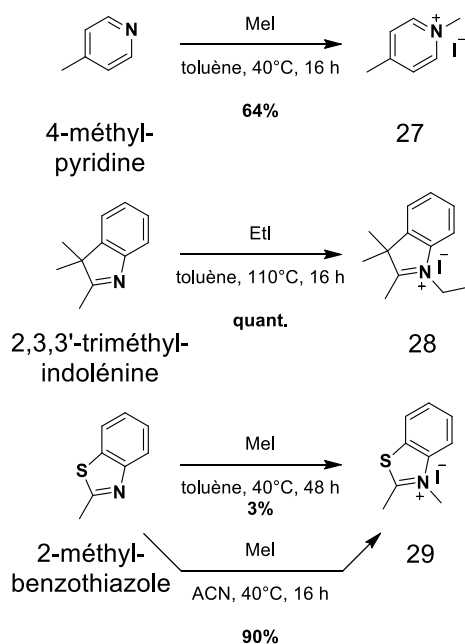
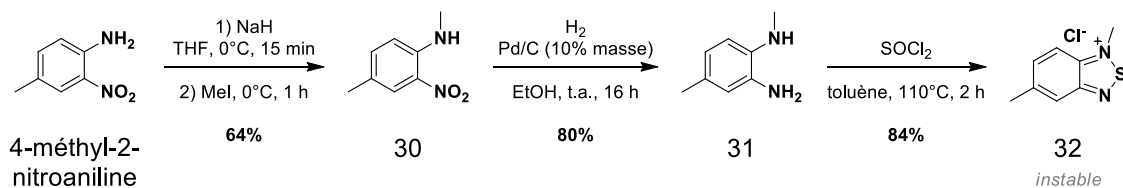


Schéma 20 : Conditions réactionnelles pour la synthèse des accepteurs quaternarisés.

Enfin, un dernier accepteur chargé a été envisagé, à partir d'un bicyclic benzothiadiazole. Cet hétérocycle comportant deux atomes d'azotes, il ne peut pas être méthylé tardivement comme les accepteurs présentés précédemment à cause du manque de régiosélectivité de la réaction. La méthylation doit donc se faire avant cyclisation ; la *N*,4-diméthylphényl-1,2-diamine **31** a été synthétisée par méthylation de la 4-méthyl-2-nitroaniline puis réduction du groupement nitro de la *N*,4-diméthylphényl-2-nitroaniline **30**, avant d'être cyclisée en présence de chlorure de thionyle selon un protocole décrit dans la littérature (Schéma 21).<sup>[124]</sup> Le sel de benzothiadiazolium **32**, jaune en solution, a été isolé avec un rendement global de 43% et caractérisé par <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C RMN. Malheureusement, le produit s'est avéré instable à l'humidité ambiante<sup>[125]</sup> et, pour cette raison, cet accepteur benzothiadiazolium **32** a été mis de côté.

Schéma 21 : Conditions réactionnelles pour la synthèse du benzothiadiazolium **32**.

### 2.2.1.2) Accepteurs neutres

Trois accepteurs neutres, de type polynitrile, ont été obtenus par une étape de condensation de Knoevenagel du malononitrile sur la cétone correspondante (Schémas 22 & 23). Dans les cas de la formation du dicyanopyrane **33** (DCP), le malononitrile est utilisé en équivalence stricte afin de limiter la polymérisation du produit sur le réactif de départ. En revanche, pour l'accepteur tricyanofurane **34** (TCF), deux équivalents de malononitrile sont nécessaires afin de permettre la cyclisation puis la seconde condensation dont résulte le produit final (Schéma 22).

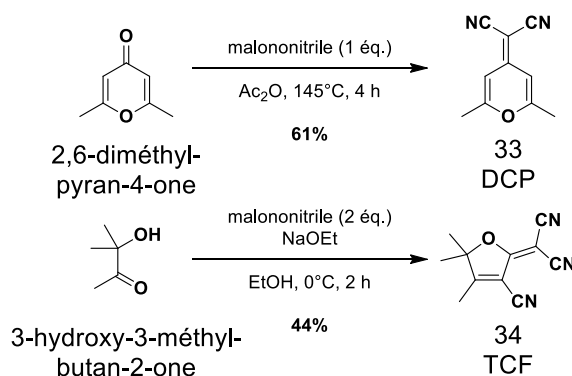


Schéma 22 : Conditions réactionnelles pour la synthèse des accepteurs de type polynitrile.

Un troisième accepteur polynitrile récurrent de la littérature a été envisagé. Comme pour les deux autres accepteurs, sa synthèse s'effectue en une étape de condensation de Knoevenagel du malononitrile sur l'isophorone. Une première série de conditions standard ont été tentées, sans succès (**Schéma 23**). Dans l'acétonitrile, seule la polymérisation de la réaction a été observée après deux jours de réaction alors qu'aucune conversion n'est observée dans l'éthanol qui est pourtant décrit dans de nombreuses synthèses du composé **35**. D'autres conditions réactionnelles ont donc été tentées, inspirées par la littérature,<sup>[126]</sup> et m'ont enfin permis d'isoler le produit souhaité sous forme des cristaux oranges avec un rendement de 49% (**Schéma 23**).

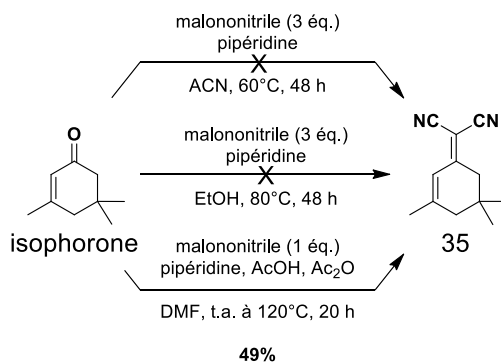
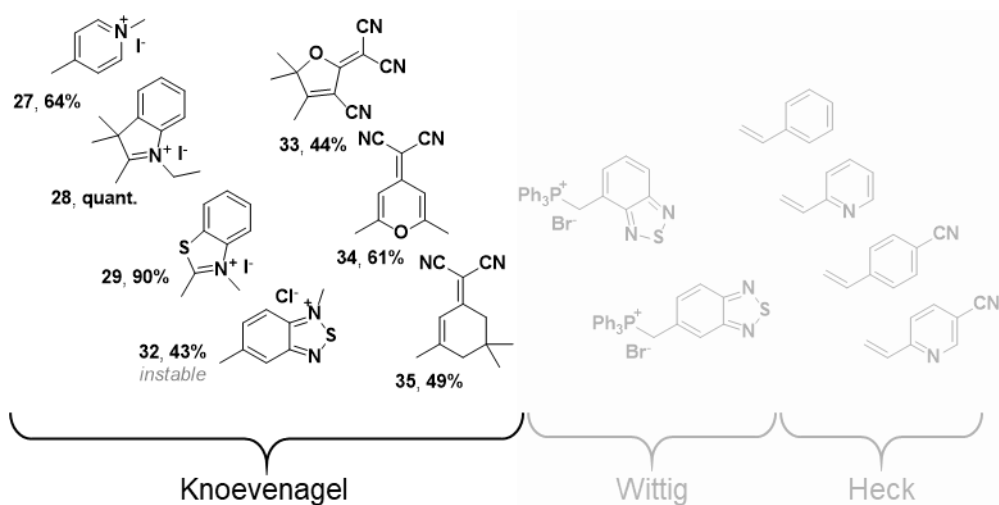
Schéma 23 : Conditions réactionnelles pour la synthèse de l'accepteur polynitrile **35**.

Figure 45 : Structures et rendements des accepteurs synthétisés pour la condensation de Knoevenagel.

Ainsi, sept accepteurs ont pu être synthétisés par quaternarisation, par cyclisation et par condensation de Knoevenagel, sur des quantités allant de 10 à 50 millimoles et des rendements finaux compris entre 44% et quantitatif (**Figure 45**).

### 2.2.2) Synthèse des sondes par condensation de Knoevenagel

Les groupements accepteurs quaternarisés (pyridinium **27**, indolinium **28** et benzothiazolium **29**) et de type polynitrile (TCF **33**, DCP **34** et **35**) ont été engagés dans une condensation de Knoevenagel avec le 1*H*-indazole-3-carboxaldéhyde **16** jusqu'à obtention des chromophores **36** à **42** avec de bons rendements compris entre 65% et 91% (**Schéma 24**).

Une première optimisation rapide des conditions réactionnelles, réalisée avant mon arrivée au laboratoire, a permis de mettre en évidence que l'acétonitrile est un meilleur solvant que l'éthanol généralement utilisé pour ces réactions et permet notamment de précipiter les produits par ajout d'éther diéthylique avant purification. La réaction est catalysée par la pipéridine, hormis pour l'accepteur DCP **34** pour lequel le produit souhaité n'a pas pu être observé dans ces conditions. En se basant sur un protocole de la littérature qui permet de mono-substituer le DCP **34**,<sup>[127]</sup> le milieu réactionnel a été tamponné par l'ajout d'acide acétique. Ces conditions réactionnelles plus douces limitent ainsi la condensation de deux aldéhydes sur un même accepteur et permettent d'isoler 50% du produit désiré (avec toujours 12% de *bis*adduit isolé, en gris, **Schéma 24**).

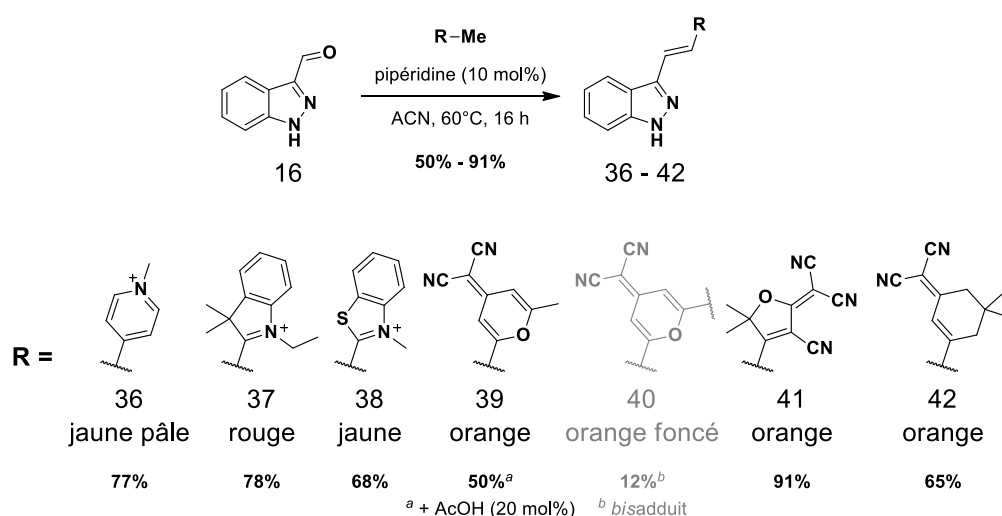


Schéma 24 : Synthèse des sondes par condensation de Knoevenagel.

Deux chromophores ont ensuite été choisis pour être méthylés en position N1 et N2 du donneur indazole afin d'étudier l'effet de cette dérivation sur les propriétés optiques de nos molécules. Ces chromophores portant des groupements accepteurs indolinium **37** et benzothiadiazole **53** (dont la synthèse sera présentée ci-après) ont été sélectionnés pour leurs différences structurales marquées, laissant pressentir des comportements spectroscopiques bien distincts. Le chromophore indolinium **37** possède une structure de type mérocyanine, c'est-à-dire une structure conjuguée et chargée où la délocalisation de cette dernière s'effectue sur un nombre impair d'électrons. Le chromophore benzothiadiazole **53** a quant à lui une structure

capto-dative, structure pour laquelle le groupement donneur et le groupement accepteur sont *a priori* séparés par un nombre pair d'atomes.

Les analogues N<sub>1</sub>-Me **43**, N<sub>2</sub>-Me **44** et indole **45** ont été synthétisés dans les conditions précédemment décrites avec des rendements allant de 44% à 66% (**Schéma 25**). Les chutes de rendements observées pour les synthèses des analogues méthylés s'expliquent par la difficulté du traitement et de la purification des produits : contrairement à la version 1*H*-indazole **37**, les produits méthylés sont plus solubles dans le solvant réactionnel, entraînant des pertes lors de la première précipitation.

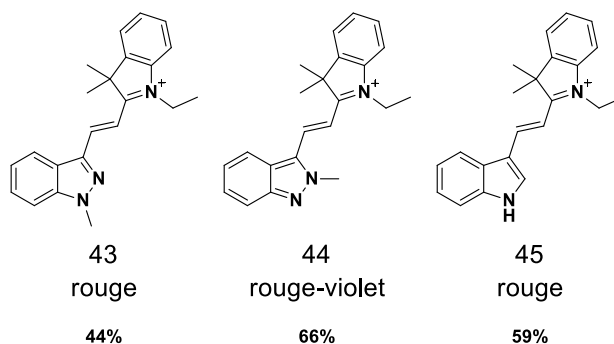


Schéma 25 : Structures et rendements de la synthèse des analogues de l'accepteur indolinium.

De façon qualitative, il est possible de constater que le dérivé méthylée en N2 **45** est plus sombre que les analogues 1*H*- et 1-méthylindazole ce qui est cohérent avec la théorie selon laquelle la méthylation de l'indazole en position N2 renforce plus sa densité électronique qu'une méthylation en position N1.

## 2.3) Réactions de Wittig

### 2.3.1) Synthèse des accepteurs

Le benzothiadiazole est peu récurrent dans la structure de sondes à applications biologiques,<sup>[128]</sup> étant principalement utilisé en tant qu'accepteur d'électrons ou relai dans les polymères appliqués à l'opto-électronique, tels que les OLED,<sup>[129,130]</sup> ou à l'amélioration de la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique dans les panneaux solaires.<sup>[131,132]</sup>

Ces hétérocycles isomères **46** et **47** sont synthétisés en deux étapes à partir du 2-amino-3-nitrotoluène et du 3-amino-4-nitrotoluène, respectivement. Le 4-méthylbenzothiadiazole **46** a été synthétisé dans un premier temps par réduction du groupement nitro en présence d'hydrogène et de palladium sur charbon actif puis par cyclisation de l'intermédiaire diamine en présence de chlorure de thionyle dans le toluène à 50°C (**Schéma 26**). L'originalité de cette synthèse repose sur la purification du produit (une huile jaune pâle) par entraînement à la vapeur d'eau puis extraction du distillat au toluène, avec un rendement global allant jusqu'à 77% sur 30 millimoles.<sup>[131]</sup>

Cette même synthèse a donc été appliquée pour le 5-méthylbenzothiadiazole **47**, cependant aucune trace de cyclisation n'a été observée dans ces conditions. Un autre protocole a donc été



mis en place dans le dichlorométhane et en présence d'une base et qui permet de cycliser le 5-méthylbenzothiadiazole **47** plus rapidement que son isomère. Après seulement 6 heures de réaction, le produit a pu être isolé par neutralisation du milieu puis extraction avec un rendement correcte de 67% (**Schéma 26**). À l'inverse de son isomère, **47** est un solide cristallin.

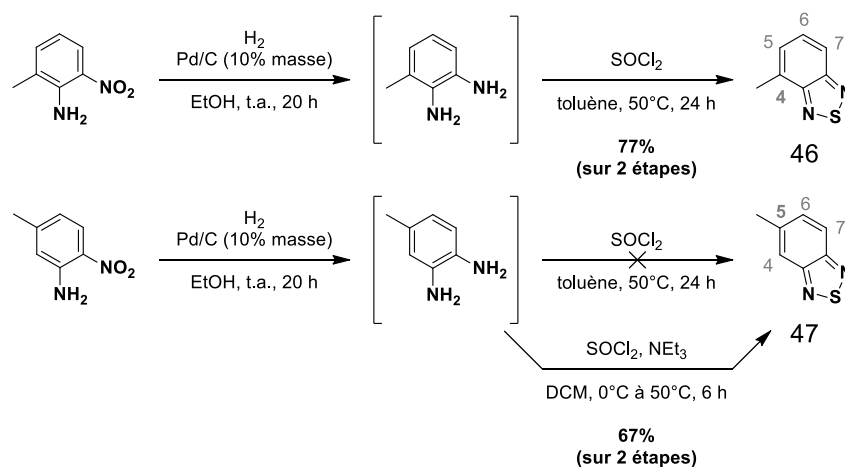


Schéma 26 : Synthèse des 4-méthylbenzothiadiazole **46** et 5-méthylbenzothiadiazole **47**.

Ces accepteurs n'étant pas assez « forts », ces molécules n'ont pas directement réagi sur le 1*H*-indazole-3-carboxaldéhyde par condensation de Knoevenagel. Un couplage par réaction de Wittig a donc été envisagé. Les sels de phosphonium correspondants **48** et **49** ont été obtenus par bromation radicalaire du méthyl benzylique en présence de *N*-bromosuccinimide (NBS) et d'azobisisobutyronitrile (AIBN) dans le DCE puis substitution par la triphénylphosphine au reflux du toluène (**Schéma 27**).<sup>[131]</sup> Une fois encore, une différence de réactivité est observée entre le 4- et le 5-méthylbenzothiadiazole, avec de meilleurs rendements réactionnels pour le 5-méthylbenzothiadiazole (88% de **49** contre seulement 49% de **48**). Ce rendement plus bas s'explique par la dibromation rapide du 4-méthylbenzothiadiazole dans ces conditions (rapport d'environ 25% de produit de départ pour 50% de monobromé et 25% de dibromé, estimé par <sup>1</sup>H RMN du brut à 45 minutes de réaction). Le temps optimal de réaction a donc été déterminé comme étant de 45 minutes (**Schéma 27**), le diminuer ne limitant pas la dibromation (probablement plus rapide que la monobromation attendue) et l'augmenter favorisant plus la dibromation que l'avancement réactionnel.

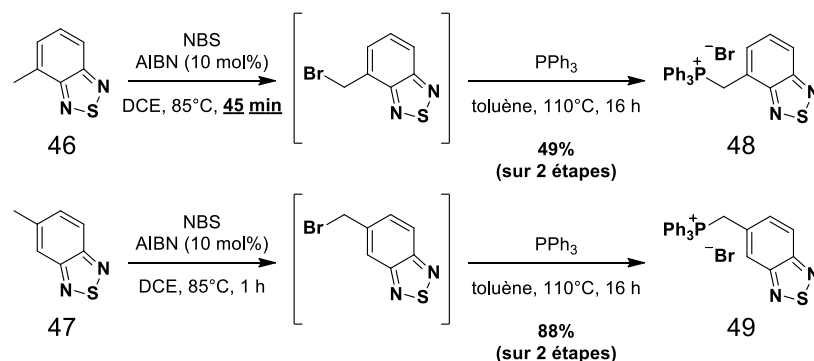


Schéma 27 : Synthèses des sels de phosphonium **48** et **49**.

Il est intéressant de noter que ce problème de dibromation n'est pas discuté dans littérature bien que la plupart des protocoles se fassent sur plusieurs heures. Une comparaison de substrats

de départ permet de constater que la bromation des composés 4-méthylbenzothiadiazole est principalement décrite pour des molécules substituées en *para* du méthyl, comme le 4-bromo-7-méthylbenzothiadiazole dans la publication de référence utilisée pour ce protocole.<sup>[131]</sup> La réactivité des 4- et 5-méthylbenzothiadiazole étant différentes, il est possible que cette substitution en *para* ait une influence notable sur la réactivité des produits et empêche leur dibromation.

Pour conclure, les deux sels de phosphonium **48** et **49** des accepteurs benzothiadiazoles ont été synthétisés en 4 étapes avec des rendements totaux respectifs de 38% et 59% (**Figure 46**).

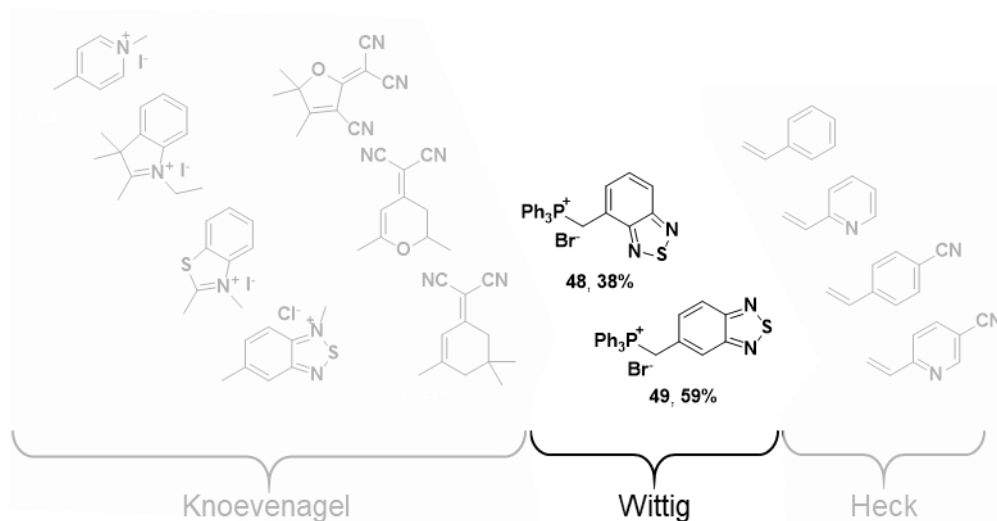


Figure 46 : Structures et rendements des accepteurs synthétisés pour la réaction de Wittig.

### 2.3.2) Synthèse des sondes par réaction de Wittig

L'installation de ces accepteurs benzothiadiazoles a été pensée *via* une réaction de Wittig sur le 1*H*-indazole-3-carboxaldéhyde **16**. Cependant, le proton labile des 1*H*-indazoles les rend relativement acide, avec un  $pK_a$  estimé autour de 11. En cas de réaction avec une base forte, cette acidité peut s'avérer problématique et c'est notamment le cas de la réaction de Wittig qui nécessite la formation d'un ylure par déprotonation du sel de phosphonium. Une étape de protection du 1*H*-indazole-3-carboxaldéhyde a donc été envisagée : le groupe protecteur tétrahydropyrane (THP, **Schéma 28**) a été retenu pour sa stabilité en milieux basiques et nucléophiles et sa déprotection en milieu théoriquement faiblement acide. Cette réaction s'effectue en présence de 3,4-dihydro-2*H*-pyrane (DHP) et d'une quantité catalytique de sel de pyridinium de l'acide *para*-toluènesulfonique au reflux du THF, avec un rendement acceptable de 68% (**Schéma 28**).

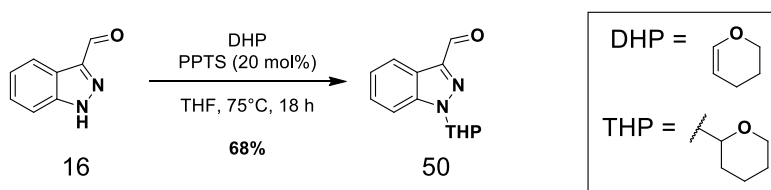


Schéma 28 : Protection du 1*H*-indazole-3-carboxaldéhyde au THP.

L'indazole-3-carboxaldéhyde protégé peut alors être engagé dans une réaction de Wittig en présence d'un sel de phosphonium et d'une base (*tert*-butanolate de potassium). Les composés **51** et **52** ainsi obtenus avec des rendements respectifs de 41% et 51% après une nuit de réaction, ont finalement été déprotégés pour donner les molécules finales **53** et **54** avec des rendements globaux respectifs de 38% et 33% sur ces deux étapes (Schéma 29). La déprotection initialement faite en présence d'acide méthanesulfonique dans le méthanol a été rapidement abandonnée au profit de conditions plus douces. Le réactif de départ est mis en suspension dans un mélange chaud d'éthanol et d'eau (98:2), avec une résine échangeuse de protons (Amberlyst IR120®).<sup>[133]</sup> Après une journée de réaction, les sondes finales sont obtenues avec de meilleurs rendements (93% contre 43%) et séparées des autres réactifs par simple filtration.

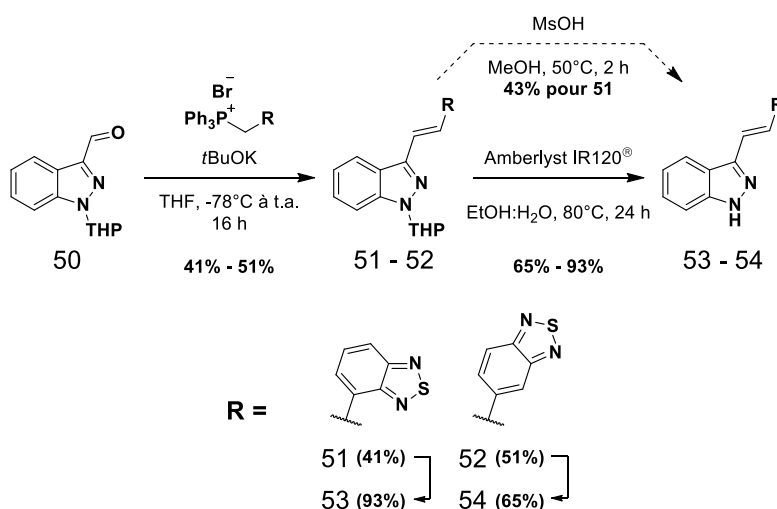


Schéma 29 : Synthèse des sondes par réaction de Wittig.

Ces accepteurs benzothiadiazoles étant relativement inédits pour la synthèse de sondes fluorescentes pour l'imagerie biologique, le benzothiadiazole **48** a été également retenu pour la synthèse d'analogues méthylées. Les azotes de l'indazole étant déjà protégés dans le cas des 1- ou 2-méthylindazoles, la synthèse de ces sondes a été effectuée en une seule étape dans les conditions décrites ci-dessus. Les composés **55** et **56** ont été obtenus avec des rendements de 68% et 73%, respectivement. De façon qualitative une fois encore, il est possible de constater que la méthylation renforce la coloration des produits par rapport à l'analogue 1*H*-indazole et, dans ce cas-là, modifie visiblement leurs propriétés de fluorescence (Schéma 30).

Les rendements de la réaction de Wittig pour la sonde **53** étant nettement inférieurs ceux des sondes analogues méthylées **55** et **56** (41% contre environ 70%), des améliorations du protocole de synthèse ont donc été explorées.

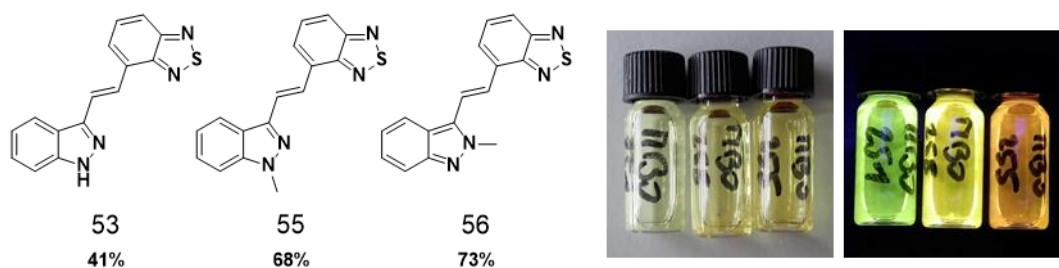


Schéma 30 : Structures, rendements de synthèse et solutions correspondantes dans l'acétonitrile (sous lumière naturelle à gauche et sous irradiation à 365 nm à droite) des analogues de l'accepteur benzothiadiazole.

Au cours de mes synthèses, j'ai pu mettre en évidence deux paramètres influençant le rendement de la réaction de Wittig. Premièrement, l'ajout de la base sur un mélange de sel de phosphonium et d'aldéhyde améliore considérablement le rendement de la réaction (conditions de Barbier), passant de 25% lorsque le ylure est formé préalablement à l'ajout d'aldéhyde (non représenté) à 41%. Deuxièmement, l'emploi d'une base plus forte que le *tert*-butanolate de potassium, comme le bis-(triméthylsilyl)amidure de lithium (LiHMDS), a permis d'atteindre le rendement correct de 66% pour la synthèse de **51** (Schéma 31). Sachant que, pour cette dernière réaction, la formation de l'ylure et l'ajout de l'aldéhyde ont été réalisés consécutivement, la procédure de Barbier sera également à étudier (en gris, Schéma 31).

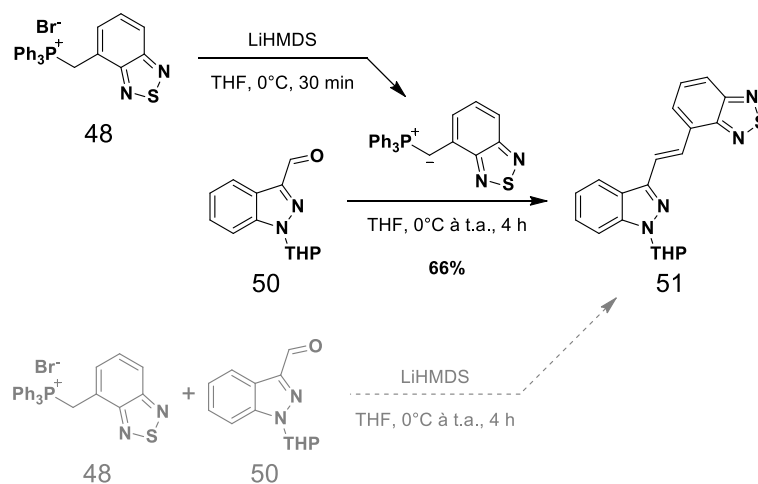
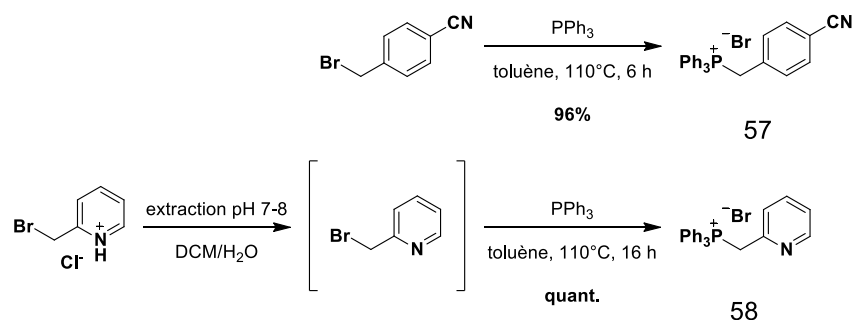


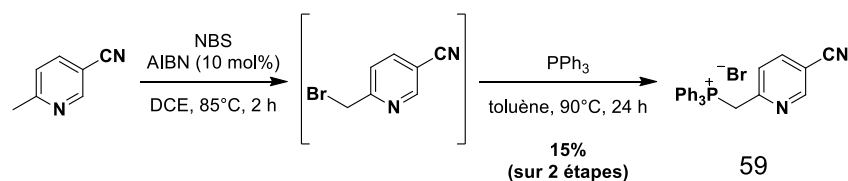
Schéma 31 : Améliorations du protocole de la réaction de Wittig pour l'accepteur benzothiadiazole **48**.

Face à la réussite des réactions de Wittig pour les accepteurs benzothiadiazoles, l'utilisation d'autres sels de phosphonium pour introduire des groupements accepteurs aromatiques a été envisagée (Schéma 32). Ces groupements, bien que moins électroattracteurs que ceux présentés jusqu'à présent, sont intéressants dans le cadre du projet pour plusieurs raisons : (i) ces accepteurs aromatiques plans altèrent peu la géométrie de la sonde rapport à l'axitinib **15** (sondes isomorphes), ce qui devrait également peu altérer leur insertion dans le récepteur VEGFr, (ii) la synthèse de sondes analogues à l'axitinib **15** sans groupement d'affinité devrait permettre de comparer directement l'influence de ces derniers sur les propriétés spectroscopiques de mes molécules.

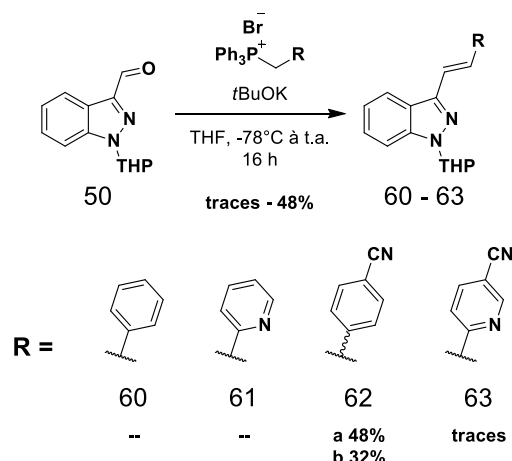
Hormis le bromure de benzyltriphenylphosphonium commercial, les sels de phosphonium cyanobenzyle **57**, pyridyle **58** et cyanopyridyle **59** ont été synthétisés au laboratoire (Schémas 32 & 33). À partir du 4-(bromométhyl)benzonitrile commercial, le sel de triphenylphosphonium correspondant **57** a été synthétisé en seulement 6 heures dans le toluène avec un rendement de 96%. Pareillement, la 2-(bromométhyl)pyridine hydrochlorate commerciale a été neutralisée et la 2-(bromométhyl)pyridine résultante a été mise en présence de triphenylphosphine dans le toluène à reflux. Le sel de phosphonium correspondant **58** a été obtenu de façon quantitative (Schéma 32).

Schéma 32 : Synthèses des sels de phosphonium **57** et **58**.

Le dernier sel de phosphonium **59** que j'ai cherché à synthétiser a été obtenu de façon analogue aux benzothiadiazoles. Une première étape de bromation de la 4-cyano-2-méthylpyridine au NBS a été initiée à l'AIBN, puis la substitution du brome par la triphénylphosphine a été réalisée dans le toluène à 90°C, pour un rendement global de seulement 15% (Schéma 33). Le faible rendement de ces deux étapes peut être expliqué par deux facteurs. Premièrement, la bromation incomplète de la 4-cyano-2-méthylpyridine ne permet pas d'atteindre un rendement supérieur à 50% pour cette première étape. Deuxièmement, l'intermédiaire résultant de la bromation s'est avéré instable et se dégrade à ces températures de réaction, la substitution n'est donc pas quantitative contrairement à toutes celles présentées précédemment. Cependant, la quantité de réactif obtenue étant suffisante pour réaliser quelques tests, je n'ai pas cherché à améliorer ces conditions réactionnelles, dans un premier temps.

Schéma 33 : Synthèses du sel de phosphonium **59**.

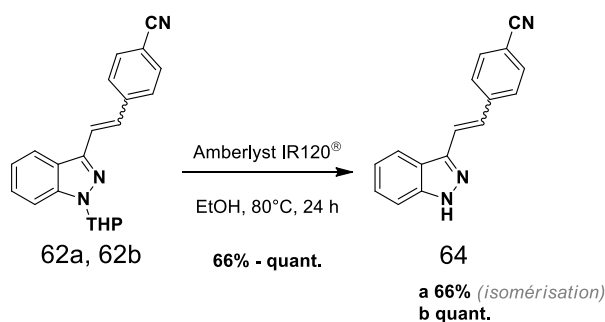
Ces sels de phosphonium **57** à **59** ont ensuite été mis en réaction avec l'indazole-3-carboxaldéhyde protégé et du *tert*-butanolate de potassium selon une procédure de Barbier (premières conditions décrites, Schéma 34). Seuls des résultats décevants ont été obtenus pour tous les groupements (benzyle, pyridyle et cyanopyridyle), hormis le groupement cyanobenzyle. Pour ce dernier, bien que l'avancement de la réaction n'ait pas été total, deux produits **62a** et **62b** ont pu être isolés après séparation sur gel de silice avec des rendements respectifs de 48% et 32% (Schéma 34). Les analyses  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  RMN des produits ont démontré qu'il s'agissait des deux isomères *E* et *Z* de la liaison alcène, malheureusement, la coalescence de nombreux signaux protons dans l'un des deux spectres ne permet pas d'attribuer avec certitude la géométrie autour de la double liaison de l'un ou l'autre des produits.

Schéma 34 : Réactions de Wittig pour les sels de phosphonium **60** à **61**.

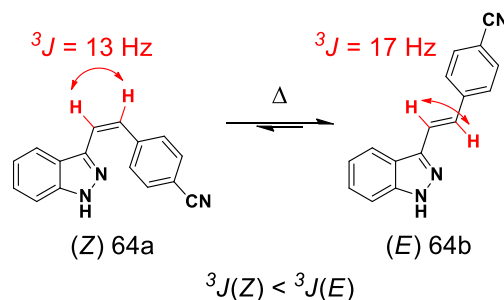
Concernant les autres réactions, la formation de l'ylure intermédiaire a pu être constatée dans chacun des cas (passage d'une suspension blanche à une solution homogène très colorée dans les tons bleu ou violet) mais seuls les produits de départ ont été récupérés pour le benzyle **60** et le pyridyle **61** et un mélange complexe a été obtenu pour le cyanopyridyle **63** avec d'éventuelles traces de produits (déterminées par  $^1\text{H}$  RMN du brut réactionnel). Dans ce dernier cas, la réaction a également été tentée en remplaçant la base par du LiHMDS mais aucune amélioration notable du rendement n'a été détectée.

Deux de ces trois sondes ayant été obtenues par une autre voie de synthèse développée en parallèle (benzyle **60** et pyridyle **61**), j'ai préféré concentrer mes efforts sur cette seconde voie qui sera développé plus bas (cf. **Chapitre 2.2.4**) p. 94) et les tentatives d'amélioration des réactions de Wittig ont donc été laissées en suspens.

Les deux produits *E* et *Z* obtenus lors de la réaction du 1*H*-indazole-3-carboxaldéhyde protégé avec le sel de phosphonium **57** ont ensuite pu être déprotégés en présence de résine acide (Amberlyst IR120<sup>®</sup>) au reflux de l'éthanol avec des rendements allant de correct (66%) à quantitatif (**Schéma 35**).

Schéma 35 : Déprotection des indazoles **62** pour accéder aux sondes finales **64**.

Ainsi, les constantes de couplages des protons vinyliques m'ont permis de conclure que les produits **64a** correspondent au produit *Z* ( $^3J = 13$  Hz, **Schéma 36**) tandis que les produits **64b** correspondent au produits *E* souhaité ( $^3J = 17$  Hz). Cette hypothèse est cohérente avec le constat que **64a** n'est pas stable à température ambiante, dans le noir, s'isomérisant lentement en **64b** au cours du temps.

Schéma 36 : Isomérisation thermique de **64a** en **64b** et attribution des structures respectives.

Pour conclure, six nouvelles sondes ont pu être obtenues par réaction de Wittig, nécessitant une protection des azotes de l'indazole et une éventuelle déprotection, avec des rendements globaux variant entre 9% et 39% (**Figure 47**).

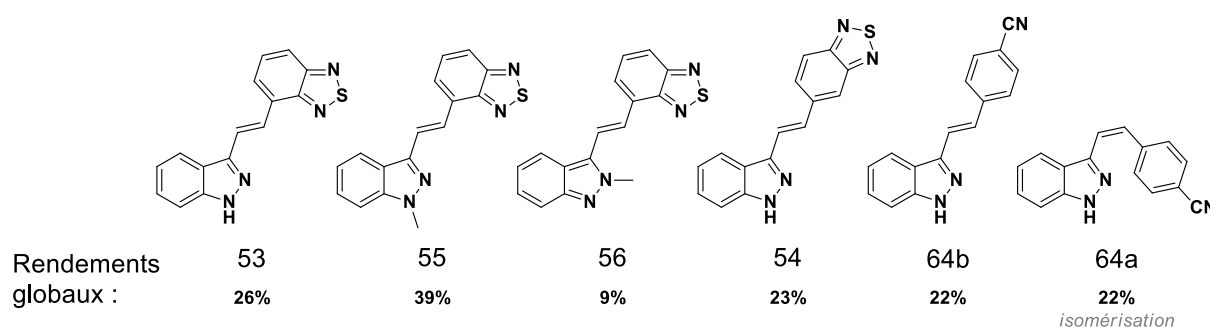


Figure 47 : Rendements globaux de synthèse des sondes par réaction de Wittig.

## 2.4) Couplages de Heck

Face aux difficultés rencontrées lors de la synthèse des sels de phosphonium ainsi qu'aux couplages de Wittig peu fructueux pour les groupements aromatiques plus faiblement électroaccepteurs, nous avons envisagé de les introduire par une réaction de Heck palladocatalysée. Comme mentionné précédemment, ces tests se sont déroulés en parallèle des réactions de Wittig.

### 2.4.1) Synthèse des accepteurs : styryles

La synthèse des sondes avec les accepteurs faiblement électroattracteurs (présentés pour les réactions de Wittig) a aussi été envisagée par couplage de Heck. Le styrène et la 2-vinylpyridine étant commerciaux, seuls les deux autres accepteurs ont dû être préparés au laboratoire.

Dans un premier temps, la synthèse du 4-vinylbenzonitrile a été envisagée en une étape par une réaction de Wittig entre un sel de méthyltriphenylphosphonium et le 4-cyanobenzaldéhyde en présence de *tert*-butanolate de potassium. Après 4 heures de réaction à température ambiante, le produit **65** est rapidement purifié sur colonne et isolé avec un rendement de seulement 25% (**Schéma 37**). Ce rendement faible est principalement dû à la polymérisation rapide du produit à température ambiante.

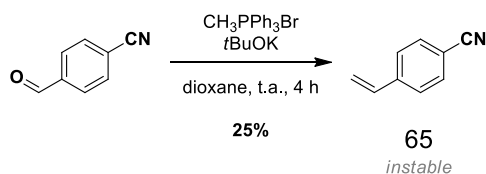


Schéma 37 : Synthèse des styryles manquants.

La synthèse de la 4-cyano-2-vinylpyridine a ensuite été envisagée de façon analogue, cependant le prix exorbitant du produit de départ nous a amené à reconsidérer notre approche (plusieurs centaines d'euros par gramme, **Schéma 38**). Les autres options envisagées passent par des réactions palladocatalysées entre la 2-bromo-4-cyanopyridine et le vinyltrifluoroborate de potassium (couplage de Heck)<sup>[134]</sup> ou la 2-chloro-4-cyanopyridine et l'ester pinacolique d'acide vinylboronique (couplage de Suzuki)<sup>[135]</sup> mais une fois encore, les prix des différents réactifs et les faibles rendements de réaction annoncés ne nous ont pas encouragé à mettre en place ces synthèses (**Schéma 38**). Faute d'alternative abordable, la synthèse de la 4-cyano-2-vinylpyridine a donc été mise en suspens.

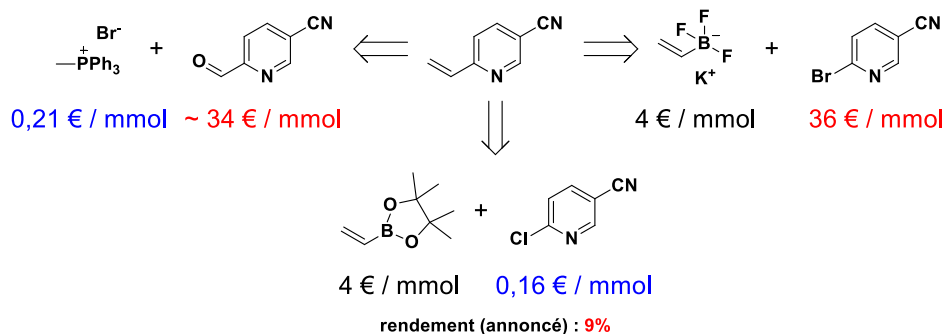


Schéma 38 : Rétrosynthèses de la 4-cyano-2-vinylpyridine et prix des réactifs (Sigma-Aldrich, juin 2020).

Pour conclure, deux des styryles nécessaires à cette synthèse sont commerciaux et un autre a pu être synthétisé au laboratoire par une réaction de Wittig. Ce styryle intermédiaire **65** est malheureusement instable et doit être fraîchement préparé ou repurifié avant utilisation. Le dernier styryle qui avait été envisagé a été laissé de côté car trop coûteux en réactifs de départ.

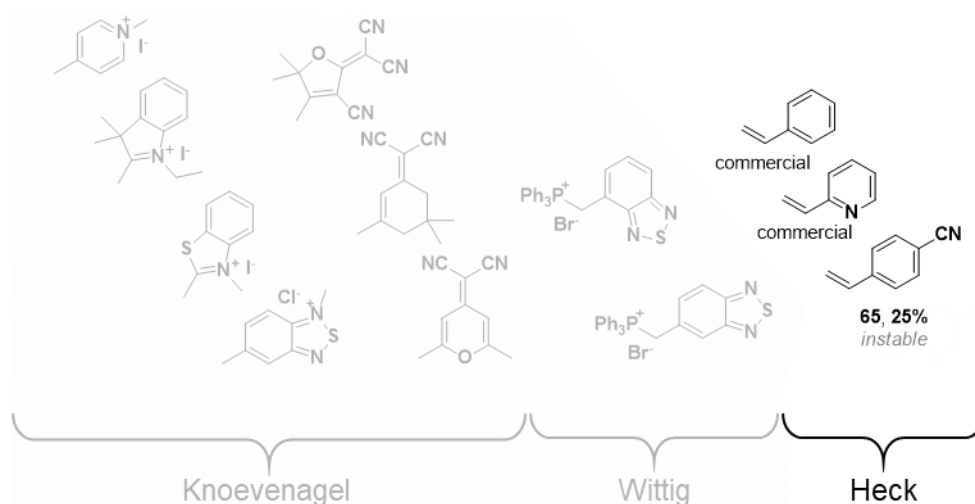


Figure 48 : Structures et rendements des accepteurs synthétisés pour la réaction de Heck.



## 2.4.2) Synthèse des sondes par couplage de Heck

Les couplages de Heck en position C3 des indazoles sont relativement bien documentés dans la littérature, que ce soit par insertion dans une liaison carbone-halogène ou par substitution direct sur une liaison C-H (cf. **Chapitre 2 1.2.1**) p. 69). La réaction de Heck est d'ailleurs une des étapes clés de la synthèse de l'axitinib **15**.<sup>[136]</sup>

Dans un premier temps, la réaction de Heck a été envisagée par catalyse au palladium, entre le 3-iodo-1*H*-indazole déprotégé et les accepteurs styryles décrits précédemment. Le 3-iodo-1*H*-indazole peut être synthétisé par halogénéation directe du 1*H*-indazole en présence de diiode et de potasse, en 30 minutes dans le DMF. Le produit est obtenu suffisamment pur après extraction pour être utilisé tel quel, avec des rendements supérieurs à 90% en moyenne (**Schéma 39**).

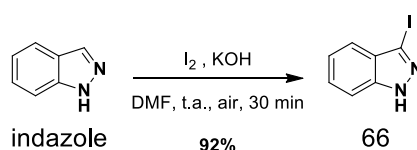


Schéma 39 : Synthèse du partenaire indazole pour la réaction de Heck.

Des premières conditions standard de réaction de Heck ont ensuite pu être testées en présence du styrène, de la 2-vinylpyridine et du 4-vinylbenzotrile **65** fraîchement préparé. Tout comme pour les réactions de Wittig qui peuvent former les isomères *E* ou *Z* des produits en fonction de la stabilité de l'ylure et des stabilités relatives des produits (comme pour le sel de phosphonium du cyanobenzène **57** dont résultent les produits *Z* **64a** et *E* **64b**), la réaction de Heck peut conduire à la formation de deux isomères en fonction de leurs stabilités relatives. Les isomères *E* moins encombrés et thermodynamiquement plus stables sont donc majoritairement attendus (**Schéma 40**).

Le pré-catalyseur (acétate de palladium) a été activé en présence de son ligand (tri(*ortho*-toluidine)phosphine), d'une base (base de Hünig) et de solvant (DMF) avant ajout des réactifs. Ainsi, des dérivés styryle **67** et pyridyle **68** ont été obtenus avec des rendements modestes (respectivement 30% et 22%, **Schéma 40**) mais aucune trace du produit *E* de réaction avec le 4-vinylbenzotrile **65** n'a été clairement observée (<sup>1</sup>H RMN du brut réactionnel complexe).

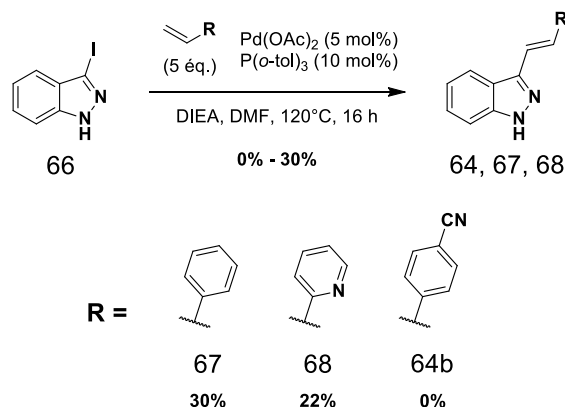


Schéma 40 : Synthèse de sondes par réaction de Heck.

Les réactions palladocatalysées, comme toutes les réactions catalysées aux métaux d'ailleurs, sont particulièrement complexes à optimiser étant donné le nombre important de paramètres qui entrent en jeu et sur lesquels il est possible d'influer. Cette tâche étant suffisamment élaborée pour occuper une bonne partie d'un sujet de thèse, j'ai préféré focaliser mon attention sur quelques paramètres clés que je développerai ici, avec pour objectif d'obtenir chacun des trois produits présentés avec des rendements corrects et, surtout, une méthode reproductible.

Comme mentionné lors de la présentation des réactions d'activation C-H sur les indazoles protégés (cf. **Chapitre 2 1.2.1**) p. 69), catalyser une réaction avec des métaux en présence d'indazoles déprotégés peut s'avérer être un défi à cause des propriétés de coordination des azotes de l'hétérocycle. Dans un premier temps, j'ai donc exploré l'influence d'un groupement protecteur sur ce couplage de Heck avec le 4-vinylbenzotrile **65** (**Schéma 41**).

Après une première étape de protection dans les conditions décrites pour la réaction de Wittig (en présence de DHP et une quantité catalytique du sel de pyridinium de l'acide *para*-toluènesulfonique), le 3-iodoindazole protégé en position N2 est obtenu avec un rendement de 64% (**Schéma 41**). À noter que, dans le cas du 3-iodo-1*H*-indazole, la protection au THP se fait majoritaire sur sa position N2 contrairement à la réaction avec le 1*H*-indazole-3-carboxaldéhyde. En effet, la substitution autour du noyau indazole, et plus particulièrement la position C3, joue un rôle clé dans la régiosélectivité des réactions de protection de ces derniers en milieu acide.<sup>[137]</sup> De plus, il a été démontré qu'une catalyse acide douce (comme dans le cas présent) favorise la substitution en position N2 des indazoles, ce qui est cohérent avec mes observations.<sup>[137]</sup>

La réaction de Heck a ensuite pu être effectuée telle que décrite ci-dessus ; le produit **70** attendu a été isolé avec un rendement modeste de 20%. Enfin, la sonde finale a été obtenue avec un rendement de 49% après déprotection et donc un rendement global de seulement 6% de sur 3 étapes (**Schéma 41**). Le rendement de cette séquence réactionnelle étant faible et celui de la réaction de Heck comparable aux réactions effectuées en l'absence de groupement protecteur, j'ai préféré focaliser mon attention sur une version déprotégée de la réaction pour limiter les pertes lors des étapes de protection/déprotection. Malgré tout, l'obtention du produit **64b** par une voie de synthèse différente de la réaction de Wittig m'a permis de confirmer l'attribution des structures effectuée auparavant.

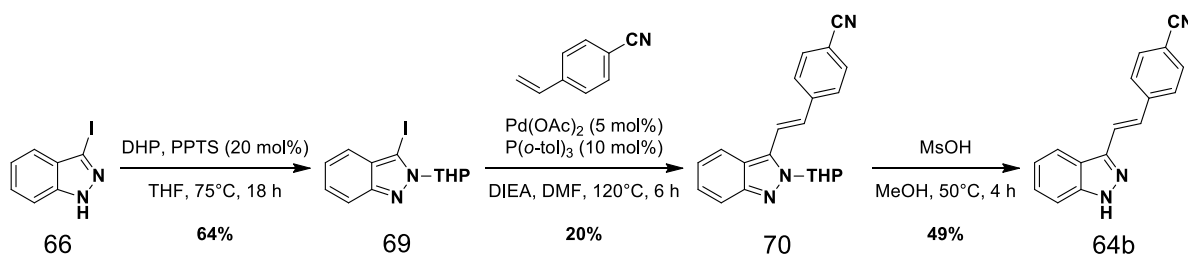


Schéma 41 : Synthèse de la sonde **64b** par couplage de Heck sur un indazole protégé en position 2.

L'analyse plus détaillée des sous-produits de la réaction entre le 3-iodo-1*H*-indazole et le styrène m'a permis de mettre en évidence un certain nombre de sous-produits pour guider mon optimisation rapide. Des traces de produit de départ ainsi qu'une part importante de son produit de déshalogénéation ont pu être observés par RMN des fractions de la colonne (**Tableau 5**

entrée 1) enfin des impuretés supplémentaires ont également été récupérées en mélange. Ces dernières, difficilement séparables et identifiables, sont possiblement des produits issus de l'addition de Michael des indazoles sur le styrène.<sup>[136]</sup>

Pour simplifier les analyses <sup>1</sup>H RMN, en particulier dans la zone des protons aromatiques, les tentatives d'optimisation suivantes ont été réalisées en présence d'acrylate de méthyle. Ainsi, le temps de réaction a été allongé afin d'atteindre un avancement complet, puis j'ai cherché à limiter la déshalogénéation du produit de départ. Dans leur publication sur l'optimisation de la synthèse industrielle de l'axitinib, Chekal *et al.* ont noté que l'emploi de la base 1,8-bis(diméthylamino)naphtalène permettait de réduire la déshalogénéation de leur produit de départ bien qu'ils aient plus de difficultés de séparation par la suite.<sup>[136]</sup> J'ai pu observer les mêmes difficultés de séparation, cependant ce changement de base n'a pas diminué la déshalogénéation du 3-iodo-1*H*-indazole de façon satisfaisante (**Tableau 5** entrée 3). La littérature fait également état du bromure de sodium comme additif récurrent pour limiter la déshalogénéation,<sup>[138]</sup> deux équivalents de sel ont donc été ajoutés au cours du couplage et ont enfin permis de limiter sensiblement la déshalogénéation bien que le rendement final ait été diminué (**Tableau 5** entrée 4). Cette dernière option est préférable malgré son rendement moindre grâce à la simplification de la séparation.

Dans un dernier effort synthétique, j'ai également cherché à limiter les autres impuretés observées. Une fois encore, je me suis appuyée sur la publication d'optimisation industrielle où est démontrée une diminution de la formation de ces impuretés et de la déshalogénéation avec l'augmentation des équivalences de l'alcène de départ. En présence de seulement 3 équivalents de styrène, j'ai enfin pu m'affranchir du problème de déshalogénéation et diminuer la formation d'impuretés au profit du produit (**Tableau 5** entrée 5). Bien que le rendement de la réaction optimisée ne soit que de 50%, la robustesse du protocole et la simplification de la purification (notamment grâce à l'absence des produits de départ et de déshalogénéation) sont apparues comme satisfaisantes étant donné la simplicité d'accès aux produits de départ.

**Tableau 5 : Optimisation de la réaction de Heck pour la synthèse des sondes.**

#	Alcène (éq.)	Catalyseur / Ligand	Base (2 éq.)	Additif (2 éq.)	Solvant	Température	Temps	Avancement	Déshalogénéation	Rendement
1	styrène (5 éq.)	Pd(OAc) <sub>2</sub> (5 mol%) / P(o-tol) <sub>3</sub> (10 mol%)	DIEA	--	DMF	120°C	16 h	partiel <sup>a</sup>	partielle <sup>a</sup>	30%
2	acrylate (1,5 éq.)		DIEA	--	DMF	130°C	24 h	partiel <sup>a</sup>	partielle <sup>a</sup>	traces
3	acrylate (1,5 éq.)		<i>Proton sponge</i>	--	DMF	130°C	24 h	partiel <sup>a</sup>	partielle <sup>a</sup>	32%
4	acrylate (1,5 éq.)		DIEA	NaBr	DMF	130°C	24 h	partiel <sup>a</sup>	moindre <sup>a</sup>	14%
5	styrène (3 éq.)		DIEA	NaBr	DMF	130°C	24 h	complet <sup>a</sup>	--	50%

<sup>a</sup> estimation par CCM

L'application de ces conditions optimisées a permis la préparation de sondes avec des rendements modestes mais reproductibles, entre 24% et 50% (**Schéma 42**).

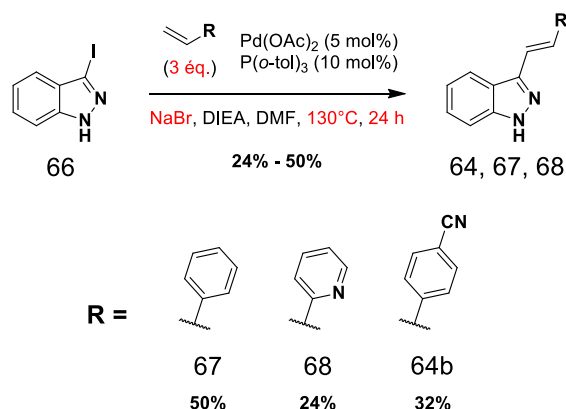


Schéma 42 : Synthèse de sondes par réaction de Heck optimisée.

Pour conclure sur l'ensemble des synthèses, seize sondes inédites à donneur indazole ont pu être obtenues pour cette première phase de ma thèse. Ces synthèses sont rapides, avec de deux à quatre étapes, et convergentes, avec un intermédiaire 1*H*-indazole-3-carboxaldéhyde commun à la majorité d'entre elles. Les rendements globaux varient entre 8% et 90% (**Figure 49**), soit entre 24% et 90% pour les synthèses en deux étapes, 8% et 39% pour trois étapes et 22% et 26% pour quatre étapes.

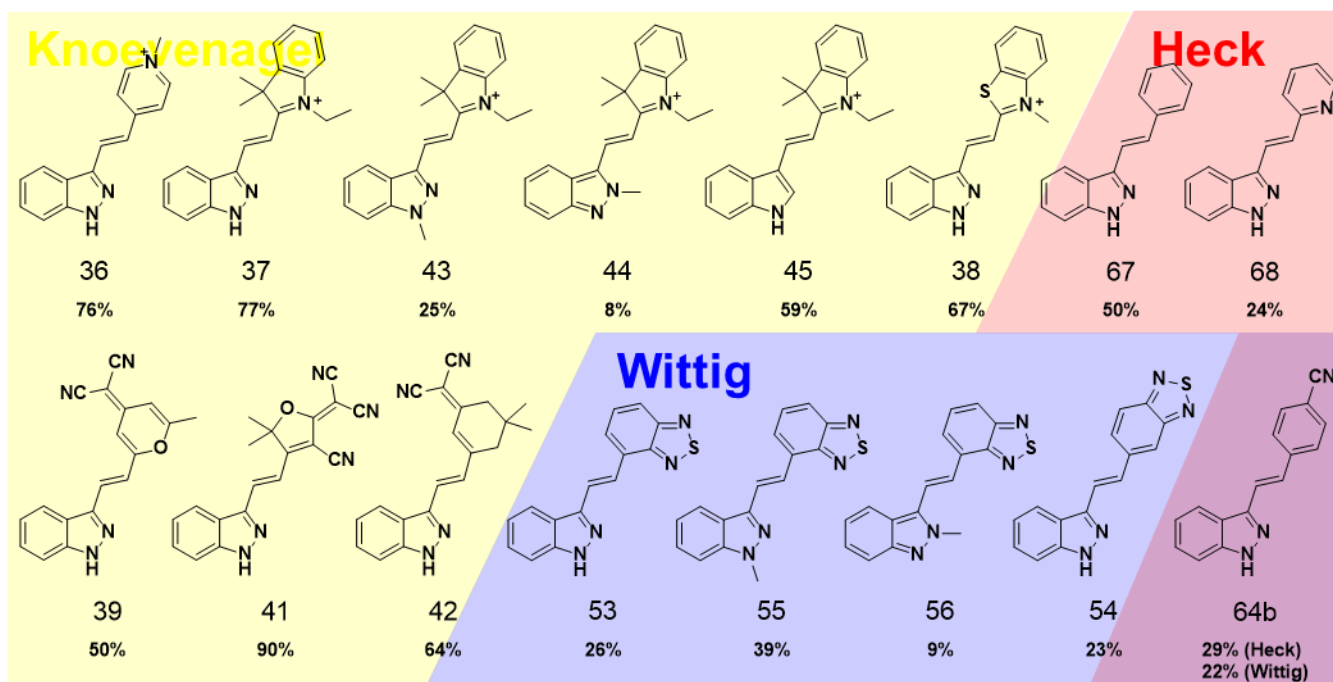


Figure 49 : Structures et rendements globaux de l'ensemble des sondes de la phase 1 de synthèse.

### 3) Études photophysiques

L'objectif de ma thèse étant de synthétiser des sondes photo-actives pour l'imagerie de fluorescence du VEGFr, les propriétés photophysiques des divers composés ont ensuite dû être évaluées. Plus précisément, les études d'influence de la polarité des solvants (solvatochromisme) et de la viscosité sur la fluorescence de ces molécules seront plus amplement développées dans cette partie. Ces résultats devraient me permettre de juger de la force des donneurs indazoles relativement inédits dans des sondes fluorescentes, ainsi que de la pertinence des différents groupements accepteurs pour la suite du projet.

#### 3.1) Solvatochromisme

Dans un premier temps, les spectres d'absorption et d'émission des différentes molécules ont été enregistrés dans plusieurs solvants afin d'étudier la force relative des groupements électroaccepteurs et celle de l'indazole comme donneur d'électrons. L'intérêt principal de cette étude est d'évaluer le caractère donneur du noyau indazole qui est peu documenté dans la littérature, en le conjuguant avec différents groupements électroattracteurs qui sont à l'inverse bien connus. Dans un second temps, l'étude de l'influence de la polarité des solvants, ou solvatochromisme, permettra de sonder la polarisabilité des fluorophores grâce aux calculs de variations de leurs moments dipolaires entre leurs états fondamentaux et excités.

##### 3.1.1) Comparaison des différents groupements électroaccepteurs

L'ensemble des molécules synthétisées avec un noyau 1*H*-indazole sont listées ci-dessous, **Tableau 6**, et ont été classées par longueurs d'ondes d'excitation et d'émission maximums dans deux solvants organiques de polarités différentes (dichlorométhane et acétonitrile). Ces solvants ont été choisis car l'ensemble des produits y étaient suffisamment solubles pour pouvoir réaliser les mesures de solvatochromisme et de rendements quantiques de fluorescence.

Sans surprise, les produits synthétisés par la réaction de Heck, ceux possédant les groupements accepteurs les plus faibles donc, absorbent et réémettent dans l'UV ( $\lambda < 400$  nm), les plus faibles longueurs d'ondes pour les molécules de la série. Leur fluorescence est faible cependant, ils absorbent plutôt bien dans l'UV, ayant des coefficients d'absorption molaire intermédiaires par rapport à l'ensemble de la série (**Tableau 6, Figure 50**). Leurs absorbances ne sont pas influencées par le solvant contrairement à leurs émissions dont les longueurs d'ondes maximums augmentent légèrement avec la polarité des solvants. Plus précisément, la longueur d'onde d'émission du dérivé pyridyle **68** ne varie pas en passant du toluène à l'acétonitrile ce qui signifie que son transfert de charge à l'état excité est faible. Cependant, en présence de donneur (MeOH) ou d'accepteur (DMSO) de liaison hydrogène, sa fluorescence est décalée vers le rouge, signifiant que les interactions avec le solvant sont capables de polariser la molécule à l'état excité. Par liaison hydrogène, le DMSO favorise la déprotonation du cycle indazole ce qui augmente la densité électronique du donneur sur l'azote N1, alors que le méthanol forme une liaison hydrogène avec l'azote de la pyridine ce qui appauvrit ce cycle

électroaccepteur. Dans un cas comme dans l'autre, le transfert de charge à l'état excité est augmenté (**Figure 50**). Dans le cas du dérivé 4-cyanobenzyle **64b**, le solvatochromisme en émission est beaucoup plus marqué car l'accepteur est plus fort. Le déplacement bathochrome de son absorption dans le DMSO est peut-être aussi lié à la formation d'une liaison hydrogène.

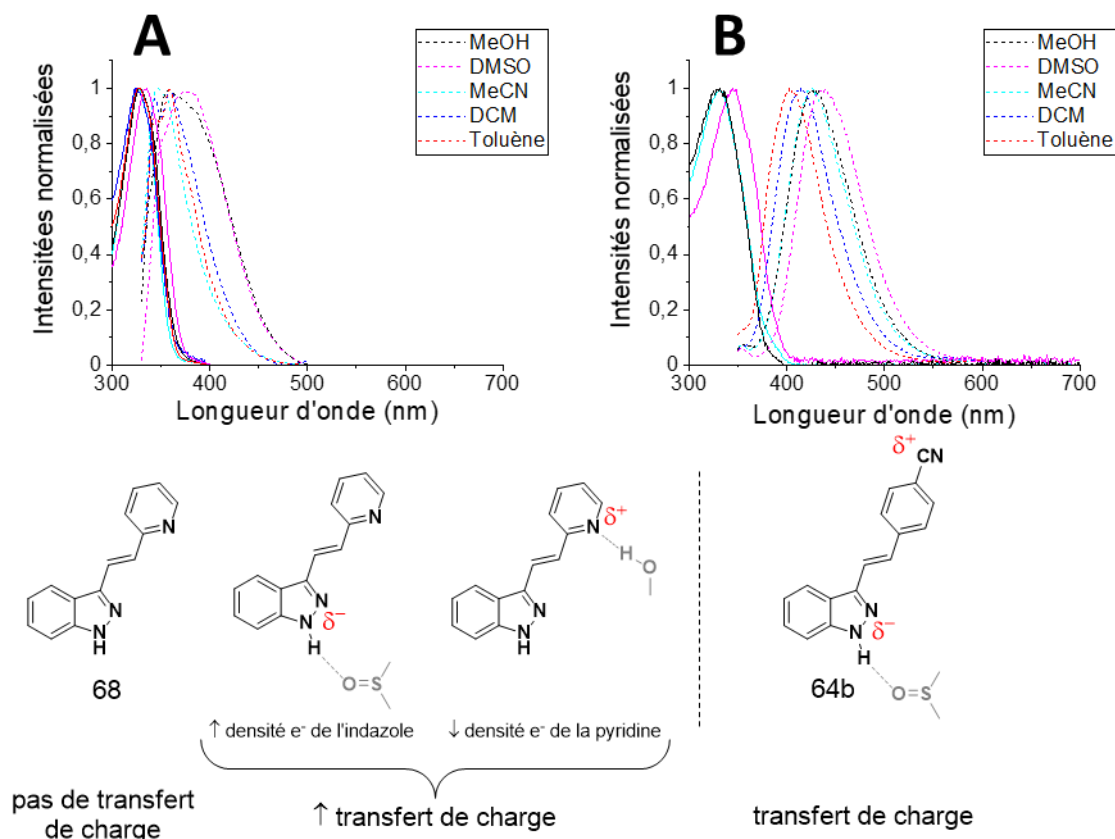


Figure 50 : Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (pointillés) dans divers solvants des composés avec les accepteurs : A) pyridyle **68** et B) 4-cyanobenzyle **64b**.

Les 4- et 5-benzothiadiazoles (**53** et **54** respectivement) obtenus par couplage de Wittig, absorbent en deux bandes invariables selon le solvant, une dans l'UV et l'autre dans le bleu, et réémettent dans le jaune. Ces molécules possèdent les plus grands déplacements de Stokes de l'ensemble de la série avec, pour les 4- et 5-benzothiadiazoles **53** et **54** respectivement, 110 nm et 130 nm d'écart dans le DCM et 140 nm et 150 nm dans le MeCN (**Figure 51, Tableau 6**). Ces valeurs de déplacements de Stokes sont remarquablement grandes et pourraient se révéler intéressantes pour de futures applications de ces sondes en imagerie de super-résolution, notamment en STED qui utilise des longueurs d'ondes de déplétion à 660 nm.

Les longueurs d'absorption comme d'émission du 4-benzothiadiazole **53** sont supérieures à celles du 5-benzothiadiazole **54**. Cette régiosélectivité influence également leurs intensités de fluorescence en fonction des solvants. D'une part, la fluorescence du 4-benzothiadiazole **53** est presque complètement éteinte dans des solvants plus polaires comme le méthanol ou l'acétonitrile ( $\Phi_{\text{MeCN}} < 0,1\%$ ) mais très intense dans des solvants de polarité moindre comme le toluène ou le dichlorométhane ( $\Phi_{\text{DCM}} = 92\%$ , **Tableau 6**). Cette diminution de l'intensité de fluorescence à mesure de l'augmentation de la polarité des solvants est un comportement récurrent des molécules capto-datives. En effet, le rendement quantique de fluorescence est

proportionnel à l'écart d'énergie entre l'état excité et l'état fondamental, or l'état excité de ces fluorophores capto-datifs étant plus stabilisé dans les solvants polaires, les écarts d'énergie diminuent avec la polarité et donc le rendement quantique de fluorescence diminue. Une autre explication serait que le milieu polaire favorise la stabilisation d'un état de charges séparées à l'état excité de la molécule (forme zwitterionique), aboutissant à une perte de fluorescence.

D'autre part, l'intensité de fluorescence du 5-benzothiadiazole est moins variable et, à l'inverse, plus forte dans les solvants plus polaires ( $\Phi_{\text{MeCN}} = 36\%$  versus  $\Phi_{\text{DCM}} = 23\%$ , **Tableau 6**). Cette distinction entre les propriétés spectroscopiques, et donc électroniques, des deux isomères benzothiadiazole est d'ailleurs assez remarquable pour des molécules dont les structures sont aussi proches. Contrairement aux 4-benzothiadiazoles,<sup>[128,132]</sup> les 5-benzothiadiazoles très sont peu fréquents dans la littérature que leurs applications soient en biologie, en optique ou en optoélectronique. De fait, il n'existe pas d'études de modélisation théorique de leurs propriétés photophysiques, une telle étude pourrait être profitable pour la suite du projet.

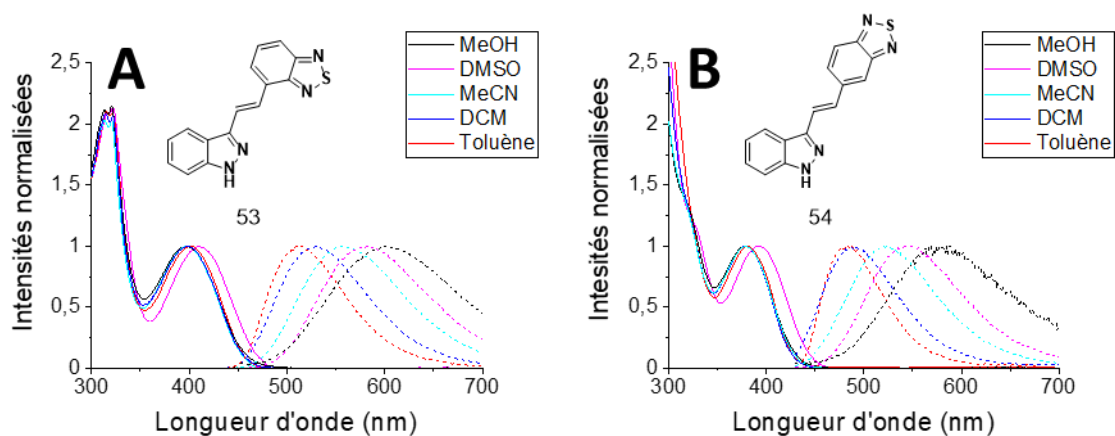


Figure 51 : Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (pointillés) dans divers solvants des composés avec les accepteurs : A) 4-benzothiadiazole **53** et B) 5-benzothiadiazole **54**.

Les spectres d'absorptions des molécules chargées **36**, **37** et **38** sont plus influencés par la polarité des solvants que leurs spectres d'émission étant donné qu'elles portent une charge permanente à l'état fondamental ; un décalage des longueurs d'ondes d'absorption dans le bleu avec l'augmentation de la polarité du solvant a été observé. Étonnamment, les spectres de fluorescence de ces molécules chargées obtenues par réactions de Knoevenagel sont globalement moins décalés vers le rouge que les accepteurs neutres. Leurs rendements quantiques de fluorescence sont *quasi* nuls dans les solvants non-visqueux (**Tableau 6**). L'observation du photoblanchiment du fluorophore avec l'accepteur indolinium sous irradiation laisse supposer qu'il existe d'autres voies de désexcitation pour cette molécule, ce qui sera plus amplement discuté un peu plus loin.

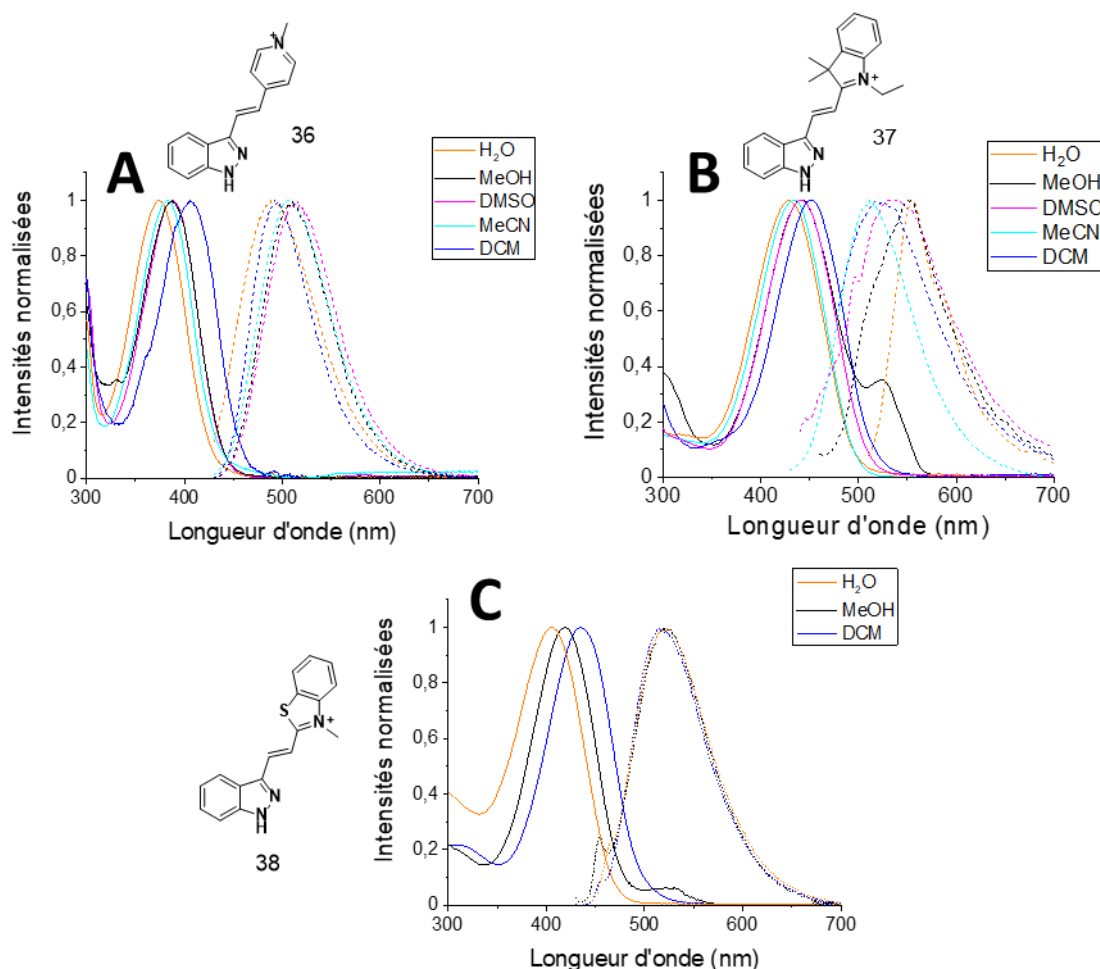


Figure 52 : Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (pointillés) dans divers solvants des composés avec les accepteurs chargés : A) pyridinium **36**, B) indolinium **37**, C) benzothiazolium **38**.

Enfin les accepteurs neutres couplés par réaction de Knoevenagel ont donné de bons chromophores avec peu de variations dans leurs spectres d'absorption entre les solvants. En revanche, hormis pour l'accepteur isophorone **42**, leurs intensités de fluorescences sont particulièrement faibles, allant jusque dans les limites de détection de notre appareil de mesure (rendant difficile la distinction du signal *versus* bruit). L'intensité de fluorescence de l'accepteur isophorone **42** et ses longueurs d'onde d'émission maximums sont sensibles à la polarité des solvants. De l'ensemble de cette série, c'est la molécule avec le solvatochromisme le plus évident après les benzothiadiazoles (Figure 52, Tableau 6).



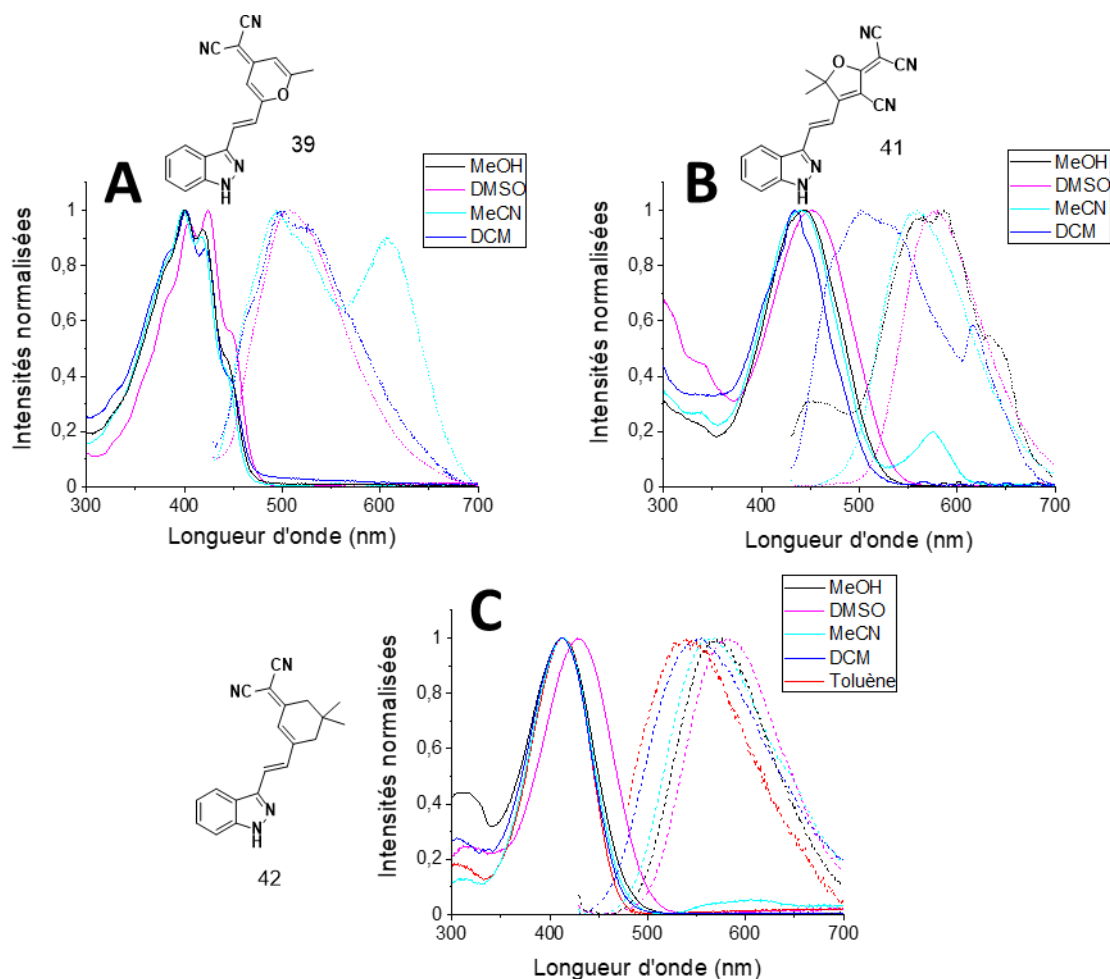


Figure 53 : Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (pointillés) dans divers solvants des composés avec les accepteurs neutres : A) DCP **39**, B) TCF **41**, C) isophorone **42**.

Tableau 6 : Comparatif des propriétés photophysiques des sondes à noyau 1*H*-indazole.

# sonde	Réaction de couplage	Accepteur	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ (nm)		$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)		$\epsilon_{\text{MeCN}}$ à $\lambda_{\text{abs}}$ ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , nm)	$\Phi_{\text{DCM}} / \Phi_{\text{MeCN}}$
			DCM	MeCN	DCM	MeCN		
<b>68</b>	Heck	Pyridyle	326	326	348	360	22370 (330)	3% / 2%
<b>64b</b>		4-cyanobenzyle	337	331	414	426	24350 (340)	-- <sup>b</sup> / -- <sup>b</sup>
<b>54</b>	Wittig	5-benzothiadiazole	379	379	490	522	22770 (380)	23% / 36%
<b>53</b>		4-benzothiadiazole	398	399	530	557	-- <sup>b</sup>	92% / 0%
<b>36</b>	Knoevenagel (accepteurs chargés)	Pyridinium	406	383	494	507	12200 (380)	3% / 2%
<b>37</b>		Indolinium	402	384	512	537	33900 (435) <sup>a</sup>	0% / 29% <sup>a</sup>
<b>38</b>		Benzothiazolium	435	412	517	521	-- <sup>b</sup>	0% / 0%
<b>39</b>	Knoevenagel (accepteurs neutres)	DCP	401	399	500	494	17580 (400)	0% / 0%
<b>41</b>		TCF	434	440	505	559	27220 (440) <sup>a</sup>	0% / 0% <sup>a</sup>
<b>42</b>		Isophorone	413	413	553	563	36560 (415)	0% / 34%

<sup>a</sup> dégradation du fluorophore dans ces conditions de mesures (irradiation forte), <sup>b</sup> non déterminé

Pour conclure, il est possible de comparer la force des groupements électroaccepteurs en ne regardant que les longueurs d'onde d'émission maximums de l'ensemble de ces molécules dans un même solvant (**Figure 54**). De ce point de vue là uniquement, les molécules avec les émissions les plus décalées dans le rouge sont les plus intéressantes pour nous. Ce n'est cependant pas le seul critère auquel nous nous sommes intéressés pour notre sélection.

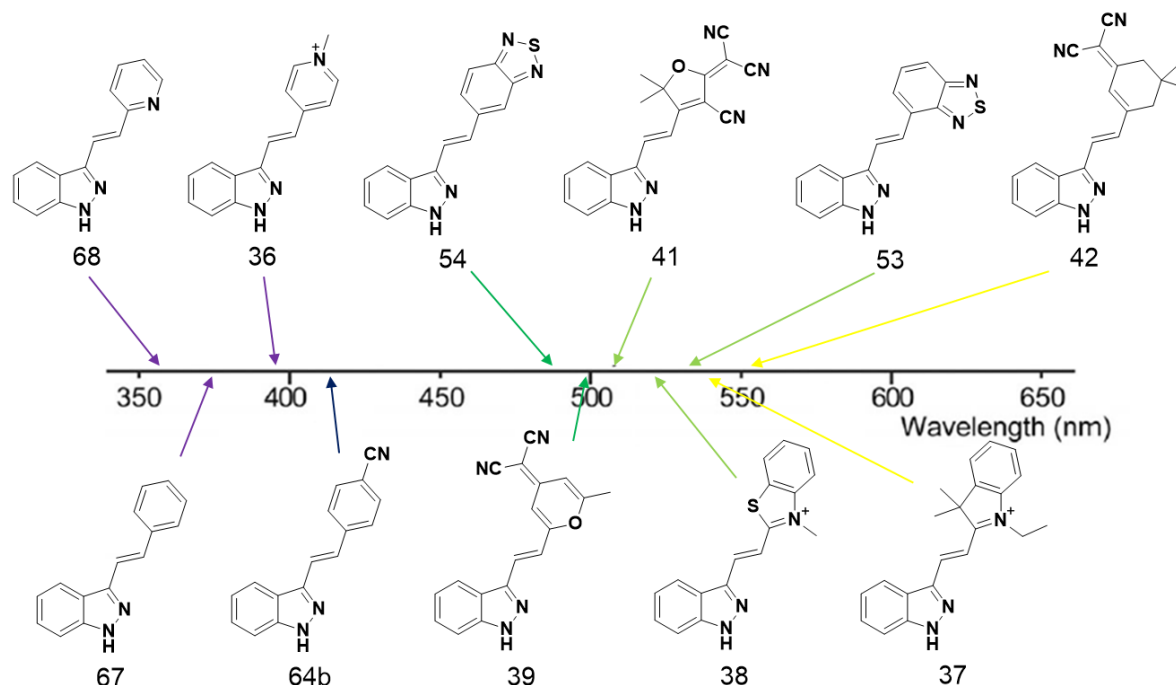


Figure 54 : Longueurs d'onde d'émission maximums des molécules à donneur 1H-indazole dans le DCM.

### 3.1.2) Effet de la méthylation sur les azotes N1 ou N2 de l'indazole

L'indazole possédant deux formes tautomères aux propriétés spectroscopiques bien distinctes, nous avons cherché à éclaircir l'influence de la méthylation sur les positions N1 et N2 de l'indazole. Comme expliqué lors de la synthèse des méthylindazoles, la comparaison des spectres d'absorption des trois donneurs (1H-indazole, 1- et 2-méthylindazoles) pour un même accepteur peut renseigner sur la position du proton labile du 1H-indazole.

Dans le cas de l'accepteur chargé indolinium comme de l'accepteur neutre benzothiadiazole, les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission des fluorophores méthylés en position N1 (**43** et **55** respectivement) sont décalées vers le rouge, tout en conservant des formes très similaires à celles de leurs analogues 1H-indazole **37** et **53** (**Figure 55**, **Tableau 7**). Cette observation est certainement due au caractère donneur du groupement méthyle qui augmente la densité électronique du cycle indazole. Dans les cas des donneurs 2-méthylindazoles, en revanche, les observations diffèrent entre les deux groupements accepteurs.

Dans le cas de l'accepteur benzothiadiazole, les spectres de **56** (2-méthylindazole) sont davantage décalés vers le rouge et une fois encore leur silhouette globale est conservée (**Figure 55 A & B**), ce qui est en accord avec la littérature qui prédit un transfert de charge plus important pour les indazoles substitués en N2 et C3 que ceux en N1 et C3 (cf. **Chapitre 2 2.1** p. 79).

Dans le cas de l'accepteur indolinium, les propriétés de **44** sont très impactées par la substitution en position N2 (**Figure 55 C & D**). Une forte réduction du déplacement de Stokes est observée, principalement liée au déplacement bathochrome de son absorption. L'autre point remarquable est que la longueur d'onde d'émission ne varie presque plus en fonction de la polarité du solvant en passant du dichlorométhane à l'acétonitrile ( $\Delta\lambda_{em}^{max} = 5$  nm, **Tableau 7**). Ces deux éléments laissent penser que ce chromophore N2 possède un caractère « cyanine » beaucoup plus marqué que son analogue 1*H*-indazole. Là aussi, ce comportement est cohérent la littérature qui attribue à la substitution en position N2 de l'indazole un caractère quinonique et moins aromatique ; en effet, la forme « cyanine » correspond à une délocalisation électronique plus complète favorisée par la réduction de l'aromaticité d'un composé.

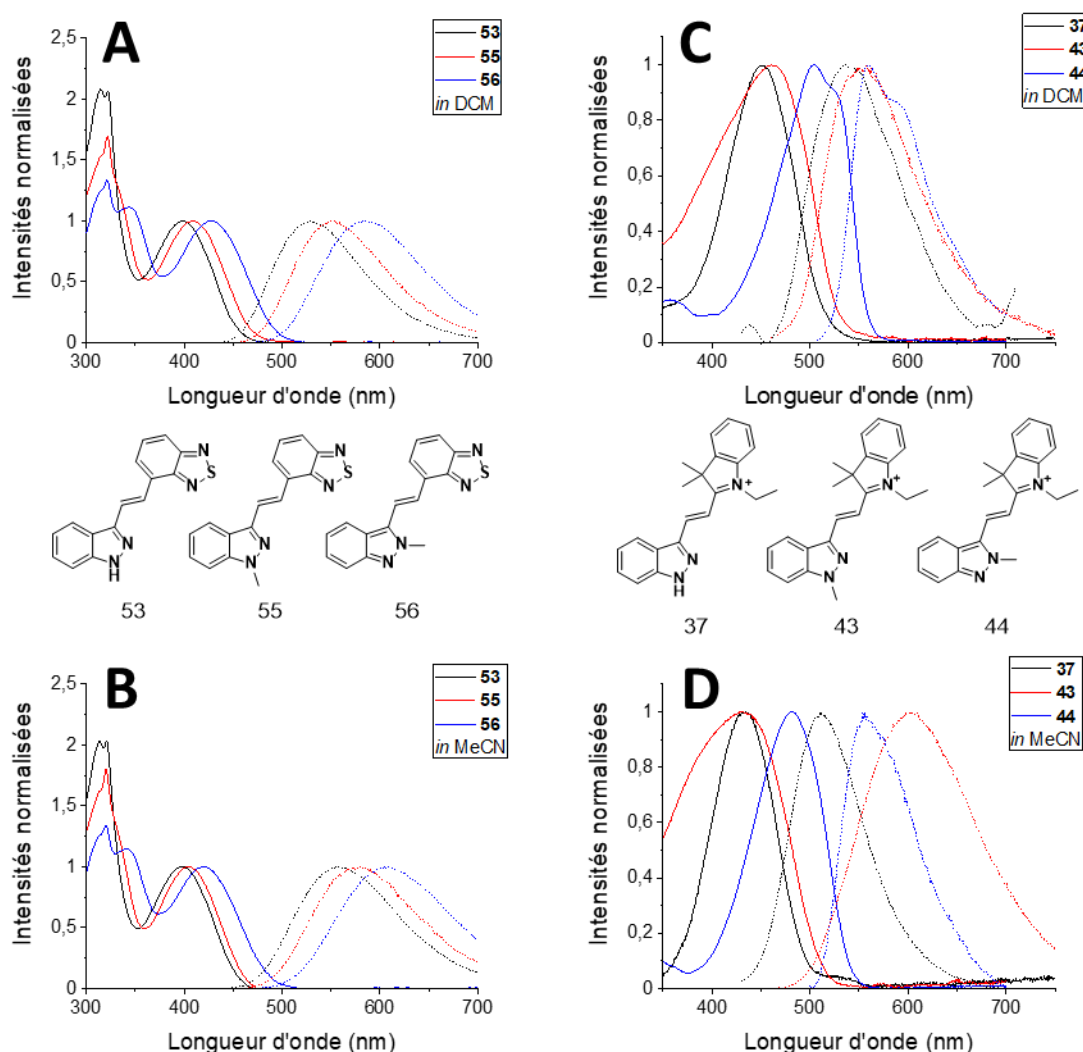


Figure 55 : Comparaison des spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (pointillés) des 1*H*-, 1-méthyl et 2-méthylindazoles pour l'accepteur 4-benzothiadiazole dans A) le DCM et B) le MeCN, et l'accepteur indolinium dans C) le DCM et D) le MeCN.

Cette étude permet enfin de conclure sur la tautomérie des molécules non méthylées. Du fait du plus grand nombre de similitudes entre les spectres d'absorption des donneurs indazoles et 1-méthylindazoles que des donneurs 2-méthylindazoles, il est possible de confirmer qu'à l'état fondamental, les 1*H*-indazoles sont bien protonés sur leur azote N1.

**Tableau 7 : Comparatif des propriétés photophysiques de l'axitinib, des sondes à noyaux 1H-indazole et indazoles méthylés.**

# sonde	Donneur	Accepteur	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ (nm)		$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)		$\epsilon_{\text{MeCN}}$ à $\lambda_{\text{abs}}$ ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , nm)	$\Phi_{\text{DCM}} / \Phi_{\text{MeCN}}$
			DCM	MeCN	DCM	MeCN		
<b>68</b>	1H-indazole	Pyridyle	326	326	348	360	22370 (330)	3% / 2%
<b>37</b>	1H-indazole		402	384	512	537	33900 (435) <sup>a</sup>	0% / 29%
<b>43</b>	1-méthylindazole	Indolinium	462	432	554	603	14040 (445) <sup>a</sup>	0% / -- <sup>a</sup>
<b>44</b>	2-méthylindazole		505	481	560	555	29000 (480) <sup>a</sup>	0% / 40%
<b>54</b>	1H-indazole		398	399	530	557	5700 (400)	92% / 0%
<b>55</b>	1-méthylindazole	4-benzothiadiazole	408	404	552	580	10270 (405)	96% / 0%
<b>56</b>	2-méthylindazole		429	420	585	607	13850 (420)	77% / 0%

<sup>a</sup> dégradation du fluorophore dans ces conditions de mesures (irradiation forte), <sup>b</sup> non déterminé

### 3.1.3) Évaluation de l'indazole comme groupement électrodonneur

Comme expliqué dans l'introduction de ce chapitre, l'indazole est un groupement peu utilisé dans les structures des sondes fluorescentes et sa force en tant que donneur d'électron dans un transfert de charge est encore moins discutée. Cette discussion est pourtant particulièrement pertinente étant donné que l'indazole ressemble structurellement à l'indole qui est un bon groupement donneur. L'indazole est cependant réputé être un cycle aromatique moins riche en électrons, ce qui se vérifie par sa plus faible nucléophilie. En revanche, il possède un proton labile relativement acide (avec un  $\text{pK}_a = 17$  dans le DMSO, contre 21 pour l'indole) et deux formes tautomères. La déprotonation des indazoles pourrait donc avoir un effet similaire à celui observé avec les phénols dont la déprotonation induit une forte augmentation du pouvoir donneur.

De façon analogue au donneur phénol,<sup>[38]</sup> l'ajout de substituants électroattracteurs sur l'indazole « simple », dont le  $\text{pK}_a \approx 17$  dans le DMSO, peut influencer fortement le  $\text{pK}_a$  de la molécule finale. En effet, dans certains solvants comme le DMSO ou le MeCN, les spectres d'absorption et d'émission des molécules TCF **41** et benzothiazolium **38** sont très différents de ceux observés dans les autres solvants ce qui pourrait être expliqué par une déprotonation du donneur 1H-indazole. Pour démontrer cette hypothèse, nous avons également mesuré les spectres de ces molécules en présence d'une faible quantité d'acide (0,1% acide méthanesulfonique, **Figure 56**). L'ajout d'acide décale complètement vers le bleu le spectre absorption de la molécule avec l'accepteur TCF **41** dans le DMSO, ce qui montre bien que cette molécule était initialement déprotonée. De la même manière, l'ajout d'acide décale vers le bleu l'émission de la molécule avec l'accepteur benzothiazolium **38** dans l'acétonitrile, montrant une diminution du pouvoir électrodonneur de l'indazole lorsqu'il est protoné.

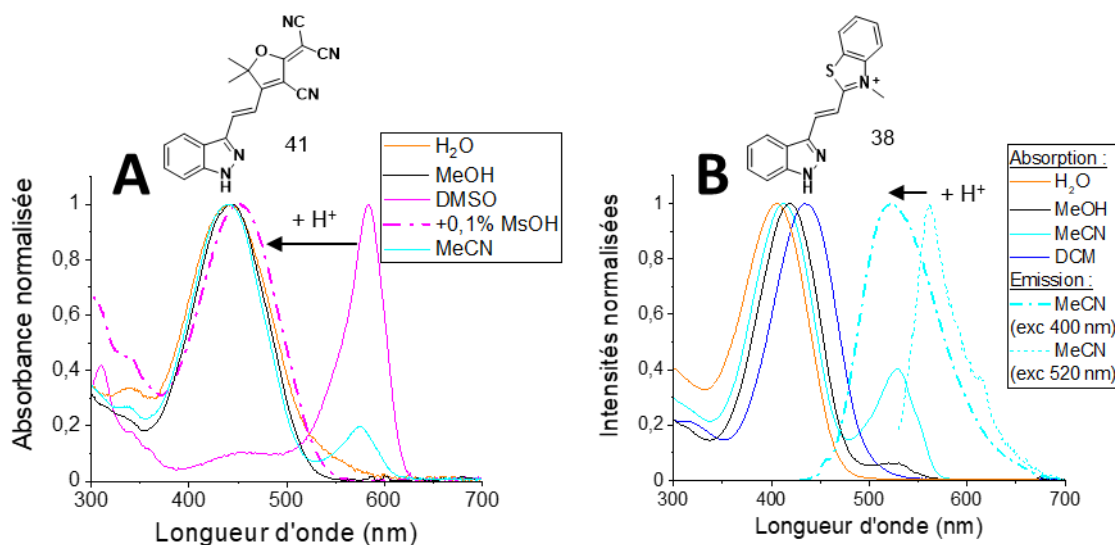


Figure 56 : A) Spectres d'absorption dans différents solvants du composé avec l'accepteur TCF **41**, dont DMSO acide (traits pointillés) ; B) Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (pointillés) dans divers solvants du composé avec l'accepteur benzothiazolium **38**.

Pour les composés chargés comme avec l'accepteur indolinium **37**, cette déprotonation se traduit par une modification des longueurs d'ondes maximums et une modification de l'aspect des spectres, passant de spectres symétriques typiques des molécules capto-datives à des spectres plus fins avec un épaulement correspondant aux bandes vibroniques typiques des cyanines (**Figure 57**). Le solvatochromisme qu'il est possible d'observer en milieu acide est cohérente avec le transfert de charge qui s'opère entre le donneur indazole et l'accepteur, et ne s'observe plus en milieu basique.

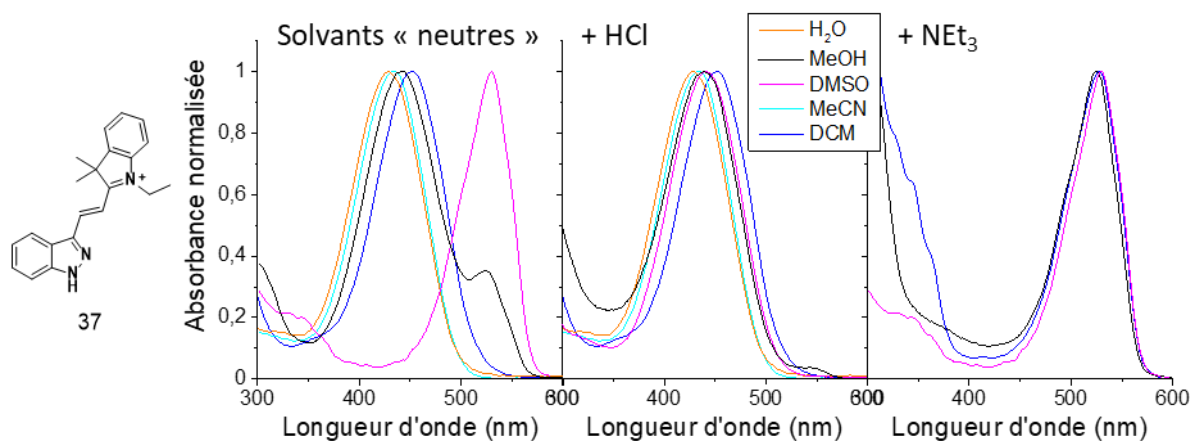


Figure 57 : Spectres d'absorption du composé avec l'accepteur indolinium **37** dans divers solvants (gauche), avec ajout de HCl (centre) ou de NEt<sub>3</sub> (droite).

Une fois déprotonés en milieu basique, les composés initialement chargés (pyridinium **36**, indolinium **37** et benzothiazolium **38**) se sont révélés stables dans le temps contrairement au composé avec l'accepteur TCF **41**. Ainsi, pour les composés stables, il est possible de déterminer leur pK<sub>a</sub> à l'état fondamental grâce à l'équation de Henderson-Hasselbach (**Equation 2**, **Figure 58**).

$$(2) \quad pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]}$$

Où  $[A^-]$  et  $[AH]$  correspondent respectivement aux concentrations des formes acides et basiques d'un même composé. Pour  $[A^-] = [AH]$ , on trouve  $\text{pH} = \text{pK}_a$ . Après titration dans un milieu tamponné, le  $\text{pK}_a$  du composé à accepteur indolinium **37** a donc été déterminé à 9,0 contre 13,86 pour l'indazole « simple ». <sup>[85]</sup>

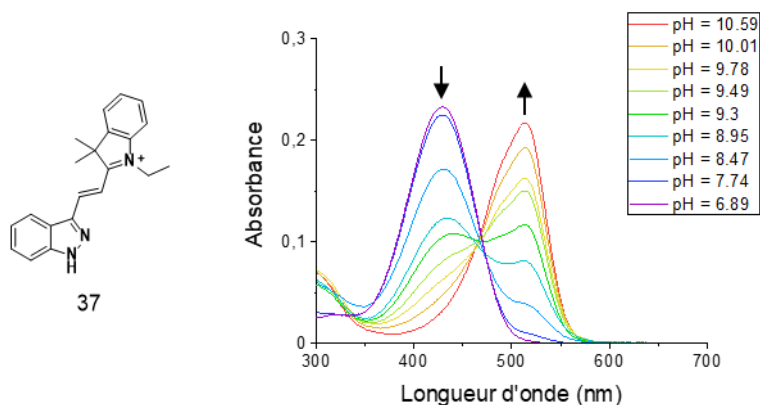


Figure 58 : Titration spectroscopique dans le tampon PBS du composé avec l'accepteur indolinium **37**.

Pour conclure, l'indazole est un cycle aromatique peu riche en électrons, ce qui se vérifie par sa plus faible nucléophilie, et donc un donneur relativement faible lorsqu'il est comparé à d'autres fluorophores de la littérature avec les mêmes groupements électroaccepteurs (**Figure 59**). En revanche, il possède un proton labile avec un  $\text{pK}_a$  relativement faible, pouvant donc être déprotoné en milieu basique. La déprotonation des indazoles induit une augmentation de la densité électronique du cycle et donc une augmentation de son pouvoir électrodonneur.

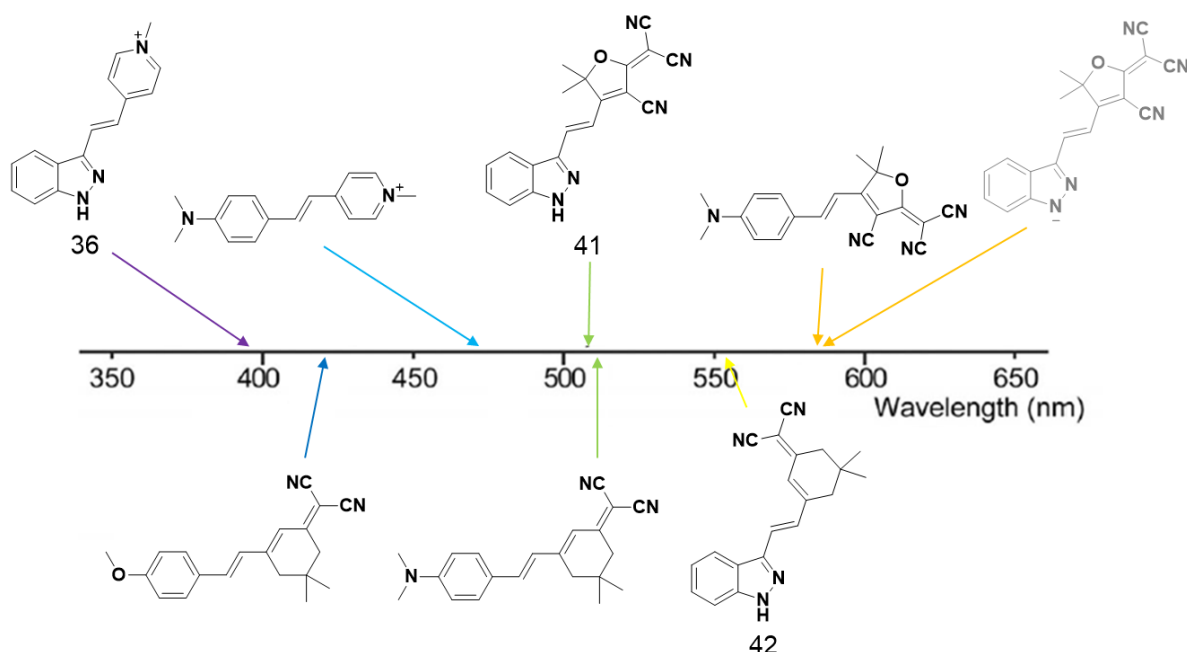


Figure 59 : Le 1H-indazole en tant que donneur : comparaison des longueurs d'onde d'émission maximums de différents fluorophores à accepteurs identiques dans le DCM. <sup>[39]</sup>

## 3.1.4) Études de la variation des moments dipolaires : modèle de Lippert-Mataga

Certains des fluorophores présentés ci-dessus se sont avérés très sensibles à la polarité des solvants, plus particulièrement les accepteurs neutres comme le 4-cyanobenzyle, l'isophorone ou encore les benzothiadiazoles. Les benzothiadiazoles étant des motifs utilisés en optoélectronique comme relai dans le transport d'électrons, par exemple, leur polarisabilité n'est pas étonnante. Ils sont cependant peu décrits dans la littérature des sondes fluorescentes et ont donc retenu notre attention. Une variation importante des déplacements de Stokes des molécules en fonction de la polarité des solvants confirme l'existence d'un bon transfert de charge et donc leur bonne polarisabilité.

En effet, la variation du transfert de charge peut directement être corrélée à une variation de moment dipolaire d'un fluorophore, et donc indirectement relié à sa polarisabilité. Cette relation est donnée par l'équation de Lippert-Mataga (**Equation 3**).

$$(3) \quad \tilde{\nu}_{abs} = -\frac{2}{hc} \mu_g (\mu_e - \mu_g) a^{-3} \Delta f + constante$$

$$(4) \quad \tilde{\nu}_{em} = -\frac{2}{hc} \mu_e (\mu_g - \mu_e) a^{-3} \Delta f + constante$$

$$(5) \quad (3) - (4) = \tilde{\nu}_{abs} - \tilde{\nu}_{em} = \frac{2}{hc} (\mu_e - \mu_g)^2 a^{-3} \Delta f + constante$$

Avec  $\tilde{\nu}_{abs}$  et  $\tilde{\nu}_{em}$  énergies des maxima d'absorption et d'émission,  $\tilde{\nu}_{abs} - \tilde{\nu}_{em}$  déplacement de Stokes ( $\text{cm}^{-1}$ ),  $h$  la constante de Planck ( $h = 6,6256 \times 10^{-27}$  erg),  $c$  la célérité ( $\text{cm.s}^{-1}$ ),  $\mu_g$  et  $\mu_e$  moments dipolaires aux états fondamentaux et excités ( $\text{statC.cm} = 10^{18}$  D),  $a$  rayon de la cavité d'Onsager (rayon de la molécule assimilée à une sphère, en cm) et enfin,  $\Delta f$  la polarisabilité orientationnelle du solvant.

À partir de cette équation, la droite dite de Lippert-Mataga peut être tracée comme une fonction de la polarisabilité orientationnelle du solvant (**Equation 6**). Le coefficient directeur  $\alpha$  de cette droite permet ainsi de calculer à la différence de moment dipolaire entre l'état fondamental et l'état excité d'une molécule (**Equation 7**).

$$(6) \quad \tilde{\nu}_{abs} - \tilde{\nu}_{em} = \alpha \Delta f + constante$$

$$(7) \quad \mu_e - \mu_g = \sqrt{\frac{hc}{2} \alpha a^3}$$

L'équation de Lippert-Mataga ne prenant en compte que la polarité des solvant, le tracé des droites correspondantes permet également de mettre en évidence des effets des solvants qui ne sont pas liés à la polarité (formation de liaisons hydrogènes, par exemple) lorsqu'un point sort de l'alignement.

L'ensemble des déplacements de Stokes pour spectres des 4- et 5-benzothiadiazoles ont été calculés (**Tableau 8**) et ont permis de tracer des droites pour l'ensemble de ces composés (**Figure 60**). À noter que cette équation est une approche qui apparente les molécules à des sphères et ne tient pas compte d'un certain nombre de paramètres tels que donneurs et les accepteurs de liaisons hydrogène du solvant comme du fluorophore. Les composés analysés ici

possédant de nombreux donneurs et accepteurs d'hydrogène, en particulier au niveau du cycle indazole, cette dernière approximation explique les décrochages observés pour l'ensemble de ces composés dans le tétrahydrofurane et le méthanol (**Figure 60**).

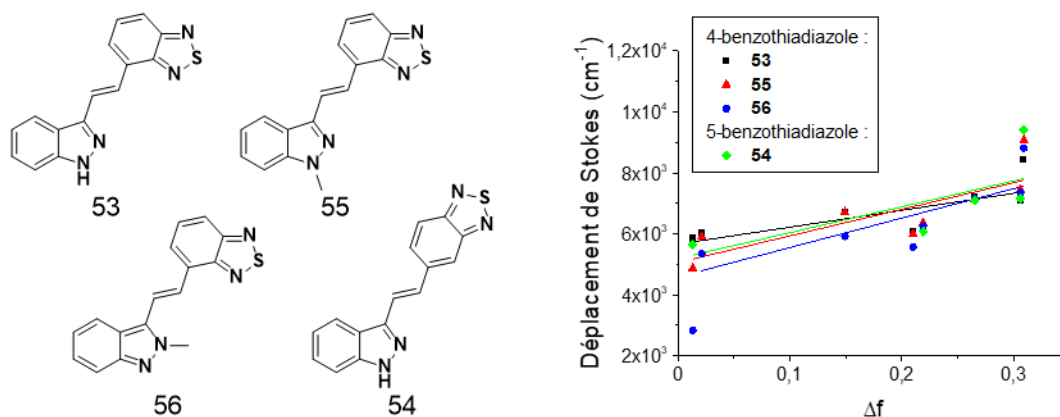


Figure 60 : Tracé des droites de Lippert-Mataga pour les 4-benzothiadiazoles **53**, **55** et **56** et 5-benzothiadiazole **54**.

Tableau 8 : Déplacements de Stokes des 4- et 5-benzothiadiazoles en fonction du solvant.

Solvant	$\Delta f$	53			55			56			54		
		$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	$\tilde{\nu}_{\text{abs}} - \tilde{\nu}_{\text{em}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	$\tilde{\nu}_{\text{abs}} - \tilde{\nu}_{\text{em}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	$\tilde{\nu}_{\text{abs}} - \tilde{\nu}_{\text{em}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	$\tilde{\nu}_{\text{abs}} - \tilde{\nu}_{\text{em}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )
Toluène	0,013	401	514	5480	411	514	4875	438	500	2830	380	484	5655
Dioxane	0,021	400	527	6024	402	527	5900	432	562	5354	--	--	--
$\text{CHCl}_3$	0,149	398	543	6709	398	543	6709	429	575	5918	--	--	--
THF	0,210	405	537	6069	405	535	5999	432	569	5573	--	--	--
DCM	0,219	398	529	6220	409	553	6365	428	584	6240	378	491	6088
DMSO	0,265	410	582	7210	415	590	7145	430	621	7150	392	543	7093
MeCN	0,306	399	557	7110	404	578	7450	419	605	7335	379	520	7154
MeOH	0,309	398	599	8430	400	628	9075	412	647	8815	379	589	9407

Le rayon d'Onsager de ces fluorophores a été déterminé comme étant de  $a = 6 \text{ \AA}$  par modélisation sur le logiciel Avogadro. Ainsi, à partir des droites, l'augmentation de leurs moments dipolaires a été calculé et sont respectivement de 9 D, 12 D, 12 D et 10 D pour les 4-benzothiadiazoles **53**, **55** et **56** et le 5-benzothiadiazole **54**. Ces résultats rejoignent la littérature concernant l'influence de la méthylation sur l'augmentation de la densité électronique sur le noyau indazole, et donc celle du transfert de charge vers groupement électroaccepteur et celle du moment dipolaire des fluorophores. La position de la méthylation sur le donneur indazole n'affecte cependant pas significativement la variation des moments dipolaires des fluorophores.



Ce résultat est une fois encore cohérent avec la littérature, pour rappel, la position de la méthylation influençait notamment la basicité des atomes d'azote du cycle indazoles. En effet, la position de la méthylation semble jouer un rôle plus important dans les interactions avec les solvants, expliquant notamment les différents profils de droites observés (décrochage dans le toluène pour le 2-méthylindazole uniquement, par exemple).

Toutes ces observations associées à des variations importantes des déplacements de Stokes des fluorophores font des accepteurs benzothiadiazole des motifs intéressants pour la suite du projet.

### 3.1.5) Mécanismes d'extinction de photoblanchiment : discussion et pistes de réflexion

La variété des structures des fluorophores explorées au cours de ce projet a entraîné divers comportements vis-à-vis de la polarité des solvants ou de leur viscosité, par exemple. Ces observations se sont accompagnées de phénomènes inédits dans la série qui seront plus amplement discutés ici, en commençant par l'effet de « double émission » de l'axitinib, suivi des spectres des composés avec les accepteurs TCF **41** et indolinium **37**. À noter que certains fluorophores sont sujets à plusieurs de ces phénomènes à la fois ce qui complique leurs analyses.

Comme mentionné au début de ce chapitre, nous avons observé deux bandes d'émission distinctes l'axitinib **15**, dont les maximums sont séparés d'environ 150 nm. Ce phénomène laisse penser qu'il existe une photo-isomérisation de l'axitinib **15** autour de sa double liaison centrale déjà observée dans la littérature.<sup>[139]</sup> En effet, le tracé des spectres d'excitation respectifs révèle l'existence de deux espèces avec des spectres distincts, ainsi un  $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 325 \text{ nm}$  a été observé pour  $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 400 \text{ nm}$  et attribué à l'isomère *E* de l'axitinib **15** contre  $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 360 \text{ nm}$  pour  $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 555 \text{ nm}$ , attribuée à l'isomère *Z* (**Figure 61**). Cette attribution peut paraître contre-intuitive car les spectres des isomères *E* sont généralement décalés vers le rouge par rapport à leurs isomères *Z*, grâce à une meilleure conjugaison électronique, mais cette attribution des spectres d'absorption pour l'axitinib est cohérente avec la littérature.<sup>[139]</sup> Aucune étude de la fluorescence de l'axitinib n'étant publiée, nos observations viennent compléter et étayer les conclusions déjà établies.

En effet, ce déplacement bathochrome des spectres d'absorption et d'émission de l'isomère *Z* est expliqué par deux phénomènes liés à sa géométrie. Il a été prouvé que l'isomère *Z* est majoritairement sous sa forme 2*H*-indazole, stabilisée par liaison hydrogène intramoléculaire entre le donneur indazole et l'accepteur pyridyle (**Figure 61**).<sup>[139]</sup> La première conséquence de cette géométrie est que le groupement donneur indazole se trouve sous sa forme quinonique qui a été identifiée comme un meilleur donneur d'électrons à la fois en théorie (cf. **Chapitre 2 2.1**) p. 79) et en pratique (cf. **Chapitre 2 3.1.2**) p. 105). Cependant, cet impressionnant déplacement de Stokes de presque 200 nm est surtout expliqué par un potentiel effet de transfert de proton intramoléculaire à l'état excité (*excited state internal proton transfer*, ESIPT) qui augmente à la fois la force du donneur 2*H*-indazole par déprotonation et celle de l'accepteur pyridyle par protonation (**Figure 61**).

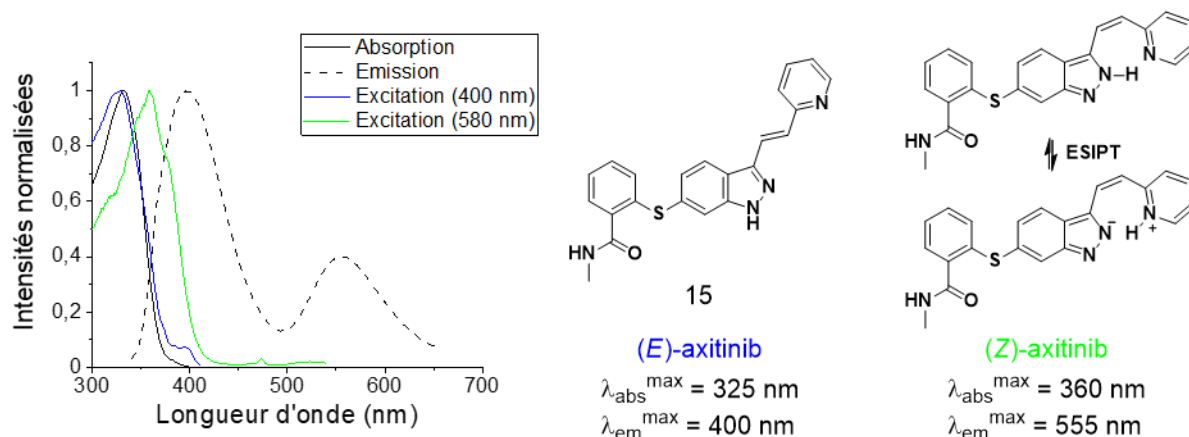


Figure 61 : Spectres d'absorption, d'émission ( $\lambda_{exc} = 320 \text{ nm}$ ) et d'excitation ( $\lambda_{em} = 400 \text{ nm}$  et  $\lambda_{em} = 580 \text{ nm}$ ) de l'axitinib **15** dans l'éthylène glycol à 20°C ; structures correspondantes.

Concernant les molécules synthétisées au cours de cette thèse, l'autre phénomène observé est la déprotonation de certains donneurs 1*H*-indazole en milieu basique, notamment pour les composés avec des accepteurs chargés (pyridinium **36**, indolinium **37** et benzothiazolium **38**) ainsi qu'un composé à accepteur neutre (TCF **41**). À l'inverse des composés chargés pour lesquels il est possible de mesurer un  $pK_a$ , les composés initialement neutres (TCF **41**, par exemple) se sont révélés instables. Cette instabilité se manifeste par une diminution de l'intensité de la bande d'absorption du composé déprotoné au bout de quelques secondes et qui finit par disparaître totalement sans ajout de base supplémentaire (bande b, **Figure 62 A**), accompagnée d'une augmentation de l'absorption dans les UV (bande c). Cette nouvelle bande d'absorption ne correspondant ni à l'espèce déprotonée ni à celle de départ (bande a, **Figure 62 B**), il a été conclu qu'une troisième espèce se formait en milieu basique. Les longueurs d'onde d'absorption dans l'UV de la bande c étant similaires à celle de l'indazole seul, notre première hypothèse était liée à une fragmentation du composé. Cependant, cette dernière espèce étant stable en milieu basique et sa formation réversible par ajout d'acide, elle ne peut pas correspondre à un produit de fragmentation.

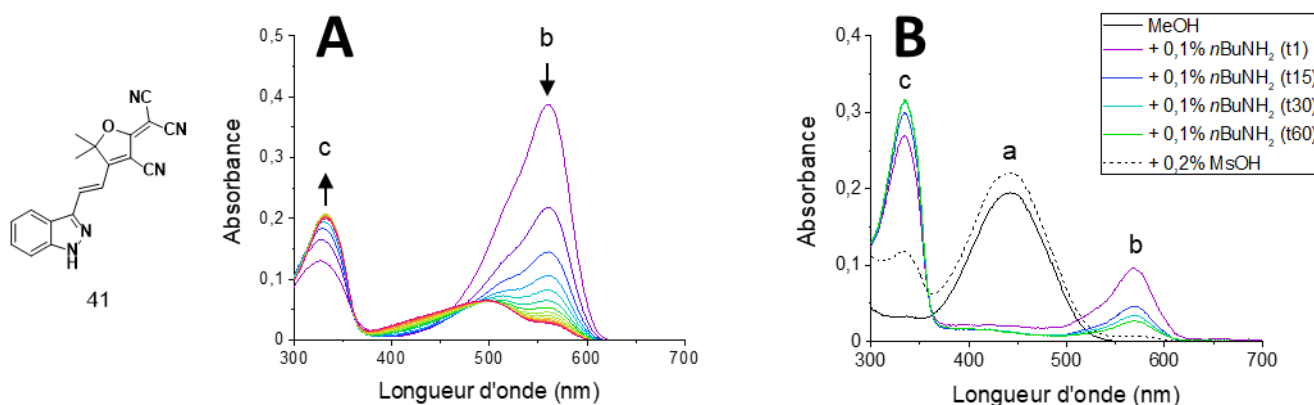


Figure 62 : A) Stabilité du composé avec l'accepteur TCF **41** en milieux aqueux basique ; B) Evolution de son spectre d'absorption après ajout de base puis d'acide dans le méthanol.

Nous avons déjà montré précédemment un problème de stabilité de certaines molécules en milieu basique mais nous avons aussi observé des fluctuations d'absorbance dans certains solvants neutre ou acide, tels que le méthanol ou le DMSO (**Figure 63**). Une irradiation

prolongée conduit à un décalage vers le bleu du spectre d'absorbance et une diminution de l'intensité de fluorescence, ces changements étant progressivement réversible lorsque l'échantillon est chauffé dans le noir. Le phénomène de photoblanchiment observé étant réversible, il est donc possible de parler de photochromisme, ou photo-switching.

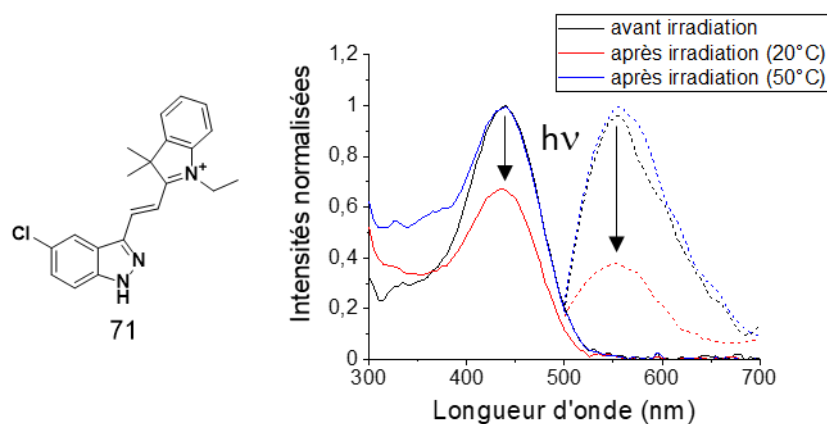


Figure 63 : Spectres d'absorbance du composé **71** dans le méthanol avant et après irradiation.

Pour mettre ce phénomène en évidence, nous avons irradié une solution de composé indolinium **71** dans le DMSO acidifié à l'aide d'acide chloridrique à 20°C en suivant l'évolution de sa fluorescence. Cette mesure et la conversion sont possibles en parallèle grâce à la lampe puissante de notre fluorimètre (Fluorolog avec une lampe xénon continue 450 W). Nous nous sommes ensuite aperçus d'un retour progressif de la fluorescence par chauffage à 50°C à l'abri de la lumière, en quelques minutes seulement. Afin de pouvoir réaliser une cinétique de ce retour, il était nécessaire de réduire l'irradiation de l'échantillon au maximum car l'irradiation induit la photo-conversion. Ce retour à 50°C a donc été suivi par spectroscopie d'absorbance UV-visible, l'irradiation de notre spectrophotomètre UV-visible étant suffisamment peu intense (Cary 50 avec une lampe xénon pulsée).

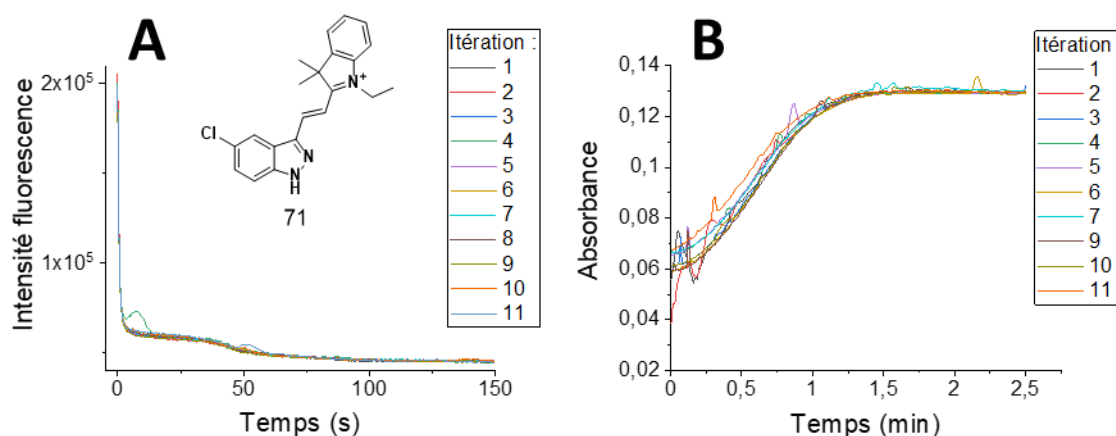


Figure 64 : Cinétiques de : A) la disparition de fluorescence de **71** dans le DMSO acide à 550 nm ( $\lambda_{exc} = 450$  nm, à 20°C) ; B) retour de l'absorption de **71** à 450 nm (à 50°C).

Une cinétique de diminution de la fluorescence très rapide de l'échantillon a été obtenue (**Figure 64 A**). De manière surprenante un palier a été observé entre 5 – 50 s puis la diminution de la fluorescence reprend pour atteindre un niveau très faible. La cinétique de restauration de l'absorption de l'échantillon à la longueur d'onde d'irradiation à 50°C a ensuite pu être

enregistrée (**Figure 64 B**), un retour à l'état initial par stimulation thermique est mesuré en une minute environ. Ainsi, l'ensemble de ces données peuvent également être rassemblées dans un unique graphique pour montrer la stabilité du produit au cours des différentes itérations de ces mesures (**Figure 65**). Ces résultats sont encourageants car ils démontrent une bonne stabilité du produit à la lumière dans le DMSO acidifié ainsi qu'une bonne réversibilité du processus de photo-switching. Il est également intéressant de noter que dans le cas de l'extinction comme de la restauration de fluorescence, un équilibre est atteint en moins de 2 minutes (120 secondes), faisant de ce composé un *switch* efficace.

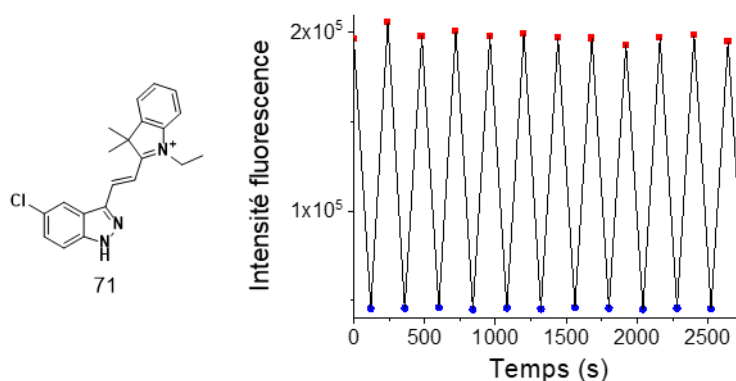


Figure 65 : Evolution des minima et maxima de l'intensité de fluorescence de **71** dans le DMSO acide à 500 nm au cours des différentes itérations de cyclisation/ouverture du cycle.

Le comportement de nos composés ressemble à celui des photo-acides avec une structure spiroyranes (**Schéma 43**), qui possèdent une forme mérocyanine ouverte absorbant dans le visible et une forme cyclisée absorbant dans l'UV. L'hypothèse de la cyclisation de nos composés indazoles est cohérente avec les variations de spectre observées lors des expériences décrites ci-dessus. Ce phénomène de cyclisation bien décrit pour les phénols<sup>[140]</sup> reste cependant assez inédit pour les indazoles, le seul exemple de la littérature étant présenté ci-dessous (**Schéma 43**).<sup>[141]</sup>

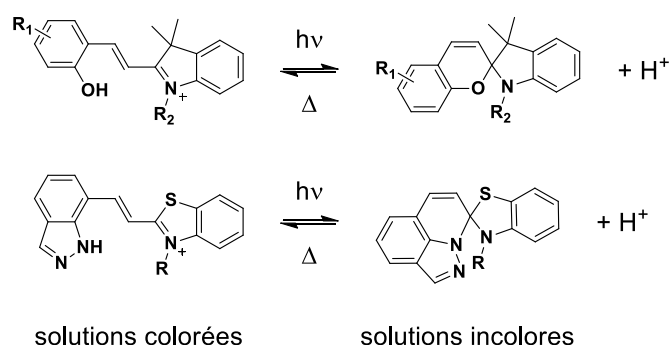


Schéma 43 : Exemples de la littérature de la cyclisation des photo-acides sous irradiation.

Dans ces cas-là, la cyclisation est un phénomène en plusieurs étapes. Le pK<sub>a</sub> des indazoles étant drastiquement diminué à l'état excité,<sup>[85]</sup> la cyclisation des composés chargés avait d'abord été vue comme le produit d'une déprotonation à l'état excité entraînant par la suite la cyclisation. Cependant, le temps de vie de l'état excité des petites molécules organiques est souvent bien inférieur à la cinétique de déprotonation, ne permettant la formation de l'anion à

l'état excité (**Schéma 44**). En revanche, sous irradiation, une isomérisation de la double liaison de nos molécules est possible, et probable, et peut favoriser la cyclisation intramoléculaire. C'est ce produit cyclisé qui serait ensuite déprotoné. Une fois encore, ce processus de cyclisation est réversible dans le noir.

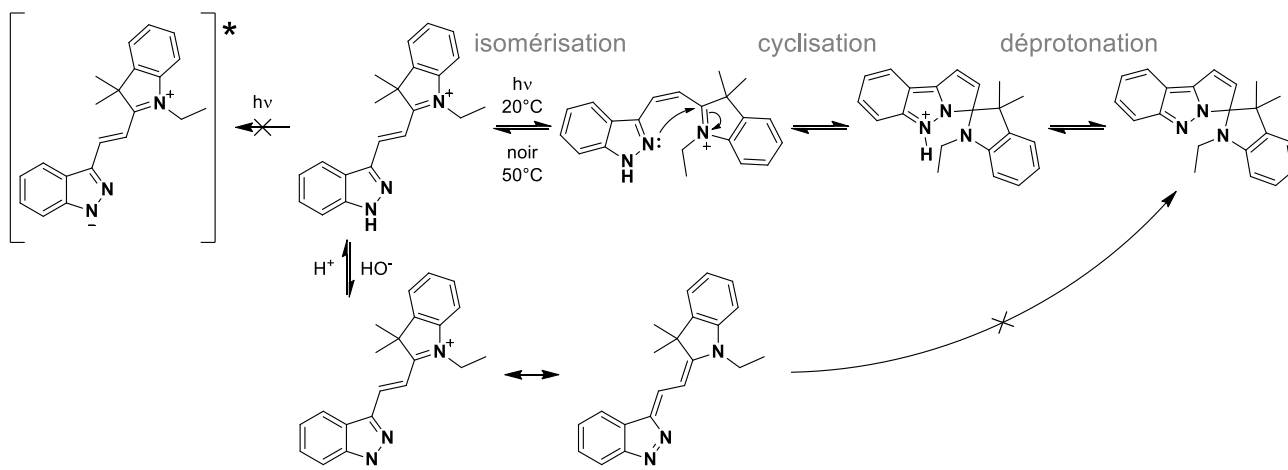


Schéma 44 : Cyclisation intramoléculaire du composé avec accepteur indolinium **37**.

Ce comportement a aussi été observé qualitativement pour le composé TCF **41** cependant, il semble être favorisé en milieu basique (**Figure 66**), contrairement au composé indolinium **37**. Une étude plus complète doit encore être menée, mais ces premières observations rejoignent la littérature. En effet, Peng *et al.* ont montré que, pour le groupement TCF lié à une quinoléine **72**, le produit pouvait cycliser sous irradiation de façon intramoléculaire et réversible (**Figure 66**).<sup>[142]</sup>

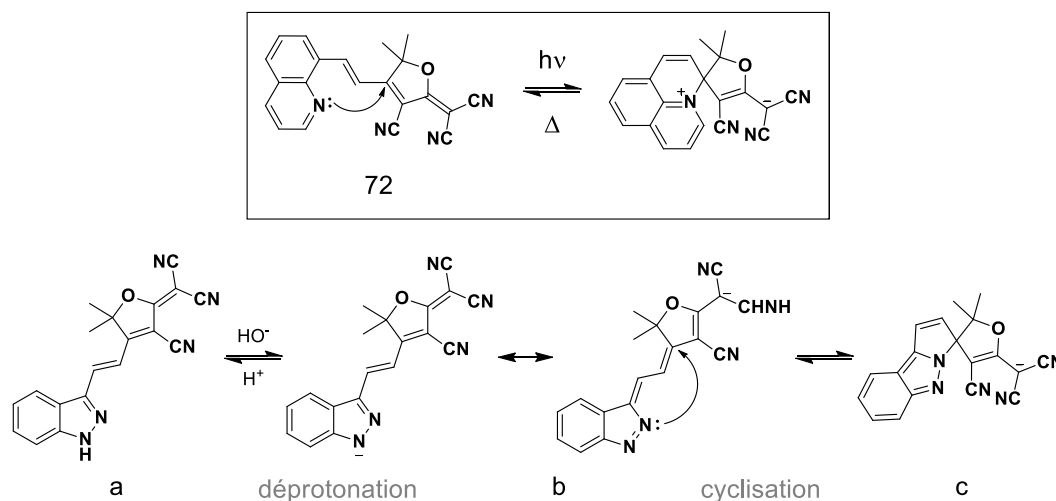


Figure 66 : Cyclisation du composé à accepteur TCF **41** et bande d'absorption correspondante.

Ainsi, ce phénomène de photo-switching (cyclisation) est supposé être à l'origine du photoblanchiment observé pour plusieurs de nos composés, en entraînant une « coupure » de la conjugaison électronique du système  $\pi$ . De plus, cette réaction semble conduire à une déprotonation des molécules qui peuvent alors être considérée comme des photo-acides. Les photo-acides sont des chromophores qui trouvent de nombreuses applications dont l'étude du pH intracellulaire par imagerie de fluorescence.<sup>[140,141]</sup> Ces sondes à pH sont basées sur des

phénols, dont les  $pK_a$  faibles ( $pK_a \approx 10$  pour le phénol non-substitué) entraîne leur cyclisation parasite dans le noir à pH physiologique. L'intérêt de nos molécules à cœur indazole réside dans la faible acidité de ce dernier qui ne permet pas cette cyclisation à pH physiologique, le  $pK_a$  du composé avec accepteur indolinium **37** ayant été déterminé à  $pK_a = 9,0$ . L'étude plus approfondie de ces photo-switches fera d'ailleurs bientôt l'objet d'une publication.

### 3.2) Études en viscosité

Toujours afin de déterminer quels accepteurs sont les plus pertinents pour la suite de notre projet, nous nous sommes également intéressés à la capacité de nos molécules à sonder la viscosité du milieu. En effet, ces molécules sont construites sur un motif de type stilbène impliqué dans un transfert de charge, qui se retrouve dans les sondes conformationnelles pro-fluorescentes (cf. **Chapitre 1 1.3.1.5**) p. 42).

#### 3.2.1) Étude en gamme de solvants et limitations

Il a d'abord été choisi de faire l'acquisition des spectres dans des mélanges de méthanol, d'éthylène glycol et de glycérol car ces trois solvants génèrent une large gamme de viscosité sans pour autant changer la polarité du milieu (**Figure 67 A–C**).<sup>[41]</sup> Il est important que la polarité reste constante lors de nos mesures étant donné que la plupart des composés de la série y sont sensibles. La température influençant également la viscosité des solvants, l'ensemble des mesures ont été thermostatées, puis les spectres d'émission ont été normalisés sur l'absorbance du produit à la longueur d'onde d'excitation afin de s'affranchir d'éventuels problèmes de dilutions en cours d'expérience. Le logarithme de l'intensité de fluorescence des molécules a ensuite pu être corrélé linéairement au logarithme de la viscosité du milieu (**Equation 8**, **Figure 67 D**).<sup>[41]</sup>

$$(8) \quad \ln(\eta_{mix}) = \sum_i n_i \times \ln(\eta_i)$$

Avec  $n_i$  le coefficient de pondération du solvant dans le mélange et  $\eta_i$  la viscosité du solvant (donné dans les tables pour une température précise).

Le coefficient directeur  $\alpha$  extrait de cette droite est une constante qui ne dépend que du fluorophore et de sa capacité à sonder la viscosité du milieu et peut donc être comparé indépendamment de sa méthode d'acquisition. L'ensemble de ces mesures ont donc été effectuées pour les composés de la série et le coefficient directeur de la droite a pu être déterminé pour chacun d'entre eux (**Figure 67 D**, **Tableau 9**).

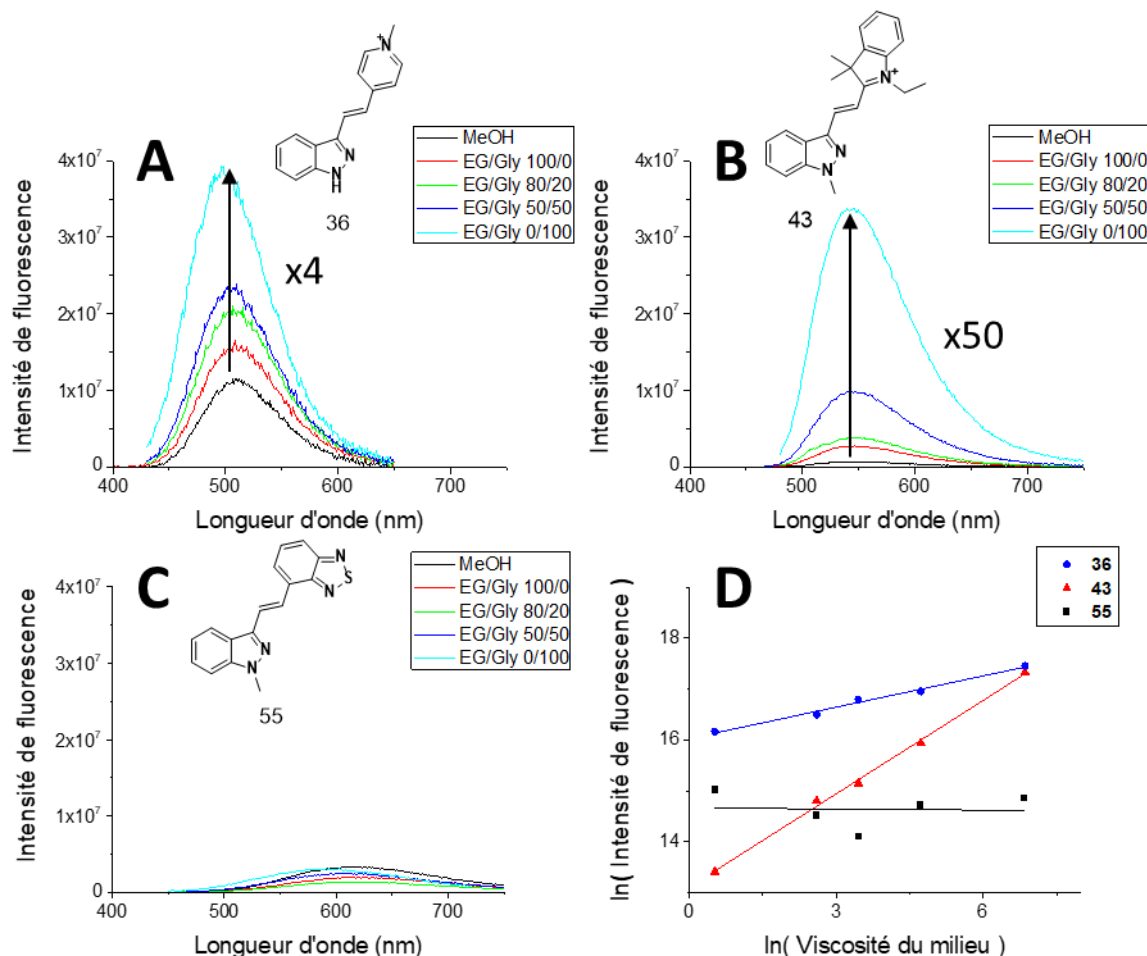


Figure 67 : Spectres d'émission (à 20°C) : A) pyridinium 36 ( $\lambda_{exc} = 390$  nm), B) indolinium, donneur N1 méthyl 43 ( $\lambda_{exc} = 440$  nm), C) benzothiadiazole, donneur N1 méthyl 55 ( $\lambda_{exc} = 400$  nm), D) Corrélation linéaire.

Le premier constat qu'il est possible de faire est que la majorité de ces composés sont sensible à la viscosité et que près de la moitié possèdent un coefficient  $\alpha$  de l'ordre de grandeur de celui du composé parent : l'axitinib **15** ( $0,4 \leq \alpha \leq 0,5$ ). Ces valeurs correspondent à une plutôt bonne augmentation de leur fluorescence de  $\times 15$  à  $\times 30$  entre les solutions de méthanol et de glycérol. À l'inverse, quelques composés ne semblent que peu, voire pas, sensibles à la viscosité comme les molécules à accepteurs pyridinium ou 4-benzothiadiazole (Figure 67 A&C).

Les résultats les plus positifs ont été obtenus pour les accepteurs indolinium, notamment avec les donneurs 1H-indazole **37** et 1-méthylindazole **43** (Figure 67 B). Leur augmentation de fluorescence entre les solutions de méthanol et de glycérol est d'environ  $\times 50$ , ce qui en fait nos composés les plus sensibles. Ces valeurs  $\alpha \geq 0,6$  sont d'ailleurs comparables à celles des sondes de viscosité de la littérature ou commerciales comme, par exemple, PicoGreen® **9** présentée précédemment qui possède un  $\alpha = 0,7$ .<sup>[41]</sup>

Une fois encore, la méthylation du donneur indazole semble influencer les propriétés spectroscopiques des composés. Dans le cas de l'accepteurs indolinium, la méthylation de l'indazole en position N1 (**43**, Figure 67 B) ne semble pas influencer la molécule contrairement à celle en position N2 qui entraîne une légère chute d'efficacité de fluorescence. Même constat

pour l'accepteur 4-benzothiadiazole pour lequel la méthylation de l'indazole en position N1 (**55**, **Figure 67 C**) et N2 semblent inhiber cette sensibilité à la viscosité du milieu.

Les résultats de cette étude sont donc globalement encourageant pour la suite du projet car l'ensemble des sondes à donneur 1*H*-indazole ont montré un minimum de sensibilité à leur environnement. Ces sondes sont donc toutes pro-fluorescentes, bien que leur efficacité varie dans la série. Il est également intéressant de noter qu'il n'y a aucune corrélation évidente entre la force ou la nature de l'accepteur et la capacité de la molécule à réagir à la viscosité.

**Tableau 9 : Coefficients directeurs des droites de corrélation fluorescence-viscosité.**

#	axitinib	67	68	64b	54	53	55	56
accepteur (donneur)	pyridiyle	benzyle	pyridyle	4-cyano pyridyle	5-benzothia diazole	4-benzothia diazole	4-benzothia diazole (N1 méthyl)	4-benzothia diazole (N2 méthyl)
$\alpha$	0,40 <sup>a</sup>	--	0,18 <sup>a</sup>	0,42 <sup>a</sup>	0,11 <sup>a</sup>	0,40 <sup>a</sup>	0	0
$r^2$	0,98 <sup>a</sup>	--	0,994 <sup>a</sup>	0,98 <sup>a</sup>	0,84 <sup>a</sup>	0,92 <sup>a</sup>	0,33	0,45

36	37	43	44	45	38	40	41	42
pyridinium	indolinium	indolinium (N1 méthyl)	indolinium (N2 méthyl)	indolinium (indole)	Benzo thiazolium	DCP	TCF	isophorone
0,2	0,62	0,61	0,53	--	0,48	--	0,50	0,40
0,98	0,995	0,996	0,95	--	0,98	--	0,98	0,97

<sup>a</sup> valeurs moyennées sur 4 points au lieu de 5

En étudiant l'ensemble des mesures réalisées pour la série des composés de phase 1, il est possible de constater que cette méthode de mesure du coefficient  $\alpha$  possède quelques limitations, des coefficients de détermination  $r^2$  peu pertinents étant enregistrés pour les faibles variations de fluorescence (**Tableau 9**). La limite principale de cette mesure provient du photoblanchiment observé sur certains composés et ne peut être évité. Une autre limite naît de la nécessité de préparer un échantillon différent pour chaque solvant, entraînant des problèmes de dilution qui ne peuvent être que partiellement corrigés par le traitement normalisation de chacun des spectres. Cette méthode de traitement est cependant coûteuse en temps.

### 3.2.2) Étude en gamme de température

Une autre façon d'obtenir ces courbes de variation de l'intensité de fluorescence en fonction de la viscosité est de faire varier la température d'un même échantillon, la viscosité d'un solvant étant inversement proportionnelle à sa température. Cette méthode présente plusieurs avantages en commençant par la préparation d'un unique échantillon pour une série de mesures. Ainsi, la nécessité de normaliser les courbes pour palier le risque de variation de dilution entre échantillons d'une même série n'a plus lieu et le nombre de points de la courbe peut être simplement et significativement augmenté en ajoutant des paliers de température.



Les mesures ont donc été doublées pour l'axitinib **15** afin d'établir un point de comparaison entre les deux méthodes et estimer la pertinence de toutes les mesures déjà effectuées (**Figure 68**, **Tableau 10**). En excitant un échantillon d'axitinib dans l'éthylène glycol à  $\lambda_{exc} = 320$  nm, il a été possible d'enregistrer les spectres d'émission des deux isomères discutés précédemment. La première observation qui peut être faite est l'inversion des courbes 55°C et 60°C pour la bande de l'isomère *E* ( $\lambda_{em}^{max} = 400$  nm), responsable du décrochage du premier point de la corrélation linéaire (**Figure 68**). Ce minimum dans l'émission, ici à 55°C, est caractéristique des spectres des molécules possédant un état TICT. En effet, ce minimum correspond à la température au-dessus de laquelle la molécule atteint un équilibre thermodynamique dans le temps de vie de l'état excité entre les minimums de ce dernier (les états TICT et à partir duquel se fait la fluorescence).<sup>[52]</sup> Cette inversion n'est cependant pas observée aux températures enregistrées pour l'isomère *Z*, laissant supposer que la barrière énergétique entre ces deux états est plus grande dans ce cas-là.

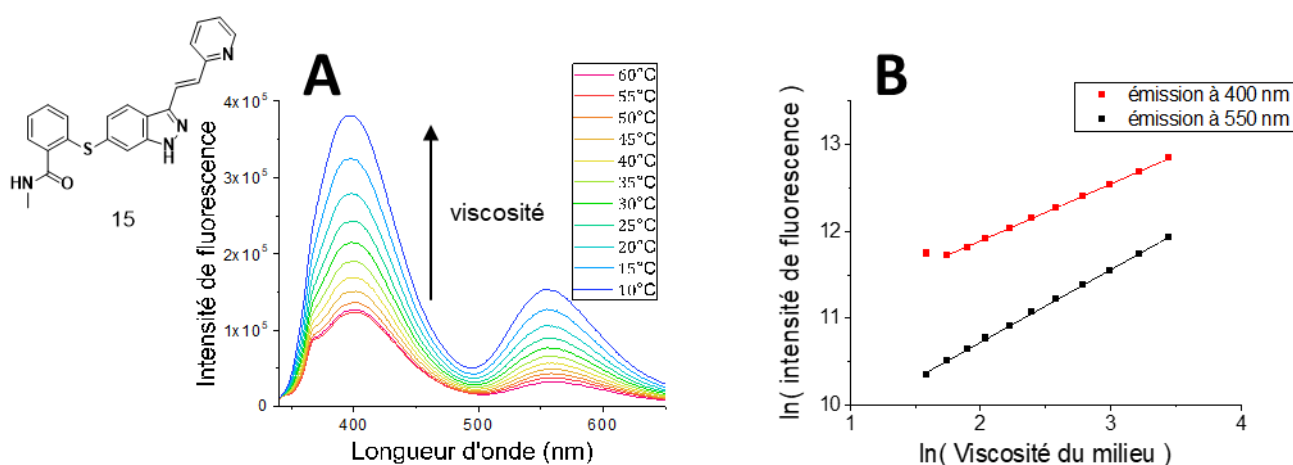


Figure 68 : A) Spectres d'émission de l'axitinib **15** dans l'éthylène glycol à différentes températures ( $\lambda_{exc} = 320$  nm) ; B) Corrélation linéaire entre l'intensité de fluorescence et la viscosité.

La seconde observation qu'il est possible de faire est que les isomères *E* et *Z* ne sont pas sensibles de la même manière à la viscosité, avec le coefficient  $\alpha$  le plus élevé enregistré dans la série pour l'isomère *Z* ( $\alpha_Z = 0,84$  versus  $\alpha_E = 0,65$  ; **Tableau 10**). Cette observation est cohérente avec l'hypothèse selon laquelle l'état excité des molécules capto-datives correspond à un état de charge séparée qui, dans le cas de l'axitinib *Z*, favorise à la fois le pouvoir donneur de l'indazole et accepteur de la pyridine par un échange de proton intramoléculaire, la planéité de la molécule étant donc d'autant plus nécessaire pour cet échange.

Tableau 10 : Coefficients directeurs des droites de corrélation fluorescence-viscosité de l'axitinib.

méthode	MeOH / EG / Glycérol	EG (température)	
$\lambda_{em}^{max}$ (nm)	400 nm	400 nm	550 nm
$\alpha$	0,40 <sup>a</sup>	0,65	0,84
$r^2$	0,98 <sup>a</sup>	0,999	0,999

<sup>a</sup> valeurs moyennées sur 4 points

À l'aide de cette nouvelle méthode, il a donc été possible de tracer la droite de corrélation entre l'intensité de fluorescence et la viscosité du milieu en 11 points (**Figure 68 B**) contre seulement 5 auparavant avec des coefficients de corrélation plus que satisfaisants ( $r^2 > 0,99$  ; **Tableau 10**). Dans le cas de l'axitinib, le coefficient  $\alpha$  calculé avec cette méthode diffère des premières mesures effectuées de façon non-négligeable ( $\alpha = 0,65$  contre  $\alpha = 0,40$  auparavant), me laissant penser que l'ensemble des coefficients  $\alpha$  mesurés sont sous-estimés. Pour tout un ensemble de raisons pratiques et la qualité des résultats obtenus, cette méthode de mesure de la variation de l'intensité de fluorescence par rapport à la viscosité du solvant en gamme de température sera appliquée à l'avenir.

## 4) Imagerie sur cellules vivantes & colocalisation

Ces travaux de phase 1 ont débouché sur une collaboration avec l'équipe du docteur Ludovic Galas (plateforme Primacen, Mont-St-Aignan), qui a réalisé les images pour dix de nos composés. Notre sélection s'est faite parmi les molécules disponibles au moment des expériences avec une bonne absorbance dans le visible et/ou une bonne sensibilité à la viscosité (**Figure 69**). Deux types de marquages spécifiques sont sortis de cette série et seront détaillés ci-dessous : les cinq composés chargés d'une part et les cinq composés neutres d'autre part.

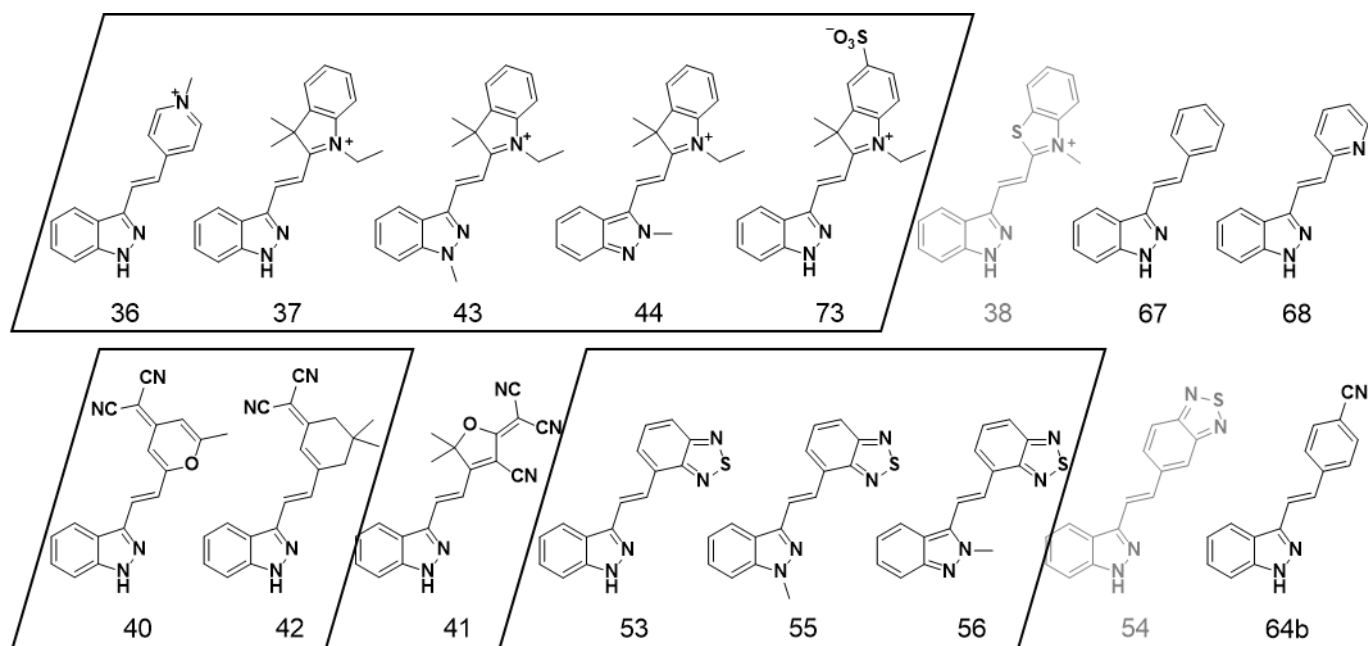


Figure 69 : Structures des dix composés sélectionnés pour l'imagerie cellulaire (encadrées) et celles des molécules synthétisées à la suite de ces expériences d'imagerie cellulaire (en gris).

### 4.1) Fluorophores avec accepteurs chargés

Ces molécules de phase 1 ne portant pas encore le groupement de sélectivité pour le VEGFr, ces premières expériences d'imagerie visaient principalement à tester la pénétration cellulaire de nos composés, leur stabilité en milieu de culture ainsi que leur toxicité. Pour ces expériences, des cellules non-différenciées issues de tumeurs surrénales de rat (lignée PC-12) ont été choisies. Les images préliminaires obtenues pour les composés chargés nous ont permis de mettre en évidence une forme de marquage cellulaire spécifique similaire pour les cinq composés (**Figure 70**).

Hormis dans le cas de la dernière molécule **73** où l'absence de marquage visible au mauvais rapport signal-sur-bruit est principalement due à un problème de solubilité de la sonde dans le milieu de culture, un marquage fréquent de forme relativement allongé hors du noyau se retrouve sur l'ensemble des images. Le meilleur contraste d'image a été obtenu pour les composés avec les donneurs 1*H*-indazole **37** et 1-méthylindazole **43** de l'accepteur indolinium. Cette similitude d'efficacité de marquage n'est pas surprenante étant donné les ressemblances de leurs propriétés spectroscopiques.

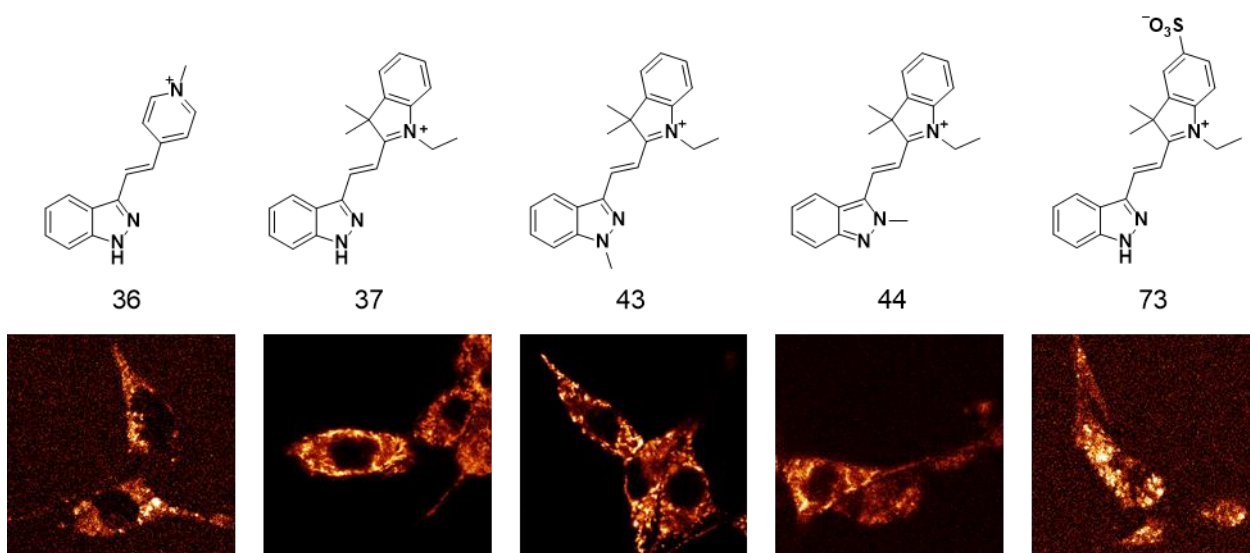


Figure 70 : Cellules imagées par fluorescence et agent de contraste correspondant.

La forme et la fréquence de ces marquages fluorescents est relativement caractéristique d'une reconnaissance des mitochondries. Cette observation est cohérente avec la littérature : les petites molécules organiques chargées positivement comme les accepteurs indolinium<sup>[143]</sup> et pyridinium<sup>[144]</sup> sont connues pour reconnaître spécifiquement le potentiel membranaire négatif de la mitochondrie. Des expériences de colocalisation entre les sondes à accepteur indolinium **37**, **43** ou **44** et une sonde commerciale spécifique des mitochondries (MitoTracker Green<sup>®</sup>) ont permis de valider notre hypothèse (**Figure 71**).

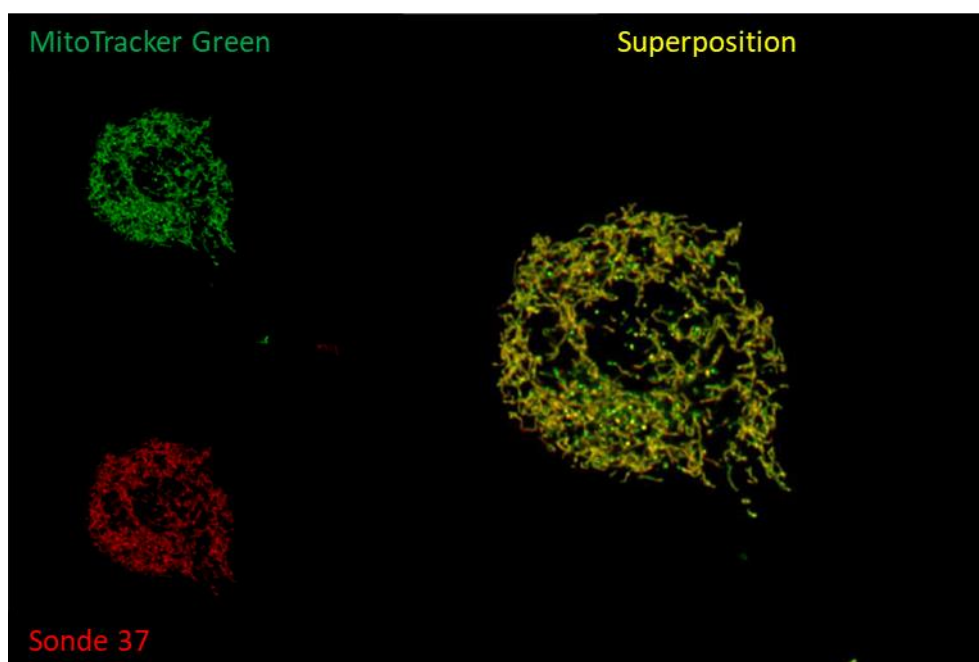


Figure 71 : Colocalisation entre la sonde **37** avec le MitoTracker Green<sup>®</sup>.

Étonnamment, les spectres d'excitation et d'émission des composés avec l'accepteur indolinium observés en cellules diffèrent des spectres en cuve en milieu aqueux (**Figure 72**, **Tableau 11**). L'ensemble des composés possèdent des longueurs d'ondes autour  $\lambda_{exc}^{max} = 540 \text{ nm}$  et un  $\lambda_{em}^{max} = 580 \text{ nm}$  en cellule ce qui, dans le cas de la molécule avec le

donneur 1*H*-indazole correspond à un décalage dans le rouge de 90 nm et 30 nm pour l'excitation et l'émission respectivement. Dans ce cas-là, les longueurs d'ondes fortement décalées dans le rouge avec des spectres au profil « cyanine » marqué auraient pu correspondre à une déprotonation du donneur en milieu cellulaire. De façon tout à fait inattendue, ce décalage des spectres vers le rouge se retrouve aussi avec les molécules méthylée en position N1 et N2, qui ne peuvent pas être déprotonée. L'existence d'une forte similitude entre les spectres du composé avec le donneur 1*H*-indazole et les donneurs méthylés écarte donc cette hypothèse de la déprotonation (**Figure 72, Tableau 11**).

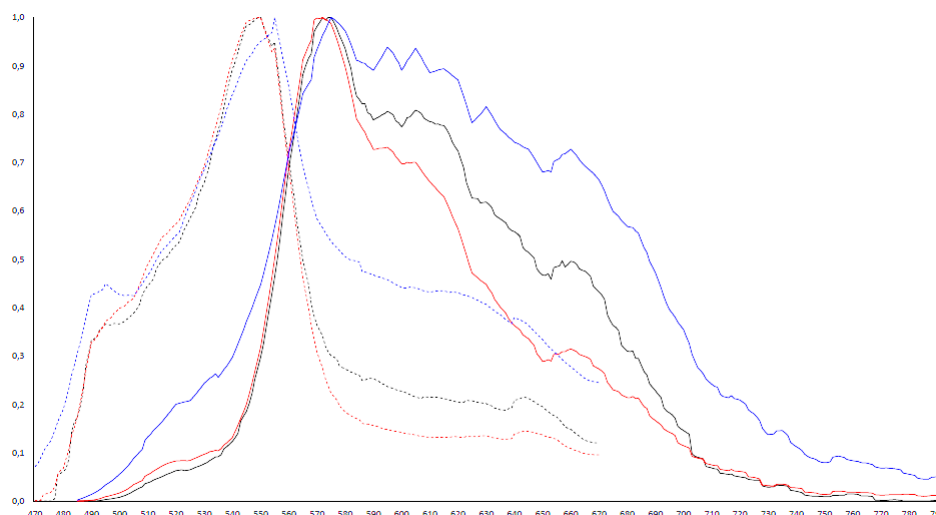


Figure 72 : Spectres normalisés d'émission (traits pleins) et d'excitation (traits pointillés) des composés à accepteurs indolinium **37** (1*H*, noir), **43** (N1, rouge) et **44** (N2, bleu) en cellule.

**Tableau 11 : Comparaison entre les spectres d'excitation et d'émission des composés en milieu aqueux (cuve) et en cellule.**

#	37 (1H)		43 (N1)		44 (N2)	
	Cuve	Cellule	Cuve	Cellule	Cuve	Cellule
<b>Excitation</b>	450	540	470	540	500	540
<b>Émission</b>	550	580	550	580	555	580

Ce phénomène de décalage des spectres de fluorescence des sondes à mitochondries a déjà été observé dans la littérature. Une des autres hypothèses invoquées pour expliquer ce phénomène est la formation d'agrégats *J* au sein de la mitochondrie.<sup>[145]</sup> Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'en présence de surfactant de nombreuses cyanines peuvent former des agrégats *J* dont résultent un décalage vers le rouge des spectres de ces fluorophores avec des bandes fines et un faible déplacement de Stokes.<sup>[146]</sup> Nos spectres ne sont cependant pas très fins et possèdent l'épaule caractéristique des bandes vibroniques qui n'est pas attendu pour les spectres de ce type d'agrégats (**Figure 72**). L'hypothèse de l'agrégation a donc été écartée.

Une autre hypothèse invoquée pour expliquer la modification des spectres de sondes à mitochondries est en effet la modification de leurs structures en milieu biologique. La présence

d'un groupement fortement électro attracteur en position vinylique favorise les potentielles additions nucléophiles en  $\alpha$  ou  $\gamma$  de ce groupement. Des sondes fluorescentes spécifiquement reposent d'ailleurs sur ce mécanisme, l'addition d'un nucléophile causant un décalage vers le bleu des spectres ainsi qu'une éventuelle diminution de l'intensité de fluorescence du fait de la perte de conjugaison de la sonde.<sup>[31]</sup> En milieu aqueux, le nucléophile impliqué pourrait être l'ion hydroxyde pour peu que le pH soit suffisamment basique cependant, en milieu micellaire ou organique, il a été montré qu'une telle attaque nucléophile peut avoir lieu sur les accepteurs indolinium même en milieu neutre.<sup>[147]</sup> Ces réactions conduisant principalement à des décalages hypochromes, inverses à nos observations, une seconde réaction serait alors nécessaire à la formation du produit « rouge » observé. Par ailleurs, nous considérons la possibilité que nos décalages soient dus à une réaction d'oxydation en présence d'oxygène singulet ou d'autres ROS générés par les mitochondries.<sup>[148]</sup>

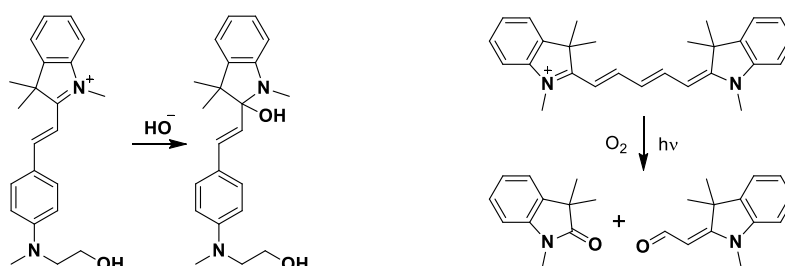
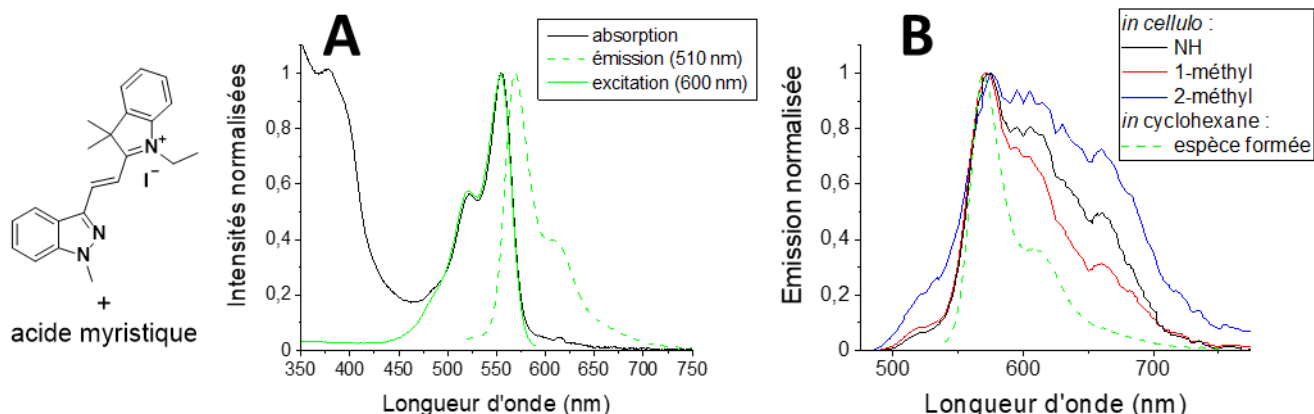


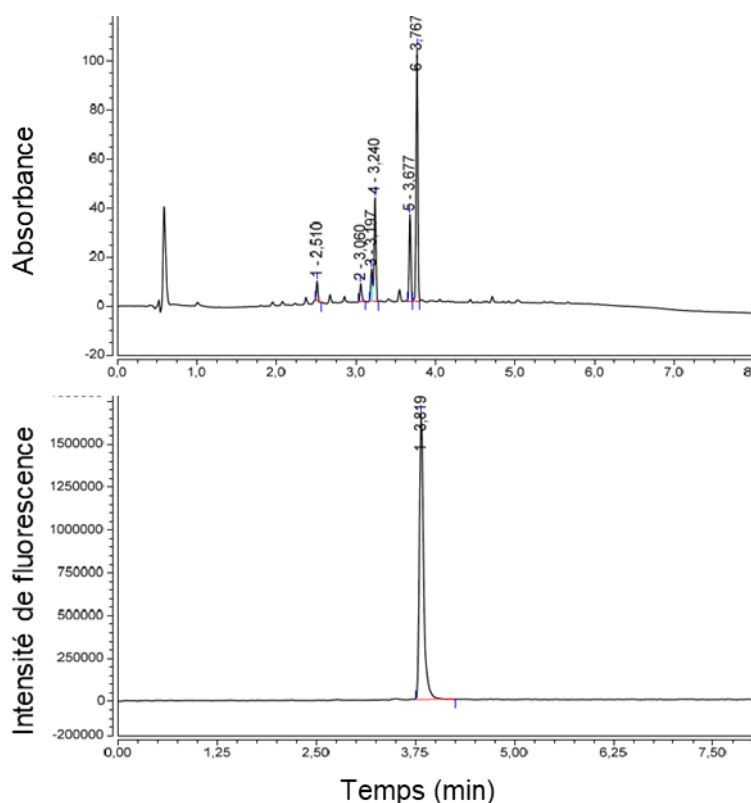
Schéma 45 : Dégradation d'une mérocyanine par attaque d'un ion hydroxyle (gauche)<sup>[147]</sup> et produit de photooxydation de la cyanine C7 (droite).<sup>[148]</sup>

Afin de prouver cette dernière hypothèse, la molécule à donneur 1-méthylindazole **43** a été solubilisée dans deux solutions aqueuses neutres de sel d'acide myristique (détergent à chaîne carbonée longue qui mime les membranes) : une maintenue sous atmosphère inerte et l'autre laissée à l'air libre. En moins de quelques minutes les deux solutions étaient entièrement décolorées puis une coloration rose est réapparue en plusieurs jours dans la solution laissée à l'air. Les spectres d'absorption et de fluorescence de cette espèce formée ont pu être enregistrés dans différents solvants incluant le cyclohexane dans lequel le composé parent est insoluble (**Figure 73 A**). De façon assez satisfaisante, les maxima et les formes des spectres de l'espèce rose formée correspondent aux spectres enregistrés en cellule (**Figure 73 B**).

La superposition de ses spectres d'absorption et d'excitation de l'espèce formée (traits pleins noir et vert, **Figure 73 A**) met cependant en évidence la formation d'un mélange dont l'ensemble des espèces absorbant ne contribuent pas à la fluorescence. Cette conclusion est cohérente avec les analyses UPLC réalisées par la suite.



Pour tenter d'identifier cette nouvelle espèce formée, ces mélanges ont été analysés de façon inédite sur une chaîne UPLC-UV-MS couplée à un fluorimètre (en parallèle du détecteur de masse). Ainsi, des mélanges complexes ont pu être séparés avec une bonne résolution et une espèce fluorescente aux longueurs d'onde d'intérêts a été mise en évidence (**Figure 74**).



L'interprétation des données de spectrométrie de masse correspondantes s'est avérée difficile, notamment dû à la complexité de l'échantillon, la proximité des pics des produits en UPLC et de la très faible concentration des échantillons. Malheureusement aucune conclusion fiable n'a pu être tirée à ce jour de ces expériences. La suite de ces études est toujours en cours.

## 4.2) Fluorophores avec accepteurs neutres

Les mêmes expériences d'imagerie de fluorescence sur cellules vivantes que précédemment ont été réalisées avec les cinq autres composés neutres (**Figure 75**). À l'exception de la molécule avec l'accepteur DCP **40**, ces composés neutres fournissent d'assez bons contrastes, avec les meilleurs résultats pour le fluorophore avec le donneur 2-méthylindazole et l'accepteur benzothiadiazole **56**. Tous ces marquages sont plus diffus dans le cytoplasme que ceux des fluorophores chargés cependant, une forme de marquage spécifique semble se retrouver avec des « taches » rondes de plus forte intensité visibles sur chaque image (**Figure 75**).

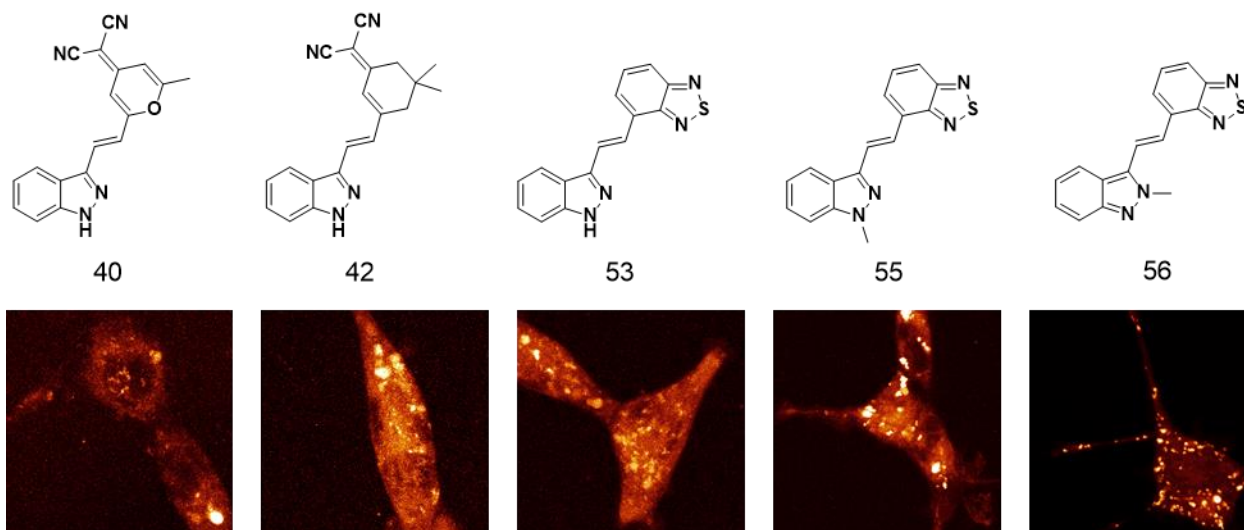


Figure 75 : Cellules imagées par fluorescence et agent de contraste correspondant.

Deux hypothèses concernant l'observation de ces « taches » ont alors été formulées. La première est qu'elles sont dues à la formation d'agrégats dans les cellules à cause du caractère relativement hydrophobes de ces structures neutres. Les images étant cependant réalisées sans lavage du milieu de culture après incubation les agrégats devraient également fluorescer hors des cellules, cette possibilité d'agrégation a donc été mise de côté au profit d'une hypothèse de marquage spécifique.

Cette seconde hypothèse est étayée par la littérature, en effet, il est possible de trouver des exemples de sondes spécifiques des poches lipidiques parmi les rares sondes fluorescentes contenant le motif benzothiadiazole.<sup>[149]</sup> De plus, ce comportement est cohérent avec les propriétés spectroscopiques de ces molécules (notamment les trois avec l'accepteur benzothiadiazole **53**, **55** et **56**), sujettes à un fort solvatochromisme et une augmentation d'intensité de fluorescence en milieu apolaire par rapport aux solvants polaires. Cependant, contrairement aux fluorophores chargés, il n'a pas été possible de réaliser des expériences de colocalisation pour les composés neutres car les spectres des sondes spécifiques commerciales recouvrent tout ou partie de ceux de nos composés.

Malgré cela, ces images aux contrastes satisfaisants sont encourageantes pour la suite du projet, permettant de valider la possibilité d'imager les cellules par fluorescence avec des sondes neutres. De plus, ces structures de fluorophores à donneurs indazoles ou à accepteurs benzothiadiazoles sont relativement inédites dans la littérature.



## 5) Conclusions et perspectives

L'objectif de cette première partie de ma thèse était la synthèse puis l'étude photophysique des systèmes D- $\pi$ -A avec un indazole comme groupement électrodonneur (D), ces derniers étant trop peu renseignés dans la littérature.

Ces synthèses passent par un intermédiaire commun 1*H*-indazole-3-carboxaldéhyde dont la synthèse en une étape à partir de l'indole a été optimisée au laboratoire. Divers groupement électroaccepteurs plutôt bien renseignés dans la littérature ont été réagis sur l'aldéhyde par condensation de Knoevenagel, réaction de Wittig ou encore de Heck. Ainsi, seize fluorophores inédits ont ainsi été obtenus en deux à quatre étapes rapides et convergentes, avec des rendements globaux variables entre 8% et 90% (**Figure 76**).

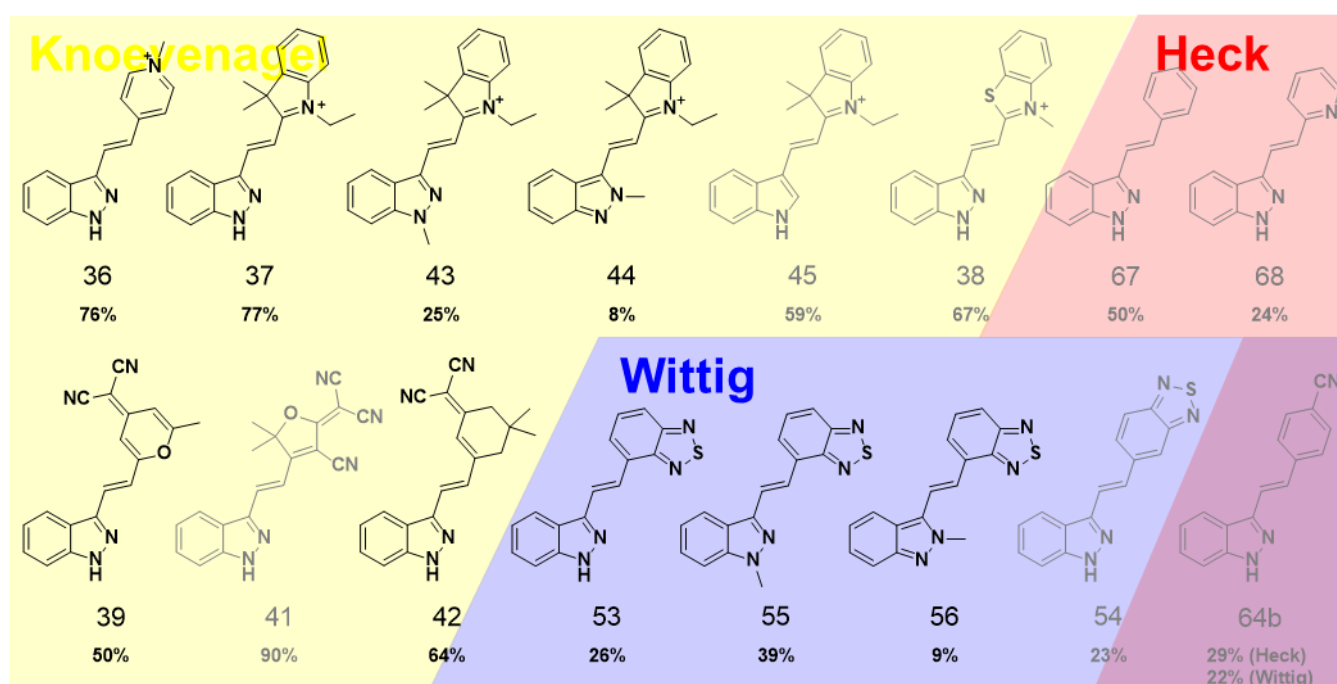


Figure 76 : Structures et rendements globaux de l'ensemble des sondes de la phase 1 de synthèse et molécules imagées en cellule vivantes (en noir).

Les études spectroscopiques dans divers solvants avaient ensuite pour intérêt d'évaluer le caractère électrodonneur du noyau indazole en le conjuguant avec différents groupements électroattracteurs qui sont à l'inverse bien connus. Le résultat le plus significatif est que l'indazole est un donneur d'électrons faible dont le proton labile peut être déprotoné en milieu basique, améliorant significativement sa force en tant que groupement électrodonneur. Ce comportement rapproche l'indazole des phénols, avec des  $pK_a$  nettement plus élevés ( $pK_a \approx 9$ ) pour des indazoles fonctionnalisés par des groupements attracteurs. L'existence de ce proton labile permet également à la formation de deux tautomères indazoles avec des comportements spectroscopiques distincts ainsi qu'à des liaisons hydrogènes pouvant influencer les spectres d'absorption et d'émission de ces composés dans certains cas. Du fait de ces particularités, le noyau indazole est intéressant pour le développement de sondes, de légères variations de son environnement étant capable de modifier significativement ses propriétés spectroscopiques.

Nos fluorophores étant construits sur un motif de type stilbène impliqué dans un transfert de charge qui se retrouve dans les sondes conformationnelles pro-fluorescentes, l'évolution de leur fluorescence en fonction de la viscosité du milieu a également été démontré. L'ensemble de ces analyses ont mis en exergue les comportements variés de ces fluorophores envers la polarité et la viscosité des solvants ainsi qu'un potentiel phénomène de *photo-switching* pour les composés à accepteur TCF **41**, pyridinium **36**, indolinium **37** et benzothiazolium **38**.

Enfin, dix composés originaux ont pu être testés en imagerie de fluorescence sur cellules vivantes (**Figure 76**). Les cinq composés chargés ont pu clairement être identifiés comme des sondes spécifiques de la mitochondrie grâce à des expériences de colocalisation, avec de meilleurs résultats d'imagerie pour les composés **37** et **43** avec l'accepteur indolinium et les donneurs 1*H*- et 1-méthylindazoles respectivement. Tout comme en solution, les cinq composés neutres se comportent différemment des chargés en cellule, avec un potentiel marquage spécifique des poches lipidiques qui ne peut pas être prouvé par colocalisation dû à l'absence de sonde commerciale aux longueurs d'ondes appropriées. Des images avec un contraste satisfaisant ont cependant été observées pour le fluorophore **56** avec le donneur 2-méthylindazole et l'accepteur benzothiadiazole, un fluorophore au donneur et à l'accepteur inédits dans la littérature des sondes à applications biologiques. Pour ces raisons, les accepteurs benzothiadiazoles ont été retenus pour les synthèses avenir.

Une des applications visées par ce projet sur long terme et, encore peu discutée, est d'utiliser ces sondes en photothérapie dynamique. La photothérapie dynamique consiste à sensibiliser l'oxygène (en oxygène singulet réactif) par transfert d'énergie de l'état triplet d'une sonde irradiée à l'oxygène. La conversion d'un état excité singulet d'une sonde ( $S_1$ ) à son état excité triplet ( $T_1$ ) est lente car elle est interdite par les règles de couplage orbitalaire. Elle peut cependant être facilitée par la présence d'un ou plusieurs atomes lourds dans la molécule. Des benzosélénodiazoles pouvant être synthétisés de façon analogue aux benzothiadiazoles, ces derniers s'étant révélés d'autant plus intéressants pour la suite du projet.

Pour appuyer notre sélection finale des accepteurs électroniques retenus pour la fin de ma thèse, des études de *docking* moléculaire ont été réalisées en collaboration avec le professeur Pascal Bonnet (laboratoire ICOA, Université d'Orléans). Ces modélisations des interactions entre les sondes finales et le VEGFr ont permis de vérifier l'orientation des groupements électroaccepteurs et de s'assurer que leur encombrement stérique ne vienne pas perturber leur fixation sur le récepteur. Ainsi, les groupements accepteurs d'électrons de type hétérocycles et non-substitués en position *ortho* ont obtenus les meilleurs scores de *docking* (**Schéma 46**).

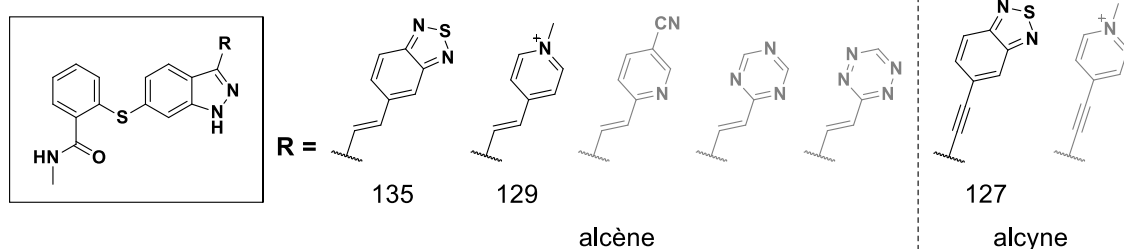


Schéma 46 : Structures des sondes estimées pertinentes par modélisation moléculaire.

Ces études de modélisation moléculaire ont également permis de mettre en lumière l'orientation favorable des composés dont les groupements électroattracteurs benzothiadiazoles sont reliés au donneur indazole par un alcynes (et non plus un alcène, **Figure 77**). L'utilisation d'une liaison alcène dans nos molécules avait pour objectif initial d'en faire des sondes conformationnelles pro-fluorescentes. Cet objectif n'étant pas atteint pour les benzothiadiazole (sensibles à la polarité et non la viscosité des solvants), le remplacement de cette liaison alcène par un alcyne a également été pris à considération pour la suite.

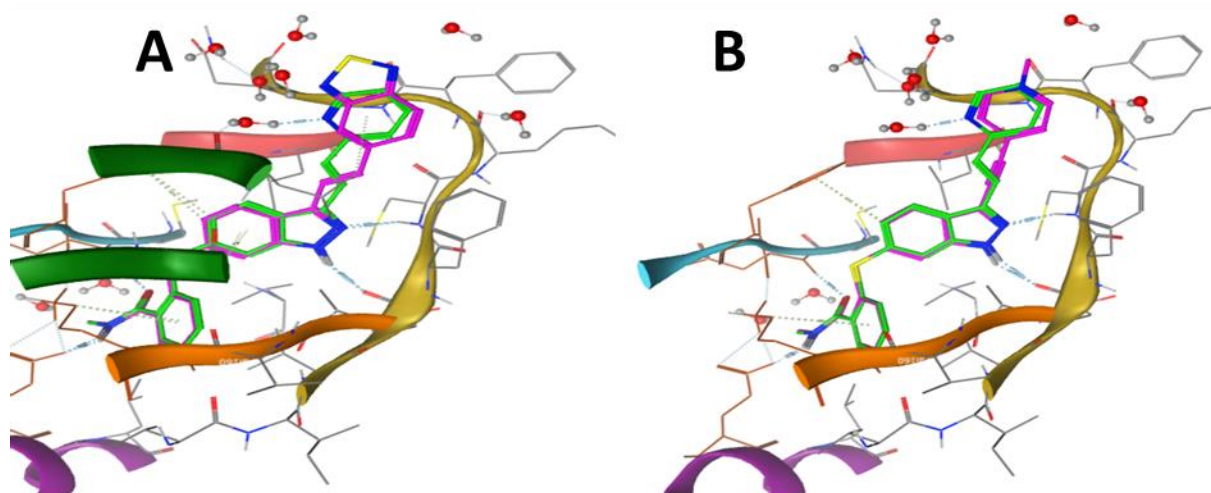


Figure 77 : Modélisation des interactions moléculaires entre le VEGFr-2 (KDR, PDB : 4AG8), l'axitinib 15 (vert) et les composés (violet) : A) avec liaison alcène 135, B) avec liaison alcyne et accepteur pyridinium.





## Chapitre 3

### Synthèses de ligands photo-actifs sélectifs du

### VEGFr et études photophysiques

Les résultats préliminaires obtenus lors des études photophysiques sur l'axitinib **15** nous ont démontré qu'il était envisageable de construire une sonde pro-fluorescente pour l'imagerie des VEGFr à partir de son squelette à condition d'augmenter les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission de la sonde finale pour la distinguer de la fluorescence intrinsèque des protéines. Pour ce faire, il a été envisagé de jouer sur la force du groupement accepteur d'électrons (A).

Afin de tester cette hypothèse et déterminer les accepteurs pertinents pour le projet, une première série de molécules pro-fluorescentes a été synthétisée avec un large panel de groupements électroattracteurs. Un certain nombre de ces accepteurs se sont révélés sensibles à la polarité des solvants et/ou à leur viscosité, faisant bel et bien du motif indazole- $\pi$ -A, où  $\pi$  est un système insaturé et A groupement électroaccepteur, un pro-fluorophore.

Cette phase 2 de synthèse de ma thèse s'est principalement axée sur l'obtention d'un intermédiaire commun avancé (**Figure 78**), décoré par un groupement responsable de l'affinité pour le VEGFr et substitué par un aldéhyde en position C3 afin d'y greffer les accepteurs de fluorescence. Appuyés par des études de modélisation protéine-ligand, ces derniers ont été choisis pour leur orientation, leur planéité et leurs accepteurs de liaisons hydrogène (**Figure 78**).

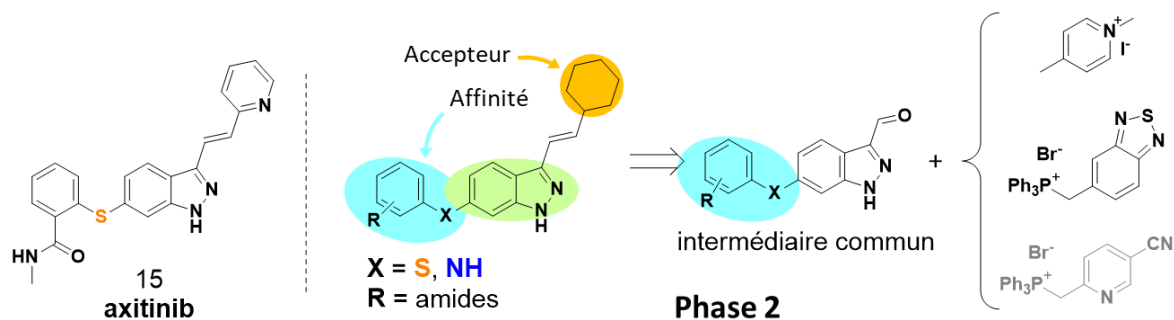


Figure 78 : Structures des molécules cibles, des intermédiaires avancées et exemples d'accepteurs clés de la phase 2 de synthèse.

## 1) Défis synthétiques des sondes sélectives par couplage de Buchwald-Hartwig

Comme précédemment, il est attendu que la substitution du noyau indazole en position C6 par un groupement électrodonneur influence de façon positive la fluorescence de nos composés. Cependant, dans le cas de l'axitinib **15**, ce groupement est un thioéther aromatique, or, les donneurs soufrés ne sont pas particulièrement riches en électrons. Pour cette raison, nous avons envisagé de remplacer l'atome de soufre par un atome d'azote qui est un meilleur donneur d'électrons et devrait contribuer d'autant plus à la fluorescence de la molécule finale.

Cette modification a été inspirée par un brevet publié par Pfizer (compagnie titulaire de l'autorisation de mise sur le marché de l'axitinib).<sup>[150]</sup> L'approche retenue par le brevet visant à diversifier les ligands responsables de l'affinité de ces composés azotés, la synthèse passe par un couplage de Buchwald-Hartwig palladocatalysé après ajout du groupement accepteur (**Figure 79**). L'approche de notre projet étant tournée vers la diversité des groupements accepteurs, la synthèse a été envisagée différemment, de sorte à obtenir un intermédiaire commun substitué par un aldéhyde en position C3 (**Figure 79**).

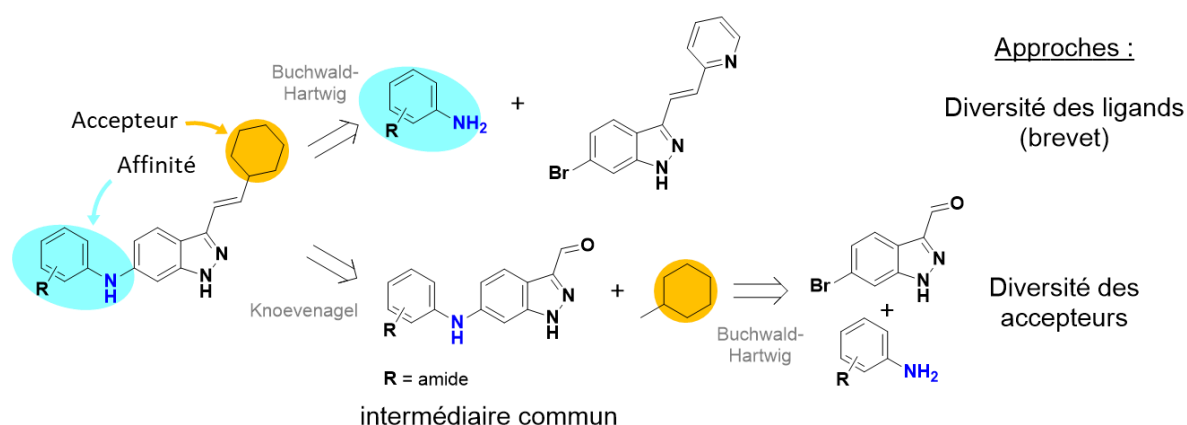


Figure 79 : Rétrosynthèse décrite dans le brevet versus celle envisagée pour ce projet.

Quelques-unes des subtilités concernant le couplage de Buchwald-Hartwig sur des dérivés azotés seront d'abord brièvement discutées puis les synthèses mises au point au laboratoire permettant d'accéder à un premier indazole modèle seront présentées. Enfin, la diversification des substrats et les synthèses alternatives seront abordées.

### 1.1) Réaction de Buchwald-Hartwig sur les indoles et les indazoles : bibliographie & expérience acquise

Le couplage de Buchwald-Hartwig est une des réactions les plus récurrentes en chimie médicinale de nos jours, au même titre que les couplages de Sonogashira ou de Suzuki.<sup>[151]</sup> À la différence de ces derniers, le couplage de Buchwald-Hartwig conduit à la formation d'une liaison carbone(sp<sup>2</sup>)-hétéroatome, où l'hétéroatome est un atome d'azote. Cette réaction d'amination entre un halogénure d'aryle et une amine (primaire ou secondaire, aromatique comme aliphatique) ne pouvant se faire spontanément par substitution nucléophile, elle doit

être catalysée. Cette catalyse est assurée par un complexe métallique, palladium 0/ligand (souvent une phosphine),<sup>[152]</sup> ou éventuellement nickel.<sup>[153]</sup>

Les exemples de la littérature concernant les couplages de Buchwald-Hartwig en présence d'hétérocycles indazoles sont minoritaires. Afin d'élargir notre compréhension de la réaction, nous nous sommes donc intéressés aux conditions réactionnelles en présence d'indoles dont la structure est relativement analogue à celle des indazoles.

### 1.1.1) Contrôler la régiosélectivité de la réaction sur les indoles

Les indoles sont parmi les hétérocycles les plus récurrents de la littérature pour ces couplages de Buchwald-Hartwig, car ils sont courants en chimie médicinale et peuvent intervenir soit comme source d'amine soit en tant qu'halogénure d'aryle. En absence de groupement protecteur, substituer l'indole à une autre position que l'azote N1 représente un réel défi synthétique car l'atome d'azote peut entrer en compétition dans la réaction et donc s'autocondenser. Il existe d'ailleurs de nombreux protocoles permettant de substituer l'azote des indoles par un groupement aryle avec de bons rendements<sup>[154-156]</sup> mais peu d'exemples de la littérature décrivent des substitutions autres.<sup>[157-159]</sup>

La *N*-arylation des indoles par catalyse au palladium telle que représentée ci-dessous apparaît comme une réaction relativement flexible avec des conditions réactionnelles variables selon les publications, dont deux trio catalyseur/ligand/base sont présentés ci-dessus (**Schéma 49**).<sup>[152,154-156]</sup> Généralement, une source de palladium II et un ligand phosphine,<sup>[152]</sup> ou un des pré-catalyseurs de Buchwald disponibles commercialement, et une base (organique comme inorganique) sont nécessaires pour former l'espèce catalytique. Les rendements reportés pour ces réactions sont généralement très bons, avec quelques chutes observées pour des espèces encombrées qui peuvent nécessiter des températures de réaction supérieures (non-représenté).

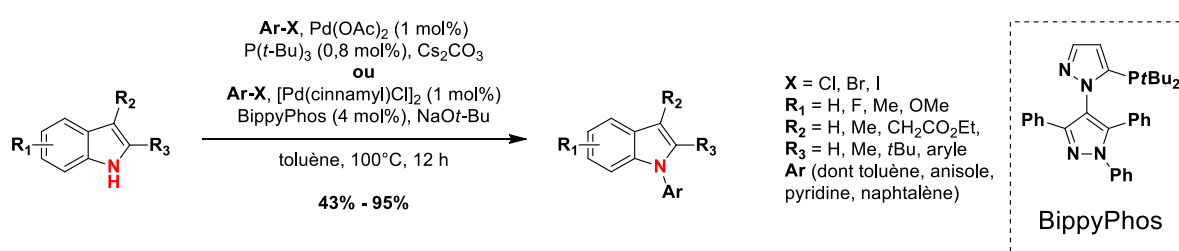


Schéma 47 : Exemples de conditions réactionnelles pour la *N*-arylation des indoles.<sup>[154,156]</sup>

Dans le cas où un halogénoindole est mis en réaction avec une amine, il est nécessaire de contrôler la sélectivité de la réaction car l'azote de l'indole peut entrer en compétition avec l'amine et s'autocondenser, voire polymériser. L'option la plus évidente est de substituer au préalable l'azote de l'indole ou de le protéger. Il existe d'ailleurs de nombreux exemples de groupements protecteurs dans la littérature, notamment en chimie médicinale (Boc, TIPS, THP, etc.). Ceux présentés ci-dessous sont extraits d'une étude mécanistique de la réaction de Buchwald-Hartwig entre deux hétérocycles, employant un des pré-catalyseurs commerciaux de



Buchwald de quatrième génération (où le catalyseur est activé à température ambiante, **Schéma 48**).<sup>[157]</sup>

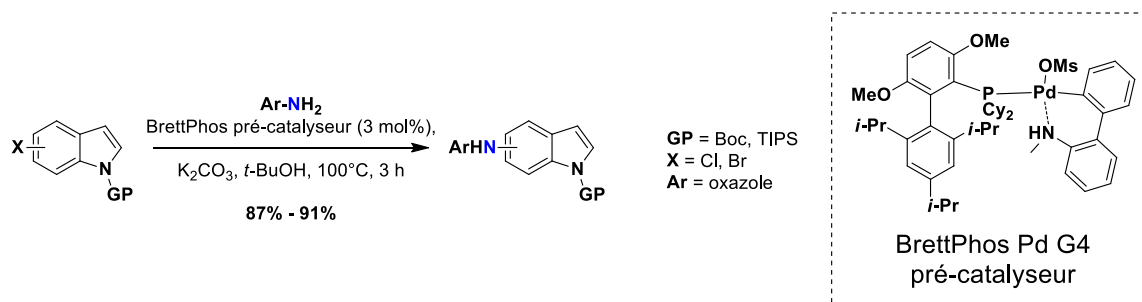


Schéma 48 : Exemples de conditions réactionnelles pour l'amination des indoles protégés.<sup>[157]</sup>

Une autre option est de mettre au point des conditions réactionnelles défavorisant le couplage sur l'azote de l'indole. Cette option bien que favorable d'un point de vue d'économie d'atomes et d'étapes de synthèse n'est cependant pas évidente. Pour rappel, les conditions de couplage sur l'azote des indoles sont très variées et celles présentées ci-dessus sont loin d'être exhaustives. De fait, il n'existe que deux exemples dans la littérature permettant d'effectuer l'amination d'indoles déprotégés par couplage de Buchwald-Hartwig (**Schéma 49**).

Le premier exemple publié par l'équipe de Buchwald lui-même emploie une base forte peu nucléophile (LiHMDS) dans le THF à seulement 65°C avec de bons rendements (> 80%), hormis pour les amines secondaires acycliques avec lesquelles la base entre en compétition du fait des similarités structurales (51%, **Schéma 49 haut**).<sup>[158]</sup> Le second exemple s'intéresse à la modification tardive de tryptophanes halogénés par activation microonde, en présence d'un pré-catalyseur de Buchwald de première génération, de base (KOH) et d'anilines, dans un mélange de solvants aqueux/organique. Des rendements corrects sont observés dans ces conditions pour des anilines simples et relativement peu encombrées (**Schéma 49 bas**).<sup>[159]</sup>

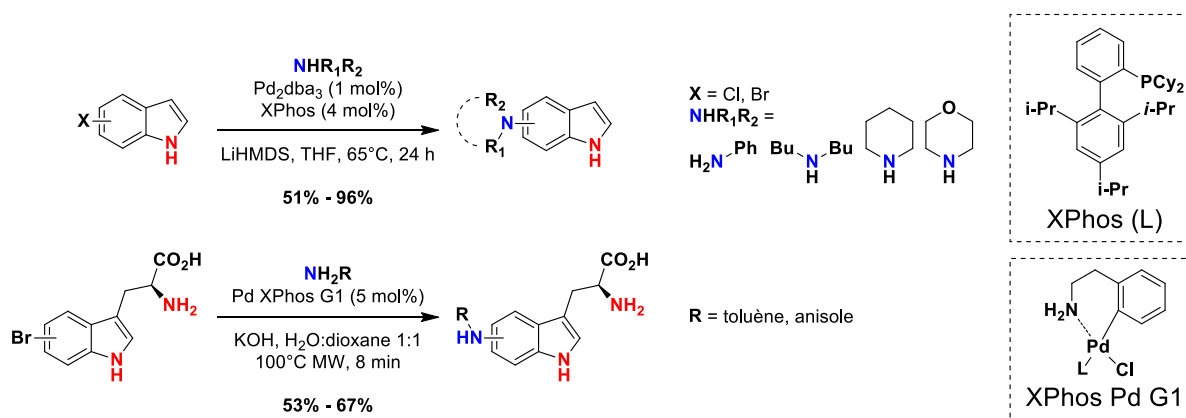


Schéma 49 : Conditions réactionnelles pour l'amination sélective des indoles libres.<sup>[158,159]</sup>

Il est intéressant de noter que dans ces deux exemples, les rendements réactionnels chutent, parfois même jusqu'à ne plus du tout observer le produit désiré, lorsque l'amine de départ est trop encombrée et/ou désactivée par des groupements électroattracteurs.<sup>[159]</sup> Dans ces cas-là, les sous-produits de ces réactions sont peu discutés mais il est probable que le couplage ait lieu avec un autre azote du produit de départ, devenu compétitif d'un point de vue cinétique.

### 1.1.2) Contrôler la régiosélectivité de la réaction sur les indazoles

Les hétérocycles indazoles, comme les indoles, comportent des atomes d'azotes capables de réagir lors d'un couplage catalysé aux métaux de transition, la présence de deux atomes d'azote induisant un problème supplémentaire de régiosélectivité.<sup>[160]</sup> De plus, le risque d'empoisonnement des catalyseurs discuté lors des synthèses de Heck (cf. **Chapitre 2** 2.4.2 p. 96) se retrouve également pour ce couplage. Les seuls rares exemples de la littérature sur les réactions de Buchwald-Hartwig utilisant des indazoles en tant qu'halogénure d'aryles se font d'ailleurs sur des indazoles protégés.<sup>[137,150]</sup>

Slade *et al.* ont étudié l'influence du groupement protecteur et de sa position (N1 *versus* N2) sur l'amination des 5-bromoindazoles par couplage de Buchwald-Hartwig. Deux réactions sont donc étudiées dans l'article : la protection sélective des indazoles puis l'amination. Leurs conditions réactionnelles pour le couplage de Buchwald-Hartwig sont similaires à celles présentées ci-dessus, seule la température de chauffage est inférieure (55°C dans le THF, **Schéma 50**) permettant de travailler éventuellement avec des groupements instables à hautes températures. Ainsi, ils ont démontré que la position du groupement protecteur influençait peu les rendements de leurs couplages. Ces rendements sont globalement bons avec, comme dans le cas de l'indole, des chutes observées pour les amines secondaires plus encombrées (comme la diéthylamine dans ce cas-là, **Schéma 50**).

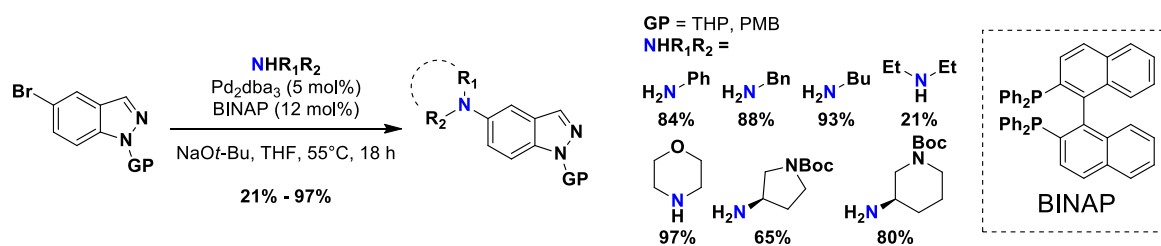


Schéma 50 : Conditions réactionnelles pour l'amination des indazoles protégés.<sup>[137]</sup>

Les leçons qu'il est possible de tirer de ces exemples de couplage de Buchwald-Hartwig sur des hétérocycles azotés sont : (i) la *quasi*-nécessité du groupement protecteur sur les atomes d'azote, hormis dans quelques rares exemples avec des indoles, (ii) les partenaires de réaction limités, ces derniers ne pouvant être encombrés ou trop désactivés, et (iii) de meilleurs rendements sont généralement observés pour les réactions avec des amines aliphatiques.

## 1.2) Résultats de synthèse

Afin de pouvoir synthétiser des fluorophores avec des groupements accepteurs variés, la rétrosynthèse de nos molécules a été envisagée différemment de celle de l'axitinib **15** ou de ses dérivés azotés (**Figure 79**). Celle-ci passe notamment par la synthèse d'un intermédiaire commun avancé : un indazole substitué par un groupement électrodonneur en position C6 et par un aldéhyde en position C3, permettant ainsi d'y greffer les accepteurs dans les mêmes conditions que celles développées en phase 1 de ma thèse.

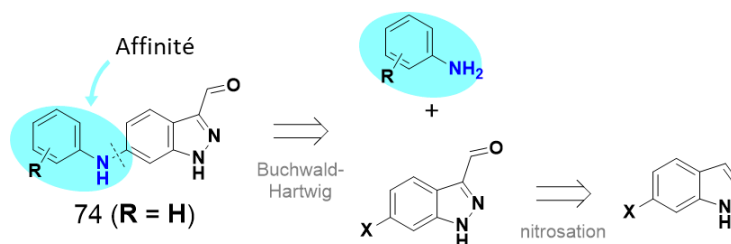
Une première voie de synthèse de l'intermédiaire azoté **74** a été explorée peu avant mon arrivée au laboratoire (**Figure 80**). Je présenterai ici mon optimisation rapide de cette synthèse

en 5 étapes puis la seconde synthèse que j'ai mise au point avec l'intention de nous affranchir du cycle de protection/déprotection. Ces optimisations ayant été réalisées en présence d'une amine modèle, les résultats de couplage sur des substrats plus complexes seront ensuite discutés. Enfin, cette discussion s'étendra aux synthèses alternatives explorées afin de contourner les limites rencontrées.

### 1.2.1) Optimisation de deux voies de synthèse

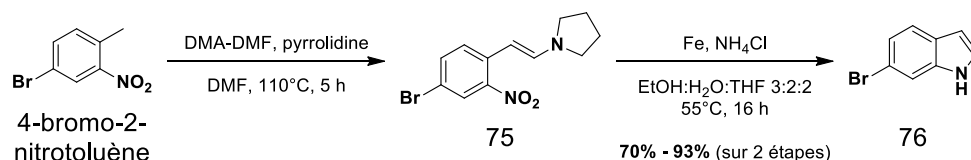
#### 1.2.1.1) Couplage de Buchwald-Hartwig tardif

La première voie de rétrosynthèse envisagée puis explorée pour l'intermédiaire commun **74** est présentée ci-dessous (**Figure 80**). Un couplage de Buchwald-Hartwig tardif est envisagé entre un 6-halogénoindazole-3-carboxaldéhyde et une aniline (substituée ou non), cet indazole pouvant être synthétisé à partir du 6-halogénoindole par la réaction de nitrosation optimisée au laboratoire. L'avantage de ce couplage tardif est qu'il est facilement envisageable de diversifier les groupements d'affinité par suite. Des travaux antérieurs à mon arrivée au laboratoire ont permis de valider cette voie de synthèse qu'il était cependant nécessaire d'optimiser.



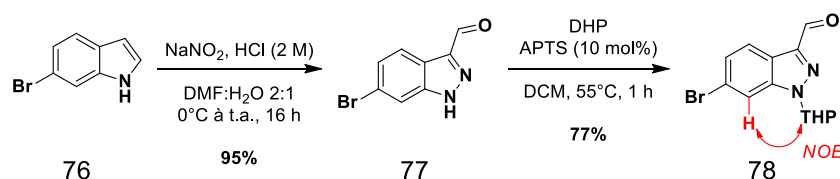
La première étape de cette synthèse est celle du 6-bromoindole **76** à partir du 4-bromo-2-nitrotoluène par la réaction de Leimgruber-Batcho.<sup>[161]</sup> Cette réaction en deux temps permet d'obtenir rapidement le 6-bromoindole qui est beaucoup plus cher que son précurseur (30 € / mmol *versus* 1,3 € / mmol).

L'énamine **75** est d'abord formée en présence de *N,N*-diméthylformamide diméthylacétal (DMF-DMA) et de pyrrolidine dans le DMF à 110°C puis la formation du cycle indole est promue par la réduction du groupement nitro (**Schéma 51**). Cette réduction est décrite dans la littérature avec un rendement final de 31% pour le 6-bromoindole lorsque la réduction se fait au nickel de Raney en présence d'hydrazine.<sup>[161]</sup> Pour des raisons de sécurité, le nickel de Raney étant particulièrement pyrophorique, la réduction a été d'abord réalisée en 4 h au zinc dans l'acide acétique au reflux avec des rendements autour de 30%. Afin de simplifier la purification, une réduction au fer et au chlorure d'ammonium dans un mélange de solvants ternaire à 65°C a été finalement choisie. J'ai pu optimiser les temps des deux étapes de cette réaction de Leimgruber-Batcho (passant de 2 h à 5 h pour la formation de l'imine et de 4 h à 16 h pour la réduction) ainsi que la température de la réduction (55°C) et le traitement du produit, améliorant les rendements jusqu'à 93% (**Schéma 51**).

Schéma 51 : Synthèse optimisée du 6-bromoindole **76** par couplage de Leimgruber-Batcho.

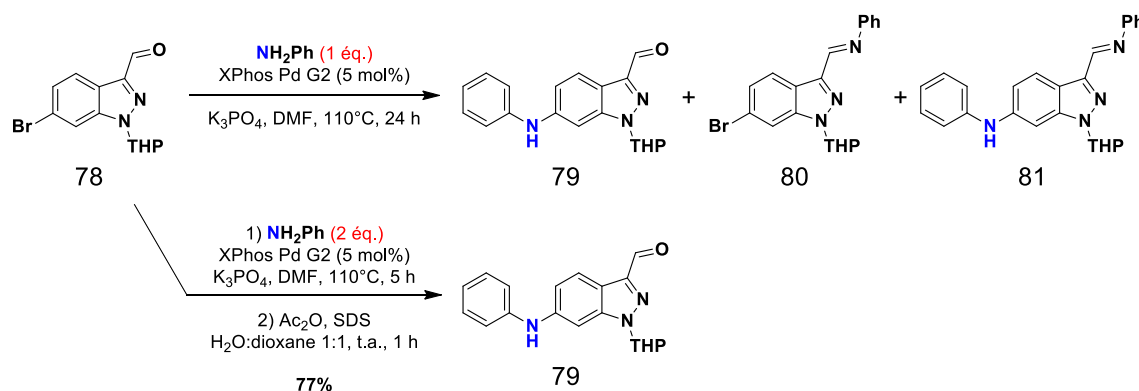
La seconde étape de cette synthèse est la nitrosation optimisée au laboratoire, permettant d'obtenir le 6-bromo-1*H*-indazole-3-carboxaldéhyde **77** à partir du 6-bromoindole **76** avec d'excellent rendement (95%, **Schéma 52**).<sup>[120]</sup>

Comme discuté dans la littérature, une étape de protection de l'indazole est ensuite nécessaire avant d'envisager un couplage de Buchwald-Hartwig sur le 6-bromoindazole-3-carboxaldéhyde.<sup>[137]</sup> Une fois encore le groupement THP a été retenu pour sa stabilité en milieu basique et nucléophile. La protection a d'abord été tentée par catalyse au pyridinium *para*-toluènesulfonate avec des résultats variables entre 20% et 70% de rendement. En changeant pour une catalyse à l'acide *para*-toluènesulfonique au reflux du DCM, l'indazole **78** protégé en N1 peut être isolé à 77% (**Schéma 52**). Sa structure a été confirmée par RMN 2D (NOESY, corrélations dans l'espace entre les protons du THP et le proton H<sub>7</sub>).

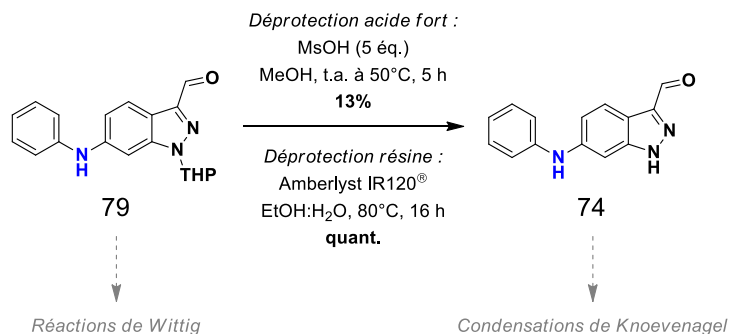
Schéma 52 : Synthèse du 6-bromoindazole-3-carboxaldéhyde protégé **78**.

La réaction de Buchwald-Hartwig a ensuite été étudiée. L'indazole protégé **78** a été mis en présence d'un équivalent aniline, d'un pré-catalyseur de Buchwald (XPhos Pd G2) et d'une base (K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) dans le DMF à 110°C (**Schéma 53 haut**). Après 24 heures dans ces conditions, des traces d'indazole de départ sont toujours observables bien que l'aniline soit consommée. Les produits n'étant pas séparables par colonne, les analyses se sont faites sur bruts réactionnels, rendant les interprétations <sup>1</sup>H RMN délicates à cause du nombre de protons aromatiques. Ces analyses en <sup>1</sup>H RMN et en spectroscopie de masse ont malgré tout permis de confirmer la formation des imines **80** et **81**, résultants soit d'une condensation sur le produit de départ, soit sur le produit de couplage attendu (**Schéma 53**).

La présence d'un aldéhyde sur le produit de départ rendant cette réaction secondaire difficilement évitable, le couplage de Buchwald-Hartwig a été réalisé avec deux équivalents d'aniline puis l'imine du produit de couplage **81** a été consécutivement déprotégée (**Schéma 53 bas**). Cette imine s'est avérée relativement stable, n'étant complètement déprotégée qu'en présence d'anhydride acétique et d'un surfactant (SDS) dans un mélange d'eau et de dioxane.<sup>[162]</sup> Ainsi, l'indazole **74** fonctionnalisé en position 6 par une aniline et en position 3 par un aldéhyde a pu être obtenu de façon très satisfaisante avec 77% de rendement par couplage de Buchwald-Hartwig, en réalisant une protection *in situ* de la fonction aldéhyde.

Schéma 53 : Synthèse de l'intermédiaire commun **79** par couplage de Buchwald-Hartwig tardif.

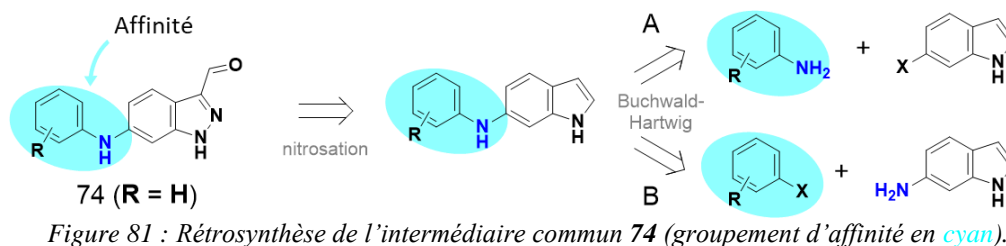
Le produit *N*-protégé **79** (THP) peut ainsi être engagé directement dans les réactions de Wittig avec des accepteurs neutres hétéroaromatiques comme les benzothiadiazoles, ou déprotégé en milieu acide afin d'obtenir l'intermédiaire commun **74** nécessaire aux condensations de Knoevenagel (Schéma 54). La déprotection subséquente était initialement faite en présence d'un acide fort (acide méthanesulfonique) mais conduisait à une destruction partielle du produit **79**, pour des rendements finaux d'environ 10% – 20%.<sup>[163]</sup> J'ai donc cherché à adoucir ces conditions en utilisant le protocole présenté lors de la synthèse des fluorophores avec donneur indazole « simple » : une réaction à la résine acide Amberlyst IR120<sup>®</sup> dans un mélange EtOH:H<sub>2</sub>O (98:2) (Schéma 54). À noter que l'eau est une composante essentielle de ce mélange réactionnel, permettant de contrôler l'ouverture des ports de la résine.<sup>[133]</sup>

Schéma 54 : Synthèses à partir des intermédiaires **79** et **74**.

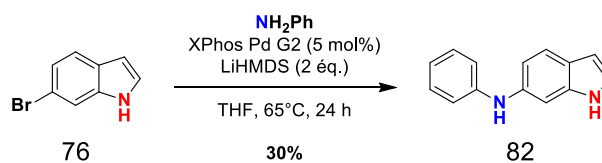
Ainsi, après une première optimisation de la voie de synthèse, l'intermédiaire commun **74** a pu être synthétisé en 5 étapes à partir du 4-bromo-2-nitrotoluène, avec un rendement global de 52% (contre environ 2% avant optimisation). Cette synthèse nécessitant l'utilisation d'un groupement protecteur et l'hydrolyse de l'imine formée lors du couplage de Buchwald-Hartwig, j'ai exploré une autre possibilité synthétique.

### 1.2.1.2) Couplage de Buchwald-Hartwig précoce

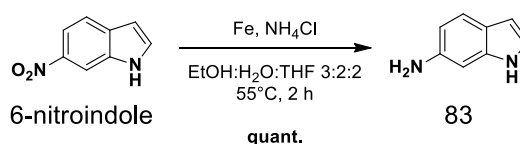
Cette seconde approche repose sur un couplage de Buchwald-Hartwig antérieur à la nitrosation et donc envisageable sans groupement protecteur. La coupure rétro-synthétique de ce couplage peut alors être vue de deux façons différentes (Figure 81), l'indole pouvant soit porter l'halogène (voie A), soit la fonction amine (voie B).



La voie A de la synthèse a été explorée dans un premier temps, le 6-bromoindole pouvant être préparé en grande quantité au laboratoire (cf. **Schéma 51** p. 139) et les conditions réactionnelles exactes du couplage de Buchwald-Hartwig sans groupement protecteur ayant été publiée dans la littérature.<sup>[158]</sup> Le 6-bromoindole a donc été mis en présence d'aniline, d'un pré-catalyseur de Buchwald (XPhos Pd G2) et d'une base forte (LiHMDS) dans le THF, cependant la réaction n'a permis d'isoler que 30% du produit **82** désiré (**Schéma 55**) contre les 96% décrits dans la littérature.<sup>[158]</sup>



N'ayant pu améliorer ce rendement, la voie B de synthèse a rapidement été étudiée. Le 6-aminoindole **83** nécessaire à la voie B a pu être synthétisé de deux façons, d'abord par réduction du 6-nitroindole puis par la réaction de Leimgruber-Batcho sur le 2,4-dinitrotoluène. La réduction du 6-nitroindole quantitative a été effectuée en présence de fer et de chlorure d'ammonium dans un mélange ternaire à 55°C pendant 2 heures (**Schéma 56**).



Cette synthèse a cependant été abandonnée au profit de la réaction de Leimgruber-Batcho présentée ci-dessous pour des raisons de disponibilité des réactifs de départ.

La réaction de Leimgruber-Batcho sur le 2,4-dinitrotoluène a été réalisée dans des conditions réactionnelles identiques à celles de la synthèse du 6-bromoindole **76** (DMA-DMF, pyrrolidine à 110°C dans le DMF pour 2 h, **Schéma 57**). Seules des traces de produit ont alors été observées. L'analyse du brut réactionnel par <sup>1</sup>H RMN lors de la première étape a permis de mettre en évidence une conversion incomplète du 2,4-dinitrotoluène et la formation de deux imines. L'énamine de la pyrrolidine **84** (produit attendu) et celle de la diméthylamine issue du DMF **85** ont pu être isolées par colonne sur gel de silice avec des rendements respectifs de 6% et 10%, puis réagies séparément. Après 2 h en présence de fer, seule l'énamine de la diméthylamine **85** a été convertie en 6-aminoindole **83**, l'autre n'ayant pas réagi. Ainsi, après retrait de la pyrrolidine du milieu réactionnel et allongement de la durée de la réaction, le 6-

aminoindole **83** a pu être obtenu à partir du 2,4-dinitrotoluène par réaction de Leimgruber-Batcho, avec le rendement correct de 70% (**Schéma 57**).

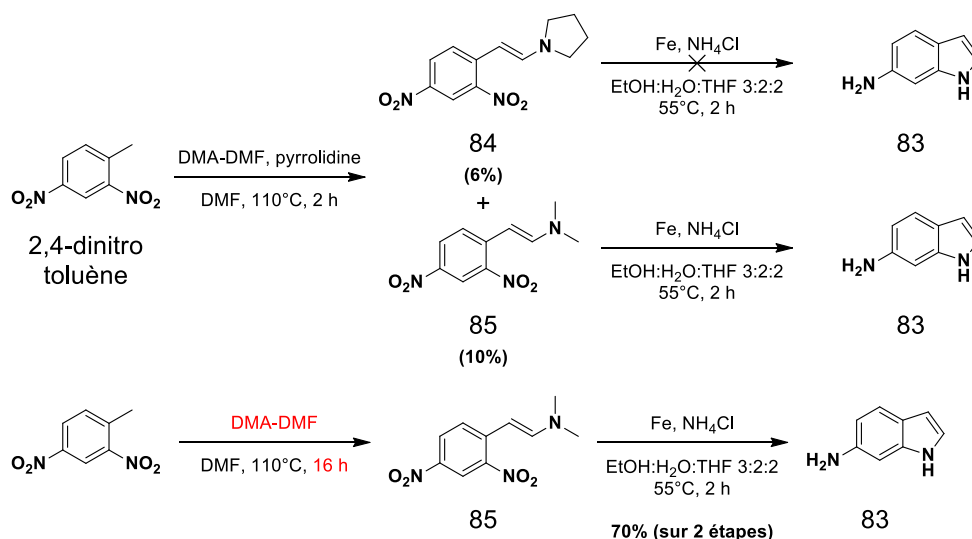


Schéma 57 : Synthèse du 6-aminoindole **83** par réaction de Leimgruber-Batcho.

Le couplage de Buchwald-Hartwig a ensuite été envisagé à partir du 6-aminoindole **83** en présence de bromobenzène, du même pré-catalyseur de Buchwald que précédemment et différentes bases dans le DMF (**Schéma 58**, **Tableau 12**). Trois premières tentatives ont alors été réalisées en parallèle pour étudier l'influence de la base sur la réaction, le solvant et la température étant repris du couplage sur l'indazole protégé. Dans les conditions exactes du couplage sur l'indazole (au phosphate de potassium tribasique, **Tableau 12** entrée 1), seul un mélange complexe de produits a été obtenu, sans produit majoritaire apparent. Un constat relativement similaire a été fait pour la réaction en présence de *tert*-butanolate de sodium, avec seulement 8% du produit de couplage isolé après colonne (**Tableau 12** entrée 2). Cependant, lorsque la réaction a été faite au carbonate de potassium, les produits de mono-, di- et tri-couplages ont pu clairement être identifiés par spectroscopie de masse du mélange brut et deux produits distincts ont pu alors être isolés par colonne (**Tableau 12** entrée 3). L'analyse RMN de toutes les fractions contenant du produit de di-couplage a permis de mettre en évidence que seul le produit **84** se formait à partir de **82** (**Schéma 58**), ce qui signifie que l'azote de l'indole est plus réactif que la diphenylamine, probablement pour des raisons d'encombrement stérique.

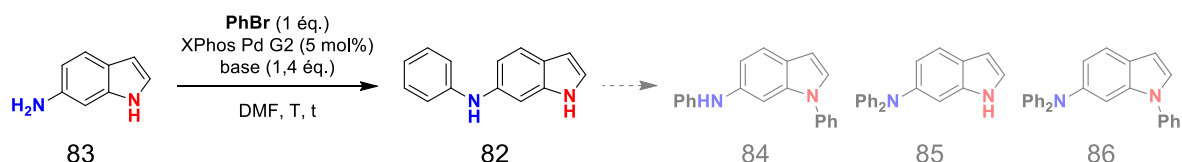


Schéma 58 : Produits et sous-produits du couplage de Buchwald-Hartwig sur le 6-aminoindole **83**.

Malgré la formation de tous ces produits di- et tri-substitués, il a été encourageant de constater qu'un seul produit de monosubstitution a été observé dans tous ces essais et qu'il s'agit bien du produit désiré. En diminuant drastiquement le temps de réaction (**Tableau 12** entrée 4), la formation du produit tri-substitués n'est d'ailleurs plus observée, sans pour autant atteindre une conversion complète du 6-aminoindole de départ. En diminuant la température à 90°C pendant 2 heures avant de remonter à 120°C pour 2 heures supplémentaires, une

conversion totale a finalement été atteinte avec un rendement isolé du produit **82** de 30%, tout en limitant les sous-produits de surréaction **84** et **86** (Tableau 12 entrée 5). Enfin, le rendement acceptable de 60% a été atteint en laissant la réaction au carbonate de potassium à 90°C pendant 6 heures (Tableau 12 entrée 6).

**Tableau 12 : Différentes conditions des couplages de Buchwald-Hartwig et rendements des sous-produits associés.**

#	Base	Solvant	Température (°C)	temps (h)	Conversion	Rendements			
						82	84	85	86
1	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	DMF	120°C	20 h	totale	mélange complexe			
2	NaOt-Bu	DMF	120°C	20 h	totale	8%	mélange complexe		
3	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	120°C	20 h	totale	traces	20%	--	15% <sup>a</sup>
4	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	120°C	2 h	partielle	20%	20% <sup>a</sup>	--	--
5	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	90°C à 120°C	4 h	totale	30%	traces	--	--
6	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	90°C	6 h	totale	60%	10% <sup>a</sup>	--	--

<sup>a</sup> rendements estimés par CCM

Forte de ces succès synthétiques, je me suis intéressée à la nitrosation de ce produit **82** pour obtenir l'intermédiaire avancé **74** (Schéma 59). Malheureusement, la présence d'une amine déprotégée sur la structure avant nitrosation conduit à de nombreux sous-produits difficilement séparables et identifiables. Une fois encore, l'emploi d'un groupement protecteur s'est avéré nécessaire.

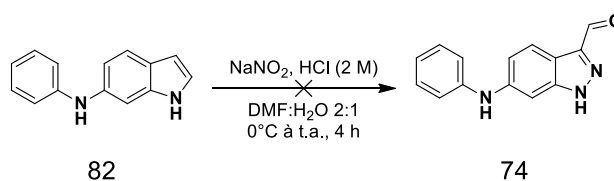


Schéma 59 : Nitrosation de l'intermédiaire **82**.

Le groupement protecteur Boc a été envisagé pour protéger et désactiver la diphenylamine mais un nouveau problème de sélectivité s'est présenté. En présence d'un seul équivalent de Boc<sub>2</sub>O et d'une amine catalytique (4-diméthylaminopyridine, 4-DMAP), seuls les produits de mono-protection de l'indole **88** et de di-protection **89** ont été observés (Schéma 60). Ces observations rejoignent celles du couplage de Buchwald-Hartwig sur le 6-aminoindole **83** qui ont démontré que l'atome d'azote de l'indole est plus réactif que celui de la diphenylamine.

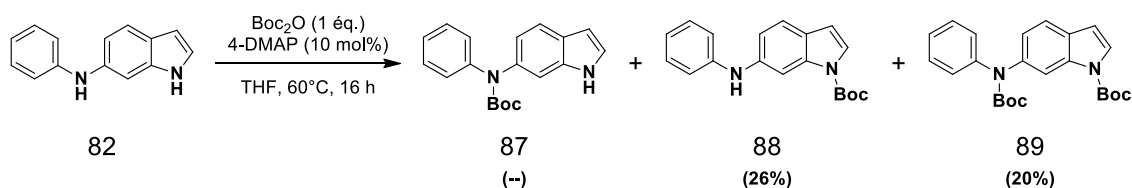


Schéma 60 : Protection sélective de l'intermédiaire **82**.



En prenant avantage des différences de stabilité entre un groupement Boc sur l'azote de l'indole ou sur une diphenylamine, j'ai choisi de protéger non-sélectivement les deux azotes puis de déprotéger sélectivement en conditions douces l'azote de l'indole au méthanol de sodium dans le méthanol à 70°C (**Schéma 61**).<sup>[164]</sup>

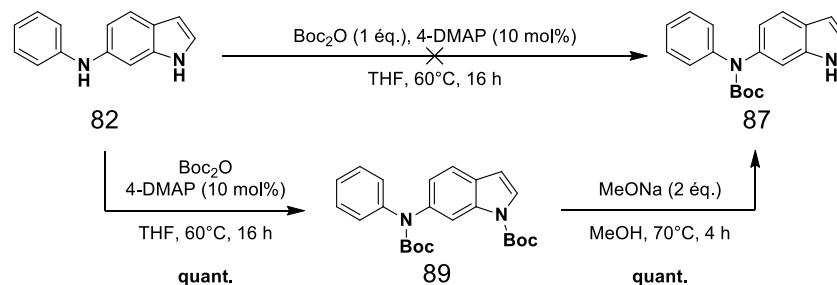


Schéma 61 : Protection sélective de l'intermédiaire 82.

La nitrosation du produit 87 a enfin pu être réalisée dans les conditions standards avec un rendement correct de 60% avant déprotection quantitative du groupement Boc à l'acide trifluoroacétique pour obtenir l'intermédiaire commun 74 (**Schéma 74**). Ainsi, l'intermédiaire 74 a pu être obtenu en 5 étapes à partir du 2,4-dinitrotoluène, avec un rendement global de 25%.

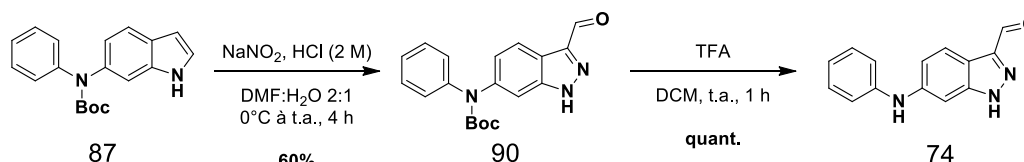


Schéma 62 : Synthèse de l'intermédiaire 74.

Face aux nombreuses difficultés rencontrées lors des couplages de Buchwald-Hartwig, j'ai fini par chercher également une façon de m'en affranchir. Hormis, les substitutions nucléophiles aromatiques, il existe peu de réactions permettant la formation d'une liaison C(sp<sup>2</sup>)-N. Cette substitution n'ayant pas lieu sur un 6-fluoroindazole-3-carboxaldéhyde, j'ai dû envisager la synthèse d'un sel de diazonium. En se penchant de plus près sur les conditions de synthèse de ces sels de diazonium, je n'ai pu m'empêcher de noter les similitudes avec celles de la nitrosation utilisée au laboratoire. L'idée de remplacer la réaction de Buchwald-Hartwig par une substitution nucléophile, tout en s'affranchissant des étapes de protection/déprotection grâce à une nitrosation et une substitution *one-pot* est apparue très séduisante (**Figure 82**). J'ai donc tenté de synthétiser ce sel en simultané de la nitrosation en partant du 6-aminoindole 83.

Afin de pouvoir attester de la formation du sel de diazonium, j'ai d'abord choisi de piéger l'intermédiaire diazonium avec de l'iode à la façon des réactions de Sandmeyer avant de pouvoir tenter employer d'autres nucléophiles.

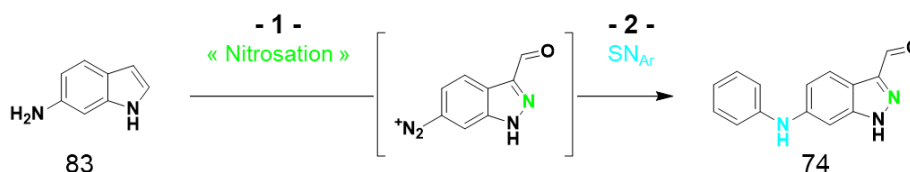


Figure 82 : Formation « one-pot » de l'intermédiaire 74 à partir du 6-aminoindole 83 via la formation d'un sel de diazonium.

Dans un premier temps, le 6-aminoindole **83** a été mis en réaction dans les conditions de la nitrosation optimisée au laboratoire puis, après 2 h à 0°C, la réaction a été arrêtée avec une solution aqueuse d'iodure de potassium (**Schéma 63**). Le produit 6-iodoindazole-3-carboxaldéhyde **92** attendu n'a pas pu être observé, en revanche, des traces de 6-chloroindazole-3-carboxaldéhyde **93** ont été observées par spectrométrie de masse et <sup>1</sup>H RMN du brut réactionnel, attestant de la formation de l'intermédiaire diazonium espéré.

Encouragée par ce résultat, j'ai tenté de limiter la réaction des ions chlorure avec l'intermédiaire diazonium en utilisant de l'acide sulfurique à la place de l'acide chlorhydrique. En effet, les contre-ions dans les sels de diazonium sont connus pour influencer leur stabilité, les ions sulfates étant décrits comme plus stables.<sup>[165]</sup> Le seul produit que j'ai été capable d'identifier à la sortie de cette réaction (**94**, **Schéma 63**) est un produit de couplage d'un indole sur la position 6 d'un indazole-3-carboxaldéhyde, attestant à nouveau de la formation d'un sel de diazonium à un moment donné. Avec le recul, travailler avec de plus grands excès d'agent nitrosant que ceux employés dans ces conditions permettrait éventuellement de limiter ce problème de condensation et d'obtenir le produit désiré. Par manque de temps, cette double réaction a cependant été mise de côté.

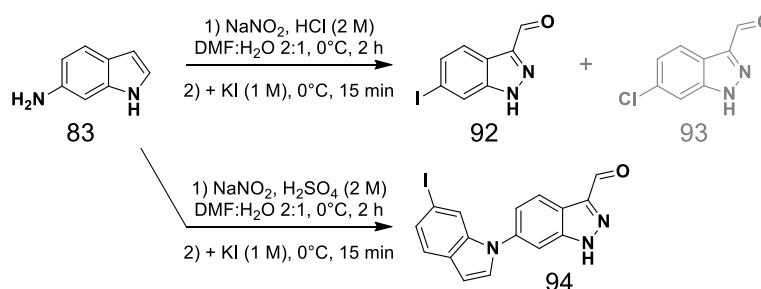


Schéma 63 : Tentatives de nitrosation des 6-aminoindoles **83**.

Ces tentatives de synthèses par substitutions nucléophiles s'avérant peu fructueuses, j'ai préféré me concentrer sur les couplages de Buchwald-Hartwig pallado-catalysés qui m'ont permis d'obtenir l'intermédiaire commun **74** désiré. Avec l'intermédiaire commun **74** obtenu par la voie de synthèse A, j'ai synthétisé le composé **95** par condensation de Knoevenagel avec le groupement indolinium **28** (**Schéma 95**). Ce composé permettra d'étudier pour un même groupement accepteur l'influence des diverses substitutions en position C6 de l'indazole. Cette synthèse a été faite dans les conditions optimisées au début de ma thèse : dans l'acétonitrile en présence d'une quantité catalytique de pipéridine avec un rendement de 30%. Le rendement faible de cette réaction est lié à des difficultés de traitement du produit qui ne précipite pas dans les conditions de la réaction, contrairement à l'analogue avec groupement donneur 1*H*-indazole.

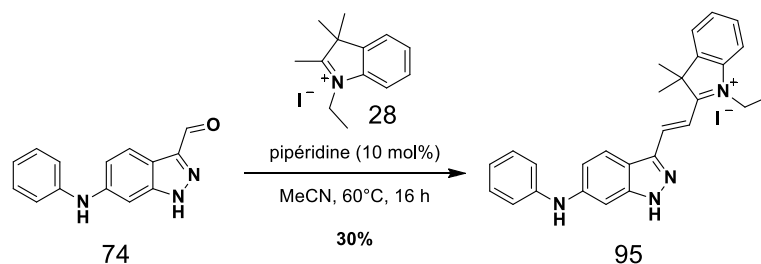
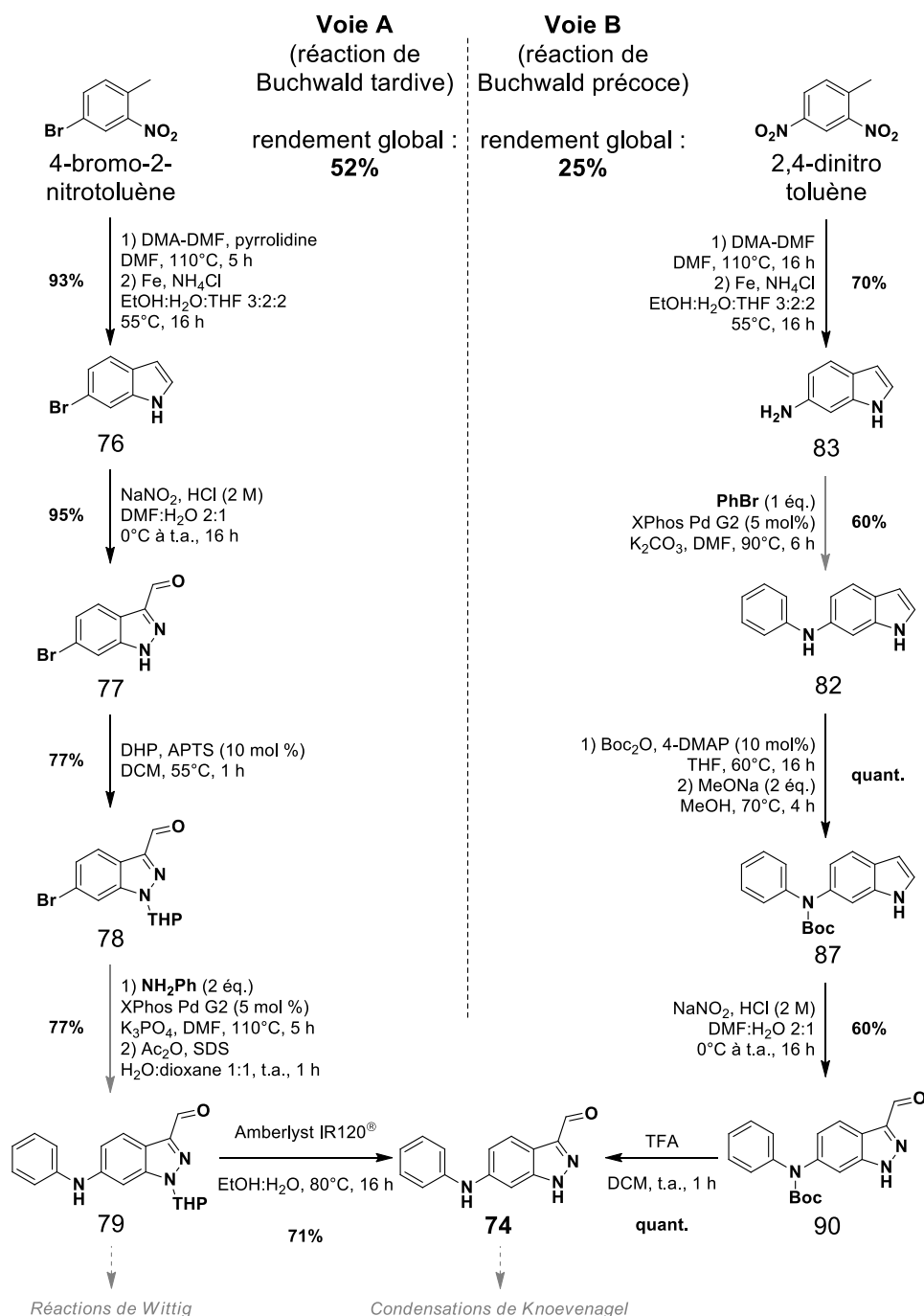


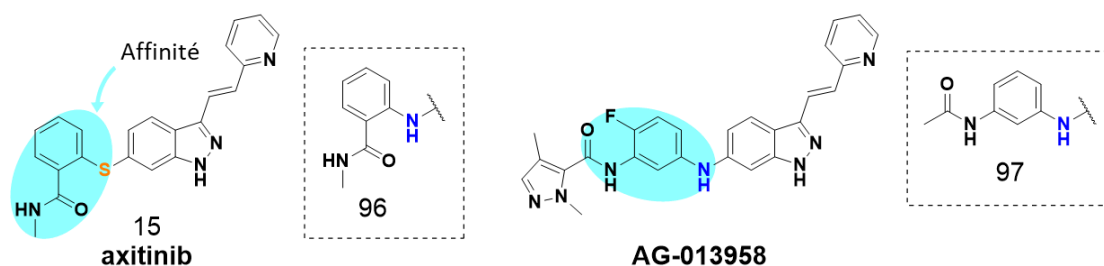
Schéma 64 : Synthèse d'un composé **95** par condensation de Knoevenagel.

Pour conclure sur la synthèse de cet intermédiaire **74**, deux voies de synthèse ont été optimisées en parallèle (**Schéma 64**). La voie A s'axe sur d'un couplage de Buchwald-Hartwig tardif avec un intermédiaire indazole protégé tandis que la voie B introduit les groupements d'affinité lors d'un couplage précoce. La voie de synthèse A a finalement été retenue pour trois raisons : (i) un meilleur rendement global, (ii) une divergence plus tardive permettant plus de diversité dans les groupements d'affinité, (iii) un intermédiaire indazole déjà protégé à partir duquel les couplages de Wittig peuvent être envisagés sans étape de protection supplémentaire.

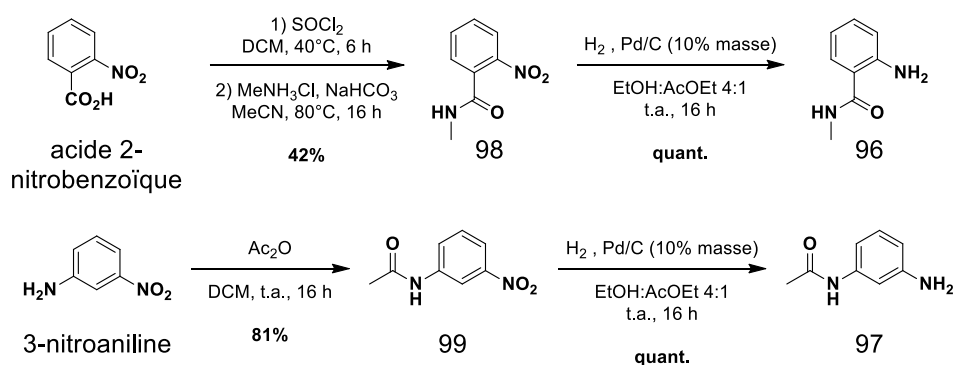
Schéma 65 : Détails des voies A et B de synthèse de l'intermédiaire **74**.

## 1.2.2) Tentatives de couplages avec des substrats plus complexes

La synthèse des intermédiaires azotés avancés ayant finalement été optimisée, je me suis intéressée aux couplages de Buchwald-Hartwig avec des anilines substituées. Deux structures aminées ont été retenues pour leurs potentielles activités contre les VEGFr : la première est directement dérivée de l'axitinib **15** avec le remplacement de l'atome de soufre par un atome d'azote et la seconde est inspirée du composé AG-013958, breveté pour des applications ophtalmiques (**Figure 83**).<sup>[166]</sup>



L'aniline **96** dérivée de l'axitinib a été obtenue en deux étapes à partir de l'acide 2-nitrobenzoïque (**Schéma 66 haut**). Dans un premier temps, le chlorure d'acyle correspondant a été synthétisé en présence de chlorure de thionyle dans le dichlorométhane puis substitué par la méthylamine (le sel correspondant a été employé en présence de bicarbonate de sodium) dans l'acétonitrile au reflux, avec un rendement de 42%. Dans un second temps, ce nitrobenzène a été réduit quantitativement en présence d'hydrogène moléculaire et de palladium sur charbon actif. L'aniline **97**, quant à elle dérivée du composé AG-013958, a été obtenue par mono-protection de la 3-nitroaniline à l'anhydride acétique puis réduction consécutive avec un rendement global de 81% sur 2 étapes (**Schéma 66 bas**).



Les réactions de Buchwald-Hartwig ont ainsi pu être testées en employant les conditions préalablement mises au point pour le couplage entre l'aniline et le 6-bromoindazole-3-carboxaldéhyde protégé **78** (2 équivalents d'aniline en présence du pré-catalyseur de Buchwald et phosphate de potassium tribasique, à 110°C dans le DMF, **Schéma 67**).

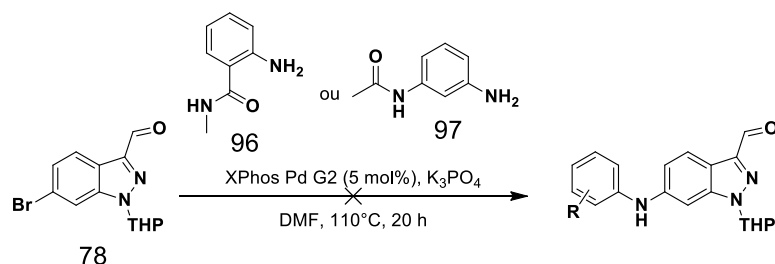


Schéma 67 : Couplages de Buchwald-Hartwig tardifs entre un indazole protégé et des anilines substituées.

Malheureusement, dans ces conditions, les produits de départ ont été récupérés inchangés après 20 heures, ni la formation des produits de couplage, ni celle des imines n'a été observée. L'une des hypothèses expliquant cette absence de couplage serait l'empoisonnement du catalyseur par ces amides pouvant jouer le rôle de ligands bi- voire tridentés.

Cette réaction de Buchwald-Hartwig tardive se soldant par un échec, j'ai inversé la réaction en partant du 6-aminoindole dont la synthèse avait été optimisée précédemment (Schéma 68). Le 6-aminoindole **83** a été mis en réaction avec les iodoaryles substitués **100** et **101** dans le DMF à 90°C avec le pré-catalyseur de Buchwald et du carbonate de potassium.

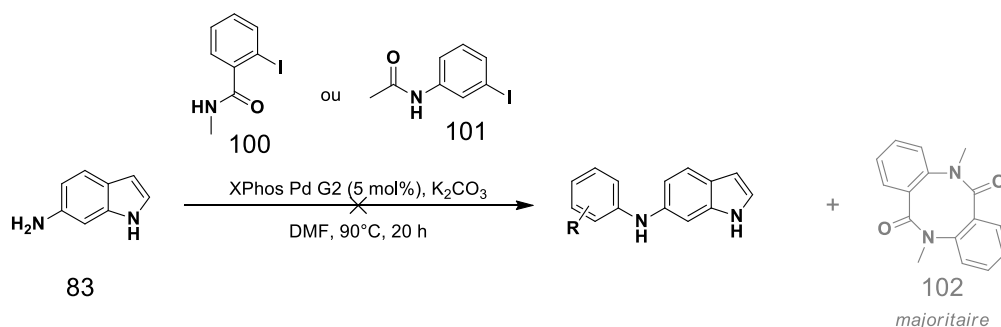
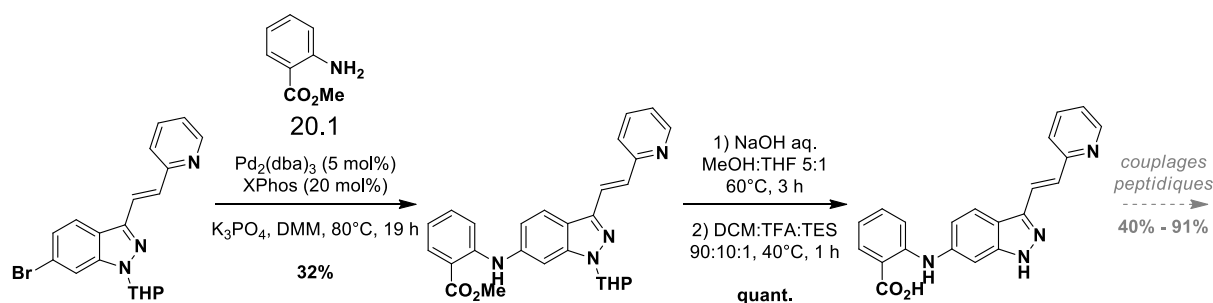


Schéma 68 : Couplages de Buchwald-Hartwig précoces entre un indole libre et des iodoaryles substitués.

Une fois encore, le produit de couplage souhaité n'a pu être observé, la réaction avec le composé **100** conduisant à l'homocouplage de ce dernier (produit **102**, Schéma 68). Ces constats décevants nous ont amené à envisager des approches synthétiques moins convergentes.

### 1.2.3) Exploration de synthèses alternatives

Après études plus approfondies de la littérature, j'ai pu constater qu'aucun protocole n'est publié pour les couplages de Buchwald-Hartwig pour des molécules substituées par des amides. Ainsi, les seuls couplages de Buchwald-Hartwig reportés lors de la synthèse d'indazoles ont été réalisés sur des anilines ne portant pas ces amides responsables de la reconnaissance aux VEGFr, ces derniers n'étant introduit que par la suite. Le brevet de la synthèse des dérivés azotés de l'axitinib décrit d'ailleurs le couplage de l'indazole protégé avec l'antranilate de méthyle, l'ester de ce dernier étant ensuite saponifié puis transformé en amide (Schéma 69).<sup>[150]</sup>

Schéma 69 : Conditions de synthèse brevetées pour les dérivés azotés de l'axitinib **15**.

Nous avons repris cette approche en essayant le couplage entre l'anthranilate de méthyle **103** et le 6-bromoindazole-3-carboxaldéhyde protégé **78**. Le problème de formation de l'imine rencontré lors des couplages similaires s'est retrouvé, compliquant les analyses brutes. Les conditions de déprotection de l'imine mises au point précédemment n'ont cependant pas permis d'isoler le produit de couplage désiré (**Schéma 70**).

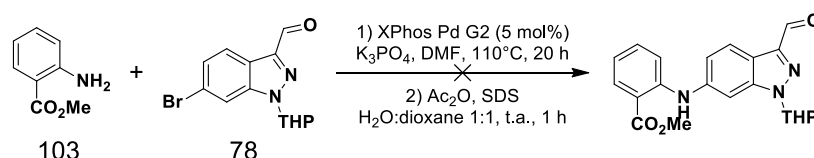


Schéma 70 : Conditions alternatives de couplages de Buchwald-Hartwig.

Face à ces impasses lors de la synthèse de cet intermédiaire commun avec l'aniline **96**, cette cible a été mise de côté au profit de l'autre intermédiaire commun avec l'aniline **97**. D'autres couplages de Buchwald-Hartwig sur des anilines ne comportant pas d'amide ont été envisagés ainsi qu'un certain nombre de substitutions nucléophiles aromatiques ( $S_NAr$ ).

Pour installer l'amide nous avons donc essayé de passer par d'autres fonctions chimiques telles que des groupements nitro ou amine. Ces nouveaux couplages se sont faits sur le 6-bromoindazole-3-carboxaldéhyde protégé dans les conditions mises au point au laboratoire. En présence du 1,3-diaminobenzène, seule la formation de l'imine a été observée, sans trace de couplage (**Schéma 71 haut**). En présence de 3-nitroaniline en revanche, le produit de couplage désiré **105** a été isolé avec un rendement modeste de 21% (**Schéma 71 bas**).

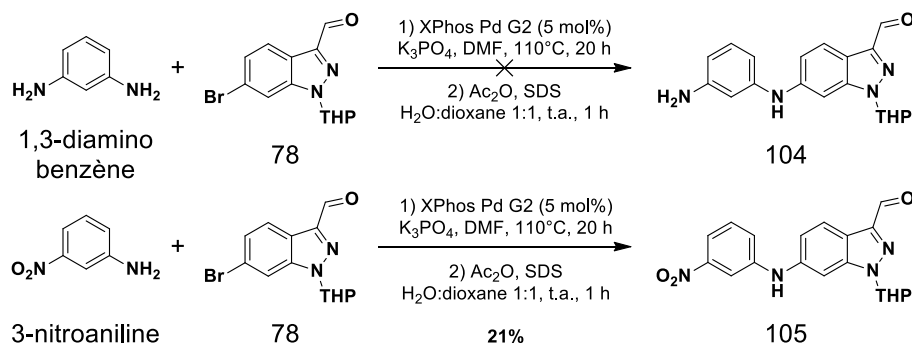


Schéma 71 : Conditions de couplage de Buchwald-Hartwig alternatifs.

Avec l'intermédiaire **105**, la réduction du groupement nitro a été étudiée dans plusieurs conditions (**Schéma 72**). En présence d'hydrogène moléculaire et de palladium sur charbon actif, aucune trace du produit attendu n'a été observée ; la formation d'un sous-produit a été

attribuée à une éventuelle déprotection du groupement THP par les sels de palladium. Un autre catalyseur supporté sur charbon actif a été testé pour sa sélectivité des groupements nitro (platine/vanadium sur charbon, **Schéma 72**),<sup>[167]</sup> cependant aucune réaction n'a pu être observée après 24 h. L'intermédiaire **105** étant riche en hétéroatomes potentiellement capable d'empoisonner les catalyseurs métalliques, une dernière méthode de réduction au dithionite de sodium dans un mélange d'eau et d'acétone a été tentée avec un léger chauffage, sans succès pour autant.

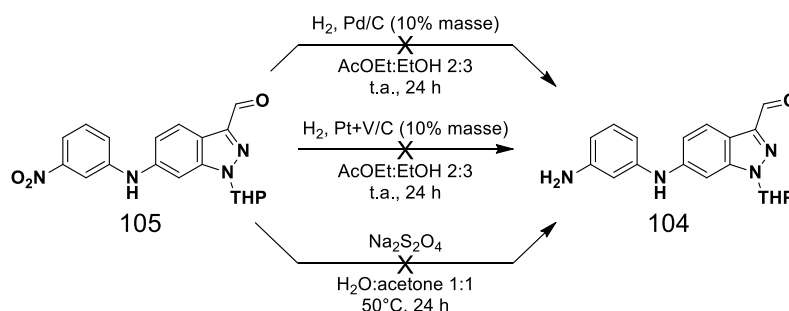


Schéma 72 : Conditions de réduction du groupement nitro de l'intermédiaire **105**.

Ainsi, l'ensemble des réactions alternatives envisagées pour la substitution des indazoles en position C6 par des anilines substituées se soldant par des échecs, l'ensemble des substituants azotés ont été mis de côté pour le projet (**Figure 84**).

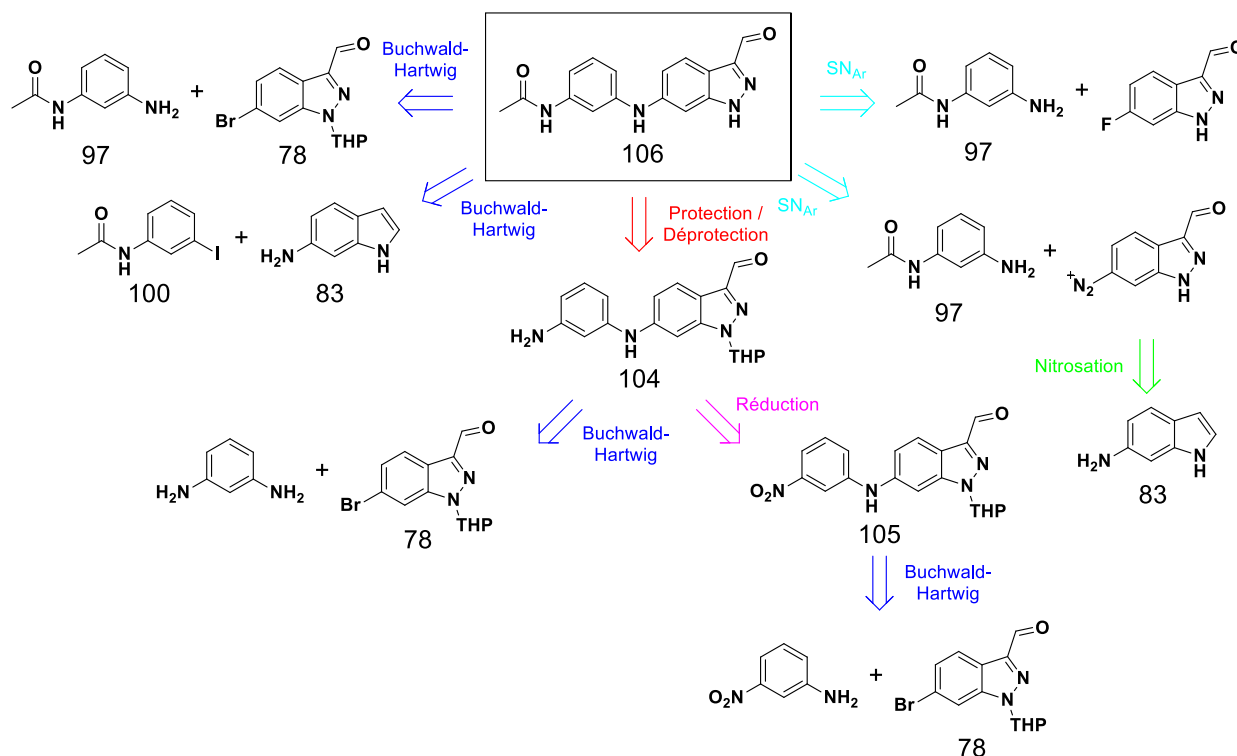


Figure 84 : Ensemble des voies de synthèse envisagées pour l'intermédiaire commun **106**.

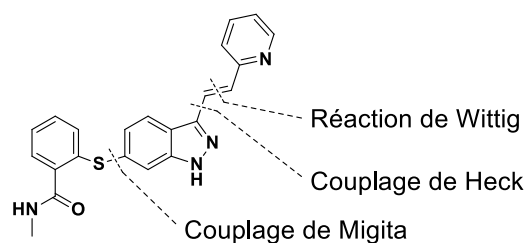
## 2) Synthèse de sondes sélectives par couplage de Migita

### 2.1) Le couplage de Migita dans la synthèse de l'axitinib

Le premier couplage entre un halogénure d'aryle et un thiol catalysé aux métaux de transition a été reporté en 1978 par le groupe de Migita, qui donnera son nom la réaction.<sup>[168]</sup> Ce premier article décrit des couplages entre des bromures et iodures d'aryles et des ions thiolates en présence de palladium avec de bons rendements, démontrant qu'il est possible de contourner le problème d'empoisonnement des métaux en présence d'atomes de soufre et faire de la catalyse efficacement avec ces derniers. Par la suite, ce couplage a été plus largement développé en présence de divers métaux de transition comme le palladium, le nickel, le cuivre, ou encore le cobalt.<sup>[169]</sup>

Les couplages de Migita possèdent deux limitations majeures. La première mentionnée ci-dessus est le risque persistant d'empoisonnement des catalyseurs par les espèces soufrées. La seconde est également liée aux thiols et plus particulièrement à la génération des thiolates au cours de la réaction. En effet, ces derniers peuvent réagir sur eux même en présence d'un oxydant (catalyseur, traces infimes d'air, ou autre) pour former des ponts disulfures stables, la cinétique de la formation des ponts disulfures est d'ailleurs bien renseignée dans la littérature.<sup>[170]</sup> Cette cinétique est dépendante de la stabilité des différents thiols et il a été démontré à de nombreuses reprises que cette stabilité est bien plus grande pour des thiolates aliphatiques (allant de plusieurs heures à une journée) que pour les thiolates aromatiques (allant de la minutes à l'heure). Une manière de limiter ce problème est d'ajouter un réducteur au le milieu réactionnel (de la poudre de zinc généralement).<sup>[171]</sup>

La synthèse de l'axitinib **15**, telle que décrite dans la littérature, repose sur deux étapes clés de couplages catalysés aux métaux de transition : un couplage de Heck et un couplage de Migita (**Figure 85**). En fonction des sources, ces couplages peuvent varier dans leur ordre mais ils sont difficilement contournables, en particulier le couplage de Migita du fait de la structure thioéther aromatique de l'axitinib.<sup>[96,136]</sup> Seule l'installation du groupement électroaccepteur pyridyle a été envisagée autrement : un brevet proposant une réaction de Wittig sur un 1*H*-indazole-3-carboxaldéhyde.<sup>[172]</sup>

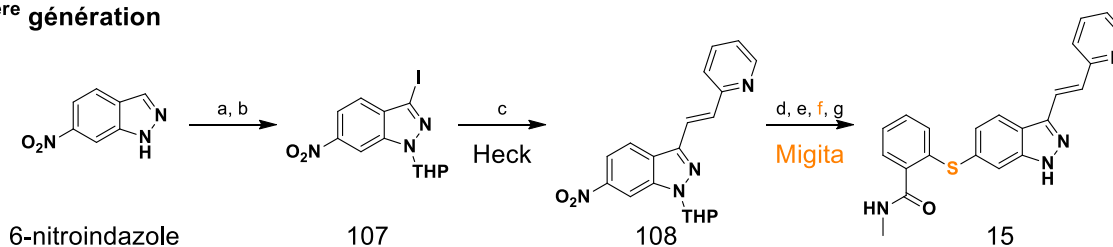


La première génération de synthèse industrielle de l'axitinib, brièvement mentionnée dans la littérature,<sup>[96,136]</sup> commence par un couplage de Heck entre la 2-vinylpyridine et le 3-iodo-6-nitroindazole protégé **107**, suivi d'un couplage de Migita avec le thiophénol substitué **110** (**Schéma 73**). À noter qu'aucune référence dédiée n'est malheureusement citée pour cette

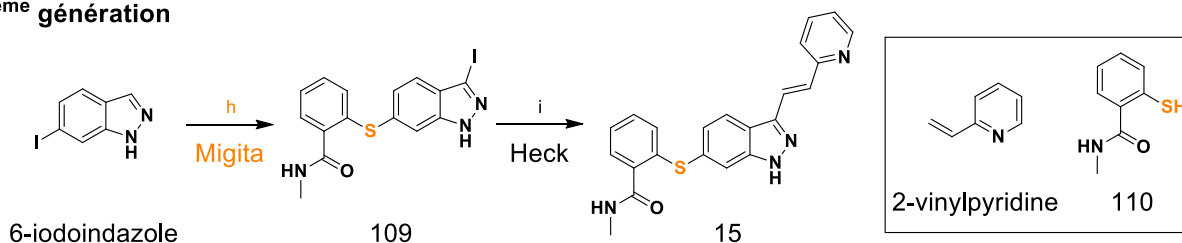


synthèse et qu'aucune discussion autour de l'optimisation de la séquence n'est disponible dans la littérature en faisant état. La synthèse de seconde génération, quant à elle plus détaillée, inverse l'ordre des couplages en commençant par celui de Migita sur le 6-iodoindazole suivi du couplage de Heck. La deuxième synthèse présente de meilleurs rendements de catalyse, moins d'étapes et préfère des séquences de protection/déprotection de l'indazole *in situ*, limitant le nombre de purifications (**Schéma 73**).<sup>[136]</sup> Ces deux générations de synthèse ne reposant que sur des couplages catalysés au palladium, une troisième génération de synthèse de l'axitinib a été optimisée avec des catalyseurs de cuivre sur le modèle de la première génération.<sup>[96]</sup>

### 1<sup>ère</sup> génération



### 2<sup>ème</sup> génération



*Schéma 73 : Deux générations de synthèse de l'axitinib 15. Conditions :* a)  $I_2$ ,  $K_2CO_3$ , DMF ; b) DHP, MsOH, DCM ; c) 2-vinylpyridine,  $Pd(OAc)_2$ ,  $P(o-tol)_3$ , DIEA, DMF,  $90^\circ C$  ; d) Fe,  $NH_4Cl$ , EtOH ; e)  $NaNO_2$ , AcOH, DCM puis KI (aq.) ; f) **110**,  $Pd(dppf)Cl_2$ ,  $Cs_2CO_3$ , DMF,  $80^\circ C$  ; g) APTS, MeOH ; h) **110**,  $Pd_2(dba)_3$  (0,5 mol%), XantPhos (1 mol%),  $NaHCO_3$ , NMP,  $50^\circ C$  puis  $I_2$ , KOH (aq.) ; i)  $Ac_2O$ , DIEA, NMP,  $60^\circ C$  puis 2-vinylpyridine,  $Pd(OAc)_2$  (4 mol%), XantPhos (4 mol%),  $90^\circ C$  puis 1,2-DAP, THF,  $H_2O$ .

En s'intéressant aux couplages de Migita de la 1<sup>ère</sup> et de la 2<sup>ème</sup> génération de synthèse de l'axitinib, il est possible de noter quelques similitudes : une source de palladium II est employée avec un ligand phosphine encombré (dppf ou XantPhos), une base carbonatée ( $Cs_2CO_3$  ou  $NaHCO_3$ ) et un solvant amide à fort pouvoir solubilisant (DMF ou NMP). L'utilisation d'un iodure d'aryle permet également de travailler à des température relativement basses ( $50^\circ C$  à  $80^\circ C$ ). La différence la plus notable entre les deux protocoles se situe dans la substitution du noyau indazole au moment du couplage.

Dans le cas de la 1<sup>ère</sup> génération, l'accepteur pyridyle est préalablement installé par couplage de Heck sur un 3-iodo-6-nitroindazole protégé **107** (condition c, **Schéma 73**) puis le groupement nitro peut ensuite être transformé en iode par réduction sélective puis réaction de Sandmeyer (conditions d & e). Cette dernière modification du groupement nitro en iode après le couplage de Heck permet de contrôler la régiosélectivité lors de l'un et l'autre des couplages catalysés au palladium. Le groupement protecteur joue également un rôle pour plusieurs de ces étapes.

Dans le cas de la 2<sup>ème</sup> génération, le couplage de Migita a été réalisé sur le 6-iodoindazole libre suivi de l'étape d'iodation de la position C3, permettant de s'affranchir à la fois du

problème de régiosélectivité lors des couplages et de la nécessité d'un groupement protecteur pour la réaction de Migita. Un groupement protecteur a malgré tout été utilisé lors de la réaction de Heck mais les étapes de protection/déprotection sont faites *in situ* (condition *i*, **Schéma 73**).

Encouragée par l'existence de conditions de couplages de Migita déjà publiés pour le thiophénol substitué **110**, j'ai cherché à synthétiser un nouvel intermédiaire commun **111** pour la phase 2 de ma thèse (**Figure 86**).

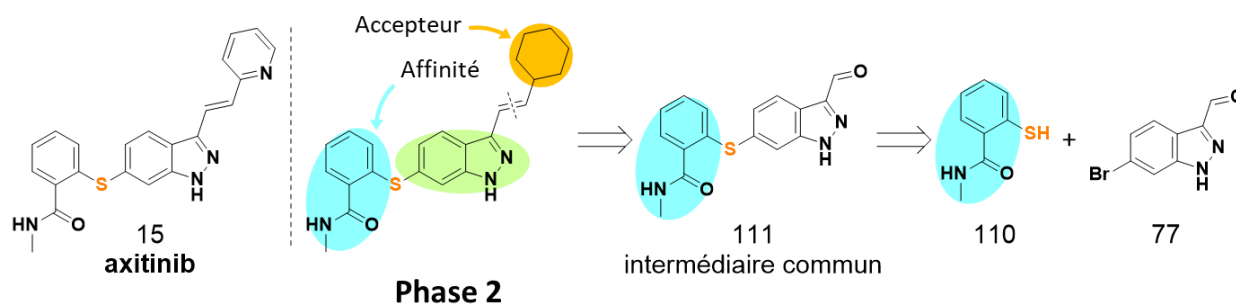


Figure 86 : Rétrosynthèse possible de l'intermédiaire commun **111** (groupements d'affinité en cyan).

## 2.2) Résultats de synthèse

Dans un premier temps, la synthèse du thiophénol substitué **110** a été réalisée en deux étapes à partir de l'acide 2,2'-dithiobenzoïque. L'acide est d'abord activé quantitativement sous forme de chlorure d'acyle au reflux du  $\text{SOCl}_2$  pendant deux heures puis l'amide **112** est formé en présence du sel de méthylamine et d'une base dans le dichlorométhane, avec un rendement de 67% sur les deux étapes. La réduction du pont disulfure **112** en thiophénols **110** est faite en présence de borohydrure de sodium dans l'éthanol suivi d'un traitement acide pour un rendement isolé d'environ 90%. Dû au manque de stabilité des thiophénols à l'air, le produit est conservé sous sa forme de pont disulfure **112** et réduit juste avant chaque couplage.

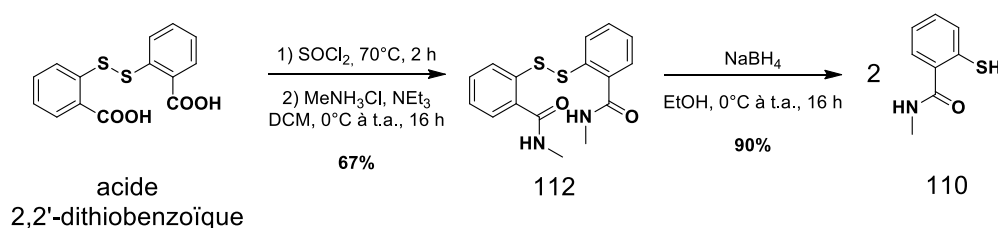


Schéma 74 : Synthèse du thiophénol substitué **110**.

Dans un second temps, je me suis intéressée au couplage de Migita. Mon travail s'est principalement basé sur la publication de Chekal *et al.* détaillant l'optimisation industrielle de la 2<sup>ème</sup> génération de synthèse de l'axitinib.<sup>[136]</sup> Afin de prendre la main sur cette nouvelle séquence réactionnelle où de nombreux paramètres entrent en jeu, j'ai d'abord tenté de reproduire la première étape de synthèse de la publication (couplage de Migita sur le 6-iodo-1*H*-indazole suivi de l'iodation en position C3 en *one-pot*). J'ai ensuite cherché à élargir ces conditions réactionnelles aux 6-bromoindazole-3-carboxaldéhydes.

## 2.2.1) Sur le 6-bromo-1H-indazole

Bien que l'intermédiaire **111** clé dans cette phase 2 de synthèse porte un groupement aldéhyde en position C3 de l'indazole, synthétiser son analogue iodé à cette position s'est révélé intéressant pour deux raisons. Premièrement, reproduire cette séquence réactionnelle décrite dans la littérature devrait me permettre de prendre en main ce couplage de Migita avant de le tenter sur des substrats inédits. Deuxièmement, cet intermédiaire iodé **109** sera valorisable par couplage de Sonogashira avec de nouveaux groupements accepteurs par catalyse aux métaux de transition. En effet, les expériences de modélisation moléculaire ont mis en évidence la possibilité de remplacer la liaison alcène entre les groupements électrodonneurs et électroaccepteurs de nos molécules cibles par des liaisons alcynes.

## 2.2.1.1) Optimisation du couplage de Migita

Selon le protocole publié dans la littérature, la synthèse de l'intermédiaire avancé **109** procède comme suit : le couplage de Migita est fait entre le thiophénol **110** et le 6-iodo-1H-indazole en présence de palladium ( $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ ), de XantPhos et de bicarbonate de sodium dans la NMP à 50°C puis l'intermédiaire obtenu **113** est consécutivement iodé (**Schéma 75**). Le produit **109** est isolé par précipitation et purifié par recristallisation en présence d'une diamine (1,2-diaminopropane) pour chélater les traces de métaux restantes.

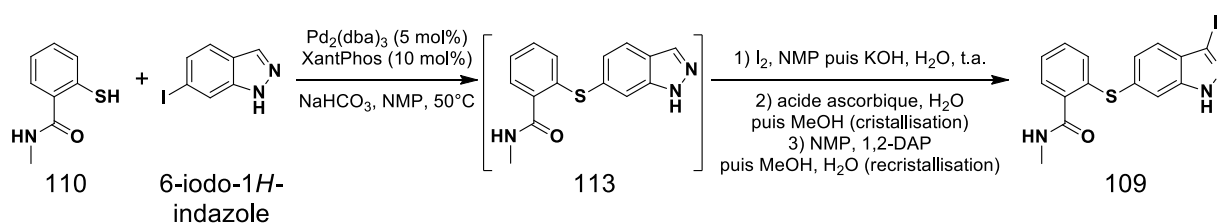
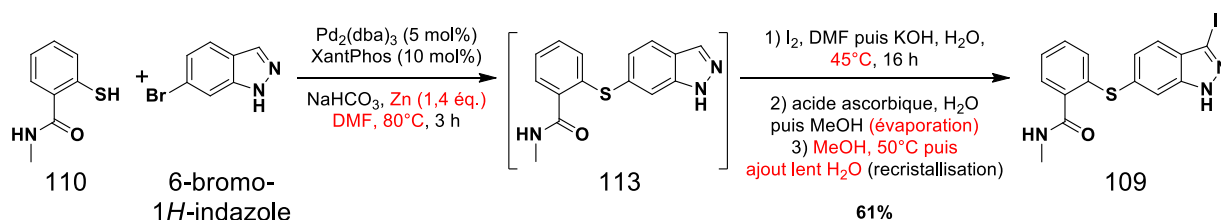


Schéma 75 : Synthèse de l'intermédiaire avancé **109** selon la littérature.<sup>[136]</sup>

Pour des raisons de disponibilité et de coût du réactif de départ, j'ai choisi de travailler avec le 6-bromo-1H-indazole disponible à moins de 6 € / mmol (contre 30 € / mmol pour l'équivalent iodé, TCI – juillet 2020), la température du couplage a donc été augmentée en conséquence. Un couplage a alors été réalisé selon le protocole décrit dans l'article. Après recristallisation, un premier précipité blanc amorphe s'est formé, suivi de la formation plus lente d'un second précipité blanc cristallin. Le premier produit, soluble uniquement dans le  $\text{DMSO-d}_6$  a été identifié comme le pont disulfure entre deux thiophénol **112** tandis que le second produit correspond à l'indazole de départ.

Cette absence de réaction étant très probablement liée à une dimérisation rapide du thiophénol **109** puis à l'empoisonnement du catalyseur par le pont disulfure **112**,<sup>[136]</sup> de la poudre de zinc a été ajoutée au milieu réactionnel en quantité stœchiométrique (additif récurrent des couplages de Migita, **Schéma 76**). Ainsi, après seulement deux heures de réaction, une  $^1\text{H}$  RMN du brut réactionnel a permis de mettre en évidence la formation d'un produit majoritaire identifié comme l'intermédiaire **113** par spectrométrie de masse haute résolution. L'iodation a ensuite été tentée à température ambiante, permettant d'isoler plus de 30% d'un mélange de l'intermédiaire **113** et du produit attendu **109** (confirmés par spectrométrie de masse haute

résolution). La température de l'iodation a donc été légèrement augmentée par rapport à la littérature permettant d'isoler le produit désiré **109** jusqu'à 61% de rendement (**Schéma 76**).



*Schéma 76 : Synthèse de l'intermédiaire avancé **109** appliquée au laboratoire.*

À noter que l'entièreté des protocoles de précipitation ainsi que de recristallisation ont dû être revus au cours de cette synthèse. Dans notre cas, le premier précipité gris obtenu après arrêt de l'iodation par la solution aqueuse d'acide ascorbique et les rinçages au méthanol correspond à l'ensemble des dimères de thiol **112**, des sels et des métaux utilisés lors de la réaction de Migita. Contrairement aux indications de l'article,<sup>[136]</sup> le produit légèrement jaune n'a pas été obtenu dans ce précipité mais a été isolé après évaporation à sec des solvants (un mélange DMF:H<sub>2</sub>O:MeOH) puis recristallisation à chaud dans un large volume de méthanol et nucléation par ajout d'eau (**Schéma 76**).

### 2.2.1.2) Synthèse de sondes par couplages de Sonogashira

Les études de *docking* moléculaire réalisées par le professeur Pascal Bonnet entre nos sondes et le VEGFr ayant montré la pertinence de remplacer la liaison alcène entre le donneur électronique (indazole) et les groupements électroaccepteurs (A) par une liaison alcyne, je me suis penchée sur cette nouvelle synthèse. Les accepteurs 4- et 5-benzothiadiazoles ont été retenus pour leurs propriétés spectroscopiques intéressantes et leur orientation favorable à une coordination au VEGFr déterminée en modélisation moléculaire, particulièrement pour le 5-benzothiadiazole.

De façon analogue aux synthèses de Heck réalisées sur des 3-iodo-1H-indazole « simples » (cf. **Chapitre 2 2.4.2**) p. 96), une réaction de Sonogashira a été envisagée pour le couplage des groupements alcynes. J'ai d'abord cherché à adapter des conditions réactionnelles sur des substrats indazoles « simples » avant de passer à des substrats plus complexes, tels que l'indazole substitué **109**.

La synthèse de l'accepteur alcyne 4-benzothiadiazole commence par une étape de bromation du 2,1,3-benzothiadiazole (**Schéma 77**). Le benzothiadiazole bromé **114** est ensuite mis en réaction dans un premier couplage de Sonogashira catalysé au palladium (Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> / PPh<sub>3</sub>) et au cuivre (CuI), avec du triméthylsilylacétylène et une base (NEt<sub>3</sub>) dans le THF et **115** est obtenu avec un bon rendement de 80%. L'alcyne peut enfin être déprotégé en une heure dans un mélange de THF et méthanol basique à température ambiante avec le rendement assez faible de 45% qui peut être dû au caractère électroniquement pauvre de la molécule.

La synthèse de l'accepteur alcyne 5-benzothiadiazole démarre quant à elle par une étape de formation de l'hétérocycle benzothiadiazole à partir de la 4-bromo-2-nitroaniline : le groupement nitro est réduit en présence de fer puis le cycle est fermé en présence de chlorure de thionyle (**Schéma 77**). De façon analogue au 4-benzothiadiazole, le produit bromé **117** est

ensuite couplé au triméthylsilylacétylène avec un bon rendement de 90% puis l'alcyne **118** est déprotégé en 30 minutes dans le méthanol basique. Ainsi, les accepteurs **116** et **119** ont été synthétisés en trois étapes à partir du 2,1,3-benzothiadiazole ou de la 4-bromo-2-nitroaniline, avec des rendements globaux de 33% et 59% respectivement.

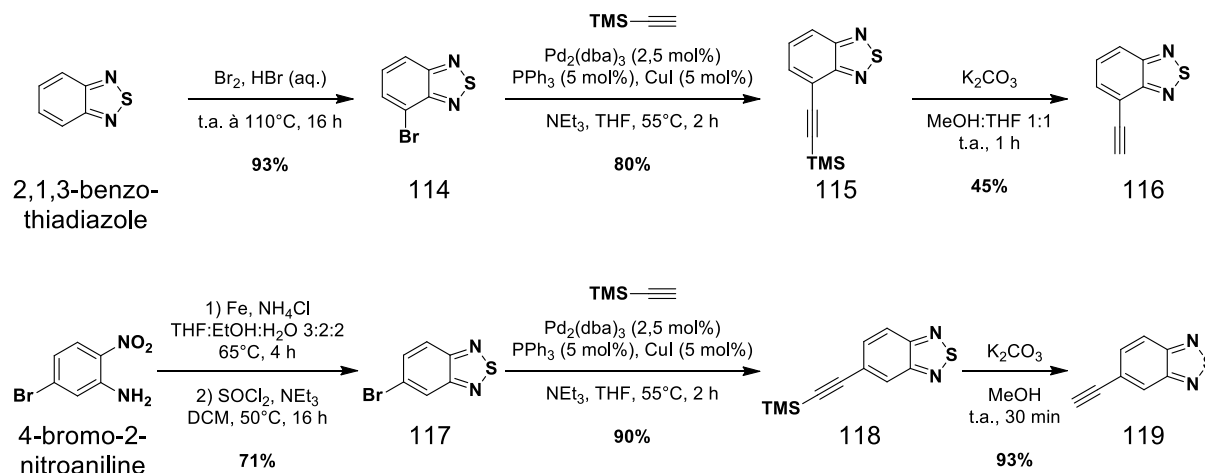


Schéma 77 : Synthèse des accepteurs alcynes.

Des conditions de couplages de Sonogashira identiques à celles présentées ci-dessus ont alors été réutilisées pour coupler cet accepteur **119** au 3-iodo-1*H*-indazole **66** (Schéma 78). Après 24 heures, seules quelques traces du produit désiré **120** ont été observées par spectrométrie de masse. La réaction a donc été retentée avec un groupement protecteur. En présence de 3-iodoindazole protégé **69**, la réaction de Sonogashira a été complète en 16 heures avec un rendement isolé acceptable de 66%. Le produit final **120** a finalement été obtenu après déprotection de l'intermédiaire **121**, avec un rendement isolé de seulement 32%. Ce rendement plutôt faible s'explique en partie par l'avancement incomplet de la réaction malgré l'ajout de résine après 8 heures et une purification délicate.

Des problèmes similaires se sont retrouvés lors de la synthèse de l'analogue 4-benzothiadiazole **122** avec un rendement de seulement 45% pour le couplage de Sonogashira et une déprotection difficile en présence de résine. La déprotection totale du produit **122** n'a été obtenue que dans un mélange d'acide chlorhydrique aqueux et de méthanol avec un très bon rendement de 90%. Ainsi, les composés **120** et **123** ont été obtenus avec des rendements globaux de 14% et 26% respectivement.

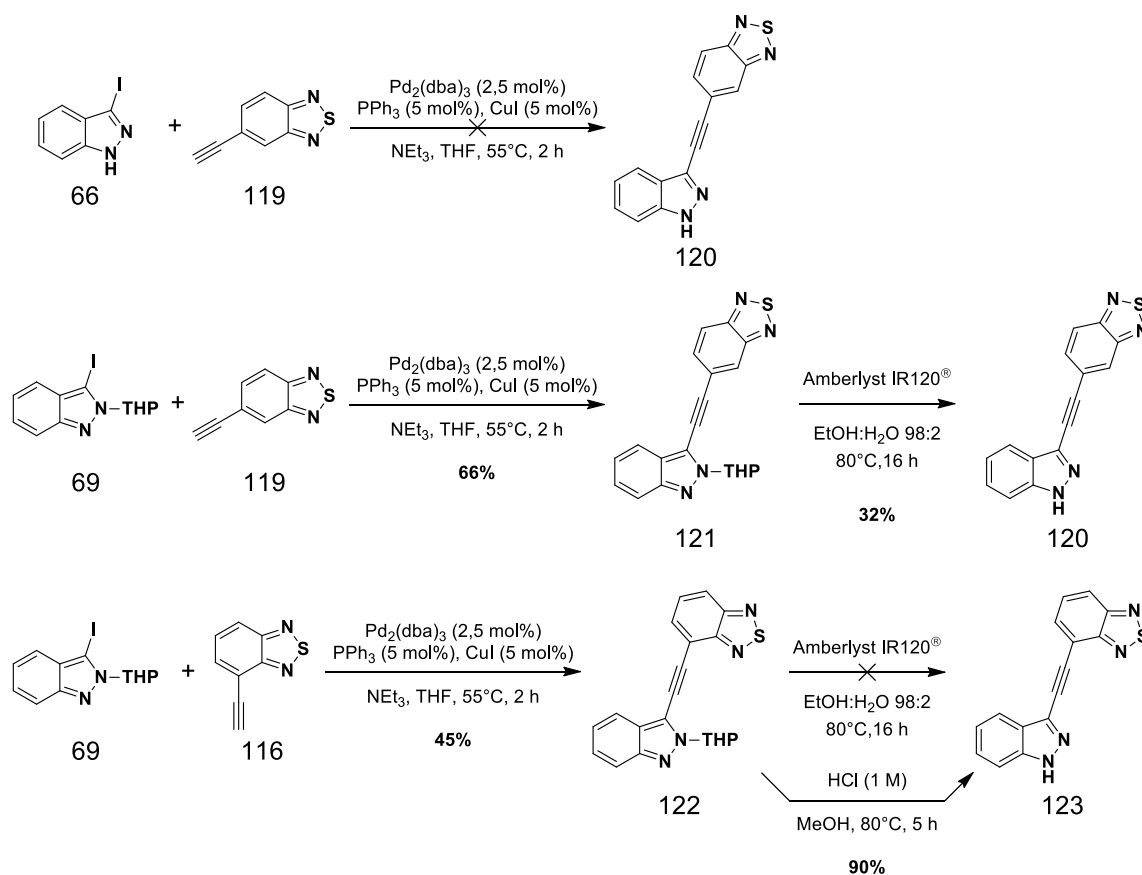
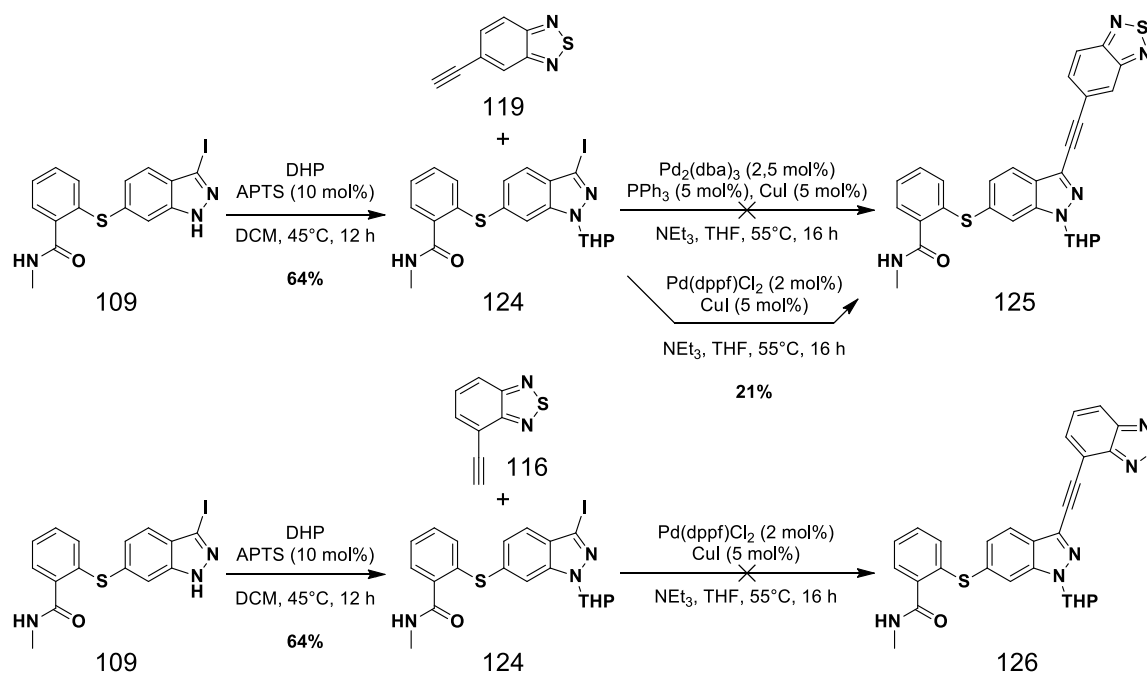
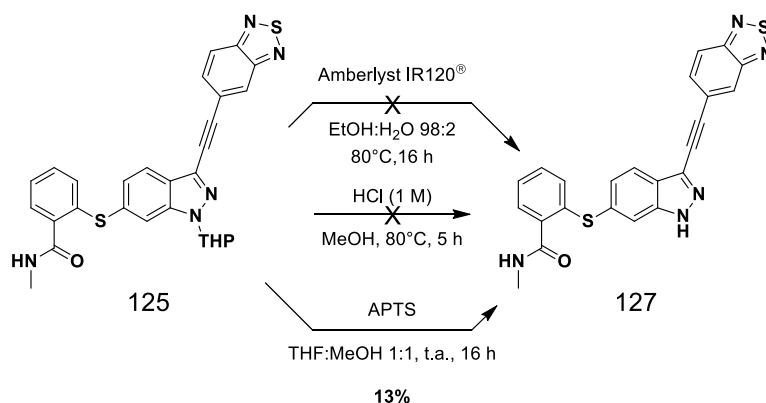


Schéma 78 : Conditions de couplage de Sonogashira sur les 3-iodoindazoles.

Ces premiers couplages sur les indazoles « simples » ont permis de mettre en évidence la nécessité du groupement protecteur pour réaliser ce couplage de Sonogashira. En conséquence, le 3-iodoindazole **109**, substitué par le groupement thiophénol identique à l'axitinib, a été protégé par un groupement THP dans les conditions décrites précédemment (cf. **Chapitre 2** 2.4.4) p. 96, **Schéma 79**) puis le produit **124** a été engagé dans le couplage de Sonogashira. Malheureusement, les conditions utilisées pour les dérivés indazoles « simples » ( $\text{Pd}_2(\text{dba})_3 / \text{PPh}_3$ ) n'ont pas permis d'isoler le produit désiré **125**. En changeant de source de palladium et de ligand ( $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ ), le produit **125** a été finalement obtenu avec un rendement modeste de 21%. Tout comme pour les indazoles « simples », les structures des deux alcynes semblent affecter fortement leurs réactivités et, contrairement à son isomère, le produit **126** n'a pas pu être isolé dans ces conditions.

Schéma 79 : Couplage de Sonogashira sur le 3-iodoindazole substitué **109**.

Ces rendements, bien que faibles, nous ont permis d'isoler suffisamment du produit désiré **125** pour poursuivre les expériences. Tout comme pour les analogues avec donneur *1H*-indazole non-substitué, l'étape de déprotection du groupement THP s'est avérée délicate. En effet, la première déprotection a été tentée sur le composé intermédiaire **125** en présence de résine acide, dans les conditions développées jusqu'alors (Schéma 80), cependant seul le produit de départ **125** a été observé après 16 heures de réaction. La déprotection en présence d'acide chlorhydrique aqueux utilisé pour le composé **123** a également été tentée mais n'a pas plus permis d'isoler le produit **127** désiré. Finalement, la conversion du produit **125** en **127** a été observée en  $^1\text{H}$  RMN en présence d'une quantité stœchiométrique d'acide *para*-toluènesulfonique (également utilisé en quantité catalytique pour la protection) dans un mélange de THF et de méthanol. Le produit désiré **127** a pu être isolé avec 13% de rendement.

Schéma 80 : Déprotection du composé final **127**.

La synthèse du produit **109** qui paraissait évidente de prime abord m'a permis de mettre en évidence la délicatesse des conditions réactionnel de ce couplage de Migita, de les adapter au laboratoire et de me former au traitement de ces produits hautement insolubles. Cet

intermédiaire iodé **109** a ensuite été valorisé par couplage de Sonogashira catalysé aux métaux de transition. Trois molécules à liaison alcyne ont ainsi pu être obtenues après une étape de déprotection également complexe, nécessitant de nombreuses mises au point des protocoles afin de réussir à isoler les produits souhaités. Deux composés avec des donneurs indazoles « simples » **120** et **123** ont été obtenus avec des rendements globaux respectifs de 14% et 26% et un dernier composé avec un donneur indazole substitué **127** a été isolé avec un rendement global de 1%.

## 2.2.2) Sur le 6-bromoindazole-3-carboxaldéhyde

### 2.2.2.1) Couplages de Migita

Forte de cette expérience, j'ai cherché à faire ce couplage de Migita sur le 6-bromoindazole-3-carboxaldéhyde. De façon analogue au 6-bromo-1*H*-indazole, le 6-bromo-1*H*-indazole-3-carboxaldéhyde déprotégé **77** a été utilisé dans un premier temps. Dans les conditions réactionnelles décrites ci-dessus, le produit désiré **111** a pu être isolé avec un rendement de 24% après purification sur gel de silice (pas de recristallisation possible dans ce cas-là, **Schéma 81**).

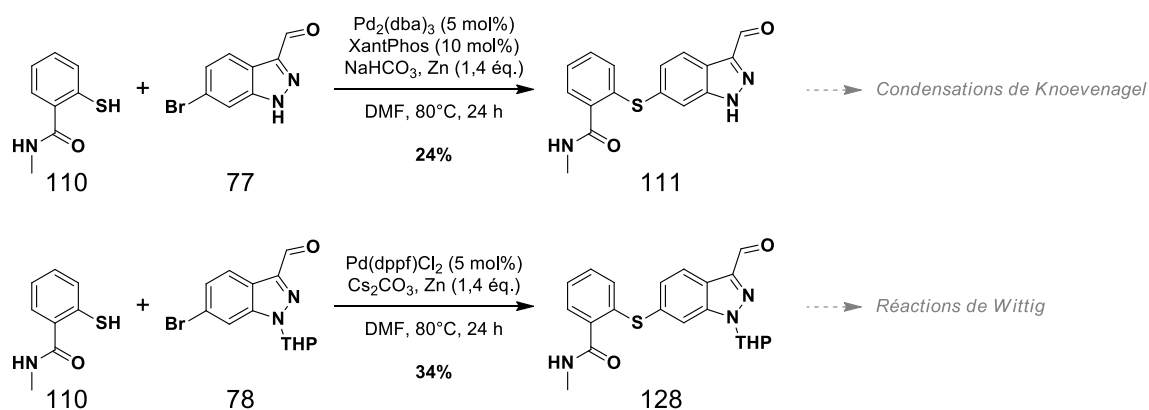


Schéma 81 : Couplage de Migita sur le 6-bromo-1*H*-indazole-3-carboxaldéhyde **77** et le 6-bromoindazole-3-carboxaldéhyde protégé **78**.

Ce rendement étant assez peu satisfaisant la réaction a été testée sur le 6-bromoindazole-3-carboxaldéhyde protégé **78** (**Schéma 81**). La première génération de synthèse de l'axitinib passant également par un indazole protégé lors du couplage de Migita (cf. **2.1**) p. 150), leurs conditions ont alors été employées. En présence d'un pré-catalyseur différent (Pd(pddf)Cl<sub>2</sub>), de carbonate de césium et de zinc, la réaction a permis d'isoler 34% du produit attendu **128** après purification sur gel de silice.

Les rendements réactionnels étant faibles indépendamment du produit de départ (24% pour l'indazole libre **77** et 34% pour l'analogue protégé **78**), d'autres conditions réactionnelles ont été testées. Dans un premier temps, les conditions de couplages décrites dans la troisième génération de la synthèse de l'axitinib ont été appliquées en présence d'indazole « libre » et protégé (**Tableau 13**, entrées 3 & 4 respectivement). La catalyse a été réalisée en présence de cuivre (CuI), d'un ligand phénantroline, de zinc et de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub><sup>[96]</sup> mais n'a conduit qu'à des produits de déshalogénéation après une nuit de réaction quel que soit le substrat de départ. Deux systèmes catalytiques à base de nickel<sup>[173,174]</sup> ont également été testés mais n'ont conduit qu'à



la déshalogénéation du produit de départ (entrée 5) ou sa récupération après réaction (entrée 6). Enfin un catalyseur au cobalt<sup>[175]</sup> a été utilisé, sans pour autant conduire au résultat attendu (entrée 7).

**Tableau 13 : Comparatif des différentes conditions de couplage de Migita testées sur les 6-bromo-indazole-3-carboxaldéhydes et références correspondantes.**

#	Réf.	Substrat	Catalyseur	Ligand	Additif	Base	Solvant	T (°C)	t (h)	Rendement
1	[136]	<b>77</b>	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub>	XantPhos	zinc	NaHCO <sub>3</sub>	DMF	80°C	24 h	24%
2	[136]	<b>78</b> (THP)	Pd(dppf)Cl <sub>2</sub>	--	zinc	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	80°C	24 h	34%
3	[96]	<b>77</b>	CuI	1,10-phénantroline	zinc	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	110°C	16 h	déshalogénéation <sup>a</sup>
4	[96]	<b>78</b> (THP)	CuI	1,10-phénantroline	zinc	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	110°C	16 h	déshalogénéation <sup>a</sup>
5	[173,176]	<b>77</b>	NiCl <sub>2</sub>	crotonate d'éthyle	zinc	pyridine	MeOH	80°C	16 h	déshalogénéation <sup>a</sup>
6	[174]	<b>77</b>	NiCl <sub>2</sub>	XantPhos	zinc	<i>t</i> BuOK	toluène	110°C	24 h	pas d'avancement <sup>a</sup>
7	[175]	<b>77</b>	Co(dppf) <sub>2</sub>	--	zinc	pyridine	MeCN	80°C	16 h	déshalogénéation <sup>a</sup>

<sup>a</sup> résultats donnés par analyse des bruts réactionnels en <sup>1</sup>H RMN.

Bien qu'ayant des rendements modestes, les premières conditions réactionnelles trouvées ont permis d'isoler les produits attendus et ont donc été retenues pour la suite des synthèses (**Tableau 13** entrées 1 & 2).

### 2.2.2.2) Synthèse des sondes finales

De façon analogue aux synthèses des fluorophores à donneur 1*H*-indazole, les composés à indazoles substitués peuvent être obtenus par condensation de Knoevenagel ou réaction de Wittig. Dans un premier temps, trois molécules ont pu être synthétisée par condensation de Knoevenagel en partant du composé **111**, avec des rendements isolés compris entre 23% et 64% (**Schéma 82**). Ces rendements globalement inférieurs à ceux observés pour les groupements 1*H*-indazoles « simples » (77% – 86%, cf. **Chapitre 2** 2.2.2) p. 86) sont dû à des purifications plus délicates et des produits instables à la lumière (notamment le composé avec le groupement électroaccepteur pyridinium **129**).

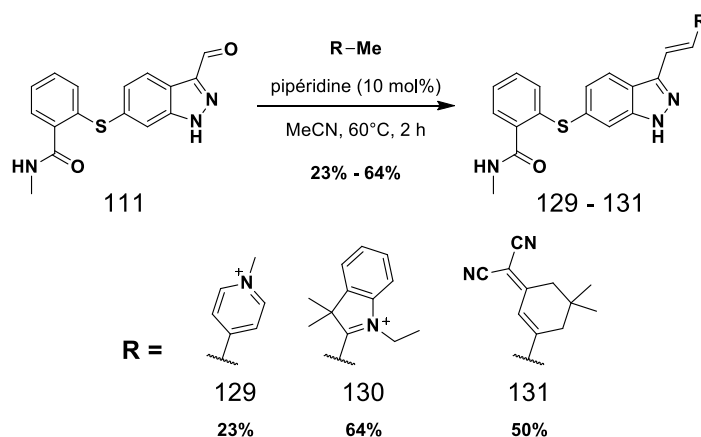


Schéma 82 : Synthèse de molécules finales par condensation de Knoevenagel.

Dans un second temps, l'intermédiaire indazole protégé **128** a été engagé dans des réactions de Wittig dans les conditions décrites précédemment (cf. **Chapitre 2** 2.3.2) p. 89, **Schéma 83**). Les produits **132** et **134** ont été isolés avec des rendements de l'ordre de grandeur de ceux pour les indazoles « simples », 39% et 50% respectivement (contre 41% et 51%). En présence de résine acide, les produits **133** et **135** ont pu être obtenus majoritairement. Une fois encore, les purifications difficiles ont entraîné des chutes de rendements supplémentaires, conduisant à des rendements isolés de seulement 25% et 33% respectivement.

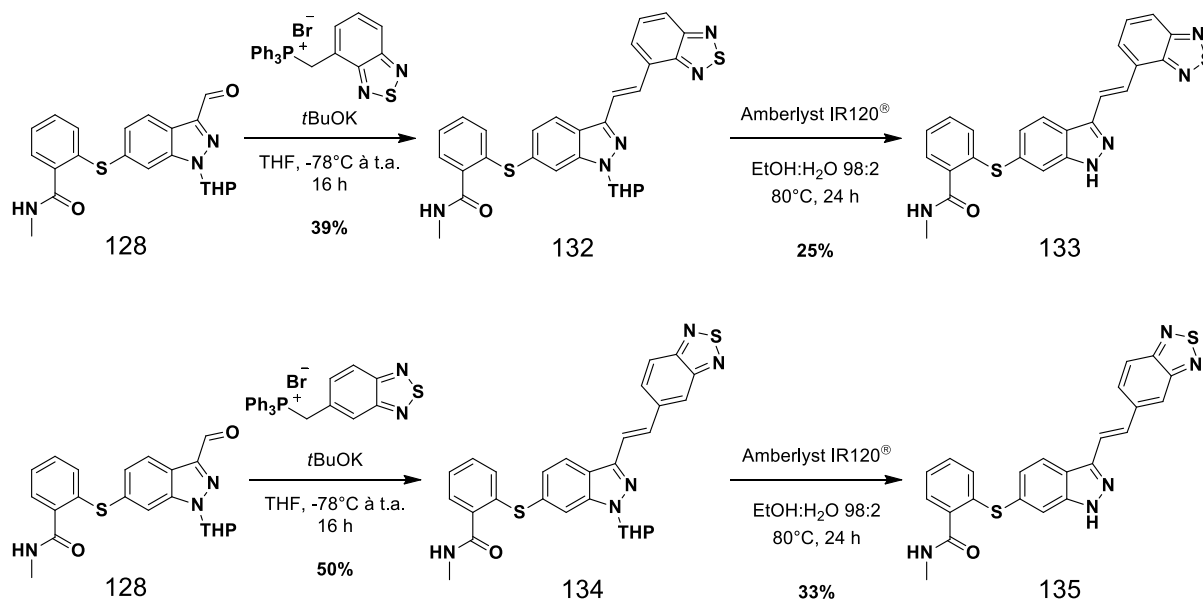


Schéma 83 : Synthèse de molécules finales par réaction de Wittig.

Ainsi, sept composés dérivés de la structure de l'axitinib ont pu être synthétisés au laboratoire (**Figure 87**). Le premier composé est un dérivé azoté obtenu après une étape clé de couplage de Buchwald-Hartwig puis une condensation de Knoevenagel, avec un rendement global de 30%. L'ensemble des autres composés possèdent le même substituant thioéther que l'axitinib. Pour cinq d'entre eux, l'indazole substitué (électrodonneur) et les groupements électroaccepteurs sont reliés par une liaison alcène. Leur synthèse s'est faite en 4 ou 6 étapes à partir du 4-bromo-2-nitrotoluène, *via* une étape clé de couplage de Migita palladocatalysée, avec des rendements globaux compris entre 3% et 13%. Le sixième composé **127** comporte une liaison alcyne et a été synthétisé directement à partir du 6-bromo-1*H*-indazole par deux couplages clés catalysés aux métaux de transition (Migita puis Sonogashira), avec un rendement global de seulement 1%.

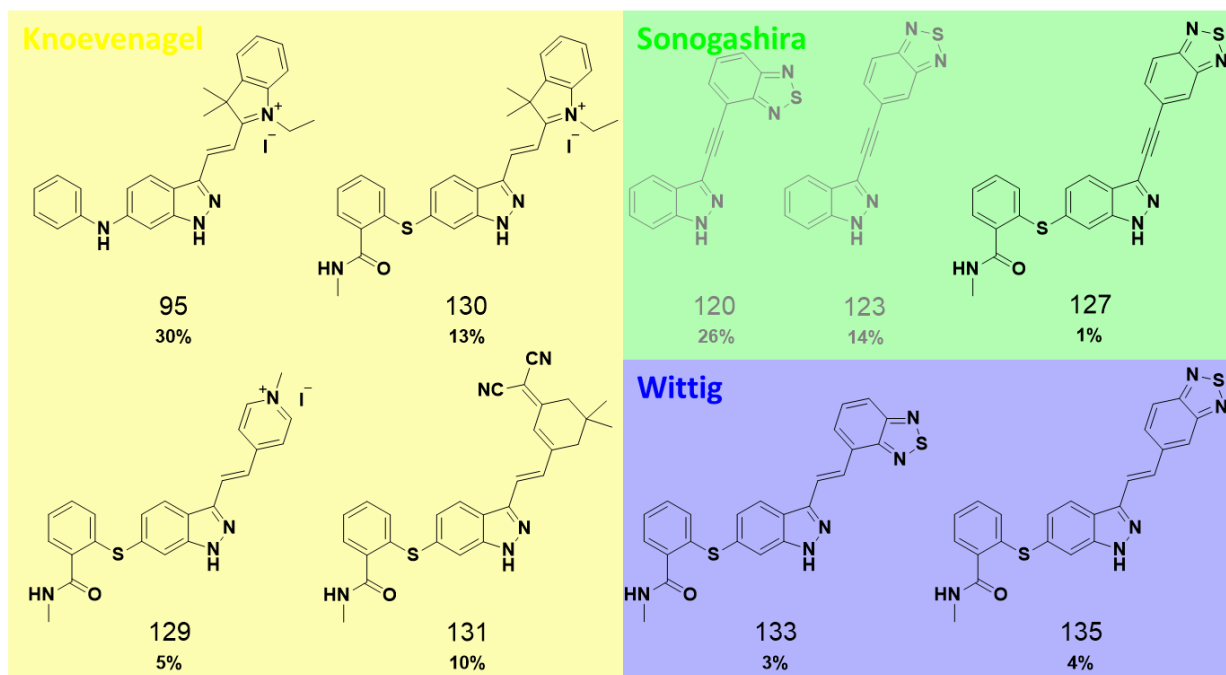


Figure 87 : Structures et rendements globaux de l'ensemble des sondes de la phase 2 de synthèse.

Les composés obtenus au cours de cette deuxième phase de synthèse étant inédits, ils ont ensuite été caractérisés par spectroscopie et comparés à leurs analogues avec un groupement électrodonneur 1*H*-indazole précédemment étudiés.

### 3) Études photophysiques

L'objectif de ma thèse étant de synthétiser des sondes photo-actives pour l'imagerie de fluorescence du VEGFr, les propriétés photophysiques des composés synthétisés ont dû être évaluées. Les études de l'influence de la polarité des solvants (solvatochromisme) et de la viscosité sur la fluorescence de ces molécules seront plus amplement développées dans cette partie. Ces résultats devraient me permettre de juger la force de ces donneurs indazoles substitués et les comparer à leurs analogues 1*H*-indazoles synthétisés précédemment (cf. **Chapitre 2 2**) p. 78) ainsi que l'influence de la nature du lien D- $\pi$ -A, où  $\pi$  est soit une liaison alcène, soit une liaison alcyne.

#### 3.1) Influence de la substitution du donneur indazole

##### 3.1.1) Solvatochromisme

Grâce à la synthèse préalable des sondes fluorescentes avec un donneur 1*H*-indazole « simple », il est maintenant possible d'établir une comparaison précise entre les divers groupements électrodonneurs du projet. Il est d'abord possible d'étudier l'influence de la substitution du noyau indazole sur les propriétés spectroscopiques des fluorophores. L'axitinib **15** peut alors être directement comparé au composé **68** avec un groupement électroaccepteur pyridyle qui a été synthétisé par couplage de Heck (cf. **Chapitre 2 2.4**) p. 94, **Figure 88**). Les spectres d'absorption des deux composés se situent dans l'UV ( $\lambda_{em} < 400$  nm) et ne sont pas influencés par les solvants. La substitution du noyau indazole ne semble d'ailleurs pas influencer l'absorption des composés ( $\Delta\lambda_{abs}^{max} = 4$  nm, **Tableau 14**). En émission, seul l'axitinib présente un net solvatochromisme, signe du meilleur transfert de charge qui s'opère entre le donneur indazole substitué et l'accepteur pyridyle (avec  $\Delta\lambda_{em}^{max} \approx 30$  nm).

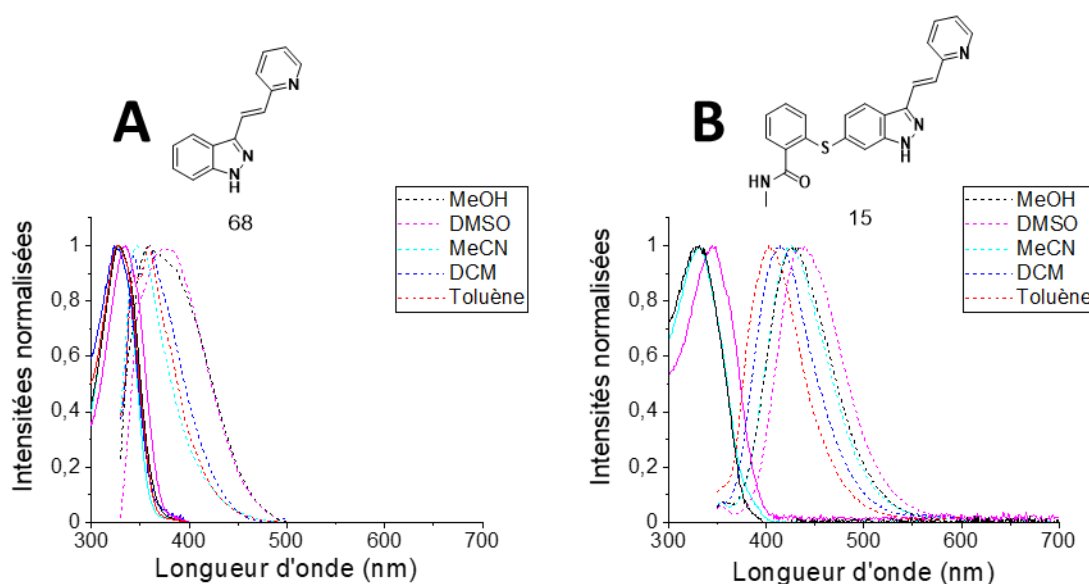


Figure 88 : Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (pointillés) dans divers solvants des composés à accepteur pyridyle et donneurs : A) 1*H*-indazole **68** et B) 1*H*-indazole substitué par un thioéther **15**.

Ces observations rejoignent la littérature, la modélisation des orbitales de l'indazole « simple » présentée précédemment (cf. **Figure 40** p. 67) mettant en évidence la contribution électronique relativement faible, mais non nulle, des carbones C5 et C6 à structure électronique leur HOMO. L'augmentation de la densité électronique disponible à ces positions par ajout d'un groupement électrodonneur comme un thioéther ou une amine contribue donc, bien que faiblement, au pouvoir électrodonneur de l'indazole. Cette augmentation de la densité électronique sur le donneur indazole est visible lors d'une augmentation du transfert de charge de la molécule ou une augmentation de ses déplacements de Stokes. Ces observations sont donc encourageantes pour la suite du projet qui vise à substituer la position C6 des indazoles par des groupements électrodonneurs dans le but de restaurer leur sélectivité pour les VEGFr.

**Tableau 14 : Comparatif des propriétés photo-physique de l'axitinib et de l'analogue 1H-indazole.**

# sonde	Accepteur	Donneur	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ (nm)		$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)		$\epsilon_{\text{MeCN}}$ à $\lambda_{\text{abs}}$ ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , nm)	$\Phi_{\text{DCM}} /$ $\Phi_{\text{MeCN}}$
			DCM	MeCN	DCM	MeCN		
axitinib	Pyridyle	1H-indazole substitué (thioéther)	330	330	377	387	-- <sup>a</sup>	4% / 2%
68		1H-indazole	326	326	348	360	22370 (330)	3% / 2%

<sup>a</sup> non déterminé

L'étude du solvatochromisme pour les dérivés de l'axitinib synthétisés au laboratoire a révélé un ensemble de comportements différents en fonction de la polarité des solvants. Pour les composés neutres comme avec les accepteurs isophorones **131**, 4- et 5-benzothiadiazole **133** et **135**, leur maxima d'absorption se situe autour de 400 nm avec un léger solvatochromisme (**Figure 89 A–C**). En revanche, en émission, tous ces composés sont sujets à un important solvatochromisme avec des déplacements de Stokes autour de 100 – 200 nm.

Pour un composé chargé comme **129** avec un accepteur pyridinium, ses maxima d'absorption subissent un solvatochromisme (**Figure 89 D**). La différence la plus notable entre ses spectres et ceux de son analogue avec un donneur 1H-indazole « simple » est la disparition du faible solvatochromisme qui était observé pour le composé **36**. En effet, les maxima d'émission de **129** sont invariables selon les solvants, seule l'acétonitrile y fait exception avec un décalage de 70 nm par rapport aux autres solvants qui n'est pas encore bien compris. Le déplacement de Stokes observé dans les autres solvants est non négligeable ( $\Delta\lambda \approx 100$  nm), en revanche, les rendements quantiques de fluorescence sont faibles (les spectres présentés ici ont été lissés). Ce faible rendement quantique de fluorescence pourrait s'expliquer par un effet de contre-ion où l'iodure joue le rôle d'atome lourd et favorise une conversion vers l'état triplet, ou bien par le caractère cationique du groupement pyridinium qui favorise la formation d'un état de type TICT généralement très peu fluorescent (cf. **Chapitre 1 1.4**) p. 46), comme précédemment observé par l'équipe de Prasad.<sup>[177]</sup>

Il est intéressant de noter que, contrairement à leur analogues 1H-indazole « simple », ces quatre composés sont au moins partiellement solubles dans l'eau, cependant, ils y sont plus faiblement fluorescents. Dans le cas des accepteurs benzothiadiazoles, il est possible de constater que leurs spectres d'émission dans l'eau sont similaires au DMSO, attestant d'une éventuelle agrégation du produit. Cette hypothèse est cohérente avec le spectre d'émission dans

le méthanol du composé avec l'accepteur 4-benzothiadiazole **135** (**Figure 89 A**), dont le maximum d'émission se situe entre celui du toluène et du DCM et est accompagné d'une queue de pic qui s'étire au-delà de 650 nm correspondant probablement au composé sous sa forme monomérique.

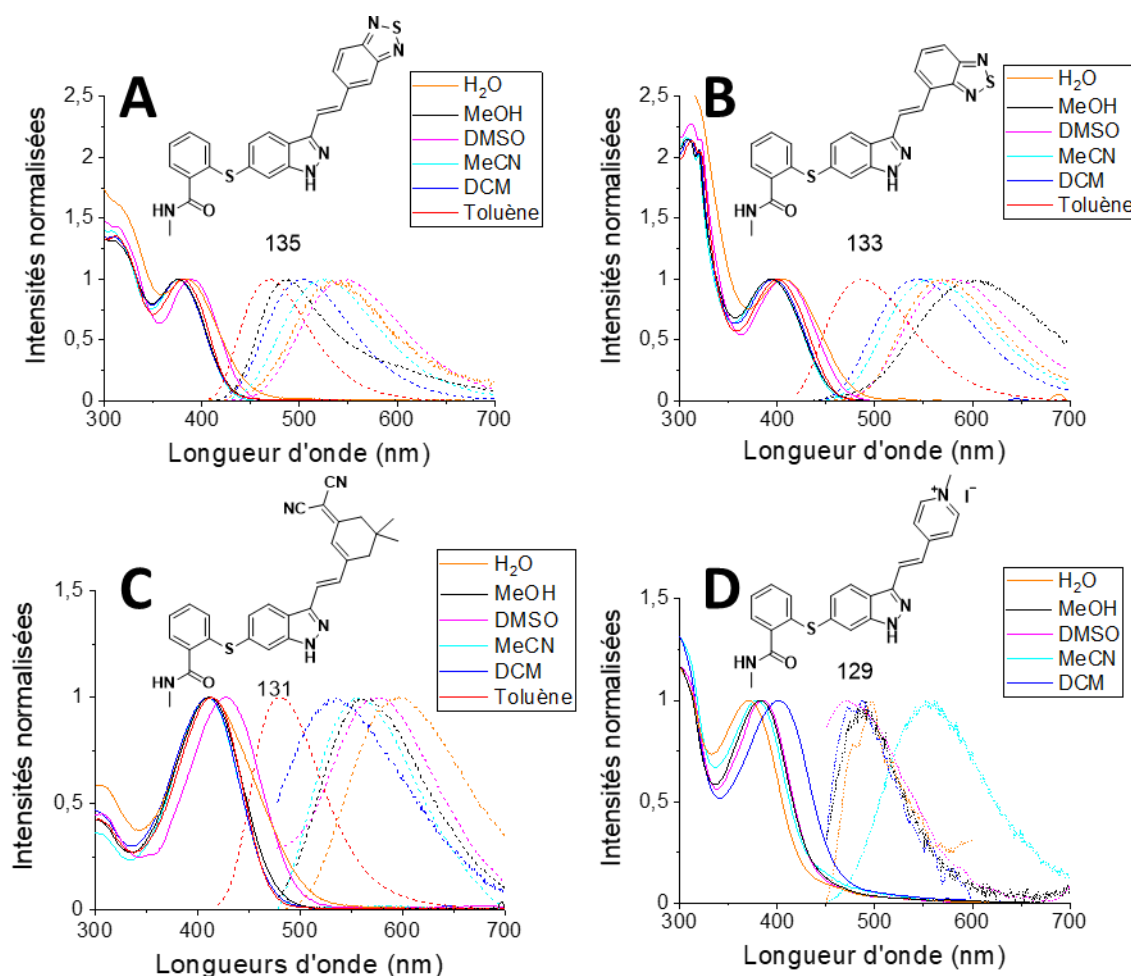


Figure 89 : Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (pointillés) dans divers solvants des composés à accepteurs : A) 5-benzothiadiazole **135**, B) 4-benzothiadiazole **133**, C) isophorone **131** & D) pyridinium **129**.

Il existe également des similitudes entre les spectres des analogues avec le groupement indolinium **37** et **130** (**Figure 90 A & B**). Pour ces deux composés, la basicité du solvant joue un rôle important sur la protonation, et donc la densité électronique, disponible sur le groupement indazole électrodonneur. Dans des solvants neutres (**Figure 90 A**) ou acidifiés, les spectres d'absorption et d'émission du composé ont des profils typiques des molécules captodatives et sont sensibles à la polarité des solvants. La fluorescence faible du composé **130** dans ces milieux acides ou neutres s'explique par un phénomène de photoblanchiment commun avec son analogue 1*H*-indazole « simple », qui sera plus amplement détaillé par la suite. En milieu basique (**Figure 90 B**), le profil des spectres se rapproche plus de ceux des cyanines avec des épaulements, bien qu'ils soient peu marqués dans le cas présent, et un déplacement de Stokes plus faible ( $\Delta\lambda \approx 35$  nm contre environ 100 nm en milieu neutre).

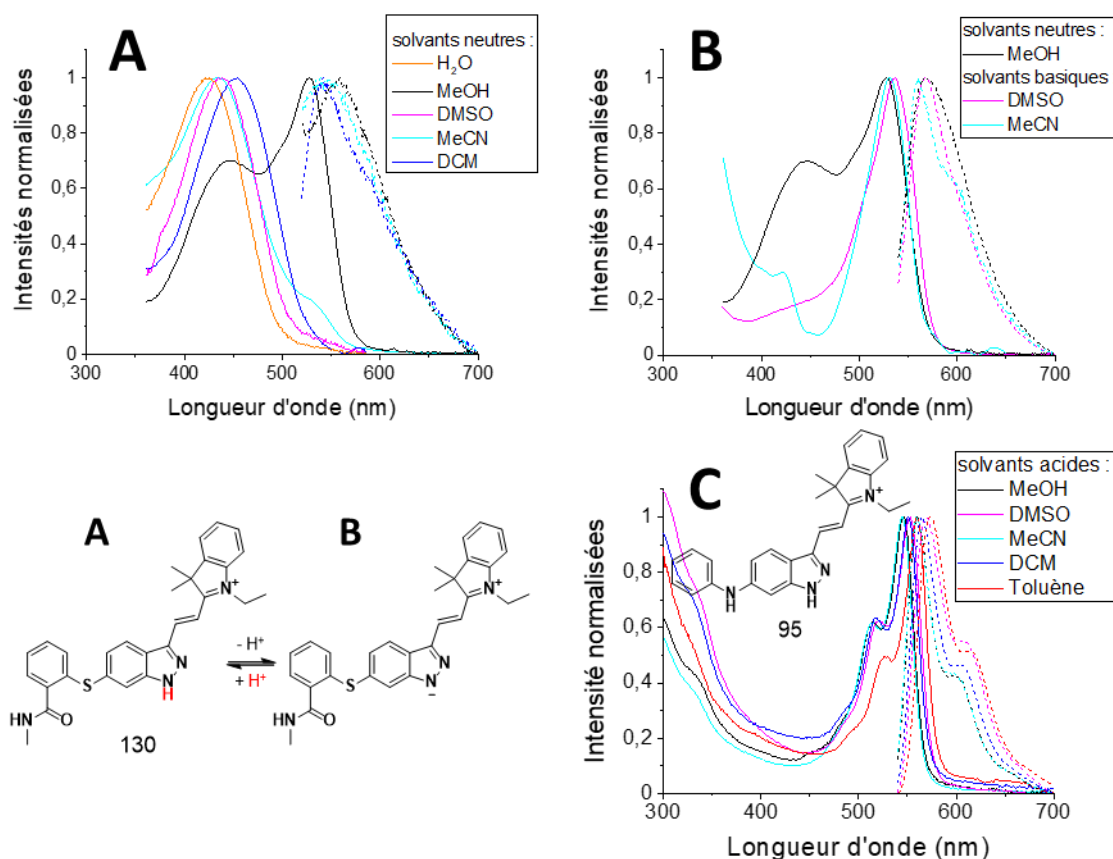


Figure 90 : Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (traits pointillés) des composés avec l'accepteur indolinium : A) & B) **130** dans divers solvants « neutres » ( $\lambda_{exc} = 440$  nm) et basifiés ( $\lambda_{exc} = 530$  nm), respectivement ; C) **95** dans divers solvants acidifiés.

Pour ces composés-là, il existe également une nette différence entre leurs rendements quantiques de fluorescence et ceux de leurs analogues *1H*-indazole. Dans le cas des *1H*-indazoles substitués, des rendements quantiques plus faibles sont principalement enregistrés (**Tableau 15**). Cette tendance laisse penser que le groupement thioéther influencerait peut-être plus les voies de désexcitations non-radiatives de ces composés que la structure électronique de leur HOMO et/ou leur LUMO. En effet, les atomes lourds comme le soufre peuvent favoriser les croisements intersystèmes qui permettent notamment la conversion de l'oxygène en oxygène singulet *via* l'état triplet du composé.

À l'inverse, le dérivé azoté **95** n'est pas comparable à son analogue *1H*-indazole « simple » (**Figure 90 C**). Ses spectres d'absorption comme d'émission ne sont pas sensibles à la polarité des solvants avec un déplacement de Stokes faible conservé d'un solvant à l'autre ( $\Delta\lambda_{em}^{max} \approx 15$  nm). Quel que soit le pH du milieu, ses spectres adoptent un profil typique des cyanines tel que décrit ci-dessus, témoignant de la bonne répartition de la charge sur l'ensemble du nuage électronique de la molécule. Ses spectres présentent d'ailleurs plus de similitudes avec celui de la forme déprotonée de **130**, avec des maxima d'émission autour de 560 – 570 nm (**Tableau 15**). Ces différences pourraient s'expliquer par la nature des substituants du donneur indazole : l'aniline étant un meilleur groupement électrodonneur que le thioéther, un donneur *1H*-indazole plus riche en électron favoriserait une forme cyanine. Une autre explication possible est liée à l'aromaticité de l'indazole, décrite comme « quinonique » en absence de

substituants (cf. **Chapitre 2 1.1**) p. 66). Il est possible que la présence du groupement aniline réduise l'aromaticité de l'indazole et, par conséquent, favorise la délocalisation électronique, stabilisant sa forme « cyanine » comme montré sur d'autres mérocyanines.<sup>[178]</sup>

**Tableau 15 : Comparaison des propriétés photophysiques des sondes à donneurs 1H-indazoles.**

# sonde	Accepteur	Donneur	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ (nm)		$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)		$\epsilon_{\text{MeCN}}$ à $\lambda_{\text{abs}}$ ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , nm)	$\Phi_{\text{DCM}} /$ $\Phi_{\text{MeCN}}$
			DCM	MeCN	DCM	MeCN		
<b>axitinib</b>	Pyridyle	1H-indazole substitué (thioéther)	330	330	377	387	-- <sup>a</sup>	4% / 2%
<b>68</b>		1H-indazole	326	326	348	360	22370 (330)	3% / 2%
<b>129</b>	Pyridinium	1H-indazole substitué (thioéther)	401	378	486	556	-- <sup>b</sup>	-- <sup>a,b</sup>
<b>36</b>		1H-indazole	406	383	494	507	12200 (380)	3% / 2%
<b>131</b>	Isophorone	1H-indazole substitué (thioéther)	409	409	534	557	-- <sup>b</sup>	1% / 1%
<b>42</b>		1H-indazole	413	413	553	563	36560 (415)	0% / 34%
<b>135</b>	5-benzothia diazole	1H-indazole substitué (thioéther)	375	375	503	526	-- <sup>b</sup>	14% / 29%
<b>54</b>		1H-indazole	379	379	490	522	22770 (380)	23% / 36%
<b>133</b>	4-benzothia diazole	1H-indazole substitué (thioéther)	395	394	544	556	-- <sup>b</sup>	28% / 37%
<b>53</b>		1H-indazole	398	399	530	557	-- <sup>b</sup>	92% / 0%
<b>95</b>	Indolinium	1H-indazole substitué (aniline)	550	544	564	559	-- <sup>b</sup>	8% / 5%
<b>130</b>		1H-indazole substitué (thioéther)	453	432 (531) <sup>c</sup>	541	545 (567) <sup>c</sup>	-- <sup>b</sup>	-- <sup>a,b</sup>
<b>37</b>		1H-indazole	402	384	512	537	33900 (435) <sup>a</sup>	0% / 29% <sup>a</sup>

<sup>a</sup> isomérisation du fluorophore dans les conditions de mesures, <sup>b</sup> non déterminé, <sup>c</sup> valeurs enregistrées en milieu basique

La substitution du noyau indazole par le groupement thioéther influence peu le profil des spectres d'absorption et d'émission des composés par rapport à leurs analogues 1H-indazole « simple ». L'augmentation des maxima d'absorption et d'émission est attribuée à une contribution du groupement thioéther à la densité électronique de l'indazole, augmentation sa force de groupement électrodonneur. La diminution est quant à elle associée à une diminution du rendement quantique de fluorescence des composés et attribuée à un effet d'atome lourd du soufre qui favorise les voies de déséxcitation non-radiative. Cependant, en absence de calculs théoriques, il n'est pas possible de valider ces hypothèses ni de prédire l'influence de la substitution des indazoles sur leur force d'électrodonneur.

### 3.1.2) Études du photoblanchiment

Parmi les composés synthétisés cours de ma thèse, un certain nombre d'entre eux se sont révélés instables sous irradiation. Les mécanismes de photoblanchiment ou de photochromismes de ces molécules ayant été amplement détaillés précédemment (cf. **Chapitre 2 3.1.5**) p. 112), nous nous intéresserons ici à l'influence de la substitution du



cycle indazole sur le photoblanchiment des composés. Le composé **37** avec le donneur 1*H*-indazole « simple » et l'accepteur indolinum avait été étudié pour sa capacité à cycliser de façon réversible sous irradiation. Deux autres composés avec le même accepteur ayant été synthétisés, leur stabilité a également été testée.

Tout comme pour les études dans différents solvants, les composés **95** et **130** montrent deux comportements distincts sous irradiation (**Figure 91**). Le composé **95** s'avère stable même après plusieurs minutes d'irradiation, contrairement à ses analogues avec les donneurs 1*H*-indazoles « simple » **37** et substitué par un thioéther **130**, dont l'intensité de fluorescence semble décroître jusqu'à un plateau en deux minutes environ. Les spectres typiques des cyanines ainsi que la stabilité sous irradiation du composé **95** trouvent plus similitudes avec la forme déprotonée (en milieu basique) de son analogue 1*H*-indazole. En effet, il a été démontré pour ce dernier que sa cyclisation ne peut pas se faire en milieu basique. Cette hypothèse est cohérente avec la forme cyanine de sa forme déprotonée qui signifie que sa densité électronique est très répartie sur son système  $\pi$  et dont découle une diminution de la nucléophilie des atomes d'azote du cycle indazole. Cette explication peut s'étendre au composé **95** dont le profil « cyanine » du spectre est encore plus marqué bien qu'il se trouve sous sa forme protonée. Ce phénomène de fatigue n'est pas non plus observé lors du suivi du retour de l'absorbance à 450 nm à 50°C.

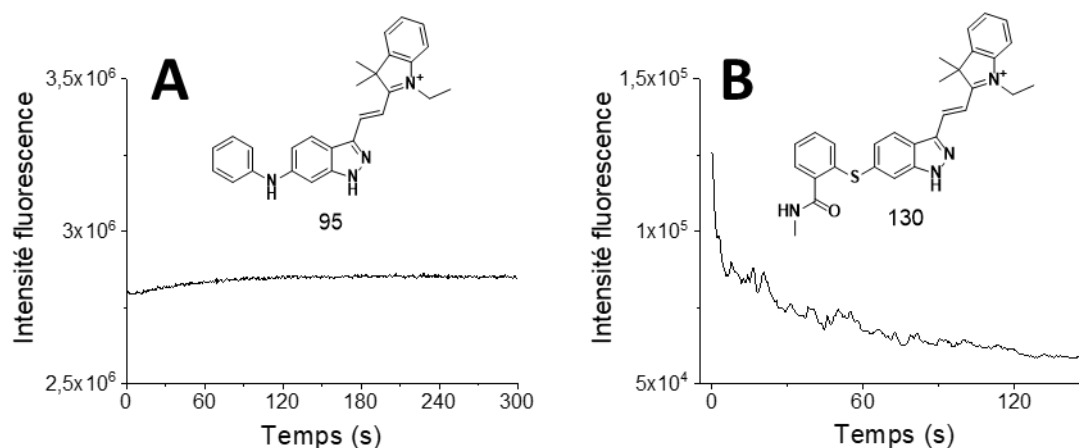


Figure 91 : Evolution au cours du temps de la fluorescence des composés : A) **95** à 570 nm ( $\lambda_{exc} = 550$  nm) & B) **130** à 520 nm ( $\lambda_{exc} = 450$  nm).

L'étude de la cyclisation et de sa réversibilité n'a donc été réalisée que pour le composé **130**. Tout comme pour son analogue à donneur 1*H*-indazole « simple » **37**, la cyclisation a été suivie grâce à la diminution de l'intensité de fluorescence du composé à 520 nm puis l'ouverture du cycle a été suivie grâce au retour de l'absorbance du mélange à 450 nm (**Figure 92**). Les courbes suivent globalement les mêmes tendances, cependant, l'intensité de fluorescence semble diminuer de moins en moins au cours du temps. Cette observation surprenante peut difficilement être associée à une fatigue qui conduirait à une diminution globale de la fluorescence du mélange et non à son augmentation après plusieurs cycles d'irradiation.

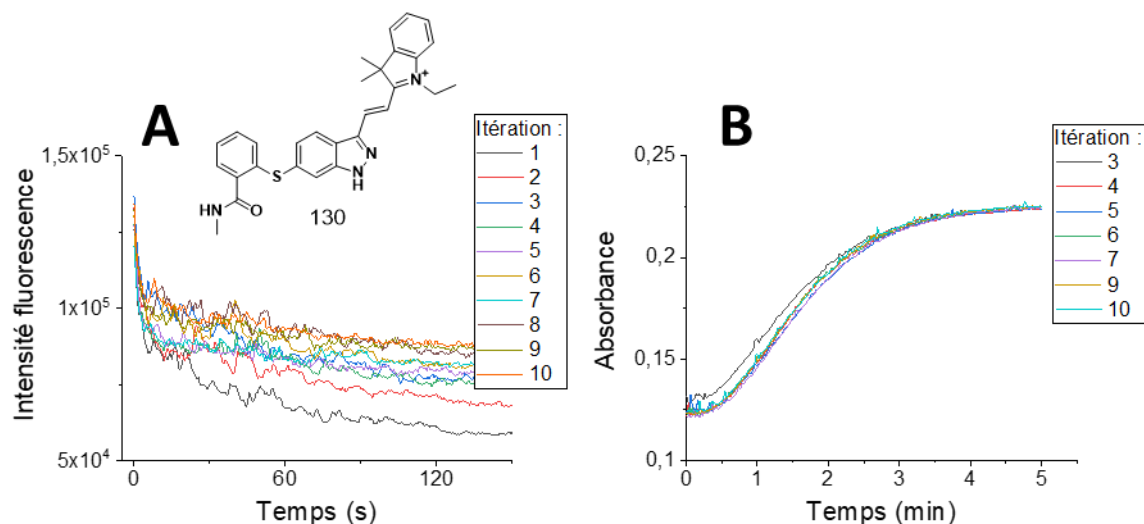


Figure 92 : Cinétiques de : A) la disparition de fluorescence de **130** dans le DMSO acide à 520 nm ( $\lambda_{exc} = 450$  nm, à 20°C) ; B) retour de l'absorption de **130** à 450 nm (à 50°C).

Cette même tendance est plus évidente encore lorsque la fluorescence est enregistrée à un temps donné pour toutes les itérations du processus de cyclisation/ouverture de cycle (traits pleins, **Figure 93**). Une explication possible de ce phénomène est associée à la précision de la mesure pour un composé dont la fluorescence est faible, notamment comparé à son analogue *1H*-indazole (**Figure 93**). Une autre explication est liée aux cinétiques de ce processus de cyclisation/ouverture de cycle. En effet, lors des études sur le dérivé *1H*-indazole « simple » **37**, il a été montré que la cyclisation comme l'ouverture de cycle atteignaient des plateaux nets en moins de deux minutes, permettant de le qualifier de « photo-switch efficace ». Bien que dans le cas du composé **130** les temps de mesures aient été augmentés, ces plateaux ne sont pas aussi marqués que ce soit en fluorescence ou en absorbance. Dans le cas de la fluorescence plus particulièrement, le dérivé *1H*-indazole montrait un profil atypique avec deux décroissances distinctes qui avaient été associée à l'isomérisation de la double liaison puis à la cyclisation. Or, seule la décroissance rapide associée à l'isomérisation est observée pour le composé **130**, il est donc possible que la cyclisation soit incomplète après 150 secondes d'irradiation, voire qu'elle n'ait pas lieu du tout (illustré à droite, **Figure 93**).

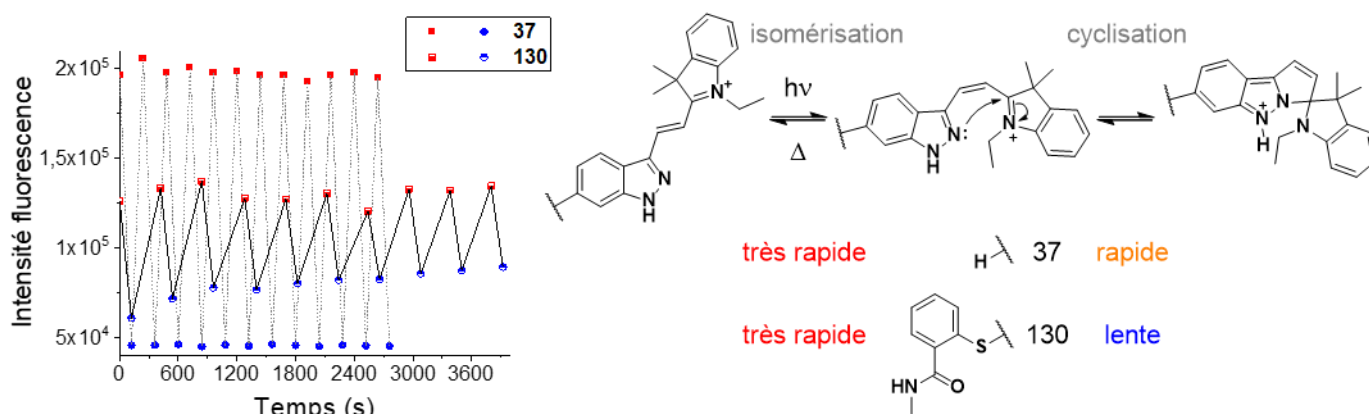


Figure 93 : Comparaison des minima et maxima de l'intensité de fluorescence de **37** et de **130** dans le DMSO acide au cours des différentes itérations de cyclisation/ouverture du cycle.

Pour conclure, la substitution du noyau indazole semble influencer fortement la stabilité des divers composés sous irradiation. Dans le cas des composés avec l'accepteur indolinium par exemple, en absence de substitution, le phénomène de photo-switching efficace observé peut être ralenti, voire complètement inhibé, par l'ajout de substituants. Ces observations démontrent la sensibilité des groupements électrodonneurs indazoles à la substitution et donc la finesse avec laquelle il est possible de faire varier leurs propriétés photophysiques.

### 3.1.3) Études en viscosité

Pour les composés stables sous irradiation, il est possible de mesurer l'influence de la viscosité du milieu sur leur fluorescence. Comme discuté précédemment, ces mesures ont été effectuées en gamme de température : la fluorescence d'un même échantillon dans l'éthylène glycol a été enregistrée à différentes températures (cf. **Chapitre 2** 3.2.2) p. 119).

De façon assez satisfaisante, des augmentations des intensités de fluorescence proportionnelles à la viscosité sont observées pour l'ensemble des composés (**Figure 94**, **Tableau 16**). Par exemple, le composé avec un accepteur indolinium **95** est le plus sensible à la viscosité, avec un des meilleurs coefficients enregistrés pour l'ensemble des composés synthétisés. Le composé avec l'accepteur isophorone **131** est également sensible à la viscosité, bien que ses rendements quantiques soient inférieurs à ceux du composé **95**. En revanche, les dérivés des benzothiadiazoles sont bien moins sensibles à la viscosité (**Tableau 16**).

Théoriquement, les coefficients directeurs  $\alpha$  de ces droites devraient être comparables car ils permettent de s'affranchir des méthodes de mesures. Cependant, j'ai démontré pour l'axitinib une différence entre les coefficients calculés lorsque la mesure est réalisée par gamme de solvants ou par gamme de température. L'ensembles des coefficients directeurs présentés **Tableau 16** ne peuvent donc pas être comparés au-delà d'une tendance générale entre les composés avec donneur 1*H*-indazole ou 1*H*-indazole substitué. Ces valeurs sont cependant cohérentes entre elles et il est donc possible que la sensibilité à la viscosité d'un composé soit principalement influencée par la nature du groupement électroaccepteur.

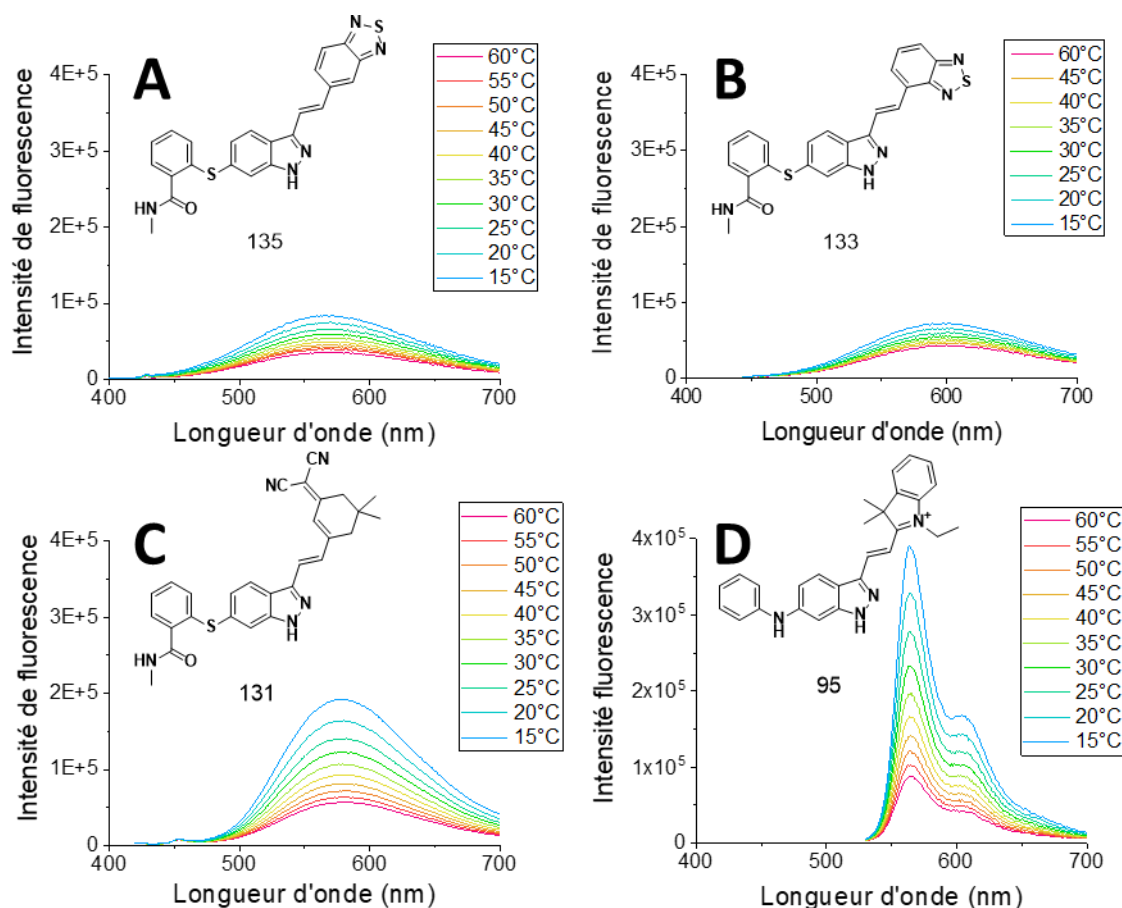


Figure 94 : Spectres d'émission dans l'éthylène glycol à différentes températures des composés 1H-indazole substitués par des groupements thioéther : A) 135 ( $\lambda_{exc} = 380$  nm), B) 133 ( $\lambda_{exc} = 400$  nm), C) 131 ( $\lambda_{exc} = 400$  nm) ; et des groupements aniline : D) 95 ( $\lambda_{exc} = 520$  nm).

Tableau 16 : Coefficients directeurs des droites de corrélation fluorescence-viscosité des composés avec un donneur 1H-indazole substitué.

#	135	54	133	53	131	42	95	37
Donneur	Thioéther	1H-indazole	Thioéther	1H-indazole	Thioéther	1H-indazole	Aniline	1H-indazole
Accepteur	5-benzothiadiazole		4-benzothiadiazole		Isophorone		Indolinium	
$\alpha$	0,52	0,11 <sup>a</sup>	0,39	0,40 <sup>a</sup>	0,75	0,40 <sup>a</sup>	0,88	0,62
$r^2$	0,997	0,84 <sup>a</sup>	0,995	0,92 <sup>a</sup>	0,999	0,97 <sup>a</sup>	0,996	0,995

<sup>a</sup> mesures réalisées dans des mélanges de solvants

Contrairement à la méthode présentée précédemment pour les dérivés 1H-indazoles (cf. Chapitre 2 3.2.1) p. 117), l'analyse de l'influence de la viscosité sur la fluorescence en gamme de température est également adaptée aux composés peu sensibles comme les composés avec les accepteurs benzothiadiazoles. En revanche, elle nécessite l'irradiation un même échantillon et ne permet donc pas d'étudier les composés sujets à un photoblanchiment rapide comme la majorité des composés avec l'accepteur indolinium. Malgré tout, les mêmes tendances se retrouvent entre les séries avec les donneurs 1H-indazole et 1H-indazole substitué, la sensibilité des composés à la viscosité semblant être plus fonction du groupement électroaccepteur.

### 3.2) Influence de la nature du lien D- $\pi$ -A

Les études de modélisation moléculaires des interactions entre nos composés et le VEGFr réalisées par l'équipe de Pascal Bonnet ont mis en évidence la possibilité de faire varier la nature du lien  $\pi$  dans nos système D- $\pi$ -A sans affecter ces interactions. Ainsi, il a été envisagé de remplacer la liaison alcène par une liaison alcyne (D-alcyne-A). Cette modification est d'autant plus intéressante qu'elle empêchera complètement le phénomène de photoblanchiment déclenché par l'isomérisation de la liaison alcène chez certain de nos composés. Les trois composés synthétisés étant inédits, leurs propriétés photophysiques ont donc été étudiées et comparées à leurs analogues alcènes. Une attention particulière a été portée sur l'influence de la polarité et de la viscosité des solvants sur leur fluorescence.

#### 3.2.1) Solvatochromisme

Afin de pouvoir établir des points de comparaison, deux composés avec un donneur 1H-indazole « simple » ont été préalablement synthétisés et analysés (**Figure 95**). Le composé avec un accepteur 5-benzothiadiazole **120** présente deux bandes d'absorption dans l'UV ( $\lambda < 400$  nm) dont les maxima varient peu selon les solvants mais est sujet à un important solvatochromisme en émission. L'intensité de sa fluorescence est également fortement influencée par les solvants, semblant inversement proportionnelle à la polarité des solvants. Le composé avec un accepteur 4-benzothiadiazole **123** présente un profil complètement différent avec une unique bande d'absorption autour de 400 nm, invariable selon les solvants sauf dans le DMSO, dont la forme est typique des composés capto-datifs. Dans le DMSO, le décalage d'absorption s'explique sans doute par la formation d'une liaison hydrogène. À la différence du précédent, le composé **123** est sujet à un solvatochromisme d'émission bien plus léger, avec des déplacements de Stokes plus importants pour tous les solvants, même les plus apolaires ( $\Delta\lambda > 100$  nm). En revanche, son intensité de fluorescence est globalement faible.

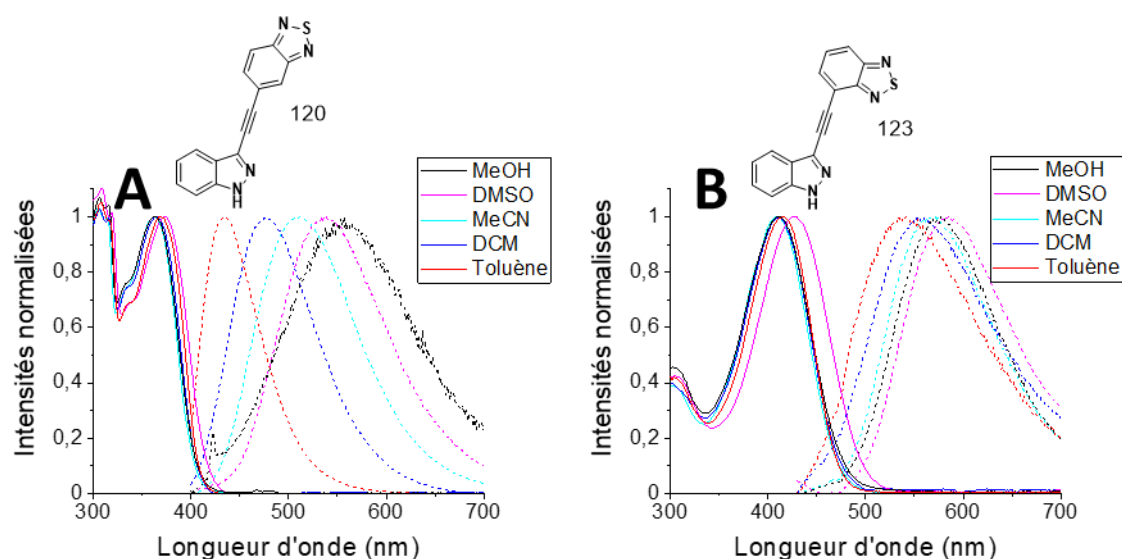


Figure 95 : A) & B) Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (traits pointillés) dans différents solvants des composés de structure D-alcyne-A, où D est un 1H-indazole **120** et **123**, respectivement.

Parmi les deux composés présentés ci-dessus, deux comportements distincts sont observés en fonction de la polarité des solvants. Cette distinction est surprenante car leurs analogues de la série alcène présentaient des spectres similaires, avec des longueurs d'ondes d'absorption et d'émission légèrement inférieures pour l'accepteur 5-benzothiadiazole. Ici, le profil des spectres du composé **120** (accepteur 5-benzothiadiazole) est conservé par rapport à son analogue alcène, avec deux bandes d'absorbance et un solvatochromisme très marqué (**Figure 95 A**). Les longueurs d'ondes maximums d'absorption et d'émission du composé alcyne sont légèrement inférieures à son analogue alcène (**Tableau 17**), attestant d'une légère perte de conjugaison au niveau du lien  $\pi$ . Ces variations s'accompagnent d'une augmentation du rendement quantique de fluorescence de **120** dans les solvants non-visqueux.

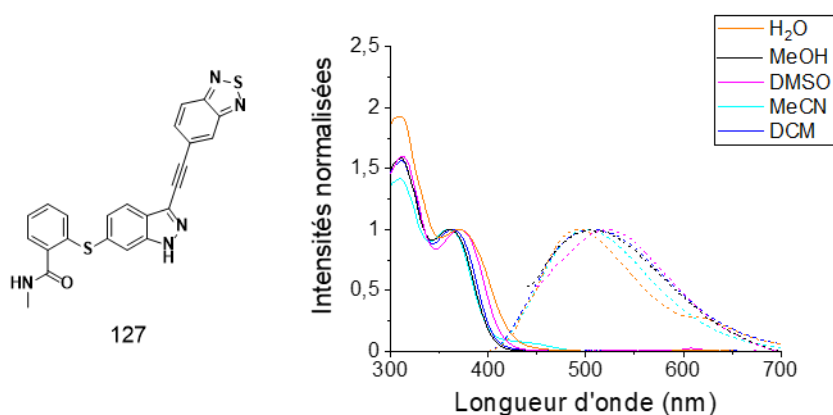
Contrairement au composé **120**, les spectres ainsi que les rendements quantiques du composé **123** (accepteur 4-benzothiadiazole) et son analogue alcène ne sont plus du tout comparables. Le profil des spectres de **123** est typique des composés capto-datifs et s'accompagne d'une diminution marquée de ses rendements quantiques de fluorescence dans l'ensemble des solvants étudiés (**Tableau 17**). À ce jour, je suis malheureusement incapable d'expliquer ces derniers résultats.

**Tableau 17 : Comparaison des propriétés photophysiques des sondes de structure D- $\pi$ -A, où D est un groupement 1H-indazole.**

# sonde	Liaison $\pi$	Accepteur	$\lambda_{exc}^{max}$ (nm)		$\lambda_{em}^{max}$ (nm)		$\epsilon_{MeCN}$ à $\lambda_{exc}$ ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ , nm)	$\Phi_{DCM} /$ $\Phi_{MeCN}$
			DCM	MeCN	DCM	MeCN		
<b>120</b>	Alcyne	5-benzothia diazole	364	362	476	511	-- <sup>a</sup>	39% / 34%
<b>54</b>	Alcène		379	379	490	522	22770 (380)	23% / 36%
<b>123</b>	Alcyne	4-benzothia diazole	412	409	555	568	-- <sup>a</sup>	0,1% / 0,2%
<b>53</b>	Alcène		398	399	530	557	-- <sup>a</sup>	92% / 0%

<sup>a</sup> non déterminé

Les spectres du composé avec un donneur 1H-indazole substitué **127** ont également été enregistrés dans différents solvants (**Figure 96**).



**Figure 96 : Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission (traits pointillés) dans différents solvants du composé **127** de structure D-alcyne-A, où A est un 1H-indazole substitué.**

Tout comme son analogue à donneur 1*H*-indazole **120** présenté ci-dessus, le composé **127** présente également deux bandes d'absorption dans l'UV. En revanche, l'émission du composé semble peu affectée par la nature du solvant, avec un important déplacement de Stokes d'environ 140 nm pour chaque solvant (**Figure 96, Tableau 18**). Cette modification du profil des spectres d'émission s'accompagne d'une importante diminution de ses rendements quantiques de fluorescence par rapport à ceux de son analogue (avec  $\Delta\Phi \approx 30\%$ ).

**Tableau 18 : Comparaison des propriétés photophysiques des sondes de structure D-alcyne-A, où A est l'accepteur 5-benzothiadiazole.**

# sonde	Donneur	Liaison $\pi$	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ (nm)		$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)		$\epsilon_{\text{MeCN}}$ à $\lambda_{\text{abs}}$ ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , nm)	$\Phi_{\text{DCM}} /$ $\Phi_{\text{MeCN}}$
			DCM	MeCN	DCM	MeCN		
<b>127</b>	1 <i>H</i> -indazole substitué	Alcyne	363	359	507	501	-- <sup>a</sup>	8% / 2%
<b>120</b>	1 <i>H</i> -indazole		364	362	476	511	-- <sup>a</sup>	39% / 34%

<sup>a</sup> non déterminé

Pour les trois composés D- $\pi$ -A synthétisés, où  $\pi$  est une liaison alcyne, aucune tendance générale ne semble se dessiner entre leurs différents spectres d'absorption et d'émission. Une fois encore, l'absence de calcul théoriques ainsi que le peu de références bibliographiques disponibles pour ces structures inédites (en particulier l'accepteur 5-benzothiadiazole) limitent ma capacité à rationaliser ces observations. Elles sont cependant encourageantes pour la suite du projet.

### 3.2.2) Études en viscosité

Un des objectifs de ma thèse étant de synthétiser une sonde pro-fluorescente sur la base des sondes conformationnelles, le lien alcène dans un motif D- $\pi$ -A avait initialement été retenu. En effet, les composés présentant ces structures D-alcène-A sont souvent sujets à la formation d'un état de transition dit « fantôme » qui favorise des voies de désexcitation non-radiative et qui est inhibé par la viscosité des solvants (cf. **Chapitre 1 1.4**) p. 46). Il existe cependant certains exemples de sondes conformationnelles dont l'axe de rotation est une liaison alcyne<sup>[52]</sup> ou diyne, tels que les dimères de porphyrines.<sup>[179]</sup> Dans le cas de ces molécules, c'est l'efficacité du croisement intersystème pour former l'état triplet en fonction de l'angle de rotation de la liaison qui est responsable de la modulation de la fluorescence.

La fluorescence des trois composés D-alcyne-A a donc été analysée dans l'éthylène glycol à différentes températures. L'ensemble des composés se sont révélés sensibles à la viscosité, avec une augmentation de leur intensité de fluorescence proportionnelle à la viscosité du solvant (**Figure 97**).

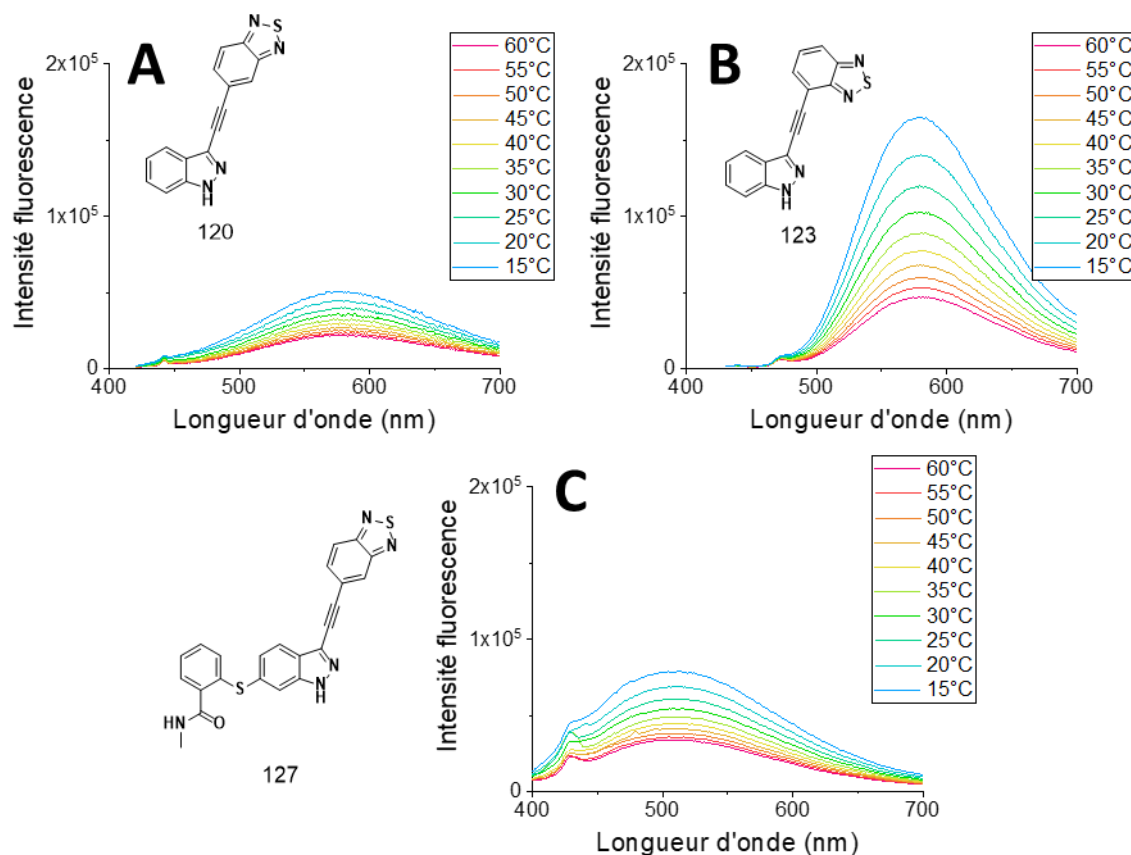


Figure 97 : Spectres d'émission dans l'éthylène glycol à différentes températures des composés D- $\pi$ -A, où D est un donneur : A) 1H-indazole **120** ( $\lambda_{exc} = 375$  nm), B) 1H-indazole **123** ( $\lambda_{exc} = 400$  nm), C) 1H-indazole substitué **127** ( $\lambda_{exc} = 380$  nm).

Tout comme pour leurs analogues alcènes, les composés avec accepteur 5-benzothiadiazole se montrent peu sensibles à la viscosité (**120** versus **123**, Tableau 19). De façon assez surprenante, ni la substitution sur le donneur indazole ni la nature du lien  $\pi$  ne semble influencer la sensibilité des composés à la viscosité des solvants ( $\alpha \approx 0,5$  pour **120**, **123** et **127**). En revanche, le composé 4-benzothiadiazole **127** est lui très sensible à la viscosité, ce qui est assez inattendu pour une molécule ne comportant pas de liaison alcène. De fait, le mécanisme qui le rend sensible à la viscosité devra être étudié.

Tableau 19 : Coefficients directeurs des droites de corrélation fluorescence-viscosité des composés D- $\pi$ -A.

# sonde	<b>120</b>	<b>123</b>	<b>127</b>	<b>135</b>
Accepteur	5-benzothia diazole	4-benzothia diazole	5-benzothia diazole	5-benzothia diazole
$\pi$	Alcyne	Alcyne	Alcyne	<b>Alcène</b>
Donneur	1H-indazole		1H-indazole substitué	
$\alpha$	0,51	0,77	0,52	0,52
$r^2$	0,996	0,999	0,996	0,997

Ainsi, la synthèse des analogues D-alcyne-A a ainsi permis de montrer que seule la nature du groupement électroaccepteur semble influencer la sensibilité à la viscosité des systèmes D- $\pi$ -A.



## 4) Conclusions et perspectives

L'objectif de cette seconde partie de ma thèse était de synthétiser puis d'étudier les propriétés photophysiques des systèmes D- $\pi$ -A, avec des indazoles substitués comme groupement électrodonneur (D). Inspirés par la structure et l'activité de l'axitinib **15**, les substituants sur l'hétérocycle indazole ont pour rôle de restaurer l'affinité de nos fluorophores pour le VEGFr. Dans le cas de l'axitinib, ce groupement est un thioéther aromatique et il avait donc été envisagé de le remplacer par une aniline, l'azote étant un meilleur donneur d'électrons qui devait contribuer davantage à la fluorescence des molécules finales.

Les synthèses des groupements électrodonneurs 6-anilino-1*H*-indazole s'articulent autour d'une étape de couplage de Buchwald-Hartwig. Deux voies de synthèse ont été optimisées pour l'aniline, choisie comme modèle, permettant d'obtenir les intermédiaires avancés **74** et **79** (**Figure 98**). Malgré de nombreux efforts synthétiques, les tentatives de couplages avec des anilines plus complexes se sont cependant soldées par des échecs.

Le choix du groupement d'affinité s'est donc orienté vers un groupement thioéther identique à celui de l'axitinib. Ainsi, quatre intermédiaires de synthèses avancés ont pu être obtenus avec succès *via* une étape de couplage de Migita (**109**, **124**, **111** & **128**, **Figure 98**).

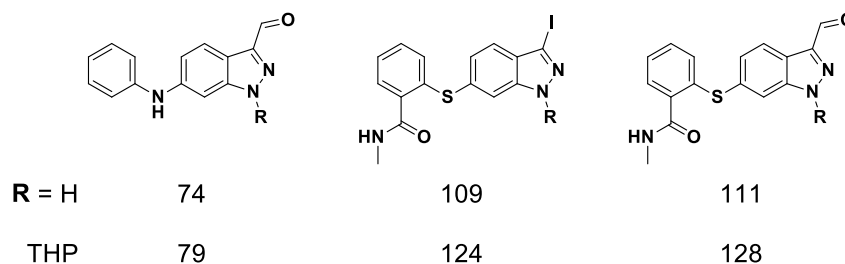


Figure 98 : Structure des intermédiaires communs avancés.

L'obtention de ces divers intermédiaires de synthèse a permis de synthétiser les systèmes D- $\pi$ -A désirés, avec divers groupements électroaccepteur (A), ainsi que de moduler la nature de la liaison  $\pi$  qui les lie aux indazoles (D). Les choix de la majorité des groupements électroaccepteurs et de la nature des liaisons  $\pi$  ont été guidés par des études de modélisation moléculaire réalisées hors du laboratoire. Les autres groupements électroaccepteurs ont été retenus par nécessité d'établir des points de comparaison avec les sondes synthétisées en phase 1 de ma thèse. Ainsi, sept molécules inédites ont été isolées avec des rendements globaux compris entre 1% et 30% (**Figure 99**).

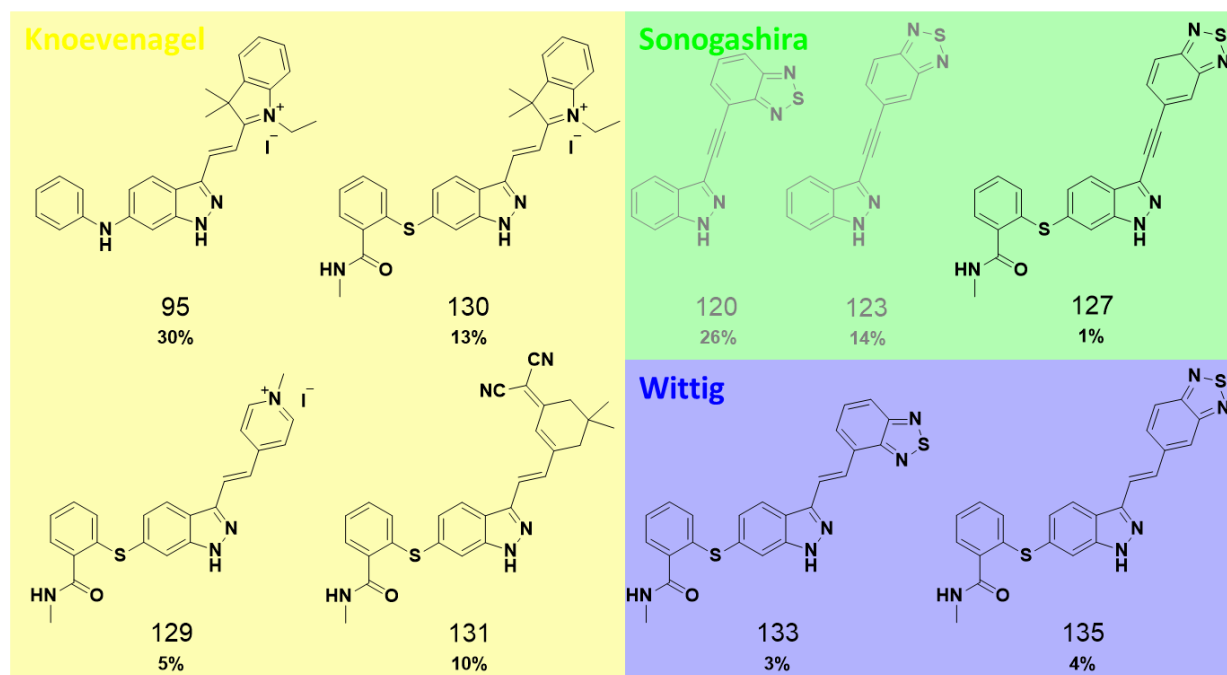


Figure 99 : Structure des composés synthétisés pour la phase 2 de ma thèse, avec groupement électrodonneur 1H-indazole « simple » (en gris) et substitué (en noir).

Ces molécules ont ensuite été analysées par spectroscopie d'absorption et d'émission. Ces études photophysiques ont permis de montrer que la substitution sur le noyau indazole pouvait influencer fortement les spectres d'absorption et d'émission des composés. Tout comme pour l'indazole déprotoné en milieu basique, il a été montré que l'augmentation de la densité sur l'indazole favorisait l'apparition d'une forme « cyanine » du composé. En absence de calculs théoriques, cependant, ces fluctuations dans les spectres des composés peuvent difficilement être rationalisés ou prédits.

L'autre résultat notable de ces études est que la liaison  $\pi$  entre les groupements électroaccepteurs et électrodonneurs affecte de façon variable le profil des spectres d'absorption et d'émission des divers composés. De manière surprenante, nos composés de type alcyne montre une certaine sensibilité à la viscosité.

La stabilité de quatre de ces composés ayant été prouvée, la suite logique du projet est de tester leur sélectivité et leur spécificité de marquage en imagerie de fluorescence sur cellule vivante. Le but de ces images étant d'imager sélectivement le VEGFr et donc de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'affinité pour le récepteur est bien liée à la substitution en position C6 de l'indazole, il est nécessaire d'utiliser des souches qui expriment le récepteur. Les cellules PC-12 utilisées lors des tests précédents n'exprimant pas de VEGFr, elles ne pourront servir que de contrôle. Une collaboration avec l'équipe du Pr. Vincent Richard et du Dr Ebba Brakenhielm (UFR pharmacologie, Université de Rouen), notamment spécialisée dans l'endothélium et l'angiogenèse, nous permettra d'obtenir des souches exprimant des VEGFr. Ces études initialement prévues pour mai 2020 ont été reportées, dû au caractère exceptionnel du confinement national (mars – mai 2020) lié à la crise sanitaire.



## Conclusion générale & perspectives

Afin de synthétiser des ligands photo-actifs pour imager sélectivement les VEGFr, mon travail de thèse s'est déroulé en deux phases :

1) la synthèse et l'étude photophysique de fluorophores à cœur indazole, afin de mieux comprendre leur comportement en tant que groupement donneur d'électrons ;

2) l'étude de l'influence de la substitution du noyau indazole sur les propriétés spectroscopiques et l'activité biologiques des fluorophores.

### 1) Résultats de synthèse

Les synthèses de la phase 1 se font à partir de produits commerciaux et peu coûteux en s'appuyant sur le savoir-faire du laboratoire. Les produits finaux ont pu être obtenus simplement et sur grande échelle si nécessaire, en seulement deux à quatre étapes, *via* une première réaction de nitrosation des indoles en indazoles puis une condensation de Knoevenagel ou une réaction de Wittig (**Schéma 84**).

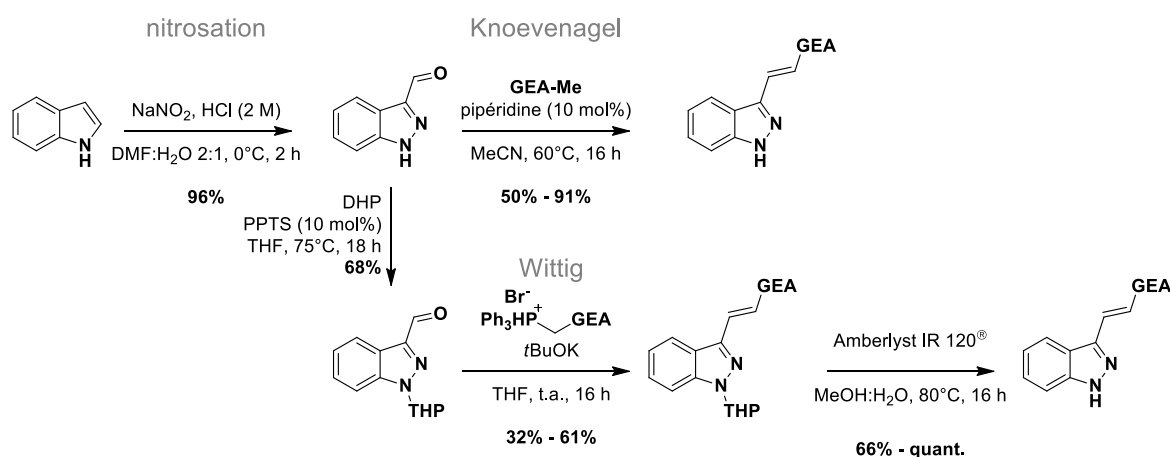


Schéma 84 : Synthèse des composés de phase 1.

Cette première phase de synthèse a permis d'obtenir douze fluorophores inédits de structure D- $\pi$ -A, où le groupement électrodonneur (D) est un 1H-indazole. La série a été ensuite complétée par quatre composés avec des donneurs indazoles méthylés, en position 1 et 2 (**Figure 100**).

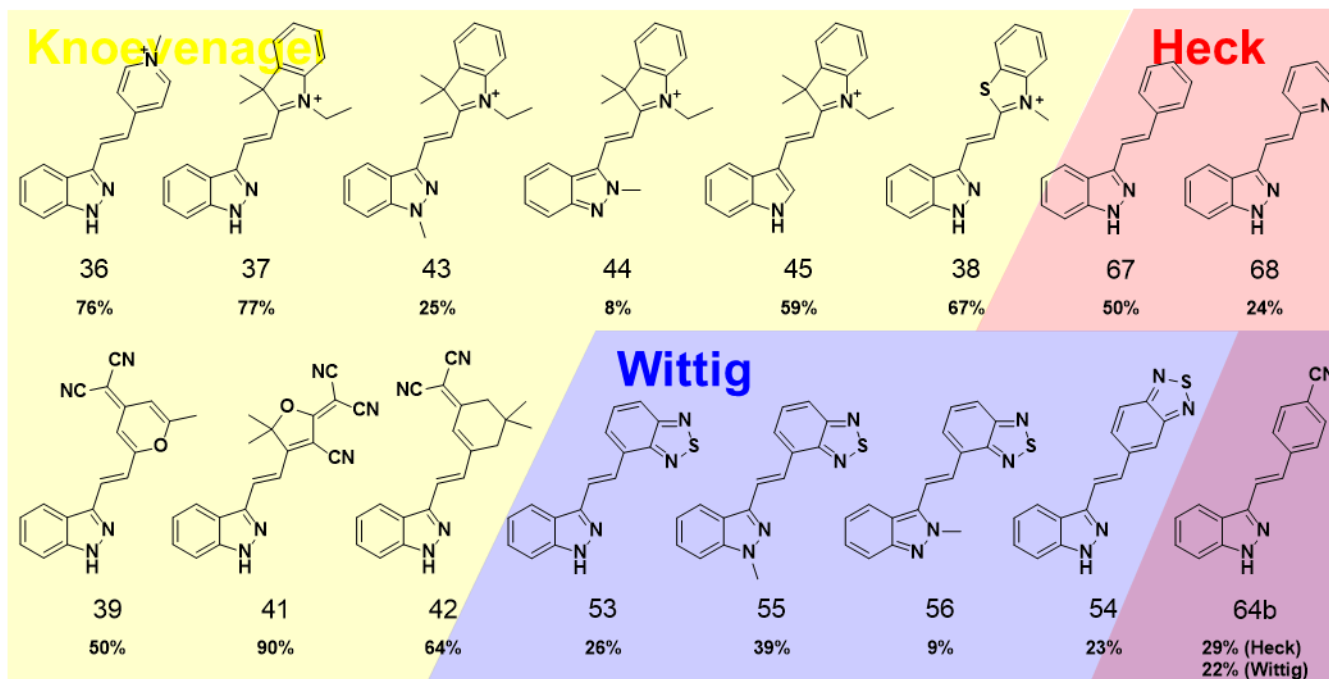


Figure 100 : Structures et rendements globaux des molécules synthétisées en phase 1.

La seconde phase de synthèse a nécessité l'optimisation de la synthèse du 6-bromoindole (publiée avec des rendements d'environ 30% en moyenne) puis l'obtention d'intermédiaires communs avancés *via* des étapes de couplages pallado-catalysés avec des hétéroatomes comme l'azote ou de soufre. Les intermédiaires **74** et **79** ont pu être synthétisés en 4 et 5 étapes respectivement, après une étape clé de couplage Buchwald-Hartwig tardif (**Figure 101**). Les intermédiaires **109**, **111** et **128** ont été obtenus en 2, 3 et 4 étapes de synthèse respectivement, par un couplage de Migita entre un halogénoindazole et un thiophénol substitué. L'intermédiaire **124** a été obtenu par protection de **109** (**Figure 101**).

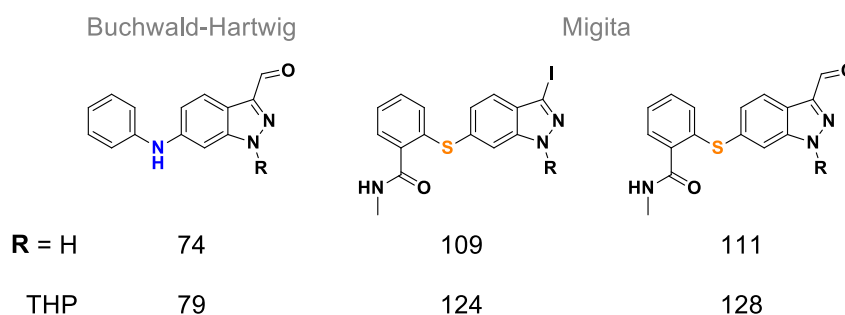


Figure 101 : Structure des intermédiaires de phase 2.

Cette seconde phase de synthèse a permis d'isoler sept autres fluorophores inédits, également de structure D- $\pi$ -A, où D est un indazole substitué (**Figure 102**).

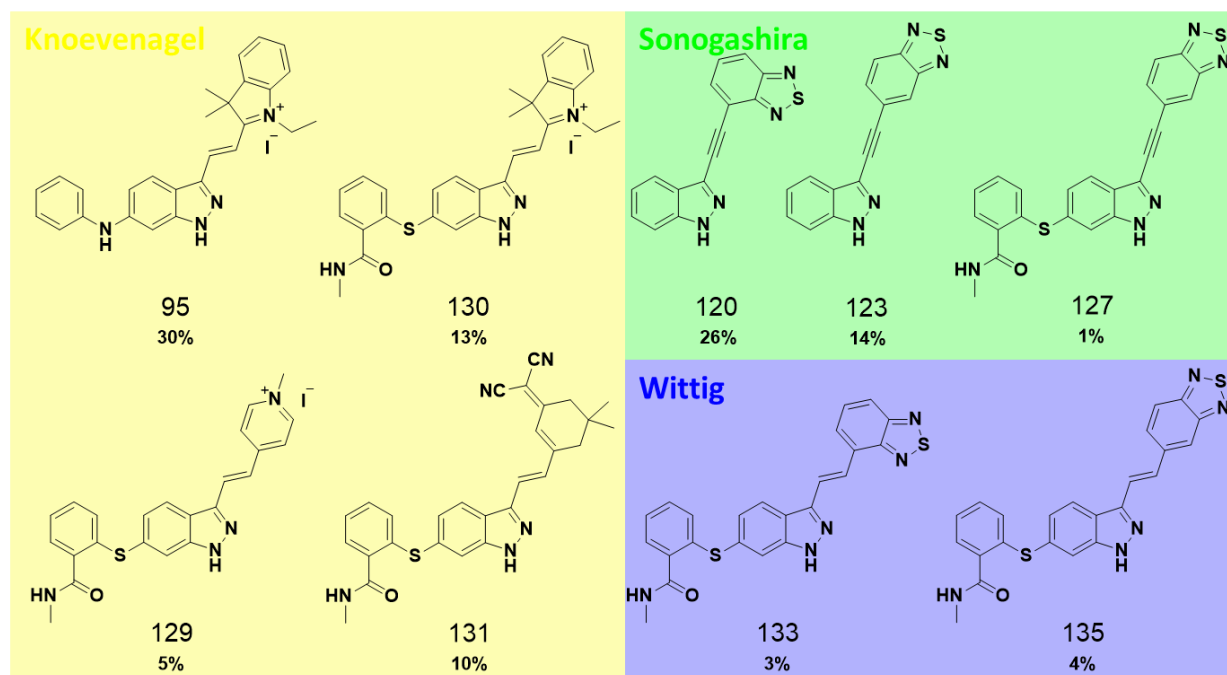


Figure 102 : Structures et rendements globaux des molécules de phase 2.

## 2) Résultats de spectroscopie de fluorescence

Les études spectroscopiques des composés de phase 1 ont mis en évidence que l'indazole est un groupement électrodonneur faible, dont la densité électronique peut être augmentée fortement lorsque son proton labile est « arraché » en milieu basique. De fait, l'indazole est particulièrement sensible à la capacité des solvants à former des liaisons hydrogène, ce qui démontre l'intérêt de ce cycle aromatique pour la conception de sondes sensibles à l'environnement. La présence d'un atome d'azote en position 2 permet également de construire des photo-*switch* dont l'efficacité et la stabilité sont principalement modulées par la nature des groupements électroaccepteur (A).

Grâce à une collaboration avec la plateforme d'imagerie Primacen, certains des composés de phase 1 ont pu être imagés par fluorescence sur cellules vivantes. Deux types de marquages spécifiques ont pu être montrés : les composés chargés manquant spécifiquement les mitochondries et les composés neutres s'accumulant dans des poches lipidiques. Cette première hypothèse a notamment pu être validée par des expériences de colocalisation avec le MitoTracker Green, commercial.

Les études photophysiques de ces composés de phase 2 ont mis en évidence que la substitution sur le noyau indazole pouvait influencer fortement les spectres d'absorption et d'émission des composés, les faisant passer d'une forme capto-dative à une forme « cyanine ». Un autre résultat parmi les plus inattendu de ces études est que les composés avec les accepteurs benzothiadiazoles et une liaison alcyne sont sensibles à la viscosité.

### 3) Perspectives

Un des résultats les plus inattendus de cette thèse et actuellement en cours d'étude est la capacité des structures D- $\pi$ -A, où D est un donneur 1*H*-indazole « simple », à cycliser de façon intramoléculaire. Afin de compléter ces travaux, des études RMN des formes cyclisées et des mesures sur d'autres des composés doivent être réalisées afin de démontrer leur structure, ainsi que des mesures à différents pH pour mieux comprendre les mécanismes impliqués. Les fluorophores à donneurs indazoles étant peu récurrents dans littérature, ce travail met en lumière une capacité encore jamais renseignée des indazoles à jouer le rôle de photo-acides. Des applications en synthèse ou en optoélectroniques peuvent être envisagées.

L'axe principal a développé à la suite de cette thèse reste la possibilité d'exploiter ces composés en tant que sondes fluorescentes. L'objectif premier du projet étant de synthétiser des sondes pour l'imagerie de fluorescence du VEGFr, l'affinité et la sélectivité des composés pour les VEGFr devra être testée, notamment pour les composés de phase 2 qui comportent les groupements d'affinité. Des premiers tests d'imagerie de fluorescence sur cellules vivantes exprimant les VEGFr (souches différentes de celles précédemment utilisées) sont prévus en collaboration avec la plateforme d'imagerie Primacen et l'équipe du Pr. Vincent Richard et du Dr Ebba Brakenhielm, notamment spécialisée dans l'endothélium et l'angiogenèse. Ces images permettront de valider la possibilité de faire du marquage spécifique des VEGFr à l'aide de nos molécules.

Ces sondes ne sont pas pour autant idéales, en effet, nous avons observé des phénomènes de dégradation sur certains composés. Une des plus grandes limites de l'imagerie de fluorescence discutée précédemment (cf. **Chapitre 1 I.1.3**) p. 26) est la pénétration dans les tissus biologiques. Les tissus absorbant et diffusant une grande partie des rayonnements UV et visible, il est nécessaire de travailler à des longueurs d'ondes d'absorption et d'émission plus élevées (rouge et proche IR) afin de pouvoir sonder les couches plus profondes. Pour ce faire, la première possibilité est de remplacer les groupements électroaccepteurs de nos molécules par des accepteurs plus fort que ceux déjà utilisés.

La seconde possibilité est de recourir à l'absorption deux photons (ADP, ou absorption biphotonique). L'ADP un processus non-linéaire qui consiste en l'absorption simultanée de deux photons incidents par une même molécule. La somme des énergies des photons absorbés étant égale à la différence énergétique entre les niveaux fondamental et excité de la molécule, les longueurs d'ondes des rayonnements incidents sont environ deux fois supérieures à celles utilisées en absorption monophotonique (**Figure 103 A**). Les deux avantages majeurs de l'ADP sont une meilleure pénétration dans les tissus (liée aux longueurs d'ondes supérieures utilisées) et un volume d'excitation très localisé (**Figure 103 B**). La capacité d'une molécule organique à absorber à deux photons étant définie par sa section efficace d'absorption à deux photons, ces dernières devront d'abord être mesurées. La section efficace d'une molécule augmentant avec sa polarisabilité, les composés avec des accepteurs benzothiadiazoles sont de bons candidats pour ce type d'imagerie.

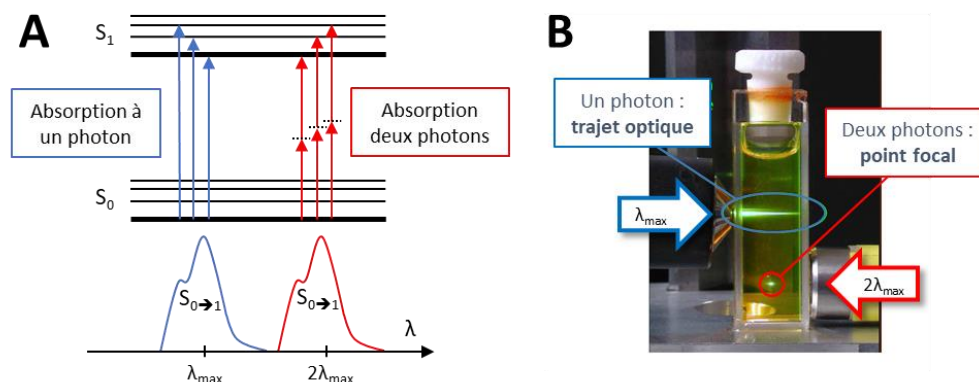


Figure 103 : A) Diagramme de Perrin-Jablonski illustrant les différences entre les absorptions mono- et biphotonique ; B) Mise en évidence des différences entre les volumes d'excitation pour un même fluorophore.

Un des axes à développer pour la suite du projet rejoint une des applications initialement prévues pour ces molécules de phase 2 si leur sélectivité est avérée. Dans le prolongement de ces tests d'imagerie, il est prévu d'utiliser ces molécules comme photosensibilisateurs pour venir photo-inactiver sélectivement les VEGFr à la surface cellulaire. Cette photo-inactivation sélective repose sur deux critères principaux : (i) la sélectivité de la sonde fluorescente pour sa cible, (ii) la capacité du fluorophore à déclencher des cascades réactionnelles *via* la génération d'espèces réactives comme des radicaux ou de l'oxygène singulet (cf. **Chapitre 1 2.2.1**) p. 54).

La génération d'oxygène singulet se fait par sensibilisation de l'oxygène du milieu par un fluorophore dans son état triplet. Cet état triplet est lui-même formé par croisement intersystème (CIS) depuis l'état excité singulet du fluorophore. La formation de l'oxygène singulet peut être observée de plusieurs façons, comme par dosage colorimétrique en présence de pièges à oxygène singulet, ou mesuré directement grâce à sa luminescence à l'aide d'un détecteur dans le proche infrarouge (1270 nm).

Ce CIS étant favorisé par l'effet d'atome lourds, les composés comportant les accepteurs benzothiadiazoles et avec de faibles rendements quantiques seront donc de bons candidats (**127** et **135**, par exemple, **Figure 104**). D'autres structures ont également été envisagées et pourront être testées dans la même optique (**Figure 104**).

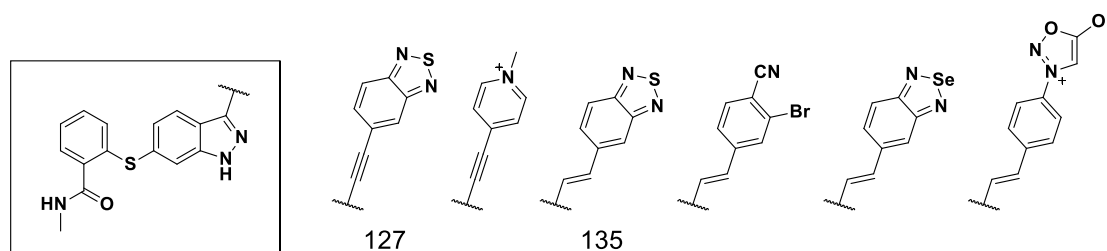


Figure 104 : Structures des composés **127** et **135** et autres groupements électroaccepteurs envisagés.

L'objectif sur le long terme est de pouvoir proposer un photosensibilisateur plus efficace, car sélectif des VEGFr (et donc des vaisseaux sanguins en croissance), que ceux actuellement utilisés en photothérapie dynamique. Cette sélectivité accrue devrait pouvoir limiter les risques principaux liés à l'actuelle photothérapie dynamique, notamment la destruction des cellules de l'œil trop peu spécifiques des vaisseaux sanguins, rendant ces opérations plus sûres et donc plus attractives que les traitements actuels contre la DMLA.





## Références bibliographiques

- [1] M. Hauser, M. Wojcik, D. Kim, M. Mahmoudi, W. Li, K. Xu, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 7428–7456.
- [2] W. C. Sanders, *Atomic Force Microscopy : Fundamental Concepts and Laboratory Investigations*, CRC Press, **2019**.
- [3] C. P. Cheng, in *Handb. Vasc. Motion* (Ed.: C.P. Cheng), Academic Press, **2019**, pp. 23–43.
- [4] T. Nagaya, Y. A. Nakamura, P. L. Choyke, H. Kobayashi, *Front. Oncol.* **2017**, *7*, DOI 10.3389/fonc.2017.00314.
- [5] K. Moghissi, M. R. Stringer, K. Dixon, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2008**, *5*, 235–237.
- [6] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, **2006**.
- [7] A. B. T. Ghisaidoobe, S. J. Chung, *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 22518–22538.
- [8] C. Ince, J. M. C. C. Coremans, H. A. Bruining, in *Oxyg. Transp. Tissue XIV* (Eds.: W. Erdmann, D.F. Bruley), Springer US, Boston, MA, **1992**, pp. 277–296.
- [9] A. Vogel, V. Venugopalan, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 577–644.
- [10] M. Zimmer, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2823–2832.
- [11] R. Y. Tsien, “The Nobel Prize in Chemistry 2008,” can be found under <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2008/tsien/lecture/>, **2008**.
- [12] “PDB101: Molecule of the Month: Green Fluorescent Protein (GFP),” can be found under <http://pdb101.rcsb.org/motm/42>, **n.d.**
- [13] C. S. McKay, M. G. Finn, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1075–1101.
- [14] A. Waggoner, in *Methods Enzymol.*, Academic Press, **1995**, pp. 362–373.
- [15] K. Renault, J. W. Fredy, P.-Y. Renard, C. Sabot, *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 2497–2513.
- [16] J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1211–1219.
- [17] C. Freidel, S. Kaloyanova, K. Peneva, *Amino Acids* **2016**, *48*, 1357–1372.
- [18] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1388–1405.
- [19] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666–676.
- [20] J.-S. Lee, Y. K. Kim, M. Vendrell, Y.-T. Chang, *Mol. Biosyst.* **2009**, *5*, 411–421.
- [21] P. R. Selvin, in *Methods Enzymol.*, Academic Press, **1995**, pp. 300–334.
- [22] C. E. Rowland, C. W. Brown, I. L. Medintz, J. B. Delehanty, *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, 042006.
- [23] H. Sahoo, *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2011**, *12*, 20–30.
- [24] T. Heyduk, J. C. Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1990**, *87*, 1744–1748.
- [25] H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, Y. Urano, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2620–2640.
- [26] H.-W. Liu, L. Chen, C. Xu, Z. Li, H. Zhang, X.-B. Zhang, W. Tan, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 7140–7180.
- [27] H. Singh, K. Tiwari, R. Tiwari, S. K. Pramanik, A. Das, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 11718–11760.
- [28] H. Cheng, S.-Y. Li, H.-R. Zheng, C.-X. Li, B.-R. Xie, K.-W. Chen, B. Li, X.-Z. Zhang, *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 4349–4354.

- [29] J. Chan, S. C. Dodani, C. J. Chang, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 973–984.
- [30] A. T. Aron, K. M. Ramos-Torres, J. A. Cotruvo, C. J. Chang, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2434–2442.
- [31] S.-H. Park, N. Kwon, J.-H. Lee, J. Yoon, I. Shin, *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 143–179.
- [32] L. Zeng, E. W. Miller, A. Pralle, E. Y. Isacoff, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10–11.
- [33] A. Kaur, J. L. Kolanowski, E. J. New, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1602–1613.
- [34] X. Jiao, Y. Li, J. Niu, X. Xie, X. Wang, B. Tang, *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 533–555.
- [35] M. Abo, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Terai, T. Komatsu, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10629–10637.
- [36] S. Kenmoku, Y. Urano, H. Kojima, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7313–7318.
- [37] D. I. Danylchuk, S. Moon, K. Xu, A. S. Klymchenko, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 14920–14924.
- [38] M. Ipuý, C. Billon, G. Micouin, J. Samarut, C. Andraud, Y. Bretonnière, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3641–3648.
- [39] S.-C. Lee, J. Heo, H. C. Woo, J.-A. Lee, Y. H. Seo, C.-L. Lee, S. Kim, O.-P. Kwon, *Chem. – Eur. J.* **2018**, *24*, 13706–13718.
- [40] M. Biancalana, S. Koide, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2010**, *1804*, 1405–1412.
- [41] A. Dragan, A. E. Graham, C. D. Geddes, *J. Fluoresc.* **2014**, *24*, 397–402.
- [42] H.-P. Lai, R.-C. Gao, C.-L. Huang, I.-C. Chen, K.-T. Tan, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 16197–16200.
- [43] A. T. Krueger, H. Lu, A. H. F. Lee, E. T. Kool, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 141–150.
- [44] R. W. Sinkeldam, N. J. Greco, Y. Tor, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2579–2619.
- [45] N. G. Gubernator, H. Zhang, R. G. W. Staal, E. V. Mosharov, D. B. Pereira, M. Yue, V. Balsanek, P. A. Vadola, B. Mukherjee, R. H. Edwards, D. Sulzer, D. Sames, *Science* **2009**, *324*, 1441–1444.
- [46] S. Mah, J. Jang, D. Song, Y. Shin, M. Latif, Y. Jung, S. Hong, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *17*, 186–194.
- [47] D. Kim, H. Lee, H. Jun, S.-S. Hong, S. Hong, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2508–2516.
- [48] R. A. Azzam, G. H. Elgemeie, R. R. Osman, *J. Mol. Struct.* **2020**, *1201*, 127194.
- [49] H. Chen, J. Wang, X. Feng, M. Zhu, S. Hoffmann, A. Hsu, K. Qian, D. Huang, F. Zhao, W. Liu, H. Zhang, Z. Cheng, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 7946–7951.
- [50] S. Pajk, D. Knez, U. Košak, M. Zorović, X. Brazzolotto, N. Coquelle, F. Nachon, J.-P. Colletier, M. Živin, J. Stojan, S. Gobec, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**.
- [51] J. Dhuguru, W. Liu, W. G. Gonzalez, W. M. Babinchak, J. Miksovská, R. Landgraf, J. N. Wilson, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 4940–4947.
- [52] W. Rettig, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 971–988.
- [53] Z. R. Grabowski, J. Dobkowski, *Pure Appl. Chem.* **1983**, *55*, 245–252.
- [54] J. Sutharsan, D. Lichlyter, N. E. Wright, M. Dakanali, M. A. Haidekker, E. A. Theodorakis, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2582–2588.
- [55] M. A. Haidekker, E. A. Theodorakis, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1669–1678.
- [56] S. Sasaki, G. P. C. Drummen, G. Konishi, *J. Mater. Chem. C* **2016**, *4*, 2731–2743.
- [57] “FLT1 - Vascular endothelial growth factor receptor 1 precursor - Homo sapiens (Human) - FLT1 gene & protein,” can be found under <https://www.uniprot.org/uniprot/P17948>, **n.d.**

- [58] “KDR - Vascular endothelial growth factor receptor 2 precursor - Homo sapiens (Human) - KDR gene & protein,” can be found under <https://www.uniprot.org/uniprot/P35968>, **n.d.**
- [59] “FLT4 - Vascular endothelial growth factor receptor 3 precursor - Homo sapiens (Human) - FLT4 gene & protein,” can be found under <https://www.uniprot.org/uniprot/P35916>, **n.d.**
- [60] A.-K. Olsson, A. Dimberg, J. Kreuger, L. Claesson-Welsh, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 359–371.
- [61] E. Stuttfeld, K. Ballmer-Hofer, *IUBMB Life* **2009**, *61*, 915–922.
- [62] N. Rahimi, *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **2006**, *11*, 818–829.
- [63] M. McTigue, B. W. Murray, J. H. Chen, Y.-L. Deng, J. Solowiej, R. S. Kania, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 18281–18289.
- [64] W. Risau, *Nature* **1997**, *386*, 671–674.
- [65] N. Ferrara, A. P. Adamis, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*, 385–403.
- [66] J. Y. Jeon, A. Sparreboom, S. D. Baker, *Clin. Pharmacol. Ther.* **2017**, *102*, 726–730.
- [67] F. Musumeci, M. Radi, C. Brullo, S. Schenone, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10797–10822.
- [68] L. P. Aiello, *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 839–841.
- [69] W. L. Wong, X. Su, X. Li, C. M. G. Cheung, R. Klein, C.-Y. Cheng, T. Y. Wong, *Lancet Glob. Health* **2014**, *2*, e106–e116.
- [70] Cour des Comptes, “Rapport sur l’Application des Lois de Financement de la Sécurité Sociale,” can be found under <https://www.ccomptes.fr/system/files/2018-10/RALFSS-2018-07-soins-visuels.pdf>, **2018**.
- [71] E. Stefánsson, *Acta Ophthalmol. Scand.* **2001**, *79*, 435–440.
- [72] A. Weiss, H. van den Bergh, A. W. Griffioen, P. Nowak-Sliwinska, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **2012**, *1826*, 53–70.
- [73] L. M. Strawn, G. McMahon, H. App, R. Schreck, W. R. Kuchler, M. P. Longhi, T. H. Hui, C. Tang, A. Levitzki, A. Gazit, I. Chen, G. Keri, L. Orfi, W. Risau, I. Flamme, A. Ullrich, K. P. Hirth, L. K. Shawver, *Cancer Res.* **1996**, *56*, 3540–3545.
- [74] D. Mucs, R. A. Bryce, P. Bonnet, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2011**, *25*, 569–581.
- [75] I. Akritopoulou-Zanze, P. J. Hajduk, *Drug Discov. Today* **2009**, *14*, 291–297.
- [76] F. Carles, S. Bourg, C. Meyer, P. Bonnet, *Molecules* **2018**, *23*, 908.
- [77] A. C. Dar, T. K. Das, K. M. Shokat, R. L. Cagan, *Nature* **2012**, *486*, 80–84.
- [78] J. Solowiej, S. Bergqvist, M. A. McTigue, T. Marrone, T. Quenzer, M. Cobbs, K. Ryan, R. S. Kania, W. Diehl, B. W. Murray, *Biochemistry* **2009**, *48*, 7019–7031.
- [79] Y. Cheng, G. Li, Y. Liu, Y. Shi, G. Gao, D. Wu, J. Lan, J. You, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 4730–4738.
- [80] J. C. Janardhanan, R. K. Mishra, G. Das, S. Sini, P. Jayamurthy, C. H. Suresh, V. K. Praveen, N. Manoj, B. P. Babu, *Asian J. Org. Chem.* **2018**, *7*, 2094–2104.
- [81] Y.-M. Liu, J.-S. Yang, Q.-H. Liu, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2004**, *52*, 454–455.
- [82] W. Al-Zereini, C. B. Fotso Fondja Yao, H. Laatsch, H. Anke, *J. Antibiot. (Tokyo)* **2010**, *63*, 297–301.
- [83] I. Denya, S. F. Malan, J. Joubert, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2018**, *28*, 441–453.
- [84] S.-G. Zhang, C.-G. Liang, W.-H. Zhang, *Molecules* **2018**, *23*, 2783.
- [85] J. Catalán, J. C. del Valle, R. M. Claramunt, G. Boyer, J. Laynez, J. Gomez, P. Jimenez, F. Tomas, J. Elguero, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 10606–10612.
- [86] J. Catalán, O. Mó, P. Pérez, M. Yáñez, *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1983**, *94*, 143–153.
- [87] J. Catalán, *Arkivoc* **2013**, *2014*, 57.

- [88] F. Padilla, N. Bhagirath, S. Chen, E. Chiao, D. M. Goldstein, J. C. Hermann, J. Hsu, J. Kennedy-Smith, A. Kuglstatter, C. Liao, W. Liu, L. E. Lowrie, K. C. Luk, S. M. Lynch, J. Menke, L. Niu, T. D. Owens, C. O-Yang, A. Railkar, R. C. Schoenfeld, M. Slade, S. Steiner, Y.-C. Tan, A. G. Villaseñor, C. Wang, J. Wanner, W. Xie, D. Xu, X. Zhang, M. Zhou, M. C. Lucas, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1677–1692.
- [89] F. Crestey, V. Collot, S. Stiebing, S. Rault, *Synthesis* **2006**, *2006*, 3506–3514.
- [90] B. Laleu, M. Lautens, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 9164–9167.
- [91] S. A. Ohnmacht, A. J. Culshaw, M. F. Greaney, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 224–226.
- [92] J. Wang, G. Dong, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 7478–7528.
- [93] M. Ye, A. J. F. Edmunds, J. A. Morris, D. Sale, Y. Zhang, J.-Q. Yu, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 2374–2379.
- [94] M. Naas, S. El Kazzouli, E. M. Essassi, M. Bousmina, G. Guillaumet, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4320–4323.
- [95] J. Yu, X. Yang, C. Wu, W. Su, *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 1009–1021.
- [96] L.-H. Zhai, L.-H. Guo, Y.-H. Luo, Y. Ling, B.-W. Sun, *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 849–857.
- [97] B. V. Lam, Y. Berhault, S. Stiebing, C. Fossey, T. Cailly, V. Collot, F. Fabis, *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22*, 4440–4446.
- [98] A. Shrivastava, A. K. Chakraborty, N. Upmanyu, A. Singh, *Austin J. Anal. Pharm. Chem.* **2016**, *3*, 1076–1099.
- [99] P. Jacobson, L. Huber, *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1908**, *41*, 660–671.
- [100] C. Rüchardt, V. Hassmann, *Liebigs Ann. Chem.* **1980**, *1980*, 908–927.
- [101] P. Schumann, V. Collot, Y. Hommet, W. Gsell, F. Dauphin, J. Sopkova, E. T. MacKenzie, D. Duval, M. Boulouard, S. Rault, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1153–1156.
- [102] M. S. Shvartsberg, I. D. Ivanchikova, L. G. Fedenok, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6749–6752.
- [103] C. M. Counciller, C. C. Eichman, B. C. Wray, J. P. Stambuli, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1021–1023.
- [104] I. L. Conlon, K. Konsein, Y. Morel, A. Chan, S. Fletcher, *Tetrahedron Lett.* **2019**, *60*, 150929.
- [105] C. Chen, G. Tang, F. He, Z. Wang, H. Jing, R. Faessler, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 1690–1693.
- [106] T. Alaïme, M. Daniel, M.-A. Hiebel, E. Pasquinet, F. Suzenet, G. Guillaumet, *Chem. Commun.* **2018**, DOI 10.1039/C8CC03612H.
- [107] C. S. Cho, D. K. Lim, N. H. Heo, T.-J. Kim, S. C. Shim, *Chem. Commun.* **2004**, 104–105.
- [108] D. Viña, E. del Olmo, J. L. López-Pérez, A. San Feliciano, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 525–528.
- [109] K. Lukin, M. C. Hsu, D. Fernando, M. R. Leanna, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8166–8172.
- [110] R. C. Wheeler, E. Baxter, I. B. Campbell, S. J. F. Macdonald, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 565–569.
- [111] P. D. Lokhande, A. Raheem, S. T. Sabale, A. R. Chabukswar, S. C. Jagdale, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 6890–6892.
- [112] I. Thomé, C. Besson, T. Kleine, C. Bolm, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7509–7513.
- [113] A. W. Kruger, M. J. Rozema, A. Chu-Kung, J. Gandarilla, A. R. Haight, B. J. Kotecki, S. M. Richter, A. M. Schwartz, Z. Wang, *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13*, 1419–1425.
- [114] V. Lefebvre, T. Cailly, F. Fabis, S. Rault, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2730–2732.

- [115] P. Li, C. Wu, J. Zhao, D. C. Rogness, F. Shi, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 3149–3158.
- [116] Z. Liu, L. Wang, H. Tan, S. Zhou, T. Fu, Y. Xia, Y. Zhang, J. Wang, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 5061–5063.
- [117] V. M. Lyubchanskaya, L. M. Alekseeva, V. G. Granik, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 15005–15010.
- [118] R. Sreenivasulu, P. Sujitha, S. S. Jadav, M. J. Ahsan, C. G. Kumar, R. R. Raju, *Monatshefte Für Chem. - Chem. Mon.* **2017**, *148*, 305–314.
- [119] George. Buchi, G. C. M. Lee, David. Yang, S. R. Tannenbaum, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 4115–4119.
- [120] A. Chevalier, A. Ouahrouch, A. Arnaud, T. Gallavardin, X. Franck, *RSC Adv.* **2018**, *8*, 13121–13128.
- [121] C. M. McBride, P. A. Renhowe, C. Heise, J. M. Jansen, G. Lapointe, S. Ma, R. Piñeda, J. Vora, M. Wiesmann, C. M. Shafer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3595–3599.
- [122] C. M. McBride, P. A. Renhowe, T. G. Gesner, J. M. Jansen, J. Lin, S. Ma, Y. Zhou, C. M. Shafer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3789–3792.
- [123] B. F. Whitehead, P. T. C. Ho, A. B. Suttle, A. N. Pandite, *Cancer Treatment Method*, **n.d.**, WO2007143483 (A2).
- [124] G. I. Eremeeva, B. Kh. Strelets, L. S. Éfros, *Chem. Heterocycl. Compd.* **1975**, *11*, 238–238.
- [125] A. J. Nunn, J. T. Ralph, *J. Chem. Soc. Resumed* **1965**, 6769–6777.
- [126] X. Sun, Y. Liu, X. Xu, C. Yang, G. Yu, S. Chen, Z. Zhao, W. Qiu, Y. Li, D. Zhu, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 10786–10792.
- [127] Z. Guo, P. Zhao, W. Zhu, X. Huang, Y. Xie, H. Tian, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 7047–7053.
- [128] B. A. D. Neto, P. H. P. R. Carvalho, J. R. Correa, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1560–1569.
- [129] T. Miyazaki, M. Shibahara, J. Fujishige, M. Watanabe, K. Goto, T. Shinmyozu, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 11440–11453.
- [130] T. Biet, K. Martin, J. Hankache, N. Hellou, A. Hauser, T. Bürgi, N. Vanthuyne, T. Aharon, M. Caricato, J. Crassous, N. Avarvari, *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23*, 437–446.
- [131] M. Jørgensen, F. C. Krebs, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6004–6017.
- [132] Y. Wu, W. Zhu, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 2039–2058.
- [133] M. Hocek, H. Dvořáková, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5773–5776.
- [134] E. J. Gilbert, M. W. Miller, J. D. Scott, D. E. Demong, A. Stamford, W. J. Greenlee, C. S. Celly, *Substituted Piperazines as Cb1 Antagonists*, **n.d.**, WO2009005646 (A2).
- [135] S. D. Kuduk, N. Liverton, Y. Luo, *Heteroaryl Orexin Receptor Antagonists*, **n.d.**, WO2016095205 (A1).
- [136] B. P. Chekal, S. M. Guinness, B. M. Lillie, R. W. McLaughlin, C. W. Palmer, R. J. Post, J. E. Sieser, R. A. Singer, G. W. Slugggett, R. Vaidyanathan, G. J. Withbroe, *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18*, 266–274.
- [137] D. J. Slade, N. F. Pelz, W. Bodnar, J. W. Lampe, P. S. Watson, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 6331–6334.
- [138] I. P. Beletskaya, A. V. Cheprakov, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 3009–3066.
- [139] D. Schmidt, T. Rodat, L. Heintze, J. Weber, R. Horbert, U. Girreser, T. Raeker, L. Bußmann, M. Kriegs, B. Hartke, C. Peifer, *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2415–2426.
- [140] V. A. Barachevsky, *Rev. J. Chem.* **2017**, *7*, 334–371.
- [141] N. Abeyrathna, Y. Liao, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11282–11284.
- [142] P. Peng, D. Strohecker, Y. Liao, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8575–8577.

- [143] R. Zhang, Y. Sun, M. Tian, G. Zhang, R. Feng, X. Li, L. Guo, X. Yu, J. Z. Sun, X. He, *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 6575–6582.
- [144] J. Sung, Y. Lee, J.-H. Cha, S. B. Park, E. Kim, *Dyes Pigments* **2017**, *145*, 461–468.
- [145] S. T. Smiley, M. Reers, C. Mottola-Hartshorn, M. Lin, A. Chen, T. W. Smith, G. D. Steele, L. B. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 3671–3675.
- [146] J. L. Bricks, Y. L. Slominskii, I. D. Panas, A. P. Demchenko, *Methods Appl. Fluoresc.* **2017**, *6*, 012001.
- [147] A. J. Chung, P. S. Deore, S. Al-Abdul-Wahid, M. M. Aboelnga, S. D. Wetmore, R. A. Manderville, *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 2261–2268.
- [148] R. R. Nani, J. A. Kelley, J. Ivanic, M. J. Schnermann, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 6556–6563.
- [149] H. Appelqvist, K. Stranius, K. Börjesson, K. Peter. R. Nilsson, C. Dyrager, *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 1363–1370.
- [150] A. J. Borchardt, R. S. Kania, C. L. Palmer, *2-(1h-Indazol-6-Ylamino)-Benzamide Compounds as Protein Kinases Inhibitors Useful for the Treatment of Ophthalmic Diseases*, **n.d.**, WO2004056806 (A1).
- [151] D. G. Brown, J. Boström, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 4443–4458.
- [152] D. S. Surry, S. L. Buchwald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6338–6361.
- [153] M. Marín, R. J. Rama, M. C. Nicasio, *Chem. Rec.* **2016**, *16*, 1819–1832.
- [154] J. F. Hartwig, M. Kawatsura, S. I. Hauck, K. H. Shaughnessy, L. M. Alcazar-Roman, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5575–5580.
- [155] D. W. Old, M. C. Harris, S. L. Buchwald, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1403–1406.
- [156] S. M. Crawford, C. B. Lavery, M. Stradiotto, *Chem. – Eur. J.* **2013**, *19*, 16760–16771.
- [157] E. P. K. Olsen, P. L. Arrechea, S. L. Buchwald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10569–10572.
- [158] M. D. Charles, P. Schultz, S. L. Buchwald, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3965–3968.
- [159] Y. J. G. Renault, R. Lynch, E. Marelli, S. V. Sharma, C. Pubill-Ulldemolins, J. A. Sharp, C. Cartmell, P. Cárdenas, R. J. M. Goss, *Chem. Commun.* **2019**, DOI 10.1039/C9CC02554E.
- [160] X. Ding, J. Bai, H. Wang, B. Zhao, J. Li, F. Ren, *Tetrahedron* **2017**, *73*, 172–178.
- [161] A. D. Batcho, W. Leimgruber, *Org. Synth.* **1985**, *63*, 214.
- [162] S. D. Sharma, P. Gogoi, M. Boruah, D. Konwar, *Synth. Commun.* **2007**, *37*, 2473–2481.
- [163] J. Li, E. Turner, *Synthesis of Platinum and Palladium Complexes as Narrow-Band Phosphorescent Emitters for Full Color Displays*, **n.d.**, WO2012162488 (A1).
- [164] P. Kolkhof, A. Bruens, K. Thede, K.-H. Schlemmer, A. Hillisch, D. Lang, M. Gerisch, A. Goeller, R. Grosser, C. Schmeck, E. Woltering, O. Prien, H. Paulsen, A. Kern, *Substituted 7-Sulfanylmethyl, 7-Sulfinylmethyl and 7-Sulfonylmethyl Indoles and Use Thereof*, **n.d.**, WO2009156072 (A1).
- [165] N. Oger, M. d'Halluin, E. Le Grogneec, F.-X. Felpin, *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18*, 1786–1801.
- [166] A. V. Chappelow, P. K. Kaiser, *Drugs* **2008**, *68*, 1029–1036.
- [167] H. Yoon, A. Lossouarn, F. Landau, M. Lautens, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 6324–6327.
- [168] M. Kosugi, T. Shimizu, T. Migita, *Chem. Lett.* **1978**, *7*, 13–14.
- [169] T. Kondo, T. Mitsudo, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 3205–3220.
- [170] S. Oae, Y. H. Kim, D. Fukushima, K. Shinham, **1978**, *5*.
- [171] S. Fukuzawa, D. Tanihara, S. Kikuchi, *Synlett* **2006**, *2006*, 2145–2147.
- [172] X. Xu, *Preparation Method of Axitinib*, **n.d.**, CN103387565 (A).
- [173] X.-B. Xu, J. Liu, J.-J. Zhang, Y.-W. Wang, Y. Peng, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 550–553.
- [174] K. D. Jones, D. J. Power, D. Bierer, K. M. Gericke, S. G. Stewart, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 208–211.

- [175] Y.-C. Wong, T. T. Jayanth, C.-H. Cheng, *Org. Lett.* **2006**, 8, 5613–5616.
- [176] C.-S. Yan, Y. Peng, X.-B. Xu, Y.-W. Wang, *Chem. - Eur. J.* **2012**, 18, 6039–6048.
- [177] C. F. Zhao, R. Gvishi, U. Narang, G. Ruland, P. N. Prasad, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 4526–4532.
- [178] F. Würthner, R. Wortmann, R. Matschiner, K. Lukaszuk, K. Meerholz, Y. DeNardin, R. Bittner, C. Bräuchle, R. Sens, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2765–2768.
- [179] M. K. Kuimova, M. Balaz, H. L. Anderson, P. R. Ogilby, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 7948–7949.





# Partie expérimentale

1) GENERAL INFORMATION .....	194
2) METHODS .....	194
3) GENERAL PROCEDURES .....	195
3.1) <i>General procedure A: Knoevenagel condensation</i> .....	195
3.2) <i>General procedure B: Wittig reaction</i> .....	195
3.3) <i>General procedure C: THP deprotection</i> .....	195
3.4) <i>General procedure D: Sonogashira coupling</i> .....	195
3.5) <i>General procedure E: Heck coupling</i> .....	196
4) SYNTHESIS.....	197
4.1) <i>Electron withdrawing groups</i> .....	197
4.2) <i>Electron donating groups</i> .....	202
4.2.1) 6-anilino-1H-indazole .....	206
4.2.2) 6-((N-methylbenzamid-2-yl)thio)-1H-indazole .....	207
4.3) <i>D-<math>\pi</math>-A</i> .....	210
4.3.1) D = 1H-indazole.....	210
4.3.1) D = 6-anilino-1H-indazole .....	217
4.3.2) D = 6-((N-methylbenzamid-2-yl)thio)-1H-indazole .....	218

## 1) General information

All commercially compounds were used as received, unless stated otherwise. All solvents were purified on a MBraun MB SPS-800 machine (MeCN, DCM, toluene, Et<sub>2</sub>O) or distilled prior to use (THF was distilled from a mixture of sodium and benzophenone under argon, EtOH from Mg(OEt)<sub>2</sub> under argon). Extra dry DMF was bought from Acros Scientific, under AcroSeal, and used as such. Unless stated otherwise, reactions were carried out under dry argon atmosphere. All reactions were monitored by TLC on precoated plates (Merck DC Kieselgel 60 F 254 aluminium sheets) and products were visualized through illumination with UV lamp ( $\lambda = 254$  nm and 360 nm) and/or by staining with ethanolic solutions of either *p*-DACA or 2,4-dinitrophenylhydrazine. Unless stated otherwise, products were purified using flash chromatography on silica gel (40-63  $\mu$ m).

<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, <sup>31</sup>P NMR spectra were recorded on a Brüker 300 machine with a probe operating at ambient temperature. Residual solvent peaks were used as reference. Data for <sup>1</sup>H NMR spectra are reported as follows: chemical shift ( $\delta$ , ppm), multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet), integration, coupling constant (<sup>3</sup>*J* values, Hz).

Infrared spectra were recorded with a universal ATR sampling accessory on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum 100 spectrometer. Only bond vibration frequencies are reported ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>).

Melting points (m.p.) were measured on a microscopic apparatus and are uncorrected.

High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on an LCT Premier XE bench orthogonal acceleration time-of-flight (oa-TOF) mass equipped with an electrospray (ESI<sup>+/-</sup>) and an atmospheric pressure ionization (API<sup>+/-</sup>) sources.

## 2) Methods

Analytical HPLC were performed on a Thermo Scientific Ultimate 3000 RS instrument equipped with diode array (DAD-3000RS) and fluorescence detectors. A Thermo Hypersil GOLD® C<sub>18</sub> column (1.9  $\mu$ m, 2.1  $\times$  50 mm) was used with MeCN and 0.1% aq. formic acid as eluents (linear gradient from 5% to 100% MeCN over 6 min; 100% MeCN for 1.5 min; linear gradient from 100% to 5% MeCN over 1.5 min; flow rate of 0.600 mL/min).

UV-visible absorption spectra were obtained on an Agilent Technologies Cary 60 scan spectrophotometer using a rectangular quartz cell (Hellma Analytics, standard cell, stoppered, light path of 10.00 mm, chamber volume of 3.5 mL).

Fluorescence spectroscopic studies (emission and excitation spectra) were performed on a Horiba Scientific Fluorolog spectrophotometer with a rectangular quartz fluorescence cell (Agilent Technologies, standard cell, stoppered, light path of 10.00 mm, chamber volume of 3.5 mL).

### 3) General procedures

#### 3.1) General procedure A: Knoevenagel condensation

Both the aldehyde (1 eq.) and the corresponding Knoevenagel acceptor (1 eq.) were solubilized in dry MeCN (final concentration of 1 M). Piperidine (10 mol%) was added and the solution was heated to 80°C for 6 hours to 16 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the crude mixture was purified by flash chromatography (cyclohexane: EtOAc 80:20).

#### 3.2) General procedure B: Wittig reaction

At -78°C, *t*BuOK (1.1 eq.) was added to a suspension of aldehyde (1 eq.) and the corresponding Wittig salt (1 eq.) in dry THF (final concentration of 0.1 M). The mixture was left 2 hours at -78°C then brought back to room temperature until completion. The crude mixture was neutralized by addition of water and extracted with EtOAc. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane: EtOAc 95:5).

#### 3.3) General procedure C: THP deprotection

Improved procedure<sup>2</sup>

To a solution of 1-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-1*H*-indazole (1 eq.) in EtOH (final concentration of 0.01 M) and H<sub>2</sub>O (2% v/v), the cation exchanger resin Amberlyst IR120 (1 g/mmol) was added. The mixture was heated to 80°C under inert atmosphere for 16 hours. The suspension was hot filtered, and the resin washed twice with hot EtOH. The solution was dried over MgSO<sub>4</sub>, concentrated under reduced pressure and the crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane: EtOAc 80:20).

#### 3.4) General procedure D: Sonogashira coupling

The desired aryl bromine (1 eq.) was charged in a reactor and backfilled with argon. Dry THF (final concentration of 0.2 M) and NEt<sub>3</sub> (5 eq.) were consecutively added and the solution was bubbled with argon for 10 min. The corresponding alkyne (2 eq.), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (0.025 eq.), PPh<sub>3</sub> (0.05 eq.) and CuI (0.05 eq.) were finally added to the mixture and the solution was bubbled 5 more minutes. The apparatus was sealed and heated to 55°C until complete TLC conversion. The mixture was diluted with water then extracted with Et<sub>2</sub>O or EtOAc. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane: EtOAc 90:10).

---

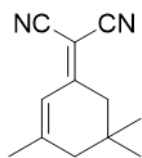
<sup>2</sup> M. Hocek, H. Dvořáková, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5773–5776.

### **3.5) General procedure E: Heck coupling**

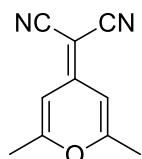
Palladium acetate (0.05 eq.), tri-(*o*-tolyl)phosphine (0.1 eq.) and sodium bromide (2 eq.) were charged in a reactor and backfilled with argon. Dry DMF (final concentration of 0.1 M), DIEA (2 eq.) and the corresponding styrene (5 eq.) were consecutively added and the solution was bubbled with argon for 15 min. 3-iodo-1*H*-indazole (1 eq.) was finally added to the mixture. The apparatus was sealed and heated to 130°C for 24 hours. The mixture was extracted with EtOAc in a large volume of water then the organic layers were further washed with water and brine. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane: EtOAc 80:20).

## 4) Synthesis

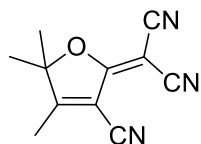
### 4.1) Electron withdrawing groups



**2-(3,5,5-trimethylcyclohex-2-en-1-ylidene)malononitrile:** (improved procedure)<sup>3</sup> To a solution of acetic acid (0.2 mL, 0.07 eq.) and acetic anhydride (0.1 mL, 0.02 eq.) in DMF (30 mL) were successively added piperidine (1.0 mL, 0.2 eq.), isophorone (8.2 mL, 1.1 eq.) and malononitrile (3.3 g, 50 mmol). The reaction was left to proceed 16 hours at room temperature then heated to 120°C until completion. The reaction was brought back to room temperature before the addition of water and extraction of the aqueous phase with EtOAc. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane: DCM: EtOAc 80:15:5) (4.70 g, orange crystals, 50% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 6.61 (sext, 1H,  $J$  = 1.4 Hz), 2.50 (s, 2H), 2.17 (dd, 2H,  $J$  = 1.4, 0.9 Hz), 2.02 (dd, 3H,  $J$  = 1.1, 0.9 Hz), 1.00 (s, 6H). **<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 170.5, 159.9, 120.7, 113.3, 112.5, 78.3, 45.8, 42.7, 32.5, 27.9, 25.4. **IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 2957, 2912, 2219, 1612, 1557, 1436, 1386, 895, 833. **HRMS (API):** [M-H]<sup>-</sup> found 185.1080; calculated for [C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 185.1079. **m.p.:** 73-74°C (lit.: 79-80°C).



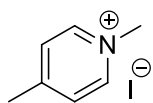
**2-(2,6-dimethyl-4H-pyran-4-ylidene)malononitrile:** 2,6-dimethyl-4H-pyran-4-one (1.36 g, 1.1 eq.) and malononitrile (660 mg, 10 mmol) were solubilized in acetic anhydride (10 mL) and heated to reflux for 4 hours. The product was precipitated by addition of water at 0°C, filtered and washed with ice-cold Et<sub>2</sub>O. The crude product was used without any further purification (0.90 g, brown powder, 52% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 6.53 (s, 2H), 2.32 (s, 6H). **<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 163.10, 156.94, 115.00, 106.82, 58.61, 19.98. **IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 2201, 2181, 1657, 1578, 1505, 1340, 1066, 919, 844. **HRMS (API<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 173.0715; calculated for [C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 173.0715. **m.p.:** 190-192°C.



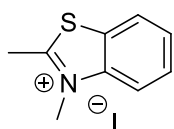
**2-(3-cyano-4,5,5-trimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile:** A solution of 3-hydroxy-3-methyl-2-butanone (5.15 mL, 49 mmol) in ethanol (5 mL), sodium ethanoate (0.50 g, 0.15 eq) and malononitrile (6.60 g, 2.05 eq) was stirred at room temperature for 1 hour. The solution was diluted with ethanol (15 mL) and refluxed for 1 hour. The resulting mixture was cooled to 0°C, filtered and washed with ethanol then dichloromethane. The crude product was used without any further purification (4.30 g, white powder, 44 % isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 2.36 (s, 3H), 1.63 (s, 6H). **<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 182.7, 175.3, 111.1, 110.5, 109.0, 104.9, 99.9, 58.5, 24.5, 14.3. **IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3024, 2258, 2222, 1644, 1574, 1520, 1478,

<sup>3</sup> X. Sun, Y. Liu, X. Xu, C. Yang, G. Yu, S. Chen, Z. Zhao, W. Qiu, Y. Li, D. Zhu, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 10786–10792.

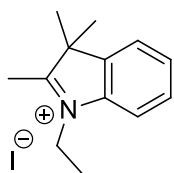
1290, 1183, 1045. **HRMS (API<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 200.0817; calculated for [C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 200.0824. **m.p.:** decomposition > 201°C.



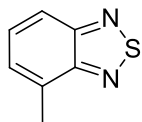
**1,4-dimethylpyridinium iodide:** To a solution of 4-picoline (9.71 mL, 10 mmol) in toluene (20 mL), iodomethane (6.8 mL, 1.1 eq.) was added. The mixture was stirred at room temperature for 3 hours then heated to 40°C overnight. The resulting precipitate was filtered and washed with Et<sub>2</sub>O. The crude product was used without any further purification (1.50 g, white powder, 64% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 8.83 (d, 2H, *J* = 6.5 Hz), 7.96 (d, 2H, *J* = 6.3 Hz), 4.28 (s, 3H), 2.60 (s, 3H). **<sup>13</sup>C NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 158.1, 144.4, 127.9, 47.1, 21.3. **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3017, 1643, 1573, 1519, 1473, 1289, 1181, 1043, 829, 808. **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M]<sup>+</sup> found 108.0813; calculated for [C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup> 108.0808. **m.p.:** 148-150°C.



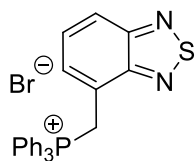
**2,3-dimethylbenzo[d]thiazol-3-ium iodide:** To a solution of 2-methylbenzothiazole (3.72 mL, 30 mmol) in toluene (50 mL), iodomethane (2.0 mL, 1.1 eq.) was added. The mixture was stirred at room temperature for 3 hours then heated to 40°C for 24 h. The resulting precipitate was filtered and washed with Et<sub>2</sub>O. The crude product was used without any further purification (0.28 g, white powder, 3% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 8.45 (dd, *J* = 8.4, 0.9 Hz, 1H), 8.29 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.90 (ddd, 1H, *J* = 8.5, 7.3, 1.2 Hz), 7.80 (ddd, 1H, *J* = 8.2, 7.4, 1.1 Hz), 4.21 (s, 3H), 3.18 (s, 3H). **<sup>13</sup>C NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 177.2, 141.6, 129.2, 128.7, 128.1, 124.5, 116.8, 36.2, 17.2. **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3271, 2963, 1669, 1582, 1443, 1202, 1013, 766, 722, 697. **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M]<sup>+</sup> found 164.0534; calculated for [C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>NS]<sup>+</sup> 164.0534. **m.p.:** 221-222°C.



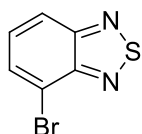
**1-ethyl-2,3,3-trimethyl-3H-indolium iodide:** 2,3,3-trimethyl-3H-indole (8.0 mL, 50 mmol) and ethyliodide (4.0 mL, 1 eq.) were solubilized in toluene (50 mL) and heated to 110°C overnight. The mixture was cooled down before the addition of dry Et<sub>2</sub>O (200 mL). The resulting precipitate was filtered and washed with cold Et<sub>2</sub>O. The crude product was used without any further purification (11 g, purple powder, quantitative yield). **<sup>1</sup>H NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 7.94 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.62 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.61 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 4.48 (quad, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.46 (s, 3H), 2.81 (s, 3H), 1.50 (s, 6H). **<sup>13</sup>C NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 196.0, 141.9, 140.6, 129.3, 128.9, 123.5, 115.2, 54.0, 43.0, 21.8, 13.9, 12.6. **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3026, 2971, 1461, 1130, 928, 774. **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M]<sup>+</sup> found 188.1441; calculated for [C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N]<sup>+</sup> 188.1434. **m.p.:** decomposition > 200°C.



**4-methylbenzo[c][1,2,5]thiadiazole:** (improved procedure)<sup>4</sup> 2-amino-3-nitrotoluene (4.56 g, 30 mmol) was solubilized in EtOH (300 mL) and the solution was purged under a nitrogen flow. After 15 min, palladium on charcoal (10% w/mol) was added and the reaction was left to proceed under a hydrogen atmosphere at room temperature. The suspension was filtered on a celite pad and the solvent removed under reduced pressure. The crude product was dissolved in toluene (200 mL) and cooled to 0°C. Thionyl chloride (100 mL, 50 eq.) was added over 1 h via a dropping funnel then the reaction was heated to 50°C for 24 h. The thionyl chloride was **very carefully** quenched at 0°C by pouring it on a solution of aqueous NaOH (1 M). The mixture was diluted with 1 L of water and heated to 140°C until 1 L of solution was collected by distillation. The aqueous phase was saturated with NaCl and extracted by EtOAc. The crude product was used without any further purification (3.45 g, light yellow oil, 77% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 7.83 (dt, 1H, *J* = 8.8, 0.8 Hz), 7.49 (dd, 1H, *J* = 8.8, 6.7 Hz), 7.37 – 7.31 (dq, *J* = 6.7, 1.1 Hz, 1H), 2.75 (t br, 3H, *J* = 0.8 Hz). **<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 155.6, 155.1, 131.8, 129.7, 128.1, 119.1, 18.0. **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 2972, 2920, 1605, 1575, 1485, 1153, 898, 853, 828, 797, 752. **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 151.03359; calculated for [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>S]<sup>+</sup> 151.03299.



**(Benzo[c][1,2,5]thiadiazol-4-ylmethyl)triphenylphosphonium bromide:** To a solution of 4-methylbenzo[c][1,2,5]thiadiazole (1.50 g, 10 mmol) in dry DCE (50 mL), NBS (1.94 g, 1.1 eq.) and AIBN (0.16 g, 0.1 eq.) were successively added. The reaction was heated to 85°C under argon for 1 h. The solution was treated with aq. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and extracted with DCM. The organic layers were concentrated under reduced pressure. The crude was dissolved in toluene (100 mL) in the presence of PPh<sub>3</sub> (10.5 g, 4 eq.) and the solution was heated to 110°C until completion. The mixture was brought back to room temperature and the resulting precipitate was filtered. The crude solid was washed twice with toluene and dried under reduced pressure to afford the final salt. The crude product was used without any further purification (2.42 g, light yellow powder, 49% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 8.02 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.6 Hz), 7.89 – 7.79 (m, 3H), 7.78 – 7.59 (m, 13H), 7.50 (dd, 1H, *J* = 6.8, 3.9 Hz), 5.64 (d, 2H, *J* = 15.4 Hz). **<sup>13</sup>C NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 154.04 (d, *J* = 4.1 Hz), 153.82 (d, *J* = 2.5 Hz), 135.09 (d, *J* = 2.9 Hz), 133.92 (d, *J* = 10.1 Hz), 131.74 (d, *J* = 7.5 Hz), 129.98 (d, *J* = 12.5 Hz), 129.75 (d, *J* = 4.3 Hz), 121.63 (d, *J* = 4.3 Hz), 121.20 (d, *J* = 9.4 Hz), 117.54 (d, *J* = 85.7 Hz), 25.24 (d, *J* = 49.1 Hz). **<sup>31</sup>P NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 121 MHz):** δ (ppm) = 23.17. **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 2998, 1677, 1434, 1104, 741, 687, 489. **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M]<sup>+</sup> found 411.1082; calculated for [C<sub>25</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>PS]<sup>+</sup> 411.1085. **m.p.:** 218-221°C.

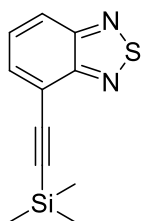


**4-bromobenzo[c][1,2,5]thiadiazole:** benzo[c][1,2,5]thiadiazole (1.36 g, 10 mmol) was solubilized in aqueous HBr (48%, 10 mL). At room temperature, a solution of bromine (0.40 mL, 0.75 eq.) in aqueous HBr (48%, 5 mL) was added

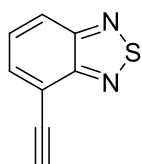
<sup>4</sup> M. Jørgensen, F. C. Krebs, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6004–6017.



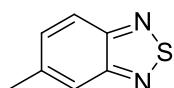
over a 30 minutes period *via* a dropping funnel. After the addition, the reaction was heated to 100°C for 16 h. The crude product was precipitated by pouring the reaction mixture on cold H<sub>2</sub>O (150 mL) then filtered. The product was purified by flash chromatography (cyclohexane: EtOAc 80:20) (1.02 g, white solid, 93% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 7.94 (dd, 1H, *J* = 8.8, 0.9 Hz), 7.81 (dd, 1H, *J* = 7.2, 0.9 Hz), 7.45 (dd, 1H, *J* = 8.8, 7.2 Hz); **<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 154.7, 153.5, 132.1, 130.0, 121.0, 114.5.



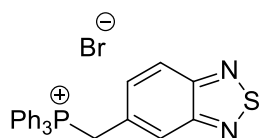
**4-((trimethylsilyl)ethynyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazole:** The product was synthesized following the *general procedure D*, 2 hours were needed to achieve full TLC completion, with 4-bromobenzo[c][1,2,5]thiadiazole (1.00 g, 4.65 mmol) and ethynyltrimethylsilane (1.3 mL, 2 eq) (1.01 g, brown solid, 93% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 7.98 (dd, 1H, *J* = 8.8, 1.1 Hz), 7.76 (dd, 1H, *J* = 7.0, 1.1 Hz), 7.54 (dd, 1H, *J* = 8.9, 7.0 Hz), 0.33 (s, 9H); **<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 154.7, 150.3, 133.7, 129.2, 122.3, 117.1, 101.8, 100.2, 0.1.



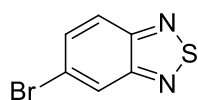
**4-ethynylbenzo[c][1,2,5]thiadiazole:** 4-((trimethylsilyl)ethynyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazole (0.86 g, 3.7 mmol) was solubilized in MeOH (20 mL) then K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.5 g, 3 eq.) was added to the solution. The mixture was stirred at room temperature for 30 minutes under argon. The salts were precipitated by addition of ice cold Et<sub>2</sub>O (50 mL), filtered on a celite pad and the organic layers were concentrated under reduced pressure. The crude product was used without further purification and stable over weeks if kept in the dark (0.37 g, light brown solid, 61% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 8.00 (dd, 1H, *J* = 8.9, 1.1 Hz), 7.77 (dd, 1H, *J* = 6.9, 1.0 Hz), 7.54 (dd, 1H, *J* = 9.0, 6.9 Hz), 3.58 (s, 1H); **<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 154.8, 154.5, 133.8, 129.1, 122.7, 116.0, 83.7, 79.2.



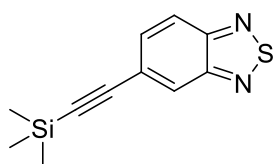
**5-methylbenzo[c][1,2,5]thiadiazole:** 3,4-diaminotoluene (1.74 g, 14 mmol) was dissolved in a solution of NEt<sub>3</sub> (13 mL, 7 eq.) in DCM (30 mL) and cooled to 0°C. Thionyl chloride (3.1 mL, 3 eq.) was added over 1 hour via a dropping funnel then the reaction was heated to 50°C for 5 hours. The thionyl chloride was **very carefully** quenched at 0°C by pouring it on a solution of aqueous NaOH (1 M). The resulting mixture was extracted by DCM. The crude product was used without any further purification (1.43 g, light orange oil, 67% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 7.83 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz), 7.71 (s, 1H), 7.38 (dd, 1H, *J* = 9.0, 1.5 Hz), 2.50 (s, 3H). **<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 155.4, 153.6, 140.0, 132.5, 120.8, 119.7, 22.0. **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3059, 2917, 2849, 1618, 1521, 1485, 1443, 1380, 1262, 1140. **HRMS (API<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 151.0326; calculated for [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>S]<sup>+</sup> 151.0330.

**(Benzo[c][1,2,5]thiadiazol-5-ylmethyl)triphenylphosphonium**

**bromide:** To a solution of 5-methylbenzo[c][1,2,5]thiadiazole (877 mg, 5.8 mmol) in dry DCE (30 mL), NBS (1.14 g, 1.1 eq.) and AIBN (95 mg, 0.1 eq.) were successively added. The reaction was heated to 85°C under argon for 1 h. The solution was treated with aq. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and extracted with DCM. The organic layers were concentrated under reduced pressure. The crude was dissolved in toluene (25 mL) in the presence of PPh<sub>3</sub> (6.1 g, 4 eq.) and the solution was heated to 110°C until completion. The mixture was brought back to room temperature and the resulting precipitate was filtered. The crude solid was washed twice with toluene and dried under reduced pressure to afford the final salt. The crude product was used without any further purification (2.53 g, light yellow powder, 88% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 7.90 – 7.79 (m, 6H), 7.70 (dt, *J* = 11.2, 5.3 Hz, 4H), 7.61 – 7.42 (m, 8H), 6.01 (d, *J* = 15.6 Hz, 2H). **<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 177.2 (s), 154.0 (d, *J* = 3.9 Hz), 153.8 (d, *J* = 2.3 Hz), 135.1 (d, *J* = 3.0 Hz), 134.7 (d, *J* = 10.0 Hz), 133.1 (d, *J* = 3.8 Hz), 130.2 (d, *J* = 12.7 Hz), 124.3 (d, *J* = 7.9 Hz), 121.0 (d, *J* = 2.4 Hz), 117.7 (d, *J* = 85.9 Hz), 29.7 (s). **<sup>31</sup>P NMR (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz):** δ (ppm) = 23.92. **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 2990, 2854, 2789, 1710, 1436, 1177, 1109, 822, 719, 625, 526, 502. **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M]<sup>+</sup> found 411.1090; calculated for [C<sub>25</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>PS]<sup>+</sup> 411.1085. **m.p.:** decomposition > 240°C.

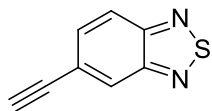


**5-bromobenzo[c][1,2,5]thiadiazole:** 4-bromo-2-nitroaniline (3.25 g, 15 mmol) was solubilized in a mix of THF (30 mL), EtOH (25 mL) and H<sub>2</sub>O (25 mL) before addition of NH<sub>4</sub>Cl (5.5 g, 7 eq.) and iron dust (4.0 g, 4.8 eq.). The mixture was stirred efficiently for 4 hours at 55°C under argon before filtration. The solvents were evaporated under reduced pressure to yield a crude oil. The product was solubilized in DCM, dried over MgSO<sub>4</sub>, concentrated under reduced pressure once again. The crude product was dissolved in dry DCM (75 mL) and NEt<sub>3</sub> (15 mL, 7 eq.) under inert atmosphere. SOCl<sub>2</sub> (3.2 mL, 3 eq.) was slowly added to the mixture at -78°C, then the reaction was heated up to 50°C for 16 hours. The reaction was brought back to 0°C before the slow addition of water and extraction of the aqueous phase with EtOAc. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane: EtOAc 80:20) (2.28 g, pale yellow crystals, 71% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 8.21 (dd, 1H, *J* = 1.9, 0.6 Hz), 7.87 (dd, 1H, *J* = 9.3, 0.7 Hz), 7.66 (dd, 1H, *J* = 9.3, 1.9 Hz); **<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 155.4, 153.5, 133.3, 124.7, 124.0, 122.3; **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3677, 2972, 1589, 1509, 1239, 1029, 852, 804, 753, 652; **HRMS (API<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 214.9277; calculated for [C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>SBr]<sup>79+</sup> 214.9279; **m.p.:** 59-60°C.



**5-((trimethylsilyl)ethynyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazole:** The product was synthesized following the *general procedure D*, 2 hours were needed to achieve full TLC completion, with 5-bromobenzo[c][1,2,5]thiadiazole (1.84 g, 8.5 mmol) and ethynyltrimethylsilane (2.4 mL, 2 eq) (1.79 g, orange oil, 90% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 8.11 (dd, 1H, *J* = 1.6, 0.9 Hz), 7.91 (dd, 1H, *J* = 9.1, 0.9 Hz), 7.60 (dd,

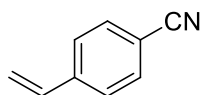
1H,  $J = 9.0, 1.5$  Hz), 0.29 (s, 9H);  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):  $\delta$  (ppm) = 154.6, 154.4, 132.7, 125.0, 124.7, 121.3, 103.8, 98.6, 0.0; IR:  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3388, 2959, 2899, 2520, 2157, 1604, 1509, 1250, 1161, 838, 816; HRMS (API<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup> found 233.0561; calculated for [C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>SSi]<sup>+</sup> 233.0569.



**5-ethynylbenzo[c][1,2,5]thiadiazole:**

5-

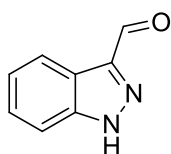
((trimethylsilyl)ethynyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazole (1.79 g, 7.7 mmol) was solubilized in MeOH (50 mL) then K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.2 g, 3 eq.) was added to the solution. The mixture was stirred at room temperature for 30 minutes under argon. The salts were precipitated by addition of ice cold Et<sub>2</sub>O (50 mL), filtered on a celite pad and the organic layers were concentrated under reduced pressure. The crude product was used without further purification and stable over weeks if kept in the dark (1.15 g, light brown solid, 93% isolated yield).  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 8.14 (dd, 1H,  $J = 1.5, 0.8$  Hz), 7.92 (dt, 1H,  $J = 9.1, 0.7$  Hz), 7.59 (dd, 1H,  $J = 9.1, 1.5$  Hz), 3.30 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):  $\delta$  (ppm) = 154.43, 154.38, 132.4, 125.5, 123.6, 121.5, 82.6, 80.7; IR:  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3248, 2101, 1607, 1509, 1314, 1143, 881, 865, 815, 710, 656, 620; HRMS (ESI<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup> found 161.0168; calculated for [C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>S]<sup>+</sup> 161.0173; m.p.: 78-81°C.



**4-cyanostyrene:**

To a solution of 4-cyanobenzaldehyde (0.65 g, 5 mmol) in dioxane (10 mL), the bromo methyltriphenylphosphonium salt (2.14 g, 6 mmol) and *t*BuOK (0.67 g, 6 mmol) were successively added. The reaction was carried out at 20°C for 4 hours. The triphenylphosphine oxide was removed by addition of cyclohexane (10 mL) and filtration on a celite pad. The crude oil was concentrated under reduced pressure and may be purified by a **quick** flash chromatography (cyclohexane 100%). The product was kept at -25°C to avoid polymerization (0.25 g, colorless oil, 38% isolated yield).  $^1\text{H}$  NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 7.67 – 7.58 (m, 2H), 7.53 – 7.43 (m, 2H), 6.73 (dd, 1H,  $J = 17.6, 10.9$  Hz), 5.87 (dd, 1H,  $J = 17.6, 0.5$  Hz), 5.45 (dd, 1H,  $J = 10.9, 0.5$  Hz). IR:  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 2989, 2226, 1605, 1506, 1404, 1174, 1117, 988, 920, 843, 535.

## 4.2) Electron donating groups

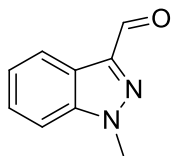


**1H-indazole-3-carbaldehyde:** The product was obtained following the protocol previously described by our team.<sup>5</sup>

At 0°C, under argon atmosphere, aqueous HCl (2 M, 40 mL, 2.67 eq.) was added to a solution of NaNO<sub>2</sub> (16.6 g, 3 eq.) in water (120 mL) and DMF (130 mL). Then the solution of 6-bromoindole (3.51 g, 30 mmol) in DMF (40 mL) was added dropwise over a 2-hour period with a mechanical syringe-pusher. At the end of the addition, the mixture was brought back to room temperature and left to evolve 16 hours. The mixture was

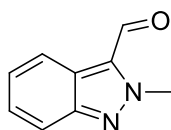
<sup>5</sup> A. Chevalier, A. Ouahrouch, A. Arnaud, T. Gallavardin, X. Franck, *RSC Adv.* **2018**, 8, 13121–13128.

extracted with EtOAc in a large volume of water then the organic layers were further washed with water and brine. The crude product was used without any further purification (3.49 g, white powder, 80% isolated yield).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 10.29 (s, 1H), 8.31 (dt, 1H,  $J = 8.1, 1.1$  Hz), 7.59 (dt, 1H,  $J = 8.4, 1.0$  Hz), 7.46 (ddd, 1H,  $J = 8.4, 6.9, 1.2$  Hz), 7.34 (ddd, 1H,  $J = 8.0, 6.9, 1.0$  Hz).



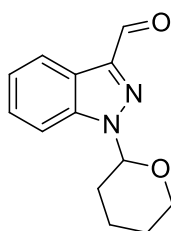
**1-methyl-1H-indazole-3-carbaldehyde:** 1H-indazole-3-carbaldehyde

(730 mg, 5 mmol) in dry MeCN (5 mL) was treated with iodomethane (0.50 mL, 1.5 eq.) in presence of  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.0 g, 1.5 eq.). The solution was refluxed for 16 h, then neutralized and extracted 3 times with EtOAc. The crude mixture was composed of  $\text{N}_1$  and  $\text{N}_2$  methylated products with a ratio of 75:15 respectively (determined by  $^1\text{H NMR}$  spectroscopy). Both isomers were isolated by flash chromatography (cyclohexane: DCM: EtOAc 65:30:5) (464 mg, white amorphous solid, 58% isolated yield).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 10.23 (s, 1H), 8.31 (dt, 1H,  $J = 8.1, 1.0$  Hz), 7.54 – 7.45 (m, 2H), 7.37 (ddd, 1H,  $J = 7.9, 5.5, 2.3$  Hz), 4.20 (s, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm) = 186.7, 143.1, 141.5, 127.6, 124.2, 122.4, 122.2, 109.5, 36.7. IR:  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3059, 2949, 2792, 1671, 1474, 1426, 1254, 1060, 788, 749, 741. HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  found 161.0716; calculated for  $[\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_2\text{O}]^+$  161.0715. m.p.: 62-63°C.



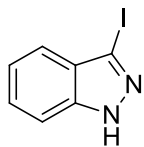
**2-methyl-2H-indazole-3-carbaldehyde:** Isolated together with 1-methyl-

1H-indazole-3-carbaldehyde (104 mg, white solid, 13% isolated yield).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 10.28 (s, 1H), 8.03 – 7.94 (m, 1H), 7.85 – 7.77 (m, 1H), 7.42 – 7.30 (m, 2H), 4.48 (s, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm) = 177.5, 147.6, 130.5, 126.8, 126.4, 125.2, 118.7, 118.3, 40.9. IR:  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2954, 2833, 1673, 1457, 1431, 1291, 1191, 1048, 780, 743. HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  found 161.0713; calculated for  $[\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_2\text{O}]^+$  161.0715. m.p.: 65-66°C.

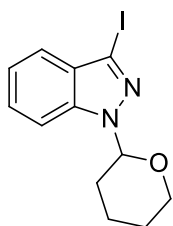


**1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)indazole-3-carbaldehyde:** 3,4-Dihydro-

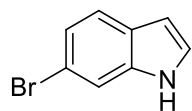
2H-pyran (DHP, 5.5 mL, 6 eq.) and pyridium *p*-toluenesulfonate (PPTS; 302 mg, 0.2 eq.) were successively added to a solution of 1H-indazole-3-carbaldehyde (1.46 g, 10 mmol) in dry THF (100 mL). The reaction was heated to 75°C until completion. A large volume of water was added then extracted with EtOAc. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane 100%) (1.56 g, white powder, 68% isolated yield).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 10.26 (s, 1H), 8.31 (dt, 1H,  $J = 8.0, 1.1$  Hz), 7.68 (dt, 1H,  $J = 8.5, 0.9$  Hz), 7.48 (ddd, 1H,  $J = 8.4, 7.0, 1.1$  Hz), 7.37 (ddd, 1H,  $J = 7.9, 7.0, 0.8$  Hz), 5.85 (dd, 1H,  $J = 8.8, 2.8$  Hz), 4.06 – 3.99 (m, 1H), 3.84 – 3.73 (m, 1H), 2.67 – 2.52 (m, 1H), 2.23 – 2.07 (m, 2H), 1.86 – 1.69 (m, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm) = 187.4, 143.5, 140.9, 127.7, 124.4, 122.5, 122.3, 110.8, 86.2, 67.5, 29.3, 25.1, 22.2. IR:  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2942, 2870, 2798, 1689, 1473, 1318, 1225, 1077, 913, 787, 747. HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  found 231.1130; calculated for  $[\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2]^+$  231.1134. m.p.: 70-73°C.



**3-iodo-1H-indazole:** (improved procedure)<sup>6</sup> At 0°C, 1H-indazole (590 mg, 5 mmol), potassium hydroxide (840 mg, 3 eq.) then iodine (2.53 g, 2 eq.) were solubilized in DMF (10 mL). The reaction was slowly brought back to 20°C then quench with Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> sat. 30 min after iodine addition. The aqueous phase was neutralized before extraction with Et<sub>2</sub>O. The crude product was used without any further purification (1.12 g, white powder, 92% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 11.56 (s br, 1H), 7.62 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.54 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.47 (ddd, 1H, *J* = 9.5 Hz, 8.4 Hz, 6.9 Hz), 7.25 (ddd, 1H, *J* = 8.9 Hz, 8.1 Hz, 6.9 Hz). **<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 140.7, 128.2, 127.6, 122.2, 121.5, 110.5, 93.9. **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3153, 2933, 1620, 1472, 1344, 1315, 1238, 1012, 747, 738. **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 244.9583; calculated for [C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>I]<sup>+</sup> 244.9576. **m.p.:** 139-141°C (lit.: 141°C).<sup>3</sup>



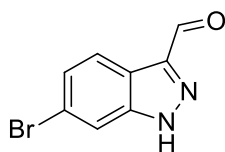
**3-iodo-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)indazole:** 3-iodo-1H-indazole (1.22 g, 5 mmol), DHP (2.7 mL, 6 eq.) and PPTS (0.12 g, 0.1 eq.) were solubilized in DCM (50 mL). After 2 hours at 65°C, the reaction was brought back to room temperature before the addition of water and extraction of the aqueous phase with DCM. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane 100%) (1.15 g, white powder, 70% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 7.56 (dt, 1H, *J* = 8.4, 0.8 Hz), 7.50 – 7.41 (m, 2H), 7.23 (ddd, 1H, *J* = 8.0, 6.9, 0.9 Hz), 5.70 (dd, 1H, *J* = 9.4, 2.7 Hz), 4.08 – 3.98 (m, 1H), 3.79 – 3.67 (m, 1H), 2.66 – 2.48 (m, 1H), 2.22 – 2.00 (m, 2H), 1.84 – 1.63 (m, 3H); **<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 140.1, 129.1, 127.8, 122.1, 121.6, 110.4, 93.5, 85.8, 67.6, 29.6, 25.1, 22.6; **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 2954, 2849, 1492, 1460, 1313, 1208, 1076, 1037, 910, 745; **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 320.0161; calculated for [C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>OI]<sup>+</sup> 320.0151; **m.p.:** 79°C.



**6-bromoindole:** To a solution of 4-bromo-2-nitrotoluene (3.20 g, 15.0 mmol) in DMF (25 mL), DMA-DMF (6 mL, 3 eq.) and pyrrolidine (2 mL, 1.6 eq.) were consecutively added. The solution was heated to 110°C under argon atmosphere until complete TLC conversion. The reaction was brought back to room temperature before the addition of water (500 mL) and extraction of the aqueous phase with EtOAc (3 x 150 mL). The organic phases were further washed with water (200 mL) then brine (200 mL) and concentrated under reduced pressure. The resulting dark red oil was solubilized in a mix of THF (30 mL), EtOH (25 mL) and H<sub>2</sub>O (25 mL) before addition of NH<sub>4</sub>Cl (5.5 g, 7 eq.) and iron dust (4.0 g, 4.8 eq.). The mixture was stirred efficiently for 16 hours at 55°C under argon before filtration. The solution was extracted with EtOAc in a large volume of water then the organic layers were further washed with water and brine. The crude product was solubilized in DCM (20 mL) and cyclohexane (100 mL) then only the DCM was evaporated under reduced pressure. The resulting brown precipitate was hot filtered, rinsed with cyclohexane and the cyclohexane was evaporated to yield a white amorphous solid (2.74 g, white powder, 93%

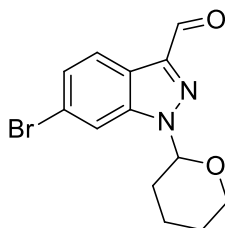
<sup>6</sup> F. Crestey, V. Collot, S. Stiebing, S. Rault, *Synthesis* **2006**, 20, 3506–3514.

isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 8.15 (s, 1H), 7.56 (t, 1H, *J* = 1.2 Hz), 7.50 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.25 – 7.16 (m, 2H), 6.53 (ddd, 1H, *J* = 3.2, 2.0, 1.0 Hz).



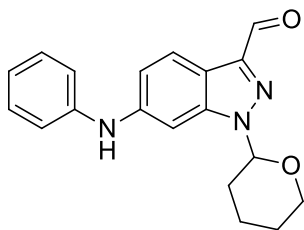
**6-bromo-1H-indazole-3-carbaldehyde:** The product was obtained following the protocol previously described by our team.<sup>5</sup>

At 0°C, under argon atmosphere, aqueous HCl (2 M, 17 mL, 2.67 eq.) was added to a solution of NaNO<sub>2</sub> (2.7 g, 3 eq.) in water (40 mL) and DMF (60 mL). Then the solution of 6-bromoindole (2.74 g, 13.9 mmol) in DMF (20 mL) was added dropwise over a 2-hour period with a mechanical syringe-pusher. At the end of the addition, the mixture was brought back to room temperature and left to evolve 16 hours. The mixture was extracted with EtOAc in a large volume of water then the organic layers were further washed with water and brine. The crude product was used without any further purification (2.78 g, brown powder, 95% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 10.26 (s, 1H), 8.20 (dd, 1H, *J* = 8.6, 0.6 Hz), 7.76 (d, 1H, *J* = 1.6, 0.7 Hz), 7.48 (dd, 1H, *J* = 8.6, 1.5 Hz).



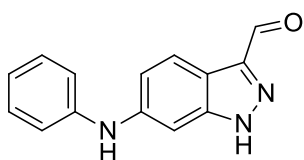
**6-bromo-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)indazole-3-carbaldehyde:** 3,4-Dihydro-2H-pyran (0.87 mL, 6 eq.) and TsOH (27 mg, 0.1 eq.) were added to a solution of 6-bromo-1H-indazole-3-carbaldehyde (375 mg, 1.6 mmol) in DCM (16 mL). The solution was heated to 65°C for 1 hours. Water was added to solution then extracted with DCM. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane 100%) (382 mg, light brown powder, 77% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 10.22 (s, 1H), 8.16 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.88 (dd, 1H, *J* = 1.5, 0.5 Hz), 7.47 (dd, 1H, *J* = 8.6, 1.6 Hz), 5.79 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.7 Hz), 4.07 – 3.94 (m, 1H), 3.83 – 3.74 (m, 1H), 2.60 – 2.46 (m, 1H), 2.23 – 2.08 (m, 2H), 1.87 – 1.66 (m, 3H); **<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 187.1, 143.4, 141.6, 128.1, 123.4, 122.2, 121.3, 114.1, 86.6, 67.4, 29.2, 25.0, 22.0; **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 2927, 2923, 2847, 1684, 1613, 1462, 1225, 1031, 812, 797; **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 309.0237 (Br<sup>79</sup>) & 311.0213 (Br<sup>81</sup>); calculated for [C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Br<sup>79</sup>]<sup>+</sup> 309.0239 & for [C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Br<sup>81</sup>]<sup>+</sup> 311.0218; **m.p.:** 142°C.

## 4.2.1) 6-anilino-1H-indazole

**6-anilino-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)indazole-3-**

**carbaldehyde:** The pre-catalyst G2 PdXPhos (0.137 g, 0.05 eq.) and  $K_3PO_4$  (1.04 g, 1.4 eq.) were charged into an argon flushed vessel. Dry DMF (20 mL) was directly added to the vessel and the mixture was bubbled with argon for 15 minutes. The aniline (0.66 mL, 2.1 eq.) and the 5-bromo-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)indazole-3-

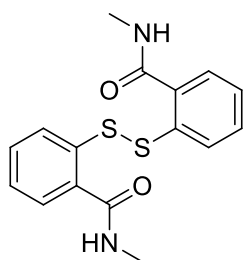
carbaldehyde (1.10 g, 3.5 mmol) solvated in a minimum of DMF were successively added to the mixture. The vessel was sealed and dipped in an oil bath, pre-heated to 120°C. After 5 hours, the mixture was filtered on a celite pad and the filtrate was partitioned between water and EtOAc. The organic layer was concentrated under reduced pressure and the crude product was dissolved in dioxane (30 mL). Water (30 mL), SDS (0.84 g, 0.9 eq.) and  $Ac_2O$  (0.40 mL, 1.2 eq.) were consecutively added. The mixture was left at room temperature for 1 hour. The dioxane was evaporated and the remaining aqueous layer was extracted with EtOAc. The crude product was purified by flash chromatography (Cyclo:EtOAc, 8:2) (0.605 g, light brown solid, 77% isolated yield).  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 10.18 (s, 1H), 8.10 (d, 1H,  $J$  = 8.9 Hz), 7.38 – 7.27 (m, 2H), 7.22 (dd, 1H,  $J$  = 2.0, 0.7 Hz), 7.21 – 7.12 (m, 2H), 7.08 – 6.96 (m, 2H), 6.08 (s, 1H), 5.67 (dd,  $J$  = 8.9, 2.8 Hz, 1H), 4.05 – 3.93 (m, 1H), 3.79 – 3.65 (m, 1H), 2.63 – 2.45 (m, 1H), 2.12 – 1.95 (m, 2H), 1.87 – 1.59 (m, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm) = 187.6, 143.9, 143.6, 142.5, 142.2, 129.6, 122.9, 122.3, 119.2, 117.5, 117.0, 95.2, 85.8, 67.4, 29.2, 25.1, 22.2; IR:  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) = 3352, 2931, 2851, 2248, 1679, 1625, 1596, 1495, 1305, 1031, 907, 727; HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $[M+H]^+$  found 322.1545; calculated for  $[C_{19}H_{20}N_3O_2]^+$  322.1556.



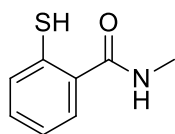
**6-anilino-1H-indazole-3-carbaldehyde:** To a solution of 6-anilino-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)indazole-3-carbaldehyde (600 mg, 1.9 mmol) in MeOH (38 mL), methanesulfonic acid (0.60 mL, 5 eq.) was added. The mixture was heated to 50°C under inert

atmosphere for 3 hours. The solution was neutralized by addition of aqueous  $NaHCO_3$  (sat.), then diluted with brine and extracted with EtOAc. The organic layers were dried over  $MgSO_4$  and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (Cyclo:EtOAc, 7:3) (58 mg, light brown solid, 13% isolated yield).  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 10.66 (s, 1H), 10.22 (s, 1H), 8.12 (dd, 1H,  $J$  = 8.7, 0.7 Hz), 7.39 – 7.29 (m, 2H), 7.19 (d, 1H,  $J$  = 1.3 Hz), 7.13 (dd, 1H,  $J$  = 2.0, 0.7 Hz), 7.05 (ddt,  $J$  = 7.6, 7.4, 1.3 Hz, 1H), 6.99 (dd,  $J$  = 8.7, 1.9 Hz, 1H), 5.99 (s, 1H).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm) = 187.6, 145.0, 144.5, 143.0, 141.9, 129.7, 122.9, 122.8, 119.9, 117.5, 115.7, 93.6.

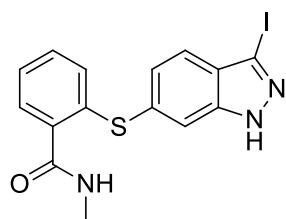
## 4.2.2) 6-((N-methylbenzamid-2-yl)thio)-1H-indazole



**2,2'-dithio(N-methylbenzamide):** 2,2'-dithiobenzoic acid (15.3 g, 50 mmol) was suspended in  $\text{SOCl}_2$  (70 mL). The reflux set-up was closed with a basic guard and the mixture was heated to reflux of the solvent for 8 hours. The solution was brought back to room temperature and left to evolve for 2 hours. The crude mixture was slowly poured on ice-cold NaOH (2 M) (500 mL) and filtered. The resulting precipitate was washed with water until neutral then dried with  $\text{Et}_2\text{O}$ . At  $0^\circ\text{C}$ , the crude 2,2'-dithiobenzoyl chloride in solution in DCM (150 mL) was canuled on a suspension of methylamine hydrochloride (10 g, 3 eq.) and  $\text{NEt}_3$  (40 mL, 6 eq.) in DCM (50 mL). The reaction was slowly brought back to room temperature and left for 16 hours. The crude product was precipitated by addition of water at  $0^\circ\text{C}$ , filtered, washed with water until neutral then dried with  $\text{Et}_2\text{O}$ . The crude product was used without further purification (11.2 g, white amorphous powder, 67% isolated yield).  **$^1\text{H}$  NMR ( $\text{SO}(\text{CD}_3)_2$ , 300 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 8.56 (q, 1H,  $J = 4.5$  Hz), 7.66 – 7.59 (m, 2H), 7.44 (td, 1H,  $J = 8.0, 1.3$  Hz), 7.29 (td, 1H,  $J = 7.5, 0.9$  Hz), 2.80 (d, 3H,  $J = 4.6$  Hz);  **$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{SO}(\text{CD}_3)_2$ , 75 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 167.3, 136.7, 133.7, 131.0, 127.8, 125.9, 125.6, 26.2; **IR:**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3283, 3061, 1631, 1550, 1405, 1326, 1039, 745, 727, 694; **HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  found 333.0729; calculated for  $[\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2]^+$  333.0731; **m.p.:** 199–200 $^\circ\text{C}$ .



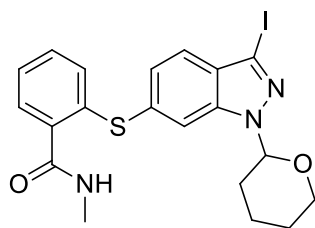
**2-mercapto-N-methylbenzamide:** At  $0^\circ\text{C}$ , under inert atmosphere, sodium borohydride (75 mg, 2 eq.) was added portion-wise to a suspension of 2,2'-dithio(N-methylbenzamide) (332 mg, 1 mmol) in dry EtOH (4 mL). The mixture was slowly brought back to room temperature. After 16 hours, the reaction was stopped by dropwise addition of HCl 3 M (1 mL, 3 eq.) to the reaction mixture at  $0^\circ\text{C}$ . After 15 min at  $0^\circ\text{C}$ , the mixture was partitioned between brine and EtOAc. The organic layers were washed with water then brine and concentrated under reduced pressure. The crude product was rapidly used without further purification (282 mg, white paste, 84% isolated yield).  **$^1\text{H}$  NMR ( $\text{SO}(\text{CD}_3)_2$ , 300 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 7.42 (dd, 1H,  $J = 7.7, 1.4$  Hz), 7.32 (dd, 1H,  $J = 7.8, 1.3$  Hz), 7.25 (td, 1H,  $J = 7.5, 1.5$  Hz), 7.13 (td, 1H,  $J = 7.4, 1.4$  Hz), 6.07 (s, 1H), 4.76 (s, 1H), 3.01 (d, 3H,  $J = 4.9$  Hz).  **$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{SO}(\text{CD}_3)_2$ , 75 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 169.5, 133.4, 133.0, 131.2, 130.7, 128.0, 125.3, 26.9.



**3-iodo-6-((N-methylbenzamid-2-yl)thio)-1H-indazole:**  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  (48 mg, 0.05 eq.), XantPhos (56 mg, 0.10 eq.),  $\text{NaHCO}_3$  (119 mg, 1.4 eq.) and zinc powder (92 mg, 1.4 eq.) were charged into argon purged vessel. Dry DMF (3 mL) was added then bubbled with argon. After 15 minutes, a solution of 6-bromo-1H-indazole (197 mg, 1 mmol) and freshly prepared 2-mercapto-N-methylbenzamide (167 mg, 1 eq.) in dry DMF (0.5 mL) was added to the vessel and bubbled with argon for 5 additional minutes. The vessel was sealed and heated at  $80^\circ\text{C}$  for 5 hours. When TLC completion was reached, the

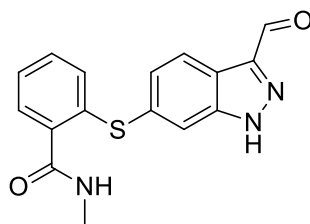


vessel was brought to 45°C and a solution of iodide (508 mg, 2 eq.) in DMF (2 mL) was slowly added to the reaction medium, followed after 1 hour, by the dropwise addition of a solution of KOH (112 mg, 2 eq.) in water (1.5 mL). After 16 hours at 45°C, the mixture was poured on a solution of ascorbic acid (308 mg, 1.75 eq.) in water (8 mL), the glassware was washed with MeOH (5 mL). The resulting precipitate was filtered, rinsed with water (5 mL) and MeOH (20 mL) and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The resulting yellow oil was solubilized in a minimum of hot MeOH and hot filtered. Finally, the produced was precipitated by slow addition of water to the MeOH filtrated. The resulting crystals were filtered and air dried (247 mg, light yellow powder, 60% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz):** δ (ppm) = 8.05 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz), 7.74 (dd, 1H, *J* = 8.4, 0.8 Hz), 7.61 (q, 1H, *J* = 1.1 Hz), 7.48 – 7.43 (m, 1H), 7.38 – 7.23 (m, 2H), 7.20 – 7.15 (m, 1H), 7.12 (dd, *J* = 8.5, 1.5 Hz, 1H), 2.85 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz):** δ (ppm) = 171.8, 138.7, 136.8, 135.0, 132.5, 131.6, 129.0, 127.8, 126.2, 125.4, 123.7, 123.3, 122.7, 115.2, 26.7; **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3391, 3181, 1614, 1414, 1348, 1087, 964, 928, 864, 740, 702.; **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 409.9824; calculated for [C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>OSI]<sup>+</sup> 409.9814.

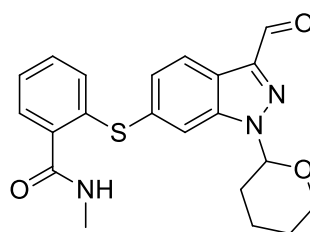


**3-iodo-6-((*N*-methylbenzamid-2-yl)thio)-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)indazole:** 3-iodo-6-((*N*-methylbenzamid-2-yl)thio)-1H-indazole (228 mg, 0.6 mmol), DHP (0.10 mL, 2 eq.) and TsOH (10 mg, 0.1 eq.) were solubilized in dry DCM (6 mL) and the solution was heated to 55°C for 16 hours. The solution was partitioned between water and DCM, then the organic layers were concentrated

under reduced pressure. The crude product was purified by solubilization in a minimum of DCM then precipitation by addition of cyclohexane and filtration (176 mg, white solid, 64% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 8.40 (q, 1H, *J* = 4.5 Hz), 8.15 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.80 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.49 (dd, 1H, *J* = 7.2, 2.0 Hz), 7.25 (pd, 2H, *J* = 7.3, 1.7 Hz), 7.13 (dd, 1H, *J* = 8.4, 1.4 Hz), 6.91 (dd, 1H, *J* = 7.5, 1.6 Hz), 5.88 (dd, 1H, *J* = 9.7, 2.3 Hz), 3.91 – 3.82 (m, 1H), 3.81 – 3.66 (m, 1H), 2.77 (d, 3H, *J* = 4.5 Hz), 2.47 – 2.29 (m, 1H), 2.06 – 1.90 (m, 2H), 1.79 – 1.63 (m, 1H), 1.61 – 1.49 (m, 2H); **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 494.0381; calculated for [C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>SI]<sup>+</sup> 494.0399.

**2-((3-formyl-1H-indazol-6-yl)thio)-N-methylbenzamide:**

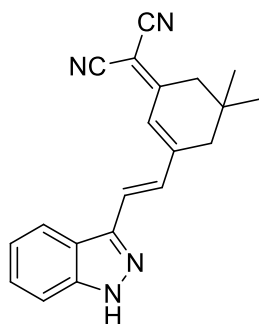
$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  (0.228 g, 0.05 eq.), XantPhos (0.289 g, 0.10 eq.),  $\text{NaHCO}_3$  (0.588 g, 1.4 eq.) and zinc powder (0.455 g, 1.4 eq.) were charged into argon purged vessel. Dry DMF (20 mL) was added then bubbled with argon. After 15 minutes, a solution of 6-bromo-1H-indazole-3-carbaldehyde (1.125 g, 5 mmol) and freshly prepared 2-mercapto-N-methylbenzamide (0.835 g, 1 eq.) in DMF (5 mL) was added to the vessel and bubbled with argon for 5 additional minutes. The vessel was sealed and heated at 80°C for 24 hours. The crude product was precipitated in HCl 0.1 M (100 mL), filtered and rinsed with water. The crude product was purified by flash chromatography (DCM: EtOAc: MeOH, 82:15:3) (0.338 g, light brown solid, 22% isolated yield).  **$^1\text{H NMR}$  ( $\text{SO}(\text{CD}_3)_2$ , 300 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 14.18 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 8.37 (q br, 1H,  $J = 4.6$  Hz), 8.11 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 7.68 (s, 1H), 7.52 – 7.44 (m, 1H), 7.39 – 7.24 (m, 3H), 7.11 – 7.00 (m, 1H), 2.75 (d, 3H,  $J = 4.6$  Hz);  **$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{SO}(\text{CD}_3)_2$ , 75 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 187.3, 167.8, 143.5, 141.8, 137.6, 134.6, 134.3, 130.7, 130.4, 127.8, 127.8, 126.6, 121.6, 119.6, 114.5, 48.6, 26.0; **IR:**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3376, 3359, 3145, 2925, 2854, 2349, 1681, 1636, 1449, 1319, 1060, 811, 749; **HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  found 312.0809; calculated for  $[\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}]^+$  312.0807; **m.p.:** 173 - 175°C.

**2-((3-formyl-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-indazol-6-yl)thio)-N-methylbenzamide:**

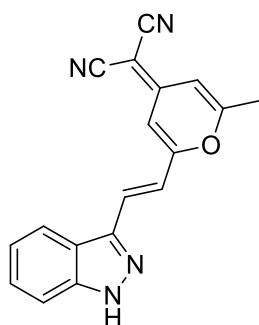
$\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$  (36 mg, 0.05 eq.),  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (455 mg, 1.4 eq.) and zinc powder (92 mg, 1.4 eq.) were charged into argon purged vessel. Dry DMF (3 mL) was added then bubbled with argon. After 15 minutes, a solution of 6-bromo-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)indazole-3-carbaldehyde (308 mg, 5 mmol) and freshly prepared 2-mercapto-N-methylbenzamide (167 g, 1 eq.) in dry DMF (0.5 mL) was added to the vessel and bubbled with argon for 5 additional minutes. The vessel was sealed and heated at 80°C for 24 hours. The impurities were precipitated in water (8 mL) and the vessel was washed with MeOH (5 mL). The precipitated was filtered, rinsed with water (5 mL) and MeOH (20 mL) and the filtrate was concentrated under reduced pressure (163 mg, light brown oil, 41% isolated yield).  **$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 10.20 (s, 1H), 8.19 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 7.72 (s, 1H), 7.59 (dd, 1H,  $J = 5.8, 3.3$  Hz), 7.30 – 7.26 (m, 2H), 7.19 – 7.16 (m, 1H), 6.33 (s br, 1H), 5.75 (dd, 1H,  $J = 8.9, 2.5$  Hz), 3.98 (dd, 1H,  $J = 11.8, 3.9$  Hz), 3.72 (ddd, 1H,  $J = 12.7, 9.0, 3.9$  Hz), 2.93 (d, 3H,  $J = 4.9$  Hz), 2.61 – 2.43 (m, 1H), 2.22 – 2.01 (m, 2H), 1.83 – 1.60 (m, 3H);  **$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 187.2, 168.6, 143.4, 141.3, 136.9, 135.1, 134.5, 132.0, 130.9, 128.7, 128.1, 127.3, 122.9, 121.8, 114.3, 86.5, 67.6, 29.3, 26.9, 25.0, 22.1; **IR:**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3297, 3055, 2936, 2854, 2235, 1685, 1633, 1529, 1033, 909, 729; **HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  found 396.1378; calculated for  $[\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}]^+$  396.1382.

4.3) D- $\pi$ -A

## 4.3.1) D = 1H-indazole

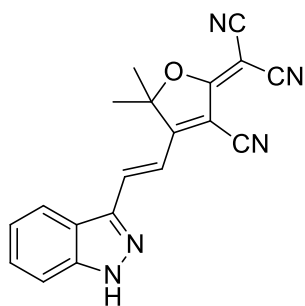


**2-(3-(2-(1H-indazol-3-yl)vinyl)-5,5-dimethylcyclohex-2-en-1-ylidene)malononitrile:** The product was synthesized following the *general procedure A* with 1H-indazole-3-carbaldehyde (100 mg, 0.68 mmol) and 2-(3,5,5-trimethylcyclohex-2-en-1-ylidene)malononitrile (127 mg, 1 eq) (140 mg, yellow solid, 65% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 300 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 13.54 (s, 1H), 8.34 (d, 1H,  $J$  = 8.1 Hz), 7.66 – 7.50 (m, 3H), 7.74 (t, 1H,  $J$  = 7.4 Hz), 7.26 (t, 1H,  $J$  = 7.4 Hz), 7.09 (s, 1H), 2.63 (s, 4H), 1.05 (s, 6H). **<sup>13</sup>C NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 75 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 170.4, 156.0, 141.7, 141.4, 129.78, 129.73, 126.6, 122.7, 121.7, 121.2, 120.9, 114.0, 113.1, 110.7, 76.1, 42.4, 37.8, 31.6, 27.4. **IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3143, 2946, 2216, 1738, 1622, 1471, 1532, 1334, 1246, 1094, 963, 745. **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M+Na]<sup>+</sup> found 315.1612; calculated for [C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>Na]<sup>+</sup> 315.1610. **m.p.:** decomposition > 238°C.

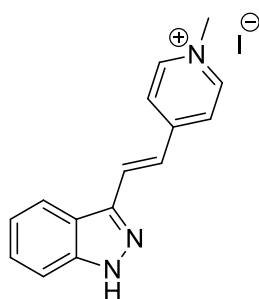


**2-(2-(2-(1H-indazol-3-yl)vinyl)-6-methyl-4H-pyran-4-ylidene)malononitrile:** (improved procedure)<sup>7</sup> 1H-indazole-3-carbaldehyde (50 mg, 0.3 mmol) and 2-(2,6-dimethyl-4H-pyran-4-ylidene)malononitrile (258 mg, 5 eq.) were solubilized in dry MeCN (1 mL). Acetic acid (0.03 mL, 2 eq.) then piperidine (0.03 mL, 1 eq.) were added to the solution before heating it at 60°C for 5 h. The resulting mixture was concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography (dichloromethane: EtOAc 8:2) (45 mg, orange powder, 50% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 300 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 13.65 (s, 1H), 8.35 (d, 1H,  $J$  = 8.2 Hz), 7.78 (d, 1H,  $J$  = 16.5 Hz), 7.62 (d, 1H,  $J$  = 8.4 Hz), 7.57 (d, 1H,  $J$  = 16.5 Hz), 7.45 (t, 1H,  $J$  = 7.2 Hz), 7.28 (t, 1H,  $J$  = 7.4 Hz), 7.20 (d, 1H,  $J$  = 2.1 Hz), 6.69 (d, 1H,  $J$  = 1.4 Hz), 2.49 (s, 3H). **<sup>13</sup>C NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 75 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 164.6, 160.3, 157.3, 141.9, 141.29, 141.27, 127.2, 122.4, 121.4, 121.2, 119.7, 116.0, 111.40, 111.36, 107.8, 106.3, 56.3, 19.8. **IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3243, 2920, 2209, 2194, 1650, 1626, 1505, 1249, 1090, 986, 747, 426. **HRMS (ESI<sup>-</sup>):** [M-H]<sup>-</sup> found 299.0930; calculated for [C<sub>18</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O]<sup>-</sup> 299.0933. **m.p.:** decomposition > 155°C.

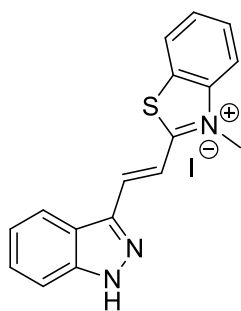
<sup>7</sup> Z. Guo, P. Zhao, W. Zhu, X. Huang, Y. Xie, H. Tian, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 7047–7053.



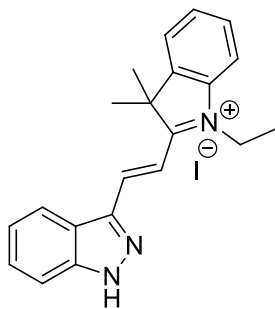
**2-(4-(2-(1H-indazol-3-yl)vinyl)-3-cyano-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile:** The product was synthesized following the *general procedure A* with 1H-indazole-3-carbaldehyde (100 mg, 0.68 mmol) and 2-(3-cyano-4,5,5-trimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile (136 mg, 1 eq) (203 mg, orange solid, 91% isolated yield).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{SO}(\text{CD}_3)_2$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 14.14 (s, 1H), 8.31 – 8.17 (m, 2H), 7.69 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.55 – 7.30 (m, 3H), 1.86 (s, 6H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{SO}(\text{CD}_3)_2$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm) = 177.0, 175.2, 141.5, 140.4, 138.2, 127.2, 123.0, 122.1, 120.5, 114.7, 112.7, 111.9, 111.4, 111.1, 99.3, 99.0, 54.1, 25.2. **IR:**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3249, 2436, 2230, 2213, 1569, 1541, 1464, 1361, 1296, 1113, 970, 745, 657. **HRMS (ESI $^-$ ):**  $[\text{M}-\text{H}]^-$  found 326.1035; calculated for  $[\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}]^+$  326.1042. **m.p.:** 247°C.



**4-(2-(1H-indazol-3-yl)vinyl)-1-methylpyridinium iodide:** The product was synthesized following the *general procedure A* with 1H-indazole-3-carbaldehyde (100 mg, 0.68 mmol) and 1,4-dimethylpyridinium iodide (160 mg, 1 eq) (221 mg, light yellow solid, 89% isolated yield).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{SO}(\text{CD}_3)_2$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 13.72 (s, 1H), 8.87 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 8.45 – 8.25 (m, 4H), 7.76 – 7.63 (m, 2H), 7.47 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.32 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 4.26 (s, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{SO}(\text{CD}_3)_2$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm) = 152.7, 144.9, 141.4, 141.0, 132.6, 126.8, 123.40, 123.35, 122.0, 121.2, 120.7, 111.0, 46.8. **IR:**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3160, 3026, 1620, 1520, 1463, 1234, 1191, 1088, 958, 873, 746, 701. **HRMS (ESI $^+$ ):**  $[\text{M}]^+$  found 236.1183; calculated for  $[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_3]^+$  236.1188. **m.p.:** > 260°C (maximum of the apparatus).

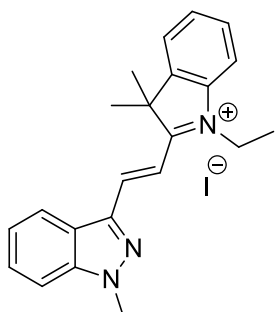


**2-(2-(1H-indazol-3-yl)vinyl)-1-methylbenzo[d]thiazolium iodide:** The product was synthesized following the *general procedure A* with 1H-indazole-3-carbaldehyde (42 mg, 0.28 mmol) and 2,3-dimethylbenzo[d]thiazol-3-ium iodide (83 mg, 1 eq) (69 mg, yellow-green solid, 68% isolated yield).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{SO}(\text{CD}_3)_2$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 14.19 (s, 1H), 8.48 (d, 1H,  $J = 16.0$  Hz), 8.45 (dd, 1H,  $J = 8.1, 1.1$  Hz), 8.42 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz), 8.31 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz), 7.98 (d, 1H,  $J = 16.0$  Hz), 7.90 (ddd, 1H,  $J = 8.5, 7.2, 1.3$  Hz), 7.81 (ddd, 1H,  $J = 8.1, 7.2, 1.0$  Hz), 7.72 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 7.54 (t, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.41 (t, 1H,  $J = 7.2$  Hz), 4.41 (s, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{SO}(\text{CD}_3)_2$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm) = 171.7, 142.1, 141.5, 140.1, 139.5, 129.4, 128.4, 127.9, 127.3, 124.3, 123.0, 121.8, 120.9, 116.9, 113.1, 111.4, 36.4. **IR:**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3090, 3010, 1741, 1615, 1284, 1255, 1147, 1093, 943, 757, 727. **HRMS (ESI $^+$ ):**  $[\text{M}]^+$  found 292.0910; calculated for  $[\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{S}]^+$  292.0908. **m.p.:** 248-249°C.

**2-(2-(1H-indazol-3-yl)vinyl)-1-ethyl-3,3-dimethyl-3H-indolium**

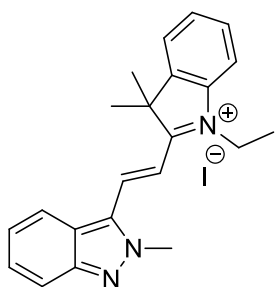
**iodide:** The product was synthesized following the *general procedure A* with 1H-indazole-3-carbaldehyde (100 mg, 0.68 mmol) and 1-ethyl-2,3,3-trimethyl-3H-indolium iodide (215 mg, 1 eq) (193 mg, pink solid, 64% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 14.43 (s, 1H), 8.67 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 8.46 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.03 – 7.89 (m, 2H), 7.80 – 7.60 (m, 4H), 7.56 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.45 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.73 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.86 (s, 6H), 1.52 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 181.0, 144.0, 143.8, 141.7, 140.6, 140.5, 129.4, 129.2, 127.4, 123.5, 123.1, 122.4, 121.0, 115.1, 111.6, 111.3, 52.3, 42.2, 25.7, 13.5. **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3077, 3028, 2973, 1599, 1577, 1533, 1433, 1235, 1098, 958, 772, 748. **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M]<sup>+</sup> found 316.1827; calculated for [C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 316.1814. **m.p.:** 193-195°C.

**1-ethyl-3,3-dimethyl-2-(2-(1-methyl-1H-indazol-3-yl)vinyl)-3H-indolium**

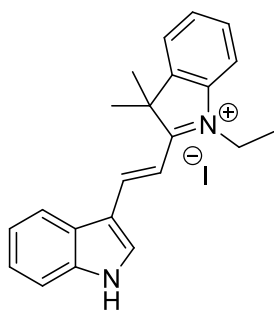
**iodide:** The product was synthesized following the *general procedure A* with 1-methyl-1H-indazole-3-carbaldehyde (15 mg, 0.1 mmol) and 1-ethyl-2,3,3-trimethyl-3H-indolium iodide (30 mg, 1 eq) (20 mg, dark pink solid, 44% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 8.45 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 8.42 – 8.36 (m, 1H), 7.84 – 7.78 (m, 1H), 7.74 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.65 – 7.53 (m, 6H), 5.01 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H), 4.25 (s, 3H), 1.91 (s, 6H), 1.69 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). **<sup>13</sup>C**

**NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 180.8, 144.8, 143.3, 142.0, 140.6, 139.9, 130.04, 130.00, 128.1, 125.4, 123.8, 122.83, 121.73, 115.4, 111.2, 110.5, 52.6, 44.9, 37.2, 27.2, 14.1. **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3003, 2976, 1592, 1534, 1455, 1311, 1237, 1065, 750. **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M]<sup>+</sup> found 330.1975; calculated for [C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 330.1970. **m.p.:** decomposition > 195°C.

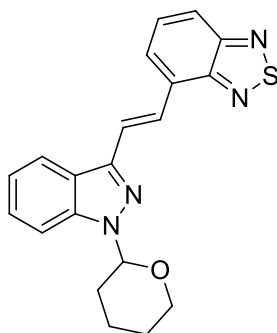
**1-ethyl-3,3-dimethyl-2-(2-(2-methyl-2H-indazol-3-yl)vinyl)-3H-indolium**

**iodide:** The product was synthesized following the *general procedure A* with 2-methyl-2H-indazole-3-carbaldehyde (15 mg, 0.1 mmol) and 1-ethyl-2,3,3-trimethyl-3H-indolium iodide (30 mg, 1 eq) (30 mg, dark purple solid, 66% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz):** δ (ppm) = 8.55 – 8.46 (m, 1H), 8.27 – 8.21 (m, 1H), 7.92 – 7.85 (m, 2H), 7.85 – 7.80 (m, 1H), 7.71 – 7.63 (m, 2H), 7.59 – 7.51 (m, 3H), 4.75 (q, 2H, *J* = 7.3 Hz), 4.54 (s, 3H), 1.93 (s, 6H), 1.67 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz). **<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz):** δ (ppm) = 149.8, 145.2, 142.0, 138.41, 138.31, 132.6, 131.0, 130.8, 128.5, 128.3,

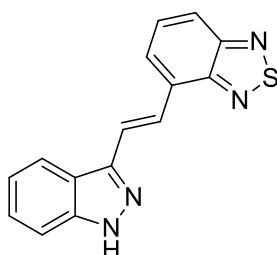
124.2, 124.1, 121.5, 120.3, 115.9, 111.2, 53.8, 43.6, 39.8, 26.9, 13.7. **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 2976, 2932, 1582, 1569, 1427, 1290, 1243, 1065, 760. **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M]<sup>+</sup> found 330.1964; calculated for [C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 330.1970. **m.p.:** decomposition > 150°C.



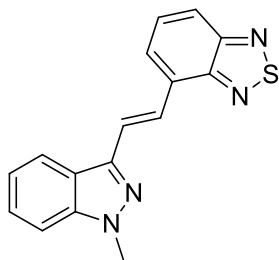
**2-(2-(1H-indol-3-yl)vinyl)-1-ethyl-3,3-dimethyl-3H-indolium iodide:** The product was synthesized following the *general procedure A* with 1H-indole-3-carbaldehyde (145 mg, 1.0 mmol) and 1-ethyl-2,3,3-trimethyl-3H-indolium iodide (315 mg, 1 eq) (260 mg, pink solid, 59% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 8.75 (d, 1H,  $J = 15.6$  Hz), 8.49 (s, 1H), 8.13 (dd, 1H,  $J = 6.4, 1.8$  Hz), 7.73 – 7.37 (m, 7H), 7.27 (d, 1H,  $J = 15.6$  Hz), 4.56 (q, 2H,  $J = 7.3$  Hz), 1.87 (s, 6H), 1.58 (t, 3H,  $J = 7.3$  Hz). **<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 181.4, 151.3, 144.0, 142.2, 141.6, 140.4, 130.3, 129.0, 126.4, 126.0, 124.9, 123.9, 122.0, 118.0, 114.5, 114.2, 105.4, 52.6, 42.0, 27.5, 13.1. **IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3398, 3099, 2974, 1585, 1463, 1422, 1298, 1230, 1116, 748. **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M]<sup>+</sup> found 315.1866; calculated for [C<sub>22</sub>N<sub>23</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 315.1861. **m.p.:** 68-69°C.



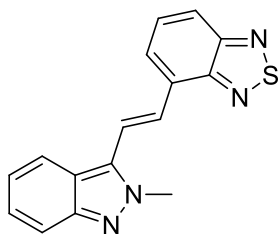
**4-(2-(1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)indazol-3-yl)vinyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazole:** The product was synthesized following the *general procedure B* with 1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-indazole-3-carbaldehyde (58 mg, 0.25 mmol), bromo(benzo[c][1,2,5]thiadiazol-4-ylmethyl)triphenylphosphonium salt (123 mg, 1 eq.) and *t*BuOK (31 mg, 1.1 eq.) (37 mg, yellow powder, 41% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 8.36 (d, 1H,  $J = 16.6$  Hz), 8.15 (d, 1H,  $J = 8.1$  Hz), 8.05 (d, 1H,  $J = 16.7$  Hz), 7.92 (dd, 1H,  $J = 8.7, 0.9$  Hz), 7.74 (d, 1H,  $J = 6.9$  Hz), 7.66 – 7.58 (m, 2H), 7.45 (ddd, 1H,  $J = 8.3, 6.9, 1.0$  Hz), 7.30 (ddd, 1H,  $J = 7.9, 7.0, 0.9$  Hz), 5.77 (dd, 1H,  $J = 9.5, 2.7$  Hz), 4.16 – 4.03 (m, 1H), 3.78 (dt, 1H,  $J = 11.2, 2.7$  Hz), 2.75 – 2.56 (m, 1H), 2.27 – 2.02 (m, 2H), 1.89 – 1.65 (m, 3H). **<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 155.8, 153.5, 143.3, 141.0, 131.0, 129.8, 126.9, 126.8, 126.7, 125.4, 123.2, 122.0, 121.3, 120.4, 110.5, 85.7, 67.8, 29.7, 25.3, 22.8. **IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3076, 2922, 2856, 1689, 1474, 1318, 1224, 1035, 751, 737. **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 363.1275; calculated for [C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>OS]<sup>+</sup> 363.1280. **m.p.:** 162-163°C.



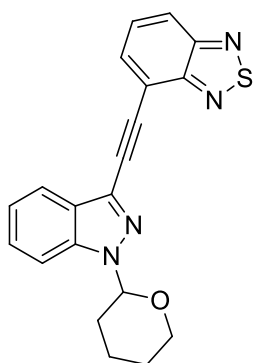
**4-(2-(1H-indazol-3-yl)vinyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazole:** The product was synthesized following the *general procedure C* with 4-(2-(1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-indazol-3-yl)vinyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazole (28 mg, 0.08 mmol) and Amberlyst IR120 (80 mg) (20 mg, yellow powder, 93% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 300 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 8.53 (d, 1H,  $J = 16.7$  Hz), 8.24 (dt, 1H,  $J = 8.2, 0.9$  Hz), 8.10 (d, 1H,  $J = 16.8$  Hz), 8.01 – 7.94 (m, 2H), 7.77 (dd, 1H,  $J = 8.8, 6.9$  Hz), 7.65 (dt, 1H,  $J = 8.4, 0.9$  Hz), 7.45 (ddd, 1H,  $J = 8.0, 6.9, 1.0$  Hz), 7.29 (ddd, 1H,  $J = 8.0, 6.9, 0.9$  Hz). **<sup>13</sup>C NMR (CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 75 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 156.6, 154.1, 143.9, 142.7, 131.7, 131.0, 128.1, 127.3, 127.0, 126.5, 122.22, 122.16, 121.4, 120.9, 111.4. **IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3152, 3119, 2914, 1627, 1534, 1462, 1341, 1253, 1094, 728. **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 279.0716; calculated for [C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>S]<sup>+</sup> 279.0704. **m.p.:** decomposition > 205°C.



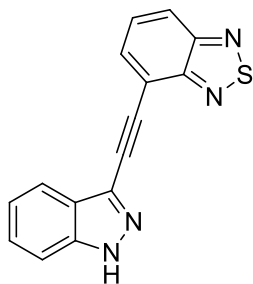
**4-(2-(1-methyl-1H-indazol-3-yl)vinyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazole:** The product was synthesized following the *general procedure B* with 1-methyl-1H-indazole-3-carbaldehyde (40 mg, 0.25 mmol), bromo (benzo[c][1,2,5]thiadiazol-4-ylmethyl)triphenylphosphonium salt (123 mg, 1 eq.) and *t*BuOK (31 mg, 1.1 eq.) (50 mg, bright yellow powder, 68% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 300 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 8.49 (d, 1H, *J* = 16.7 Hz), 8.21 (dt, 1H, *J* = 8.2, 0.9 Hz), 8.06 (d, 1H, *J* = 16.8 Hz), 8.00 – 7.92 (m, 2H), 7.76 (dd, 1H, *J* = 8.9, 6.9 Hz), 7.64 (dt, 1H, *J* = 8.5, 0.8 Hz), 7.52 – 7.44 (ddd, 1H, *J* = 7.9, 6.9, 1.1 Hz), 7.30 (ddd, 1H, *J* = 7.9, 6.9, 0.9 Hz), 4.14 (s, 3H). **<sup>13</sup>C NMR (CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 75 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 155.7, 153.1, 141.5, 141.4, 130.8, 130.0, 127.1, 126.3, 125.6, 125.2, 122.1, 121.2, 120.6, 119.9, 109.8, 35.0. **IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 2926, 1743, 1451, 1247, 1066, 962, 740. **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 293.0859; calculated for [C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>S]<sup>+</sup> 293.0861. **m.p.:** 158-159°C.



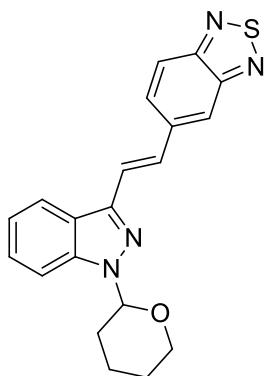
**4-(2-(2-methyl-2H-indazol-3-yl)vinyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazole:** The product was synthesized following the *general procedure B* with 2-methyl-2H-indazole-3-carbaldehyde (40 mg, 0.25 mmol), bromo (benzo[c][1,2,5]thiadiazol-4-ylmethyl)triphenylphosphonium salt (123 mg, 1 eq.) and *t*BuOK (31 mg, 1.1 eq.) (53 mg, bright orange powder, 73% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 300 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 8.59 (d, 1H, *J* = 16.4 Hz), 8.17 (dt, 1H, *J* = 8.4, 1.0 Hz), 8.04 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz), 7.99 (dd, 1H, *J* = 8.7, 0.8 Hz), 7.97 (d, 1H, *J* = 16.5 Hz), 7.77 (dd, 1H, *J* = 8.8, 7.0 Hz), 7.67 (dt, 1H, *J* = 8.6, 1.0 Hz), 7.33 (ddd, 1H, *J* = 8.6, 6.7, 1.1 Hz), 7.22 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 6.7, 1.0 Hz), 4.37 (s, 3H). **<sup>13</sup>C NMR (CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 75 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 156.6, 153.9, 149.0, 133.4, 131.3, 130.9, 128.7, 127.2, 126.5, 123.3, 121.50, 121.48, 121.3, 121.0, 118.6, 38.8. **IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3069, 2926, 2855, 1622, 1462, 1291, 1249, 1050, 954, 747. **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 293.0870; calculated for [C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>S]<sup>+</sup> 293.0861. **m.p.:** 143-145°C.



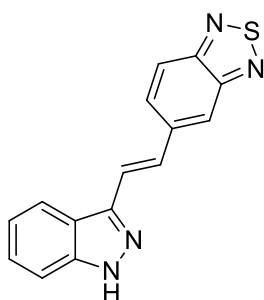
**4-((1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-indazol-3-yl)ethynyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazole:** The product was synthesized following the *general procedure D* with 3-iodo-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)indazole (150 mg, 0.45 mmol) and 4-ethynylbenzo[c][1,2,5]thiadiazole (110 mg, 1.5 eq.) (74 mg, yellow powder, 45% isolated yield).



**4-((1H-indazol-3-yl)ethynyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazole:** The product was synthesized following the *general procedure C* with 4-((1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-indazol-3-yl)ethynyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazole (74 mg, 0.20 mmol) and Amberlyst IR120 (205 mg) (50 mg, brown powder, 88% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 13.70 (s, 1H), 8.19 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 8.09 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.93 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.80 (dd, 1H, *J* = 8.9, 7.0 Hz), 7.66 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.48 (ddd, 1H, *J* = 8.1, 6.9, 0.9 Hz), 7.31 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz); **<sup>13</sup>C NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 154.1, 140.1, 133.1, 129.9, 127.0, 124.4, 122.3, 121.9, 119.5, 115.5, 111.1.

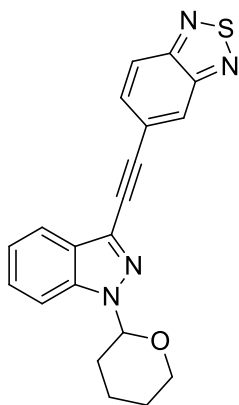


**5-(2-(1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)indazol-3-yl)vinyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazole:** The product was synthesized following the *general procedure B* with 1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)indazole-3-carbaldehyde (230 mg, 1 mmol), bromo (benzo[c][1,2,5]thiadiazol-5-ylmethyl)triphenylphosphonium salt (491 mg, 1 eq.) and *t*BuOK (123 mg, 1.1 eq.) (185 mg, yellow powder, 51% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 8.01 – 7.87 (m, 4H), 7.66 – 7.51 (m, 3H), 7.43 – 7.35 (m, 1H), 7.27 – 7.20 (m, 1H), 5.69 (dd, 1H, *J* = 9.5, 2.7 Hz), 4.03 (dd, 1H, *J* = 11.1, 2.1 Hz), 3.71 (td, 1H, *J* = 11.2, 2.8 Hz), 2.56 (ddd, 1H, *J* = 13.7, 10.3, 6.7 Hz), 2.21 – 1.97 (m, 2H), 1.80 – 1.59 (m, 3H). **<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 155.6, 154.7, 142.5, 140.9, 138.9, 129.6, 127.8, 126.9, 123.3, 122.9, 122.0, 121.5, 120.8, 119.1, 110.5, 85.5, 67.8, 29.6, 25.1, 22.7. **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3050, 2924, 2854, 1610, 1318, 1227, 1081, 1059, 1037, 741. **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 363.1070; calculated for [C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>OS]<sup>+</sup> 363.1280. **m.p.:** 169–170 °C.

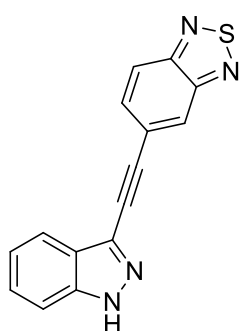


**5-(2-(1H-indazol-3-yl)vinyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazole:** The product was synthesized following the *general procedure C* with 5-(2-(1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-indazol-3-yl)vinyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazole (185 mg, 0.5 mmol) and Amberlyst IR120 (500 mg) (91 mg, yellow powder, 65% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 13.30 (s, 1H), 8.34 – 8.25 (m, 3H), 8.09 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz), 7.87 (d, 1H, *J* = 16.7 Hz), 7.76 (d, 1H, *J* = 16.7 Hz), 7.58 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.42 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.25 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz). **<sup>13</sup>C NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 155.2, 154.1, 141.9, 141.3, 139.1, 128.3, 128.0, 126.4, 123.8, 121.14, 121.07, 120.87, 120.80, 118.7, 110.5. **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3223, 2911, 1735, 1662, 1416, 1193, 963, 801. **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 279.0704; calculated for [C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>S]<sup>+</sup> 279.0704. **m.p.:** 200–221 °C.

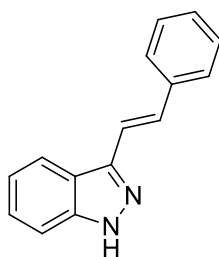




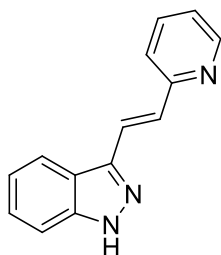
**5-((1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)indazol-3-yl)ethynyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazole:** The product was synthesized following the *general procedure D* with 3-iodo-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)indazole (328 mg, 1 mmol) and 5-ethynylbenzo[c][1,2,5]thiadiazole (192 mg, 1.2 eq.) (237 mg, yellow powder, 66% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 8.28 (t, 1H,  $J$  = 1.2 Hz), 8.00 (dd, 1H,  $J$  = 9.0, 0.9 Hz), 7.89 (dt, 1H,  $J$  = 8.1, 1.1 Hz), 7.78 (dd, 1H,  $J$  = 9.1, 1.5 Hz), 7.66 (dd, 1H,  $J$  = 8.5, 0.9 Hz), 7.46 (ddd, 1H,  $J$  = 8.4, 6.9, 1.1 Hz), 7.30 (ddd, 1H,  $J$  = 8.0, 6.9, 0.9 Hz), 5.79 (dd, 1H,  $J$  = 9.1, 2.6 Hz), 4.04 (ddt, 1H,  $J$  = 11.6, 3.7, 2.2 Hz), 3.84 – 3.70 (m, 1H), 2.61 (dtd, 1H,  $J$  = 13.3, 9.1, 5.3 Hz), 2.14 (ddt, 2H,  $J$  = 17.2, 11.1, 2.9 Hz), 1.89 – 1.58 (m, 3H); **<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 154.7, 154.5, 139.9, 132.5, 128.7, 127.4, 126.3, 124.8, 124.4, 122.5, 121.6, 120.7, 110.9, 92.3, 85.9, 84.6, 67.5, 29.5, 25.2, 22.5; **IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 2933, 2843, 2214, 1604, 1509, 1409, 1343, 1257, 1221, 1078, 1030, 864, 764; **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 361.1113; calculated for [C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>OS]<sup>+</sup> 361.1123; **m.p.:** 145-150°C.



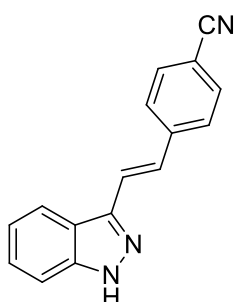
**5-((1H-indazol-3-yl)ethynyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazole:** The product was synthesized following the *general procedure C* with 5-((1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)indazol-3-yl)ethynyl)benzo[c][1,2,5]thiadiazole (100 mg, 0.27 mmol) and Amberlyst IR120 (277 mg) (24 mg, yellow powder, 32% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 300 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 13.66 (s, 1H), 8.49 (dd, 1H,  $J$  = 1.6, 0.9 Hz), 8.18 (dd, 1H,  $J$  = 9.1, 0.9 Hz), 8.02 – 7.89 (m, 2H), 7.65 (dt, 1H,  $J$  = 8.4, 0.9 Hz), 7.47 (ddd, 1H,  $J$  = 8.3, 6.8, 1.1 Hz), 7.30 (ddd, 1H,  $J$  = 7.9, 6.9, 0.9 Hz); **<sup>13</sup>C NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 75 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 154.0, 153.8, 140.1, 132.3, 127.2, 127.0, 124.3, 124.2, 123.6, 121.8, 121.8, 119.7, 111.0, 91.6, 85.1; **IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 2903, 1607, 1341, 1261, 1067, 865, 818, 739; **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 277.0540; calculated for [C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>S]<sup>+</sup> 277.0548; **m.p.:** > 250°C (above apparatus maximum).



**3-styryl-1H-indazole:** The product was synthesized following the *general procedure E* with 3-iodo-1H-indazole (122 mg, 0.5 mmol) and styrene (0.29 mL, 5 eq.) (55 mg, white powder, 50% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 10.30 (s, 1H), 8.06 (dt, 1H,  $J$  = 8.2, 0.9 Hz), 7.61 (dd, 2H,  $J$  = 8.4, 1.2 Hz), 7.52 (d, 2H,  $J$  = 9.7 Hz), 7.50 (dt, 1H,  $J$  = 8.4, 1.0 Hz), 7.45 – 7.39 (m, 3H), 7.31 (dt, 1H,  $J$  = 4.5, 1.8 Hz), 7.29 – 7.23 (m, 1H). **<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):**  $\delta$  (ppm) = 144.4, 141.7, 137.4, 131.5, 128.9, 128.1, 127.2, 126.7, 121.57, 121.45, 121.1, 120.3, 110.2. **IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3115, 2921, 1251, 1092, 952, 916, 730, 685, 501, 427. **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 221.1084; calculated for [C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 221.1079. **m.p.:** 160-162°C.

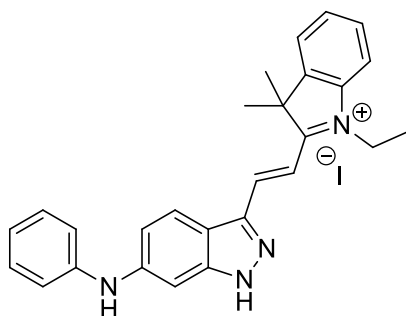


**3-(2-(pyridin-2-yl)vinyl)-1H-indazole:** The product was synthesized following the *general procedure E* with 3-iodo-1H-indazole (70 mg, 0.3 mmol) and 2-vinylpyridine (147 mg, 5 eq) (14 mg, yellow powder, 22% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 12.38 (s, 1H), 8.61 (ddd, 1H, *J* = 4.7, 1.6, 0.8 Hz), 8.19 (dt, 1H, *J* = 8.2, 1.0 Hz), 8.09 (d, 1H, *J* = 16.3 Hz), 7.78 (td, 1H, *J* = 7.7, 1.8 Hz), 7.64 (d, 1H, *J* = 16.3 Hz), 7.64 – 7.59 (m, 2H), 7.42 (ddd, 1H, *J* = 8.0, 6.9, 1.1 Hz), 7.29 – 7.22 (m, 2H). **<sup>13</sup>C NMR (CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 156.6, 150.6, 143.5, 142.8, 137.4, 130.1, 127.2, 125.3, 123.2, 123.0, 122.3, 122.1, 121.5, 111.3. **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3057, 2919, 2855, 1640, 1617, 1590, 1461, 1432, 1255, 747, 425. **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 222.1035; calculated for [C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 222.1031. **m.p.:** 169-171°C.



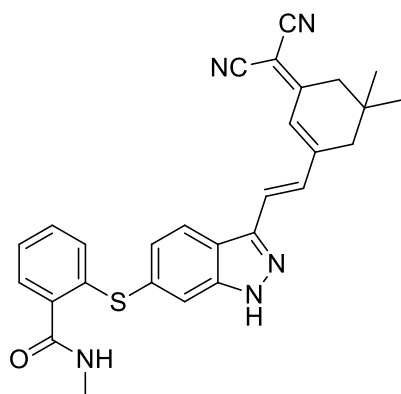
**4-(2-(1H-indazol-3-yl)vinyl)benzonitrile:** The product was synthesized following the *general procedure E* with 3-iodo-1H-indazole (122 mg, 0.5 mmol) and 4-cyanostyrene (200 mg, 3 eq) (39 mg, white powder, 32% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 12.44 (s, 1H), 8.20 (dt, 1H, *J* = 8.2, 1.0 Hz), 7.91 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz), 7.78 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz), 7.77 (d, 1H, *J* = 16.6 Hz), 7.65 (d, 1H, *J* = 16.6 Hz), 7.62 (dt, 1H, *J* = 8.4, 0.9 Hz), 7.46 – 7.40 (ddd, 1H, *J* = 8.4, 6.9, 1.0 Hz), 7.25 (ddd, 1H, *J* = 8.2, 6.9, 0.9 Hz). **<sup>13</sup>C NMR (CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 143.29, 143.24, 142.8, 133.4, 128.7, 127.9, 127.3, 125.3, 122.22, 122.16, 121.5, 119.6, 111.4, 111.3. **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3282, 2920, 2222, 1620, 1600, 1249, 1089, 959, 740, 580, 426. **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 246.1030; calculated for [C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 246.1031. **m.p.:** 202-204°C.

#### 4.3.1) D = 6-anilino-1H-indazole

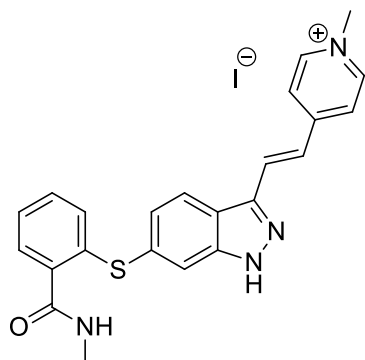


**1-ethyl-3,3-dimethyl-2-(2-(6-(phenylamino)-1H-indazol-3-yl)vinyl)-3H-indolium iodide:** The product was synthesized following the *general procedure A* with 6-anilino-1H-indazole-3-carbaldehyde (30 mg, 0.12 mmol) and 1-ethyl-2,3,3-trimethyl-3H-indolium iodide (38 mg, 1 eq) (1.5 mg, pink solid, 2% isolated yield). **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M]<sup>+</sup> found 407.2233; calculated for [C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>N<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 407.2236.

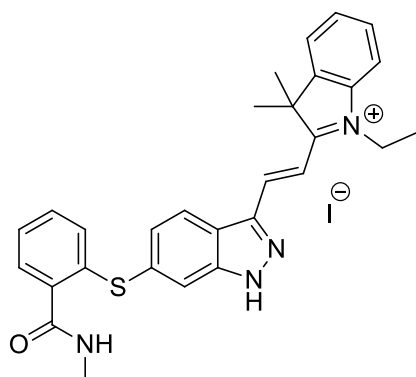
## 4.3.2) D = 6-((N-methylbenzamid-2-yl)thio)-1H-indazole



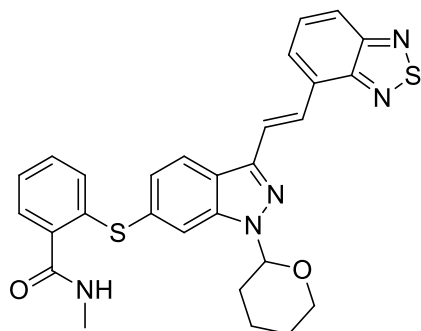
**2-((3-(2-(3-(dicyanomethylene)-5,5-dimethylcyclohex-1-en-1-yl)vinyl)-1H-indazol-6-yl)thio)-N-methylbenzamide:** The product was synthesized following the *general procedure A* with 2-((3-formyl-1H-indazol-6-yl)thio)-N-methylbenzamide (52 mg, 0.17 mmol) and 2-(3,5,5-trimethylcyclohex-2-en-1-ylidene)malononitrile (31 mg, 1 eq) (40 mg, dark orange solid, 50% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 13.57 (s, 1H), 8.36 (dd, 2H, *J* = 10.2, 6.6 Hz), 7.66 – 7.45 (m, 3H), 7.30 (ddd, 2H, *J* = 6.7, 4.4, 1.8 Hz), 7.19 (dd, 1H, *J* = 8.5, 1.5 Hz), 7.11 – 7.01 (m, 2H), 2.80 – 2.70 (m, 3H), 2.62 (d, 4H, *J* = 5.4 Hz), 1.04 (s, 6H); **<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 170.3, 167.8, 155.8, 141.9, 137.3, 135.2, 133.1, 130.27, 130.24, 129.3, 127.8, 126.3, 125.7, 123.0, 122.2, 120.3, 114.4, 114.0, 113.1, 76.4, 42.4, 37.8, 31.6, 27.4, 26.1; **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3410, 3159, 2957, 2228, 2216, 1644, 1564, 1517, 1160, 746. 401.1443; **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 480.1860, calculated for [C<sub>28</sub>H<sub>26</sub>N<sub>5</sub>OS]<sup>+</sup> 480.1858.



**1-methyl-4-(2-(6-((2-(methylcarbamoyl)phenyl)thio)-1H-indazol-3-yl)vinyl)pyridinium iodide:** The product was synthesized following the *general procedure A* with 2-((3-formyl-1H-indazol-6-yl)thio)-N-methylbenzamide (52 mg, 0.17 mmol) and 1,4-dimethylpyridin-1-ium iodide (39 mg, 1 eq) (20 mg, dark yellow solid, 23% isolated yield). **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M]<sup>+</sup> found 401.1443; calculated for [C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>OS]<sup>+</sup> 401.1436.

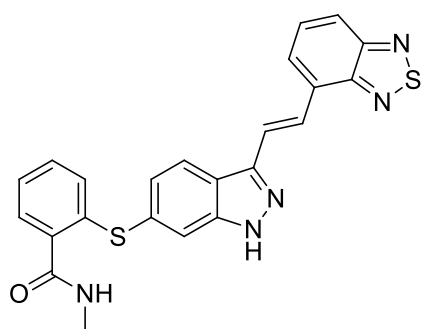


**1-ethyl-3,3-dimethyl-2-(2-(6-((2-(methylcarbamoyl)phenyl)thio)-1H-indazol-3-yl)vinyl)-3H-indolium iodide:** The product was synthesized following the *general procedure A* with 2-((3-formyl-1H-indazol-6-yl)thio)-N-methylbenzamide (67 mg, 0.21 mmol) and 1-ethyl-2,3,3-trimethyl-3H-indolium iodide (68 mg, 1 eq) (80 mg, dark red solid, 63% isolated yield). **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M]<sup>+</sup> found 481.2074; calculated for [C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>N<sub>4</sub>OS]<sup>+</sup> 481.2062.



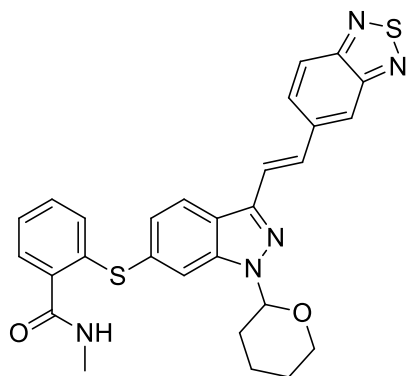
**2-((3-(2-(benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-4-yl)vinyl)-1-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-yl)thio)-*N*-methylbenzamide:** The product was synthesized following the *general procedure B* with 2-((3-formyl-1-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-yl)thio)-*N*-methylbenzamide (115 mg, 0.3 mmol), bromo (benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-4-ylmethyl)triphenylphosphonium salt (147 mg, 1 eq.) and *t*BuOK (34 mg, 1.1 eq.) (59 mg, yellow powder, 39%

isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 8.31 (d, 1H, *J* = 16.6 Hz), 8.07 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 8.00 (d, 1H, *J* = 16.7 Hz), 7.92 (dd, 1H, *J* = 8.7, 0.9 Hz), 7.76 – 7.57 (m, 4H), 7.31 – 7.17 (m, 4H), 6.29 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz), 5.69 (dd, 1H, *J* = 9.6, 2.5 Hz), 4.06 (d, 1H, *J* = 12.7 Hz), 3.79 – 3.66 (m, 1H), 2.96 (d, *J* = 4.9 Hz, 3H), 2.65 – 2.50 (m, 1H), 2.22 – 2.04 (m, 2H), 1.86 – 1.66 (m, 3H); **<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 169.4, 156.5, 154.1, 144.1, 142.1, 137.2, 135.9, 134.1, 132.4, 131.6, 131.5, 130.5, 129.5, 127.95, 127.74, 127.66, 126.7, 125.6, 123.4, 122.8, 121.3, 115.2, 86.7, 68.6, 30.4, 27.6, 25.9, 23.4; **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3267, 2927, 3853, 1648, 1547, 1407, 1315, 1225, 1076, 1055, 1036, 748; **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 528.1546; calculated for [C<sub>28</sub>H<sub>26</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 528.1528; **m.p.:** 221-222°C.



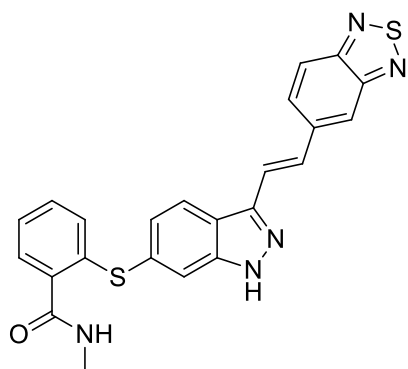
**2-((3-(2-(benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-4-yl)vinyl)-1*H*-indazol-6-yl)thio)-*N*-methylbenzamide:** The product was synthesized following the *general procedure C* with 2-((3-(2-(benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-4-yl)vinyl)-1-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-yl)thio)-*N*-methylbenzamide (33 mg, 0.06 mmol) and Amberlyst IR120 (65 mg) (7 mg, light yellow powder, 25% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,**

**400 MHz):** δ (ppm) = 13.40 (s, 1H), 8.44 (d, 1H, *J* = 16.7 Hz), 8.39 (q, 1H, *J* = 4.6 Hz), 8.24 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 8.07 – 7.95 (m, 3H), 7.78 (dd, 1H, *J* = 8.8, 7.0 Hz), 7.61 (d, 1H, *J* = 1.2 Hz), 7.53 – 7.46 (m, 1H), 7.37 – 7.24 (m, 2H), 7.23 (dd, 1H, *J* = 8.4, 1.5 Hz), 7.05 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.3 Hz), 2.77 (d, 3H, *J* = 4.6 Hz); **<sup>13</sup>C NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 101 MHz):** δ (ppm) = 167.7, 155.1, 152.5, 142.6, 141.9, 137.0, 135.6, 132.6, 130.32, 130.25, 130.0, 129.9, 127.8, 126.2, 125.8, 125.6, 125.4, 121.7, 120.2, 114.8, 26.1; **IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3339, 3214, 2982, 2893, 1645, 1538, 1064, 958, 851, 800, 741, 614; **HRMS (ESI<sup>+</sup>):** [M+H]<sup>+</sup> found 444.0938; calculated for [C<sub>23</sub>H<sub>18</sub>N<sub>5</sub>OS<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 444.0953; **m.p.:** 248-249°C.



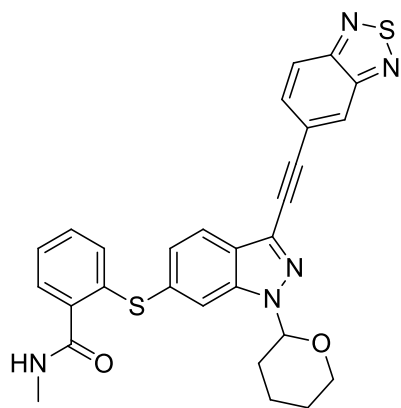
**2-((3-(2-(benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-5-yl)vinyl)-1-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-yl)thio)-*N*-methylbenzamide:** The product was synthesized following the *general procedure B* with 2-((3-formyl-1-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-yl)thio)-*N*-methylbenzamide (118 mg, 0.3 mmol), bromo (benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-5-ylmethyl)triphenylphosphonium salt (147 mg, 1 eq.) and *t*BuOK (34 mg, 1.1 eq.) (77 mg, light yellow powder, 50% isolated yield). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ (ppm) = 8.40 (q, 1H, *J* = 4.6 Hz), 8.33 – 8.27 (m, 3H), 8.09 (d, 1H, *J* = 9.2

Hz), 7.96 (d, 1H, *J* = 0.6 Hz), 7.86 (d, 1H, *J* = 16.7 Hz), 7.78 (d, 1H, *J* = 16.7 Hz), 7.51 (dd, 1H, *J* = 7.3, 1.8 Hz), 7.36 – 7.21 (m, 3H), 6.99 (dd, 1H, *J* = 7.7, 1.3 Hz), 5.93 (dd, 1H, *J* = 9.6, 1.9 Hz), 3.93 – 3.88 (m, 1H), 3.84 – 3.71 (m, 1H), 2.79 (d, 3H, *J* = 4.6 Hz), 2.47 – 2.35 (m, 1H), 2.08 – 1.99 (m, 2H), 1.80 – 1.73 (m, 1H), 1.62 – 1.55 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ (ppm) = 167.8, 155.1, 154.2, 141.9, 141.1, 138.7, 136.28, 136.17, 132.9, 130.4, 129.6, 129.4, 128.3, 127.8, 126.8, 125.9, 122.6, 122.2, 121.7, 121.3, 119.2, 115.4, 84.1, 66.7, 29.0, 26.1, 24.8, 22.1; IR: ν (cm<sup>-1</sup>) = 3283, 2950, 1735, 1645, 1584, 1548, 1204, 1076, 1034, 794, 608; HRMS (ESI<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup> found 528.1531; calculated for [C<sub>28</sub>H<sub>26</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 528.1528; m.p.: 222-223°C.

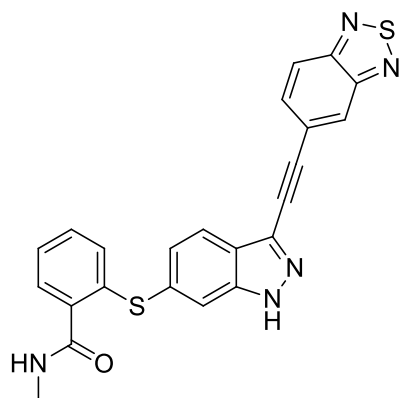


**2-((3-(2-(benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-5-yl)vinyl)-1*H*-indazol-6-yl)thio)-*N*-methylbenzamide:** The product was synthesized following the *general procedure C* with 2-((3-(2-(benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-5-yl)vinyl)-1-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-yl)thio)-*N*-methylbenzamide (40 mg, 0.08 mmol) and Amberlyst IR120 (70 mg) (11 mg, light yellow powder, 33% isolated yield). <sup>1</sup>H NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 400 MHz): δ (ppm) = 13.39 (s, 1H), 8.39 (q, 1H, *J* = 4.5 Hz), 8.33 – 8.24 (m, 3H), 8.10 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz), 7.86 (d, 1H, *J*

= 16.7 Hz), 7.77 (d, 1H, *J* = 16.7 Hz), 7.61 (dd, 1H, *J* = 1.5, 0.7 Hz), 7.49 (dd, 1H, *J* = 7.1, 2.0 Hz), 7.40 – 7.24 (m, 2H), 7.20 (dd, 1H, *J* = 8.5, 1.5 Hz), 7.04 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.3 Hz), 2.77 (d, 3H, *J* = 4.6 Hz); <sup>13</sup>C NMR (SO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 101 MHz): δ (ppm) = 167.9, 155.1, 154.2, 139.0, 137.0, 135.6, 132.6, 130.3, 130.0, 128.5, 128.3, 127.8, 126.2, 125.5, 121.9, 121.2, 120.4, 118.9, 26.1; IR: ν (cm<sup>-1</sup>) = 3322, 3213, 2965, 2893, 1644, 1539, 1337, 1273, 1065, 953, 871, 798, 754, 615; HRMS (ESI<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup> found 444.0965; calculated for [C<sub>23</sub>H<sub>18</sub>N<sub>5</sub>OS<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 444.0953; m.p.: 250-251°C.



**2-((3-(benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-5-ylethynyl)-1-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-yl)thio)-*N*-methylbenzamide:** The product was synthesized following the *general procedure D* with 3-iodo-6-((*N*-methylbenzamid-2-yl)thio)-1-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)indazole (40 mg, 0.08 mmol) and 5-ethynylbenzo[*c*][1,2,5]thiadiazole (19 mg, 1.5 eq.) (9 mg, yellow powder, 21% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) = 8.27 (s, 1H), 8.00 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.80 – 7.74 (dd, *J* = 9.1, 1.5 Hz, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.63 – 7.59 (m, 2H), 7.33 – 7.14 (m), 6.26 (s, 1H), 5.70 (dd, *J* = 9.4, 2.0 Hz, 1H), 4.04 – 3.96 (m, 1H), 3.72 – 3.64 (m, 1H), 2.95 (dd, *J* = 4.9, 3.8 Hz, 3H), 2.55 – 2.47 (m, 1H), 2.26 – 2.11 (m, 2H), 1.80 – 1.68 (m, 3H); **<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):** δ (ppm) = 168.6, 154.7, 151.2, 140.3, 137.3, 134.2, 132.4, 131.9, 131.0, 128.8, 127.3, 126.2, 124.9, 124.2, 121.7, 121.3, 114.6, 114.0, 92.8, 86.3, 67.9, 66.9, 53.6, 51.0, 29.9, 29.5, 26.9, 25.1, 22.4.



**2-((3-(benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-5-ylethynyl)-1*H*-indazol-6-yl)thio)-*N*-methylbenzamide:** APTS (3 mg, 1 eq.) was added to a solution of 2-((3-(benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-5-ylethynyl)-1-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-1*H*-indazol-6-yl)thio)-*N*-methylbenzamide (9 mg, 0,017 mol) in a mixture of MeoH: THF (1:1, 0,4 mL). After 16 h, at room temperature, the acid was precipitated by addition of Et<sub>2</sub>O (2 mL) and filtered of. The crude product was purified by flash chromatography (DCM: MeOH, 98:2) (1 mg, light yellow solid, 13% isolated yield). **<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz):** δ (ppm) = 8.22 (s, 1H), 7.98 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.81 – 7.71 (m, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.45 – 7.35 (m, 2H), 7.29 – 7.21 (m, 2H), 7.18 – 7.13 (m, 2H), 2.75 (d, *J* = 4.7 Hz, 3H).







# Résumé

## *Ligands photo-actifs pour l'imagerie de fluorescence du VEGFr*

Les VEGFr (*Vascular Endothelium Growth Factor receptors*, récepteurs des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire) sont des protéines responsables de l'angiogenèse, c'est-à-dire, la croissance des vaisseaux sanguins. De fait, ils sont impliqués dans les maladies liées à une vascularisation néfaste comme dans la croissance des tumeurs cancéreuses ou de néovascularisation rétinienne. Traiter ces vaisseaux sanguins sans atteindre les tissus sains est un enjeu qui nécessite de les imager spécifiquement et précisément, ces deux critères pouvant être atteints par imagerie de fluorescence. La spécificité en imagerie de fluorescence repose sur l'emploi d'une sonde, c'est-à-dire un fluorophore sélectif du phénomène à imager.

Pour synthétiser des sondes sélectives, nous nous sommes inspirés d'un ligand connu du VEGFr : l'axitinib. La structure chimique de l'axitinib comporte un hétérocycle indazole avec deux rôles essentiels : (i) dans la fluorescence de l'axitinib, (ii) dans sa sélectivité pour le VEGFr. Cette structure a été modifiée de façon à introduire des substituants rendant la molécule plus fluorescente tout en conservant au mieux le squelette responsable de l'activité biologique.

Une librairie d'une vingtaine de fluorophores a été synthétisée et étudiée pour des applications en imagerie de fluorescence.

Mots clés : *Indazole, Synthèse organique, Fluorescence, Imagerie de fluorescence, VEGFr*

# Abstract

## *Photo-active ligands for the fluorescent imaging of the VEGFr*

VEGFr (*Vascular Endothelium Growth Factor receptors*) are proteins responsible for the angiogenesis, meaning the growth of blood vessels. Consequently, they are involved in diseases due to harmful vascularization such as tumor growth or retinal neovascularization. Treating those blood vessels without harming healthy tissues is an issue. It requires specific and precise images of the blood vessels, both criteria being achievable thanks to fluorescent imaging. The specificity of fluorescent imaging relies on the use of a probe, meaning a selective fluorophore.

To synthesize selective probes, we were inspired by a known ligand of the VEGFr: the axitinib. The chemical structure of the axitinib has an indazole heterocycle with two key roles: (i) in the fluorescence of the axitinib, (ii) in its selectivity for the VEGFr. Substituents were introduced to increase the overall fluorescence of the molecule while preserving the backbone responsible for the biological activity to the best of our ability.

A library of about twenty fluorophores was synthesized and studied for applications in fluorescent imaging.

Key words: *Indazole, Organic Synthesis, Fluorescence, Fluorescent Imaging, VEGFr*