



Développement d'une nouvelle méthode de détection pour les petits analytes basée sur l'assemblage supramoléculaire d'aptamères générant de la fluorescence

Rim Karkori

► To cite this version:

Rim Karkori. Développement d'une nouvelle méthode de détection pour les petits analytes basée sur l'assemblage supramoléculaire d'aptamères générant de la fluorescence. Autre. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2024. Français. ⟨NNT : 2024GRALV088⟩. ⟨tel-05140933⟩

HAL Id: tel-05140933

<https://theses.hal.science/tel-05140933v1>

Submitted on 2 Jul 2025

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.



HAL Authorization

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Chimie organique

Unité de recherche : Département de Chimie Moléculaire

Développement d'une nouvelle méthode de détection pour les petits analytes basée sur l'assemblage supramoléculaire d'aptamères générant de la fluorescence

Development of a new detection method for small analytes based on the fluorogenic supramolecular assembly of aptamers

Présentée par :

Rim KARKORI

Direction de thèse :

Nicolas SPINELLI
PROFESSEUR D'UNIVERSITE, UGA
Isabelle BAUSSANNE
CHARGÉE DE RECHERCHE, CNRS

Directeur de these

Co-encadrante de
thèse

Rapporteurs :

Cyrille SABOT
DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS Paris Normandie
Laura IANNAZZO
CHARGÉE DE RECHERCHE HDR, CNRS Ile-de-France Villejuif

Thèse soutenue publiquement le 16 décembre 2024, devant le jury composé de :

Nicolas SPINELLI,
PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes
Cyrille SABOT,
DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS Paris Normandie
Laura IANNAZZO,
CHARGÉE DE RECHERCHE HDR, CNRS Ile-de-France Villejuif
Corinne RAVELET,
PROFESSEURE DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Directeur de these

Rapporteur

Rapporteuse

Présidente

Invités :

Isabelle BAUSSANNE
CHARGÉE DE RECHERCHE, CNRS, Université Grenoble Alpes



Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent aux membres du jury, les Dr. Laura Iannazzo et Dr. Cyrille Sabot ainsi que le Pr. Corinne Ravelet pour avoir bien voulu accepter d'évaluer ce travail.

Je ne saurais exprimer en peu de mots toute ma gratitude envers mes directeurs de thèse, le Pr. Nicolas Spinelli et le Dr. Isabelle Baussanne. Je leur suis infiniment reconnaissante pour leur disponibilité, leur écoute, leur bienveillance, leur sympathie, leur confiance et leurs conseils avisés, ainsi que leurs encouragements durant les périodes de doutes ou de difficultés. J'ai énormément appris grâce à eux, et faire face aux défis de la recherche aurait été autrement plus difficile sans leur précieuse guidance et présence à mes côtés.

Un grand merci aux membres permanents des équipes I₂BM du DCM (Didier, Olivier, Thomas, Mélissa, Sabine, Nathalie, Hugues, Rémy, Muriel, Eric...) et COMET du DPM (Marie-Ange, Philippe, Basile, Yung-Sing, Marie-Carmen, Romain...) pour m'avoir accueillie avec gentillesse et bonne humeur. Les remarques et les questions posées durant les présentations furent grandement appréciées. Je tiens également à remercier le personnel administratif des deux équipes (Pascale, Régine et Véronique) pour leur aide et leur réactivité.

Merci aux thésards, post-docs et ingénieurs d'étude pour tous les moments qui ont égayé mes journées, et pour m'avoir prêté leurs oreilles quand il était temps de commiserer. Merci en particulier aux « collocs » de bureau pour les fous rires parfois un peu trop bruyants (Rudy et Massimo) et les voisins pour les discussions riches, variées et souvent farfelues (Leticia, Jawad, Cyril, Océane, Jordan, Meven...)

Mes vifs remerciements s'adressent également au Labex Arcane pour avoir financé ces travaux de thèse, ainsi que pour les séminaires, retraites et conférences auxquels il m'a donné l'occasion de participer.

Et pour finir, je remercie tous mes proches qui m'ont soutenue et encouragée de près ou de loin au cours des 3 dernières années. Du fond de mon cœur, un grand merci à mes parents pour leur aide tout au long de ma vie mais surtout ces dernières semaines : merci Papa pour les nombreuses relectures du manuscrit à la recherche minutieuse de fautes d'orthographe, et merci Maman pour les encouragements et les conseils. Merci aussi à mon frère pour les dépannages informatiques à 1h du matin.

À tous ceux que j'ai oublié de mentionner et à vous, lecteur, un chaleureux merci également.

Table des matières

<u>Introduction</u>	11
I. Les aptamères, outils de reconnaissance moléculaire	14
A. <i>Rappels sur les acides nucléiques</i>	14
1. Bref historique de la détermination structurale de l'ADN	14
2. Caractéristiques des acides nucléiques	15
B. <i>Les aptamères, une nouvelle classe de récepteurs pour des applications diagnostiques et thérapeutiques</i>	18
1. Définition et sélection.....	18
2. Modes de liaison des aptamères	20
C. <i>Les aptamères pour la détection de petites molécules</i>	23
D. <i>Les « split » aptamères</i>	25
E. <i>Les méthodes de détection fluorogéniques</i>	28
II. Les indolizines, hétérocycles fluorescents à intérêts multiples	29
A. <i>Définition et propriétés biologiques, électrochimiques et optiques</i>	29
B. <i>L'indolizine, un fluorophore pour la détection de diverses cibles</i>	32
III. Présentation et objectifs du projet	36
Références bibliographiques	38

Chapitre I : Synthèse de nouveaux fluorophores indolizines 1,3,7-trisubstitués..... 45

I. Stratégies de synthèse des indolizines basées sur le motif pyridine	46
A. <i>Voies de synthèse basées sur les pyridines non substituées en position α</i>	47
B. <i>Voies de synthèse basées sur les pyridines α-substituées</i>	52
1. La 2-picoline, un réactif historique	52
2. Les réactions de cycloisomérisation intramoléculaires.....	54
3. Les réactions tandem couplage croisé/cycloisomérisation.....	58
4. Réaction de cyclisation à partir de 2-pyridylacétate	61
5. Réactions diverses à partir de 2-carbonylpyridines.....	68

C. Voie de synthèse basée sur les N-méthylures de pyridinium	72
II. Synthèse et caractérisation d'une nouvelle série d'indolizines trisubstituées ..	87
A. Synthèse d'indolizines trisubstituées par cycloaddition 1,3-dipolaire.....	89
1. Synthèse des sels de pyridinium (série PG = Boc)	89
2. Cycloaddition des 1,3-dipolaire des sels de pyridinium (série PG = Boc).....	94
3. Synthèse de la seconde série de sels de pyridinium (PG = Ei)	97
B. Etudes photophysiques des fluorophores et sélections des meilleurs candidats....	101
C. Bilan du chapitre.....	107
Références bibliographiques	108

Chapitre II : Applications des indolizines 1,3,7-trisubstituées couplées à l'ADN : vers le modèle AptaSplit-Indo

I. Les indolizines trisubstituées comme nouveaux marqueurs biomoléculaires	116
A. Synthèse des conjugués indolizines-ODN	118
1. Généralités sur la synthèse d'oligonucléotide	118
2. La chimie « click » pour les ligations bioorthogonales.....	124
3. Synthèse des conjugués indolizine-ADN	135
B. Caractérisation des conjugués indolizine-ODN.....	138
1. Etude de la dénaturation des duplex conjugués par Dichroïsme Circulaire.....	138
II. Vers un modèle aptamère simplifié	146
A. Le modèle double-brin complémentaire basé sur l'ADN matriciel	146
B. Synthèse des conjugués ADN-précurseurs	149
1. Synthèse des conjugués ADN-pyridinium par ligation oxime	149
2. Synthèse des conjugués ADN-alcynes	150
C. Cycloaddition 1,3-dipolaire des conjugués ADN-précurseurs	159
III. Perspectives et valorisation de la cycloaddition comme réaction click fluorogénique	169
A. Modèle AptaSplit-Indo à aptamères ANP	170
1. L'acide nucléique peptidique.....	170
2. Les aptamères à ANP.....	171

<i>B. Valorisation de la cycloaddition 1,3-dipolaire comme réaction click fluorogénique pour la synthèse peptidique</i>	173
1. Les réactions click fluorogéniques	173
2. Vers une application pour la synthèse de plateformes peptidiques	174
<i>C. Bilan général du chapitre</i>	178
Références bibliographiques	179
<u>Chapitre III : Exploration de modèles aptamères alternatifs : l'indolizine comme précurseur fluorescent</u>	186
I. Le modèle des cycl[3.2.2]azines	187
<i>A. Synthèse des précurseurs libres de la cycloaddition [8+2]</i>	190
<i>B. La cycloaddition [8+2] d'indolizines et d'acétylènes mise à l'épreuve</i>	192
II. Le modèle des indolizines squaraines	194
III. Le modèle basé sur la dimérisation oxydative d'indolizines	198
<i>A. Les 3,3-biindolizines comme source d'inspiration</i>	198
<i>B. Synthèses et dimérisations de précurseurs indoliziniques</i>	200
<i>C. Préparation des nouveaux conjugués ADN-indolizines</i>	203
<i>D. Conclusion et perspectives : Dimérisation oxydative médiée par le fer(III)</i>	207
<u>Références bibliographiques</u>	209
Conclusion Générale	211
Partie expérimentale	214
Annexe	256

Abréviations

Ac ₂ O	Acetic anhydride
acac	Acétylacétone
AcOH	Acide acétique
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ANP	Acide Nucléique Peptidique
ARN	Acide RiboNucléique
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
calcd	Calculated
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CDYPA	Cycloaddition 1,3-dipolaire d'ylure de pyridinium et d'alcyne
CE	Capillary Electrophoresis
CuAAC	Copper(I)-catalysed Alkyne-Azide Cycloaddition
DBCO	Dibenzocyclooctyne
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DMAD	Dimethyl acetylenedicarboxylate
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DMTMM	4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium chloride
EDG	Electron Donating Group
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Ei	1-éthoxyéthylidène
eq/equiv	Equivalent
ESI	Electrospray Ionization
Et ₂ O	Diethyl ether
EtOH	Éthanol
EWG	Electron Withdrawing Group
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl
FRET	Förster resonance energy transfer
HATU	Hexafluorophosphate Azabenzotriazole Tetramethyl Uronium
HBTU	Hexafluorophosphate Benzotriazole Tetramethyl Uronium
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
ICT	Internal Charge Transfer
LRMS	Low Resolution Mass Spectrometry
LUMO	Lowest Occupied Molecular Orbital
MB	Molecular Beacon
MeCN	Acétonitrile
MeOH	Méthanol
MHBA	Morita–Baylis–Hillman Acetates
obsd	Observed
ODN	OligoDésoxyNucléotide
ON	Overnight
pH	Potentiel Hydrogène
ppm	Partie par million
RMC	Réaction MultiComposants
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Radical Oxygen Species
SEC	Size Exclusion Chromatography
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment
SET	Single Electron Transfer
SPAAC	Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition
TBAF	Tetra- <i>n</i> -butylammonium fluoride
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl chloride
TBHP	<i>tert</i> -Butyl hydroperoxide
TFA	Trifluoroacetic acid
THF	Tétrahydrofurane
THPTA	Tris(benzyltriazolylmethyl)amine
TMS	triméthylsilyl
TMSOTf	Triméthylsilyl trifluoromethanesulfonate
TPCD	Tetrakis(Pyridine)Cobalt(II) Dichromate
t _r	Temps de rétention
Tr	Trityle
UV	UltraViolet

Introduction

Introduction générale

La détection de petites molécules, généralement définies comme des entités pesant moins de 1000 Da, suscite un intérêt continu en raison de leur omniprésence dans les processus biologiques et environnementaux. Par exemple, dans les organismes vivants, les petites molécules sont les éléments biochimiques de base des cellules (les acides aminés, les nucléotides et les sucres) qui constituent les briques à partir desquelles sont construits les biopolymères essentiels. De plus, la monnaie énergétique universelle de la vie partagée entre les métabolismes eucaryotes et procaryotes, l'adénosine triphosphate (ATP), se caractérise par une faible masse de 507 Da. Enfin, les petites molécules jouent un rôle crucial dans la régulation des fonctions physiologiques et métaboliques : elles modulent l'activité des enzymes, permettent la signalisation au sein et entre les espèces, et activent des voies importantes dans la cascade immunitaire.^{1,2}

Les petites molécules ont également une importance cruciale en dehors de leurs activités endogènes. Afin de contrôler et garantir la santé humaine, les domaines pharmaceutique et médical nécessitent des méthodes sensibles pour la reconnaissance de marqueurs moléculaires permettant la mise en évidence de diverses maladies,³ qu'elles soient physiologiques ou infectieuses — ces dernières étant dynamiques et en constante évolution. En effet, l'émergence et la réémergence perpétuelle d'agents pathogènes transmissibles soulignent le besoin impératif de développer de nouvelles approches adaptatives pour leur dépistage. Les réglementations en matière de sécurité alimentaire impliquent quant à elles la quantification des niveaux de toxines et de métaux lourds dans les cultures agricoles, ainsi que les concentrations en pesticides et radionucléides. Dans le même esprit, les analyses médico-légales requièrent également des moyens fiables et rentables pour l'identification de substances psychoactives.

En 1987, Turner, Karube et Wilson ont défini les biocapteurs comme des dispositifs d'analyse compacts qui intègrent un élément de détection biologique, responsable de la sélectivité envers la cible, associé à un transducteur physico-chimique (optique, électronique, potentiométrique, acoustique, mécanique, etc.) capable de produire un signal discret ou continu proportionnel à un analyte donné.⁴ Historiquement, le spectromètre de masse est le biocapteur traditionnel. Cependant, il n'est ni rapide, ni portable, ne permet pas une analyse en temps réel et nécessite la mobilisation d'un personnel hautement qualifié. Cette technique n'est pas non plus idéale en termes de coût. Malgré les avancées technologiques qui ont

conduit à des performances spectrométriques supérieures parmi lesquelles on peut citer les appareils à tailles réduites,^{5,6} des alternatives plus faciles d'usage ont vu le jour.

La miniaturisation et l'automatisation des systèmes de détection fonctionnant sur puce ont constitué une avancée majeure dans le domaine de la chimie analytique. Associés à la microfluidique, les biocapteurs permettent l'obtention de produits commercialement viables qui ne nécessitent que des gouttelettes d'échantillons, généralement de l'ordre du nanolitre.⁷ Ils se sont ainsi révélés être des outils de diagnostic efficaces et profitables.⁸⁻¹⁰ Des approches innovantes telles que les distributeurs de liquide sans pompes/valves¹¹, les dispositifs microfluidiques à base de papier¹² et les réseaux sans fil¹³ ont été exploitées pour développer des biopuces entièrement portables qui permettent des analyses instantanées sur le terrain.

Les anticorps, complexes protéiques ciblant des antigènes spécifiques, sont fréquemment utilisés comme sondes de reconnaissance. Cependant, leur fabrication nécessite souvent des expérimentations sur des animaux. En plus de soulever des considérations éthiques, leur production est un processus long, laborieux, onéreux et source de contaminations. De surcroît, il est parfois difficile d'obtenir des anticorps pour les petites molécules en raison de leur faible immunogénicité,¹⁴ ce qui limite évidemment leur champ d'application.

Les biocapteurs à aptamères, souvent appelés *aptasenseurs*, sont bâtis autour de récepteurs à base d'acide nucléique. Depuis leur découverte dans les années 90, les aptamères ont suscité une grande attention en tant qu'outils de reconnaissance. Cette affirmation est étayée par des chiffres : une croissance exponentielle des travaux portant sur le sujet a eu lieu au cours des trois dernières décennies, avec environ 19 000 publications répertoriées sur Pubmed.¹⁵ Cette fascination peut s'expliquer par les propriétés uniques des aptamères et les avantages qu'ils confèrent par rapport aux autres biomolécules. La section introductive suivante est dédiée à la présentation de ces caractéristiques.

I. Les aptamères, outils de reconnaissance moléculaire

A. Rappels sur les acides nucléiques

Avant d'introduire le concept d'aptamère plus en détail, il convient de faire un point sur les macromolécules supports de l'empreinte génétique : l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) et l'ARN (Acide RiboNucléique). Le premier code l'information héréditaire (l'ensemble du matériel génétique est alors désigné par le terme de *génome*), tandis que le second agit comme un messenger dirigeant la synthèse protéique : l'information circule de l'ADN vers l'ARN puis vers les protéines. Toutefois, tous les ARN fonctionnels ne sont pas traduits en protéines. En effet, les ARN non codants (ARNt, ARNr, pARNi) assurent des processus cellulaires importants comme la régulation de l'expression génétique, alors que certains organismes (les virus) possèdent des génomes à ARN.

Nous le verrons plus tard, les acides nucléiques peuvent avoir de multiples usages outre leurs rôles naturels.

1. Bref historique de la détermination structurelle de l'ADN

Beaucoup attribuent à tort la découverte des acides nucléiques au biologiste américain J. Watson et au physicien anglais F. Crick dans les années 1950, mais l'identification historique de l'ADN précède leurs travaux de plus d'un siècle. La première observation a été rapportée par le chimiste allemand J. Liebig en 1847 : il note la présence d'une matière acide dans un filtrat extrait de muscle bovin qu'il surnomme alors « acide inosinique » (du grec *inos*, fibre musculaire).¹⁶ Vingt ans plus tard, le chimiste suisse F. Miescher isole la « nucléine » à partir d'un échantillon de leucocytes.¹⁷ La substance, précipitée en milieu acide et extraite des noyaux de globules blancs (d'où son nom) présente des propriétés chimiques distinctives : elle se distingue des protéines par sa teneur en phosphore particulièrement élevée et une résistance aux protéases. En 1974, il détermine également que la nucléine est naturellement présente sous une forme associée à des protéines, et qualifie cette masse de « protamine ». Nous la connaissons aujourd'hui sous le nom de chromatine.¹⁸

Même si ses publications sur le sujet n'ont pas joui d'une grande popularité, d'autres chercheurs ont continué à étudier le noyau et ses composants. En 1889, l'histologiste prussien R. Altmann sépare les nucléines des protéines à l'aide de pepsine, et désigne le matériel restant sous le nom de « *nucleinsäure* » (ou acide nucléique). Après son hydrolyse dans les années qui suivent, le physiologiste A. Kossel identifie les composants de l'ADN avec plus de

précision : il isole une sous-unité phosphorique, des bases azotées puriques (la guanine G et l'adénine A) et pyrimidiques (la cytosine C, la thymine T et l'uracile U), ainsi qu'un glucide suspecté de correspondre au pentose.¹⁹ Eventuellement, deux types d'acides nucléiques ont été distingués — l'ADN et l'ARN — dont la différence réside dans la composition de leurs bases pyrimidiques (C et T pour l'ADN, C et U pour l'ARN) et du sucre (désoxyribose et ribose respectivement).

Ces résultats ont été confirmés par les travaux du médecin russe P. Levene au début du 20^{ème} siècle, qui a alors proposé la structure des nucléosides : une base nucléaire liée à un dérivé de pentose par une liaison glycosidique ; puis la structure des nucléotides (modèle « polynucléotidique »).^{20,21} En 1950, le biochimiste autrichien E. Chargaff a approfondi les travaux de Levene en révélant que les quantités de purines et de pyrimidines étaient identiques au sein du génome (règles de Chargaff).²²

Toutes ces découvertes préliminaires, combinées aux travaux cruciaux de cristallographie aux rayons X réalisés par les chercheurs anglais R. Franklin et M. Wilkins,²³ ont ouvert la voie à Watson et Crick lorsqu'ils ont élucidé, pour la première fois, la structure en double hélice de l'ADN en 1953 (Figure 1).²⁴ Cela leur a valu le prix Nobel de médecine en 1962.

2. Caractéristiques des acides nucléiques

Ainsi, les acides nucléiques sont des polymères dont l'unité de base est le nucléotide, lui-même constitué d'un pentose lié en position 1' à une base azotée (ou base nucléique) et attaché à un groupement phosphate en 3' et/ou 5'. On parle alors de liaison N-osidique et phosphodiester, respectivement. *In vivo*, l'ADN est bicaténaire (Figure 1). Sa forme physiologique la plus courante est l'ADN-B, un duplex hélicoïdal droitier constitué de deux brins antiparallèles enroulés l'un autour de l'autre avec un pas d'environ 0,34 nm par paire de bases pour un diamètre de 2,0 nm. Il possède deux sillons inégaux (grand et petit sillons), causés par les dimensions différentes des motifs purines et pyrimidines qui provoquent un agencement décalé de l'axe. La double hélice est maintenue grâce aux appariements canoniques de type « Watson-Crick ». Ils font référence à la capacité des bases dites complémentaires à former des liaisons hydrogènes. Les appariements G≡C, plus stables, sont assurés par trois liaisons tandis que les appariements A=T (ou A=U) n'en impliquent que deux. De plus, les nucléobases hétérocycliques favorisent la formation d'interactions d'empilement π qui renforcent l'hybridation des brins complémentaires. En revanche, la plupart des ARN naturels sont présents sous forme monocaténaire : les duplex non éphémères sont considérés comme des infections virales et sont rapidement détruits par les ARNases des cellules procaryotes.²⁵

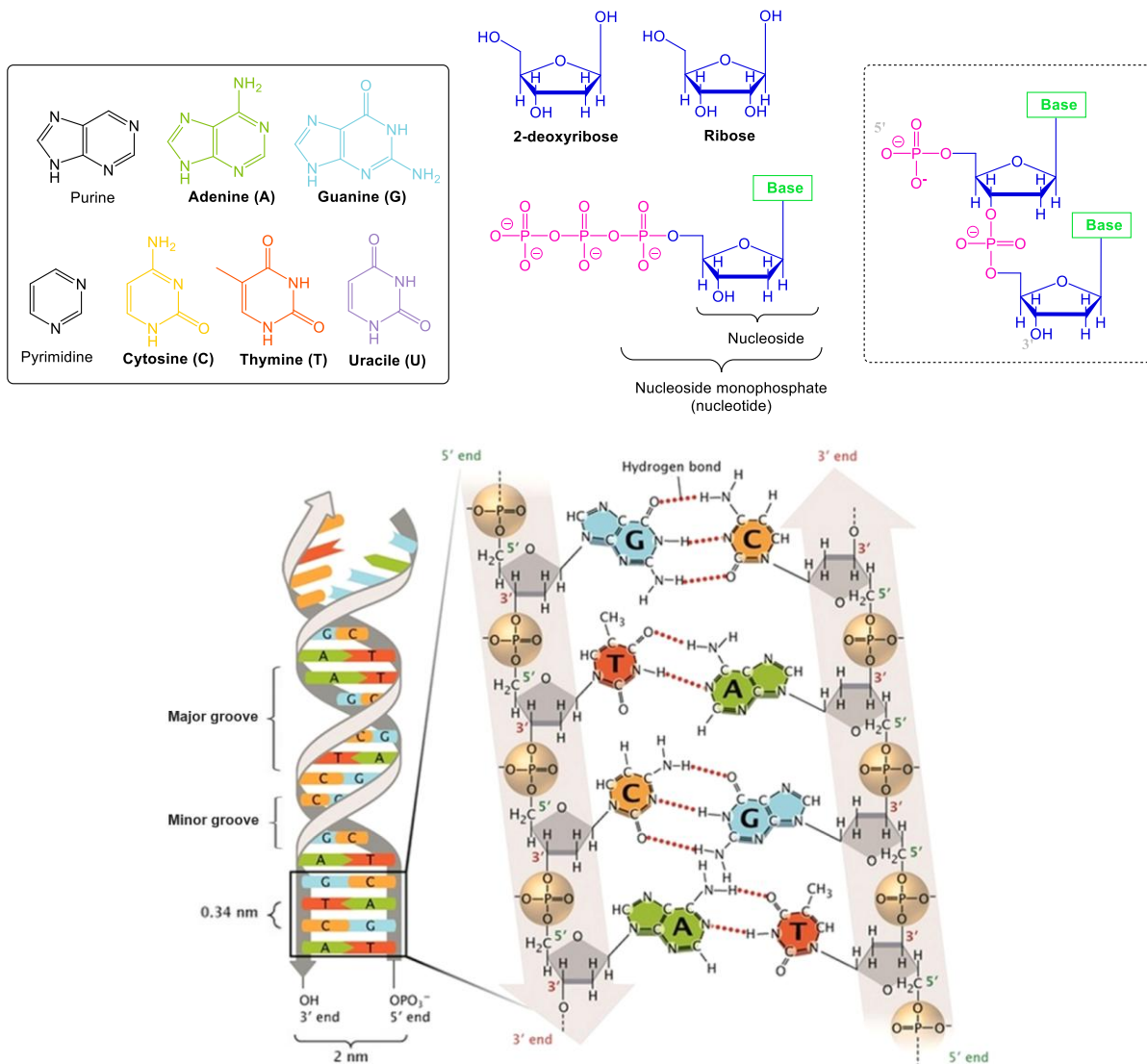


Figure 1 : Structures des bases nucléaires, des nucléosides et nucléotides, d'une chaîne d'ADN et d'un duplex ADN-B (adapté de Nature Education)

Les acides nucléiques présentent quatre niveaux d'organisation structurale. La structure primaire fait référence à la séquence linéaire d'oligo(désoxy)ribonucléotides (notés ODN ou ORN). Sa longueur est généralement mesurée selon le nombre de bases (b), ou de paires de bases (pb) au sein d'un duplex. Les tailles varient d'une vingtaine de nucléotides (petits ARN interférents) à des centaines de millions de paires de bases (247 millions pour le chromosome humain 1).²⁶ La structure secondaire de l'ADN a été décrite ci-dessus : il s'agit de la double hélice classique maintenue par l'appariement de bases complémentaires. Bien qu'il soit simple brin, l'ARN contient également de courtes séquences auto-complémentaires qui peuvent se replier de manière intracaténaire pour former des motifs complexes tels que les tige-boucles, les bulges, les jonctions à trois voies et les pseudo-nœuds (Figure 2).

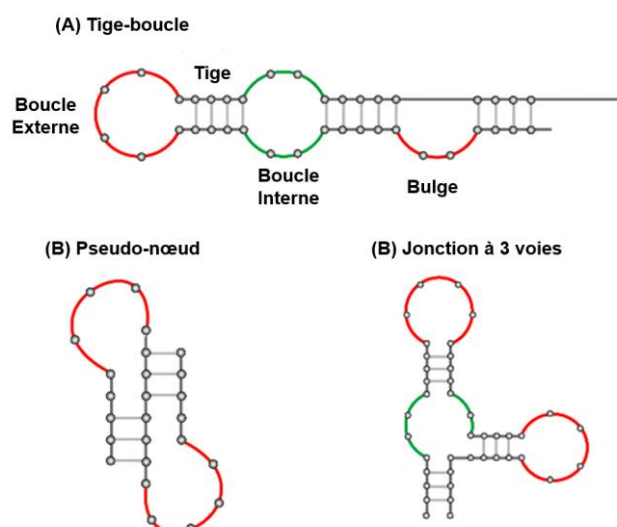


Figure 2 : Motifs structurels secondaires de l'ARN, adaptée de Kizer et al. (2020)²⁷

Les organisations tertiaires et quaternaires sont des structures d'ordre supérieur impliquant un repliement à grande échelle du polymère (ADN super hélicoïdale, chromatine, ribosomes, etc.) Notons qu'il existe des modèles de liaisons hydrogène non-canoniques. À titre d'exemple, les appariements de type Hoogsteen²⁸ conduisent à des géométries différentes par rapport aux règles de Watson-Crick pour les paires de bases A=T et C=G, ainsi qu'à des associations G=G, A=A et C=C inhabituelles. Ces associations génèrent des structures d'ADN et d'ARN secondaires et tertiaires complexes : parmi les plus notables, on peut citer les triplex, les quadruplex et les cruciformes (Figure 3).²⁹

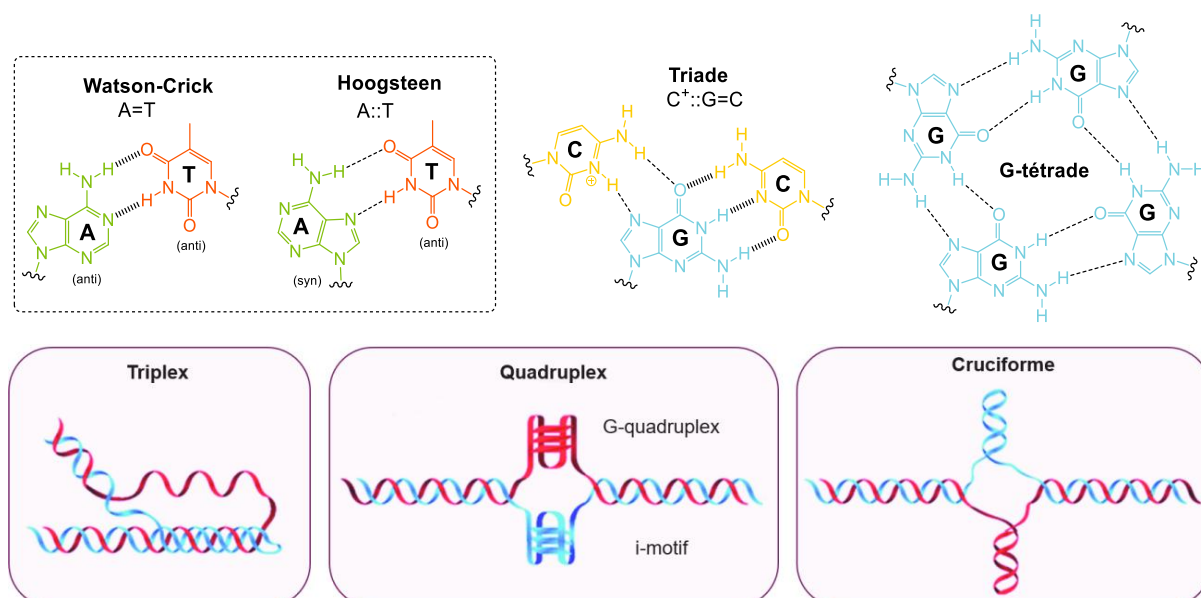


Figure 3 : Appariements de bases et structures de l'ADN non-canoniques, adaptée de Sugimoto et al. (2020)³⁰

Le point essentiel à retenir de ce préambule est que les acides nucléiques peuvent adopter un agencement complexe – une caractéristique qui leur accorde des propriétés structurales et fonctionnelles intéressantes. La capacité des aptamères à se lier à leur cible spécifique est basée sur ce repliement tridimensionnel dans l'espace.

B. Les aptamères, une nouvelle classe de récepteurs pour des applications diagnostiques et thérapeutiques

1. Définition et sélection

La genèse des aptamères remonte à trente ans. Des études portant sur la pathogénèse du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) ont révélé que son génome code des petits ARN structurés qui se lient aux protéines virales, augmentant ainsi le taux de réplication et de transcription.³¹ Cette découverte a encouragé les biochimistes à considérer les acides nucléiques comme des potentiels ligands. Un article publié en 1990 par Tuerk et Gold rapporte que des ligands à base d'ARN ciblant l'ADN polymérase du bactériophage T4 ont été isolés à partir d'un pool d'acides nucléiques.³² Simultanément et indépendamment, Ellington et Szostak utilisent la même stratégie — à savoir, le criblage d'une bibliothèque de séquences aléatoires — pour identifier des ligands d'ARN qui se lient spécifiquement aux colorants organiques.³³ Le mérite du terme aptamère est attribué à ce deuxième groupe : le néologisme vient du latin « aptus » (s'adapter) et du suffixe grec « mer » désignant un polymère. Ellington *et al.* déterminent également que la spécificité et l'affinité observées sont dues à un repliement conformationnel particulier de l'ARN. Depuis lors, les aptamères ont été étendus à l'ADN et à diverses cibles de tailles variables, allant des ions métalliques³⁴ aux cellules entières.³⁵

Les aptamères peuvent donc être définis comme des oligonucléotides monocaténares, synthétiques et courts (20 à 60 bases) capables d'adopter des structures tridimensionnelles uniques leur permettant de se lier à un analyte donné avec une spécificité et une sélectivité élevées, imitant ainsi l'interaction antigène-anticorps. Ils sont sélectionnés *in vitro* à partir de bibliothèques d'acides nucléiques aléatoires par un processus itératif appelé Evolution Systématique des Ligands par enrichissement EXponentiel (ou SELEX en anglais), dont les trois étapes sont représentées dans la Figure 4.³⁶ La bibliothèque est constituée de 10^{13} à 10^{15} séquences contenant une région randomisée flanquée aux deux extrémités par des amorces permettant leur amplification par PCR (SELEX-ADN) ou PCR à transcription inverse (SELEX-ARN). Au début du processus, la population est incubée avec la cible d'intérêt ; puis les séquences liées sont séparées de celles non liées par diverses méthodes telles que la chromatographie d'exclusion stérique ou la rétention sur filtre. Ensuite, les oligonucléotides

présentant une affinité pour la cible sont amplifiés avant d'être impliqués dans des cycles de sélection successifs en conditions de plus en plus strictes. Ce processus est répété jusqu'à ce que la bibliothèque converge vers une collection de séquences à taille limitée, caractérisée par les meilleures affinités. Enfin, les ligands retenus sont clonés et séquencés.

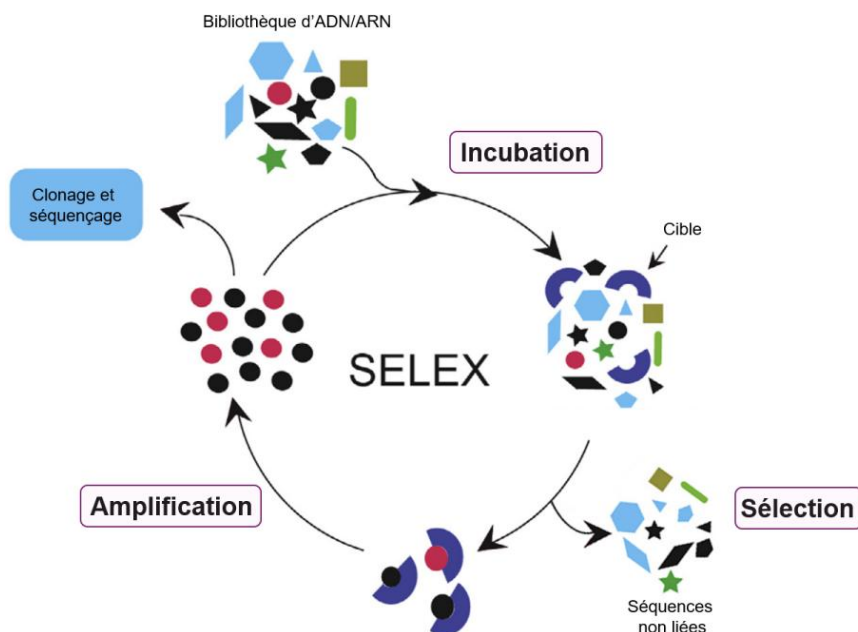


Figure 4 : Principe de la méthode SELEX, figure adaptée de Kwon et al. (2016)

Au cours des trois dernières décennies, diverses variantes de la méthode SELEX ont été développées.³⁷ Pour réduire le temps de traitement de la technique conventionnelle qui nécessite en moyenne 15 cycles et plusieurs semaines, la SELEX par électrophorèse capillaire (CE-SELEX) a été développée.³⁸ Elle fait appel à la mobilité électrophorétique comme moyen efficace et rapide de séparer les séquences lors de l'étape de sélection. Les méthodologies SELEX négatives et contre-SELEX ont également été introduites pour améliorer la spécificité des aptamères en incluant une étape supplémentaire d'incubation avec des contrôles négatifs.^{39,40} On peut aussi citer la In-Vivo-SELEX qui génère des aptamères directement au sein d'un animal, garantissant le fait que leurs fonctionnalités sont conservées dans l'organisme.⁴¹

Les aptamères ont trouvé de nombreuses applications allant des sondes pour l'imagerie *in vivo*⁴² aux outils chromatographiques⁴³ en passant par un potentiel en tant qu'agents pharmaceutiques.⁴⁴ En 2004, un aptamère a été approuvé comme médicament thérapeutique (Pegaptanib, pour le traitement de la DMLA exsudative), tandis que d'autres sont en développement préclinique ou clinique. Cela dit, les aptamères ont surtout été exploités comme biocapteurs. L'intérêt des aptamères comme récepteurs pour la détection d'analytes repose sur de nombreuses propriétés avantageuses. Leur plus large champ d'application est

largement apprécié : en principe, les aptamères peuvent être sélectionnés contre n'importe quelle cible imaginable, y compris les molécules toxiques et non immunogènes qui ne peuvent pas être reconnues par les anticorps. De plus, la génération d'aptamères est nettement plus facile et rapide que la production d'anticorps. Leur synthèse chimique est moins chère et offre une plus grande flexibilité en termes de modification : les oligonucléotides sont plus petits (et donc plus faciles à manipuler) et leur marquage pour la méthode de transduction choisie est plus aisée. Parmi les autres avantages, il convient de mentionner une durée de conservation plus longue et une thermostabilité plus élevée : les aptamères peuvent en effet être régénérés après exposition à la chaleur alors que les anticorps sont dénaturés de manière irréversible.

2. Modes de liaison des aptamères

Comme nous l'avons souligné à maintes reprises, le repliement des aptamères dans l'espace est à l'origine de la spécificité de leur liaison à la cible. Leur conformation tridimensionnelle engendre en effet une plateforme d'interaction assurée par des liaisons hydrogène, des forces électrostatiques, des effets hydrophobes, des empilements π - π et des forces de Van Der Waals.⁴⁵

Comprendre le mode de liaison aptamère-cible est crucial car cela ouvre la porte à des modifications synthétiques. La spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), la cristallographie aux rayons X et les simulations d'amarrage moléculaire sont des outils pour cette entreprise. Après avoir identifié les résidus nécessaires à la reconnaissance, la spécificité du complexe peut être améliorée par mutation, élimination ou ajout de nucléotides. Cela permet également le placement judicieux de marqueurs pour la détection, ou encore des molécules actives à des fins thérapeutiques. Le plus souvent, la séquence aptamérique entière isolée après SELEX n'est pas nécessaire pour une liaison efficace à la cible, et recourir à un variant tronqué peut considérablement réduire le coût de synthèse tout en conservant des caractéristiques comparables voire améliorées. L'aptamère **C13** de la kinase GRK2 est présenté comme exemple dans la Figure 5 : son variant tronqué **C13.51**, obtenu après suppression de la tige inférieure de 51 nucléotides, conserve une forte affinité pour l'enzyme ($K_D = 78,2$ et $101,2$ nM respectivement).

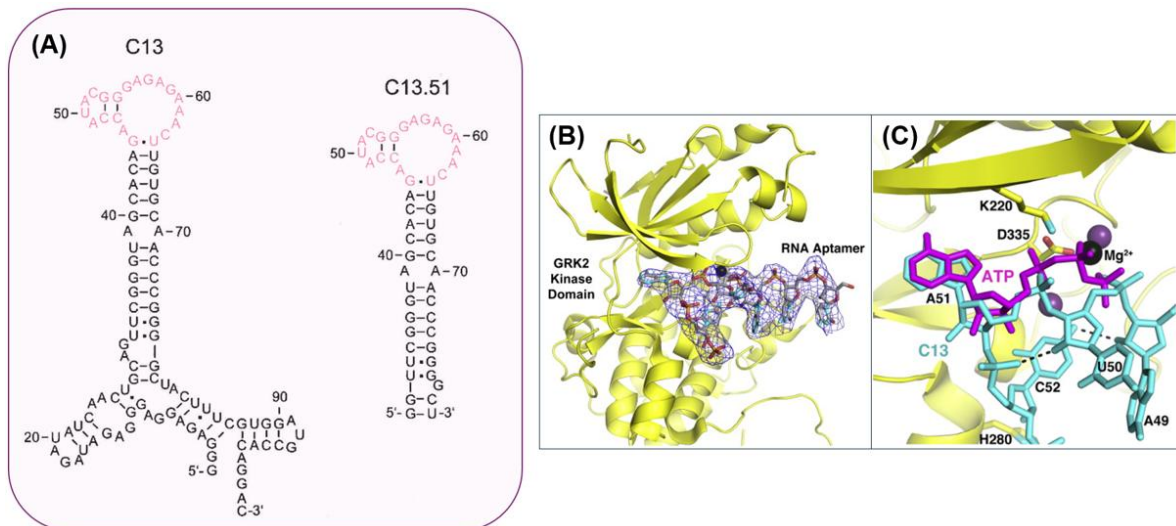


Figure 5 : A) Structure secondaire proposée de l'aptamère ARN **C13** ciblant la kinase GRK2 (gauche) et de la variante tronquée **C13.51** (droite). Les résidus responsables de la liaison à la cible sont colorés en rouge ; B) Structure modélisée du complexe GRK2-C13. Seuls les résidus 47-CCAUAAC-52 sont représentés. La kinase est colorée en jaune ; C) Interaction de l'aptamère **C13** (bleu) dans le site actif de GRK2, imitant le mode de liaison de l'ATP (violet).^{46,47}

On peut distinguer trois modèles de liaison^{48,49}, dérivés des interactions protéine-ligand :

- 1) Le modèle *clé-serrure* (Figure 6-A) : sans doute le plus simpliste, ce modèle suppose un biorécepteur rigide qui ne subit aucun changement structurel lors de la complexation à la cible. Il repose sur une adéquation stérique parfaitement ajustée entre les deux entités. Mais en réalité, les aptamères présentent une certaine plasticité : ils sont souvent peu ou pas structurés en solution et s'associent à leurs ligands en adoptant les architectures moléculaires nécessaires.⁵⁰ Les deux modèles suivants sont donc considérés comme plus exemplaires.
- 2) Le modèle de *sélection conformationnelle* (Figure 6-B) admet un comportement dynamique des aptamères et stipule que de nombreux états conformationnels coexistent en solution. Le ligand sélectionne et stabilise alors un état pour lequel il a une grande affinité, déplaçant l'équilibre vers ce dernier.
- 3) En ce qui concerne le modèle d'*ajustement induit* (Figure 6-C), les interactions ligand-récepteur permettent au système de surmonter la barrière énergétique pour atteindre un état conformationnel auparavant inaccessible par l'aptamère seul.

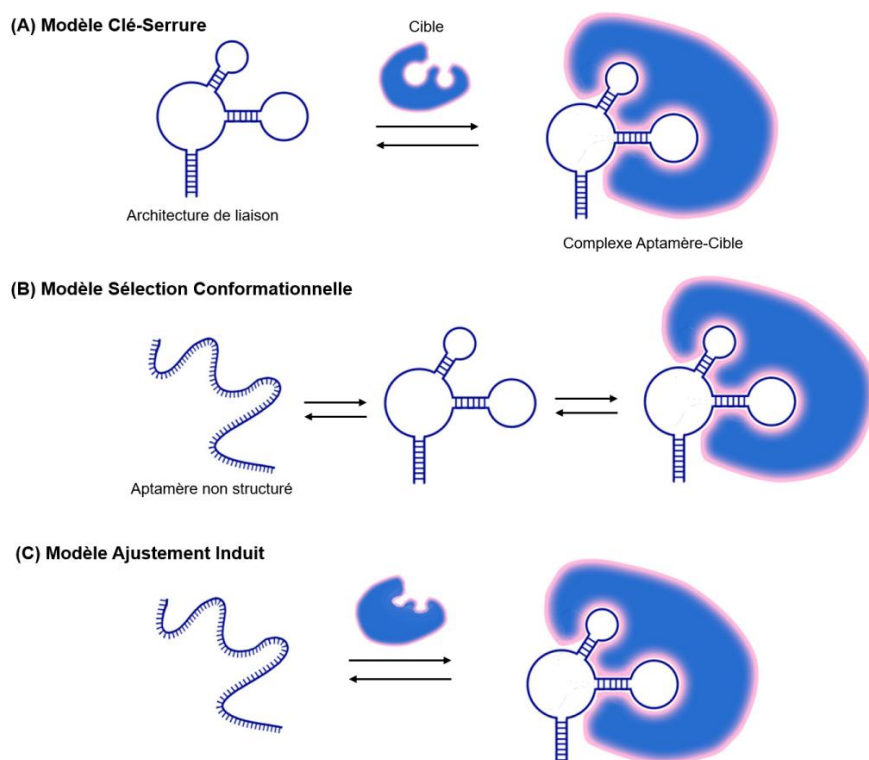


Figure 6 : Les trois modèles de liaison aptamère-ligand, adaptée de Domsicova et al. (2024)⁵¹

Il est important de déterminer si l'interaction aptamère-ligand est accompagnée par un changement structural dans les cadres des aptasenseurs. En effet, de nombreuses méthodes de détection reposent sur une détection par effet de repliement. C'est notamment le cas pour les transducteurs optiques : la méthode la plus pratique est la liaison covalente d'un fluorophore à l'aptamère au niveau d'une région qui subit un changement structural significatif lors de sa complexation avec la cible (Figure 7-A).⁵² La modification de l'environnement électronique du fluorophore induit alors un changement d'émission considérable, qu'il s'agisse d'une augmentation ou d'une diminution de l'intensité de la fluorescence. Une variante de cette stratégie est l'approche par balise moléculaire (ou *Molecular Beacon*, noté MB) pour laquelle les deux extrémités de l'aptamère sont modifiées par un fluorophore et un inhibiteur de fluorescence (quencher) respectivement (Figure 7-B).⁵³ L'émission dépend donc de la distance fluorophore-quencher. Cette méthode exploite le changement de structure pour créer un interrupteur *on/off* optique en présence de la cible. Les MBs ne se limitent d'ailleurs pas aux fluorophores organiques : les points quantiques,⁵⁴ les matériaux à base de carbone⁵⁵ et les nanoparticules métalliques⁵⁶ ont été utilisés comme alternatives. La logique reste la même : sans changement structural spécifique et significatif du ligand à sa cible, aucun signal fiable ne sera enregistré.

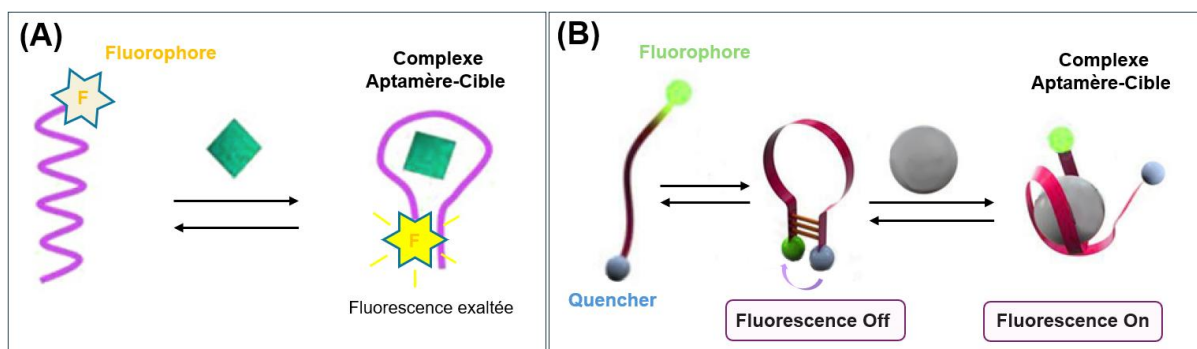


Figure 7 : A) Marquage fluorescent avec détection par effet de repliement ; B) Aptasenseur avec détection de type balise moléculaire adaptée de Moutsopoulos et al. (2019)

Il existe d'autres mécanismes de transduction sans marquage : les changements structuraux ont alors peu d'importance puisque le signal enregistré est dû à une variation de la masse (détection piézoélectrique),⁵⁷ de la diffusion Raman (détection par diffusion Raman exaltée de surface),⁵⁸ de l'indice de réfraction (détection par résonance plasmonique de surface)⁵⁹ ou d'une contrainte mécanique (détection par microcantilevers)⁶⁰ lors de la liaison de l'aptamère à sa cible. Cependant, ces techniques ne sont pas adaptées à la détection de petites molécules : souvent, leur taille limitée ne cause pas une variation significative des propriétés physiques mesurées après formation du complexe aptamère-cible.

C. Les aptamères pour la détection de petites molécules : une route pavée de limites

Les aptamères peuvent être sélectionnés pour des petites cibles non reconnues par les anticorps (neurotransmetteurs, acides aminés, et autres molécules non-immunogéniques). Malgré l'importance de cette classe d'analytes, une étude effectuée en 2015 a révélé que seulement 25% des aptamères recensés entre 1990 et 2013 ciblaient les petites molécules.⁶¹ Ce pourcentage limité s'explique par des affinités et spécificités aptamère-petite molécule souvent insuffisantes pour des applications pratiques ainsi qu'à des difficultés rencontrées lors des étapes de sélection. Par exemple, les chercheurs n'ont pas réussi à isoler des aptamères à ADN pour la L-leucine, importante sur le plan clinique car son accumulation anormale dans l'organisme peut provoquer une leucinose et une dégénérescence neurologique⁶² ; ou pour l'antifongique voriconazole.⁶³ L'un des modèles aptamères les plus décrits, celui de la cocaïne (303 Da), présente une affinité micromolaire pour sa cible, typique des aptamères de petites molécules.⁶⁴ Cependant, cette valeur est assez médiocre si on la compare aux affinités nanomolaires et même picomolaires que peuvent atteindre les aptamères pour les protéines.⁶⁵ La sensibilité et la fiabilité globalement plus faible de ces systèmes est illustrée par la Figure 8-B: les constantes de dissociation aptamère-cible sont en moyenne plus élevées pour les petites molécules.

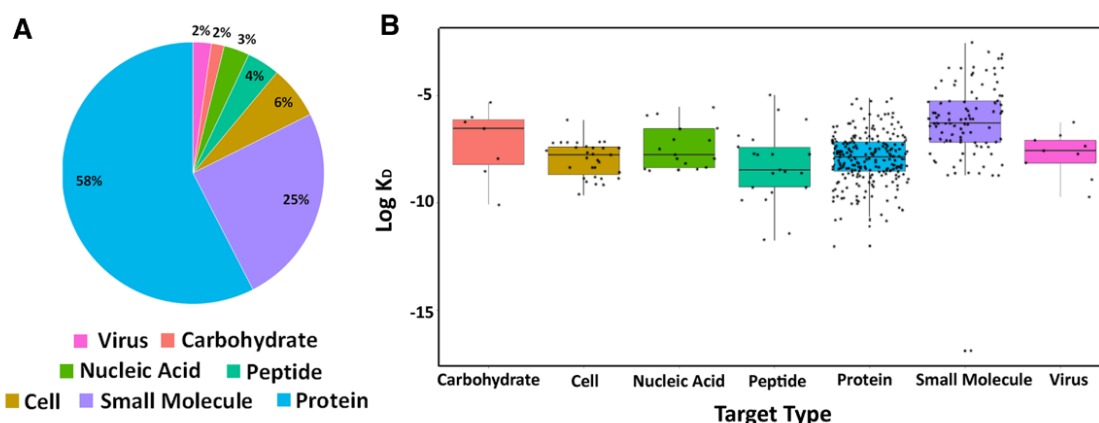


Figure 8 : A) Pourcentage d'aptamères regroupés par type de cible, rapportés dans la littérature de 1990 à 2013 ; B) Diagramme en boîte des affinités aptamère-cible selon le type de cible, en fonction des constantes de dissociation, $\text{Log}_{10}(K_D)$, d'après McKeague et al. (2015)⁶¹

Le criblage d'aptamères capables de se lier aux petites molécules avec une affinité et une spécificité élevées est difficile à cause des propriétés intrinsèques de l'analyte attribuées par leur taille. Cela semble intuitif : une petite surface implique un nombre limité de groupes fonctionnels portés par la cible et donc moins de sites d'interaction potentiels avec le ligand, ce qui impacte négativement la force et la spécificité de la liaison. De plus, des contraintes supplémentaires sont rencontrées lors du processus SELEX : l'étape de séparation nécessite souvent une immobilisation de la cible sur une surface telle que les microbilles (FluMag-SELEX)⁶⁶ pour faciliter l'isolation des ligands et des brins non liants. Contrairement aux cibles de grande taille comme les protéines qui pèsent en moyenne 52 kDa, les techniques de séparation sans marquage telles que la chromatographie d'exclusion de taille (SEC) ou l'électrophorèse capillaire (CE) ne peuvent pas être utilisées. Il va sans dire qu'une immobilisation implique une modification chimique de l'espèce à détecter, ce qui limite encore davantage les groupements fonctionnels disponibles pour les interactions avec l'oligonucléotide. Plus important encore, la sélection est effectuée sur un conjugué. La fixation de bras chimiques (linkers) peut drastiquement altérer les propriétés de la molécule, ce qui signifie que l'aptamère isolé peut présenter une affinité réduite pour l'analyte naturel par rapport à la forme immobilisée. À titre d'exemple, des aptamères sélectionnés pour l'acide glutamique n'ont pas produit de signal en présence de l'analyte natif et se sont avérés uniquement spécifiques pour les conjugués streptavidine-glutamate ayant été utilisés durant le processus SELEX.⁶⁷ De plus, l'adsorption des oligonucléotides sur la surface des billes ou une liaison au linker conduit également à l'enrichissement de ligands non spécifiques.

Pour surmonter ces problèmes, des stratégies ne nécessitant pas l'immobilisation de la cible ont été développées. L'une des deux méthodes représentatives est le processus GO-SELEX (pour Graphene Oxide).⁶⁸ Dans cette variante, la bibliothèque d'acides nucléiques est adsorbée sur des feuillets de graphène via des empilements π - π . La liaison à la cible induit ensuite une désorption des séquences du nanomatériau. La deuxième méthodologie porte quant à elle le nom de Capture-SELEX : elle repose sur la présence de brins complémentaires à la bibliothèque ancrés à une surface.⁶⁹ La formation du complexe ligand-cible rompt l'hybridation des duplex, libérant ainsi les séquences d'intérêt du support.

Bien que ces approches alternatives éliminent les inconvénients des expériences de sélection impliquant une cible conjuguée, elles n'améliorent pas pour autant l'affinité des systèmes. Il convient également de noter que la petite taille de l'analyte risque de ne pas induire de changement structurel ou environnemental significatif permettant la détection du complexe aptamère-cible par les méthodes optiques décrites précédemment.

D. Les « split » aptamères

Des progrès ont été réalisés ces deux dernières décennies pour augmenter la sensibilité et la spécificité des aptasenseurs ciblant les petites molécules. Par analogie avec les tests «sandwich» protéiques (Figure 9-A)⁷⁰ durant lesquels deux anticorps sont utilisés pour reconnaître des régions distinctes d'une même cible, les *split* aptamères (ou aptamères fragmentés) ont émergé comme des modèles de biocapteurs prometteurs. Le concept, introduit par Stojanovic et ses collaborateurs en 2000, consiste à scinder un aptamère parent en deux fragments ou plus.⁷¹ Ces brins courts, indépendants et non structurés en solution, sont capables de s'assembler en présence (et uniquement en présence) de la cible pour former un complexe ternaire *fragment-cible-fragment*. En effet, les interactions entre l'analyte et l'architecture de liaison « native » modifient l'équilibre thermodynamique et favorisent l'association des fragments. Ce mécanisme de double reconnaissance assure la spécificité du système, augmentant la fiabilité du signal tout en réduisant les bruits de fond. De plus, la fragmentation de l'aptamère produit des extrémités oligonucléotidiques supplémentaires et donc de nouveaux sites de conjugaison potentiels.

Cependant, la division réduit considérablement l'affinité pour la cible et la stabilité du complexe. Par ailleurs, seuls quelques aptamères ont été fragmentés avec succès à ce jour, et leur application reste limitée. En l'espace de vingt ans, moins de vingt split aptasenseurs ont été décrits dans la littérature.^{72,73} Cette rareté par rapport au grand nombre de publications portant sur les aptamères peut s'expliquer par les contraintes rencontrées lors de la coupure de l'oligonucléotide parent : l'architecture de liaison peut être fortement perturbée si la division

est effectuée au mauvais endroit, et la plupart des séquences ne possèdent pas de régions dispensables suffisamment éloignées du site de fixation à la cible.

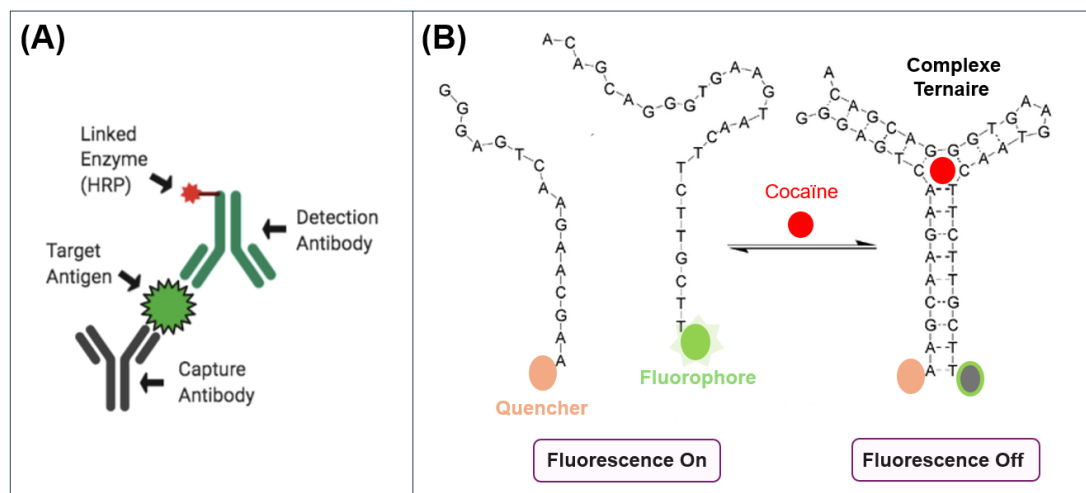


Figure 9 : A) test ELISA en sandwich ; B) Split aptamère de la cocaïne développé par Stojanovic et al. avec D : dabcyl et F : 6-carboxyfluorescéine

Le split aptamère le plus décrit est celui de la cocaïne, dont le premier exemple est illustré ci-dessus (Figure 9-B). Le modèle a été conçu pour induire une extinction de la fluorescence en présence de la cible. Le capteur possède une excellente sélectivité pour la cocaïne par rapport à ses métabolites, l'ecgonine benzoyle et l'ester méthylique d'ecgonine ; toutefois la constante de dissociation a augmenté de manière significative (K_D non-fragmenté = 0,4-10 μ M, contre K_D split = 20 μ M), conduisant ainsi à un système de détection moins sensible.

Pour résoudre ce problème, la stabilité de la structure ternaire a été améliorée par la formation d'une interaction supplémentaire se produisant après l'assemblage supramoléculaire. En effet, des fonctionnalités ont été ajoutées aux extrémités des fragments ODN afin de produire une jonction (covalente ou non) après repliement de la structure de liaison, stabilisant ainsi le système. Cette stratégie englobe l'esprit de la chimie à ADN matriciel⁷⁴ (ou *DNA templated chemistry*), dont le principe repose sur une hybridation d'acides nucléiques afin de diriger les synthèses organiques par rapprochement de groupements réactifs conjugués aux brins.

L'approche non-covalente implique un système hôte-invité (Figure 10) : en 2015, Yang et ses collègues ont modifié les deux fragments de l'aptamère anti-adénosine avec une β -cyclodextrine et un dansyl respectivement, ce dernier étant susceptible d'être inclus dans le macrocycle.⁷⁵ En présence de la cible, l'assemblage ternaire se forme et le complexe d'inclusion résultant fournit des effets stabilisants : la dénaturation du complexe ternaire nécessite en effet une augmentation de la température équivalant près de 7°C. De plus, le microenvironnement du dansyl est modifié conduisant à une augmentation de la fluorescence émise, ce qui agit comme un signal de transduction. Malheureusement, ce modèle ne peut

pas être généralisé : un grand nombre de petites molécules telles que la cocaïne peuvent former des complexes d'inclusion avec la β -cyclodextrine,⁷⁶ remplaçant le fluorophore et conduisant à des signaux et des quantifications erronés.

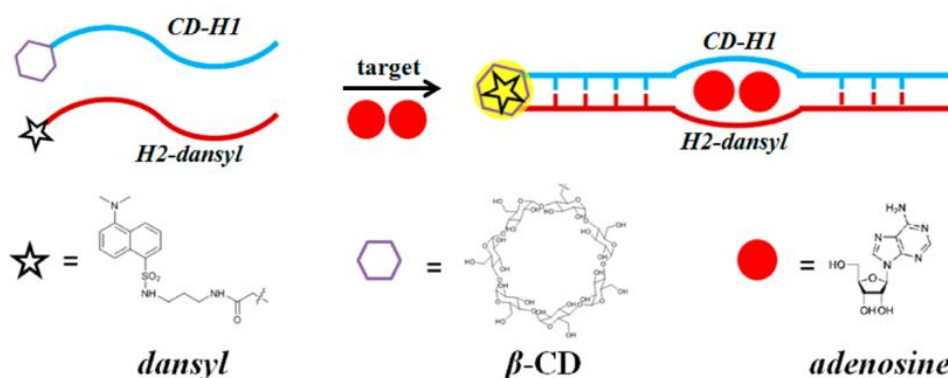


Figure 10 : Split aptamère de l'adénosine basé sur un système hôte-invité, d'après Yang *et al.* (2015)

Une stratégie alternative et plus largement applicable en théorie appelle à la formation d'une liaison covalente lors de la liaison à l'analyte qui empêcherait toute dissociation du complexe cible-aptamère. Cela a été démontré pour l'aptamère split de la cocaïne en utilisant la Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition (SPAAC, cycloaddition d'alcyne et d'azide favorisée par une tension cyclique)⁷⁷, une réaction d'amination réductrice⁷⁸ ainsi que la formation réversible de *N*-méthoxyoxazolidine en fonction du pH⁷⁹ (Figure 11). Il convient de noter que l'approche SPAAC développée par Heemstra *et al.* en 2011 a été la première réaction à ADN matriciel guidée par la liaison d'une petite molécule au ligand nucléique et non par la complémentarité de bases entre deux brins d'ODN.

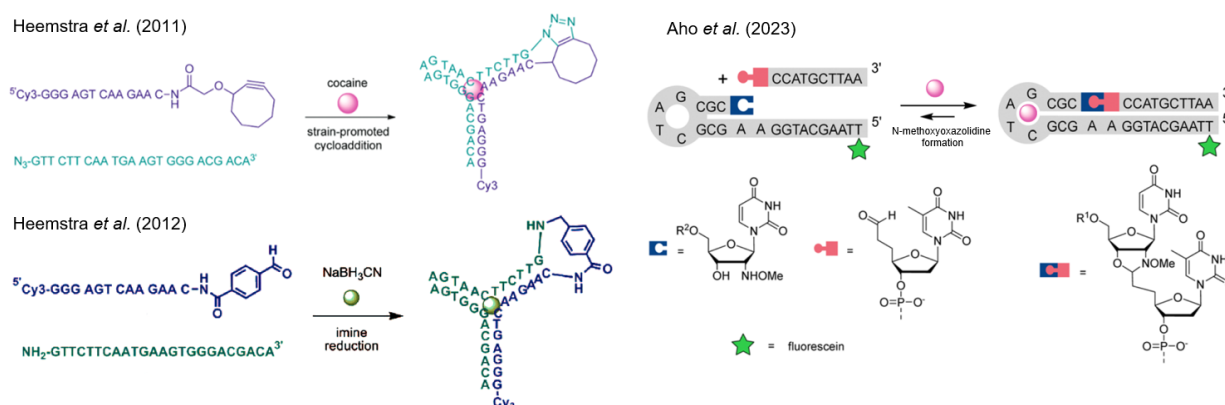


Figure 11 : Split aptamères de la cocaïne basé sur la formation d'une liaison covalente

L'assemblage des brins fragmentés est covalent, ce qui augmente considérablement l'affinité et la sensibilité de la détection ; cependant un inconvénient demeure : la molécule stabilisatrice formée n'est pas fluorescente, ce qui signifie que la double fonction originale de stabilisation-transduction accordée par le modèle hôte-invité est perdue. Concevoir une

nouvelle stratégie qui permet de la rétablir tout en conservant l'aspect covalent fut la principale motivation à l'origine de ce projet de thèse.

E. Les méthodes de détection fluorogéniques

Les avancées récentes dans le domaine des split aptasenseurs ont fait l'objet de plusieurs revues.^{72,80,81} Lorsqu'il s'agit des méthodes de transduction optiques, un signal positif est souvent dû à une augmentation ou une extinction quantifiable d'un fluorophore existant, conjugué au préalable à un des fragments d'ODN. À notre connaissance, aucune réaction véritablement fluorogénique — en d'autres termes, une réaction aboutissant à la formation d'une molécule de signalisation fluorescente à partir de précurseurs non fluorescents — n'a été rapportée pour un aptamère. Ceci est un fait surprenant étant donné que les réactions « templatée » à l'ADN générant de la fluorescence ont suscité énormément d'intérêt au cours des deux dernières décennies. Elles représentent en effet un outil puissant et polyvalent pour l'imagerie *in vivo* et la détection d'oligonucléotide.⁸²

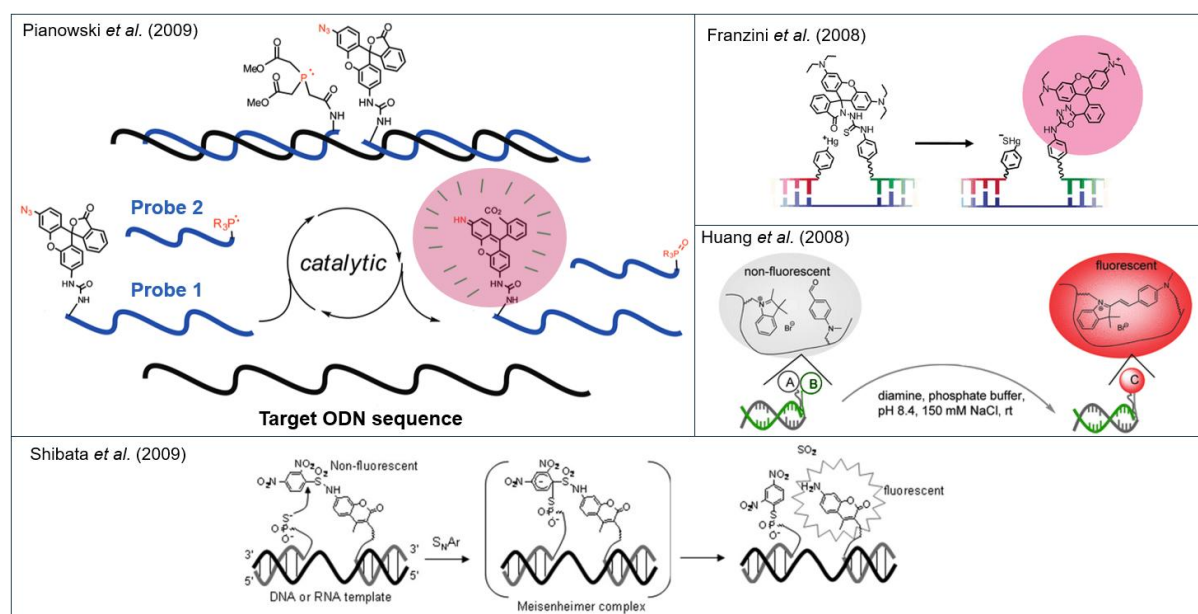


Figure 12 : Quelques exemples de réactions fluorogéniques guidées par l'ADN

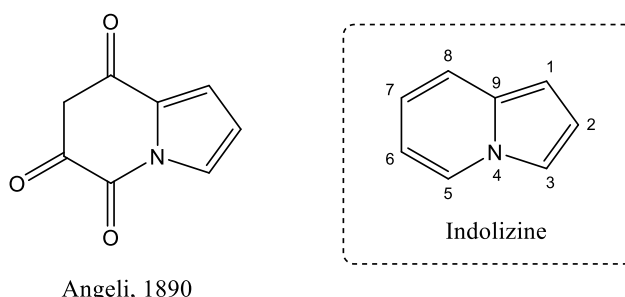
Parmi les méthodologies décrites dans la littérature, on peut citer le démasquage de fluorophores tels que l'azidorhodamine et la fluorescéine par réduction de Staudinger,^{83,84} le dévoilement de la rhodamine assistée par le mercure,⁸⁵ la condensation de type aldolique générant des hémicyanines⁸⁶ et la formation d'une 7-aminocoumarine par réaction de substitution nucléophile aromatique.⁸⁷ Cette courte liste n'est évidemment pas exhaustive et n'a pour but que de servir d'exemples illustratifs (Figure 12).

En 2023, Zhao *et al.* ont publié un répertoire actualisé des réactions fluorogéniques couramment utilisées en biologie chimique.⁸⁸ Bien que beaucoup d'entre elles pourraient être adaptées à la conception d'un aptasenseur split, nous avons pour notre part choisi une voie peu conventionnelle : la formation d'une indolizine fluorescente.

II. Les indolizines, hétérocycles fluorescents à intérêts multiples

A. Définition et propriétés biologiques, électrochimiques et optiques

L'indolizine est un isomère chimique de l'indole : elle est constituée de deux cycles condensés avec un atome d'azote pontant (Figure 13). Ce motif a été signalé pour la première fois en 1890 lorsque le chimiste italien Angeli a décrit la préparation de l'imine-anhydride de l'acide pyrrolypyruvique et suggéré le nom de « pyrindole » pour le noyau hétérocyclique insaturé.⁸⁹ Il a fallu attendre 22 ans pour la première synthèse de cet hétérocycle par Scholtz,⁹⁰ et depuis lors, il a été appelé pyrrodine, pyrrolo[1,2-a]pyridine, 8-pyrrolopyridine et pyrrocoline avant que le nom *indolizine* ne soit officiellement adopté par *Chemical Abstracts*. La numérotation représentée ci-dessous sera utilisée tout au long du manuscrit.



Angeli, 1890

Figure 13 : Synthèse d'Angeli et structure de l'indolizine

Le bicyclic possède une géométrie plane et un système à 10 électrons π délocalisés, le doublet non liant de l'azote participant à l'aromaticité. En réalité, l'indolizine est mieux représentée par un hybride de résonance composé de trois structures mésomères (Schéma 1). L'hétéroatome central confère au fragment pyrrole une richesse électronique tandis que le cycle à six chaînons est plus déficient en électrons. Ainsi, les substitutions électrophiles ont facilement lieu sur les positions C3/C1.⁹¹ Notons que l'hétérocycle est relativement basique ($pK_a = 3,9$)⁹² par rapport au pyrrole ($pK_a = -3,8$)⁹³ et à l'indole ($pK_a = -3,6$)⁹⁴ et plus acide comparé à la pyridine ($pK_a = 5,2$).⁹⁵

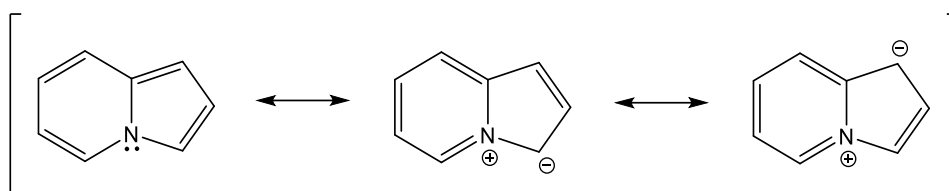


Schéma 1 : Structure de résonance de l'indolizine

Jusqu'à présent, le noyau indolizine n'a pas été trouvé dans la nature, mais son analogue réduit, l'indolizidine, est abondant. Divers alcaloïdes ont été isolés de la flore et de la faune marines et terrestres, y compris les arbres,⁹⁶ les champignons,⁹⁷ les fourmis⁹⁸ et les grenouilles⁹⁹ (Figure 14).

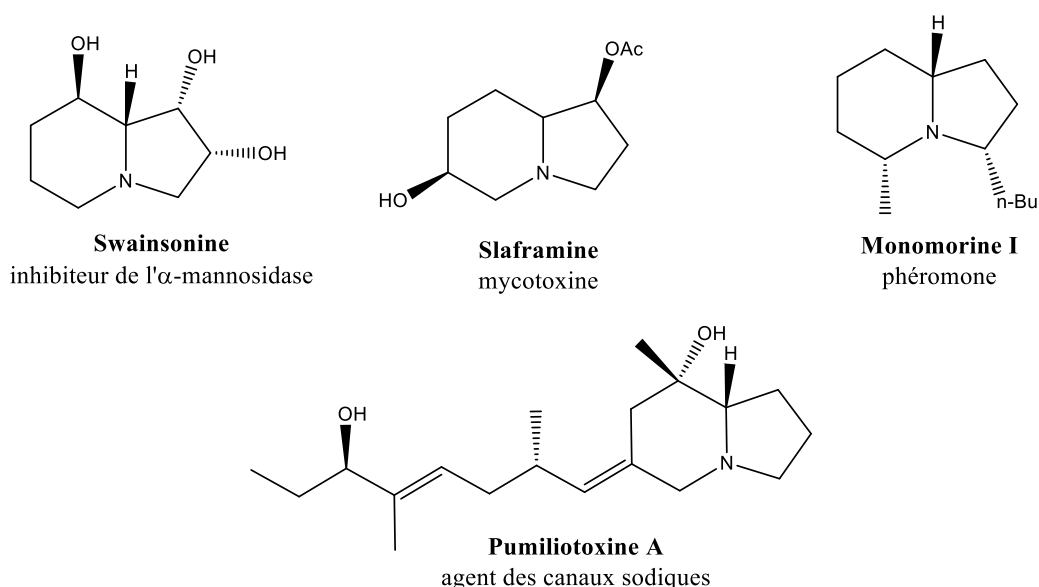


Figure 14 : Structures de quelques alcaloïdes indolizidiniques naturels

Un certain nombre de dérivés d'indole et d'indolizidines présentent des effets pharmacologiques intéressants,^{100,101} ce qui a suscité des spéculations dans les années 60 supposant que les analogues indolizidiniques pourraient posséder des activités biologiques similaires.¹⁰² Cela s'est avéré véridique : les indolizines synthétiques présentent diverses applications thérapeutiques potentielles parmi lesquelles des activités antibactériennes et antifongiques,^{103,104} antivirales,¹⁰⁵ anti-inflammatoires,¹⁰⁶ antioxydantes,¹⁰⁷ anticancéreuses,¹⁰⁸ antihistaminiques et anticholinergiques,¹⁰⁹ antituberculeuses¹¹⁰ et analgésiques¹¹¹ (Figure 15).

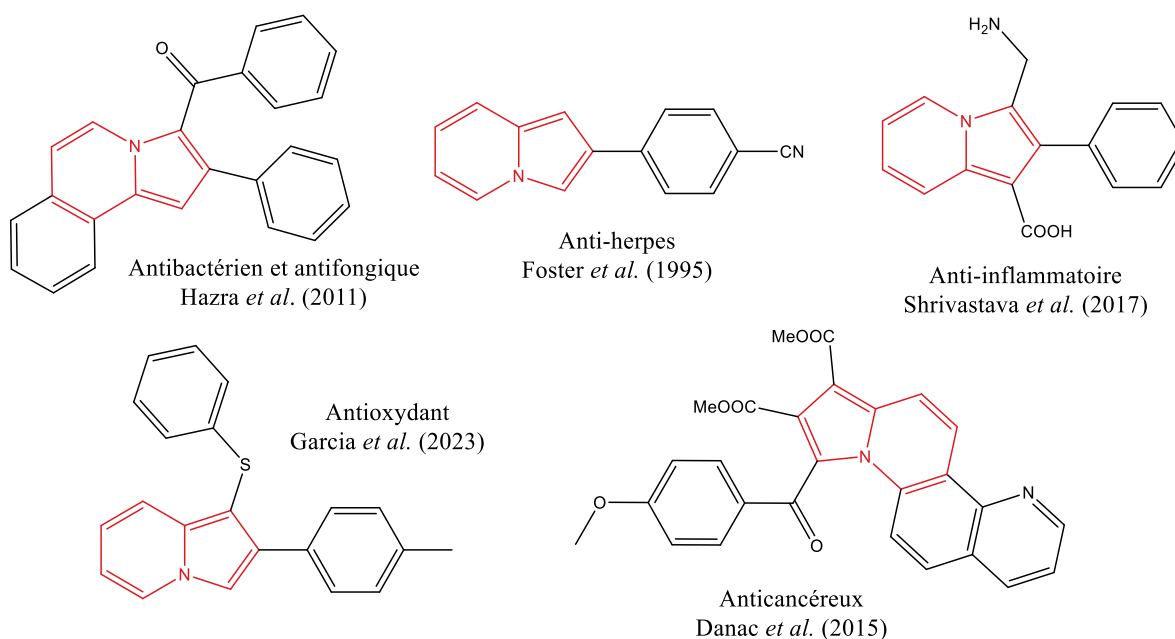


Figure 15 : Exemples d'indolizines possédant des activités biologiques d'intérêt

Outre la chimie médicinale, les indolizines ont également trouvé des utilités dans le domaine de la science des matériaux. Elles ont en effet été exploitées comme sensibilisateurs pour la conversion de l'énergie solaire dans les cellules photovoltaïques,¹¹² comme matériaux transporteurs d'électrons pour les dispositifs électroluminescents organiques (OLED, pour Organic Light-Emitting Devices)¹¹³ et comme fluorophores pour les nanotubes de carbone à paroi simple (Single-Walled Carbon Nanotubes, notés SWNT).¹¹⁴ Ces applications sont dues à leurs propriétés électrochimiques et optiques uniques, ces dernières ayant particulièrement retenu notre intérêt.

Les caractéristiques photophysiques de l'indolizine ont été étudiées pour la première fois en 1972 par Lerner.¹¹⁵ Avec une longueur d'onde d'émission généralement située dans la gamme de [400 à 480 nm], les dérivés indoliziniques sont des fluorophores bleus qui présentent des rendements quantiques à température ambiante et des durées de vie de fluorescence relativement élevées. La fonctionnalisation du noyau peut cependant décaler l'émission dans les régions verte, jaune et même rouge (Figure 16).^{116–120}

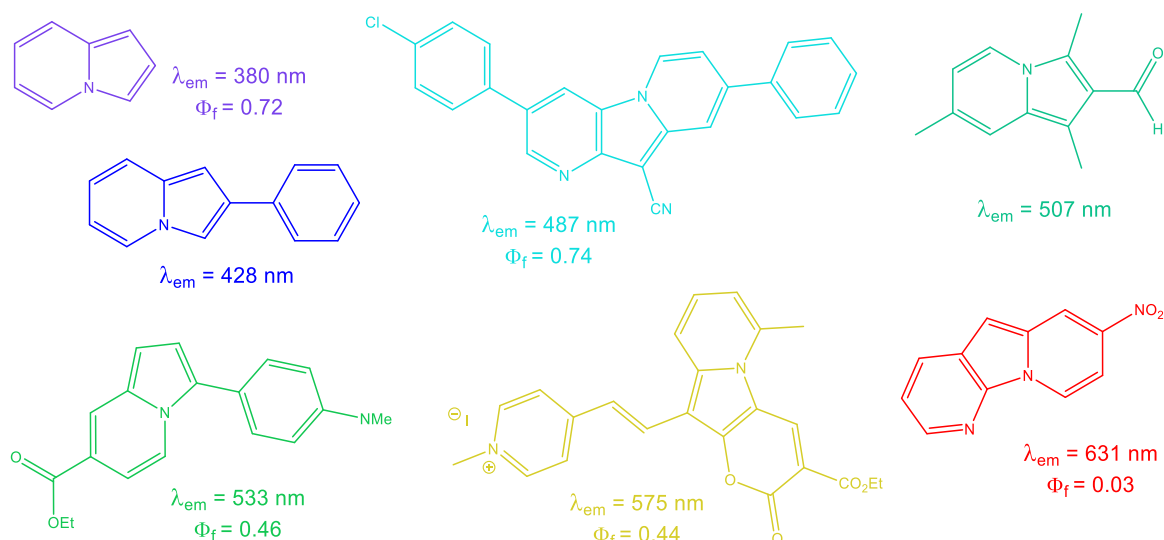


Figure 16 : Structures, longueurs d'onde d'émission (λ_{em}) et rendements quantiques de quelques fluorophores indoliziniques

B. L'indolizine, un fluorophore pour la détection de diverses cibles

L'indolizine a également été exploitée pour l'élaboration de modèles de détection. L'un des premiers exemples décrits est le capteur indolizine-cyclodextrine pour les composés organiques volatils (COVs).¹²¹ Développé par Becuwe *et al.* en 2008, le modèle implique la conjugaison d'une indolizine en dehors de la cavité du macrocycle (Figure 17). L'inclusion de COV tels que le 1-adamantanol ou le toluène conduit à une variation de l'intensité de la fluorescence émise.

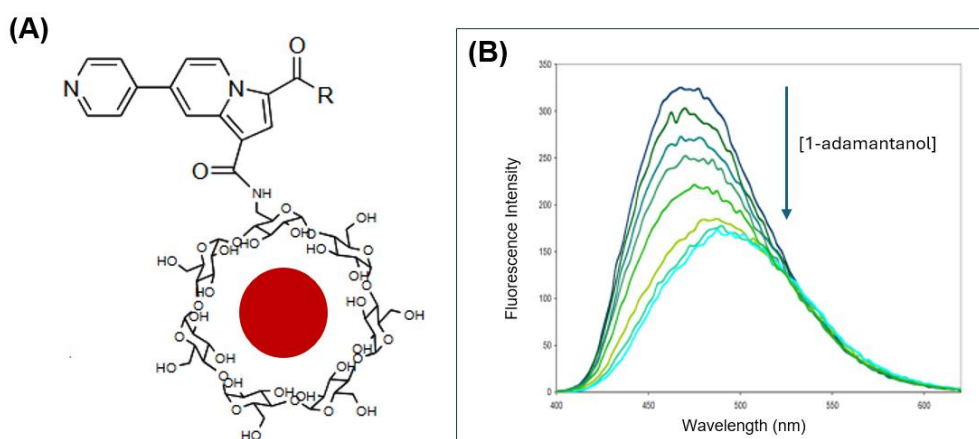


Figure 17 : A) Capteur indolizine-cyclodextrine pour les COVs ; B) Diminution de la fluorescence émise par le système en fonction de la concentration en 1-adamantanol, d'après Becuwe *et al.* (2008)

Un autre modèle est la sonde indolizine-rhodamine ratiométrique conçue par Ji *et al.* en 2017 pour la quantification d'ions mercure,¹²² un polluant métallique dangereux qui peut facilement traverser la peau et venir endommager les reins, le cerveau, le système endocrinien et le système nerveux, même à de faibles concentrations. Il est donc essentiel de contrôler son

niveau, que ce soit dans l'environnement ou au sein de l'organisme. La sonde conçue par le groupe est représentée dans la Figure 18 : une indolizine a été choisie comme molécule donneuse d'énergie tandis qu'un dérivé leuco-rhodamine non fluorescent agit comme unité de reconnaissance. Une réaction d'ouverture de cycle est ensuite induite par les ions Hg^{2+} , révélant ainsi la rhodamine en tant qu'accepteur pour le transfert d'énergie par résonance Förster (FRET). Ce modèle a été appliqué *in vivo* avec succès.

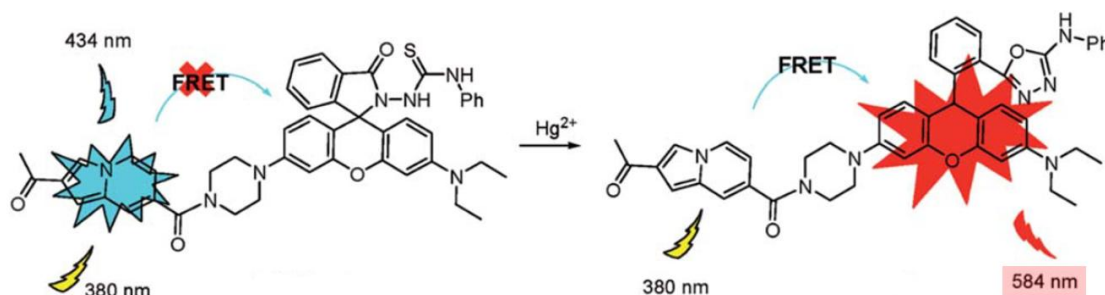


Figure 18 : Sonde ratiométrique fluorescente indolizine-rhodamine pour la détection d'ions mercure

Une application plus récente remonte à 2020. Cette année-là, le groupe de Kim a rapporté un nouveau capteur de fluorure à base d'indolizine (Figure 19).¹²³ La détection repose sur l'ajout d'un groupement TBDMS (*tert*-butyldiméthylsilyl) sur l'hétérocycle. La présence d'ions F^- dans le milieu déclenche le clivage de la liaison $\text{Si}-\text{O}$ et libère un phénol, groupement donneur d'électrons plus fort, ce qui provoque une diminution de l'intensité de la fluorescence.

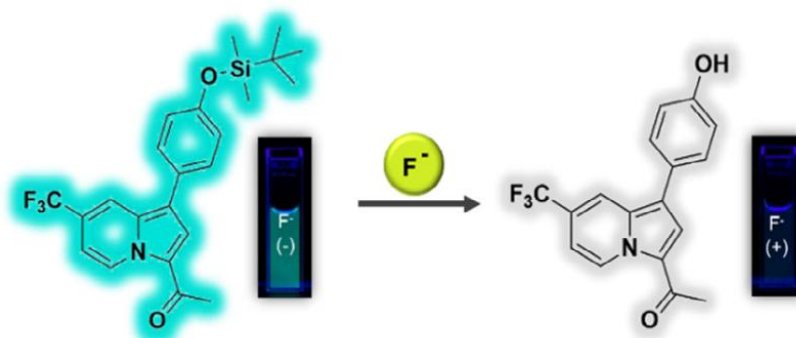


Figure 19 : Sonde de fluorure à base d'indolizine

On peut également citer les deux sondes de pH indépendamment conçues par les groupes de Ge et de Kim en 2017 et 2022 respectivement (Figure 20).^{124,118} Les deux systèmes reposent sur l'introduction de groupements fonctionnels sensibles au pH dans le noyau indolizine tels que les groupes *N,N*-diméthylamine et acide carboxylique. Leur protonation et déprotonation altèrent les propriétés électroniques de l'hétérocycle, générant des décalages de la longueur d'onde d'émission.

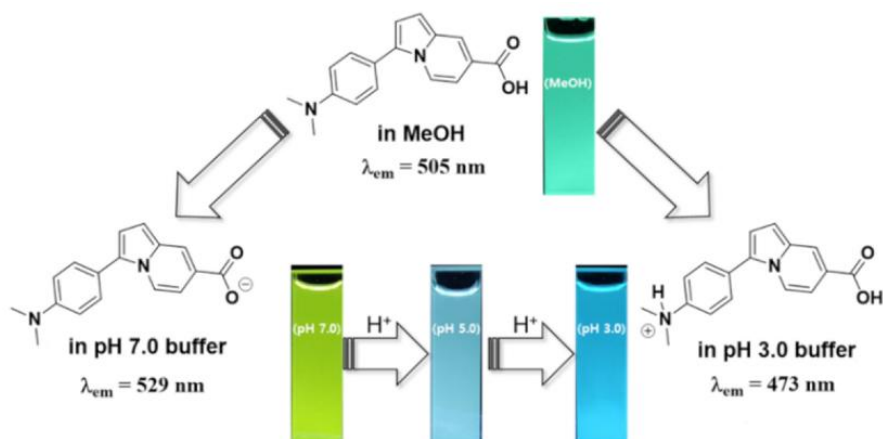


Figure 20 : Capteur à pH à base d'indolizine

En 2022 également, Kim et ses collègues ont développé une méthode portable et non invasive pour l'autosurveillance de la glycémie (Figure 21).¹²⁵ Au lieu de requérir un échantillon sanguin, ce nouveau capteur analyse le taux de glucose contenu dans les larmes, réduisant ainsi la douleur et le stress ressentis par les patients souffrant d'une phobie des seringues. L'appareil emploie la glucose oxydase (GOx) pour produire du peroxyde d'hydrogène qui clive ensuite le groupement dioxaborolane des indolizines immobilisées sur la surface du biocapteur, conduisant de la sorte à une variation de la fluorescence.

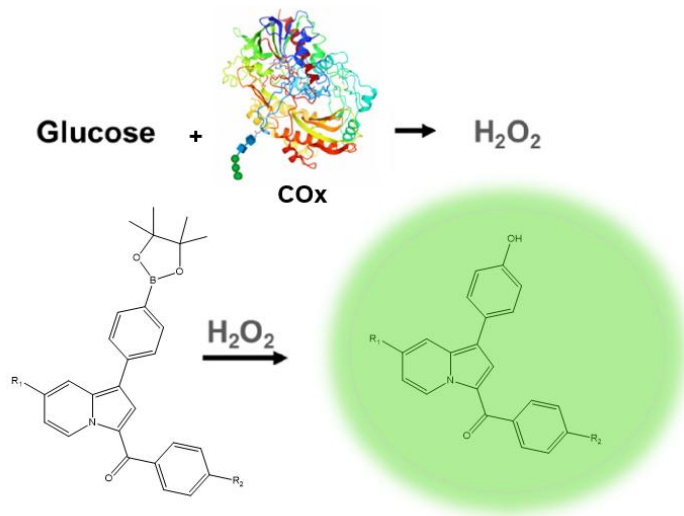


Figure 21 : Biocapteur de glucose employant des indolizines comme signal de transduction

Quant à l'utilisation du fluorophore aux côtés d'acides nucléiques, il n'existe à notre connaissance qu'un seul exemple décrit à ce jour. Une indolizine contenant un fragment anthracène a été synthétisée en 2016 par Marangoci *et al.* dans l'espoir de servir de biomarqueur d'ADN (Figure 22).¹²⁶ La fraction aromatique hydrocarbonée a été ajoutée à l'hétérocycle car elle se lie fortement à l'ADN par intercalation entre les bases nucléiques et par liaison dans les sillons.¹²⁷ Ainsi, l'association de l'anthracène avec l'ADN permettrait sa

détection grâce à la fluorescence émise par l'indolizine. Étonnamment, le précurseur synthétique dépourvu d'anthracène s'est également révélé capable de se lier à l'ADN, bien que l'interaction soit caractérisée par une affinité plus faible. Cela est supposément dû à une quantité plus limitée d'interactions hydrophobes possibles avec les bases. Les indolizines présentent ainsi un potentiel en tant qu'agents intercalants.

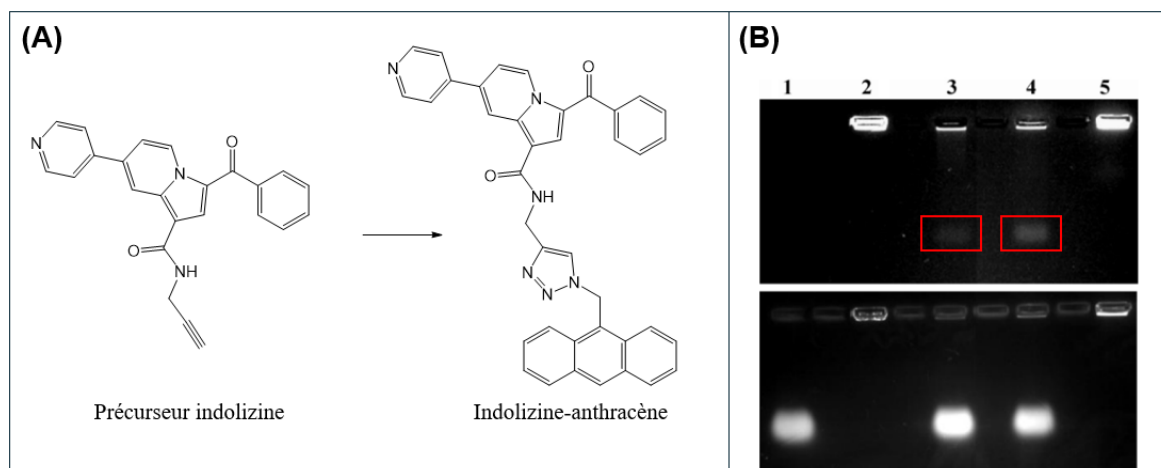


Figure 22 : A) Structure du précurseur indolizinique et du produit indolizine-anthracène pour le biomarquage d'ADN ; B) Gel d'agarose montrant l'interaction des deux dérivés d'indolizine avec l'ADN simple brin avant (en haut) et après (en bas) le développement du gel avec du bromure d'éthidium (puit 1 : ADN de sperme de saumon ; puit 2 : précurseur indolizine ; puit 3 : précurseur indolizine + ADN ; puit 4 : indolizine-anthracène + ADN ; puit 5 : indolizine-anthracène)

L'originalité de ce projet de thèse est donc triple : d'une part, nous souhaitons développer le premier split aptamère impliquant une réaction fluorogénique lors de l'assemblage supramoléculaire de la cible et des ligands. D'autre part, nous visons à exploiter les indolizines comme fluorophore pour un système biocapteur à ADN. Enfin, il s'agirait du premier exemple de formation d'indolizine facilitée par de l'ADN matriciel.

III. Présentation et objectifs du projet

Une myriade de méthodes de synthèse pour la préparation d'indolizines ont été développées depuis 1912, et feront l'objet d'une présentation bibliographique dans le Chapitre 1. L'une des approches les plus convergentes et les plus simples est la cycloaddition 1,3-dipolaire d'alcynes avec des ylures de pyridinium, générés à partir des sels correspondants (Schéma 2).¹²⁸



Schéma 2 : Synthèse d'indolizine par cycloaddition 1,3-dipolaire d'ylures de pyridinium et d'alcynes

Cette réaction a retenu notre attention pour deux raisons. Tout d'abord, les précurseurs sont non fluorescents et facilement préparés à partir de réactifs commercialement disponibles. Ensuite, la cycloaddition peut se produire dans des conditions douces parfaitement compatibles avec l'utilisation d'oligonucléotides (milieu aqueux, pH légèrement basique (7-8) et température ambiante).¹²⁹ Inspiré des aptasenseurs split pour les petites molécules décrits plus haut, notre modèle surnommé **AptaSplit-Indo** et illustré dans la Figure 23 vise à surmonter leurs limitations (portée limitée des analytes et nécessité d'une conjugaison préalable à un fluorophore). En effet, l'interaction stabilisatrice et le signal de transduction sont dus à la formation irréversible d'une indolizine fluorescente se produisant lors de la liaison des fragments d'aptamère à leur cible. Dans cette conception, les deux brins portent respectivement un sel de pyridinium et un alcyne à leurs extrémités, et l'assemblage supramoléculaire ternaire catalyse la cycloaddition en rapprochant les groupes réactifs, augmentant de ce fait leur concentration molaire effective. L'intérêt de cette stratégie réside aussi dans sa versatilité puisqu'il est possible de modifier le noyau pyridinium pour moduler la réactivité, la fluorescence ou encore le point d'ancrage de l'oligonucléotide. De plus, cette réaction ne nécessite pas de catalyseur et les risques d'interférence avec l'analyte sont moindres.

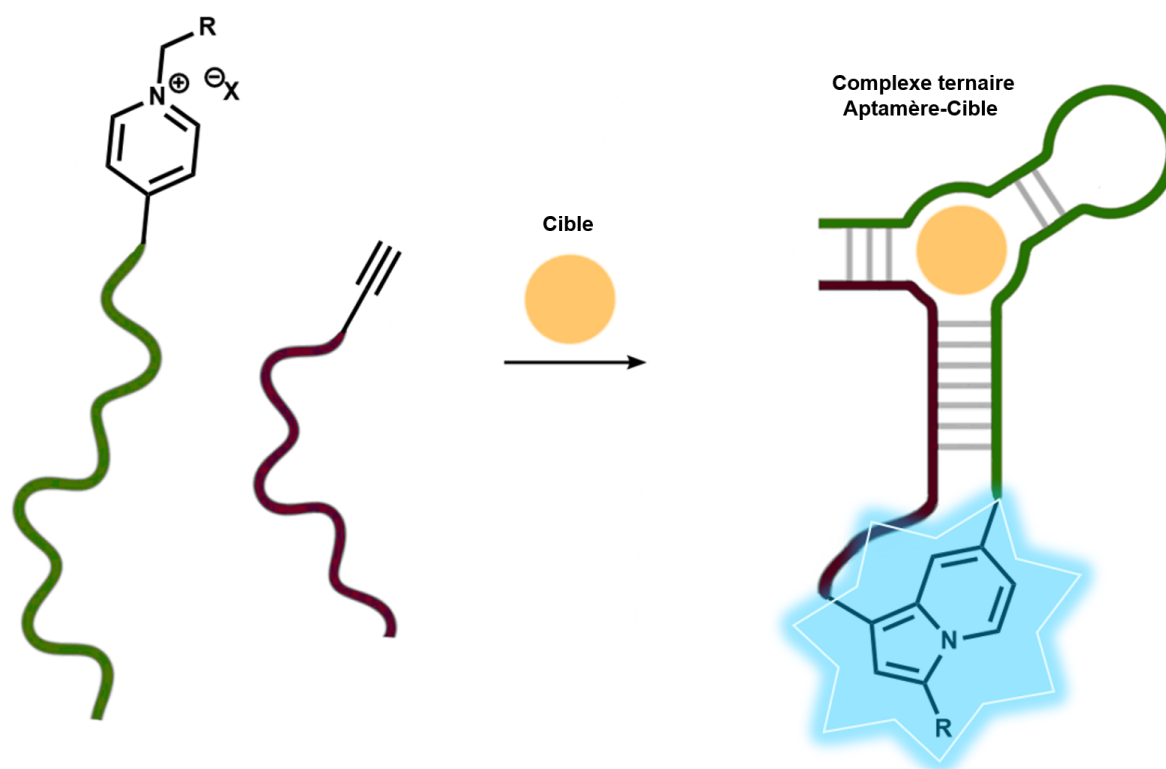


Figure 23 : Modèle AptaSplit-Indo pour la détection de petite molécule

Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré à la préparation et à la caractérisation de nouveaux fluorophores indoliziniques 1,3,7-trisubstitués, obtenus par cycloaddition 1,3-dipolaire d'ylures de pyridinium et d'alcynes.

Dans le deuxième chapitre, le potentiel de nos fluorophores en tant que marqueurs d'ADN a été évalué. Ensuite, un modèle aptamère simplifié a été conçu : pour ce faire, les précurseurs non fluorescents ont été conjugués à des brins oligonucléotidiques complémentaires et la réaction fluorogénique a été étudiée en présence d'ADN afin d'évaluer son effet sur la réactivité et la fluorescence des produits.

Après la découverte d'une incompatibilité entre la cycloaddition de nos précurseurs et les acides nucléiques, des modèles aptamères alternatifs basés sur la formation stabilisante d'une cycl[3.2.2]azine, d'une indolizine squaraine et de 3,3-biindolizines ont été explorés dans le troisième et dernier chapitre.

Références bibliographiques

- (1) McNerney, M. P.; Styczynski, M. P. Small Molecule Signaling, Regulation, and Potential Applications in Cellular Therapeutics. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2018**, *10* (2), 10.1002/wsbm.1405. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1405>.
- (2) Kadow, S.; Jux, B.; Chmill, S.; Esser, C. Small Molecules as Friends and Foes of the Immune System. *Future Med. Chem.* **2009**, *1* (9), 1583–1591. <https://doi.org/10.4155/fmc.09.125>.
- (3) Qiu, S.; Cai, Y.; Yao, H.; Lin, C.; Xie, Y.; Tang, S.; Zhang, A. Small Molecule Metabolites: Discovery of Biomarkers and Therapeutic Targets. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2023**, *8* (1), 132. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01399-3>.
- (4) Turner, A.; Karube, I.; Wilson, G. S. *Biosensors : Fundamentals and Applications*; Oxford University Press, 1987.
- (5) Wang, J.; Pursell, M. E.; DeVor, A.; Awoyemi, O.; Valentine, S. J.; Li, P. Portable Mass Spectrometry System: Instrumentation, Applications, and Path to 'omics Analysis. *Proteomics* **2022**, *22* (23–24), e2200112. <https://doi.org/10.1002/pmic.202200112>.
- (6) Hu, J.; Liu, F.; Chen, Y.; Shangguan, G.; Ju, H. Mass Spectrometric Biosensing: A Powerful Approach for Multiplexed Analysis of Clinical Biomolecules. *ACS Sens.* **2021**, *6* (10), 3517–3535. <https://doi.org/10.1021/acssensors.1c01394>.
- (7) Whitesides, G. M. The Origins and the Future of Microfluidics. *Nature* **2006**, *442* (7101), 368–373. <https://doi.org/10.1038/nature05058>.
- (8) Garcia-Cordero, J. L.; Maerkl, S. J. Microfluidic Systems for Cancer Diagnostics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2020**, *65*, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.11.022>.
- (9) Cetin, D.; Okan, M.; Bat, E.; Kulah, H. A Comparative Study on EpCAM Antibody Immobilization on Gold Surfaces and Microfluidic Channels for the Detection of Circulating Tumor Cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2020**, *188*, 110808. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110808>.
- (10) Lunelli, L.; Barbaresco, F.; Scordo, G. PDMS-Based Microdevices for the Capture of MicroRNA Biomarkers. *Appl. Sci.* **2020**, *10* (11), 3867. <https://doi.org/10.3390/app10113867>.
- (11) Srinivasan, V.; Pamula, V. K.; Fair, R. B. An Integrated Digital Microfluidic Lab-on-a-Chip for Clinical Diagnostics on Human Physiological Fluids. *Lab. Chip* **2004**, *4* (4), 310–315. <https://doi.org/10.1039/B403341H>.
- (12) Bahavarnia, F.; Saadati, A.; Hassanpour, S. Paper Based Immunosensing of Ovarian Cancer Tumor Protein CA 125 Using Novel Nano-Ink: A New Platform for Efficient Diagnosis of Cancer and Biomedical Analysis Using Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (μPAD). *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *138*, 744–754. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.109>.
- (13) Cai, H.-L.; Yang, Y.; Zhang, Y.-H.; Zhou, C.-J.; Guo, C.-R.; Liu, J.; Ren, T.-L. A High Sensitivity Wireless Mass-Loading Surface Acoustic Wave DNA Biosensor. *Mod. Phys. Lett. B* **2014**, *28*, 1450056. <https://doi.org/10.1142/S0217984914500560>.
- (14) Clementi, M. E.; Marini, S.; Condò, S. G.; Giardina, B. Antibodies against Small Molecules. *Ann. Ist. Super. Sanita* **1991**, *27* (1), 139–143.
- (15) Askari, A.; Kota, S.; Ferrell, H.; Swamy, S. UTexas Aptamer Database: The Collection and Long-Term Preservation of Aptamer Sequence Information. *Nucleic Acids Res.* **2024**, *52* (D1), D351–D359. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad959>.
- (16) Coghill, R. D. Nucleic Acids (Levene, P. A.; Bass, Lawrence W.). *J. Chem. Educ.* **1932**, *9* (1), 198. <https://doi.org/10.1021/ed009p198.2>.
- (17) Hall, K.; Sankaran, N. DNA Translated: Friedrich Miescher's Discovery of Nuclein in Its Original Context. *Br. J. Hist. Sci.* **2021**, *54* (1), 99–107. <https://doi.org/10.1017/S000708742000062X>.
- (18) Miescher. *Die Spermatozoen einiger Wirbelthiere: ein Beitrag zur Histochemie*; 1874.
- (19) Hammarsten: *Zur Kenntniss der Nucleoproteide* - Google Scholar.
- (20) Levene, P. A.; Mori, T. RIBODESOSE AND XYLODESOSE AND THEIR BEARING ON THE STRUCTURE OF THYMINOSE. *J. Biol. Chem.* **1929**, *83* (3), 803–816. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)77109-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)77109-3).
- (21) Levene, P. A.; London, E. S. THE STRUCTURE OF THYMONUCLEIC ACID. *J. Biol. Chem.* **1929**, *83* (3), 793–802. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)77108-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)77108-1).
- (22) Chargaff, E. Chemical Specificity of Nucleic Acids and Mechanism of Their Enzymatic Degradation. *Experientia* **1950**, *6* (6), 201–209. <https://doi.org/10.1007/BF02173653>.
- (23) Franklin, R. E.; Gosling, R. G. Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate. *Nature* **1953**, *171* (4356), 740–741. <https://doi.org/10.1038/171740a0>.

- (24) Watson, J. D.; Crick, F. H. Molecular Structure of Nucleic Acids; a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171* (4356), 737–738. <https://doi.org/10.1038/171737a0>.
- (25) Clark, D. P.; Pazdernik, N. J. Chapter E18 - Regulation at the RNA Level. In *Molecular Biology (Second Edition)*; Clark, D. P., Pazdernik, N. J., Eds.; Academic Press: Boston, 2013; pp e399–e404. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378594-7.00053-6>.
- (26) Gregory, S. G.; Barlow, K. F.; McLay, K. E. *et al.* The DNA Sequence and Biological Annotation of Human Chromosome 1. *Nature* **2006**, *441* (7091), 315–321. <https://doi.org/10.1038/nature04727>.
- (27) Duan, J.; Wang, X.; Kizer, M. E. Biotechnological and Therapeutic Applications of Natural Nucleic Acid Structural Motifs. *Top. Curr. Chem.* **2020**, *378* (2), 26. <https://doi.org/10.1007/s41061-020-0290-z>.
- (28) Nikolova, E. N.; Zhou, H.; Gottardo, F. L.; Alvey, H. S.; Kimsey, I. J.; Al-Hashimi, H. M. A Historical Account of Hoogsteen Base-Pairs in Duplex DNA. *Biopolymers* **2013**, *99* (12), 10.1002/bip.22334. <https://doi.org/10.1002/bip.22334>.
- (29) Bansal, A.; Kaushik, S.; Kukreti, S. Non-Canonical DNA Structures: Diversity and Disease Association. *Front. Genet.* **2022**, *13*, 959258. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.959258>.
- (30) Tateishi-Karimata, H.; Sugimoto, N. Chemical Biology of Non-Canonical Structures of Nucleic Acids for Therapeutic Applications. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (16), 2379–2390. <https://doi.org/10.1039/C9CC09771F>.
- (31) Cullen, B. R.; Greene, W. C. Regulatory Pathways Governing HIV-1 Replication. *Cell* **1989**, *58* (3), 423–426. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90420-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90420-0).
- (32) Tuerk, C.; Gold, L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science* **1990**, *249* (4968), 505–510. <https://doi.org/10.1126/science.2200121>.
- (33) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. In Vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands. *Nature* **1990**, *346* (6287), 818–822. <https://doi.org/10.1038/346818a0>.
- (34) Qu, H.; Csordas, A. T.; Wang, J.; Oh, S. S.; Eisenstein, M. S.; Soh, H. T. Rapid and Label-Free Strategy to Isolate Aptamers for Metal Ions. *ACS Nano* **2016**, *10* (8), 7558–7565. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.6b02558>.
- (35) Yuhuan, J.; Zhu, L.; Zhu, L.; Huang, K.; He, X.; Xu, W. Cell-Specific Aptamers as Potential Drugs in Therapeutic Applications: A Review of Current Progress. *J. Controlled Release* **2022**, *346*, 405–420. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.04.039>.
- (36) Wu, Y. X.; Kwon, Y. J. Aptamers: The “Evolution” of SELEX. *Methods* **2016**, *106*, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.04.020>.
- (37) Zhuo, Z.; Yu, Y.; Wang, M.; Li, J.; Zhang, Z.; Liu, J.; Wu, X.; Lu, A.; Zhang, G.; Zhang, B. Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (10), 2142. <https://doi.org/10.3390/ijms18102142>.
- (38) Mendonsa, S. D.; Bowser, M. T. In Vitro Evolution of Functional DNA Using Capillary Electrophoresis. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (1), 20–21. <https://doi.org/10.1021/ja037832s>.
- (39) Jenison, R. D.; Gill, S. C.; Pardi, A.; Polisky, B. High-Resolution Molecular Discrimination by RNA. *Science* **1994**, *263* (5152), 1425–1429. <https://doi.org/10.1126/science.7510417>.
- (40) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. Selection in Vitro of Single-Stranded DNA Molecules That Fold into Specific Ligand-Binding Structures. *Nature* **1992**, *355* (6363), 850–852. <https://doi.org/10.1038/355850a0>.
- (41) Mi, J.; Liu, Y.; Rabbani, Z. N.; Yang, Z.; Urban, J. H.; Sullenger, B. A.; Clary, B. M. In Vivo Selection of Tumor-Targeting RNA Motifs. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6* (1), 22–24. <https://doi.org/10.1038/nchembio.277>.
- (42) Bohrmann, L.; Burghardt, T.; Haynes, C.; Saatchi, K.; Häfeli, U. O. Aptamers Used for Molecular Imaging and Theranostics - Recent Developments. *Theranostics* **2022**, *12* (9), 4010–4050. <https://doi.org/10.7150/thno.72949>.
- (43) Perret, G.; Boschetti, E. Aptamer-Based Affinity Chromatography for Protein Extraction and Purification. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2020**, *174*, 93–139. https://doi.org/10.1007/10_2019_106.
- (44) Zhou, J.; Rossi, J. Aptamers as Targeted Therapeutics: Current Potential and Challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16* (3), 181–202. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.199>.
- (45) Tan, S. Y.; Acquah, C.; Sidhu, A.; Ongkudon, C. M.; Yon, L. S.; Danquah, M. K. SELEX Modifications and Bioanalytical Techniques for Aptamer-Target Binding Characterization. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2016**, *46* (6), 521–537. <https://doi.org/10.1080/10408347.2016.1157014>.
- (46) Mayer, G.; Wulffen, B.; Huber, C.; Brockmann, J.; Flicke, B.; Neumann, L.; Hafenbradl, D.; Klebl, B. M.; Lohse, M. J.; Krasel, C.; Blind, M. An RNA Molecule That Specifically Inhibits G-

- Protein-Coupled Receptor Kinase 2 in Vitro. *RNA* **2008**, *14* (3), 524–534. <https://doi.org/10.1261/rna.821908>.
- (47) Tesmer, V. M.; Lennarz, S.; Mayer, G.; Tesmer, J. J. G. Molecular Mechanism for Inhibition of G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 by a Selective RNA Aptamer. *Structure* **2012**, *20* (8), 1300–1309. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.05.002>.
 - (48) McCluskey, K.; Penedo, J. C. An Integrated Perspective on RNA Aptamer Ligand-Recognition Models: Clearing Muddy Waters. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19* (10), 6921–6932. <https://doi.org/10.1039/C6CP08798A>.
 - (49) Sester, C.; McCone, J. A. J.; Sen, A.; Vorster, J.; Harvey, J. E.; Hodgkiss, J. M. Unraveling the Binding Mode of a Methamphetamine Aptamer: A Spectroscopic and Calorimetric Study. *Biophys. J.* **2022**, *121* (11), 2193–2205. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.04.027>.
 - (50) Hermann, T.; Patel, D. J. Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers. *Science* **2000**, *287* (5454), 820–825. <https://doi.org/10.1126/science.287.5454.820>.
 - (51) Domsicova, M.; Korcekova, J.; Poturnayova, A.; Breier, A. New Insights into Aptamers: An Alternative to Antibodies in the Detection of Molecular Biomarkers. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25* (13), 6833. <https://doi.org/10.3390/ijms25136833>.
 - (52) Perrier, S.; Guieu, V.; Chovelon, B.; Ravelet, C.; Peyrin, E. Panoply of Fluorescence Polarization/Anisotropy Signaling Mechanisms for Functional Nucleic Acid-Based Sensing Platforms. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (7), 4236–4248. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04593>.
 - (53) Moutsipoulou, A.; Broyles, D.; Dikici, E.; Daunert, S.; Deo, S. K. Molecular Aptamer Beacons and Their Applications in Imaging and Diagnostics. *Small Wein. Bergstr. Ger.* **2019**, *15* (35), e1902248. <https://doi.org/10.1002/smll.201902248>.
 - (54) Chi, C.-W.; Lao, Y.-H.; Li, Y.-S.; Chen, L.-C. A Quantum Dot-Aptamer Beacon Using a DNA Intercalating Dye as the FRET Reporter: Application to Label-Free Thrombin Detection. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26* (7), 3346–3352. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.01.015>.
 - (55) Wang, C.; Sun, L.; Zhao, Q. A Simple Aptamer Molecular Beacon Assay for Rapid Detection of Aflatoxin B1. *Chin. Chem. Lett.* **2019**, *30* (5), 1017–1020. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2019.01.029>.
 - (56) Zhang, J.-Q.; Wang, Y.-S.; Xue, J.-H.; He, Y.; Yang, H.-X.; Liang, J.; Shi, L.-F.; Xiao, X.-L. A Gold Nanoparticles-Modified Aptamer Beacon for Urinary Adenosine Detection Based on Structure-Switching/Fluorescence-“Turning on” Mechanism. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *70*, 362–368. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.05.032>.
 - (57) Yuan, M.; Zhang, Q.; Song, Z.; Ye, T.; Yu, J.; Cao, H.; Xu, F. Piezoelectric Arsenite Aptasensor Based on the Use of a Self-Assembled Mercaptoethylamine Monolayer and Gold Nanoparticles. *Microchim. Acta* **2019**, *186* (5), 268. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3373-1>.
 - (58) Cai, L.; Fang, G.; Tang, J.; Cheng, Q.; Han, X. Label-Free Surface-Enhanced Raman Spectroscopic Analysis of Proteins: Advances and Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (22), 13868. <https://doi.org/10.3390/ijms232213868>.
 - (59) Nguyen, H. H.; Park, J.; Kang, S.; Kim, M. Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications. *Sensors* **2015**, *15* (5), 10481–10510. <https://doi.org/10.3390/s150510481>.
 - (60) Lim, Y. C.; Kouzani, A. Z.; Duan, W.; Dai, X. J.; Kaynak, A.; Mair, D. A Surface-Stress-Based Microcantilever Aptasensor. *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.* **2014**, *8* (1), 15–24. <https://doi.org/10.1109/TBCAS.2013.2286255>.
 - (61) McKeague, M.; McConnell, E. M.; Cruz-Toledo, J.; Bernard, E. D.; Pach, A.; Mastronardi, E.; Zhang, X.; Beking, M.; Francis, T.; Giamberardino, A.; Cabecinha, A.; Ruscito, A.; Aranda-Rodriguez, R.; Dumontier, M.; DeRosa, M. C. Analysis of In Vitro Aptamer Selection Parameters. *J. Mol. Evol.* **2015**, *81* (5), 150–161. <https://doi.org/10.1007/s00239-015-9708-6>.
 - (62) Strauss, K. A.; Puffenberger, E. G.; Carson, V. J. Maple Syrup Urine Disease. In *GeneReviews®*; Adam, M. P., Feldman, J., Mirzaa, G. M., Pagon, R. A., Wallace, S. E., Amemiya, A., Eds.; University of Washington, Seattle: Seattle (WA), 1993.
 - (63) Yang, K.; Mitchell, N. M.; Banerjee, S.; Cheng, Z.; Taylor, S.; A. M.; Stojanovic, M. N. A Functional Group-Guided Approach to Aptamers for Small Molecules. *Science* **2023**, *380* (6648), 942–948. <https://doi.org/10.1126/science.abn9859>.
 - (64) Stojanovic, M. N.; de Prada, P.; Landry, D. W. Aptamer-Based Folding Fluorescent Sensor for Cocaine. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (21), 4928–4931. <https://doi.org/10.1021/ja0038171>.
 - (65) Nimjee, S. M.; Rusconi, C. P.; Sullenger, B. A. Aptamers: An Emerging Class of Therapeutics. *Annu. Rev. Med.* **2005**, *56*, 555–583. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.56.062904.144915>.

- (66) R, S.; C, R.; B, S. FluMag-SELEX as an Advantageous Method for DNA Aptamer Selection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 383 (1). <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3388-9>.
- (67) Ohsawa, K.; Kasamatsu, T.; Nagashima, J.; Hanawa, K.; Kuwahara, M.; Ozaki, H.; Sawai, H. Arginine-Modified DNA Aptamers That Show Enantioselective Recognition of the Dicarboxylic Acid Moiety of Glutamic Acid. *Anal. Sci.* **2008**, 24 (1), 167–172. <https://doi.org/10.2116/analsci.24.167>.
- (68) Park, J.-W.; Tatavarty, R.; Kim, D. W.; Jung, H.-T.; Gu, M. B. Immobilization-Free Screening of Aptamers Assisted by Graphene Oxide. *Chem. Commun.* **2012**, 48 (15), 2071–2073. <https://doi.org/10.1039/C2CC16473F>.
- (69) Ka, Y.; R, P.; Mn, S. In Vitro Selection and Amplification Protocols for Isolation of Aptameric Sensors for Small Molecules. *Methods San Diego Calif* **2016**, 106. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.04.032>.
- (70) Sakamoto, S.; Putalun, W.; Vimolmangkang, S.; Phoolcharoen, W.; Shoyama, Y.; Tanaka, H.; Morimoto, S. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Quantitative/Qualitative Analysis of Plant Secondary Metabolites. *J. Nat. Med.* **2018**, 72 (1), 32–42. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1144-z>.
- (71) Stojanovic, M. N.; de Prada, P.; Landry, D. W. Fluorescent Sensors Based on Aptamer Self-Assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122 (46), 11547–11548. <https://doi.org/10.1021/ja0022223>.
- (72) Chen, A.; Yan, M.; Yang, S. Split Aptamers and Their Applications in Sandwich Aptasensors. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, 80, 581–593. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.04.006>.
- (73) Wang, R.; Zhang, Q.; Zhang, Y.; Shi, H.; Nguyen, K. T.; Zhou, X. Unconventional Split Aptamers Cleaved at Functionally Essential Sites Preserve Biorecognition Capability. *Anal. Chem.* **2019**, 91 (24), 15811–15817. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04115>.
- (74) Gartner, Z. J.; Liu, D. R. The Generality of DNA-Templated Synthesis as a Basis for Evolving Non-Natural Small Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123 (28), 6961–6963. <https://doi.org/10.1021/ja015873n>.
- (75) Yang, C.; Spinelli, N.; Perrier, S.; Defrancq, E.; Peyrin, E. Macrocyclic Host-Dye Reporter for Sensitive Sandwich-Type Fluorescent Aptamer Sensor. *Anal. Chem.* **2015**, 87 (6), 3139–3143. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00341>.
- (76) Carneiro, S. B.; Costa Duarte, F. Í.; Heimfarth, L.; Siqueira Quintans, J. de S.; Quintans-Júnior, L. J.; da Veiga Júnior, V. F.; Neves de Lima, Á. A. Cyclodextrin–Drug Inclusion Complexes: In Vivo and In Vitro Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20 (3), 642. <https://doi.org/10.3390/ijms20030642>.
- (77) Sharma, A. K.; Heemstra, J. M. Small-Molecule-Dependent Split Aptamer Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (32), 12426–12429. <https://doi.org/10.1021/ja205518e>.
- (78) Spiropoulos, N. G.; Heemstra, J. M. Templating Effect in DNA Proximity Ligation Enables Use of Non-Bioorthogonal Chemistry in Biological Fluids. *Artif. DNA PNA XNA* **2012**, 3 (3), 123–128. <https://doi.org/10.4161/adna.23842>.
- (79) Aho, A.; Virta, P. Assembly of Split Aptamers by Dynamic pH-Responsive Covalent Ligation. *Chem. Commun.* **2023**, 59 (38), 5689–5692. <https://doi.org/10.1039/D3CC01158E>.
- (80) Lee, E.-S.; Lee, J. M.; Kim, H.-J.; Kim, Y.-P. Fluorogenic Aptasensors with Small Molecules. *Chemosensors* **2021**, 9 (3), 54. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9030054>.
- (81) Liu, X.; Song, J.; Yang, R.; Su, S.; Zhang, L.; Huang, Y.; Fan, Q. Recent Advances of Biosensors Based on Split Aptamers in Biological Analysis: A Review. *IEEE Sens. J.* **2022**, 22, 1–1. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2022.3176601>.
- (82) Silverman, A. P.; Kool, E. T. Detecting RNA and DNA with Templated Chemical Reactions. *Chem. Rev.* **2006**, 106 (9), 3775–3789. <https://doi.org/10.1021/cr050057+>.
- (83) Pianowski, Z.; Gorska, K.; Oswald, L.; Merten, C. A.; Winssinger, N. Imaging of mRNA in Live Cells Using Nucleic Acid-Templated Reduction of Azidorhodamine Probes. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (18), 6492–6497. <https://doi.org/10.1021/ja809656k>.
- (84) Cai, J.; Li, X.; Yue, X.; Taylor, J. S. Nucleic Acid-Triggered Fluorescent Probe Activation by the Staudinger Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (50), 16324–16325. <https://doi.org/10.1021/ja0452626>.
- (85) Franzini, R. M.; Kool, E. T. Organometallic Activation of a Fluorogen for Templated Nucleic Acid Detection. *Org. Lett.* **2008**, 10 (14), 2935–2938. <https://doi.org/10.1021/ol800878b>.
- (86) Huang, Y.; Coull, J. M. Diamine Catalyzed Hemicyanine Dye Formation from Nonfluorescent Precursors through DNA Programmed Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (11), 3238–3239. <https://doi.org/10.1021/ja0753602>.

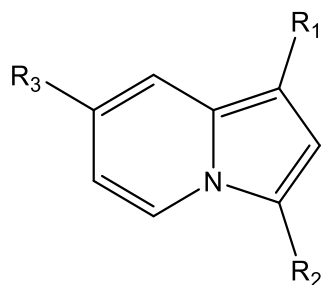
- (87) Shibata, A.; Abe, H.; Ito, M.; Kondo, Y.; Shimizu, S.; Aikawa, K.; Ito, Y. DNA Templated Nucleophilic aromatic Substitution Reactions for Fluorogenic Sensing of Oligonucleotides. *Chem. Commun.* **2009**, No. 43, 6586–6588. <https://doi.org/10.1039/B912896D>.
- (88) Chen, Y.; Jiang, H.; Hao, T.; Zhang, N.; Li, M.; Wang, X.; Wang, X.; Wei, W.; Zhao, J. Fluorogenic Reactions in Chemical Biology: Seeing Chemistry in Cells. *Chem. Biomed. Imaging* **2023**, *1* (7), 590–619. <https://doi.org/10.1021/cbmi.3c00029>.
- (89) Borrows, E. T.; Holland, D. O. The Chemistry of the Pyrrocolines and the Octahydropyrrocolines. *Chem. Rev.* **1948**, *42* (3), 611–643. <https://doi.org/10.1021/cr60133a005>.
- (90) Scholtz, M. Die Einwirkung von Essigsäureanhydrid Auf α -Picolin. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1912**, *45* (1), 734–746. <https://doi.org/10.1002/cber.191204501108>.
- (91) Cannon, J. G. Comprehensive Heterocyclic Chemistry II Edited by A. R. Katritzky, C. W. Rees, and E. F. V. Scriven. (Set). *J. Med. Chem.* **1997**, *40* (25), 4165–4166. <https://doi.org/10.1021/jm9706123>.
- (92) Armarego, W. L. F. C-1 and C-3 Protonation of Indolizines. *J. Chem. Soc. B Phys. Org.* **1966**, No. 0, 191–194. <https://doi.org/10.1039/J29660000191>.
- (93) Chiang, Y.; Whipple, E. B. The Protonation of Pyrroles. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (18), 2763–2767. <https://doi.org/10.1021/ja00901a020>.
- (94) Hinman, R. L.; Lang, J. The Protonation of Indoles. Basicity Studies. The Dependence of Acidity Functions on Indicator Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (18), 3796–3806. <https://doi.org/10.1021/ja01072a040>.
- (95) Binetin, S.; Devillers, J. QSAR for Organic Chemical Sorption in Soils and Sediments. *Chemosphere* **1994**, *28* (6), 1171–1188. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(94\)90335-2](https://doi.org/10.1016/0045-6535(94)90335-2).
- (96) Dorling, P. R.; Huxtable, C. R.; Colegate, S. M. Inhibition of Lysosomal α -Mannosidase by Swainsonine, an Indolizidine Alkaloid Isolated from *Swainsona Canescens*. *Biochem. J.* **1980**, *191* (2), 649–651. <https://doi.org/10.1042/bj1910649>.
- (97) Harris, C. M.; Schneider, M. J.; Ungemach, F. S.; Hill, J. E.; Harris, T. M. Biosynthesis of the Toxic Indolizidine Alkaloids Slaframine and Swainsonine in *Rhizoctonia Leguminicola*: Metabolism of 1-Hydroxyindolizidines. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (3), 940–949. <https://doi.org/10.1021/ja00211a039>.
- (98) Ritter, F. J.; Rotgans, I. E. M.; Talman, E.; Verwiel, P. E. J.; Stein, F. 5-Methyl-3-Butyl-Octahydroindolizine, a Novel Type of Pheromone Attractive to Pharaoh's Ants (*Monomorium Pharaonis* (L.)). *Experientia* **1973**, *29* (5), 530–531. <https://doi.org/10.1007/BF01926645>.
- (99) Daly, J. W.; Tokuyama, T.; Fujiwara, T.; Highet, R. J.; Karle, I. L. A New Class of Indolizidine Alkaloids from the Poison Frog, *Dendrobates Tricolor*. X-Ray Analysis of 8-Hydroxy-8-Methyl-6-(2'-Methylhexylidene)-1-Azabicyclo[4.3.0]Nonane. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (2), 830–836. <https://doi.org/10.1021/ja00522a064>.
- (100) Kumar, S.; Ritika. A Brief Review of the Biological Potential of Indole Derivatives. *Future J. Pharm. Sci.* **2020**, *6* (1), 121. <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00141-y>.
- (101) Zhang, J.; Morris-Natschke, S. L.; Ma, D.; Shang, X.; Yang, C.; Liu, Y.; Lee, K. Biologically Active Indolizidine Alkaloids. *Med. Res. Rev.* **2021**, *41* (2), 928–960. <https://doi.org/10.1002/med.21747>.
- (102) Harrell, W. B.; Doerge, R. F. Mannich Bases from 2-Phenylindolizines I. 3-Alkyl-1-Dialkylaminomethyl Derivatives. *J. Pharm. Sci.* **1967**, *56* (2), 225–228. <https://doi.org/10.1002/jps.2600560215>.
- (103) Hazra, A.; Mondal, S.; Maity, A.; Naskar, S.; Saha, P.; Banerjee, S.; Mondal, N. B. Amberlite-IRA-402 (OH) Ion Exchange Resin Mediated Synthesis of Indolizines, Pyrrolo [1,2-a] Quinolines and Isoquinolines: Antibacterial and Antifungal Evaluation of the Products. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46* (6), 2132–2140. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.02.066>.
- (104) Faghih-Mirzaei, E.; Seifi, M.; Abaszadeh, M.; Zomorodian, K.; Helali, H. Design, Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling Study of Novel Indolizine-1-Carbonitrile Derivatives as Potential Anti-Microbial Agents. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* **2018**, *17* (3), 883–895.
- (105) Foster, C.; Ritchie, M.; Selwood, D. L.; Snowden, W. Synthesis and Anti-Herpes Activity of a Series of Indolizines. *Antivir. Chem. Chemother.* **1995**, *6* (5), 289–297. <https://doi.org/10.1177/095632029500600502>.
- (106) Shrivastava, S. K.; Srivastava, P.; Bandresh, R.; Tripathi, P. N.; Tripathi, A. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Some Novel Indolizine Derivatives as Dual Cyclooxygenase and Lipoxygenase Inhibitor for Anti-Inflammatory Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25* (16), 4424–4432. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.027>.

- (107) Garcia, C. S.; da Rocha, M. J.; Presa, M. H.; Pires, C. S.; Besckow, E. M.; Penteado, F.; Gomes, C. S.; Lenardão, E. J.; Bortolatto, C. F.; Brüning, C. A. Exploring the Antioxidant Potential of Chalcogen-Indolizines throughout in Vitro Assays. *PeerJ* **2024**, *12*, e17074. <https://doi.org/10.7717/peerj.17074>.
- (108) Danac, R.; Al Matarneh, C. M.; Shova, S.; Daniloia, T.; Balan, M.; Mangalagiu, I. I. New Indolizines with Phenanthroline Skeleton: Synthesis, Structure, Antimycobacterial and Anticancer Evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (10), 2318–2327. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.077>.
- (109) Antonini, I.; Claudi, F.; Gulini, U.; Micossi, L.; Venturi, F. Indolizine Derivatives with Biological Activity IV: 3-(2-Aminoethyl)-2-Methylindolizine, 3-(2-Aminoethyl)-2-Methyl-5,6,7,8-Tetrahydroindolizine, and Their N-Alkyl Derivatives. *J. Pharm. Sci.* **1979**, *68* (3), 321–324. <https://doi.org/10.1002/jps.2600680317>.
- (110) Venugopala, K. N.; Chandrashekhara, S.; Deb, P. K.; Tratat, C. Anti-Tubercular Activity and Molecular Docking Studies of Indolizine Derivatives Targeting Mycobacterial InhA Enzyme. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **36** (1), 1472–1487. <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1919889>.
- (111) Vaught, J. L.; Carson, J. R.; Carmosin, R. J.; Blum, P. S.; Persico, F. J.; Hageman, W. E.; Shank, R. P.; Raffa, R. B. Antinociceptive Action of McN-5195 in Rodents: A Structurally Novel (Indolizine) Analgesic with a Nonopioid Mechanism of Action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, *255* (1), 1–10.
- (112) Huckaba, A. J.; Giordano, F.; McNamara, L. E.; Dreux, K. M.; Hammer, N. I.; Tschumper, G. S.; Zakeeruddin, S. M.; Grätzel, M.; Nazeeruddin, M. K.; Delcamp, J. H. Indolizine-Based Donors as Organic Sensitizer Components for Dye-Sensitized Solar Cells. *Adv. Energy Mater.* **2015**, *5* (7), 1401629. <https://doi.org/10.1002/aenm.201401629>.
- (113) Wan, J.; Zheng, C.-J.; Fung, M.-K.; Liu, X.-K.; Lee, C.-S.; Zhang, X.-H. Multifunctional Electron-Transporting Indolizine Derivatives for Highly Efficient Blue Fluorescence, Orange Phosphorescence Host and Two-Color Based White OLEDs. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22* (10), 4502–4510. <https://doi.org/10.1039/C2JM14904D>.
- (114) Bayazit, M. K.; Coleman, K. S. Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotubes Following the 1,3-Dipolar Cycloaddition of Pyridinium Ylides. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (30), 10670–10676. <https://doi.org/10.1021/ja903712f>.
- (115) Lerner, D. A.; Evleth, E. M. Photophysical Properties of Indolizine and Some Azaindolizines. *Chem. Phys. Lett.* **1972**, *15* (2), 260–262. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(72\)80163-5](https://doi.org/10.1016/0009-2614(72)80163-5).
- (116) Sokolova, E. A.; Festa, A. A.; Golantsov, N. E.; Lukonina, N. S.; Ioffe, I. N.; Varlamov, A. V.; Voskressensky, L. G. Highly Fluorescent Pyrido[2,3-*b*]indolizine-10-Carbonitriles through Pseudo Three-Component Reactions of *N*-(Cyanomethyl)Pyridinium Salts. *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, *2019* (40), 6770–6775. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201900995>.
- (117) Yuan, Y.-C.; Liu, T.-Z.; Zhao, B.-X. Metal-Free Catalyzed Synthesis of Fluorescent Indolizine Derivatives. *J. Org. Chem.* **2021**, *86* (18), 12737–12744. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c01292>.
- (118) Kim, T.; Kim, J. Color-Tunable Indolizine-Based Fluorophores and Fluorescent pH Sensor. *Molecules* **2022**, *27* (1), 12. <https://doi.org/10.3390/molecules27010012>.
- (119) Badaro, J. S. A.; Wrzosek, A.; Morawski, O.; Szewczyk, A.; Deperasińska, I.; Gryko, D. T. Strongly Fluorescent Indolizine-Based Coumarin Analogs. *Org. Chem. Front.* **2024**. <https://doi.org/10.1039/D4QO01216J>.
- (120) Yi, S.; Kim, D.; Cho, W.; Lee, J. H.; Kwon, J. H.; Kim, J.; Park, S. B. Rational Design of Pyrido[3,2-*b*]Indolizine as a Tunable Fluorescent Scaffold for Fluorogenic Bioimaging. *JACS Au* **2024**. <https://doi.org/10.1021/jacsau.4c00135>.
- (121) Becuwe, M.; Landy, D.; Delattre, F.; Cazier, F.; Fourmentin, S. Fluorescent Indolizine-*b*-Cyclodextrin Derivatives for the Detection of Volatile Organic Compounds. *Sensors* **2008**, *8* (6), 3689–3705. <https://doi.org/10.3390/s8063689>.
- (122) Ji, R.; Liu, A.; Shen, S.; Cao, X.; Li, F.; Ge, Y. An Indolizine–Rhodamine Based FRET Fluorescence Sensor for Highly Sensitive and Selective Detection of Hg²⁺ in Living Cells. *RSC Adv.* **2017**, *7* (65), 40829–40833. <https://doi.org/10.1039/C7RA07938A>.
- (123) Kim, H.; Shin, M.; Kim, E. Fluorescent Fluoride Sensor Based on Indolizine Core Skeleton for Bioimaging. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2021**, *42* (1), 95–98. <https://doi.org/10.1002/bkcs.12134>.
- (124) Ge, Y.; Liu, A.; Dong, J.; Duan, G.; Cao, X.; Li, F. A Simple pH Fluorescent Probe Based on New Fluorophore Indolizine for Imaging of Living Cells. *Sens. Actuators B Chem.* **2017**, *247*, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.02.157>.

- (125) Kim, H.; Lee, S.; Lee, K. W.; Kim, H.; Im, H.; Yoon, H. C.; Ko, J.; Kim, E. Fluorescence Sensor Array Based on Indolizine for Noninvasive Monitoring of Tear Glucose with Machine Learning-Supported Smartphone. Social Science Research Network: Rochester, NY April 11, 2022. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4080802>.
- (126) Marangoci, N.-L.; Popovici, L.; Ursu, E.-L.; Danac, R.; Clima, L.; Cojocaru, C.; Coroaba, A.; Neamtu, A.; Mangalagiu, I.; Pinteala, M.; Rotaru, A. Pyridyl-Indolizine Derivatives as DNA Binders and pH-Sensitive Fluorescent Dyes. *Tetrahedron* **2016**, 72 (50), 8215–8222. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.10.052>.
- (127) Wilson, W. D.; Wang, Y.-H.; Kusuma, S.; Chandrasekaran, S.; Boykin, D. W. The Effect of Intercalator Structure on Binding Strength and Base-Pair Specificity in DNA Interactions. *Biophys. Chem.* **1986**, 24 (2), 101–109. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(86\)80003-5](https://doi.org/10.1016/0301-4622(86)80003-5).
- (128) Shang, Y.; Zhang, M.; Yu, S.; Ju, K.; Wang, C.; He, X. New Route Synthesis of Indolizines via 1,3-Dipolar Cycloaddition of Pyridiniums and Alkynes. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50 (50), 6981–6984. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.09.143>.
- (129) Bonte, S.; Ghinea, I.; Dinica, R.; Baussanne, I.; Demeunynck, M. Investigation of the Pyridinium Ylide—Alkyne Cycloaddition as a Fluorogenic Coupling Reaction. *Molecules* **2016**, 21 (3), 332. <https://doi.org/10.3390/molecules21030332>.

Chapitre 1

Synthèse de nouveaux fluorophores indolizines 1,3,7-trisubstitués



I. Principales stratégies de synthèse des indolizines basées sur le motif pyridine

De par leur importance en chimie médicinale, les méthodologies de synthèse des indolizines se développent continuellement et rapidement : il existe plus de 2000 publications portant sur la préparation de cet hétérocycle. Naturellement, les approches synthétiques utilisées à ce jour sont diverses et variées.¹

Sans prétendre à l'exhaustivité, cette première partie a pour objectif de présenter une vue d'ensemble sur les principales stratégies basées sur une transformation d'un noyau pyridine. En effet, la grande majorité des voies de synthèse implique le cycle à 6 chaînons comme point de départ, en raison de sa disponibilité commerciale, la facilité de sa fonctionnalisation et la relative simplicité des réactions associées. Les méthodologies alternatives comme celles impliquant le cycle pyrrole et ses dérivés, bien que nombreuses, ne feront pas l'objet de ce chapitre.²

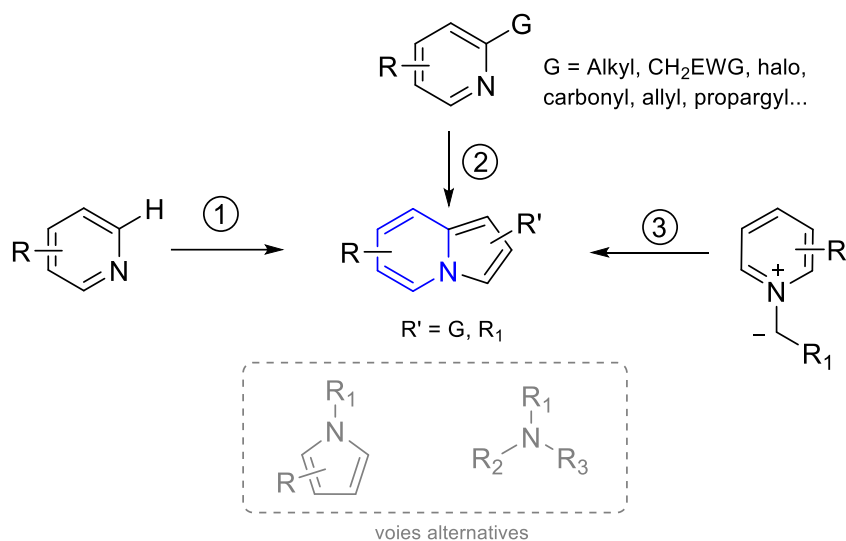


Schéma 3 : Les principales voies de synthèse des indolizines

Les stratégies représentatives peuvent être regroupées en 3 grandes classes (Schéma 3) : les réactions reposant sur une pyridine non substituée en position 2 (voie ①), une plus large catégorie de méthodologies basées sur les pyridines α-fonctionnalisées (voie ②), et enfin les réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire faisant appel aux ylures de pyridinium méthylène (voie ③).

A. Voies de synthèse basées sur les pyridines non substituées en position α

La première des catégories présentées emploie le bloc de construction le plus simple : une pyridine non substituée en position α . En 2009, Basavaiah et ses collaborateurs décrivent la synthèse one-pot d'indolizines 1,2-disubstituées à partir de pyridine et de bromures d'allyle.³ Elle procède *via* la formation d'un sel de pyridinium intermédiaire suivi par une cycloaddition 1,5-dipolaire intramoléculaire (Schéma 4). Les rendements sont modérés (47-63%), mais cette réaction présente l'avantage de se dérouler en conditions douces.

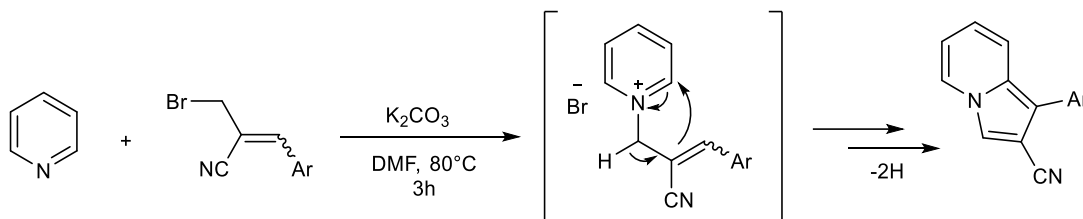


Schéma 4 : Synthèse one-pot d'indolizine 1,2-disubstituées à partir de pyridine et de bromure Baylis-Hillman

La cyclisation [3 + 2] entre la pyridine et les diazoacétates d'alcényle, proposée par Barluenga *et al.* un an plus tard, s'est avérée plus efficace avec des rendements atteignant 94%.⁴ Catalysée par le cuivre (I), un métal de transition écologique et bon marché, cette réaction d'annélation est compatible avec une large gamme de dérivés pyridiniques (dont la quinoléine et l'isoquinoléine) et a conduit à la formation d'indolizines hautement fonctionnalisées (Schéma 5). Selon le mécanisme suggéré, la première étape serait la formation d'un alcénylcarbène de cuivre **I**. Ce dernier évoluerait ensuite en intermédiaire cuprate **II** après une addition de Michael de la pyridine. Après cyclisation, élimination réductrice et décooordination du cuivre, la dihydroindolizine **V** générée subirait une aromatisation oxydative pour aboutir au produit **1** souhaité.

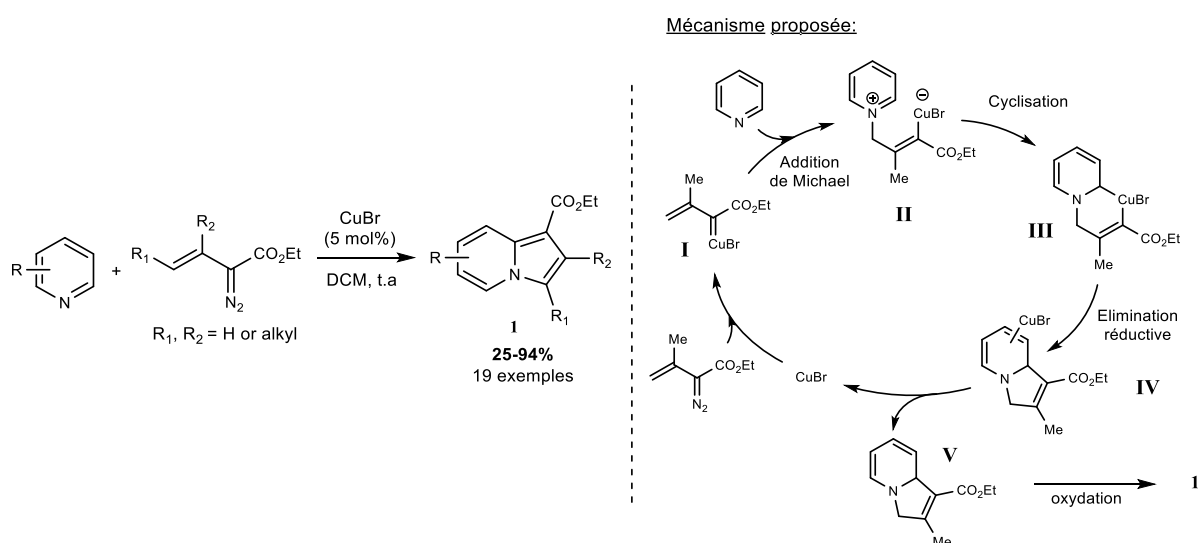


Schéma 5 : Cyclisation régiosélective [3 + 2] des pyridines et alcényldiazoacétates catalysée par le cuivre (I)

L'équipe de Dowden rapporte en 2017 une synthèse multicomposants one-pot impliquant également un réactif diazoïque et un intermédiaire réactionnel de type ylure de pyridinium.⁵ Cette fois-ci, des indolizines 1,3-disubstituées sont préparées à partir de pyridine, d'alcyne terminal et d'éthyl diazoacetate (Schéma 6). Le mécanisme réactionnel n'est pas abordé dans cette section puisque la cycloaddition d'ylures de pyridinium avec des alcynes sera soigneusement détaillée plus loin dans le chapitre. Une méthodologie similaire faisant appel aux alcènes a été décrite plus tôt la même année, mais cette dernière nécessitait une forte quantité de catalyseur (20 mol% de CuF₂ et PPh₃) pour des rendements relativement faibles (51%).⁶ Remplacer les oléfines par une triple liaison a permis de réduire la quantité de métal utilisée (fer (III) en l'occurrence) à 0.25 mol% tout en maintenant d'excellents rendements (82%). Notons qu'un alcyne déficient en électrons est nécessaire : les indolizines cibles n'ont pas été obtenues lorsque le triméthylsilylacétylène ou le phénylacétylène ont été utilisés.

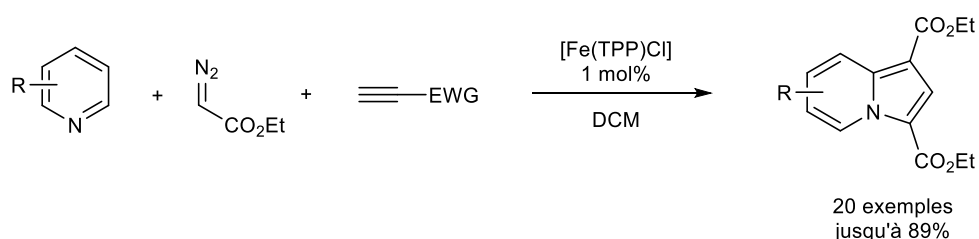


Schéma 6 : Synthèse d'indolizine catalysée par le fer(III) à partir de pyridines, de composés diazo et d'alcynes

Une autre voie de synthèse impliquant le Fe(III) a été proposée par le groupe de Jia *et al.* en 2018.⁷ Il s'agit d'une cyclisation oxydative entre la pyridine et un allénoate α -substitué en présence d'oxygène moléculaire, permettant un accès rapide aux dérivés d'indolizine triplement fonctionnalisés en position 1, 2 et 3 (Schéma 7). Les rendements associés sont modérés à élevés (41-87%), mais plus remarquable encore est le fait que cette méthodologie soit le premier exemple d'incorporation d'O₂ dans une réaction d'annélation impliquant les allénoates. Fait intéressant, lorsque R₁ = H, l'indolizine résultante porte un aldéhyde en position 1.

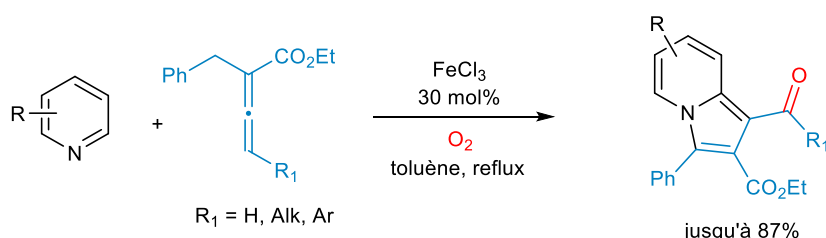


Schéma 7 : Synthèse d'indolizines 1,2,3-trisubstituées selon une réaction de cyclisation oxydative entre la pyridine et un allénoate α -substitué en présence d'oxygène moléculaire

Un mécanisme réactionnel plausible a été proposé sur la base d'expériences de marquage isotopique (Schéma 8) : après addition 1,4 de la pyridine sur l'allénoate, un transfert de protons

favorisé par l'eau se produit pour fournir l'intermédiaire **B** à partir duquel l'intermédiaire **C** est formé par protonation. La coordination du chlorure de fer avec l'intermédiaire **C** augmente la réactivité de l'alcène, facilitant ainsi le processus de type S_N2 suivant. Après déprotonation et cyclisation de l'intermédiaire **F**, la dihydroindolizine résultante est aromatisée. Une insertion d'oxygène moléculaire en position 1 de l'indolizine intermédiaire **H** mène au produit final.

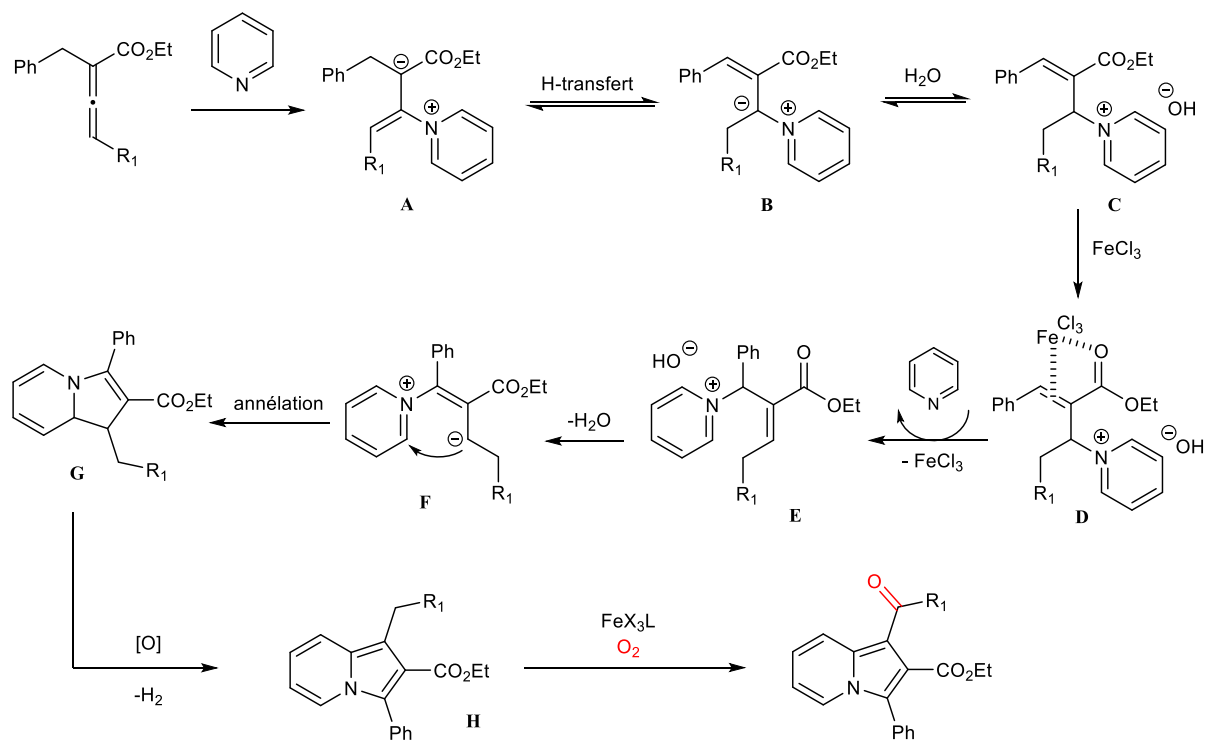


Schéma 8 : Mécanisme proposé pour la réaction de cyclisation oxydative entre la pyridine et l'α-allénoate catalysée par le Fe(III)

L'introduction d'un groupement cyano en position 1 d'indolizines 1,2,3-trisubstituées est également possible en partant de pyridine. Wang et ses collaborateurs partagent en 2014 un protocole efficace impliquant l'hétérocycle à 6 chaînons et des esters 1-cyanocyclopropanes en présence d'iode⁸ : les 1-cyanoindolizines résultantes, obtenues avec de bons rendements (63-85%), sont le produit d'une cycloaddition formelle de type [3+2] (Schéma 9). En effet, l'ouverture de cyclopropanes contraints donne naissance à des intermédiaires 1,3-dipolaires capables de réagir avec la pyridine qui joue le rôle de dipolarophile.

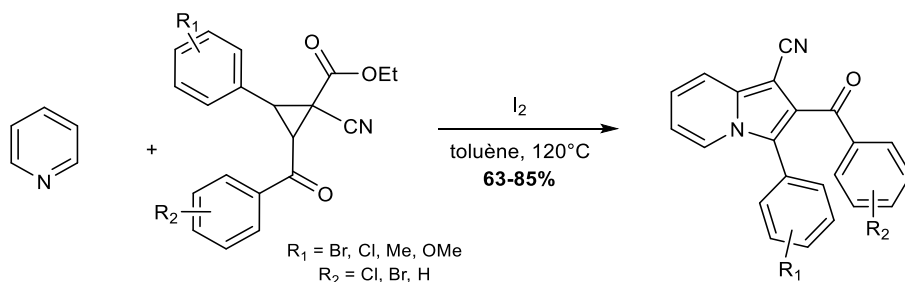


Schéma 9 : Synthèse de dérivés 1-cyanoindolizines à partir de pyridine et d'ester 1-cyanocyclopropane

Le mécanisme potentiel est détaillé dans le Schéma 10 : l'iode favoriserait la formation de l'anion énoate **A**, suivie d'une ouverture du cyclopropane générant l'intermédiaire **B**. Sa forme mésomère **B'** agirait ensuite en tant que dipôle 1,3 pour donner l'intermédiaire **C** après cycloaddition avec la pyridine. Une élimination du formiate d'éthyle conduirait à la dihydroindolizine **D**. Enfin, son aromatisation en présence d'iode et d'air permettrait l'obtention de la 1-cyanoindolizidine correspondante.

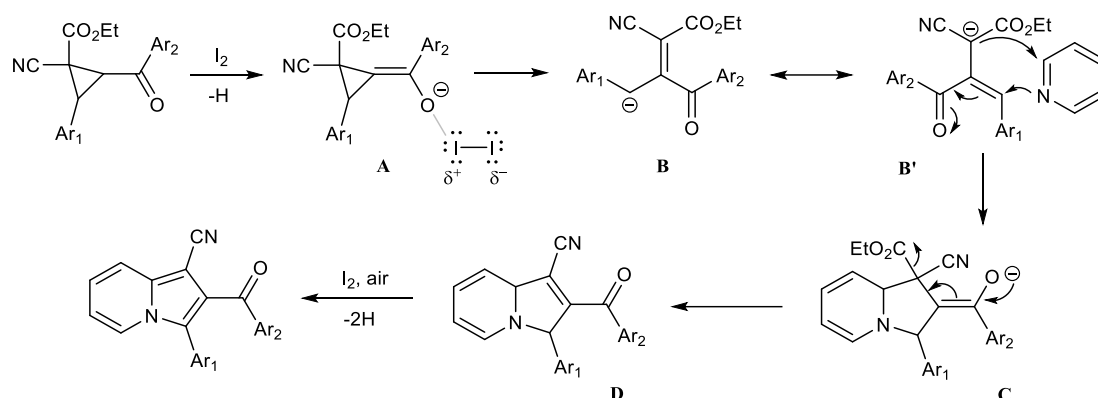


Schéma 10 : Mécanisme proposé de la cycloaddition [3 + 2] conduisant à la formation de 1-cyanoindolizines

Avant de conclure cette section, il serait pertinent de mentionner le procédé original développé par Liu *et al.* la même année.⁹ Le groupe décrit une réaction médiée par le chlorure de cuivre entre la pyridine, le DMAD (éthynedicarboxylate de diméthyle) et la naphtoquinone en présence de dioxygène. Cette synthèse se distingue non seulement par l'obtention d'un produit tétracyclique, mais surtout par le fait qu'il s'agit du premier exemple de clivage catalysé par le cuivre (II) de la liaison $C\equiv C$ d'un alcyne interne. Comme le montre le Schéma 11, le mélange réactionnel n'a pas généré le produit de cycloaddition [4 + 2] attendu. En effet, un dérivé de quinolizine **2** avait été anticipé par addition nucléophile du zwitterion **A** au sel de pyridinium **B**. À sa place, la benzo[f]pyrido[1,2-a]indole-6,11-dione **3** a été isolée avec un excellent rendement de 93%. Ce résultat étonnant indique que la triple liaison du DMAD a été efficacement clivée dans ces conditions.

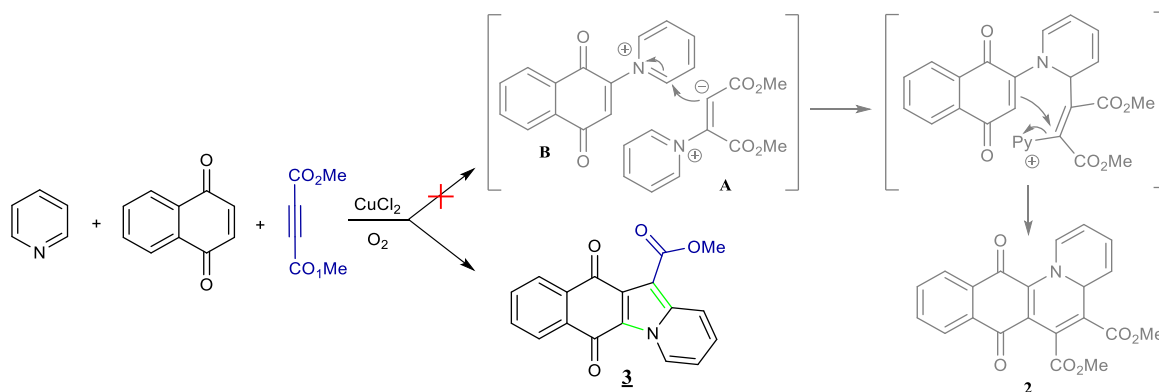


Schéma 11 : Synthèse d'indolizines tétracycliques annelées par clivage de liaison $C\equiv C$ catalysé par le cuivre (II)

Afin de mieux comprendre la réaction, cette dernière a été réalisée avec une quantité non-stœchiométrique de DMAD (0,6 eq). Le rendement du composé **3** n'en a pas souffert et reste élevé (86%). Ce résultat a montré qu'après clivage, les deux fragments de l'alcyne participent à la formation de l'indolizine, et a permis d'élucider le mécanisme décrit dans le Schéma 12. La formation du tétracycle se déroule selon deux chemins réactionnels. Dans le premier (voie a), l'addition nucléophile de la pyridine au DMAD conduit au zwitterion **I** qui réagit ensuite avec l'intermédiaire **II** pour former l'intermédiaire **III**. Une cyclisation 5-exo-trig suivie d'un transfert de proton permet d'obtenir l'intermédiaire **IV** puis l'indolizine **3** après β -élimination d'un sel de pyridinium. Ce dernier subit une déprotonation générant l'ylure de pyridinium **V** qui réagit dans la voie b avec l'intermédiaire **II**. Ce deuxième chemin se solde également par la formation du composé **3** désiré après élimination d'une pyridine et aromatisation de l'intermédiaire **VII**.

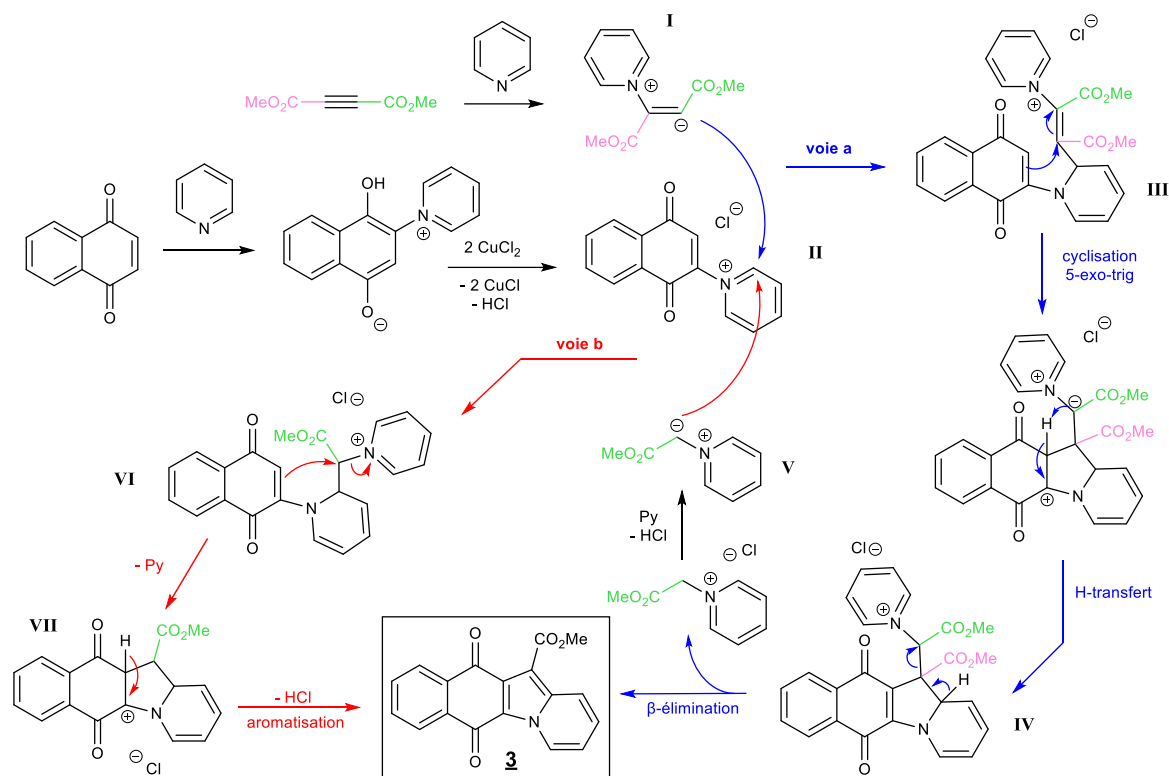


Schéma 12 : Mécanisme proposé de la synthèse d'indolizine par clivage de $\text{C}\equiv\text{C}$ interne catalysé par le Cu(II)

Les stratégies de synthèse d'indolizine à partir de pyridines présentent l'avantage de ne pas requérir une transformation en amont de l'hétérocycle à 6 chaînons, faisant d'elles des méthodologies relativement simples et rapides qui s'inscrivent dans le concept d'économie d'atomes. Cependant, elles restent peu nombreuses. La vaste majorité des protocoles nécessite une pyridine substituée en position α comme réactif de départ.

B. Voies de synthèse basées sur les pyridines α -substituées

1. La 2-picoline, un réactif historique

Les approches plus traditionnelles emploient des pyridines alkylées en position α , y compris la voie de synthèse originelle décrite en 1912.¹⁰ Scholtz découvre que le simple traitement de la 2-picoline par l'anhydride acétique à très haute température donne naissance à un composé cristallin, alors surnommé « picolide », à partir duquel l'indolizine est isolée après hydrolyse (Schéma 13). La structure **4** attribuée par Scholtz à l'intermédiaire cristallin reste controversée jusqu'à la publication des travaux de Tschitschibabin et Stepanow en 1929.¹¹ Non convaincus par l'attribution fournie par leur prédécesseur, ces derniers réexaminent la réaction de condensation et élucident son mécanisme ainsi que la structure de la picolide qui s'avère être en réalité la 1,3-diacétylindolizine.

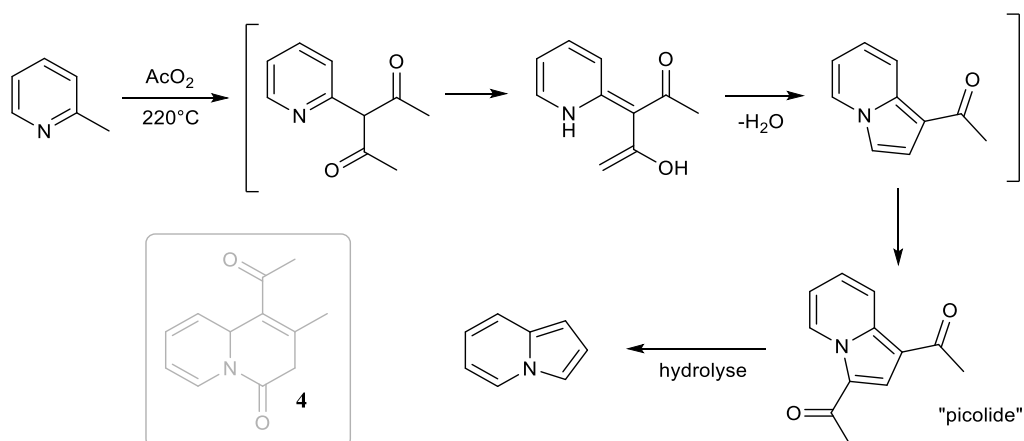


Schéma 13 : Réaction de Scholtz

Inspiré par cette synthèse, Tschitschibabin développe sa propre méthodologie¹² pour la préparation d'indolizines substituées en position 2 dans laquelle la picoline est condensée avec un composé α -halogénocarbonyl (Schéma 14). En ce qui concerne le mécanisme, le noyau pyridine est d'abord quaternisé suivi par une cyclisation intermoléculaire du sel de pyridinium intermédiaire donnant lieu à des indolizines mono-, di- ou trisubstituées sur le motif pyrrole. Cette réaction tolère une large gamme de substituants et de solvants (alcools, acétone, acétonitrile, eau, toluène, sans solvant), se déroule en condition douce (entre t.a et 80°C selon les substrats) en présence ou absence de base (NaHCO_3 , K_2CO_3 , NEt_3) et est généralement associée à d'excellents rendements.¹¹ Partant de réactifs commercialement disponibles et peu onéreux, cette stratégie est encore largement utilisée aujourd'hui, et éclipse même les approches contemporaines en termes de simplicité et d'efficacité.

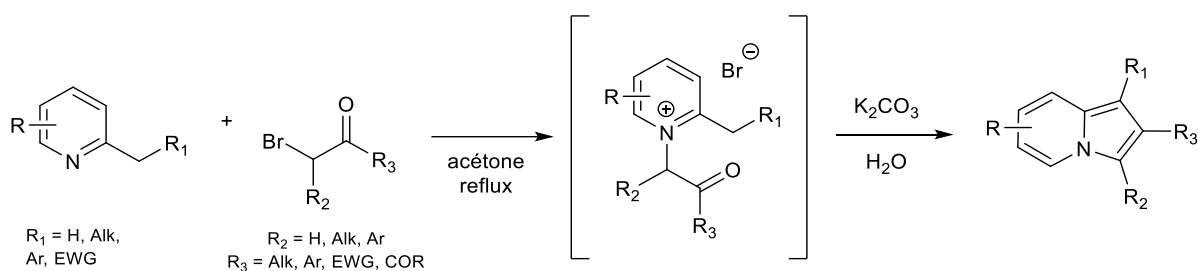
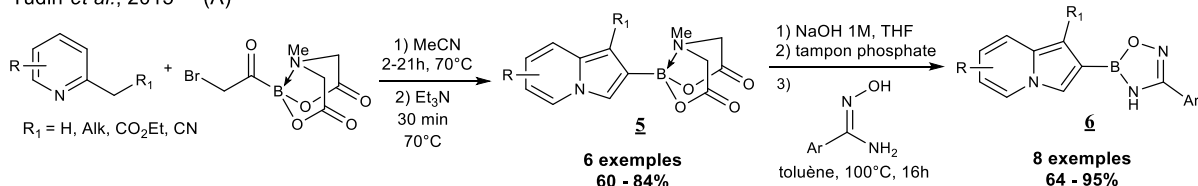


Schéma 14 : La réaction de Tschitschibabin pour la synthèse d'indolizines

En guise d'exemples d'application récente, le Schéma 15 présente deux exploitations de la réaction de Tschitschibabin pour l'obtention d'hétérocycles complexes et/ou chiraux. En 2015, l'équipe de Yundin a développé une synthèse de 2-indolizylboronates¹³ à partir de dérivés de picoline et de bromométhylacylboronates protégés par un groupement acide *N*-méthyliminodiacétique (Schéma 15-A). Les indolizines **5**, obtenues avec des rendements très satisfaisants, ont ensuite été condensées avec des hydroxyamidines pour générer les molécules **6** bis(hétéroaryle) contenant du bore. L'intermédiaire **5** a également été utilisé avec succès pour une réaction de couplage croisé de Suzuki avec le 4-bromobenzonitrile (jusqu'à 73% de rendement). Li et ses collaborateurs ont quant à eux décrit en 2020 la première synthèse hautement régio- et énantiosélective des 3-allylindolizines¹⁴ par alkylation asymétrique séquentielle couplée à une réaction de Tschitschibabin « interrompue » (Schéma 15-B). En effet, une déprotonation et alkylation du pyridinium au niveau du carbone α de la cétone **7** avant cyclisation du sel quaternaire permet d'introduire une fonction supplémentaire en position 3 de l'indolizine résultante. Un catalyseur à base de rhodium a permis l'alkylation allylique de l'intermédiaire Tschitschibabin **7** avec un remarquable excès énantiomérique (99%), et s'est donc avéré être un outil efficace pour la synthèse asymétrique d'indolizines **9** 2,3-disubstituées portées par un carbone chiral.

Yudin *et al.*, 2015 (A)



Réaction de Tschitschibabin interrompue

Li *et al.*, 2020 (B)

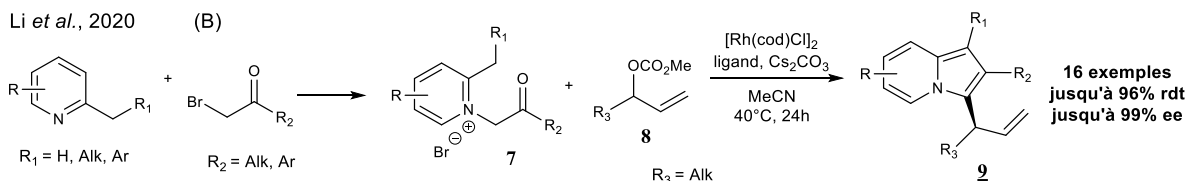


Schéma 15 : Récentes synthèses de (A) 2-indolizylboronates et (B) 3-allylindolizines énantiomériques impliquant une réaction de Tschitschibabin

2. Les réactions de cycloisomérisation intramoléculaires

En 2001, le groupe de Gevorgyan partage une nouvelle approche catalysée par le cuivre (I) pour la préparation d'indolizines 3-substituées à partir de pyridine 2-acétylénique.¹⁵ En présence de CuCl, l'hexynyl-2-pyridine est transformée de manière efficace en 3-propylindolizine (Schéma 16). Il a été postulé que la réaction se déroule *via* une isomérisation du propargyle en allène suivie par sa cyclisation après coordination du cuivre. Ce mécanisme suppose la migration de deux atomes d'hydrogène et se limite donc à la préparation d'indolizines non substituées en position 1 et 2.

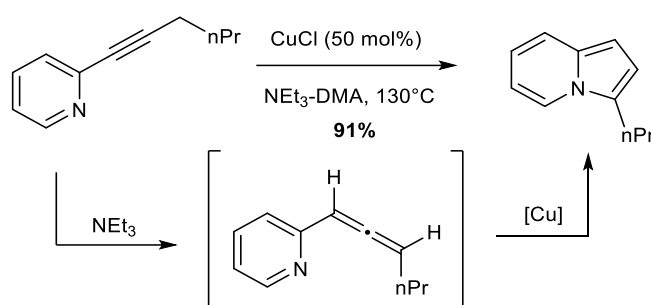


Schéma 16 : Cycloisomérisation assistée par le Cu(I) de pyridine 2-acétylénique générant une 3-alkylpyridine

Malgré sa portée limitée et le fait qu'elle nécessite beaucoup de catalyseur, ce premier exemple de cycloisomérisation d'alcynepyridines marque le début d'un nouveau chapitre pour la synthèse d'indolizines. Cinq ans plus tard, Gevorgyan et ses collaborateurs publient une approche alternative vers l'hétérocycle substitué en position 1 et 2. Inspirés par la capacité de divers groupements à subir une migration 1,2 lors d'isomérisation alcyne-vinylidène^{16,17}, ils décrivent la synthèse d'indolizines 1,2-disubstituées à l'aide de dérivés esters de 2-propargylpyridines¹⁸ (Schéma 17). Cette méthode, catalysée par l'or, permet l'introduction à haut rendement de groupes 2-silyle et 2-stannyle. Les travaux décrivent également la migration 1,2 d'un groupement germyle jusqu'alors inexplorée. C'est une découverte particulièrement intéressante car les composés à base de silyle et de stannyle résultants peuvent être utilisés dans les couplages croisés Hiyama ou Stille respectivement, permettant la synthèse ultérieure d'indolizines hautement fonctionnalisées en C-2.

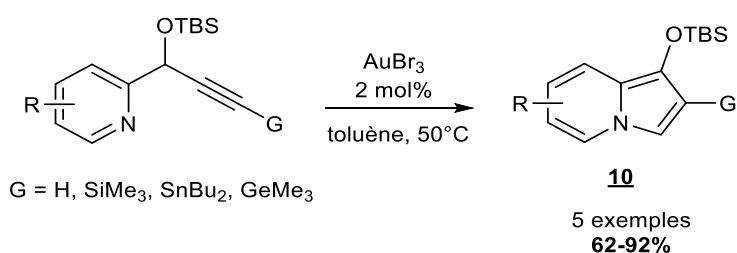


Schéma 17 : Synthèse d'indolizines 1,2-disubstituées à partir de 2-propargylpyridine catalysée par l'or impliquant une migration 1,2 du groupement G

Le mécanisme de la cycloisomérisation initialement proposé est représenté dans le Schéma 18: dans un premier temps, l'isomérisation de l'alcyne conduirait à la formation du vinylidène métallique **I** suivie de sa cyclisation en zwitterion **II**. Ce dernier serait par la suite soit engagé dans une série de déplacement d'hydruure 1,2 (voie A), soit subirait une déprotonation-protonation par le noyau pyridine (voie B) pour fournir l'indolizine **10**. Malgré la formation documentée de vinylidènes métalliques à partir d'alcyne en présence d'or¹⁹⁻²², des expériences DFT réalisées en 2010²³ soutiennent plutôt la génération d'un intermédiaire carbène **III**, vraisemblablement obtenu après une séquence de cyclisation/transfert de protons (voie C).

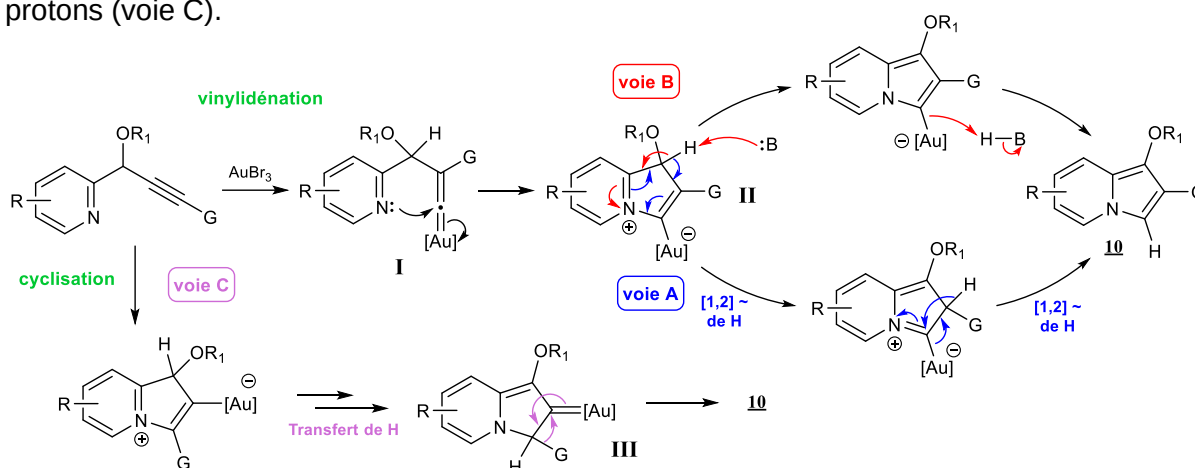


Schéma 18 : Mécanismes proposés pour la cycloisomérisation de la 2-propargylpyridine catalysée par Au(III)

En 2007, la même équipe présente une stratégie complémentaire permettant l'obtention d'indolizines avec un motif de substitution différent.²⁴ Elle montre que l'utilisation de métaux π -philes tels que l'argent conduit à la formation d'indolizines 1,3-disubstituées avec des rendements quasi-quantitatifs et à température ambiante (Schéma 19).

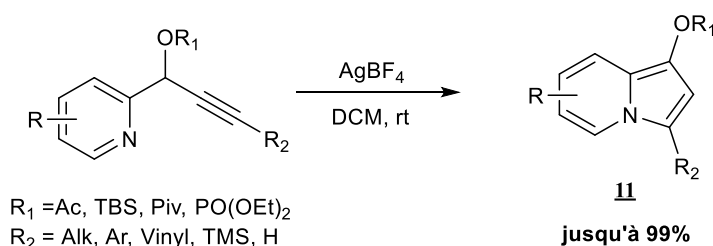


Schéma 19 : cycloisomérisation de la 2-propargylpyridine en indolizines 1,3-disubstituée catalysée par l'argent

En ce qui concerne le mécanisme réactionnel (Schéma 20), un métal possédant une affinité particulière pour les liaisons π se coordonne au fragment propargylique et augmente le caractère électrophile de la triple liaison, provoquant ainsi la formation de l'intermédiaire **II** via une attaque nucléophile intramoléculaire de l'azote. Des expériences de marquage au deutérium ont révélé que l'hétérocycle ne se réaromatise pas grâce à des déplacements 1,2-

hydrure mais progresse selon une série de déprotonation-protonation pour former l'indolizine **11**.

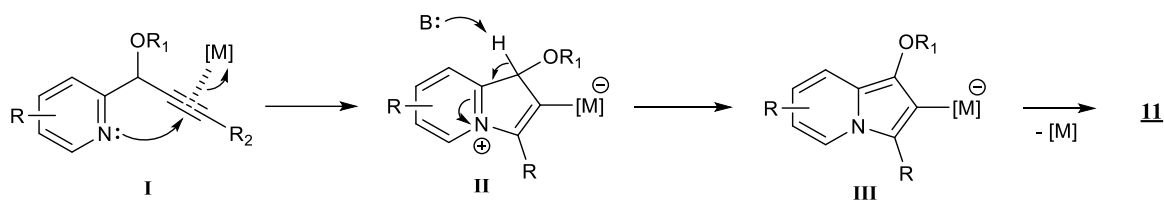


Schéma 20 : mécanisme réactionnelle de la cycloisomérisation catalysée par un métal π -phile

Il a ensuite été démontré que cette transformation est également compatible avec le Cu(I)²⁵ et le Pt(II)²⁶. Par ailleurs, le même profil de substitution porté par l'indolizine **11** est accessible à partir de pyridine 2-acétylénique portant un groupement phosphotriester (Schéma 21).²⁷ Cette réaction catalysée par le cuivre implique une isomérisation propargyl-allényle se déroulant *via* un déplacement sigmatropique [3,3] du groupement phosphorylé.

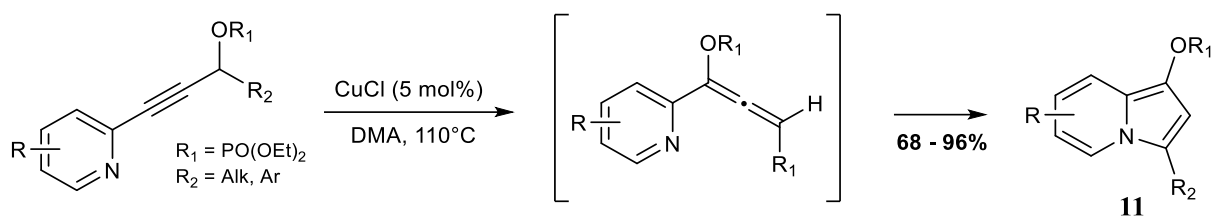


Schéma 21 : Cycloisomérisation de 2-phosphatyoxy-alcynylpyridines en indolizines 1,3-disubstituées catalysée par le cuivre

Le champ d'application de ces cycloisomérisations a été étendu pour inclure la synthèse d'hétérocycles 1,2,3-trisubstitués. En 2020, Gevorgyan *et al.* déclinent leur approche en réaction à deux composants²⁸ : en présence d'halogénure d'aryle et de catalyseur au palladium, les propargylpyridines sont converties en 2-arylindolizines (Schéma 22).

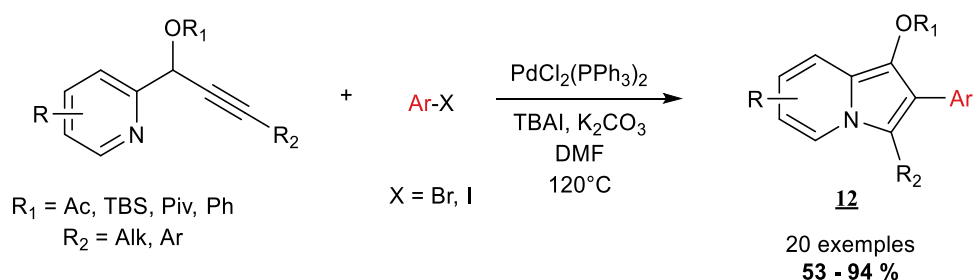


Schéma 22 : Synthèse de 2-arylindolizines par réaction cascade d'arylation/cyclisation de 2-propargylpyridine catalysée par le Pd(II)

Les rendements de cette arylation en cascade sont bons à excellents (jusqu'à 93%). En ce qui concerne le mécanisme (Schéma 23), la réaction débute par une coordination de la triple liaison à l'intermédiaire ArPdX , obtenu après addition oxydante du catalyseur sur l'arylhalogène, déclenchant ainsi une cyclisation 5-endodig qui génère le zwitterion **I**. Une fois déprotoné, l'intermédiaire **II** subit une élimination réductrice pour fournir le produit **12**.

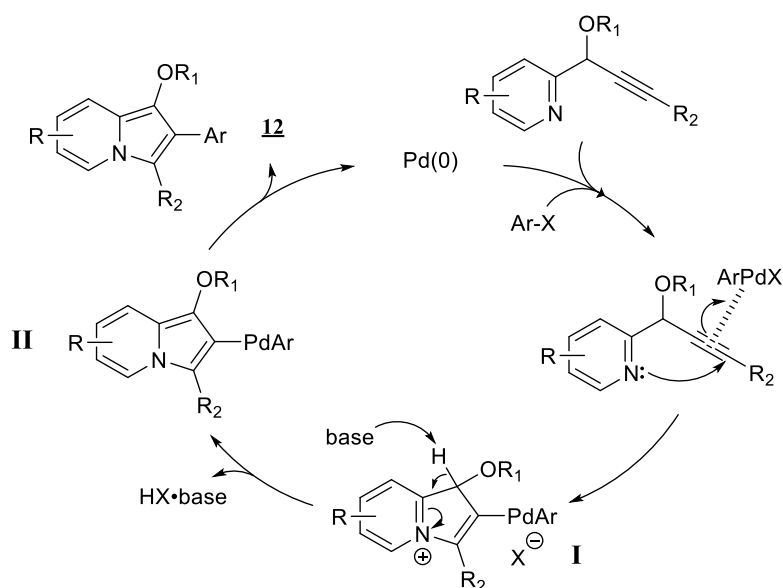


Schéma 23 : Mécanisme proposé de l'arylation/cycloisomérisation en cascade

Une autre façon d'obtenir des indolizines substituées sur le carbone 2 est décrite par Kim et ses collègues en 2007.²⁹ Très efficace avec des rendements souvent quantitatifs, cette méthodologie présente l'avantage conséquent de ne pas requérir de métaux de transition onéreux. En effet, la cyclisation 5-endo-dig est cette fois-ci médiée par l'iode, donnant lieu à des 2-iodoindolizines qui peuvent être fonctionnalisées ultérieurement par couplage croisé ou transformées en hétérocycle 1,3-disubstitué par réactions radicalaires (Schéma 24).

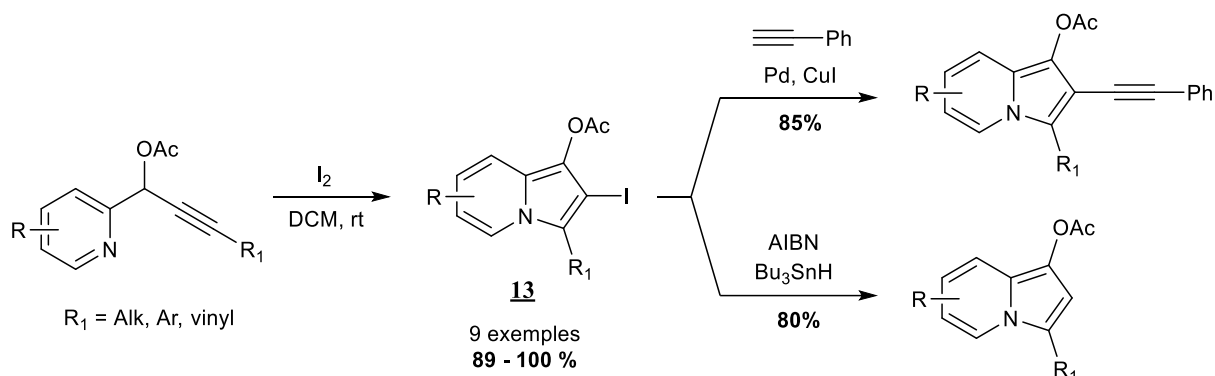


Schéma 24 : Synthèse de dérivés d'indolizine di- ou trisubstitués à partir de 2-propargylpyridine par cyclisation 5-endo-dig médiée par l'iode

En général, cette classe de réaction était exclusivement effectuée dans des solvants organiques tels que le dichlorométhane ou le benzène, nuisibles pour l'environnement, jusqu'à ce que Sarpong et Narayan prouvent que la cycloisomérisation peut se dérouler de manière plus verte dans l'eau sans baisser les taux de conversion.³⁰ Plus intéressant encore, la catalyse métallique n'est pas nécessaire en milieu aqueux. Cela augmente l'attrait de ces méthodologies pour l'industrie pharmaceutique très intéressée par les indolizines, petits hétérocycles possédant des activités biologiques très variées.

Notons que les réactions de cycloisomérisation ne se limitent pas aux dérivés propargyles comme substrats : l'iodocyclisation est également possible à partir d'esters allyliques de pyridine (Schéma 25).³¹ Lorsqu'une 2-allylpyridine est traitée par l'iode, une dihydroindolizine isolable est formée dans un premier temps. L'aromatisation et la déshydroiodation de cet intermédiaire sont ensuite favorisées en condition basique pour générer un produit non substitué en position 2 avec de bons rendements (45-89%).

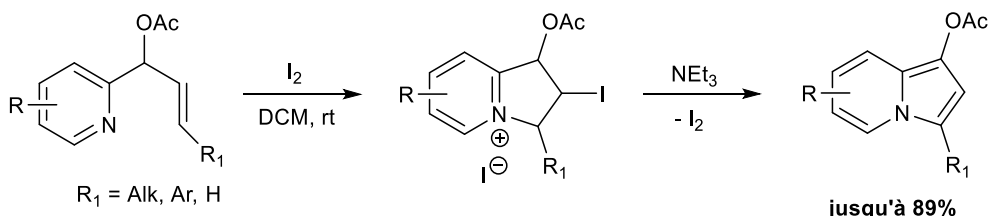


Schéma 25 : Synthèse one-pot d'indolizine disubstituées à partir d'acétate allylique de pyridine favorisée par l'iode

Les cycloisomérisations mentionnées ci-dessus sont incontestablement efficaces, mais elles nécessitent toutes l'introduction en amont de fonctions alcynyles (ou alcényles) sur l'hétérocycle à 6 chaînons. Bien que simple, la synthèse des dérivés d'alcool propargylique de pyridine requiert au moins deux étapes préliminaires (Schéma 26). Afin d'améliorer l'économie d'atomes, tout en limitant la quantité de déchets, le coût et le nombre d'étapes globales, les préparations directes d'indolizines à partir de dérivés de pyridine disponibles commercialement ont suscité un intérêt croissant.

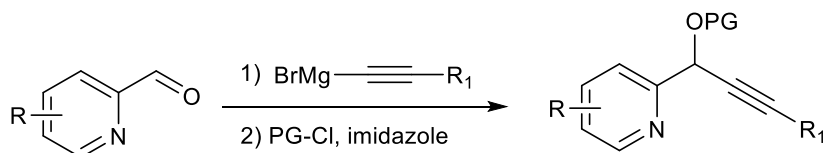


Schéma 26 : Synthèse de 2-propargylpyridine pour les réactions de cycloisomérisation

3. Les réactions tandem couplage croisé/cycloisomérisation

Les réactions one-pot tandem de couplage croisé/cycloisomérisation représentent une solution intéressante pour ce souci d'économie, mais il n'existe que quelques exemples d'applications réussies.

a) À partir de 2-halo- ou 2-triflylpyridines

Peu coûteuses, les 2-halopyridines et leurs équivalents triflates sont des matières premières de choix. En 2007, Liu *et al.* publient leurs travaux portant sur la synthèse efficace de 3-amino- et 3-amidoindolizines³² obtenues en une étape à partir de 2-bromopyridine (Schéma 27). Cette méthodologie implique une réaction tandem en présence de palladium et de cuivre qui catalysent simultanément le couplage C—C et la cycloisomérisation dans un seul ballon,

réduisant ainsi la quantité totale de réactifs requis. La réaction progresse *via* une *N*-(2-alcynyl)amine **I** générée *in situ* par couplage de Sonogashira suivie par une réutilisation du Cu(I) pour la cyclisation de l'intermédiaire en composé souhaité **14**.

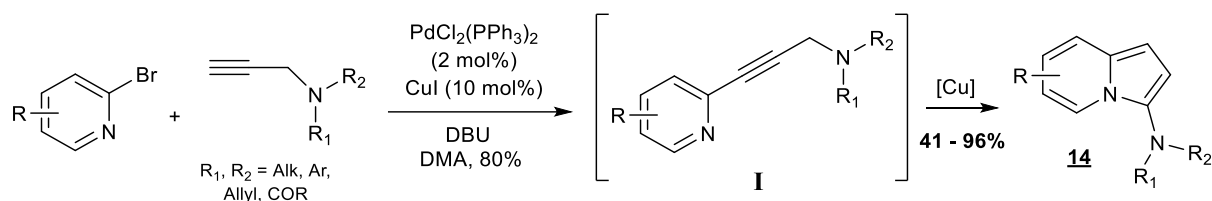
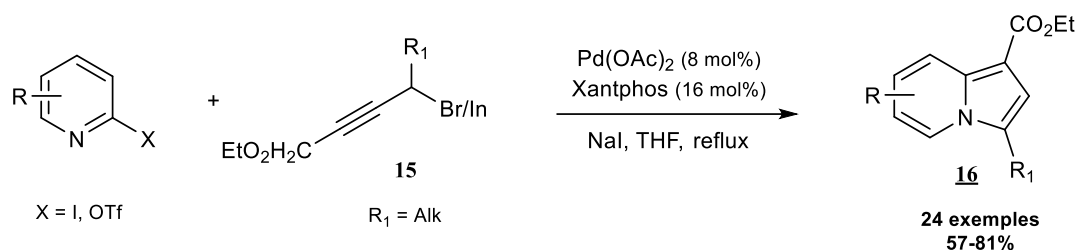


Schéma 27 : Synthèse de 3-aminoindolizine par réaction tandem couplage croisé/cycloisomérisation

Trois ans plus tard, Kim et ses collaborateurs rapportent la préparation d'indolizines 1,3-disubstituées à partir de 2-iodo- ou 2-triflylpyridine.³³ La cascade tandem, également catalysée par le palladium, implique la génération *in situ* de l'organoindium **15** dérivé de 4-bromo-alcynoate d'éthyle et d'indium (Schéma 28). Cette approche monotope fournit le produit **16** avec des rendements modérés à bons (jusqu'à 81%). Le mécanisme réactionnel plausible se déroulerait comme suit : le complexe pyridyl-Pd(II) **I** subit d'abord une transmétallation avec l'organoindium **15**, générant après élimination réductrice l'intermédiaire allényle **III**. Sa coordination au métal favorise une cyclisation en mode 5-endo pour donner le vinylpalladium **V**. L'indolizine **16** est ensuite formée par transfert de proton.



Mécanisme proposé:

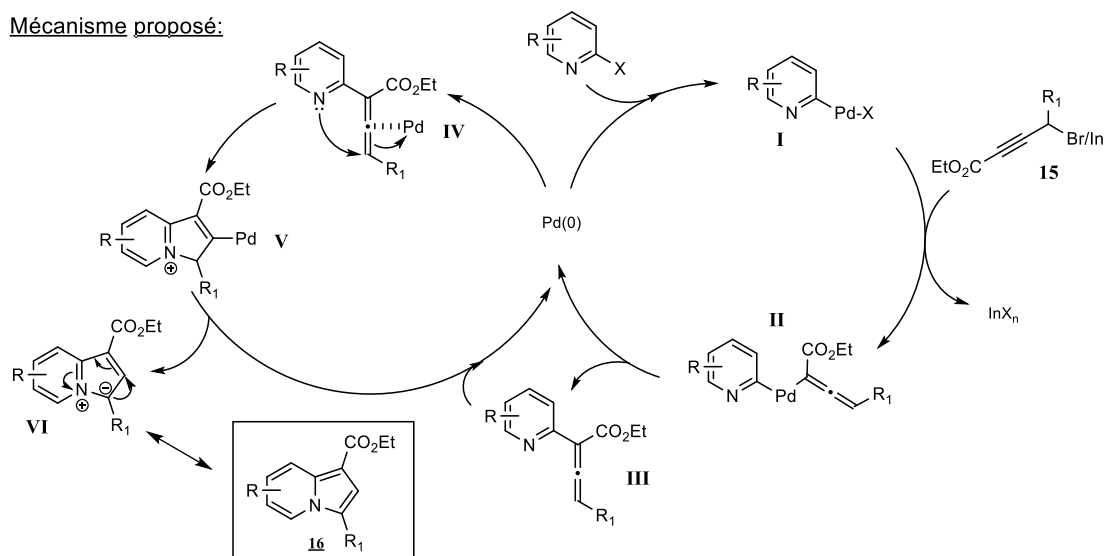


Schéma 28 : Synthèse d'indolizines 1,3-disubstituées par couplage croisé/cycloisomérisation tandem

b) À partir de pyridine 2-carboxaldéhyde

Suite au développement de la synthèse de 3-aminoindolizines présentée plus haut, Yan et Liu conçoivent une seconde méthode tandem à trois composants à partir de pyridine 2-carboxaldéhydes, d'amines secondaires et d'alcynes terminaux.³⁴ Catalysée par l'or (III), cette réaction de couplage/cycloisomérisation se fait aussi bien dans l'eau que sans solvant, et génère cette fois-ci des indolizines disubstituées portant un groupement amine en position 1 (Schéma 29), avec une grande efficacité et une économie d'atomes remarquable. Écologique et bon marché, cette approche tolère une large gamme de substituants, à l'exception d'amines primaires qui conduisent à un mélange réactionnel trop complexe. En particulier, le couplage de dérivés d'acides aminés énantiomériquement purs a produit les hétérocycles correspondants sans racémisation, une découverte à fort intérêt pharmacologique. Les indolizines chirales résultantes pourraient par exemple être utilisées comme réactifs pour la synthèse de peptides. D'un point de vue mécanistique, cette réaction implique la formation d'une 2-propargylpyridine intermédiaire **I** selon une réaction de Mannich-Grignard à trois composants catalysée par l'or.³⁵ Les étapes suivantes sont similaires à la cycloisomérisation des pyridines propargyliques catalysée par l'argent décrite précédemment (Schéma 20).

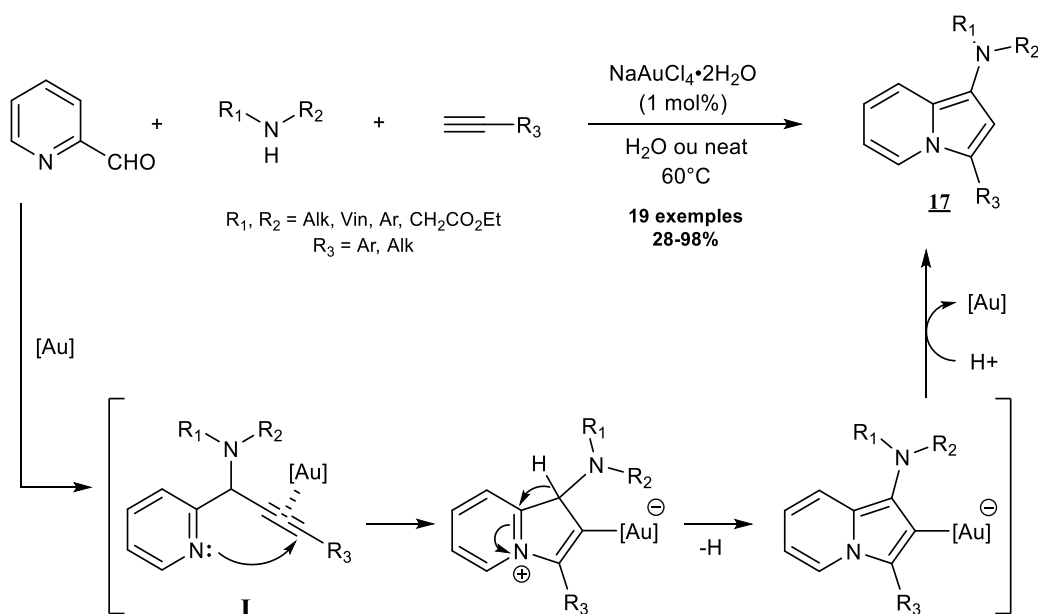


Schéma 29 : Synthèse 3-RMC (Réaction MultiComposants) de 1-aminoindolizines à partir d'aldéhydes, d'amines et d'alcynes catalysée par l'or

Des travaux ultérieurs ont ensuite montré que le catalyseur métallique à base d'or onéreux peut être remplacé par des sels plus rentables tels que l' AgBF_4 ,³⁶ le $\text{Fe}(\text{acac})_3$,³⁷ le CuI ³⁸ ou encore même par des nanoparticules de cuivre.³⁹ De plus, la durée de la réaction peut être considérablement réduite en effectuant la synthèse sous chauffage par micro-ondes (réaction terminée en 45 minutes au lieu de 12 heures sous catalyse au Cu(I)).³⁸

4. Réaction de cyclisation à partir de 2-pyridylacétate

Les dérivés de pyridylacétate constituent une autre classe de substrats commercialement disponibles et peu chers pour la synthèse d'indolizines en une seule étape. Les exemples d'annélation de ces composés avec des fragments alcynes ou alcènes sont nombreux, donnant lieu à des méthodologies simples et efficaces pour la construction d'hétérocycles avec différents types de substituants.

a) *Annélation de 2-pyridylacétate et d'alcynes*

En 2014, les équipes d'Agrawal et de Pan décrivent indépendamment une nouvelle synthèse d'indolizines 1,3-di- ou 1,2,3-trisubstituées médiée par l'argent, selon une annélation de 2-pyridylacétate et d'alcynes terminaux⁴⁰ ou internes⁴¹ respectivement (Schéma 30). Dans le cas de triples liaisons asymétriques, cette transformation est régiosélective avec l'introduction du groupement le plus encombrant en position 3. Lorsque $R_2 = R_3 = \text{alkyle}$, les rendements sont faibles à négligeables : les alcynes riches en électrons fournissent les composés souhaités avec des rendements bien plus élevés. Il est intéressant de noter que si l'éthynyltriméthylsilane est utilisé, une indolizine-1-carboxylate est générée avec un rendement modéré de 55% au lieu du produit 1,3-disubstitué attendu, ouvrant une voie alternative vers l'obtention d'esters monosubstitués d'indolizines. Malgré l'excès d' Ag_2CO_3 utilisé, le sel peut être recyclé facilement par un simple traitement à l'acide nitrique/carbonate de sodium, minimisant ainsi les coûts et déchets liés à cette transformation.

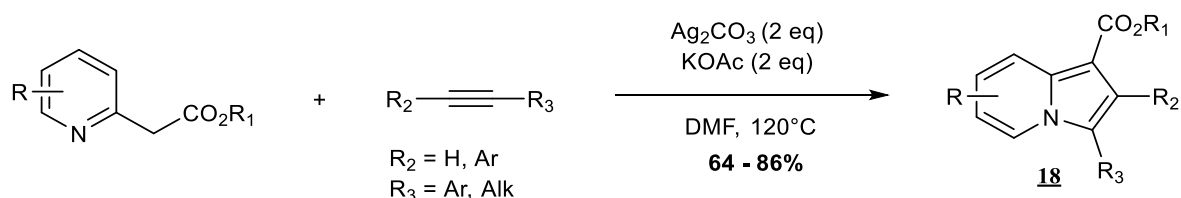
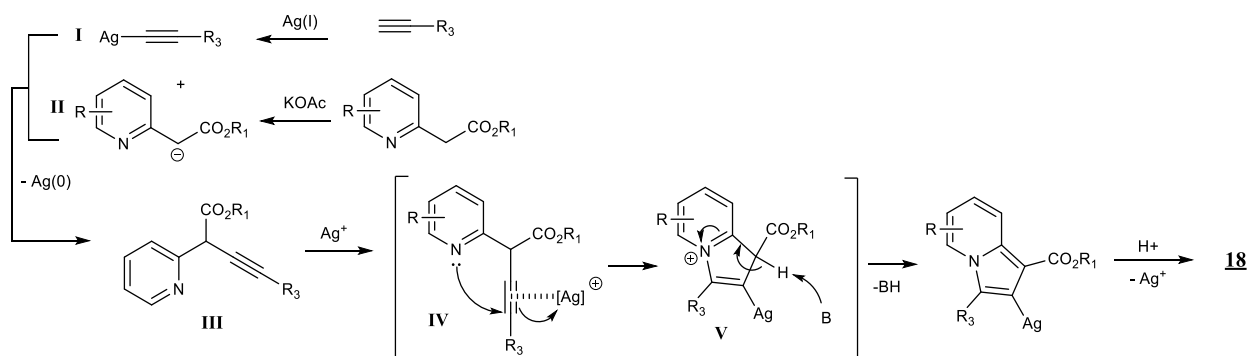


Schéma 30 : Synthèse d'indolizines di- ou trisubstituées à partir de 2-pyridylacétate et d'alcyne catalysée par l'argent

Des expériences de marquage au deutérium ont révélé deux voies possibles pour le mécanisme de la cyclisation, en fonction de l'utilisation ou non d'un alcyne terminal (Schéma 31). Si $R_2 = \text{H}$ (voie A), un acétylure d'argent **I** est formé, suivi par la déprotonation de la 2-pyridylacétate. L'attaque nucléophile de l'intermédiaire **II** sur le complexe **I** donne lieu à l'intermédiaire de couplage croisé oxydatif **III**. Enfin, la cycloisomérisation se poursuit via un processus 5-endo-dig après coordination de l'argent au propargyl. Si l'alcyne est interne (voie B), le procédé est radicalaire avec propagation par SET (Single Electron Transfer).

Voie A: alcyne terminal $R_2 = H$



Voie B: alcyne interne $R_2 = Ar, Alk$

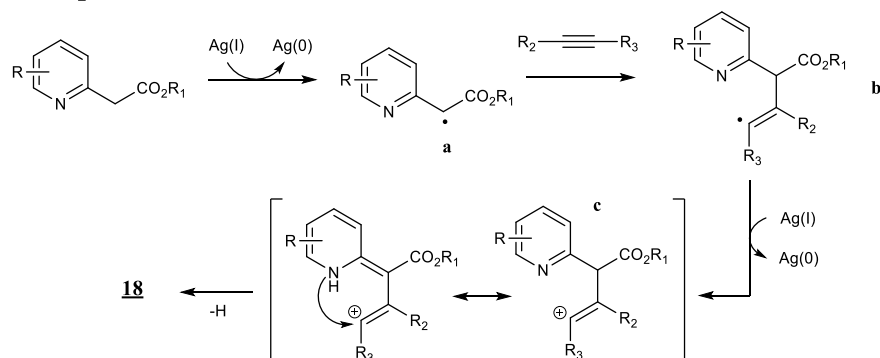


Schéma 31 : Mécanismes proposés de l'annélation de 2-pyridylacétate en indolizine

La même année, Pan *et al.* ont converti des alcools propargyliques et des 2-alkylpyridines en indolizines 1,2,3-trisubstituées grâce à une réaction catalysée par le samarium (III).⁴² Avec d'excellents rendements, cette méthodologie fonctionne en conditions douces et sans solvant sans se limiter aux dérivés de 2-pyridylacétate (Schéma 32). Il est intéressant de noter que la nature du substituant R_2 influence la régiospécificité de la transformation. Si l'alkyne est terminal ou protégé par un groupement TMS (triméthylsilyle), le substituant R_1 est retrouvée en position 3. S'il est lié à un groupement aryl, le régioisomère **19a** est généré.

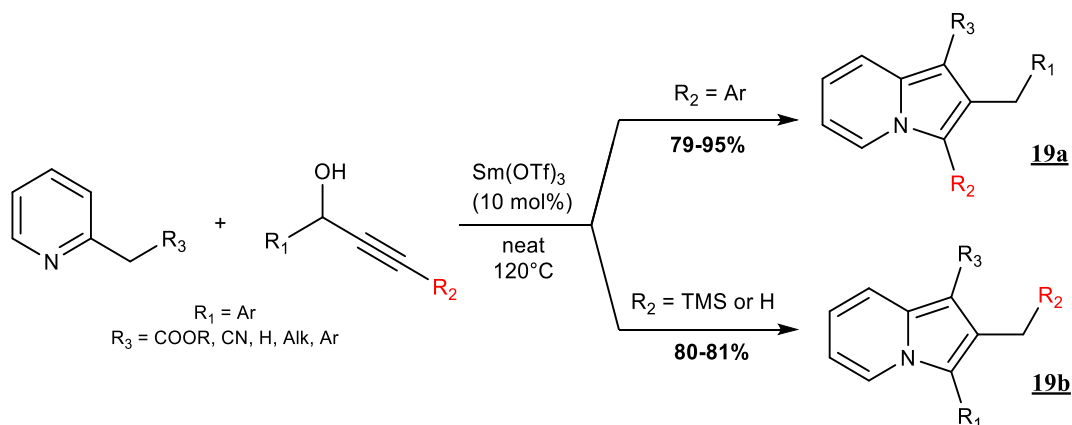


Schéma 32 : Formation d'indolizines 1,2,3-trisubstituées à partir d'alcools propargyliques et de dérivés de 2-alkylpyridine catalysée par le $\text{Sm}(\text{III})$

Ce phénomène a été expliqué à l'aide du mécanisme suggéré par Pan illustré dans le Schéma 33. La cyclométallation de l'alkylpyridine avec le samarium conduit à l'intermédiaire **I**, tandis que le cation propargylique **II** est formé après perte d'hydroxyde. La réaction se poursuit ensuite différemment en fonction du substituant. Si $R_2 = \text{Ar}$ (voie A), l'intermédiaire **II** est capable d'être isomérisé en cation allényle **III**. L'attaque nucléophile subséquente de **I** sur la position γ du cation, stabilisée par l'aryle, génère l'intermédiaire **IV** qui cyclise ensuite en indolizine **19a**. Par contre, si $R_2 = \text{H}$ ou TMS, la réaction se déroule selon la voie B. En effet, l'intermédiaire allényle serait trop instable ($R_2 = \text{H}$) ou une gêne stérique rendrait l'attaque nucléophile en position γ défavorable ($R_2 = \text{TMS}$). En conséquence, le cation propargylique **II** réagit directement avec l'intermédiaire **I** pour aboutir au régioisomère **19b**.

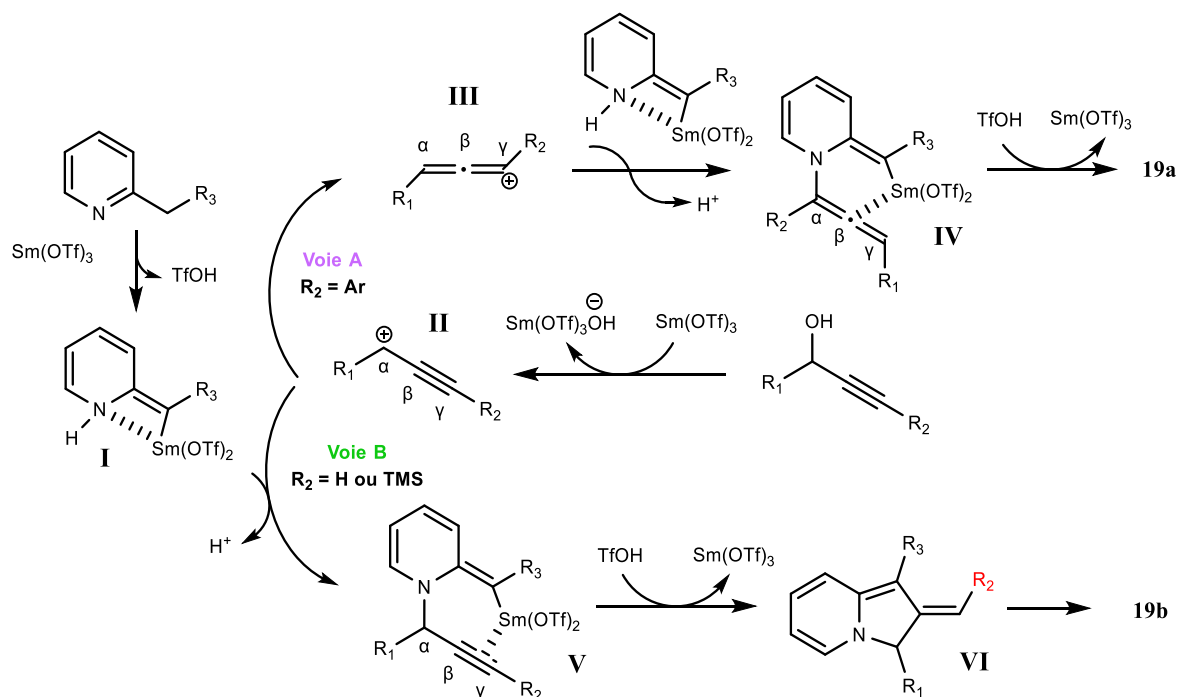


Schéma 33 : Mécanisme proposé pour la synthèse d'indolizine catalysée par le samarium

Une synthèse similaire, catalysée cette fois-ci par le palladium, a été décrite en 2017 par Yang et ses collègues qui utilisent des carbonates propargyliques pour produire l'indolizine trisubstituée **19a** (Schéma 34).⁴³ Cela dit, bien que bons, les rendements restent globalement plus faibles et la transformation moins régiospécifique que celle catalysée par le samarium avec la formation minoritaire du régioisomère **19b** même lorsque $R_2 = \text{Ar}$ (jusqu'à 15% de sous-produit obtenu). De plus, étant donné que les catalyseurs au palladium sont plus chers, cette méthode est moins rentable.

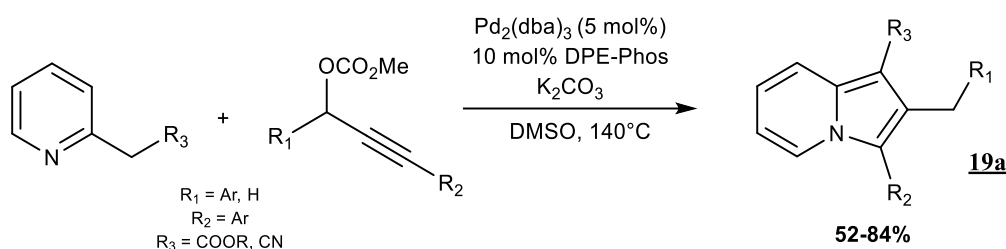


Schéma 34: Synthèse d'indolizines 1,2,3-trisubstituées à partir de carbonates propargyliques catalysée par le Pd

Des versions plus économiques et sans métaux de ces approches ont également été mises au point. Un couplage croisé oxydatif/cyclisation du 2-pyridylacétate avec des alcynes terminaux, médié par l'iode, a été publié par Lei et ses collaborateurs en 2015.⁴⁴ Le premier exemple signalé s'est produit en présence d'hydroperoxyde de cumène (2 eq) et fournit des indolizines 1,3-disubstituées. Un an plus tard, Reddy *et al.* ont montré que la cyclisation peut être réalisée de manière efficace sans oxydant supplémentaire ajouté au milieu réactionnel (Schéma 35).⁴⁵ Des expériences de contrôle ont prouvé qu'une fonction ester sur la pyridine est nécessaire pour que la cyclisation se produise. La réaction implique une voie radicalaire comme l'a démontré l'absence d'indolizine formée en présence de capteurs de radicaux, mais aucun mécanisme n'a été proposé à ce jour.

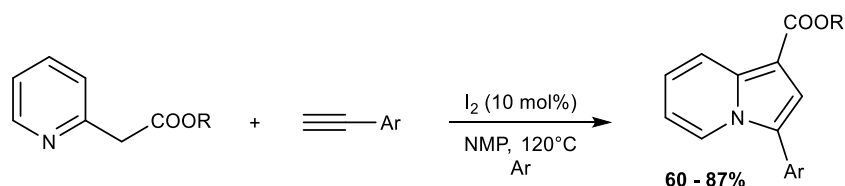


Schéma 35 : Cyclisation oxydative d'alcynes terminaux et de 2-pyridylacétate catalysée par I₂

Il est également possible d'obtenir des indolizines 1,3-disubstituées sans catalyseur en utilisant uniquement de l'oxygène moléculaire par annélation de 2-pyridylacétate avec des dérivés de but-2-ynal.⁴⁶ Cette stratégie développée en 2019 par Chen et ses collègues permet d'obtenir des indolizines 1,3-diacylées avec des rendements bons à excellents (Schéma 36). Notons que cette méthode permet l'introduction d'éthers ou de thioéthers en position 3 en ajoutant l'alcool ou le thiol correspondant au milieu réactionnel tout en travaillant sous argon et en conditions acides.⁴⁷

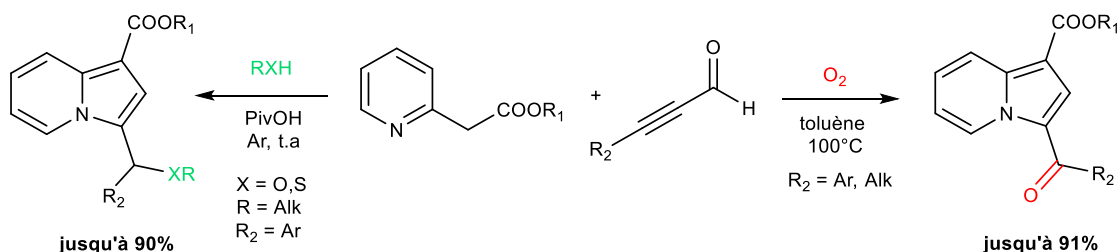


Schéma 36 : Synthèse d'indolizine 1,3-disubstituées à partir de 2-pyridylacétate et d'ynales

b) Annélation de 2-pyridylacétate et alcènes

La préparation d'indolizines à partir de dérivés de 2-pyridylacétate ne se limite pas aux réactions avec les alcynes. En 2013, des indolizines 1,2,3-trisubstituées ont été obtenues en traitant des 2-alkylpyridines avec des MHBA (ou acétates de Morita-Baylis-Hillman **20**)⁴⁸, substrats polyvalents contenant au moins quatre sites électrophiles potentiels.⁴⁹ En présence de triéthylamine, une séquence d'addition-élimination de Michael suivie d'un réarrangement conduit à la formation du composé **21** avec de bons à excellents rendements (Schéma 37).

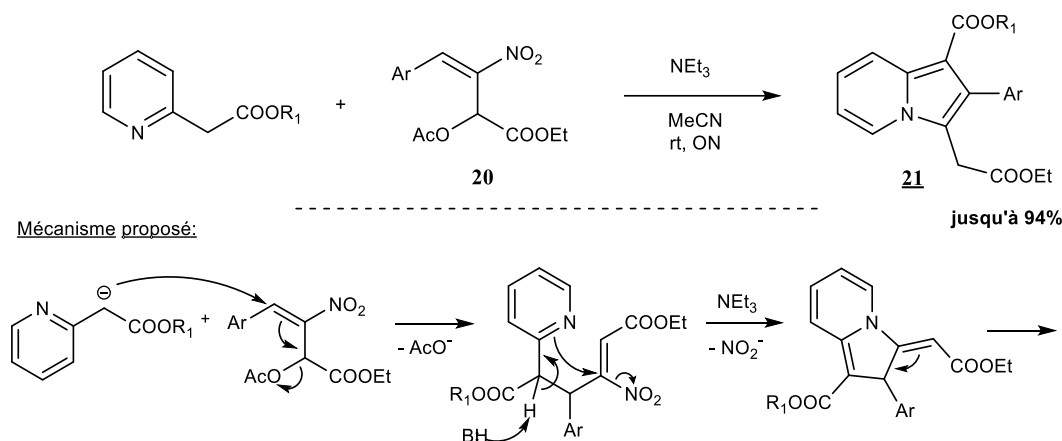


Schéma 37 : Synthèse d'indolizines 1,2,3-trisubstituées à partir de MHBA

À l'instar des méthodes impliquant des alcynes, une indolizine 1,3-disubstituée peut être formée par cyclisation oxydative. L'équipe de Pan décrit en 2015 l'annélation efficace de 2-pyridinylacétate avec des alcènes terminaux catalysée par le cuivre.⁵⁰ Plus tôt la même année, Yan et ses collègues ont publié une synthèse analogue sans métal : médiée par l'iode, leur méthodologie conduit à des rendements similaires⁵¹, mais elle nécessite 3 équivalents de TBHP (hydroperoxyde de tert-butyle) comme additif. Avec l'acétate de cuivre, l'air seul suffit comme oxydant (Schéma 38).

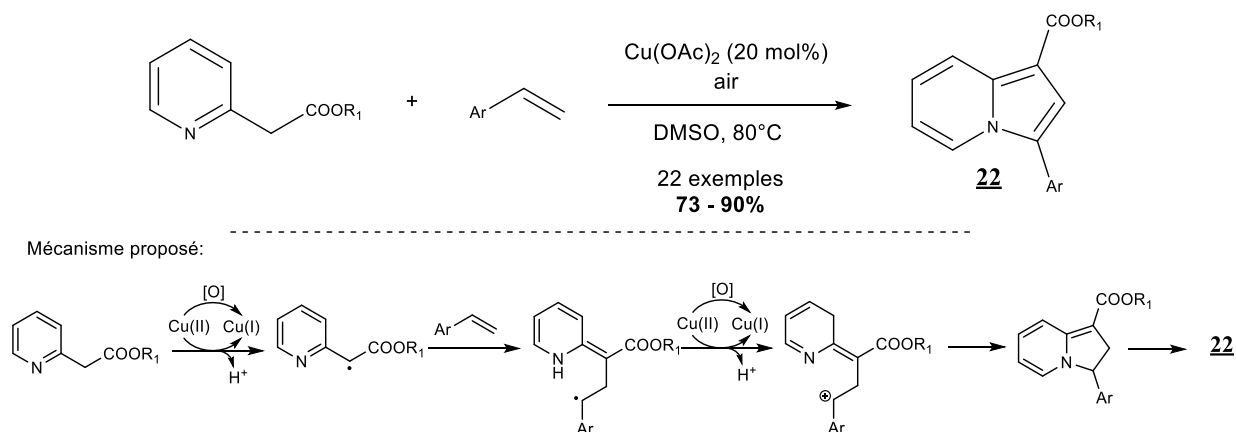


Schéma 38 : Annélation de 2-pyridinylacétate et d'oléfines catalysée par le cuivre(II)

Il convient de noter que des indolizines 1,2,3-trisubstituées peuvent également être dérivées d'alcènes internes, bien que les rendements associés soient fortement réduits (35%).⁵² De même, les alcènes terminaux aliphatiques ne sont pas aussi performants que les alcènes aromatiques (15%). Ces résultats peuvent s'expliquer par le mécanisme réactionnel illustré plus haut qui implique des intermédiaires radicalaires et cationiques davantage stabilisés par un groupement aromatique adjacent.

La réaction des 2-pyridylacétates avec des acides carboxyliques α,β -insaturés a été étudiée par Zhang *et al.*⁵³ En présence de cuivre et de nickel, des indolizines 1,2-disubstituées portant un groupement aryle en position 2 peuvent être obtenues avec des rendements modestes (42-68%). Cette méthodologie à l'efficacité modérée présente l'avantage de tolérer une diversité de substituants R_1 et ne se limite pas aux esters de pyridine (Schéma 39).

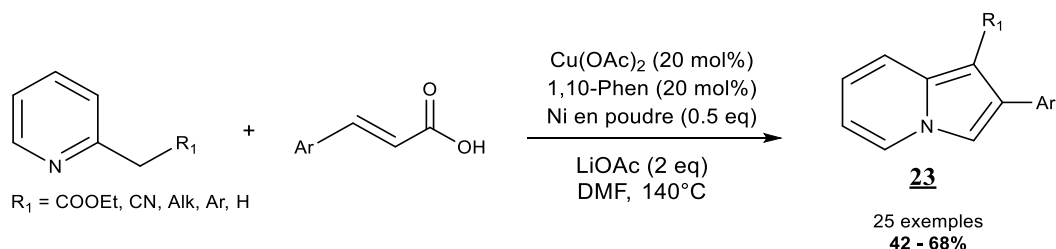


Schéma 39 : Annélation de 2-alkylpyridines avec un acide carboxylique α,β -insaturé catalysée par le cuivre

Les détails mécanistiques n'ont pas été communiqués, mais les analyses GC des gaz libérés pendant la réaction ont confirmé la formation de CO_2 et H_2 , indiquant donc une étape de décarboxylation. De plus, les analyses des précipités obtenus après réaction ont révélé qu'une espèce $\text{Cu}(0)$ pourrait être impliquée dans ce processus.

c) Annélation de 2-pyridylacétate et de composés carbonylés aliphatiques

Le même motif de substitution que celui porté par le composé **23** peut être atteint en faisant réagir le 2-pyridinylacétate avec de l'acétophénone (Schéma 40). Chandra et ses collaborateurs ont montré en 2015 qu'une combinaison de $\text{I}_2\text{-CuBr}_2$ en présence de peroxyde de di-*tert*-butyle en guise d'oxydant engendrait les meilleures conditions catalytiques pour des rendements atteignant 79%.⁵⁴ L'avantage majeur de cette méthode, en plus des substrats peu coûteux, est qu'elle peut être réalisée sans solvant.

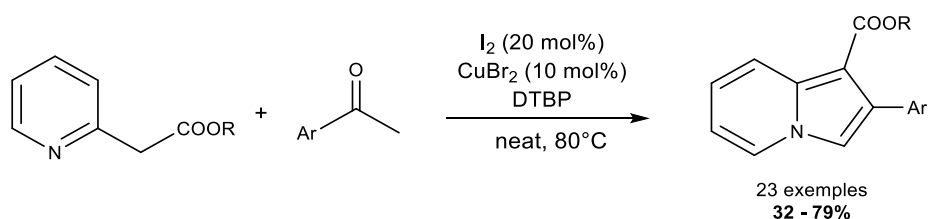


Schéma 40 : Synthèse d'indolizines 1,2-disubstituées à partir de dérivés de 2-pyridylacétate et d'acétophénone

La conversion procède sans problème avec les acétophénone riches comme pauvres en électrons. D'un point de vue mécanistique (Schéma 41), l'intermédiaire α -iodo-acétophénone généré *in situ* réagit avec le 2-pyridylacétate selon une réaction d'Ortoleva-King pour former un sel de pyridinium qui subit ensuite une crotonisation avant d'aboutir au produit désiré.

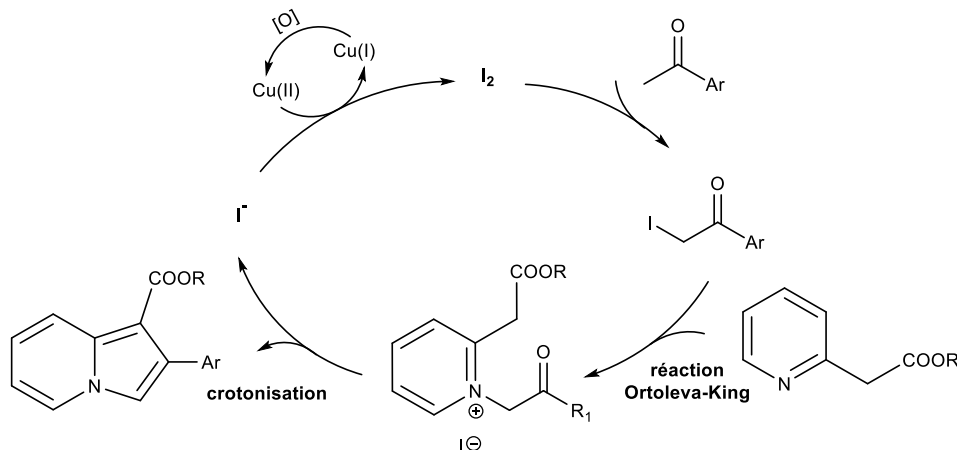
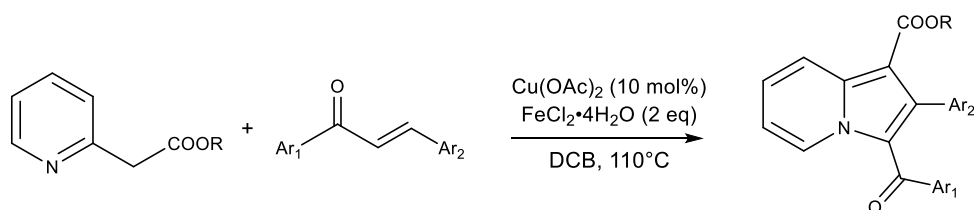


Schéma 41 : Mécanisme suggéré de la réaction entre une acétophénone et le 2-pyridylacétate catalysée par I_2 -CuBr₂

Dans la même publication, Chandra a également exploré la réactivité des chalcones. Avec elles, des indolizines trisubstituées portant un groupement acyle en position 3 sont produites sous catalyse au cuivre (Schéma 42).



15 exemples
42 - 89%

Schéma 42 : Synthèse d'indolizines trisubstituées à partir de chalcones et de 2-pyridylacétates catalysée par Cu(II)

Pour leur part, le groupe de Yan partage le protocole de couplage oxydatif du 2-pyridylacétate avec des aldéhydes pour fournir des indolizines 1,3-disubstituées.⁵⁵ La réaction, catalysée par l'iode, se déroule en conditions douces avec des rendements modérés à bons sous argons (Schéma 43). Les conversions sont globalement meilleures pour les aldéhydes aromatiques qu'aliphatiques. Le mécanisme proposé par les auteurs se déroulerait comme suit : le produit de la crotonisation serait d'abord soumis à une substitution électrophile, puis l'intermédiaire iodé serait ensuite cyclisé pour générer le produit **24** après élimination d'un proton.

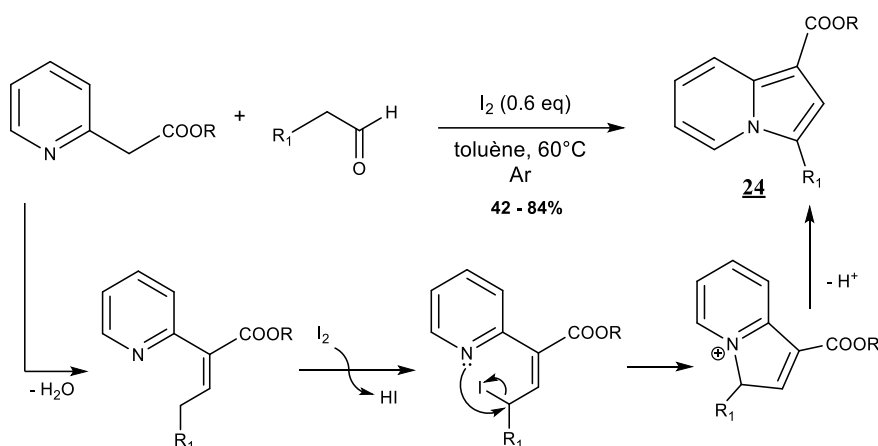


Schéma 43 : Cyclisation oxydative d'aldéhydes et 2-pyridylacétate catalysée par I_2 en indolizines 1,3-disubstituées

5. Réactions diverses à partir de 2-carboxypyridines

Parmi les réactifs de départ peu coûteux, on peut retrouver la pyridine 2-carboxaldéhyde. En 2003, Basavaiah *et al.* décrivent sa réaction monotopée avec des alkylvinylcétone permettant de produire des indolizines substituées en position 2 par un groupement acyle.⁵⁶ Il s'agit également du premier exemple publié d'un processus Baylis-Hillman induit par le partenaire électrophile. Par définition, ce type de réaction implique le couplage d'une cétone en position α avec un électrophile sous l'influence d'un catalyseur.⁵⁷ Dans le cas de la pyridine-2-carboxaldéhyde (Schéma 44), l'hétérocycle possède à la fois un site électrophile et un site nucléophile : après activation de la cétone α - β -insaturée par le TMSOTf, le doublet non-liant de l'azote est impliqué dans une addition de Michael conduisant à la cyclisation de l'intermédiaire **I** et à l'obtention de l'indolizine monosubstituée **25**. Les rendements de la transformation sont certes modérés (38-55%) mais la réaction possède l'avantage de se dérouler en conditions douces.

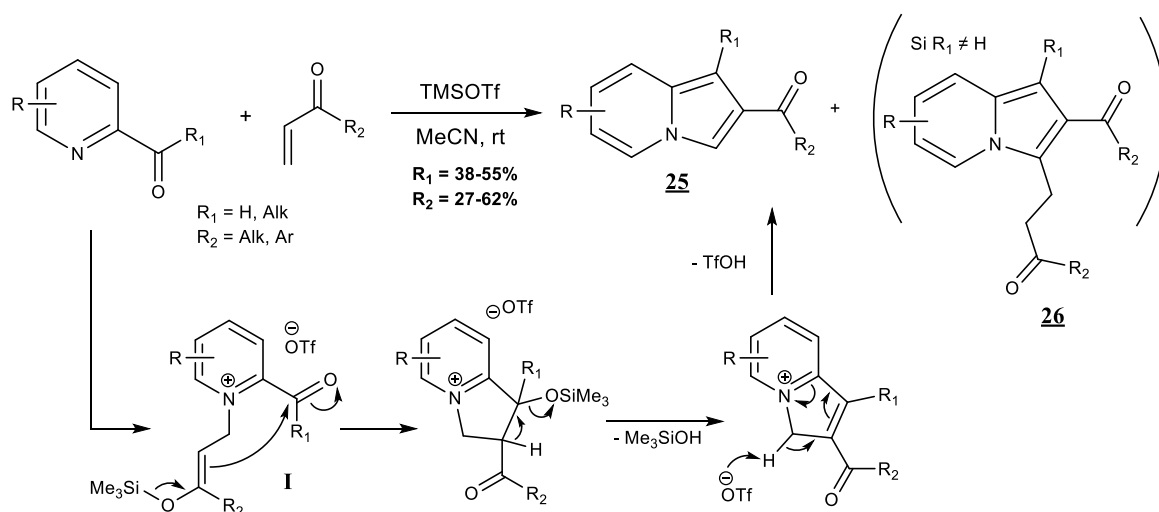


Schéma 44 : Réaction de Baylis-Hillman formant une indolizine à partir de pyridine-2-carboxaldéhyde

Onze ans plus tard, le même groupe étend cette méthodologie aux dérivés de 2-acétylpyridine.⁵⁸ Bien qu'étant des électrophiles moins réactifs comparés aux aldéhydes, les cétones de pyridines ont permis d'obtenir les indolizines correspondantes avec des rendements faibles à modérés (27-62%). Il convient de noter que l'indolizine **25** n'est pas le seul composé bicyclique formé durant cette réaction. Un sous-produit mineur **26** 1,2,3-trisubstitué est également isolé (11-46%), obtenu après addition de Michael de **25** sur l'alkylvinylcétone.

L'introduction aisée d'une fonction amine dans le fragment pyrrole à partir d'une cétone de pyridine est également rendue possible en 2013 par Shi et ses collaborateurs.⁵⁹ Ils décrivent la cycloisomérisation de 2-énoylpyridines avec des sulfonamides catalysée par le chlorure de titane. Cette réaction mène à des 1-aminoindolizines générées avec des rendements bons à excellents (Schéma 45). Les pyridylchalcones impliquées sont commerciales ou facilement préparées par condensation de la 2-acétylpyridine avec un aldéhyde selon la procédure de Singh.⁶⁰

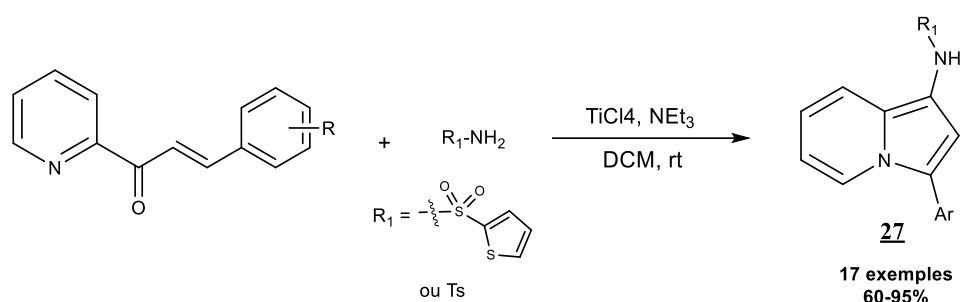


Schéma 45 : Synthèse de 1-aminoindolizines à partir d'énoylpyridines et de sulfonamides catalysée par le Ti(IV)

Le mécanisme réactionnel probable est présenté dans le Schéma 46. Dans un premier temps, un intermédiaire imine α,β -insaturé **A** serait généré in situ, suivi par une attaque nucléophile 1,4 de l'azote hétérocyclique sur sa double liaison extrêmement polarisée. Après transfert de proton, le zwitterion **B** serait isomérisé pour fournir le produit 1,3-disubstitué **27** souhaité. Notons que si l'aryle est remplacé par un groupement cinnamyle, le produit souhaité n'est pas formé, probablement en raison d'une complexation avec le TiCl₄.

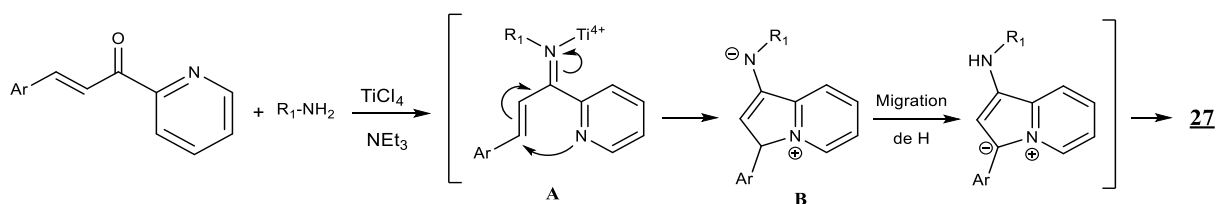


Schéma 46 : Mécanisme plausible de la cycloisomérisation de 2-énoylpyridines en aminoindolizines

Les aminoindolizines obtenues peuvent être ensuite exploitées pour produire des composés davantage fonctionnalisés en couplant l'amine secondaire à des méthylvinylcétones. En effet, une addition aza-Michael catalysée par la triphenylphosphine a été développée dans le même article. Les conversions sont quasi-quantitatives (83-99%) et la réaction tolère également des allènes activés comme substrats (Schéma 47).

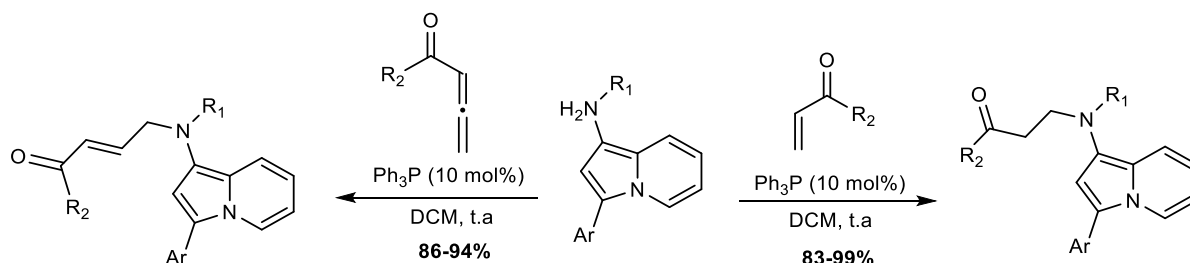


Schéma 47 : Addition aza-Michael de l'aminoindolizine 3a avec des dérivés d'alcènes et allènes activés

Les pyridylchalcones ont également été transformées en indolizines par le groupe de Liu en 2015, sans avoir recours à un catalyseur métallique.⁶¹ En utilisant simplement l'anhydride acétique comme substrat électrophile, des indolizines 1,3-disubstituées ont pu être synthétisées de manière efficace (Schéma 48). Puisque cette réaction se déroule sans métal, elle peut être utilisée pour la préparation d'indolizines contenant des groupements cinnamyl ou hétéroatomiques à partir de chalcones correspondantes, contournant ainsi le problème d'une éventuelle désactivation du catalyseur par chélation. Il s'est toutefois avéré que la nature des substituants portés par la fraction aryle influence de manière significative l'efficacité de la cyclisation. En effet, les groupements riches en électrons conduisent à une réactivité plus élevée (92% de rendement lorsque R = Me contre seulement 48% pour R = CF₃).

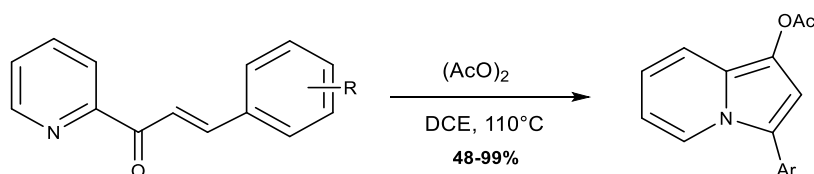
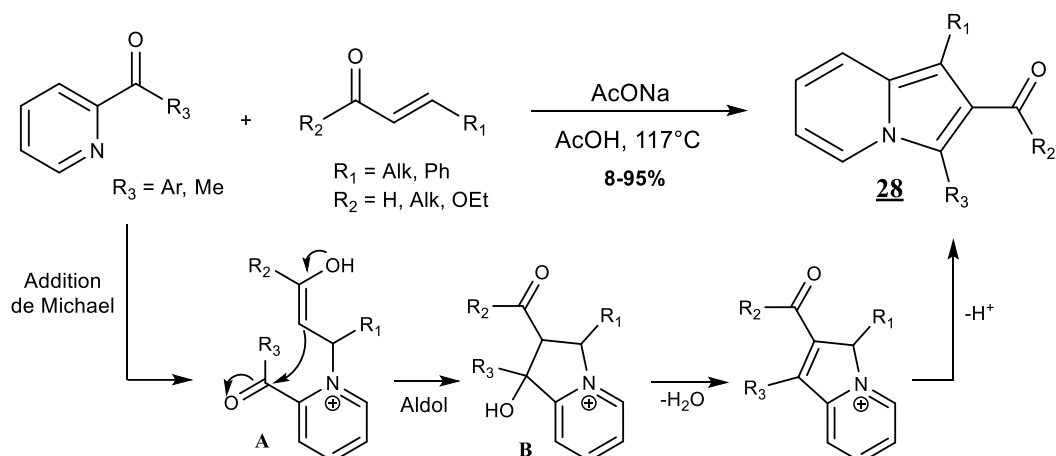


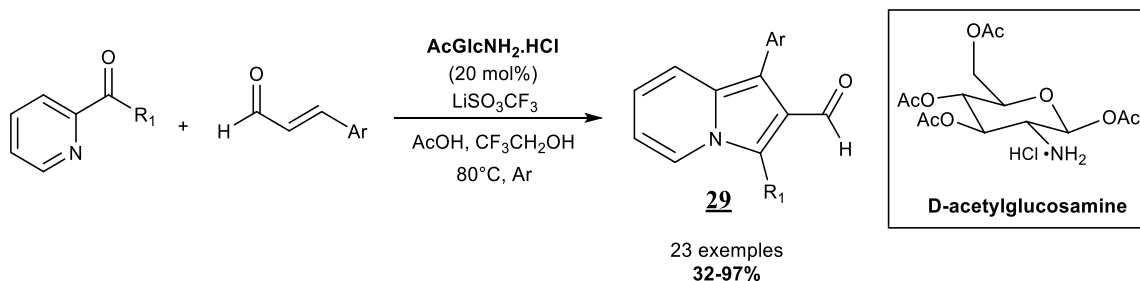
Schéma 48 : Synthèse d'indolizines 1,3-disubstituées à partir d'énolpyridines et d'anhydride acétique

Plus récemment, Zhao *et al.* ont rapporté en 2021 une nouvelle méthodologie one-pot pour la construction d'indolizines 1,2,3-trisubstituées à partir de pyridinone et d'aldéhydes α,β -insaturés ou de cétones.⁶² Economique et sans métal, cette stratégie de synthèse est une voie simple vers les indolizines portant un aldéhyde en position 2, précurseurs d'intérêt pour la préparation de molécules plus complexes. La condensation des dérivés de 2-acétylpyridines et but-2-énal est réalisée en présence d'acétate de sodium et d'acide acétique (Schéma 49). Lorsque R₃ = aryle, les aldéhydes α,β -insaturés et les cétones participent tous deux volontiers à cette réaction, qui se conclut avec des rendements très satisfaisants (jusqu'à

95%). Par contre, si R_3 = alkyle, la transformation est bien moins efficace (10-56%). Cette synthèse a également été tentée sous irradiation aux micro-ondes, mais les rendements restent globalement inférieurs à ceux obtenus par chauffage thermique. Le mécanisme suggéré par les auteurs est décrit ci-dessous : l'énolate **A** est d'abord formé suite à une addition de Michael, après quoi une réaction d'aldol intramoléculaire se produit. La déshydratation et la déprotonation de l'intermédiaire **B** donnent par la suite naissance à l'indolizine **28** désirée.



Plus dernièrement encore, l'équipe de Zhang, inspirée par la méthodologie précédente, propose en 2023 une approche originale catalysée par des osamines dérivés de la biomasse.⁶³ La D-glucosamine, ainsi que le chitosane, un polymère contenant principalement des unités β -D-anhydroglucosamine, se sont révélés être des catalyseurs efficaces pour l'obtention de la molécule trisubstituée **28**. La réaction décrite dans le Schéma 50 est non seulement l'un des rares exemples de synthèse d'indolizine-2-carbaldéhydes en une seule étape, mais elle permet également de valoriser des composés biosourcés abondants et renouvelables.



L'annélation de pyridinones et d'aldéhydes α,β -insaturés décrite a été réalisée en présence de LiSO_3CF_3 et d'acide acétique dans du trifluoroéthanol. Sans le sucre, seules des traces du produit **29** ont été isolées. En sa présence, les rendements atteignent 97%. Le lithium est

ajouté en tant qu'acide de Brönsted afin d'activer l'aldéhyde et promouvoir la formation d'un ion iminium intermédiaire. La transformation se déroulerait en effet *via* une séquence iminium/énamine résumée dans le Schéma 51.

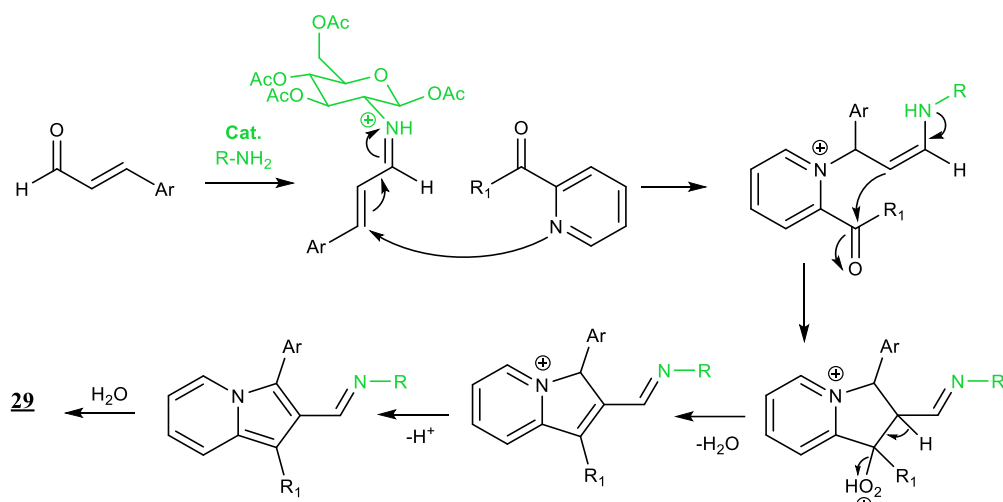


Schéma 51 : Mécanisme proposé de la synthèse d'indolizine-2-aldéhyde catalysée par le D-GlcNH₂

C. Voie de synthèse basée sur les *N*-méthylures de pyridinium

Utilisée si souvent qu'elle mérite sa propre catégorie, la méthodologie la plus courante et la plus versatile pour la synthèse d'indolizines est la cycloaddition 1,3-dipolaire de dérivés *N*-méthylures de pyridinium avec des acétylènes ou des alcènes déficients en électrons. Depuis un siècle, ce type de réaction a été appliqué avec succès pour produire un grand nombre d'hétérocycles décrits dans la littérature, offrant l'avantage conséquent de ne nécessiter que quelques étapes de synthèse tout en faisant appel à des matières premières relativement simples et peu onéreuses.

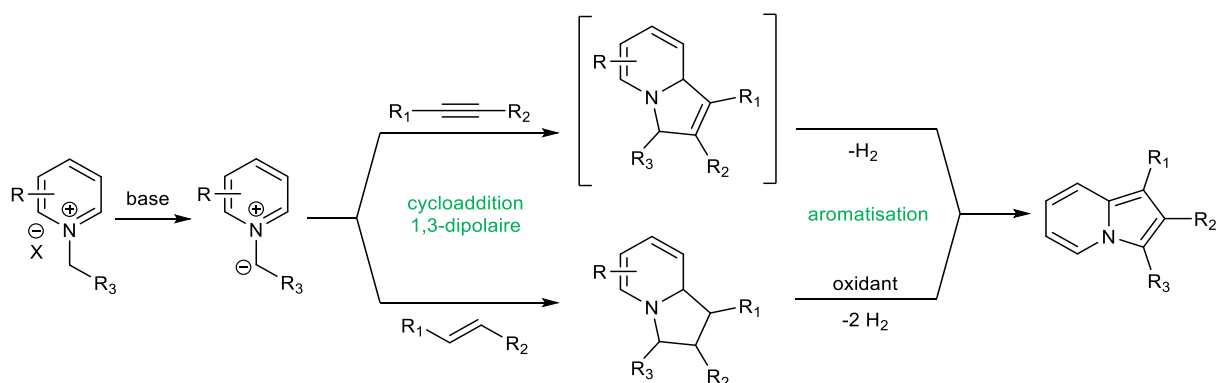


Schéma 52 : Synthèse générale d'indolizine par cycloaddition [3+2] d'ylures de pyridinium et de dérivés insaturés

Comme indiqué précédemment, les alcènes et les alcynes activés sont tous deux compatibles avec cette approche (Schéma 52). Il existe cependant une différence majeure lors de leur

utilisation : lorsque le rôle de dipolarophile est joué par une oléfine, un oxydant est généralement ajouté comme additif au mélange réactionnel afin de permettre l'aromatisation de la di- ou tétrahydroindolizine obtenue après cycloaddition. Ce phénomène ne se déroule de manière spontanée avec les alcènes que dans quelques cas bien précis. Quant aux ylures, dipôles 1,3 stabilisés par délocalisation de la charge positive sur l'hétérocycle, ils sont souvent issus de la déprotonation d'un sel de pyridinium. Les structures hybrides de résonance du dipôle sont représentées dans le Schéma 53. Notons que la présence de groupements électroattracteurs augmente la stabilité de l'espèce, avec l'existence d'une forme énolate quand $R_1 = \text{COR}_3$.

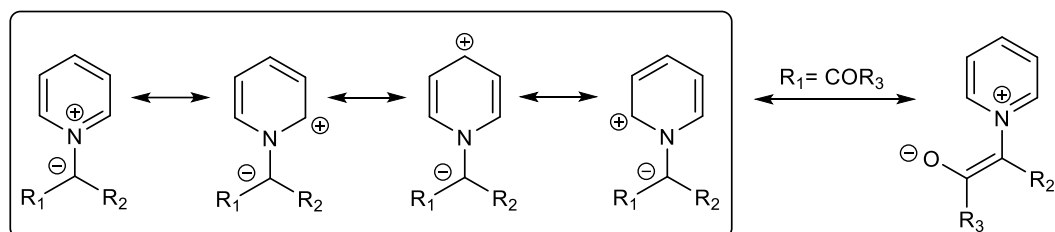


Schéma 53 : Structures hybrides de résonance d'un ylure de pyridinium

En ce qui concerne la cycloaddition, il est généralement admis que les nouvelles liaisons sigma se forment de manière concertée *via* un processus suprafacial-suprafacial thermiquement autorisé par les règles de Woodward et Hoffmann.⁶⁴ Avec 4 électrons π répartis sur un squelette à trois atomes, les ylures d'azométhine sont considérés comme des espèces riches en électrons : l'interaction dominante implique donc la $\text{HOMO}_{\text{dipôle}}$ et la $\text{LUMO}_{\text{dipolarophile}}$.⁶⁵ Des substituants électroattracteurs sur le composé insaturé renforcent cette interaction en abaissant la LUMO de ce dernier, donnant lieu à une séparation énergétique HOMO-LUMO plus courte. Les alcènes ou alcynes déficients en électrons sont ainsi plus réactifs envers les cycloadditions [3+2].

La partie qui suit est un historique des principales innovations de la méthodologie au fil des années, de sa conception aux avancées les plus récentes.

La synthèse d'indolizine à partir d'ylure de pyridinium est décrite pour la première fois en 1961 par Boekelheide et Fahrenholtz.⁶⁶ Inspirés par l'approche de Tschitschibabin et son intermédiaire sel quaternaire, les auteurs ont tenté de préparer un dérivé de 7-azaindolizine (**I**) via une cyclisation intramoléculaire de l'ylure de pyrazinium **A** (Schéma 54). La transformation initialement envisagée ayant échoué, ils ont décidé d'étudier la réaction du dipôle avec le DMAD à la place. En présence de Pd/C, deux produits de cycloaddition [3+2] **II** et **III** ont été isolés. Cette découverte fortuite a ensuite été appliquée aux analogues de pyridine : l'ylure obtenu par déprotonation du bromure de phénacilpyridinium a été traité avec

l'acétylène pour fournir l'indolizine trisubstituée **31** avec un modeste rendement de 20%. Le produit a ensuite été hydrolysé pour fournir l'acide **32** après décarboxylation.

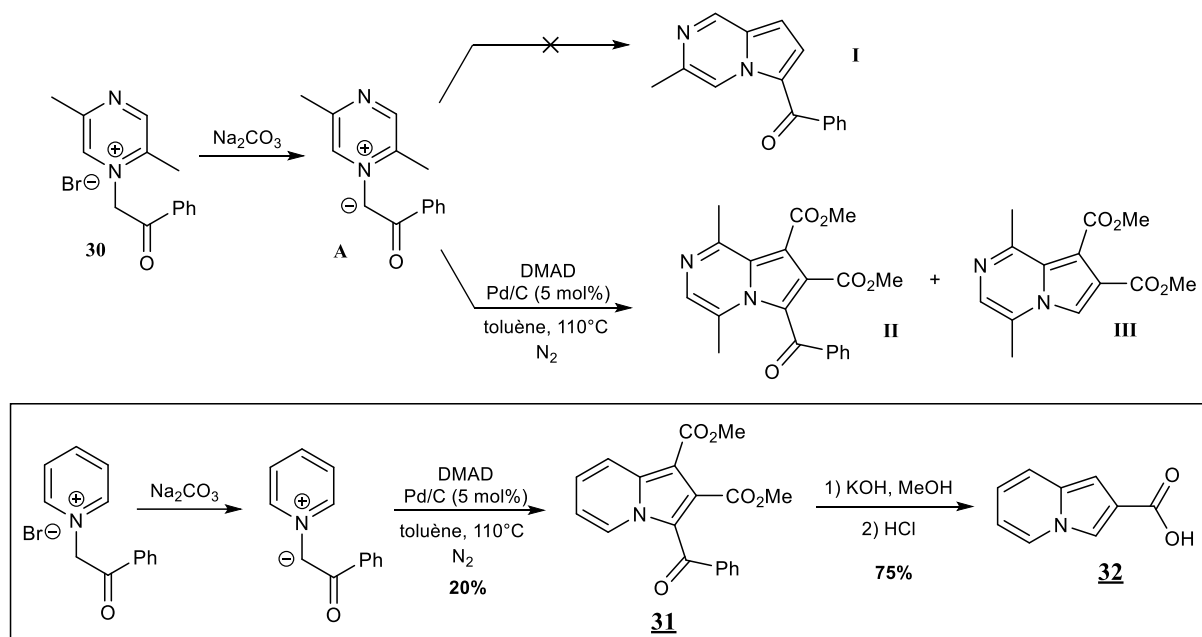


Schéma 54 : Première synthèse d'indolizine par cycloaddition 1,3-dipolaire d'ylure de pyridinium et de DMAD

Durant la décennie qui suivit cette découverte, la synthèse d'indolizines par cycloaddition d'ylure de phénacylpyridinium et de divers acétylènes carbonylés (propiolate de méthyle, 3-butyn-2-one, but-2-ynoate de méthyle, 3-phénylpropiolate de méthyle et hex-3-yne-2,5-dione),⁶⁷ ainsi que des dérivés de cyanoacetylene,⁶⁸ a été explorée. Les rendements rapportés restent tout aussi faibles (2-35%). Le catalyseur au palladium s'est vite avéré inutile : l'air suffit pour oxyder l'intermédiaire et aucune dihydroindolizine n'est isolée. Le dicyanométhylure de pyridinium s'est quant à lui révélé être plus réactif envers le DMAD que l'analogue phénacyl car l'ylure est davantage stabilisé par effet électroattracteur plus intense,⁶⁹ générant ainsi la diméthyl 3-cyanoindolizine-1,2-dicarboxylate **33** avec un rendement de 48% (Schéma 55). Le cyanure étant un bon groupe partant, un équivalent d'acide cyanhydrique est libéré lors de cette transformation après aromatisation.

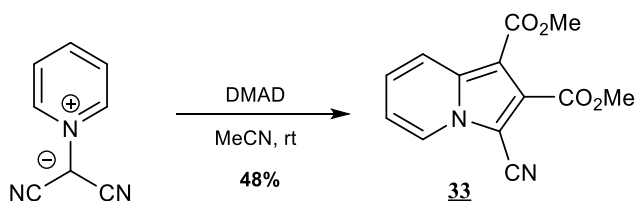


Schéma 55 : Synthèse de 3-cyanoindolizine trisubstituée à partir de dicyanométhylure de pyridinium

Il a fallu attendre 1971 et les travaux de Fröhlich et Kröhnke pour le premier exemple d'utilisation d'alcène comme partenaire dipolarophile.⁷⁰ L'obtention régiosélective de 1-cyanoindolizines disubstituées à partir d'acrylonitrile est réalisée en deux étapes (Schéma

56): la tétrahydroindolizine **34** formée après cycloaddition est isolée puis déshydrogénée à l'aide de Pd/C pour aboutir à un rendement global de 12%. De même, la réaction d'ylures de pyridinium avec les acrylates conduit à la formation d'intermédiaires 2,3-dihydroindolizines stables nécessitant une étape d'oxydation supplémentaire.⁷¹

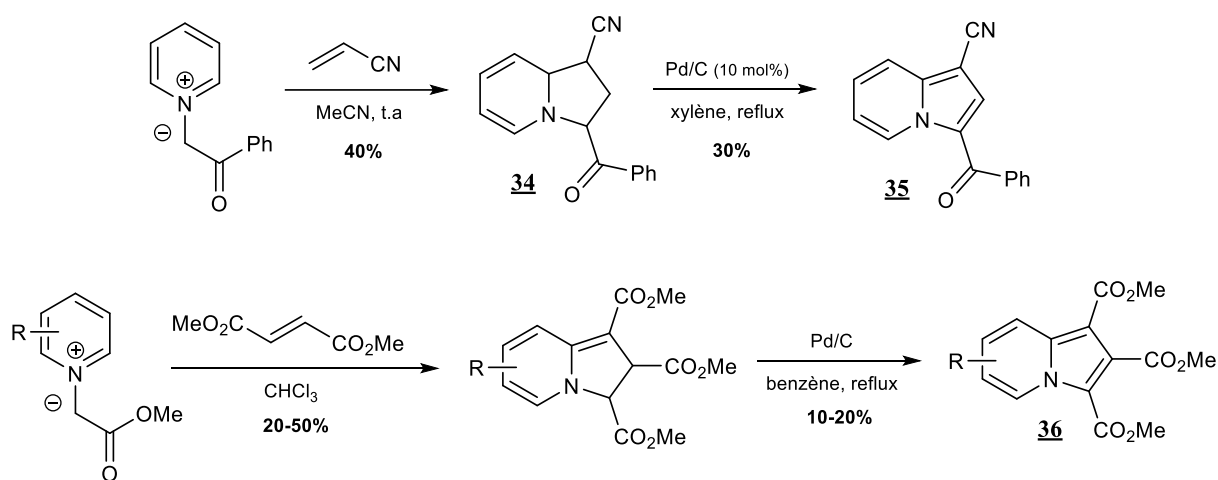


Schéma 56 : Premières cycloadditions 1,3-dipolaires d'ylure de pyridinium et d'alcène activé

Deux ans plus tard, Hayasi *et al.* utilisent le *S,S*-dioxyde diphénylthiirène comme dipolarophile (Schéma 57)⁷². Ce dernier se comporte comme un acétylène, donnant directement accès à la 1,2-diphénylindolizine **37** sans avoir recours à un oxydant. En effet, la cycloaddition conduit à l'ouverture du cycle tendu à trois chaînons et passe par un intermédiaire dihydroindolizine facilement aromatisable par oxydation avec l'air avec une élimination formelle de dihydrogène et de dioxyde de soufre.

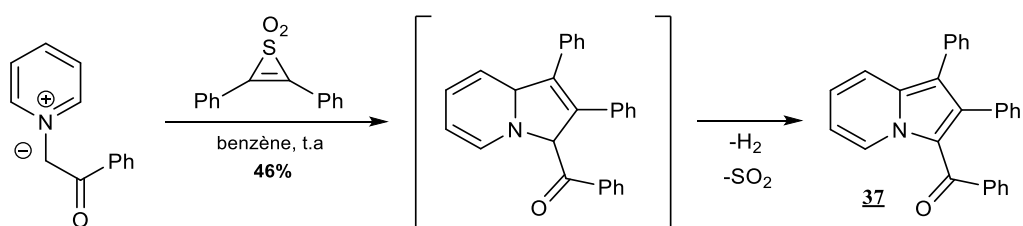


Schéma 57: Synthèse d'indolizine à partir de *S,S*-dioxyde diphénylthiirène

La même année, Basketter et Plunkett décrivent la réaction d'ylures d'isoquinolinium avec des énamines (Schéma 58), générées *in situ* à partir de cétones et d'amines primaires ou secondaires.⁷³ Comme l'exemple précédent, cette combinaison particulière de réactifs ne nécessite pas l'ajout d'un oxydant dans le milieu réactionnel car la tétrahydroindolizine intermédiaire **I** est aromatisée spontanément.

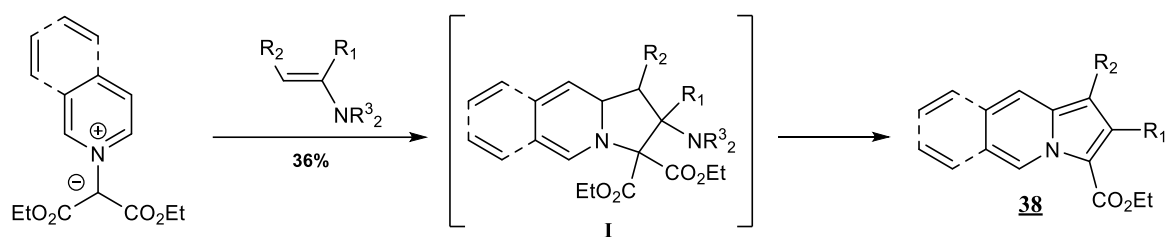


Schéma 58 : Cycloaddition 1,3-dipolaire d'ylures d'azométhine et d'énamines

La préparation en une étape de 3-cyanoindolizine **39** à partir de phénylvinylsulfoxydes a également été proposée comme alternative aux dérivés d'acétylène (Schéma 59).⁷⁴ Cette voie de synthèse publiée par le groupe de Matsumoto en 1979 donne naissance à des produits monosubstitués avec des rendements modérés à bons atteignant 73%. Cette valeur mérite d'être soulignée compte tenu de l'efficacité limitée des cycloadditions recensées précédemment.

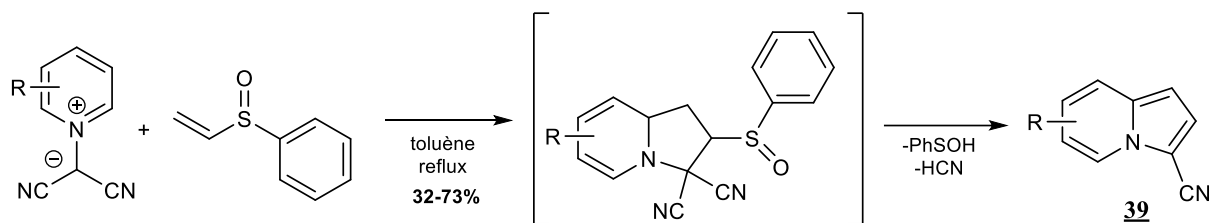


Schéma 59 : Synthèse de 3-cyanoindolizines à partir de dicyanométhylures et de phénylvinylsulfoxydes

Bien qu'il ait été établi en 1990 que les composés α -methoxyéthylènes polarisés pouvaient fournir les indolizines correspondantes sans agent déshydrogénant,⁷⁵ ce n'est qu'en 1993 qu'un procédé one-pot plus général pour les alcènes a été développée.⁷⁶ En faisant réagir des sels de pyridinium et des oléfines en présence de l'oxydant TPCD (Tetrakis(Pyridine)Cobalt(II) Dichromate) et de base (Schéma 60), Wei et ses collègues obtiennent des indolizines di- ou trisubstituées avec des rendements bons à excellents sans précédent (jusqu'à 93%).

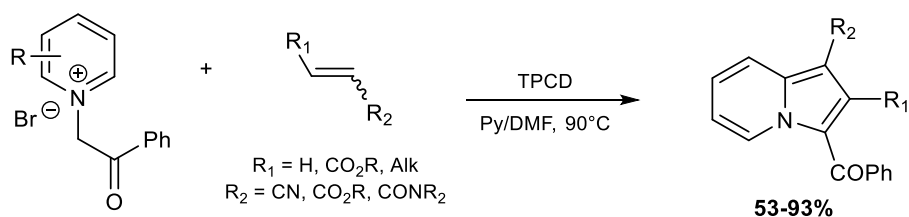


Schéma 60 : Cycloaddition 1,3-dipolaire d'ylures de pyridinium générés in situ et d'alcènes en présence de TPCD

Cette méthodologie permet de contourner les inconvénients rencontrés jusque-là : la cycloaddition 1,3-dipolaire ne se limite plus aux alcènes fonctionnalisés par de bons groupes partants si l'étape supplémentaire d'aromatisation, médiée par le palladium ou encore le chloranile, veut être évitée. Les oléfines déficientes en électrons étant plus largement disponibles que leurs homologues alcynes, le protocole de Wei permet ainsi de réduire

considérablement le coût synthétique tout en augmentant la variété structurale des produits résultants. Le dioxyde de manganèse peut aussi remplacer l'espèce chromée.⁷⁷

Malgré toutes les portes qu'elle a ouvertes, cette méthode n'arrive pas à s'affranchir du motif de substitution 3-indolizine. Le défi est relevé par Katritzky en 1999 avec l'utilisation de benzotriazolyméthylures de pyridinium (**40**),⁷⁸ facilement préparés à partir de pyridines, d'aldéhydes et de chlorure de thionyle (Schéma 61). Le cycle benzotriazole sert de groupe partant durant l'étape d'élimination, ce qui conduit aux indolizines **41** éventuellement vierges en position 3. Afin d'éviter une aromatisation incomplète avec les alcènes, des bromures ont été employés comme dipolarophile, sinon les rendements sont réduits par formation de sous-produits dihydroindolizines.

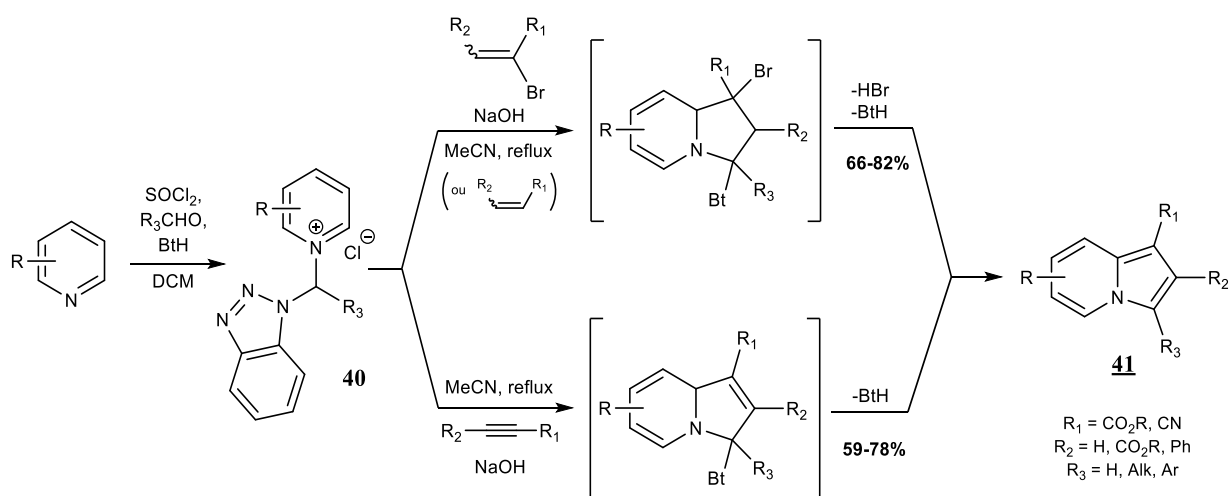


Schéma 61 : Synthèse d'indolizine à partir d'ylures de pyridinium benzotriazoles

Un autre obstacle est resté insurmonté jusqu'au siècle suivant : la présence indispensable de groupements électroattracteurs sur le composé insaturé. En 2001, Matsumoto *et al.* décrivent la première cycloaddition 1,3-dipolaire à demande électronique inverse en utilisant le cyclooctyne hautement contraint, au lieu des alcènes ou alcynes activés habituels. Les rendements de la réaction illustrée dans le Schéma 62 se sont révélés modérés à bons (15-67%). Les calculs des orbitales moléculaires ont, quant à eux, indiqué que la cycloaddition se déroulait entre la LUMO_{1,3-dipôle} et la HOMO_{cyclooctyne}. Ces résultats ont été confortés par des observations expérimentales : les dicyanométhylures de pyridinium génèrent les indolizines correspondantes avec un rendement presque quantitatif (97%). Cette réactivité accrue s'explique par une énergie LUMO réduite grâce au caractère fortement électroattracteur des cyanures.

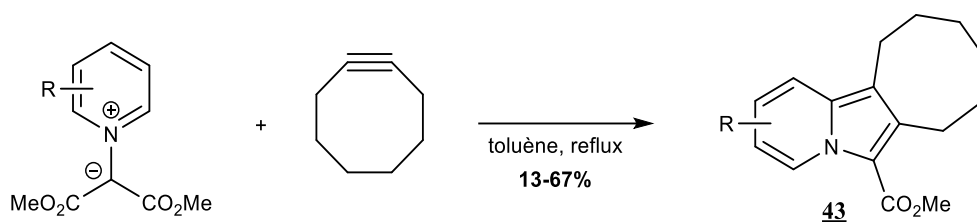
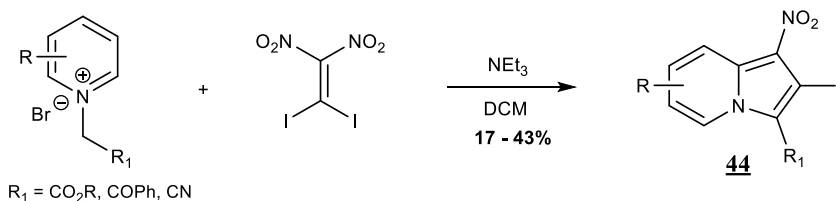


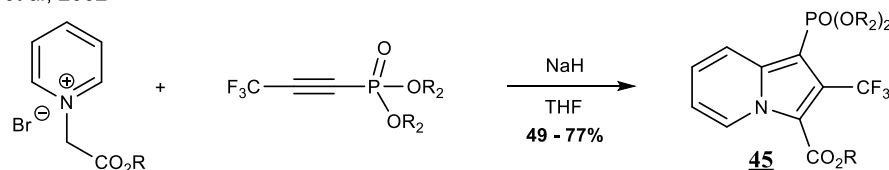
Schéma 62 : Cycloaddition 1,3-dipolaire d'ylures de pyridinium et de cyclooctyne

Plusieurs synthèses d'indolizines halogénées se sont rapidement succédées au début des années 2000 (Schéma 63). Bouladakis et ses collègues ont préparé des indolizines 1-nitro-2-iodo-trisubstituées à partir de 1,1-diiodo-2,2-dinitriéthylène,⁷⁹ réactif facilement obtenu par traitement du tétraiodoéthylène avec de l'acide nitrique.⁸⁰ Les rendements de la cycloaddition décrite sont modérés (17-43%) mais le produit **44** est particulièrement utile puisqu'il peut être ultérieurement fonctionnalisé par couplage croisé ou par réduction du groupement nitro, conduisant ainsi à des molécules plus complexes. La même année, le groupe de Shen exploite la cycloaddition 1,3-dipolaire pour produire les indolizinylphosphonates perfluoroalkylés **45** avec des rendements tout à fait acceptables (jusqu'à 77%).⁸¹ Les ylures de pyridinium peuvent également être cyclisés de manière efficace avec des fluoroalcènes gazeux : c'est ce que démontrent Wu et Chen en 2003.⁸²

Bouladakis *et al*, 2002



Shen *et al*, 2002



Wu *et al*, 2003

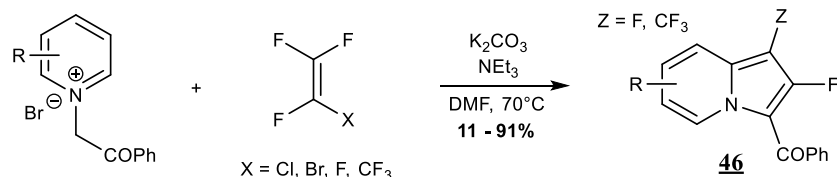


Schéma 63 : Synthèse d'indolizines halogénées par cycloaddition 1,3-dipolaire

Bien que la gamme d'alcènes utilisés pour la cycloaddition 1,3-dipolaire soit large et variée, jusqu'en 2009 seuls les dérivés carbonylacétylènes (et plus rarement nitriles ou phosphonyles) étaient utilisés comme dipolarophiles à triple liaison. Il a fallu attendre les

travaux de Shang pour étendre la méthode aux arylalcynes et diynes.⁸³ En effet, la 2-arylindolizine **47** est obtenue avec de bons rendements (jusqu'à 85%) lorsqu'un phénylacétylène remplace le DMAD (Schéma 64).

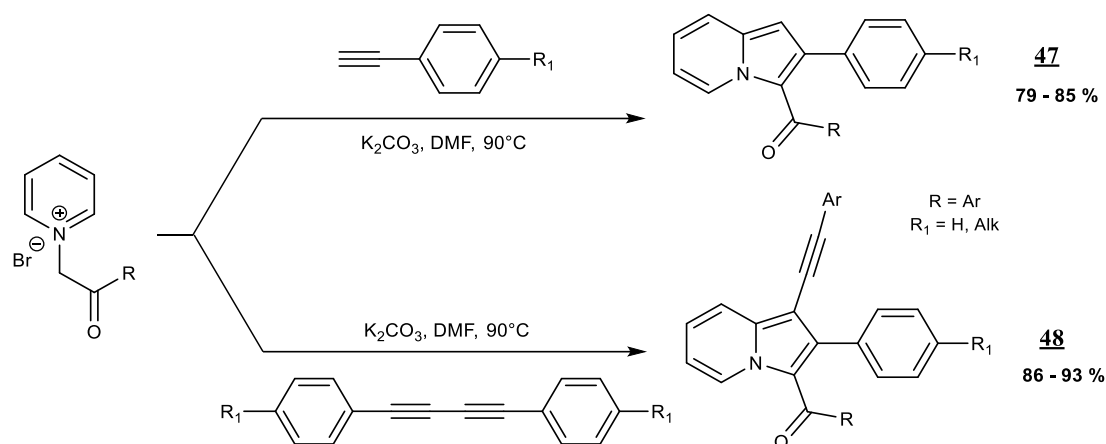


Schéma 64: Synthèse de 2-arylindolizines à partir d'arylalcynes et diynes

Si un groupement phényle adjacent est suffisamment électroattracteur pour polariser et activer la triple liaison, la nature inerte de l'heptyne et des composés apparentés conduit à un rendement bien plus modeste (40% au maximum). Quant au 1,4-diphénylbuta-1,3-diyne, la cycloaddition s'est déroulée de manière très efficace et régiosélective pour donner les indolizines trisubstituées **48** portant une fonction arylalcyne en position 1.

L'année suivante, Liu *et al.* ont découvert que des indolizines 3-monosubstituées peuvent être préparées à l'aide d'anhydride maléique en présence d'oxydant chromé.⁸⁴ Comme le montre le Schéma 65, la réaction implique une étape de décarboxylation oxydative après cycloaddition, donnant lieu au produit souhaité avec des rendements satisfaisants (jusqu'à 89%). Cette publication a prouvé que le TPCD n'est pas seulement un agent de déshydro-aromatisation efficace pour la synthèse d'hétérocycles azotés, mais peut également être utilisé en vue de décarboxyler les esters.

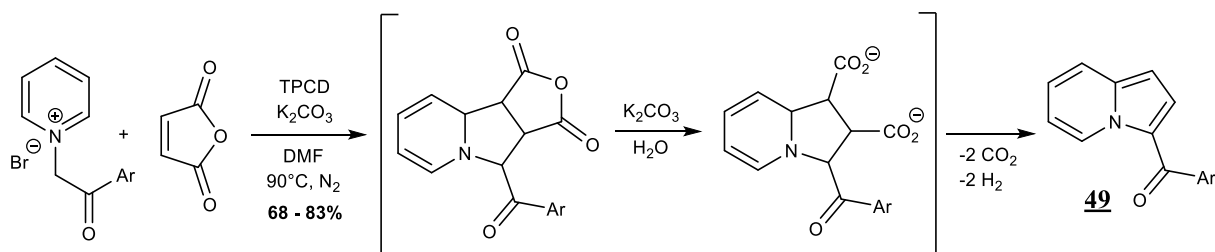


Schéma 65 : Synthèse de 3-acylpyridines via la cycloaddition [3+2] d'ylures de pyridinium et d'anhydride maléique

Nous allons maintenant souligner les travaux les plus significatifs rapportés au cours des deux dernières décennies. En 2010, Coffinier et ses collaborateurs présentent une nouvelle voie de synthèse des 2-aminoindolizines trisubstituées à partir d'hydroxycéténimines

phosphorylées.⁸⁵ Un tel dipolarophile est facilement produit en suivant la procédure en deux étapes de Nef-Perkow par réaction entre un isocyanure, un chlorure d'acyle et un ester phosphite.⁸⁶ Lorsque les céténimines obtenues réagissent avec un ylure de pyridinium (Schéma 66), l'intermédiaire dihydroindolizine est aromatisé par élimination d'un phosphate, générant le bicycle désiré avec des rendements modérés à bons (jusqu'à 74%). Il est intéressant de noter qu'aucun sous-produit dérivé d'une cycloaddition de l'ylure sur le fragment C=N de la céténimine n'est isolé.

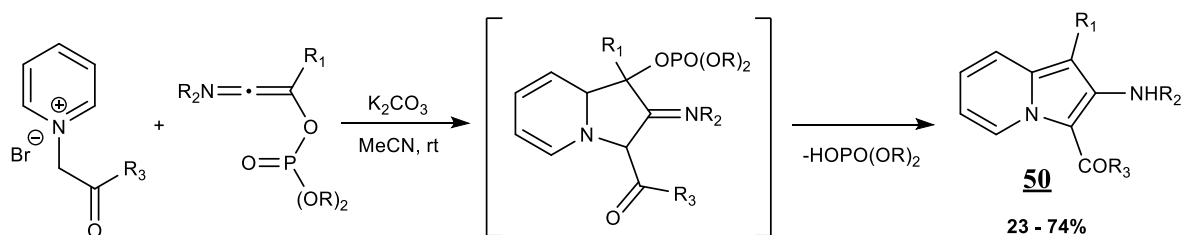


Schéma 66 : Synthèse d'aminindolizines à partir d'ylures de pyridinium et de céténimines phosphorylées

Les 2-aminoindolizines peuvent également être générées à partir d'ynamides.⁸⁷ Le groupe de Cossy caractérise une variété de composés trisubstitués fournis par la cycloaddition illustrée ci-dessous, avec de bons rendements (Schéma 67).

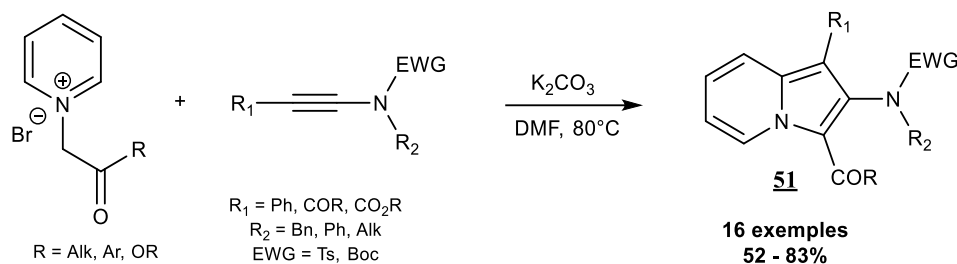


Schéma 67 : Cycloaddition 1,3-dipolaire de méthylures de pyridinium et d'ynamides

Parmi les exemples récents et inédits d'alcènes dipolarophiles, on compte les nitrooléfines α,β -disubstituées⁸⁸ et les sels de vinylsulfonium⁸⁹. En particulier, on peut citer la cycloaddition d'ylures de pyridinium avec les di(alkylsulfonyl)-1,2-dichloroéthène **52** (Schéma 68).⁹⁰ D'abord utilisés en 2008 par Dontsova *et al.* pour la synthèse de dérivés pyrrolo[1,2-a]pyrazines,⁹¹ la même équipe décrit en 2013 l'obtention d'indolizines bifonctionnalisées par des groupement sulfonyles en position 1 et 2. Le produit **53** souhaité est isolé avec un bon rendement (jusqu'à 75%) dans le DMF (*N,N*-diméthylformamide). Notons que lorsque la cycloaddition est réalisée dans un solvant protique tel que l'éthanol, un sous-produit furanique est formé *via* une élimination 1,5 d'acide chlorhydrique.

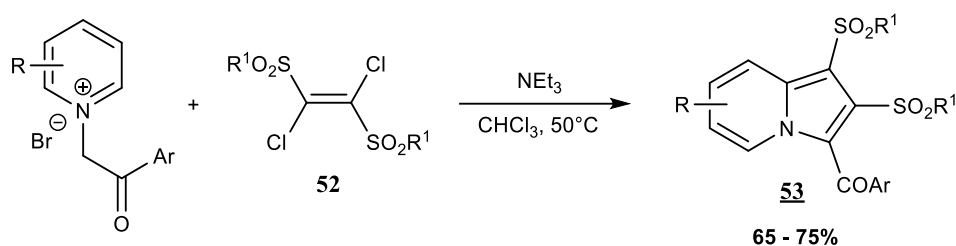
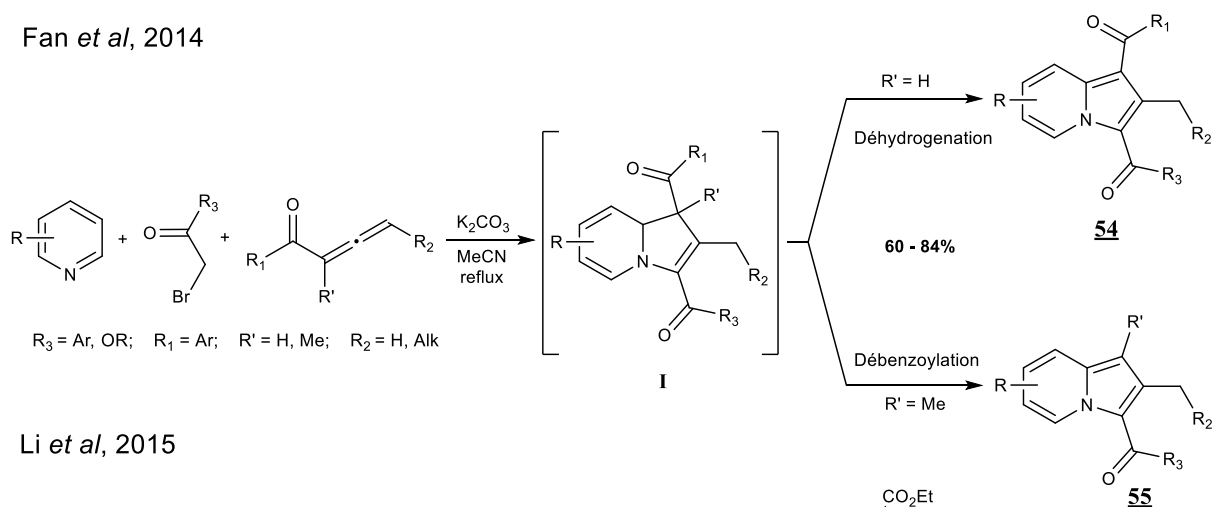


Schéma 68 : Synthèse d'indolizines 1,2-sulfonylées par cycloaddition [3+2]

L'année 2014 marque la première utilisation d'allènes comme dipolarophiles. Fan et ses collègues ont fait réagir des allénylcétone avec des ylures de pyridinium, générés in situ à partir de pyridine et d'agents alkylants. Ils ont ainsi obtenu des indolizines trisubstituées.⁹² Cette synthèse multicomposant monotope se solde par de bons rendements et ne nécessite pas l'ajout d'un oxydant dans le milieu réactionnel (Schéma 69). Le motif de substitution de l'indolizine isolée dépend de la nature du substituant en position α interne de la cétone. Si $\text{R}' = \text{H}$, l'intermédiaire **I** subit une déshydrogénation qui conduit à la présence d'une fonction acyle en C1 de l'indolizine **54** formée. Sinon, la transformation se poursuit par débenzoylation et fournit le composé monoacylé **55**. Les acétoxyallénoates ont également été exploités par Li *et al.* en 2015 avec une participation exclusive de la double liaison interne, ce qui fournit les indolizines **56** portant une unité $\text{C}=\text{C}$ exocyclique.

Fan *et al.*, 2014



Li *et al.*, 2015

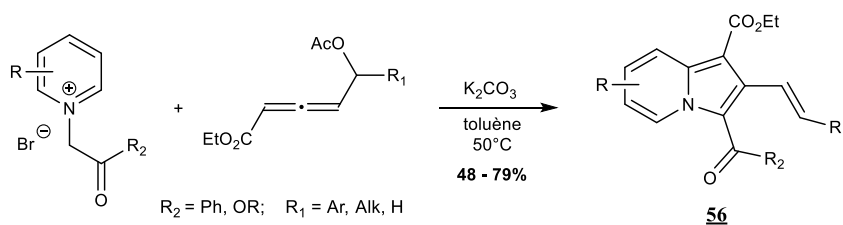


Schéma 69 : Synthèse d'indolizines par cycloaddition 1,3-dipolaire à partir de composés alléniques

Les ajouts récents à la méthodologie comprennent les réactions de cycloaddition assistées par les micro-ondes, permettant ainsi l'obtention des produits souhaités avec d'excellents rendements et des délais très courts (jusqu'à 92% en 8 min),⁹³⁻⁹⁵ ou l'accès à des structures

plus complexes.^{96,97} À cela s'ajoutent des processus par activation photochimique qui ne nécessitent pas de base afin de former l'ylure de pyridinium,⁹⁸ et même des voies biocatalysées originales basées sur l'utilisation d'enzymes extraites de levures.⁹⁹ La principale préoccupation reste toutefois le développement de nouvelles approches one-pot à partir du réactif le plus simple : la pyridine ; ce qui implique une génération *in situ* du sel quaternaire et du dipôle correspondant. Les exemples présentés ci-après sont de ce fait complémentaires aux stratégies listées dans la section I.A.

En 2017, Liu et ses collègues étudient la réaction en cascade de pyridine, de méthylcétones et d'acides alcénoïques catalysée par le bromure de cuivre.¹⁰⁰ Compatible avec une large gamme de substituants, elle se déroule sans solvant et sous oxygène pour fournir des indolizines mono-, di- ou 1,2,3-trisubstituées (Schéma 70). Les rendements atteignant 87%, cette méthode efficace se distingue par sa polyvalence et conduit à divers motifs de substitution possibles.

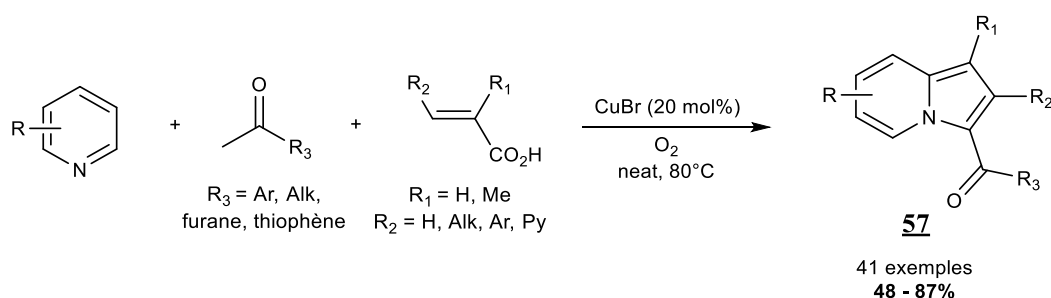


Schéma 70 : Synthèse one-pot d'indolizines catalysée par CuBr via une cycloaddition [3+2] décarboxylative

Une série d'expériences a permis d'élucider le mécanisme en cascade illustré dans le Schéma 71. La réaction implique une transformation de l'alcène en sel de cuivre **I** ainsi qu'une bromation de la méthylcétone, par le biais de CuBr₂ généré *in situ*, en intermédiaire **II** à partir duquel un sel de pyridinium est ensuite formé. Une fois déprotoné, l'ylure **III** et l' α -bromocétone **II** subissent une cycloaddition [3+2] suivie par une décarboxylation oxydative de l'intermédiaire **IV**. L'espèce radicalaire **V** est ensuite oxydée, déprotonée et aromatisée en indolizine **57**.

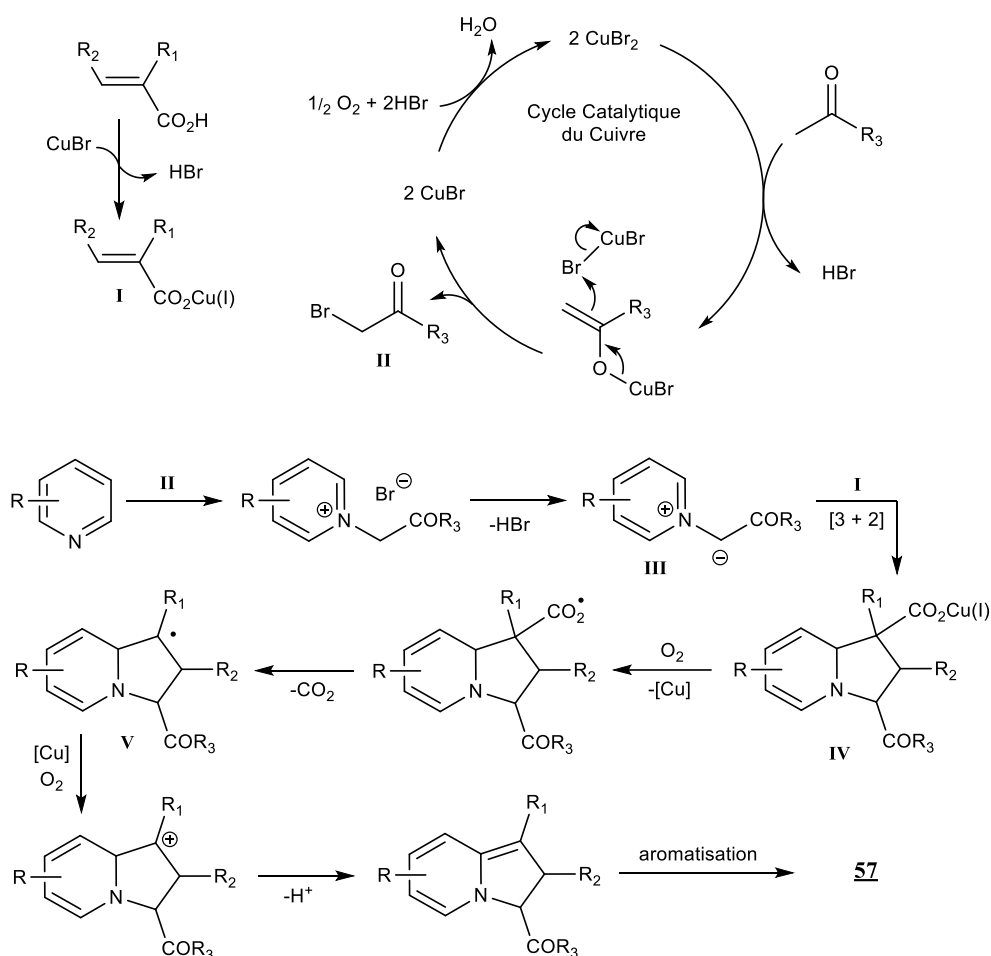


Schéma 71: Mécanisme proposé de la cycloaddition [3+2] décarboxylative catalysée par CuBr

En 2019, l'équipe de Shanmugam rapporte la synthèse 3-RMC d'indolizines fonctionnalisées par un groupement méthylsulfanyle en position 2.¹⁰¹ L'ylure de pyridinium, formé *in situ*, et des dithioacétals oxocétènes réagissent en présence de NaH pour donner lieu à des bicycles trisubstitués (Schéma 72). Impliquant une libération formelle de méthanthiol, la réaction ne requiert pas d'oxydant et se conclut avec de bons rendements.

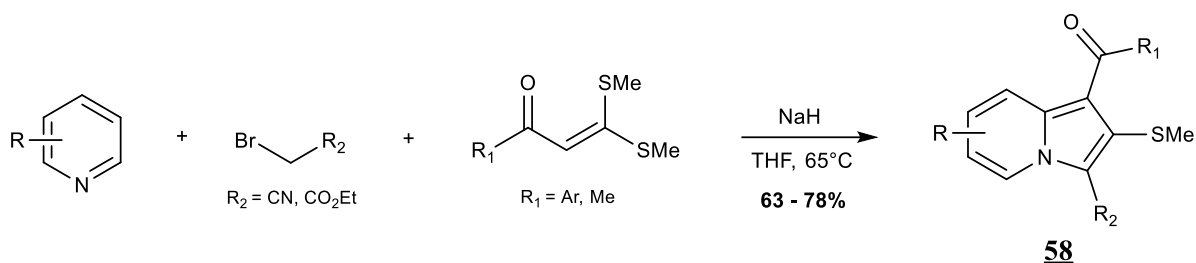
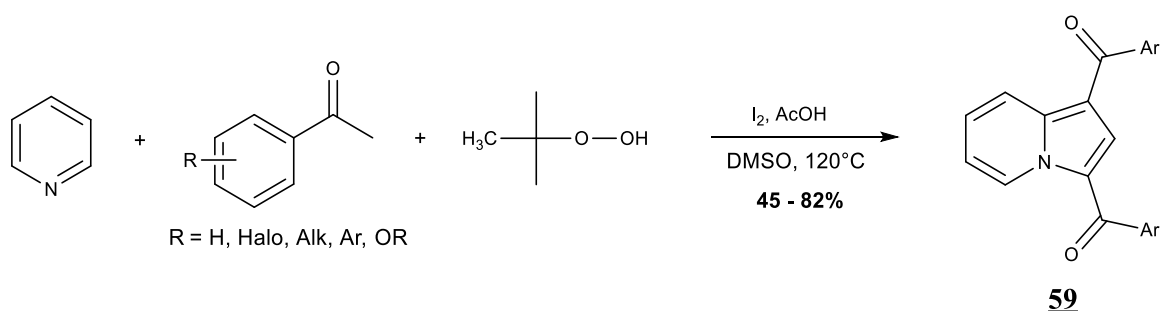


Schéma 72: Synthèse one-pot de 2-méthylsulfanylindolizines

Un procédé oxydatif en cascade inédit datant de 2020 et produisant des indolizines non-substituées en position 2 est publié par Zhang *et al.* Médiée par l'iode, la réaction décrite dans le Schéma 73 fournit le produit **59** à partir de pyridine, de dérivés d'acétophénone et

d'hydroperoxyde de *tert*-butyle (TBHP). Des intermédiaires radicalaires participent au processus. En effet, le mécanisme proposé par les auteurs met en jeu un radical méthyle **ii** dérivé du TBHP et un radical pyridinium **D** qui génèrent ensemble l'intermédiaire α - β -insaturé **F** à l'aide du radical tert-butoxy **i**. La cycloaddition de **F** et de l'ylure de pyridinium **C** formé *in situ* conduit à l'intermédiaire **G** puis à la dihydroindolizine **H** après élimination d'une pyridine. Une oxydation fournit par la suite le produit désiré avec un rendement élevé (jusqu'à 82%).



Mécanisme proposé:

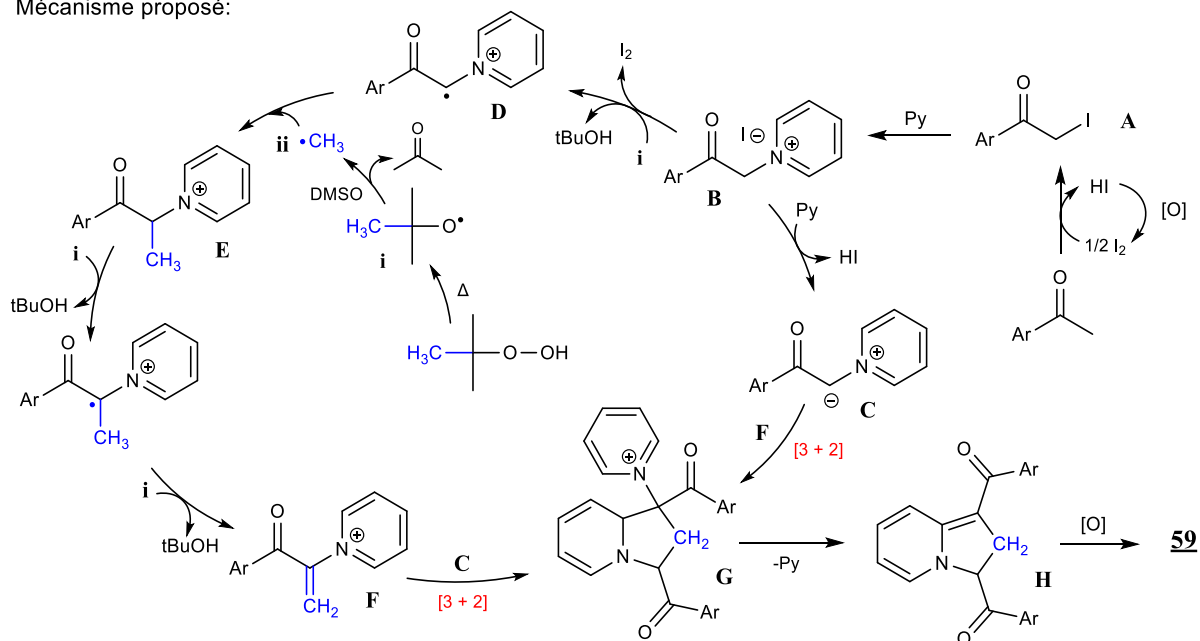


Schéma 73: Synthèse one-pot d'indolizine non-substituée en position 2 à partir de pyridine, d'acétophénone et de TBHP catalysée par l'iode

Maintenant qu'un historique global de la stratégie [3+2] a été présenté, nous pouvons aborder les travaux qui ont inspiré ce projet de thèse, précédemment entrepris au sein de l'équipe COMET du DPM par Bonte *et al.*¹⁰² La cycloaddition d'esters propioliques avec des ylures de pyridinium para-substitués, générés *in situ* à partir des sels correspondants, a été étudiée dans différents solvants. Elle s'est avérée possible dans l'eau avec des rendements faibles à modérés, pourvu que le noyau pyridine porte un groupement électroattracteur supplémentaire R₁ (Schéma 74).

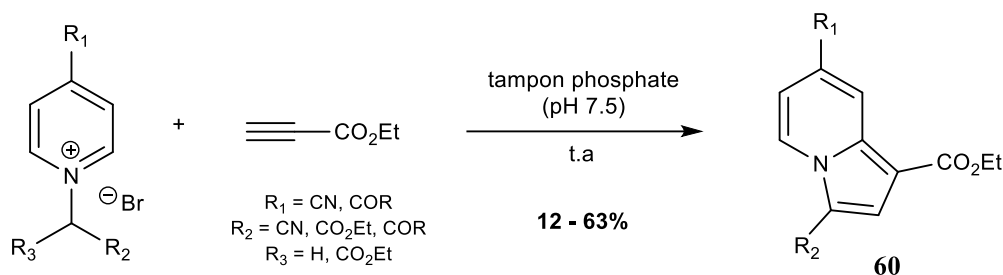


Schéma 74 : Cycloaddition 1,3-dipolaire d'ylures de pyridinium et d'éthyle propiolique en milieu aqueux

En effet, les fonctions esters, nitriles ou cétones en position 4 abaissent la constante d'ionisation des sels de pyridinium¹⁰³ par délocalisation de la charge négative de l'ylure sur R₁ : une valeur de pKa aussi faible que 7,07 a été atteinte pour R₁ = CN, R₂ = *p*-PhNO₂ et R₃ = H. Cela favorise la déprotonation de l'ylure en tampon aqueux et permet à la cycloaddition de se dérouler en conditions très douces. Des indolizines peuvent ainsi être obtenues à température ambiante et à pH 7.5 quasi-physiologique. Notons que si le méthylène porte un second groupement électroattracteur, le pKa chute aux alentours de 5. Dans ce cas-là, le pyridinium existe principalement sous forme d'ylure, expliquant la plus grande réactivité observée par rapport à l'espèce monosubstituée (63% contre 24% de rendement isolé au maximum).

En ce qui concerne leur fluorescence, les indolizines 1,2,3-trisubstituées synthétisées ont été caractérisées par des longueurs d'onde d'émission allant de 400 à 480 nm.¹⁰⁴ Il a par ailleurs été démontré qu'une augmentation de la délocalisation électronique sur la position 7 de l'hétérocycle venait considérablement augmenter l'intensité du signal.

Ces travaux ont ainsi démontré la potentielle compatibilité de la cycloaddition 1,3-dipolaire avec des biomolécules telles que les protéines ou les oligonucléotides, polymères sensibles aux environnements plus rudes. Ce fut une découverte forte intrigante qui a ouvert la porte à une nouvelle application pour les indolizines. Comme il a été établi lors de l'inventaire des méthodologies disponibles, elles sont rarement réalisables dans l'eau ou sans catalyse métallique, ce qui explique pourquoi la formation d'indolizine en présence d'ADN est restée

inexplorée jusqu'à présent. Dans le but d'exploiter la fluorescence de l'hétérocycle générée après cycloaddition, le modèle aptamère divisé **AptaSplit-Indo** pour la détection de petites cibles a été conçu (Figure 24). On rappelle que dans le cadre de ce modèle, la cycloaddition 1,3-dipolaire est dite « templatée » par l'ADN : l'assemblage supramoléculaire *fragments aptamères-cible* rapproche les deux précurseurs et favorise ainsi leur réaction.

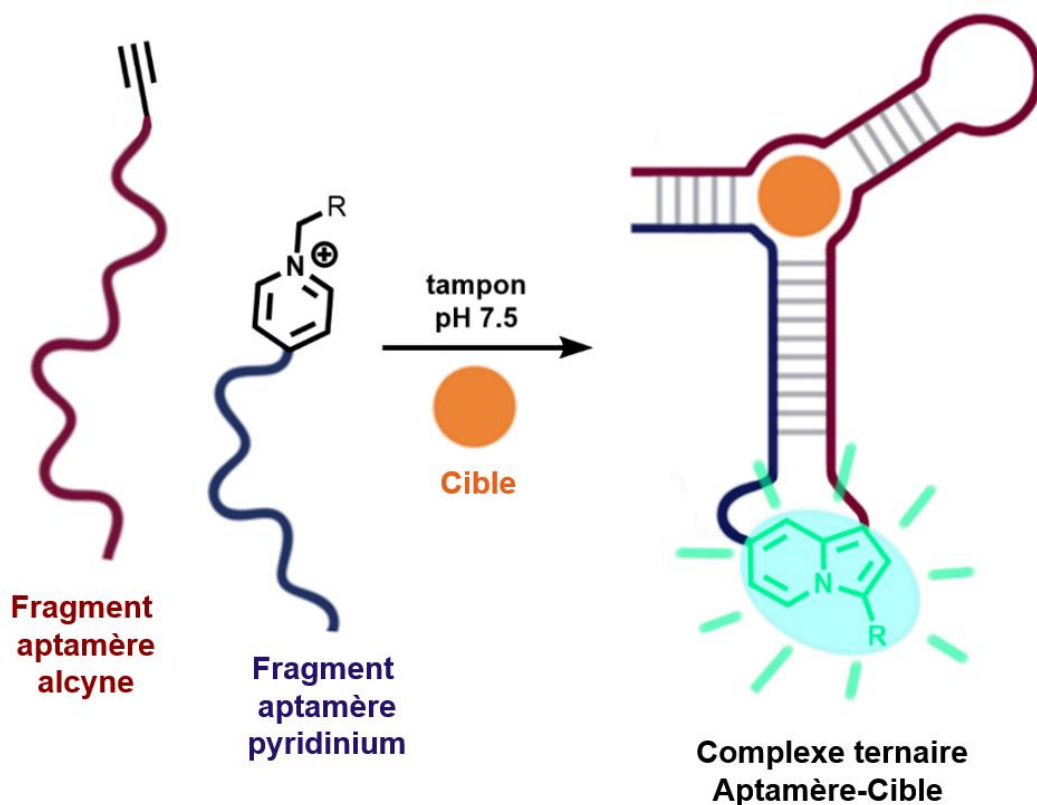


Figure 24 : Modèle **AptaSplit-Indo** pour la détection de cibles d'intérêt médiée par la cycloaddition 1,3-dipolaire de brins d'aptamères fragmentés générant de la fluorescence

En ce qui concerne l'alcyne activé, le *N*-hexylpropiolamide joue le rôle du dipolarophile. Il a en effet été démontré que les amides propioliques sont capables de participer à la cycloaddition.¹⁰² Ce fut une observation intéressante et pratique car la triple liaison peut être directement introduite sur un oligonucléotide portant une fonction amine à son extrémité 3' ou 5'. La chaîne carbonée, quant à elle, mime la longueur du linker C₆-NH₂ qui peut être directement ajouté à l'ADN lors de sa synthèse automatisée.

Les indolizines dérivées de ces précurseurs seront donc trisubstituées. Puisqu'elles porteront toutes des fonctions amides en position 1 et 7, le groupement R offre la seule source de variation chimique possible. Son effet sur la cycloaddition ainsi que les propriétés photophysiques des fluorophores résultants seront donc étudiés sur des modèles simples, c'est-à-dire sans les brins d'oligonucléotides (nous qualifions alors les précurseurs et les indolizines correspondantes comme étant à l'état « libre » ou non conjugué). En ce qui concerne la nature de ce substituant, des dérivés acétophénones et amides sont préférés. Ce choix s'explique par la forte réactivité des cyanométhylures de pyridinium, largement étayée par la littérature, tandis que les esters, également très réactifs, courent en plus le risque d'être hydrolysés en milieu aqueux.

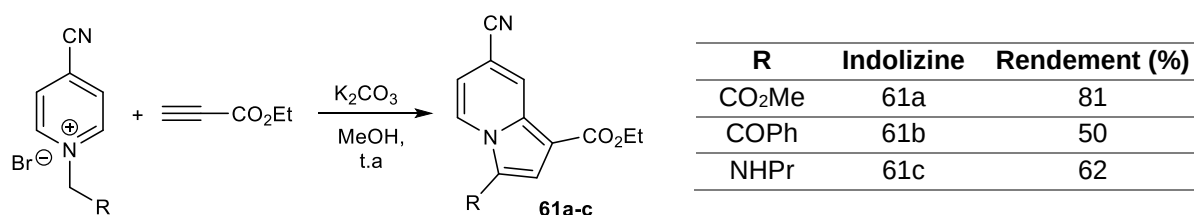


Tableau 1 : Influence du substituant R sur le rendement de la cycloaddition

L'impact du substituant R sur la réactivité de la cycloaddition est illustré de manière plus concrète par le Tableau 1, basé sur des résultats antérieurs obtenus au sein du laboratoire. La réaction dans le méthanol d'ylures de 4-cyanopyridinium avec le propiolate d'éthyle fournit des rendements plus modérés lorsque R = COPh ou NHPr comparés à un ester. Ils devraient être encore plus bas dans l'eau en raison de la faible solubilité du dipolarophile en milieu aqueux.

Cela étant dit, la préparation de nos indolizines libres va maintenant être abordée.

A. Synthèse d'indolizines trisubstituées par cycloaddition 1,3-dipolaire

1. Synthèse des sels de pyridinium (série PG = Boc)

La première synthèse d'ylures de pyridinium stables remonte à 1935.¹⁰⁸ Depuis les travaux de Kröhnke, la chimie de ces dipôles a largement été explorée et passée en revue.^{109,110} Ce sont des éléments de base pour la préparation de divers pyrroles et polyazoles fusionnés (indolizines, benzotriazoles, benzodiazépines etc) ainsi que pour la synthèse d'hétérocycles oxygénés ou sulfurés tels que les furanes ou thiophènes. Bien qu'il s'agisse d'un outil extrêmement utile et polyvalent, les voies d'obtention de l'ylure sont loin d'être aussi variées que ses applications.

En 1984, Miki et ses collaborateurs décrivent la synthèse originale en deux étapes de *N*-méthylure à partir d'un triflate de pyridinium portant un groupement TMS en position β .¹¹¹ Formé par réaction de la pyridine avec le triméthylsilylméthyl triflate, le sel est ensuite désilylé à l'aide d'ions fluorures. L'ylure généré n'est pas isolé : il est directement transformé en indolizine en présence de DMAD (Schéma 75).

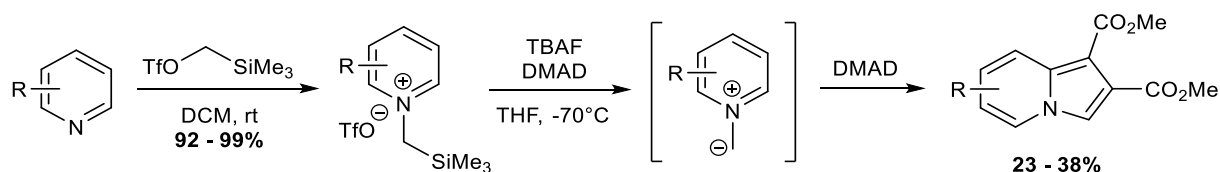


Schéma 75 : Synthèse d'ylures de pyridinium par désilylation

Une méthode alternative rapportée par le groupe de Platz fait appel à la décomposition photochimique de composés diazos (Schéma 76). L'ylure est alors assemblé à partir d'un intermédiaire carbène piégé par la pyridine. Le premier exemple est publié en 1988 et implique la photolyse de la phénylchlorodiazirine en présence de pyridine et de DMAD.¹¹² Cette réaction génère l'indolizine **31** avec un rendement de 30% en passant par un méthylure de chlorophénylpyridinium. La diazirine peut également être remplacée par une α -diazocétone.¹¹³ Dans ce cas, les produits de la photolyse dépendent de sa conformation : un isomère *cis* conduit à la formation d'un cétène, tandis que l'irradiation lumineuse de l'isomère *trans* libère du diazote et un carbène. Ce dernier peut ensuite être isomérisé en oxirène mais les deux formes réagissent avec la pyridine pour générer l'ylure désiré. Cette voie est certes économe en termes d'atomes avec une génération de sous-produits sans trace mais les rendements associés restent faibles.

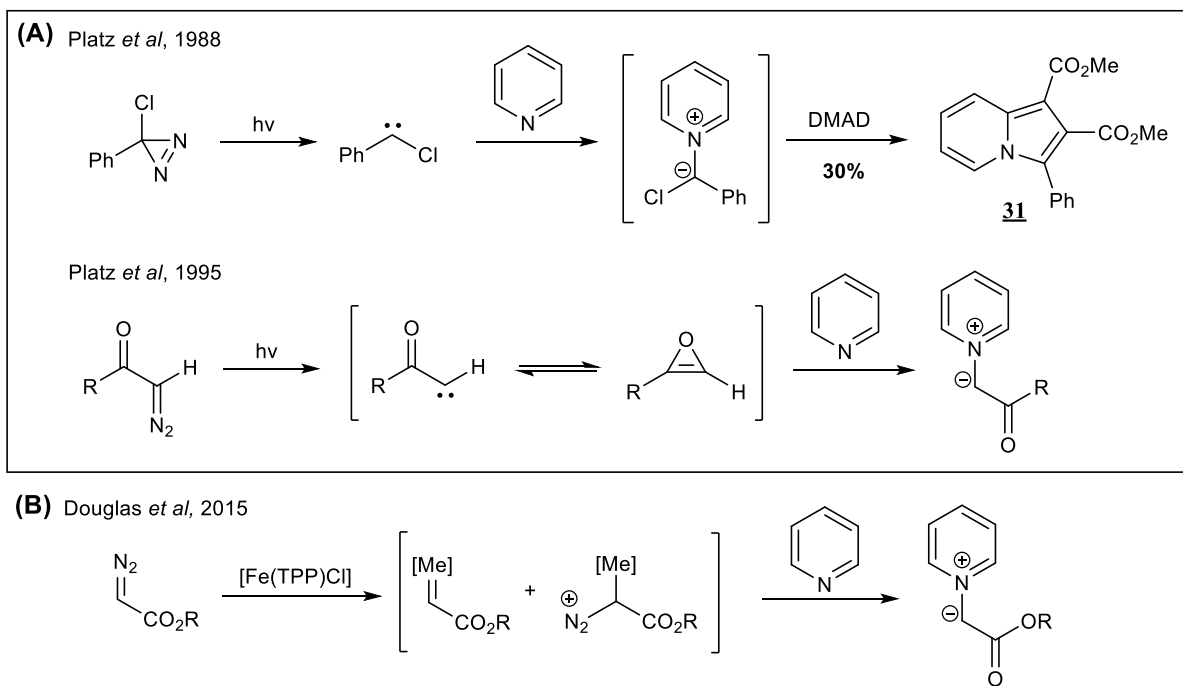


Schéma 76 : A) Synthèse d'ylures de pyridinium par photolyse de composés diazos ; B) ylures de pyridinium générés catalytiquement à partir de composés diazo à l'aide de métaux

Dans la partie I.A du chapitre, nous avons vu que les ylures de pyridinium peuvent également être générés à partir de composés diazo en utilisant des catalyseurs métalliques tels que le fer (III), et ce à partir d'un intermédiaire carbénoïde métallique illustré ci-dessus. Les rendements peuvent atteindre jusqu'à 89%, cependant l'utilisation de catalyseur représente un coût supplémentaire pour la synthèse.

Une stratégie efficace ne nécessitant pas de métaux est décrite dans les années 60 par Linn et ses collègues.⁶⁹ La réaction de la pyridine avec l'oxyde de tétracyanoéthylène (TCNEO), facilement préparé à partir de tétracyanoéthylène et de peroxyde d'hydrogène, engendre le dicyanométhylure de pyridinium avec un rendement quantitatif (Schéma 77).¹¹⁴

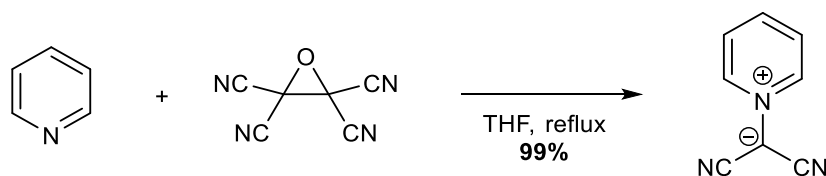


Schéma 77 : Synthèse de dicyanométhylures de pyridinium à partir d'oxyde de tétracyanoéthylène

Aussi fructueuse soit-elle, cette méthodologie reste limitée en termes d'utilisation car son produit ne peut fournir que des 3-cyanoindolizines après cycloaddition. Le protocole le plus versatile et le plus simple reste la stratégie traditionnelle employée par Kröhnke¹¹⁵: une alkylation de la pyridine à l'aide de dérivés halogénés suivie de la déprotonation du sel obtenu (Schéma 78).

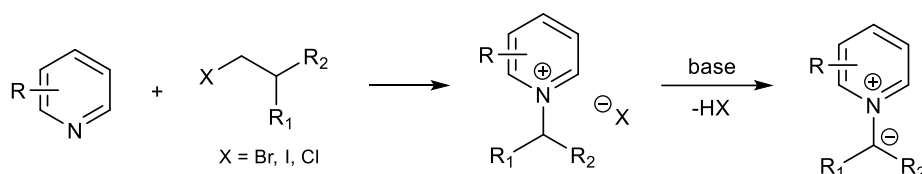


Schéma 78 : Synthèse de d'ylures de pyridinium à partir de dérivés halogénés

Le rendement de ces conversions ainsi que la stabilité du produit dépendent fortement des substituants portés par la pyridine et par l'agent alkylant.¹¹⁶ Par exemple, les tentatives de synthèse du dicyanométhylure à l'aide de bromomalonitrile ont échoué, alors que le pyridinium dérivé du bromocyanoacétate de méthyle est directement obtenu sous forme d'ylure, sans nécessiter l'ajout d'une base en raison de sa forte acidité.

Nos sels de pyridinium ont été préparés suivant cette méthodologie, à l'image de travaux déjà réalisés au sein de l'équipe. Pour ce faire, le couplage du linker amino-oxy au noyau pyridine a d'abord été entrepris. Lors de nos synthèses, le *tert*-butyloxycarbonyl (Boc) a initialement été choisi comme groupement protecteur acido-labile, conduisant à une première gamme de précurseurs. Nous verrons plus tard que la protection Boc conduit à des difficultés durant l'étape de cycloaddition.

La chaîne oxyamine est facilement préparée à partir de *N*-3-bromopropylphthalimide et de *N*-Boc-hydroxylamine (Schéma 79). Après la substitution, le phthalimide est éliminé à l'aide de l'hydrate d'hydrazine pour générer l'amine libre **63**. Le rendement modéré de cette déprotection (53%) s'explique par des pertes survenues lors de l'étape d'extraction due à la solubilité du produit dans l'eau.

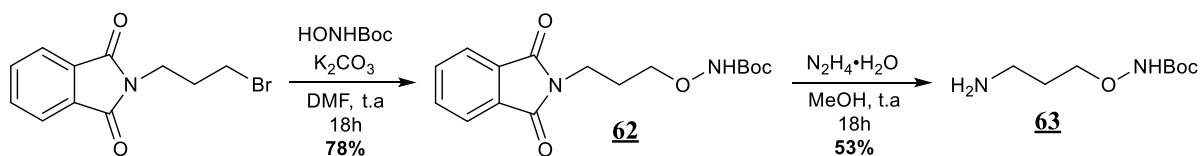


Schéma 79 : Synthèse du linker amino-oxy *tert*-butyl (3-aminopropoxy)carbamate **63**

Un ester activé de l'acide isonicotinique, synthétisé en utilisant du *para*-nitrophénol et du DCC comme agent de couplage en présence de quantité catalytique de DMAP, est ensuite mis en réaction avec l'amine **63** pour former la pyridine 4-substituée **65** prête à être alkylée (Schéma 80).

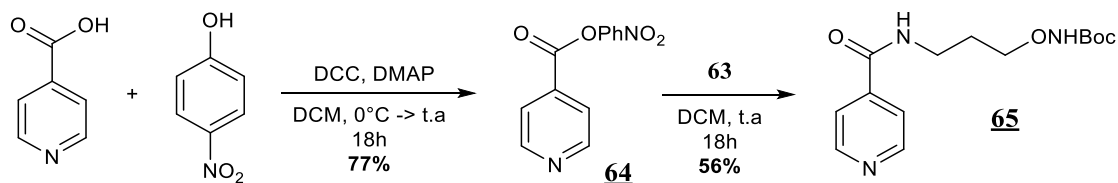
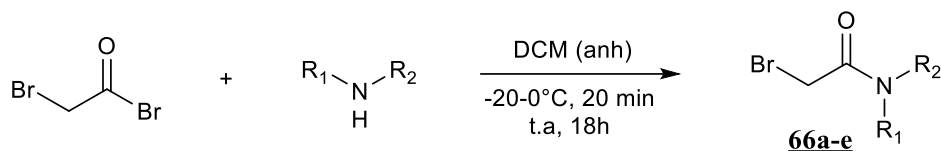


Schéma 80 : Synthèse du *tert*-butyl (3-(isonicotinamido)propoxy)carbamate **65**

Les bromures utilisés lors de l'étape suivante sont pour la plupart disponibles dans le commerce mais quelques-uns ont été synthétisés au laboratoire. C'est le cas des 2-bromoacétamides **66a-e**, facilement préparés à partir de bromure de bromoacétyle et d'amines (Tableau 2). On constate que les amides tertiaires sont obtenus avec de meilleurs rendements (entrées 1, 2 et 5).



Entrée	Produit	R ₁	R ₂	Rendement (%)
1	66a	Me	Me	76
2	66b	Et	Et	71
3	66c	H	Pr	57
4	66d	H	Ph	25
5	66e	Me	Ph	76

Tableau 2 : Synthèse de α -bromoacétamides **66a-e**

Les bromoacétophénones ont quant à elles été directement obtenues commercialement à l'exception du composé **67**, synthétisé par bromation de la *para*-chloroacétophénone à l'aide de bromure de cuivre (II) (Schéma 81).

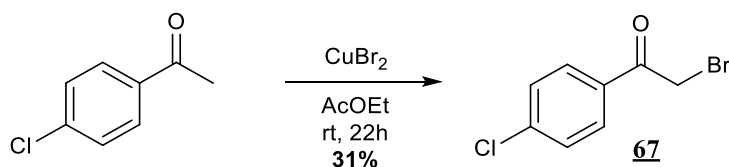
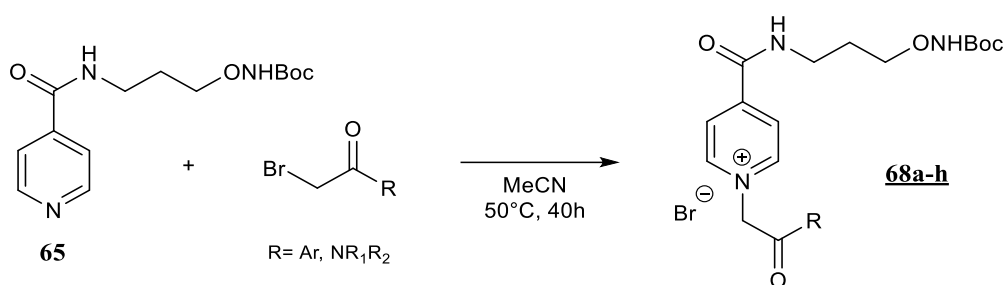


Schéma 81 : Synthèse de 2-Bromo-4'-chloroacetophenone

Une première famille de 8 sels de pyridinium est ainsi générée par alkylation du dérivé de pyridine **65**. Les résultats de cette réaction, effectuée dans l'acétonitrile pendant 40 heures, sont rassemblés dans le Tableau 3. Il a été précédemment rapporté qu'une augmentation de la température est défavorable pour cette transformation, expliquant pourquoi elle est effectuée à 50°C. Cela dit, le rendement du composé **68a** passe de 56 à 74% lorsque la transformation procède à reflux. Dans les conditions décrites ci-dessous, les rendements restent modérés à bons.



Entrée	R	Sel de pyridinium	Rendement (%)
1	Ph	68a	56
2	<i>p</i> -PhOMe	68b	68
3	<i>p</i> -PhC ₆ H ₅	68c	87
4	<i>p</i> -PhNO ₂	68d	86
5	NMe ₂	68e	25
6	NHPr	68f	47
7	NHPh	68g	40
8	NMePh	68h	25

Tableau 3 : Synthèse de la première série de sels de pyridinium (PG = Boc) **68a-h**

Les dérivés acétophénone (entrées 1 à 4, 56 à 87%) ont été isolés en quantité supérieure par rapport aux sels de pyridinium portant une fonction amide en position méthylure (entrées 5 à 8, 25 à 47%). Les amides tertiaires donnent lieu à des rendements particulièrement faibles. Lorsqu'un précipité se forme au cours de la réaction, une purification du sel quaternaire est possible par simple trituration du brut dans l'éther. Malheureusement, dans la plupart des cas, aucun précipité n'a été observé et une chromatographie sur colonne s'est avérée nécessaire. Cela a entraîné une perte substantielle de quantité de produits isolés. La purification de ces composés a en effet été difficile car des mélanges très polaires sont nécessaires pour l'élution des pyridinium sur silice : du méthanol à 100% et même des mélanges d'eau et d'alcools ont dû être utilisés. Par conséquent, des impuretés minoritaires sont parfois retrouvées dans les fractions récoltées. Des méthodes de purification alternatives, telles qu'une chromatographie sur oxyde d'aluminium ou une extraction à pH contrôlé ou même diverses tentatives de recristallisation, n'ont pas abouti à de meilleurs résultats. Une chromatographie en phase inverse est probablement mieux adaptée à cette série de molécules polaires. Cela dit, les difficultés rencontrées lors de l'étape de purification sont dues à la chaîne oxyamine *N*-Boc puisque, comme nous le verrons plus tard, elles disparaissent dès que le groupement protecteur est modifié.

2. Cycloaddition des 1,3-dipolaire des sels de pyridinium (série PG = Boc)

Une fois les sels de pyridinium synthétisés, le précurseur dipolarophile de la cycloaddition est préparé. Pour ce faire, différentes approches synthétiques ont été testées (Schéma 82). En effet, l'obtention du *N*-hexylpropiolamide **69** par couplage d'acide propiolique et d'hexylamine est limitée par des réactions d'addition 1,4 parasites. En espérant contourner ce problème, le chlorure d'acyle (route B) et l'alcyne protégé par un groupement TMS (route C) ont été utilisés, mais les meilleurs rendements (31%) ont finalement été obtenus en passant par un ester activé de l'acide propiolique (route D).

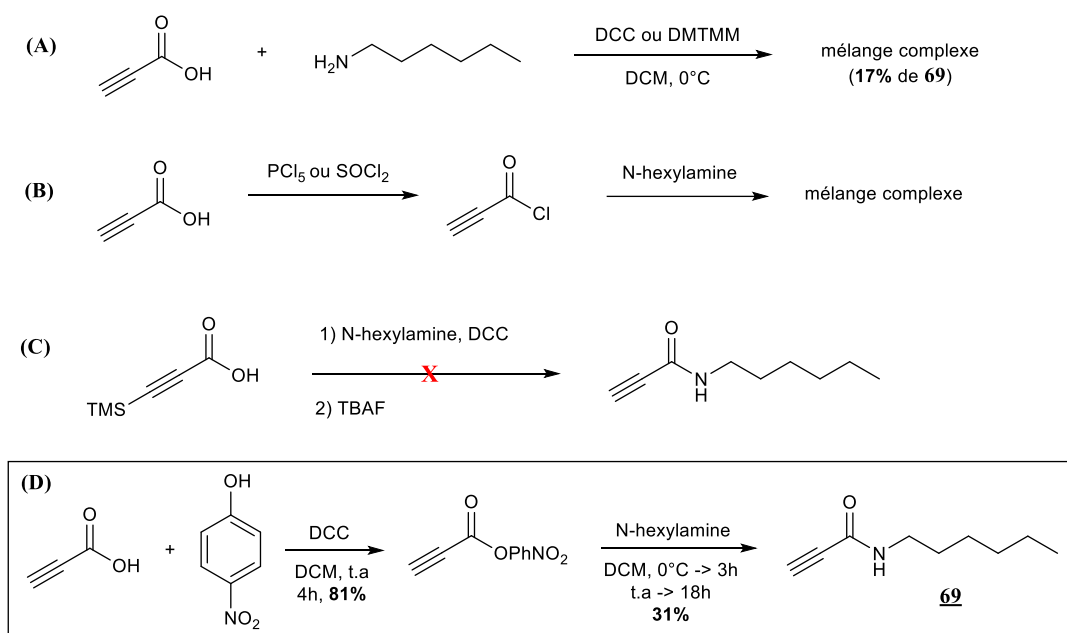
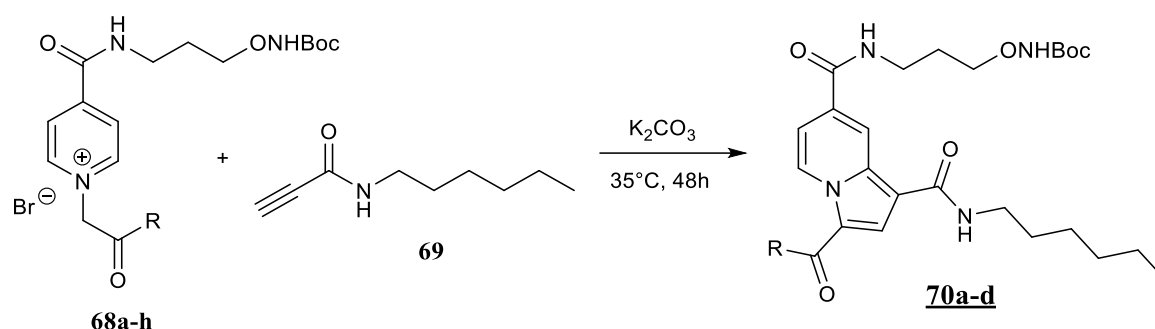


Schéma 82 : Synthèse de *N*-hexylpropiolamide **69**

Les cycloadditions de quatre sels de pyridinium avec l'alcyne activé ont été réalisées à 35°C en milieu aqueux (pH 7-8) en utilisant le K_2CO_3 comme base pour la génération *in situ* d'ylures. Le carbonate de potassium a été préféré à NEt_3 pour minimiser les risques d'addition de Michael sur la triple liaison : des sels de vinyltrialkylammonium peuvent en effet être générés par réaction de la triéthylamine aqueuse avec un acétylène.¹¹⁷ Les cycloadditions ont été suivies par CCM : la formation des indolizines **70a-d** est rapidement visible grâce à l'apparition d'une tache relativement apolaire correspondant au produit aromatique bicyclique, caractérisé par une intense fluorescence bleue sous lampe UV ($\lambda=365$ nm). Notons que le point est flanqué par une longue traînée fluorescente. Les résultats de la cycloaddition sont rassemblés dans le Tableau 4.



Entrée	R	Condition	Indolizine	Rendement (%)
1	Ph	K ₂ CO ₃ , H ₂ O, pH 7-8	70a	40
2	Ph	K ₂ CO ₃ , DMF, 45°C	70a	15
3	<i>p</i> -PhOMe	K ₂ CO ₃ , H ₂ O, pH 7-8	70b	49
4	<i>p</i> -PhC ₆ H ₅	K ₂ CO ₃ , H ₂ O, pH 7-8	70c	35
5	NMe ₂	K ₂ CO ₃ , H ₂ O, pH 7-8	70d	16
6	NMe ₂	K ₂ CO ₃ , DMF, 45°C	70d	9

Tableau 4 : Cycloaddition [3+2] des sels de pyridinium **68a-d** avec le *N*-hexylpropiolamide **69**

Malgré la génération quasi immédiate de fluorescence, une réactivité limitée a été observée pour l'ensemble de la série. Après 48 heures, les réactifs ne sont toujours pas entièrement consommés. Aucune évolution n'est observée par prolongation de la durée réactionnelle.

Les rendements obtenus après chromatographie sur colonne sont modérés à faibles, allant de 49% à 16% selon le substituant porté par le méthylure. Nous reviendrons sur ces effets électroniques plus loin dans le chapitre. De faibles rendements dans l'eau étaient attendus (et désirés) : la faible solubilité du dipolarophile en milieu aqueux limite la réactivité, et il est probable que le pyridinium ne soit que partiellement sous sa forme ylure dans le carbonate de potassium. Plus surprenant est le fait que les rendements isolés sont plus faibles lorsque la réaction est conduite en milieu organique (entrées 2 et 6). Dans le DMF, l'indolizine **70a** est obtenue avec un rendement de 16% contre 40% dans l'eau. Une tendance similaire est observée pour le composé **70d**.

Notons que les rendements indiqués dans le tableau ne représentent pas avec précision l'efficacité de la cycloaddition. En effet, une difficulté persistante a été rencontrée lors de l'étape de purification : une impureté est retrouvée au sein des produits isolés à travers toute la série, même après plusieurs chromatographies sur silice et lavages subséquents. Les spectres RMN ¹H présentent les signaux attendus pour la partie aromatique des indolizines. La formation du produit désiré est par ailleurs corroborée par spectrométrie de masse. Cependant, des intégrations spectrales incorrectes sont trouvées pour la partie aliphatique de la molécule, spécifiquement entre 2 et 0 ppm. Le profil affiché est en accord avec l'apparence théorique du spectre, mais les intégrations s'avèrent être trop élevées. Les signaux associés

à ce phénomène correspondent aux protons de la chaîne carbonée C₆ de la fonction amide en position 1 de l'indolizine. À titre d'exemple, le triplet trouvé à $\delta = 0,87$ ppm pour l'indolizine **70a**, correspondant au CH₃ terminal du squelette hexyle, présente une valeur de I = 13 (Annexe I).

L'hypothèse initialement suggérée impliquerait la réaction de l'indolizine désirée avec une seconde molécule de *N*-hexylpropiolamide via une addition aza-Michael de l'oxyamine protégée. Ceci est illustré dans le Schéma 83. Une telle réaction serait éventuellement favorisée par un solvant protique¹¹⁸, ce qui expliquerait par la même occasion les « rendements » plus élevés observés dans l'eau comparés au DMF (qui correspondent à la formation de l'indolizine et du produit secondaire).

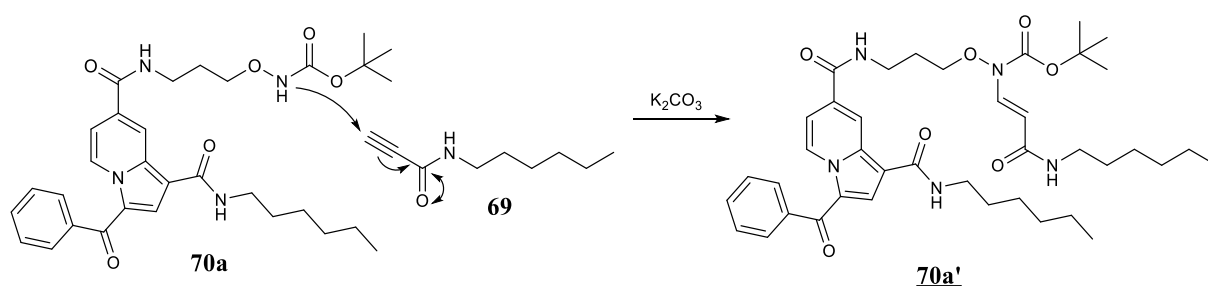


Schéma 83 : Réaction secondaire initialement suggérée

Le raisonnement derrière cette suggestion provient de la réaction des *N*-hydroxycarbamates protégés avec des électrophiles tels que l'iodure de méthyle, décrite dans la littérature en 1989.¹¹⁹ Cela dit, de telles alkylations nécessitent généralement une base forte comme l'hydruure de sodium pour retirer le proton du carbamate. Il semble peu probable que le carbonate de potassium soit suffisant pour promouvoir l'addition Aza-Michael proposée. L'absence de protons vinyliques dans les spectres RMN ne plaide pas en faveur de cette explication. De plus, l'ion correspondant à la masse calculée pour **70a'** n'est pas détecté par spectrométrie de masse ESI (en mode positif et négatif). Cependant, les intégrations aberrantes pourraient être dues à un adduit non-covalent entre l'indolizine et l'alcyne.

La première hypothèse signifie que le groupement Boc ne protège pas efficacement l'oxyamine pour nos objectifs. Afin de tester cette théorie et confirmer que les problèmes de purification sont liés au *tert*-butoxycarbonyl, la cycloaddition est réalisée avec un sel de pyridinium sans fonction amino-oxy protégée (Schéma 84). Pour ce faire le *N*-propylisonicotinamide **71**, obtenu par couplage DCC de l'acide isonicotinique et de la *N*-propylamine, est alkylé à l'aide de bromure de phénacyle. Le sel de pyridinium **72** généré est ensuite mis en réaction avec le *N*-hexylpropiolamide en présence de K₂CO₃. Après 22 heures d'agitation dans le DMF à 60°C, l'indolizine **73** est produite avec 14% de rendement. Cette

fois, la purification est simple : une seule colonne est nécessaire, donnant lieu au produit pur présentant les intégrations spectrales attendues pour tous les signaux de la molécule.

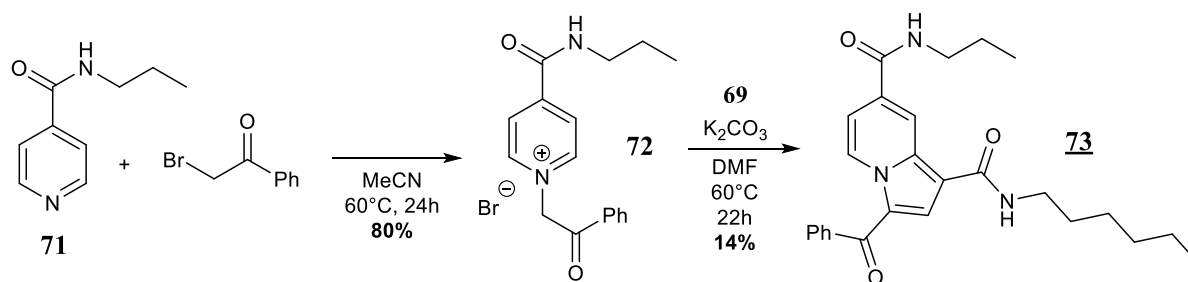


Schéma 84 : Synthèse de 3-benzoyl-N1-hexyl-N7-propylindolizine-1,7-dicarboxamide **73**

Cette expérience de contrôle a rendu indéniable le fait que le groupement Boc ne permet pas une cycloaddition « propre ». Afin de s'assurer que le problème est lié au Boc et non pas à la présence de l'oxyamine elle-même, des groupements protecteurs alternatifs ont été testés.

3. Synthèse de la seconde série de sels de pyridinium (PG = Ei)

La deuxième protection envisagée a été le groupement trityle car ce dernier peut facilement être introduit en partant de l'intermédiaire **65** précédemment synthétisé. La préparation de l'indolizine —ONHTr **76** (et ses précurseurs) est détaillée dans la Partie Expérimentale. Mais comme pour la série Boc, une impureté est isolée avec le produit de la cycloaddition et les intégrations spectrales sont toujours incorrectes pour les signaux inférieurs à 2 ppm. Une troisième protection acido-labile a alors été envisagée. Cette fois-ci, la possibilité de déprotoner l'oxyamine *N*-protégée secondaire est éliminée par l'utilisation d'un groupe acétimide d'éthyle (ou 1-éthoxyéthylidène ; PG = Ei). Pour ce faire, le linker est préparé selon une voie de synthèse analogue à celle décrite lors de la synthèse des sels de pyridinium *N*-Boc (Schéma 85).

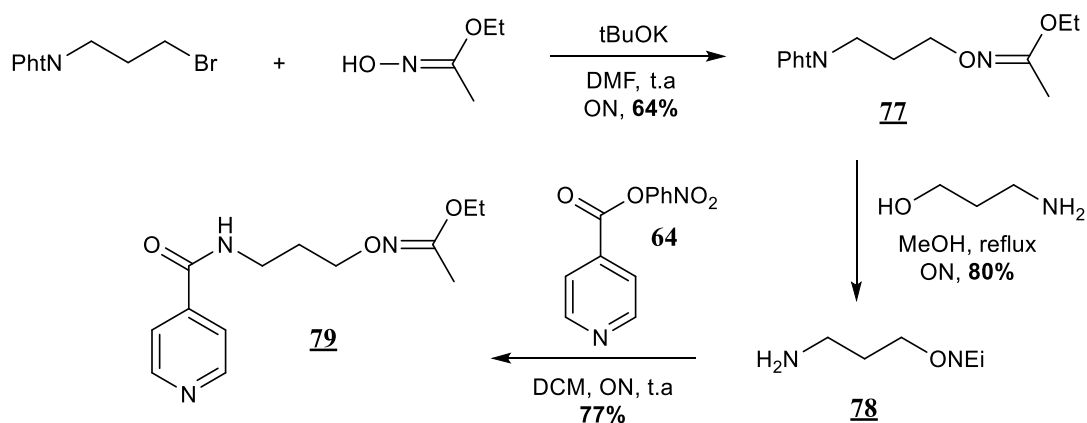
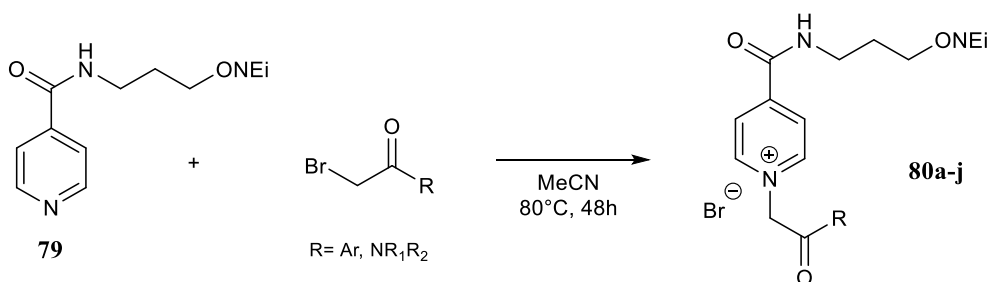


Schéma 85 : Synthèse d'éthyl *N*-(3-(isonicotinamido)propoxy)acétimide **79**

Le *N*-(3-bromopropyl)phtalimide réagit avec le *N*-hydroxyacétimide d'éthyle pour former l'intermédiaire **77** avec un rendement de 64%. Puisque le pKa du *N*-hydroxyacétimide est supérieur à celui de la *N*-Boc-hydroxylamine (~14 contre 9), la substitution est plus efficace lorsque le *tert*-butylate de potassium remplace le K₂CO₃. L'utilisation de DIPEA ou de NaH conduit à des rendements inférieurs. La déprotection du phtalimide nécessite l'utilisation du 3-aminopropanol à la place de l'hydrazine. L'amine **78** ainsi libérée est ensuite couplée à l'acide isonicotinique par réaction avec l'ester activé **64**. Le produit **79** est obtenu avec un rendement global de 40%.

Une seconde famille comptant 10 sels de pyridinium est ensuite synthétisée. Les alkylations se déroulent dans de l'acétonitrile à reflux pendant 48 heures et se concluent par de bons rendements (63-89%). Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 5. Contrairement à la première série, aucune chromatographie sur colonne n'est nécessaire même lorsqu'aucun précipité ne se forme : après évaporation du solvant, une simple trituration du résidu dans l'éther suffit à isoler le produit pur. La nature du substituant R n'a pas d'effet considérable sur la réaction puisque les rendements moyens sont comparables pour les sous-séries acétophénone et amide (**80a-f** et **80h-j** respectivement). La présence d'un substituant donneur d'électrons en position *para* de l'acétophénone (entrée 2 et 5) entraîne une légère diminution du rendement par rapport aux groupements électroattracteurs ou à l'analogue non substitué. En ce qui concerne les spectres RMN, le signal CH₂ du méthylène apparaît généralement sous la forme d'un singulet situé entre 6,6 et 5,5 ppm. Une multiplicité différente et une intégration inférieure à celles attendues sont observées pour les composés **80a**, **c** et **e**, tandis que le signal est complètement absent pour **80d**. Ceci est probablement dû à un échange H/D rapide dans le MeOD. Le singulet est décalé vers la droite pour la sous-série **80g-j**, expliqué par le caractère moins électroattracteur de l'amide.

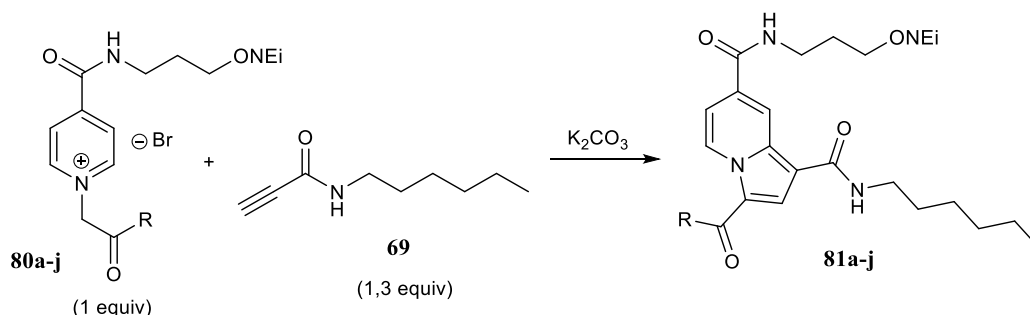


Entrée	R	Sel de pyridinium	Rendement (%)
1	Ph	80a	89
2	<i>p</i> -PhOMe	80b	72
3	<i>p</i> -PhC ₆ H ₅	80c	81
4	<i>p</i> -PhNO ₂	80d	80
5	<i>p</i> -PhNMe ₂	80e	70

6	<i>p</i> -PhCl	80f	81
7	NHPr	80g	63
8	NEt ₂	80h	81
9	NHPh	80i	83
10	NMePh	80j	77

Tableau 5 : Synthèse de la première série de sels de pyridinium (PG = Ei) **80a-j**

Un premier essai a été effectué avec le sel de pyridinium **80a**. Lorsque la cycloaddition est réalisée dans l'eau ou dans l'acétonitrile (Tableau 6, entrées 2 et 1 respectivement), l'indolizine **81a** correspondante présente le profil RMN ¹H correct, sans impuretés détectées après chromatographie sur colonne (Annexe II). Il en est de même pour le reste de la série. L'acétimide d'éthyle est ainsi considéré comme le groupement protecteur amino-oxy le plus adapté à nos besoins. Dans le but de générer les plus grandes quantités de produits possibles pour les caractérisations ultérieures, le reste des cycloadditions a été principalement réalisé en milieu organique et à température élevée (70°C, 18h). L'acétonitrile a été préféré au DMF car les tentatives précédentes dans ce dernier ont conduit à une conversion réduite. Par gain de temps, les réactions en milieu aqueux n'ont pas été étendues à toute la série et ont uniquement été réservées aux fluorophores sélectionnés après études photophysiques (voir p. 101).



Entrée	R	Condition	Indolizine	Rendement (%)
1	Ph	K ₂ CO ₃ (2 eq), MeCN, 70°C, 18h	81a	15
2	Ph	K ₂ CO ₃ , H ₂ O, pH 7-8, 35°C, 48h	81a	4
3	<i>p</i> -PhOMe	K ₂ CO ₃ (2 eq), MeCN, 70°C, 18h	81b	18
4	<i>p</i> -PhOMe	K ₂ CO ₃ , H ₂ O, pH 7-8, 35°C, 48h	81b	14
5	<i>p</i> -PhC ₆ H ₅	K ₂ CO ₃ (2 eq), MeCN, 70°C, 18h	81c	23
6	<i>p</i> -PhNO ₂	K ₂ CO ₃ (2 eq), MeCN, 70°C, 18h	81d	9
7	<i>p</i> -PhNMe ₂	K ₂ CO ₃ (2 eq), MeCN, 70°C, 18h	81e	34
8	<i>p</i> -PhCl	K ₂ CO ₃ (2 eq), MeCN, 70°C, 18h	81f	8
9	NHPr	K ₂ CO ₃ (2 eq), MeCN, 70°C, 18h	81g	24
10	NHPr	K ₂ CO ₃ , H ₂ O, pH 7-8, 35°C, 48h	81g	10

11	NEt ₂	K ₂ CO ₃ (2 eq), MeCN, 70°C, 18h	81h	33
12	NEt ₂	K ₂ CO ₃ , H ₂ O, pH 7-8, 35°C, 48h	81h	13
13	NHPh	K ₂ CO ₃ (2 eq), MeCN, 70°C, 18h	81i	23
14	NMePh	K ₂ CO ₃ (2 eq), MeCN, 70°C, 18h	81j	42

Tableau 6 : Cycloaddition [3+2] des sels de pyridinium **80a-j** avec le N-hexylpropiolamide **69**

Malgré l'activation thermique, les rendements restent modérés à faibles dans l'acétonitrile (42 à 8%). Ce rendement dépend de la nature du substituant acylé R. En général, les sels de pyridinium portant un amide sur le carbone méthylène (entrées 9-14) semblent être plus réactifs vis-à-vis de la cycloaddition par rapport aux dérivés d'acétophénone (entrées 1-13). Au sein du second groupe, de meilleurs rendements sont isolés lorsque le phényle porte un groupement électrodonneur en position *para*. En l'absence de substituant, 15% de 3-benzoylindolizine **81a** sont obtenus. Les rendements s'élèvent à 34% et 18% respectivement lorsque les dérivés 4-diméthylamino ou 4-méthoxy sont utilisés (**81e** et **81b**). Dans le même ordre d'idées, on observe une diminution du rendement lorsqu'un groupement électroattracteur est introduit en position *para* de l'acétophénone. Une baisse équivalente se produit pour un substituant mésomère (9% pour NO₂, entrée 6, composé **81d**) ou inductif (8% pour Cl, entrée 8, composé **81f**). En ce qui concerne l'autre sous-groupe, la présence d'amide tertiaire en position 3 de l'indolizine conduit à des rendements plus élevés par rapport aux amides secondaires.

Contrairement à la série précédente, la cycloaddition est moins efficace dans l'eau (entrées 2, 4, 10 et 12) avec des rendements atteignant 4%. Ceci est plus conforme à nos attentes. En effet, une réactivité limitée est souhaitée pour le modèle **AptaSplit-Indo**. Les sels de pyridinium trop réactifs dans l'eau auraient été écartés comme candidats potentiels pour une application couplée à l'ADN, car la vitesse de la cycloaddition aurait été en compétition avec l'assemblage du complexe ternaire. De plus, le couplage des précurseurs aux oligonucléotides devrait considérablement augmenter leur solubilité dans l'eau, et donc améliorer la réactivité indépendamment de la catalyse apportée par les effets « DNA template ».¹²⁰

Quant à la fluorescence de ces molécules, elle est visible sous lampe UV pour tous les composés sauf le produit **81d**. Notons que les indolizines **81e** portant un groupement 4-(diméthylamino)benzoyl et **81f** contenant un halogène apparaissent vert-jaunes sous excitation à 365 nm (Figure 26), tandis que la fluorescence du reste de la série se décline du cyan au bleu roi. Les caractérisations photophysiques de ces molécules sont présentées dans la section suivante.

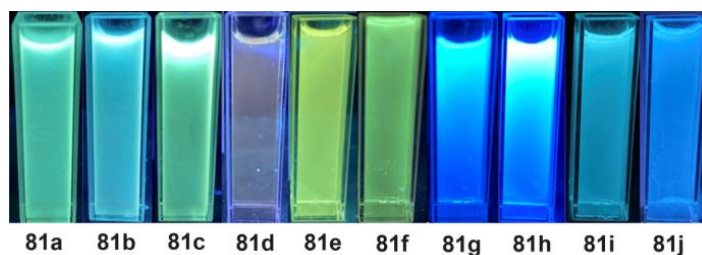


Figure 26 : Fluorescence des indolizines **81a-j** sous lampe UV ($\lambda=365$ nm) dans l'acétonitrile

B. Etudes photophysiques des fluorophores et sélections des meilleurs candidats

Les spectres d'absorbance et de fluorescence des indolizines obtenues précédemment ont été comparés pour évaluer l'impact du substituant en position 3. Les propriétés photophysiques des composés **81a-j** ont ainsi été évaluées en solvants organiques (DCM, MeCN, MeOH) ainsi qu'en milieu aqueux.

Les spectres d'absorption normalisés des indolizines dans le DCM sont présentés dans les Figure 27-A et 27-B pour les composés **81a-f** et **81g-j** respectivement. Les maxima se situent dans une plage de 330 à 400 nm. Nous remarquons que la présence d'une fonction amide en position 3 induit un décalage vers le bleu par rapport à la sous-série acétophénone.

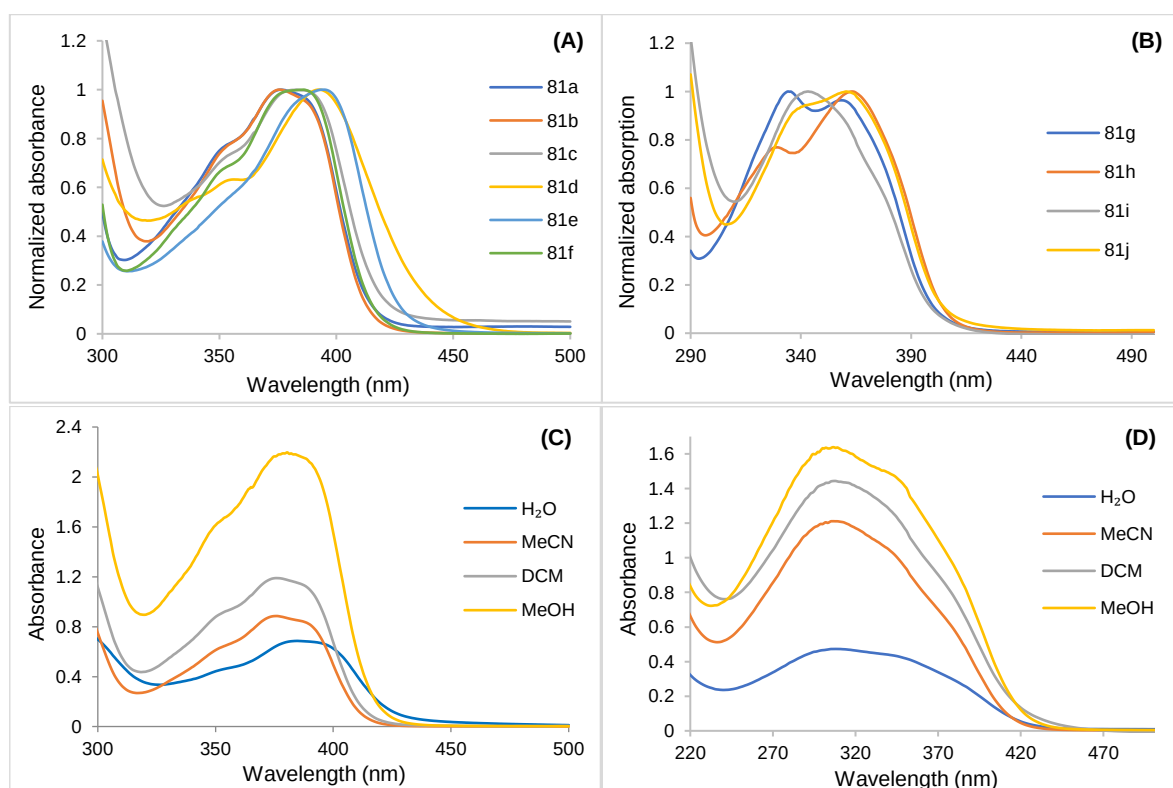


Figure 27 : (A) Spectres d'absorption normalisés de **81a-f** ($C = 30 \mu\text{M}$) dans le DCM ; (B) Spectres d'absorption normalisés de **81g-j** ($C = 30 \mu\text{M}$) dans le DCM ; (C) Spectres d'absorption de **81b** ($C = 50 \mu\text{M}$) dans divers solvants ; (D) Spectres d'absorption de **81i** ($C = 50 \mu\text{M}$) dans divers solvants

L'influence du solvant sur les spectres d'absorption est visible sur les Figure 27-C et 27-D avec les composés **81b** et **81i** comme exemples illustratifs, en plus d'être détaillée dans le Tableau 7. On observe un léger solvatochromisme caractérisé par un redshift corrélé à la polarité du solvant. Ce phénomène est plus marqué dans la série acétophénone (jusqu'à 26 nm de décalage pour **81f** en passant du DCM à l'eau) par rapport aux dérivés 3-amidoindolizine (décalages négligeables). L'effet de solvation est plus prononcé lorsque l'on examine l'absorptivité molaire : les bandes d'absorption diffèrent considérablement selon le solvant et sont plus intenses dans le méthanol.

Indolizine	λ_{abs} (nm) DCM	λ_{abs} (nm) MeCN	λ_{abs} (nm) MeOH	λ_{abs} (nm) H ₂ O	ϵ in DCM (M ⁻¹ .cm ⁻¹)
81a	376	375	383	386	23 021
81b	375	376	380	384	23 690
81c	383	382	383	386	17 873
81d	392	392	388	398	19 904
81e	392	392	397	406	41 173
81f	386	393	382	412	21 716
81g	335	332	333	335	15 122
81h	364	362	362	363	14 120
81i	343	342	358	343	25 482
81j	362	361	363	362	21 995

Tableau 7 : Données spectrales d'absorption des indolizines **81a-j**

L'effet du solvant sur la fluorescence a également été évalué en prenant l'indolizine **81a** comme exemple (Figure 28). Dans le DCM où nos molécules sont les plus solubles, la longueur d'onde d'émission maximale est de 472 nm avec un déplacement de Stokes s'élevant à 99 nm. Dans l'acétonitrile, le méthanol et l'eau, les λ_{max} sont enregistrées à 470, 448 et 435 nm respectivement. Un décalage hypsochrome en fonction de la polarité du solvant est donc observé, signifiant que le moment dipolaire du fluorophore est plus élevé à l'état fondamental qu'à l'état excité. Par ailleurs, l'intensité de la fluorescence augmente proportionnellement avec la solubilité ($F_{\text{H}_2\text{O}} < F_{\text{MeOH}} < F_{\text{MeCN}} < F_{\text{DCM}}$).

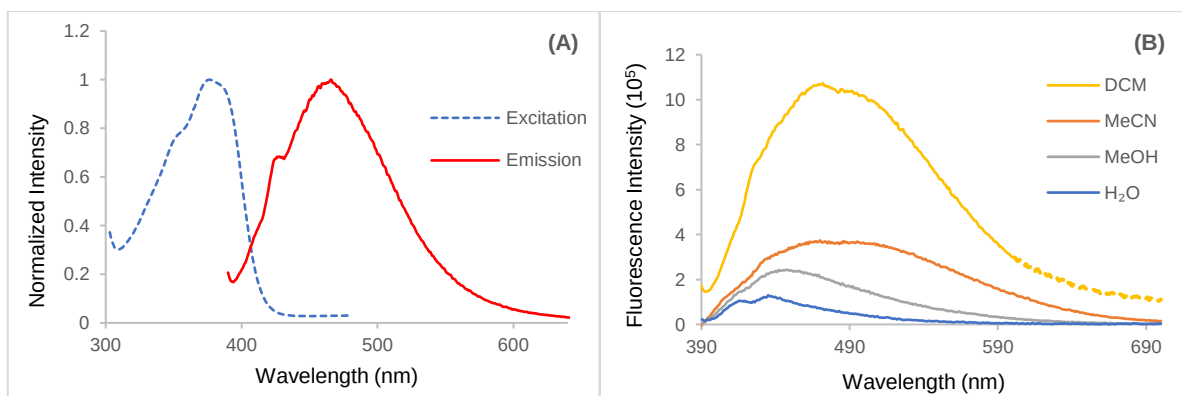


Figure 28 : (A) Spectres normalisés d'excitation et d'émission de **81a** dans le DCM ; (B) Spectres d'émission de **81a** enregistrés dans différents solvants ($C = 5 \mu\text{M}$)

Les dix spectres d'émission des indolizines **81a-j** ont ensuite été comparés afin d'examiner l'influence du substituant variable sur la fluorescence. En ce qui concerne la première sous-série (Figure 29-A), la présence d'un groupement électrodonneur en position *para* de l'acétophénone (**81b** et **81e**) entraîne un décalage vers le bleu par rapport au composé non-substitué **81a**. Quant aux groupements électroattracteurs, ils déplacent généralement les maxima d'émission vers des longueurs d'onde plus longues. C'est le cas des composés **81c** et **81f** ; toutefois un comportement inverse est observé pour l'indolizine **81d** substituée par un groupement nitro. Cette dernière est considérée comme une exception car elle est la moins fluorescente du lot. Ceci est probablement dû à un Transfert de Charge Interne (noté ICT, en anglais) entre le fragment *para*-nitroacétophénone et l'amide en position 1 ou 7, phénomène qui désactiverait les états excités de l'indolizine et conduirait ainsi à une diminution significative de l'intensité de la fluorescence.¹²¹ Les effets du substituant sur le maximum d'émission sont moins prononcés pour la sous-série amide (Figure 29-B) avec des longueurs d'onde avoisinant 430 nm. On note un décalage hypsochrome de la fluorescence par rapport aux dérivés acétophénones.

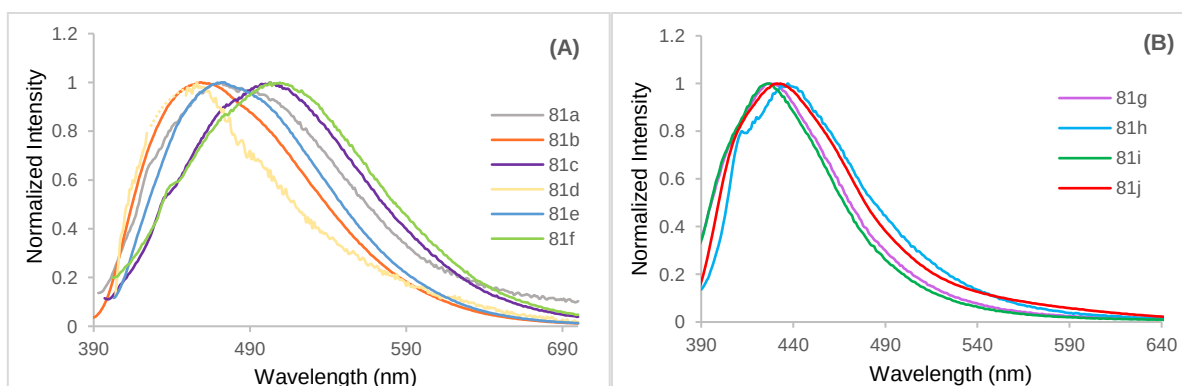


Figure 29 : Spectres d'émission normalisés dans le DCM ($C = 5 \mu\text{M}$) des indolizines (A) de la série acétophénone **81a-f** ; et (B) de la série amide **81g-j**

Plus intéressant encore, l'introduction d'une fonction amide en position 3 vient augmenter l'intensité du signal enregistré. On constate notamment un gain d'intensité d'un facteur 10 pour les indolizines **81g** et **81h**. Cela permet une excellente détection de la fluorescence dans l'eau pour des concentrations nanomolaires ($C = 100 \text{ nM}$, Figure 30). Cette émission considérablement accrue est associée aux amides aliphatiques et n'est pas observée pour les analogues aromatiques **81i-j**.

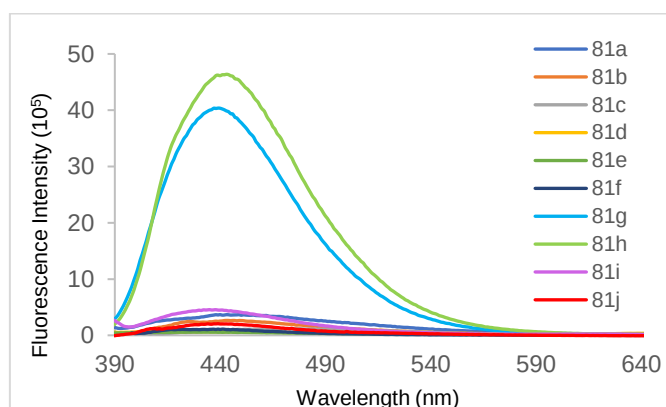


Figure 30 : Spectres d'émission des indolizines 81a-j dans l'eau ($C = 100 \text{ nM}$)

Un autre paramètre crucial pour la caractérisation d'un fluorophore est son rendement quantique Φ_F . Défini comme le nombre de photons émis divisé par le nombre de photons absorbés, cette valeur permet d'établir l'efficacité de la fluorescence émise (qualifiée de « brillance » ou luminosité). Les rendements quantiques de nos composés ont été déterminés en utilisant la Coumarine 1 comme référence ($\Phi_{\text{ref}} = 0,73$ dans l'éthanol à 25°C).¹²² L'ensemble des propriétés photophysiques de nos indolizines sont rassemblées dans le Tableau 8. En ce qui concerne les dérivés d'acétophénone (entrées 1-6), les rendements quantiques mesurés s'avèrent être modestes (0.05 à 0.01). Les valeurs les plus élevées sont obtenues pour les composés portant un groupement électrodonneur en position *para* (**81b** et **81e**). En revanche, des valeurs Φ_F excellentes à modérées ont été obtenues pour les dérivés 3-amido (entrées 7-10). Les amides tertiaires possèdent un rendement quantique inférieur à leurs analogues secondaires : on observe une diminution de 0.92 à 0.67 pour les indolizines 3-propylcarbamyle **81g** et 3-diéthylcarbamyle **81h** respectivement. Un comportement similaire est noté lorsqu'on compare les hétérocycles **81i** (3-phénylcarbamyle) et **81j** (3-méthylphénylcarbamyle). La fluorescence est potentiellement sensible à la formation de liaisons hydrogènes $\text{RCON-H}\cdots\text{O}$ qui l'impacteraient positivement.

Entrée	Indolizine	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm) H ₂ O	Δ (nm) [a]	I (CPS) [b]	λ_{em} (nm) DCM	Φ_F [c]
1	81a	376	435	59	349 080	472	0.02
2	81b	375	448	73	258 170	459	0.05

3	81c	383	475	92	115 780	503	0.02
4	81d	392	429	37	65 190	459	0.01
5	81e	392	471	79	110 880	473	0.05
6	81f	386	441	55	109 900	503	0.01
7	81g	335	437	102	4 036 400	432	0.92
8	81h	364	443	79	4 637 780	437	0.67
9	81i	343	435	92	455 950	427	0.14
10	81j	362	434	72	265 230	431	0.05

Tableau 8 : Propriétés photophysiques des indolizines **81a-j**. ^[a] Les déplacements de Stokes Δ ont été calculés à partir des spectres d'émission des indolizines dans l'eau. ^[b] Les intensités I ont été mesurées dans l'eau pour une concentration $C = 100$ nM. ^[c] Les rendements quantiques de fluorescence Φ_F ont été mesurés dans l'éthanol en utilisant la Coumarine 1 comme référence.

Sans surprise, les indolizines **81g** et **81h** sont choisies comme candidates pour une future conjugaison à l'ADN en raison de leur fluorescence intense et leurs larges déplacements de Stokes. Le composé **81b** est également retenu en tant que représentant de la sous-série acétophénone (celui qui a le meilleur rendement quantique).

Suite à cette sélection, les effets du solvant ont une fois de plus été explorés pour les molécules sélectionnées (Figure 31). Le solvatochromisme est plus prononcé pour le dérivé d'acétophénone **81b**, avec un modeste décalage hypsochrome dans les solvants polaires protiques (H_2O et MeOH vs DCM et MeCN). Une tendance opposée est observée pour les 3-amidoindolizines **81g-h** caractérisées par des longueurs d'onde légèrement plus élevées dans l'eau.

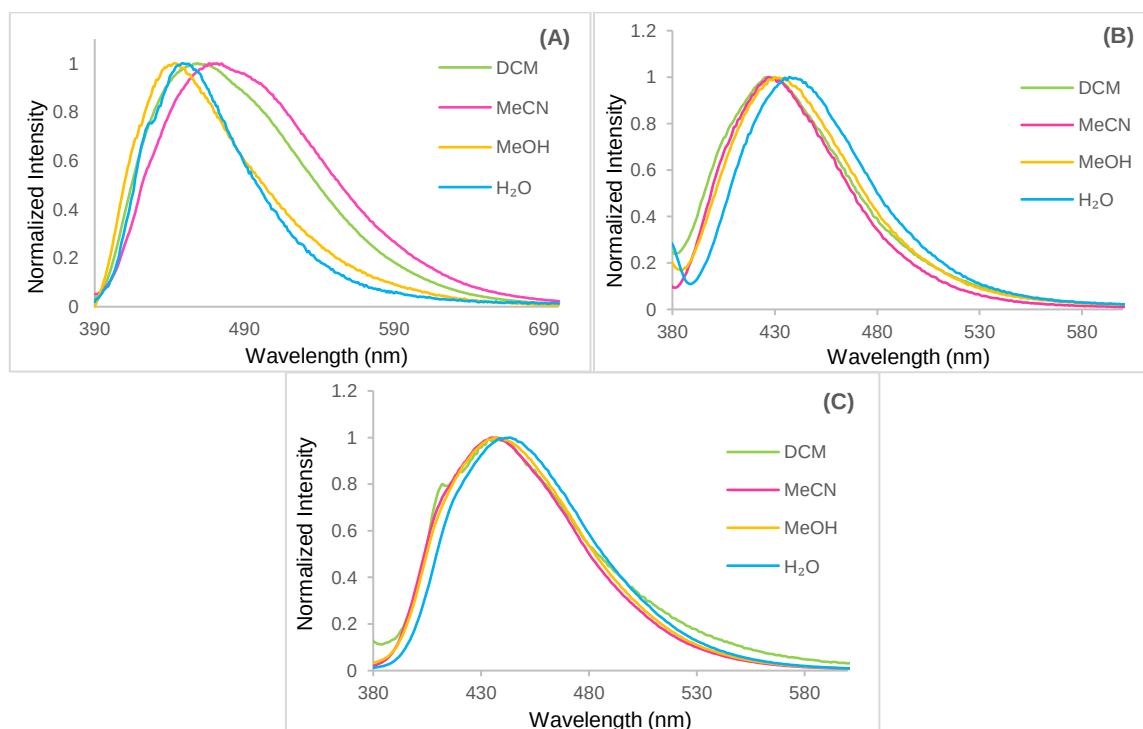


Figure 31 : Spectres d'émission normalisés des indolizines (A) **81b** à $C = 5 \mu M$; (B) **81g** et (C) **81h** à $C = 10$ nM dans différents solvants

Pour finir, le composé **81e** a été examiné en tant que potentielle sonde de pH. En effet, le groupement *para*-diméthylamino porté par l'acétophénone peut facilement être protoné en milieu acide. Comme établi dans l'introduction, les processus de protonation/déprotonation peuvent modifier les caractéristiques électroniques d'un fluorophore, affectant ainsi sa longueur d'onde d'émission. Dans cette optique, les spectres d'émission de l'indolizine **81e** ont été mesurés dans différents tampons aqueux (pH 7,0 – 4,0). Les conditions acides favorisent un faible décalage vers le bleu de la longueur d'onde d'émission par réduction des propriétés électrodonneuses de l'amine (Figure 32-A), entraînant une légère perturbation des états électroniques pour des pH ≤ 5 . En condition neutre (pH 7), la fluorescence est plus intense (Figure 32-B) ; cependant l'émission est comparable pour les pH 6 à 4. De ce fait, la réponse de la molécule à une variation du pH est limitée. Une transformation de la fraction acétophénone en fragment *para*-(diméthylamino)phényle conduirait à une sonde pH plus sensible grâce à un processus ICT direct via un système π -conjugué *push-pull* entre l'amine et l'amide en position 7 : un tel modèle a été étudié par Kim *et al.* en 2022.¹²³

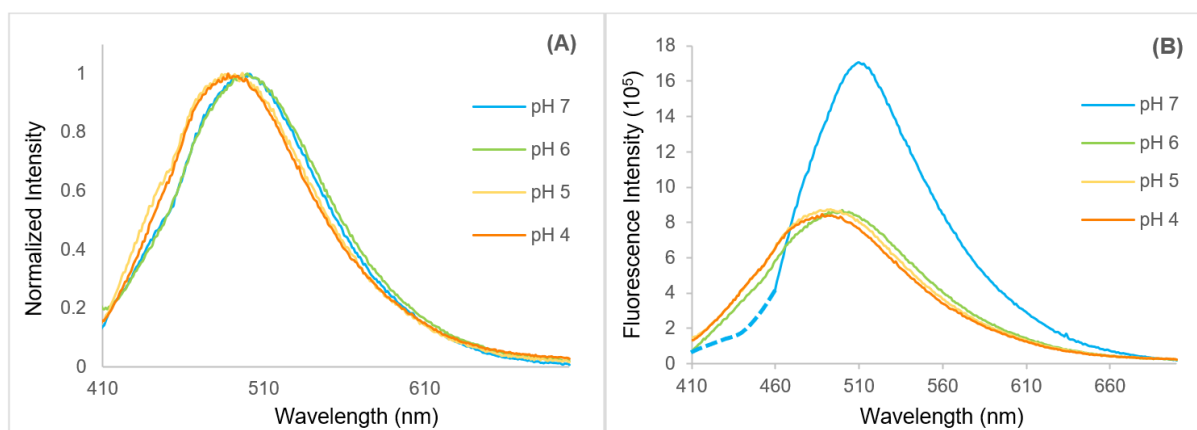


Figure 32 : (A) Spectres d'émission normalisés de **81e** à différents pH (7 à 4) ; (B) Spectres d'émission de **81e** à différents pH (C=2 μ M)

C. Bilan du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons décrit la synthèse d'une nouvelle série de fluorophores comprenant dix indolizines 1,3,7-trisubstituées. Elles ont été obtenues selon une cycloaddition 1,3-dipolaire d'ylures de pyridinium et de *N*-hexylpropiolamide, caractérisée par une réactivité limitée en solvant aqueux comme en solvant organique.

Le précurseur hétérocyclique porte un linker oxyamine permettant une conjugaison ultérieure à l'ADN. Après plusieurs essais, nous avons identifié le 1-éthoxyéthylidène comme meilleur groupement protecteur pour la cycloaddition : lorsque l'amino-oxy est masquée par un Boc ou un trityle, elle conserve une certaine réactivité qui diminue les rendements et rendent l'étape de purification difficile.

Après étude de la fluorescence de nos composés, nous avons sélectionné trois nouvelles indolizines possédant d'excellentes propriétés photophysiques dans l'eau (Figure 33). Émettant dans la gamme classique des indolizines (autour de 440 nm), deux d'entre elles se distinguent par un rendement quantique exceptionnel. La luminosité des composés **81g** et **81h**, fonctionnalisés par les trois groupements amides en position 1, 3 et 7, rivalise en effet avec des exemples récents comme les indolizines Seoul-Fluor ($\Phi_F = 0.20$ à 0.99) qui ont suscité un certain intérêt en tant que biosondes.¹²⁴

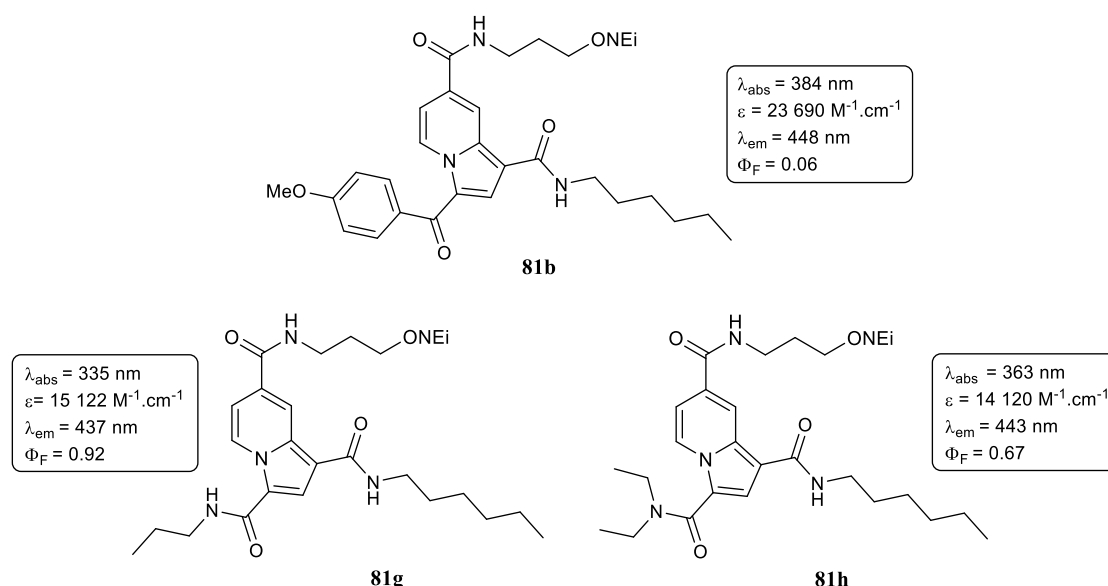


Figure 33: Fluorophores sélectionnés pour la construction du modèle aptamère

Nos fluorophores présentent ainsi un potentiel en tant que marqueurs d'ADN. Nous souhaitons maintenant évaluer l'influence d'oligonucléotides conjugués sur la réactivité des précurseurs ainsi que la fluorescence résultante au sein d'un modèle d'ADN double brin.

Références Bibliographiques

- (1) Nevskaya, A. A.; Zinoveva, A. D.; Van der Eycken, E. V.; Voskressensky, L. G. Synthetic Strategies for the Construction of Indolizines and Indolizine-Fused Compounds: Thienoindolizines and Indolizinoindoles. *Asian J. Org. Chem.* **2023**, *12* (10), e202300359. <https://doi.org/10.1002/ajoc.202300359>.
- (2) Sadowski, B.; Klajn, J.; T. Gryko, D. Recent Advances in the Synthesis of Indolizines and Their π -Expanded Analogues. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (33), 7804–7828. <https://doi.org/10.1039/C6OB00985A>.
- (3) Basavaiah, D.; Devendar, B.; Lenin, D. V.; Satyanarayana, T. The Baylis-Hillman Bromides as Versatile Synthons: A Facile One-Pot Synthesis of Indolizine and Benzofused Indolizine Frameworks. *Synlett* **2009**, 2009 (03), 411–416. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1087533>.
- (4) Barluenga, J.; Lonzi, G.; Riesgo, L.; López, L. A.; Tomás, M. Pyridine Activation via Copper(I)-Catalyzed Annulation toward Indolizines. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (38), 13200–13202. <https://doi.org/10.1021/ja106751t>.
- (5) Douglas, T.; Pordea, A.; Dowden, J. Iron-Catalyzed Indolizine Synthesis from Pyridines, Diazo Compounds, and Alkynes. *Org. Lett.* **2017**, *19* (23), 6396–6399. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b03252>.
- (6) Chen, R.; Zhao, Y.; Sun, H.; Shao, Y.; Xu, Y.; Ma, M.; Ma, L.; Wan, X. In Situ Generation of Quinolinium Ylides from Diazo Compounds: Copper-Catalyzed Synthesis of Indolizine. *J. Org. Chem.* **2017**, *82* (18), 9291–9304. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b01042>.
- (7) Jin, T.; Tang, Z.; Hu, J.; Yuan, H.; Chen, Y.; Li, C.; Jia, X.; Li, J. Iron-Catalyzed Aerobic Oxidation and Annulation Reaction of Pyridine and α -Substituted Allenolate toward Functionalized Indolizine. *Org. Lett.* **2018**, *20* (2), 413–416. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b03696>.
- (8) Liu, J.; Zhou, L.; Ye, W.; Wang, C. Formal [3+2] Cycloaddition of 1-Cyanocyclopropane 1-Ester with Pyridine, Quinoline or Isoquinoline: A General and Efficient Strategy for Construction of Cyanoindolizine Skeletons. *Chem. Commun.* **2014**, 50 (65), 9068–9071. <https://doi.org/10.1039/C4CC03267E>.
- (9) Sun, J.; Wang, F.; Hu, H.; Wang, X.; Wu, H.; Liu, Y. Copper(II)-Catalyzed Carbon–Carbon Triple Bond Cleavage of Internal Alkynes for the Synthesis of Annulated Indolizines. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (9), 3992–3998. <https://doi.org/10.1021/jo500456d>.
- (10) Scholtz, M. Die Einwirkung von Essigsäureanhydrid auf α -Picolin. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1912**, *45* (1), 734–746. <https://doi.org/10.1002/cber.191204501108>.
- (11) Tschitschibabin, A. E.; Stepanow, F. N. Über Das Picolid von M. Scholtz Und Über Acetyl-derivate Des Indolizins Und 2-Methyl-Indolizins. *Berichte Dtsch. Chem. Ges. B Ser.* **1929**, *62* (4), 1068–1075. <https://doi.org/10.1002/cber.19290620451>.
- (12) Tschitschibabin, A. E. Tautomerie in Der Pyridin-Reihe. *Berichte Dtsch. Chem. Ges. B Ser.* **1927**, *60* (7), 1607–1617. <https://doi.org/10.1002/cber.19270600724>.
- (13) Adachi, S.; Liew, S. K.; Lee, C. F.; Lough, A.; He, Z.; Denis, J. D. St.; Poda, G.; Yudin, A. K. Condensation-Driven Assembly of Boron-Containing Bis(Heteroaryl) Motifs Using a Linchpin Approach. *Org. Lett.* **2015**, *17* (22), 5594–5597. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b02741>.
- (14) Li, K.; Li, C. Enantioselective Synthesis of 3-Allylindolizines via Sequential Rh-Catalyzed Asymmetric Allylation and Tschitschibabin Reaction. *Org. Lett.* **2020**, *22* (24), 9456–9461. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c03383>.
- (15) Kel'in, A. V.; Sromek, A. W.; Gevorgyan, V. A Novel Cu-Assisted Cycloisomerization of Alkynyl Imines: Efficient Synthesis of Pyrroles and Pyrrole-Containing Heterocycles. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (9), 2074–2075. <https://doi.org/10.1021/ja0058684>.
- (16) Katayama, H.; Wada, C.; Taniguchi, K.; Ozawa, F. Effect of Substituents on the Formation of Vinylideneruthenium(II) Complexes. X-Ray Structures of $\text{RuCl}_2\{\text{CC}(\text{Z})\text{Ph}\}(\text{Dcpmp})$ ($\text{Z} = \text{H}, \text{SiMe}_3$; $\text{Dcpmp} = \text{C}_5\text{H}_3\text{N}(\text{CH}_2\text{PCy}_2)_2$). *Organometallics* **2002**, *21* (15), 3285–3291. <https://doi.org/10.1021/om020238r>.
- (17) Shirakawa, E.; Morita, R.; Tsuchimoto, T.; Kawakami, Y. Ruthenium-Catalyzed Hydrogenation of Alkynylstannanes with Migration of the Stannyl Group. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (42), 13614–13615. <https://doi.org/10.1021/ja0458827>.
- (18) Seregin, I. V.; Gevorgyan, V. Gold-Catalyzed 1,2-Migration of Silicon, Tin, and Germanium En Route to C-2 Substituted Fused Pyrrole-Containing Heterocycles. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (37), 12050–12051. <https://doi.org/10.1021/ja063278l>.

- (19) Mamane, V.; Hannen, P.; Fürstner, A. Synthesis of Phenanthrenes and Polycyclic Heteroarenes by Transition-Metal Catalyzed Cycloisomerization Reactions. *Chem. – Eur. J.* **2004**, *10* (18), 4556–4575. <https://doi.org/10.1002/chem.200400220>.
- (20) Soriano, E.; Marco-Contelles, J. Mechanisms of the Transition Metal-Mediated Hydroarylation of Alkynes and Allenes. *Organometallics* **2006**, *25* (19), 4542–4553. <https://doi.org/10.1021/om0605332>.
- (21) Rabaã, H.; Engels, B.; Hupp, T.; Hashmi, A. S. K. Theoretical Study of the Reaction of Alkynes with Furan Catalyzed by AuCl₃ and AuCl. *Int. J. Quantum Chem.* **2007**, *107* (2), 359–365. <https://doi.org/10.1002/qua.21063>.
- (22) Lavallo, V.; Frey, G. D.; Kousar, S.; Donnadiou, B.; Bertrand, G. Allene Formation by Gold Catalyzed Cross-Coupling of Masked Carbenes and Vinylidenes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (34), 13569–13573. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705809104>.
- (23) Xia, Y.; Dudnik, A. S.; Li, Y.; Gevorgyan, V. On the Validity of Au-Vinylidenes in the Gold-Catalyzed 1,2-Migratory Cycloisomerization of Skipped Propargylpyridines. *Org. Lett.* **2010**, *12* (23), 5538–5541. <https://doi.org/10.1021/ol1024794>.
- (24) Seregin, I. V.; Schammel, A. W.; Gevorgyan, V. Base- and Ligand-Free Room-Temperature Synthesis of N-Fused Heteroaromatic Compounds via the Transition Metal-Catalyzed Cycloisomerization Protocol. *Org. Lett.* **2007**, *9* (17), 3433–3436. <https://doi.org/10.1021/ol701464j>.
- (25) Yan, B.; Zhou, Y.; Zhang, H.; Chen, J.; Liu, Y. Highly Efficient Synthesis of Functionalized Indolizines and Indolizinones by Copper-Catalyzed Cycloisomerizations of Propargylic Pyridines. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (20), 7783–7786. <https://doi.org/10.1021/jo070983j>.
- (26) Smith, C. R.; Bunnelle, E. M.; Rhodes, A. J.; Sarpong, R. Pt-Catalyzed Cyclization/1,2-Migration for the Synthesis of Indolizines, Pyrrolones, and Indolizinones. *Org. Lett.* **2007**, *9* (6), 1169–1171. <https://doi.org/10.1021/ol0701971>.
- (27) Schwier, T.; Sromek, A. W.; Yap, D. M. L.; Chernyak, D.; Gevorgyan, V. Mechanistically Diverse Copper-, Silver-, and Gold-Catalyzed Acyloxy and Phosphatylxy Migrations: Efficient Synthesis of Heterocycles via Cascade Migration/Cycloisomerization Approach. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (32), 9868–9878. <https://doi.org/10.1021/ja072446m>.
- (28) Chernyak, D.; Skontos, C.; Gevorgyan, V. Two-Component Approach Toward a Fully Substituted N-Fused Pyrrole Ring. *Org. Lett.* **2010**, *12* (14), 3242–3245. <https://doi.org/10.1021/ol1011949>.
- (29) Kim, I.; Choi, J.; Won, H. K.; Lee, G. H. Expedient Synthesis of Indolizine Derivatives via Iodine Mediated 5-Endo-Dig Cyclization. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (39), 6863–6867. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.07.180>.
- (30) Narayan, A. R. H.; Sarpong, R. Remarkable Facilitation of Hetero-Cycloisomerizations with Water and Other Polar Protic Solvents: Metal-Free Synthesis of Indolizines. *Green Chem.* **2010**, *12* (9), 1556–1559. <https://doi.org/10.1039/C0GC00198H>.
- (31) Kim, I.; Won, H. K.; Choi, J.; Lee, G. H. A Novel and Efficient Approach to Highly Substituted Indolizines via 5-Endo-Trig Iodocyclization. *Tetrahedron* **2007**, *63* (52), 12954–12960. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.10.037>.
- (32) Liu, Y.; Song, Z.; Yan, B. General and Direct Synthesis of 3-Aminoindolizines and Their Analogues via Pd/Cu-Catalyzed Sequential Cross-Coupling/Cycloisomerization Reactions. *Org. Lett.* **2007**, *9* (3), 409–412. <https://doi.org/10.1021/ol062766v>.
- (33) Kim, H.; Lee, K.; Kim, S.; Lee, P. H. An Efficient Preparation of Indolizines through a Tandem Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reaction and Cycloisomerization. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (34), 6341–6343. <https://doi.org/10.1039/C0CC01945C>.
- (34) Yan, B.; Liu, Y. Gold-Catalyzed Multicomponent Synthesis of Aminoindolizines from Aldehydes, Amines, and Alkynes under Solvent-Free Conditions or in Water. *Org. Lett.* **2007**, *9* (21), 4323–4326. <https://doi.org/10.1021/ol701886e>.
- (35) Wei, C.; Li, C.-J. A Highly Efficient Three-Component Coupling of Aldehyde, Alkyne, and Amines via C–H Activation Catalyzed by Gold in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (32), 9584–9585. <https://doi.org/10.1021/ja0359299>.
- (36) Bai, Y.; Zeng, J.; Ma, J.; Gorityala, B. K.; Liu, X.-W. Quick Access to Druglike Heterocycles: Facile Silver-Catalyzed One-Pot Multicomponent Synthesis of Aminoindolizines. *J. Comb. Chem.* **2010**, *12* (5), 696–699. <https://doi.org/10.1021/cc100086h>.
- (37) Patil, S.; Patil, S.; Bobade, V. Synthesis of Aminoindolizine and Quinoline Derivatives via Fe(Acac)₃/TBAOH-Catalyzed Sequential Cross-Coupling-Cycloisomerization Reactions. *Synlett* **2011**, *2011* (16), 2379–2383. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1260305>.

- (38) Dighe, S. U.; Hutait, S.; Batra, S. Copper-Catalyzed Multicomponent Coupling/Cycloisomerization Reaction between Substituted 1-Formyl-9 *H* - β -Carbolines, Secondary Amines, and Substituted Alkynes for the Synthesis of Substituted 3-Aminoindolizino[8,7-*b*]Indoles. *ACS Comb. Sci.* **2012**, *14* (12), 665–672. <https://doi.org/10.1021/co300123y>.
- (39) Albaladejo, M. J.; Alonso, F.; González-Soria, M. J. Synthetic and Mechanistic Studies on the Solvent-Dependent Copper-Catalyzed Formation of Indolizines and Chalcones. *ACS Catal.* **2015**, *5* (6), 3446–3456. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b00417>.
- (40) Pandya, A. N.; Fletcher, J. T.; Villa, E. M.; Agrawal, D. K. Silver-Mediated Synthesis of Indolizines via Oxidative C–H Functionalization and 5-*Endo-Dig* Cyclization. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55* (50), 6922–6924. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.10.112>.
- (41) Tan, X.; Liang, Y.; Bao, F.; Wang, H.; Pan, Y. Silver-Mediated C–H Bond Functionalization: One-Pot to Construct Substituted Indolizines from 2-Alkylazaarenes with Alkynes. *Tetrahedron* **2014**, *70* (38), 6717–6722. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.07.085>.
- (42) Wang, X.; Li, S.; Pan, Y.; Wang, H.; Liang, H.; Chen, Z.; Qin, X. Samarium(III)-Catalyzed C(Sp³)–H Bond Activation: Synthesis of Indolizines via C–C and C–N Coupling between 2-Alkylazaarenes and Propargylic Alcohols. *Org. Lett.* **2014**, *16* (2), 580–583. <https://doi.org/10.1021/ol4034513>.
- (43) Wu, T.; Chen, M.; Yang, Y. Synthesis of Indolizines via Palladium Catalyzed Annulation of Propargyl Carbonates and 2-(Pyridin-2-Yl)Acetonitrile Derivatives. *J. Org. Chem.* **2017**, *82* (20), 11304–11309. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02278>.
- (44) Tang, S.; Liu, K.; Long, Y.; Qi, X.; Lan, Y.; Lei, A. Tuning Radical Reactivity Using Iodine in Oxidative C(Sp³)–H/C(Sp)–H Cross-Coupling: An Easy Way toward the Synthesis of Furans and Indolizines. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (42), 8769–8772. <https://doi.org/10.1039/C5CC01825K>.
- (45) Reddy, N. N. K.; Mohan, D. C.; Adimurthy, S. Metal-Free Synthesis of Indolizines through Oxidative CC and CN Bond Formations of C (Sp³) H Bonds. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57* (10), 1074–1078. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.01.082>.
- (46) Chen, Z.; Liang, P.; Ma, X.; Luo, H.; Xu, G.; Liu, T.; Wen, X.; Zheng, J.; Ye, H. Catalyst-Free Annulation of 2-Pyridylacetates and Ynals with Molecular Oxygen: An Access to 3-Acylated Indolizines. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (3), 1630–1639. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b02883>.
- (47) Yang, D.; Yu, Y.; Wu, Y.; Feng, H.; Li, X.; Cao, H. One-Pot Regiospecific Synthesis of Indolizines: A Solvent-Free, Metal-Free, Three-Component Reaction of 2-(Pyridin-2-Yl)Acetates, Ynals, and Alcohols or Thiols. *Org. Lett.* **2018**, *20* (8), 2477–2480. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b00835>.
- (48) Zhu, H.; Shao, N.; Chen, T.; Zou, H. Functionalized Heterocyclic Scaffolds Derived from Morita–Baylis–Hillman Acetates. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (70), 7738–7740. <https://doi.org/10.1039/C3CC43285H>.
- (49) Nair, D. K.; Mobin, S. M.; Nambhoorthi, I. N. N. Synthesis of Functionalized and Fused Furans and Pyrans from the Morita–Baylis–Hillman Acetates of Nitroalkenes. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (26), 3349–3352. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.04.084>.
- (50) Liu, J.; Liang, Y.; Wang, H.; Pan, Y. Copper-Catalyzed Oxidative Coupling–Annulation: One-Pot Synthesis of Indolizines from 2-Alkylazaarenes with Alkenes. *Synlett* **2015**, *26* (14), 2024–2028. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1378785>.
- (51) Xiang, L.; Zhang, F.; Chen, B.; Pang, X.; Yang, X.; Huang, G.; Yan, R. An I₂-Catalyzed Oxidative Cyclization for the Synthesis of Indolizines from Aromatic/Aliphatic Olefins and α -Picoline Derivatives. *RSC Adv.* **2015**, *5* (37), 29424–29427. <https://doi.org/10.1039/C5RA01234A>.
- (52) Liu, R.-R.; Hong, J.-J.; Lu, C.-J.; Xu, M.; Gao, J.-R.; Jia, Y.-X. Indolizine Synthesis via Oxidative Cross-Coupling/Cyclization of Alkenes and 2-(Pyridin-2-Yl)Acetate Derivatives. *Org. Lett.* **2015**, *17* (12), 3050–3053. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b01334>.
- (53) Yang, Y.; Xie, C.; Xie, Y.; Zhang, Y. Synthesis of Functionalized Indolizines via Copper-Catalyzed Annulation of 2-Alkylazaarenes with α,β -Unsaturated Carboxylic Acids. *Org. Lett.* **2012**, *14* (4), 957–959. <https://doi.org/10.1021/ol300067h>.
- (54) Chandra Mohan, D.; Ravi, C.; Pappula, V.; Adimurthy, S. Synthesis of Indolizines through Oxidative Linkage of C–C and C–N Bonds from 2-Pyridylacetates. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (13), 6846–6855. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b00477>.
- (55) Xiang, L.; Yang, Y.; Zhou, X.; Liu, X.; Li, X.; Kang, X.; Yan, R.; Huang, G. I₂-Mediated Oxidative Cyclization for Synthesis of Substituted Indolizines. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (21), 10641–10647. <https://doi.org/10.1021/jo5019574>.

- (56) Basavaiah, D.; Rao, A. J. First Example of Electrophile Induced Baylis–Hillman Reaction: A Novel Facile One-Pot Synthesis of Indolizine Derivatives. *Chem. Commun.* **2003**, No. 5, 604–605. <https://doi.org/10.1039/B211349J>.
- (57) Basavaiah, D.; Rao, A. J.; Satyanarayana, T. Recent Advances in the Baylis–Hillman Reaction and Applications. *Chem. Rev.* **2003**, *103* (3), 811–892. <https://doi.org/10.1021/cr010043d>.
- (58) Basavaiah, D.; Veeraraghavaiah, G.; Badsara, S. S. Ketones as Electrophiles in Two Component Baylis–Hillman Reaction: A Facile One-Pot Synthesis of Substituted Indolizines. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (10), 1551–1555. <https://doi.org/10.1039/C3OB42064G>.
- (59) Wang, D.; Wei, Y.; Shi, M. Synthesis of Highly Functionalized Aminoindolizines by Titanium(IV) Chloride Mediated Cycloisomerization and Phosphine-Catalyzed Aza-Michael Addition Reactions. *Asian J. Org. Chem.* **2013**, *2* (6), 480–485. <https://doi.org/10.1002/ajoc.201300062>.
- (60) Singh, P. K.; Singh, V. K. Highly Enantioselective Friedel–Crafts Reaction of Indoles with 2-Enoylpyridine 1-Oxides Catalyzed by Chiral Pyridine 2,6-Bis(5',5'-Diphenyloxazoline)–Cu(II) Complexes. *Org. Lett.* **2008**, *10* (18), 4121–4124. <https://doi.org/10.1021/ol8016929>.
- (61) Wu, J.; Leng, W. L.; Liao, H.; Mai Hoang, K. L.; Liu, X. Intramolecular C–N Bond Formation under Metal-free Conditions: Synthesis of Indolizines. *Chem. – Asian J.* **2015**, *10* (4), 853–856. <https://doi.org/10.1002/asia.201403400>.
- (62) Yuan, Y.-C.; Liu, T.-Z.; Zhao, B.-X. Metal-Free Catalyzed Synthesis of Fluorescent Indolizine Derivatives. *J. Org. Chem.* **2021**, *86* (18), 12737–12744. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c01292>.
- (63) Zeng, K.; Mei, R.; Dechert, S.; Ackermann, L.; Zhang, K. A Recyclable Stereoauxiliary Aminocatalyzed Strategy for One-Pot Synthesis of Indolizine-2-Carbaldehydes. *Commun. Chem.* **2023**, *6* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s42004-023-00828-2>.
- (64) Huisgen, R. Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. Reply. *J. Org. Chem.* **1968**, *33* (6), 2291–2297. <https://doi.org/10.1021/jo01270a024>.
- (65) Sustmann, R. Orbital Energy Control of Cycloaddition Reactivity. *Pure Appl. Chem.* **1974**, *40* (4), 569–593. <https://doi.org/10.1351/pac197440040569>.
- (66) Boekelheide, V.; Fahrenholtz, K. The Formation of Pyrrocolines by the Reaction of Dimethyl Acetylenedicarboxylate with Heterocyclic Zwitterions. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83* (2), 458–462. <https://doi.org/10.1021/ja01463a047>.
- (67) Acheson, R. M.; Bite, M. G.; Cooper, M. W. Addition Reactions of Heterocyclic Compounds. Part LXIV. Indolizines from Reactions of Hex-3-Yne-2,5-Dione, but-3-Yn-2-One, and Allene-Carboxylic Esters with Some Nitrogen-Containing Heterocyclic Ylides. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1976**, No. 18, 1908–1911. <https://doi.org/10.1039/P19760001908>.
- (68) Sasaki, T.; Kanematsu, K.; Yukimoto, Y. The Chemistry of Cyanoacetylenes. Part V. I. Dipolar Cycloaddition Reactions of Cyanoacetylenes with N-Ylides and N-Heterocyclic Ylides. *J. Chem. Soc.* **1970**.
- (69) Linn, W. J.; Webster, O. W.; Benson, R. E. Tetracyanoethylene Oxide. I. Preparation and Reaction with Nucleophiles. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87* (16), 3651–3656. <https://doi.org/10.1021/ja01094a022>.
- (70) Fröhlich, J.; Kröhnke, F. Indolizine Aus Phenacyl-cyclimoniumsalzen. *Chem. Ber.* **1971**, *104* (5), 1621–1628. <https://doi.org/10.1002/cber.19711040530>.
- (71) Kakehi, A.; Ito, S. Preparation of Stable 2,3-Dihydroindolizines by the Reactions of Pyridinium Methylides with Various Acrylates. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1974**, *47* (4), 938–941. <https://doi.org/10.1246/bcsj.47.938>.
- (72) Hayasi, Y.; Nakamura, H.; Nozaki, H. The Reaction of Acyl-Substituted Sulfonium and Pyridinium Ylides with Diphenylthiirene Dioxide. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1973**, *46* (2), 667–669. <https://doi.org/10.1246/bcsj.46.667>.
- (73) Basketter, N. S.; Plunkett, A. O. Reactions of Isoquinolinium Ylides: Amine-Catalysed Cycloaddition of Aldehydes and Ketones. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1973**, No. 5, 188b–1189. <https://doi.org/10.1039/C3973000188B>.
- (74) Matsumoto, K.; Uchida, T.; Paquette, L. A. Synthesis of 3-Cyanoindolizines via Cycloaddition-Extrusion Reactions of Dicyanomethylids with Phenyl Vinyl Sulfoxide. *Synthesis* **1979**, 1979 (09), 746–747. <https://doi.org/10.1055/s-1979-28826>.
- (75) Tominaga, Y.; Ichihara, Y.; Mori, T.; Kamio, C.; Hosomi, A. Polarized Ethylene. V. Synthesis of 1-Substituted Indolizine, Pyrazolo[1,5-a]Pyridine, and Their Related Compounds Using Methoxyethylene Derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* **1990**, *27* (2), 263–268. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570270228>.
- (76) Wei, X.; Hu, Y.; Li, T.; Hu, H. A Facile One-Step Synthesis of Aromatic Indolizines by 1,3-Dipolar Cycloaddition of Pyridinium and Related Heteroaromatic Ylides with Alkenes in the Presence of

- TPCD [Copy4(HCrO4)2]. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1993**, No. 20, 2487–2489. <https://doi.org/10.1039/P19930002487>.
- (77) Wang, B.; Zhang, X.; Li, J.; Jiang, X.; Hu, Y.; Hu, H. Preparation of Indolizine-3-Carboxamides and Indolizine-3-Carbonitriles by 1,3-Dipolar Cycloaddition of N-(Cyanomethyl)Pyridinium Ylides to Alkenes in the Presence of Tetrakispyridinecobalt(II) Dichromate or Manganese(IV) Oxide. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1999**, No. 11, 1571–1576. <https://doi.org/10.1039/a809581g>.
- (78) Katritzky, A. R.; Qiu, G.; Yang, B.; He, H.-Y. Novel Syntheses of Indolizines and Pyrrolo[2,1-a]Isoquinolines via Benzotriazole Methodology. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (20), 7618–7621. <https://doi.org/10.1021/jo9906936>.
- (79) Boultsadakis, E.; Chung, B.; Elsegood, M. R. J.; Weaver, G. W. Synthesis of Substituted Indolizines and Pyrrolo[2,1-a]Isoquinolines from 1,1-Diiodo-2,2-Dinitroethylene. *Synlett* **2002**, *2002* (9), 1547–1549. <https://doi.org/10.1055/s-2002-33507>.
- (80) Baum, K.; Bigelow, S. S.; Nguyen Nghi Van; Archibald, T. G.; Gilardi, R.; Flippen-Anderson, J. L.; George, C. Synthesis and Reactions of 1,1-Diiododinitroethylene. *J. Org. Chem.* **1992**, *57* (1), 235–241. <https://doi.org/10.1021/jo00027a042>.
- (81) Shen, Y.; Zhang, Y.; Jiang, G.-F. A Convenient Synthesis of Perfluoroalkylated Indolizinyolphosphonates. *Synthesis* **2002**, *2002* (6), 714–716. <https://doi.org/10.1055/s-2002-25763>.
- (82) Wu, K.; Chen, Q.-Y. Synthesis of Fluorinated Indolizines and 4H-Pyrrolo[1,2-a]Benzimidazoles via 1,3-Dipolar Cycloaddition of Fluoroalkenes to N-Ylides. *Synthesis* **2003**, *1* (01), 0035–0040. <https://doi.org/10.1055/s-2003-36246>.
- (83) Shang, Y.; Zhang, M.; Yu, S.; Ju, K.; Wang, C.; He, X. New Route Synthesis of Indolizines via 1,3-Dipolar Cycloaddition of Pyridiniums and Alkynes. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (50), 6981–6984. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.09.143>.
- (84) Liu, Y.; Zhang, Y.; Shen, Y.-M.; Hu, H.-W.; Xu, J.-H. Regioselective Synthesis of 3-Acylindolizines and Benzo- Analogues via 1,3-Dipolar Cycloadditions of N-Ylides with Maleic Anhydride. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (10), 2449–2456. <https://doi.org/10.1039/C000277A>.
- (85) Coffinier, D.; El Kaim, L.; Grimaud, L. Nef-Perkow Access to Indolizine Derivatives. *Synlett* **2010**, *2010* (16), 2474–2476. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1258569>.
- (86) Coffinier, D.; El Kaim, L.; Grimaud, L. New Benzotriazole and Benzimidazole Scaffolds from Ugi–Smiles Couplings of Isocyanides. *Org. Lett.* **2009**, *11* (4), 995–997. <https://doi.org/10.1021/ol8029438>.
- (87) Brioché, J.; Meyer, C.; Cossy, J. Synthesis of 2-Aminoindolizines by 1,3-Dipolar Cycloaddition of Pyridinium Ylides with Electron-Deficient Ynamides. *Org. Lett.* **2015**, *17* (11), 2800–2803. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b01205>.
- (88) Kucukdisli, M.; Opatz, T. A Modular Synthesis of Polysubstituted Indolizines. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012* (24), 4555–4564. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201200424>.
- (89) An, J.; Yang, Q.-Q.; Wang, Q.; Xiao, W.-J. Direct Synthesis of Pyrrolo[2,1-a]Isoquinolines by 1,3-Dipolar Cycloaddition of Stabilized Isoquinolinium N-Ylides with Vinyl Sulfonium Salts. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54* (29), 3834–3837. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.05.053>.
- (90) Dontsova, N. E.; Nesterov, V. N.; Shestopalov, A. M. Effect of Solvent Nature on the Regioselectivity of the Reactions of Pyridinium Ylides with *E*-1,2-Di(Alkylsulfonyl)-1,2-Dichloroethene. From the Reaction of 1,3-Dipolar Cycloaddition to the Reaction of Nucleophilic Addition–Elimination (AdN–E1,5). *Tetrahedron* **2013**, *69* (24), 5016–5021. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.03.098>.
- (91) Dontsova, N. E.; Shestopalov, A. M.; Litvinov, V. P. Synthesis of Substituted 7,8-Di(Propylsulfonyl)Pyrrolo[1,2-a]Pyrazines. *Russ. Chem. Bull.* **2008**, *57* (2), 434–436. <https://doi.org/10.1007/s11172-008-0069-9>.
- (92) Fan, X.; Wang, Y.; He, Y.; Guo, S.; Zhang, X. Synthesis of 1,2,3-Trisubstituted Indolizines, Pyrrolo[1,2-a]Quinolines, and Pyrrolo[2,1-a]Isoquinolines from 1,2-Allenyl Ketones. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014* (4), 713–717. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201301719>.
- (93) DIAZ-ORTIZ, A.; DIEZ-BARRA, E.; DE LA HOZ, A.; LOUPY, A.; PETIT, A.; SANCHEZ, L. 1,3-Dipolar Cycloadditions of Pyridinium Dicyanomethylide under Microwave Irradiation. *1,3-Dipolar Cycloaddit. Pyridinium Dicyanomethylide Microw. Irradiat.* **1994**, *38* (4), 785–792.
- (94) Dinica, R. M.; Druta, I. I.; Pettinari, C. The Synthesis of Substituted 7,7'-Bis-Indolizines via 1,3-Dipolar Cycloaddition under Microwave Irradiation. *Synlett* **2000**, *2000* (7), 1013–1015. <https://doi.org/10.1055/s-2000-6657>.
- (95) Bora, U.; Saikia, A.; Boruah, R. C. A Novel Microwave-Mediated One-Pot Synthesis of Indolizines via a Three-Component Reaction. *Org. Lett.* **2003**, *5* (4), 435–438. <https://doi.org/10.1021/ol020238n>.

- (96) Bayazit, M. K.; Celebi, N.; Coleman, K. S. A Theoretical and Experimental Exploration of the Mechanism of Microwave Assisted 1,3-Dipolar Cycloaddition of Pyridinium Ylides to Single Walled Carbon Nanotubes. *Mater. Chem. Phys.* **2014**, *145* (1), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2014.01.045>.
- (97) Sokolova, E. A.; Festa, A. A.; Subramani, K.; Rybakov, V. B.; Varlamov, A. V.; Voskressensky, L. G.; Van Der Eycken, E. V. Microwave-Assisted Synthesis of Fluorescent Pyrido[2,3-b]Indolizines from Alkylpyridinium Salts and Enaminones. *Molecules* **2020**, *25* (18), 4059. <https://doi.org/10.3390/molecules25184059>.
- (98) Dohmen, C.; Ihmels, H.; Kreienmeier, R.; Patrick, B. O. Synthesis of a Crystallochromic Indolizine Dye by a Base- and Catalyst-Free Photochemical Route. *Chem. Commun.* **2019**, 55 (74), 11071–11074. <https://doi.org/10.1039/C9CC04730A>.
- (99) Dinica, R. M.; Furdul, B.; Ghinea, I. O.; Bahrim, G.; Bonte, S.; Demeunynck, M. Novel One-Pot Green Synthesis of Indolizines Biocatalysed by Candida Antarctica Lipases. *Mar. Drugs* **2013**, *11* (2), 431–439. <https://doi.org/10.3390/md11020431>.
- (100) Wang, W.; Han, J.; Sun, J.; Liu, Y. CuBr-Catalyzed Aerobic Decarboxylative Cycloaddition for the Synthesis of Indolizines under Solvent-Free Conditions. *J. Org. Chem.* **2017**, *82* (6), 2835–2842. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b02455>.
- (101) Ramesh, V.; Devi, N. S.; Velusamy, M.; Shanmugam, S. Catalyst Free Synthesis of Highly Functionalized Indolizines from In Situ Generated Pyridinium Ylides via One-Pot Multicomponent Reaction. *ChemistrySelect* **2019**, *4* (13), 3717–3721. <https://doi.org/10.1002/slct.201900665>.
- (102) Bonte, S.; Ghinea, I.; Dinica, R.; Baussanne, I.; Demeunynck, M. Investigation of the Pyridinium Ylide–Alkyne Cycloaddition as a Fluorogenic Coupling Reaction. *Molecules* **2016**, *21* (3), 332. <https://doi.org/10.3390/molecules21030332>.
- (103) Douglass, J. K.; Tabor, M. W.; Spradling III, J. E. The Effect of 4-Substituents on the Stability of Pyridinium Dicarbethoxymethylides. *J. Heterocycl. Chem.* **1972**, *9* (1), 53–56. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570090108>.
- (104) Bonte, S. Etude de La Cycloaddition 1,3-Dipolaire Des Ylures de Pyridinium Pour Le Développement de Nouvelles Réactions de Ligations Fluorogéniques. These de doctorat, Grenoble, 2013. <https://theses.fr/2013GRENV074> (accessed 2024-10-16).
- (105) Sasaki, T.; Kanematsu, K.; Yukimoto, Y.; Ochiai, S. Heteroaromaticity. XLIII. Orientation in the 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions of Heteroaromatic Nitrogen Methylides with Dipolarophiles. *J. Org. Chem.* **1971**, *36* (6), 813–818. <https://doi.org/10.1021/jo00805a018>.
- (106) Forget, D.; Boturyn, D.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P. Highly Efficient Synthesis of Peptide–Oligonucleotide Conjugates: Chemoselective Oxime and Thiazolidine Formation. *Chem. – Eur. J.* **2001**, *7* (18), 3976–3984. [https://doi.org/10.1002/1521-3765\(20010917\)7:18<3976::AID-CHEM3976>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1521-3765(20010917)7:18<3976::AID-CHEM3976>3.0.CO;2-X).
- (107) Kölmel, D. K.; Kool, E. T. Oximes and Hydrazones in Bioconjugation: Mechanism and Catalysis. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (15), 10358–10376. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00090>.
- (108) Kröhnke, F. Über Enol-Betaine. *Berichte Dtsch. Chem. Ges. B Ser.* **1935**, *68* (6), 1177–1195. <https://doi.org/10.1002/cber.19350680637>.
- (109) Jacobs, J.; Van Hende, E.; Claessens, S.; De Kimpe, N. Pyridinium Ylids in Heterocyclic Synthesis. *Curr. Org. Chem.* **2011**, *15* (9), 1340–1362. <https://doi.org/10.2174/138527211795378209>.
- (110) Kakehi, A. Reactions of Pyridinium N-Ylides and Their Related Pyridinium Salts. *HETEROCYCLES* **2012**, *85* (7), 1529. <https://doi.org/10.3987/REV-12-735>.
- (111) Miki, Y.; Hachiken, H.; Takemura, S. NOVEL SYNTHESIS AND 1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION REACTION OF PYRIDINIUM E-METHYLIDE. *Heterocycles* **1984**, *22* (4).
- (112) Jackson, J. E.; Soundararajan, N.; Platz, M. S.; Liu, M. T. H. Pyridine Ylide Formation by Capture of Phenylchlorocarbene and Tert-Butylchlorocarbene. Reaction Rates of an Alkylchlorocarbene by Laser Flash Photolysis. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (16), 5595–5596. <https://doi.org/10.1021/ja00224a068>.
- (113) Toscano, J. P.; Platz, M. S.; Nikolaev, V. Lifetimes of Simple Ketocarbenes. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (16), 4712–4713. <https://doi.org/10.1021/ja00121a032>.
- (114) Rieche, A.; Dietrich, P. Das Tetracyanäthylenoxyd. *Chem. Ber.* **1963**, *96* (11), 3044–3049. <https://doi.org/10.1002/cber.19630961130>.
- (115) Zecher, W.; Kröhnke, F. Eine neue Synthese substituierter Pyridine, I. Grundzüge der Synthese. *Chem. Ber.* **1961**, *94* (3), 690–697. <https://doi.org/10.1002/cber.19610940317>.
- (116) Kobayashi, Y.; Katsuma, T.; Morigana, K.; Fujita, M.; Hanzawa, Y. Studies on the Reactions of Heterocyclic Compounds. IV. Preparations and Reactions of Heterocyclic N-Ylides. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1970**, *18* (12), 2489–2498. <https://doi.org/10.1248/cpb.18.2489>.

- (117) Herkes, F. E.; Simmons, H. E. Mono- and Disubstituted Vinyltrialkylammonium Compounds. Synthesis and Stereochemistry. *J. Org. Chem.* **1973**, 38 (16), 2845–2851. <https://doi.org/10.1021/jo00956a025>.
- (118) De, K.; Legros, J.; Crousse, B.; Bonnet-Delpon, D. Solvent-Promoted and -Controlled Aza-Michael Reaction with Aromatic Amines. *J. Org. Chem.* **2009**, 74 (16), 6260–6265. <https://doi.org/10.1021/jo9012699>.
- (119) Sulsky, R.; Demers, J. P. Alkylation of N-Benzyloxyureas and Carbamates. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30 (1), 31–34. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)80314-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)80314-2).
- (120) Li, X.; Liu, D. R. DNA-Templated Organic Synthesis: Nature's Strategy for Controlling Chemical Reactivity Applied to Synthetic Molecules. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2004**, 43 (37), 4848–4870. <https://doi.org/10.1002/anie.200400656>.
- (121) de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. Signaling Recognition Events with Fluorescent Sensors and Switches. *Chem. Rev.* **1997**, 97 (5), 1515–1566. <https://doi.org/10.1021/cr960386p>.
- (122) Jones, G. I.; Jackson, W. R.; Choi, C. Y.; Bergmark, W. R. Solvent Effects on Emission Yield and Lifetime for Coumarin Laser Dyes. Requirements for a Rotatory Decay Mechanism. *J. Phys. Chem.* **1985**, 89 (2), 294–300. <https://doi.org/10.1021/j100248a024>.
- (123) Kim, T.; Kim, J. Color-Tunable Indolizine-Based Fluorophores and Fluorescent pH Sensor. *Molecules* **2022**, 27 (1), 12. <https://doi.org/10.3390/molecules27010012>.
- (124) Kim, E.; Lee, Y.; Lee, S.; Park, S. B. Discovery, Understanding, and Bioapplication of Organic Fluorophore: A Case Study with an Indolizine-Based Novel Fluorophore, Seoul-Fluor. *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48 (3), 538–547. <https://doi.org/10.1021/ar500370v>.

Chapitre 2

Applications des indolizines 1,3,7-trisubstituées couplées à l'ADN : vers le modèle AptaSplit-Indo

I. Les indolizines 1,3,7-trisubstituées comme nouveaux marqueurs biomoléculaires

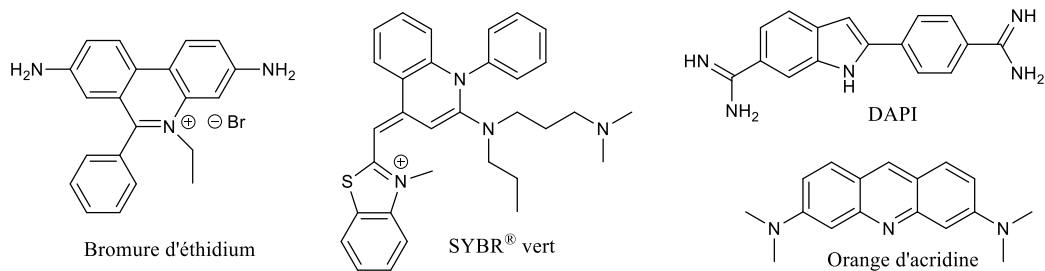
Ce deuxième chapitre est consacré aux diverses applications des molécules précédemment synthétisées. Mais avant de développer le modèle aptamère, l'exploitation des fluorophores en tant que marqueurs d'ADN a d'abord été explorée.

Les acides nucléiques peuvent être modifiés enzymatiquement ou chimiquement avec des marqueurs permettant leur détection ou leur purification tout en conservant leur capacité à s'apparier. Ainsi, les oligonucléotides marqués sont couramment utilisés en biologie moléculaire, en biotechnologie et en pharmacologie clinique. Ils sont notamment impliqués dans la visualisation, la caractérisation et la quantification de processus physiologiques dans des systèmes organiques, *in vivo* comme *in vitro*. De nombreux réactifs sont commercialement disponibles à cet effet. Les marqueurs d'ADN et d'ARN traditionnels sont les radioisotopes¹ (³²P, ³⁵S, etc.), mais ils présentent certains inconvénients tels que des risques pour la santé et une potentielle contamination de l'environnement lors du traitement et de l'élimination des déchets. De plus, la courte demi-vie des isotopes utilisés nécessite la synthèse fréquente de nouveaux lots.²

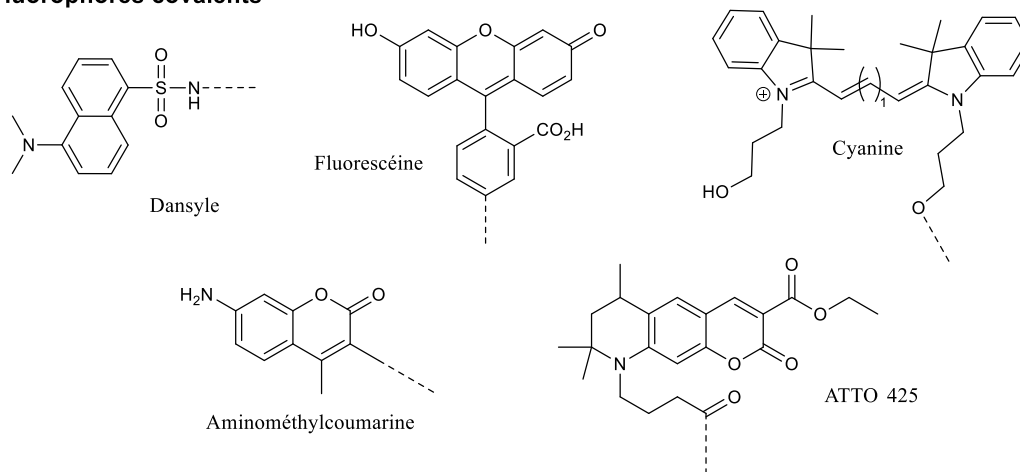
Bien que moins sensibles, les fluorophores (Figure 34) sont plus faciles à manipuler et ont émergé comme une alternative séduisante pour la détection d'ADN. Ils sont stables, relativement sans risque et permettent la détection directe et en temps réel des cibles. Le marquage fluorescent permet également d'effectuer des analyses rapides sur micropuces.³ Les fluorophores peuvent interagir avec la biomolécule par liaison covalente ou non covalente. Les colorants tels que le bromure d'éthidium, le SYBR® vert ou le DAPI se lient à l'ADNdb (double brin) par intercalation réversible au cœur de la double hélice qui entraîne une forte augmentation de leur fluorescence. Cependant, l'absence de liaison stable entre le colorant et la biomolécule peut entraîner la dissociation du fluorophore, réduisant ainsi l'intensité du signal enregistré tout en conduisant à une potentielle fluorescence indésirée provenant de l'interaction avec d'autres espèces présentes dans le milieu. À l'inverse, une connexion covalente permet une plus grande spécificité et offre même une possibilité de multiplexage.^{4,5}

Les fluorophores les plus couramment utilisés comprennent le dansyle, la fluorescéine, la rhodamine, les coumarines et les colorants cyanines.⁶⁻⁹ Parmi ceux qui émettent vers le bleu comme nos indolizines, on retrouve principalement l'aminométhylcoumarine ($\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$),¹⁰ la diéthylaminocoumarine ($\lambda_{em} = 480 \text{ nm}$)¹¹ et l'ATTO 425 ($\lambda_{em} = 485 \text{ nm}$),¹² représentés dans la Figure 34.

Agents intercalants



Fluorophores covalents



Indolizines 1,3,7-trisubstituées sélectionnées

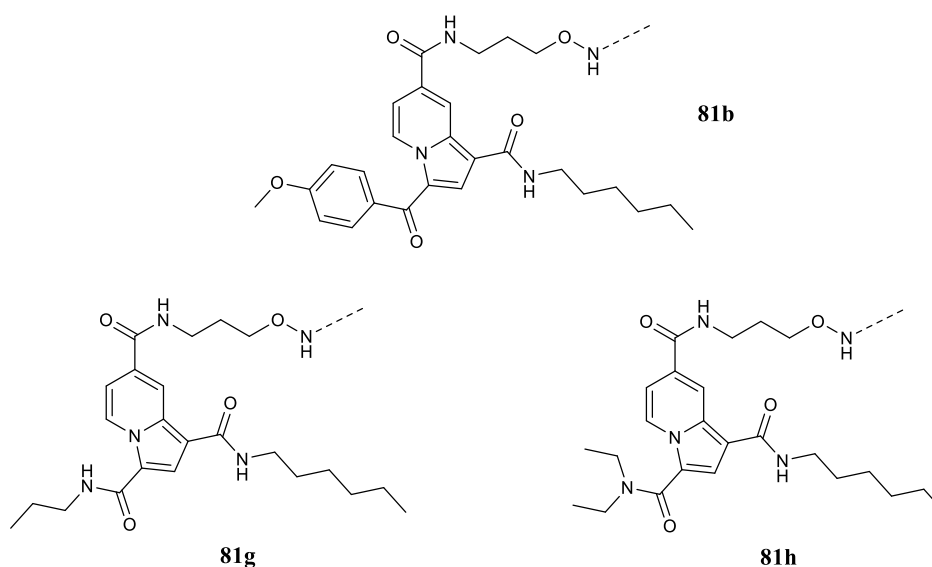


Figure 34 : Structures de quelques marqueurs d'ADN fluorescents et de nos indolizines retenues

L'aminométhylcoumarine s'avère être l'un des fluorophores bleus les plus brillants ($\Phi_F = 0,56$ dans l'éthanol).¹³ Nos molécules, en particulier les composés **81g** et **81h** ($\Phi_F = 0,91$; $0,68$ respectivement dans l'éthanol), pourraient donc servir d'alternative. En effet, leur intensité lumineuse est équivalente voire meilleure. De plus, leur petite taille, comparable aux

marqueurs d'ADN usuels, devrait conduire à une perturbation minimale des fonctions natives de la séquence.

Pour évaluer ce potentiel, étudier les effets des acides nucléiques sur l'émission et mesurer l'influence des fluorophores sur la stabilité d'un duplexe, nos indolizines ont été attachées à de courts brins d'ADN complémentaires.

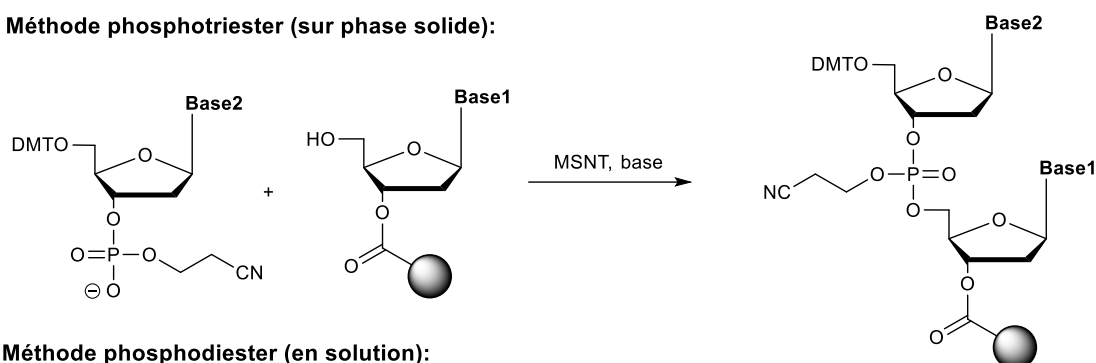
Il existe deux principales approches pour incorporer un colorant aux oligonucléotides : 1) une insertion directe durant leur synthèse à l'aide de phosphoramidite conjugué au fluorophore, ou 2) une modification post-synthèse des oligonucléotides. La seconde méthodologie est largement préférée lorsque les phosphoramidites ne sont pas commerciaux. Après synthèse, le couplage se produit par réaction d'un groupement fonctionnel porté par le brin d'ADN (à ses extrémités ou au sein de la séquence) et une fonction complémentaire présente sur le fluorophore. Ce clipsage fait appel aux réactions spécifiques et biocompatibles de *chimie click*, détaillée plus loin. En général, les éléments « chimio-cliquables » ajoutés aux oligonucléotides sont des groupes amino, alcynes ou thiols. La préparation de ces biomolécules est décrite ci-dessous.

A. Synthèse des conjugués indolizines-ODN

1. Généralités sur la synthèse d'oligonucléotide

Qu'il soit question de produire quelques microgrammes pour la recherche académique ou plusieurs kilogrammes pour une utilisation thérapeutique ou commerciale, la synthèse sur phase solide reste la méthode privilégiée pour la fabrication d'oligonucléotides. Greffée sur une résine, la séquence est agrandie par des étapes successives de couplage et de déprotection avec un système de filtrage permettant l'élimination des excès de réactifs par simples lavages. Inspiré par la Synthèse Peptidique sur Phase Solide (notée SPPS) établie par Bruce Merrifield en 1963,¹⁴ l'assemblage d'acides nucléiques emploie une plateforme automatisée aujourd'hui basée sur la chimie des phosphoramidites.¹⁵ On parle alors de SPOS (Solid Phase Oligonucleotide Synthesis), une approche envisagée pour la première fois en 1965 par Letsinger et Mahadevan.¹⁶ Leur étude initiale faisait appel à des intermédiaires phosphotriesters durant l'élongation du brin. Le couplage d'oligonucléotides par cette méthode aujourd'hui obsolète est représenté dans le Schéma 86.

Méthode phosphotriester (sur phase solide):



Méthode phosphodiester (en solution):

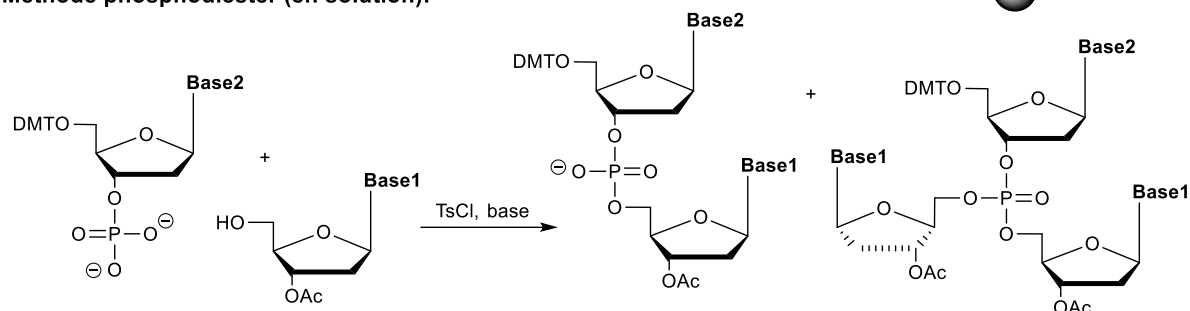


Schéma 86 : Couplage d'oligonucléotides par la méthode phosphotriester sur support solide (en haut) et phosphodiester en solution (en bas)

Son aspect clé reposait sur la protection du groupe phosphate afin d'empêcher une ramification de l'oligonucléotide,¹⁷ un phénomène qui handicapait systématiquement l'approche phosphodiester antérieure.¹⁸ Le groupement protecteur le plus fréquent était un β -cyanoéthyle, facilement éliminé par traitement à l'hydroxyde d'ammonium. La condensation internucléosidique était ensuite assurée par des activateurs tels que le chlorure de mésityl sulfonyle (MSCl) ou le mésityl sulfonyl nitrotriazole (MSNT). Le support d'origine était, quant à lui, constitué d'un polymère surnommé « popcorn ». Ce mélange de styrène et de divinylbenzène n'est plus utilisé aujourd'hui car il a tendance à gonfler. Letsinger a donc focalisé ses travaux ultérieurs sur la synthèse d'ADN en solution.

La chimie des phosphotriesters fut la norme pendant une décennie, mais elle souffrait néanmoins d'inconvénients. Parmi eux figurait la courte longueur du brin généré. Puisque l'efficacité par étape de couplage ne dépassait généralement pas le seuil des 95%, la séquence était souvent limitée à 20 bases nucléotidiques. À titre d'exemple, la synthèse d'une chaîne de 30 bases selon cette méthode serait associée à un rendement global modeste de 21%. De plus, le temps de couplage était long (plus d'une heure et demie par cycle), et la synthèse d'oligonucléotides requérait donc plusieurs jours.

Des protocoles plus efficaces et plus rapides étaient donc nécessaires pour la préparation de chaînes nucléotidiques longues. En 1975, Letsinger a apporté une nouvelle contribution majeure en développant la méthode des phosphites triesters,¹⁹ à partir de laquelle l'approche phosphoramidite contemporaine a été dérivée. La chimie des phosphites est basée sur

l'utilisation de dérivés nucléotides P(III), bien plus réactifs que leurs analogues phosphoryl P(V) (Schéma 87). Cette stratégie requiert une étape supplémentaire d'oxydation afin de générer l'espèce phosphate désirée. L'oxydation a lieu après chaque étape de couplage plutôt qu'à la fin de l'élongation car la liaison phosphite triester intermédiaire est instable, particulièrement en conditions acides requises pour l'élimination du groupement protecteur DMT (diméthoxytrityle).

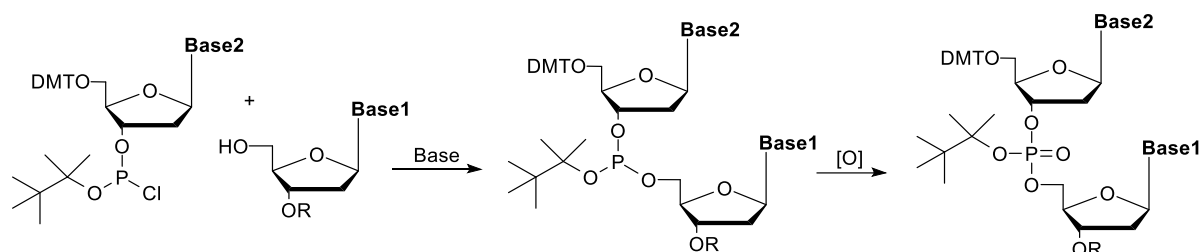


Schéma 87: Synthèse d'oligonucléotide par la méthode des phosphite triesters

Grâce à la grande réactivité des espèces P(III), le temps de réaction par cycle de couplage a été réduit à 30 minutes, raccourcissant ainsi considérablement le processus de synthèse. Malheureusement, cette nouvelle méthodologie présentait toujours des inconvénients. En effet, le réactif phosphomonochloridite est très sensible à l'hydrolyse et à l'oxydation par l'air, ce qui rend son stockage difficile. Il devait donc être préparé in situ avant chaque couplage à partir d'un phosphorodichloridite (ROPCl_2) et du nucléoside correspondant. Cette réaction conduisait également à la formation d'un sous-produit dimère 3'-3' (Schéma 88) qui diminuait le rendement global de la synthèse par réduction de la concentration en réactif désiré. De plus, l'excès de phosphorodichloridite restant en solution pouvait réagir avec les hydroxyles libres de la chaîne oligonucléotidique croissante avant que le couplage suivant n'ait eu lieu, générant ainsi des séquences tronquées ou indésirées.

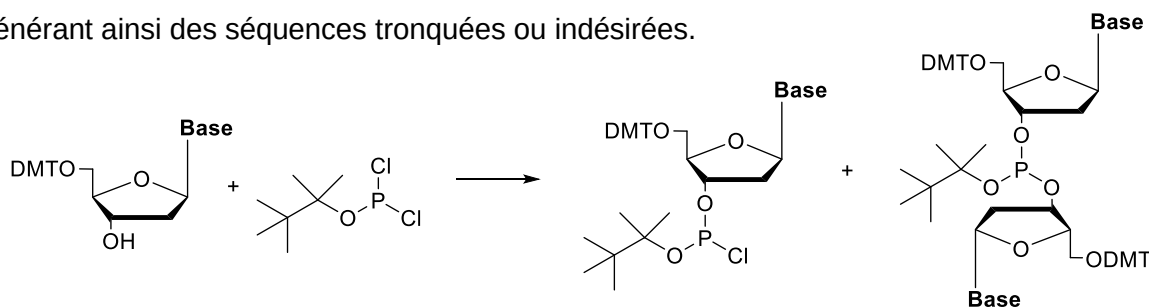
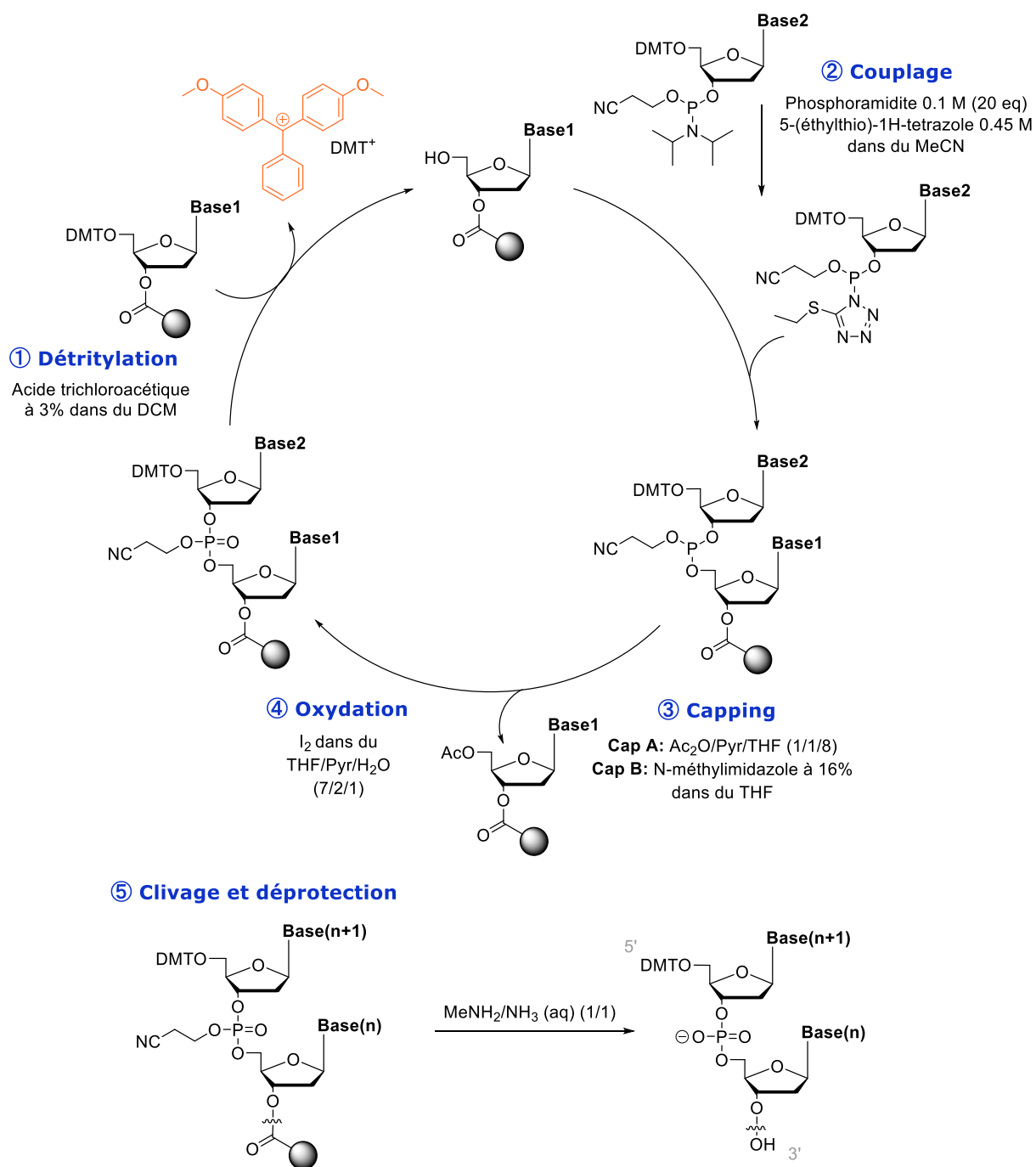


Schéma 88 : Réaction entre un nucléoside protégé en 5' et un phosphodichloridite

Quelques années plus tard, la chimie mise au point par un ancien étudiant de Letsinger, Marvin Caruthers, a surmonté ces inconvénients. Dans un premier temps, il a trouvé une alternative à la résine « popcorn » utilisée durant la SPOS. En 1981, Caruthers et ses collègues ont partagé un nouveau protocole où le polystyrène a été remplacé par de la silice inorganique.²⁰ Cela a directement inspiré les travaux de Köster publiés trois ans plus tard et durant lesquels la synthèse oligonucléotidique a été réalisée sur du verre à porosité contrôlée

(support CPG, pour Controlled Pore Glass), un verre à base de silice comprenant des pores de taille bien définie.²¹ Ne gonflant pas dans les solvants organiques, chimiquement inerte et stable (sauf en milieu fortement alcalin), le support CPG reste aujourd'hui la référence absolue pour la synthèse d'oligonucléotides en phase solide.

Plus marquante encore, la contribution la plus notable de Caruthers est l'introduction de l'approche phosphoramidite pour la synthèse d'oligonucléotides.¹⁵ En remplaçant le chlorure du réactif phosphite par un amide, il a contourné les inconvénients majeurs de la méthode précédente. En effet, les phosphoramidites sont stables et peuvent être stockées en toute sécurité sous forme de poudre. Cette avancée a permis la fabrication et la distribution commerciale des réactifs nécessaires à la préparation d'ADN ou d'ARN, et a mené à une automatisation robotisée de leur synthèse. Le processus peut être schématisé par un cycle de réactions d'une grande simplicité et d'une efficacité remarquable (Schéma 89). La chimie des phosphoramidites a résisté à l'épreuve du temps et reste pratiquement inchangée depuis sa conception dans les années 80s.



Phosphoramidites nucléosidiques et leurs protections base-labiles

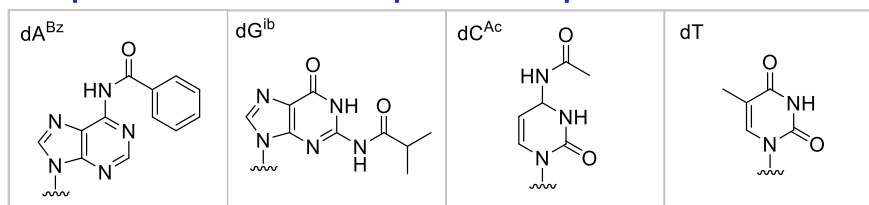


Schéma 89 : Cycle de synthèse d'oligonucléotides sur phase solide

Comme indiqué précédemment, les supports utilisés sont constitués de silice poreuse (CPG). Cette dernière est fonctionnalisée par des groupements permettant l'ancrage de la résine au

premier nucléotide. Un lien succinyle est le plus couramment utilisé à cet effet, facilement clivé en fin d'élongation par traitement basique. Le support commercial peut soit être directement lié au premier nucléotide de la séquence, soit porter une modification permettant l'introduction d'un bras chimique particulier à l'extrémité 3' de la chaîne. En effet, contrairement au processus naturel, l'élongation automatisée se fait dans le sens 3' → 5' car la fonction hydroxyle en position 5' est plus réactive. Les oligonucléotides produits peuvent être composés de nucléosides naturels comme d'analogues synthétiques, et diverses fonctions peuvent être introduites au sein de la séquence ou à son extrémité 5' à l'aide de différents phosphoramidites (méthyle, alcyne, maléimide, aldéhyde, etc). Par ailleurs, les nucléotides incorporés sont convenablement protégés pour éviter les réactions secondaires. Un DMT est toujours trouvé en position hydroxyle 5' tandis que l'amine des bases nucléaires est dotée d'une protection spécifique (benzoyle pour l'adénine, isobutyle pour la guanosine, acétyle ou benzoyle pour la cytidine...). Le fragment phosphoramidite est, quant à lui, protégé par un groupement 2-cyanoéthyle.

Le cycle synthétique de la SPOS est composé de quatre étapes pour chaque nucléotide incorporé :

① **Détritylation** : La synthèse commence par l'élimination du DMT lié au support avec une solution douce d'acide trichloracétique à 2-3% dans le DCM. La déprotection peut être suivie par dosage spectrométrique grâce à la formation d'un cation diméthoxytritylium (DMT⁺) de couleur orange vif. La résine est ensuite rigoureusement lavée à l'acétonitrile pour éliminer toute trace d'acide résiduelle.

② **Couplage** : Le nucléotide suivant est ensuite couplé sur la fonction hydroxyle libérée. L'activation du phosphoramidite se fait avec du 5-(éthylthio)-1H-tétrazole. Ce catalyseur est un acide suffisamment faible pour ne pas affecter la protection DMT du deuxième réactif, mais reste amplement acide pour la formation efficace du lien phosphite triester désiré. Le mécanisme d'activation est détaillé ci-dessous (Schéma 90) et se déroule par protonation de la diisopropylamine, servant de groupe partant, suivie de son déplacement par le tétrazole. Cela donne lieu à un intermédiaire tétrazolide très réactif qui subit ensuite une rapide substitution nucléophile par l'hydroxyle 5' de l'unité précédente, comme l'ont montré des expériences de RMN ³¹P.²²

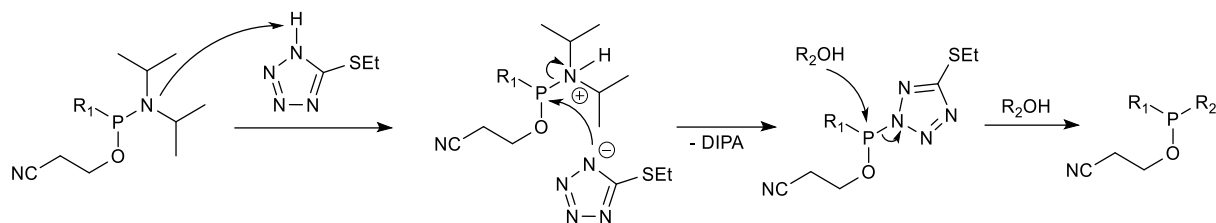


Schéma 90 : Activation d'un phosphoramidite par le 5-(éthylthio)-1H-tétrazole

③ **Capping** : Il se peut que l'étape de couplage ne soit pas totale. Afin d'éviter la formation de séquences tronquées, les fonctions 5' hydroxyles libres n'ayant pas réagi sont acétylées et rendues inactives pour le reste de la synthèse à l'aide d'un mélange d'anhydride acétique et de N-méthylimidazole.

④ **Oxydation** : Pour terminer, le phosphite internucléosidique est oxydé en lien phosphotriester pentacoordonné en présence de diiode et d'eau. Un nouveau cycle de synthèse peut alors commencer.

Une fois le dernier nucléotide attaché, la séquence est clivée du support à l'aide d'un mélange ammoniacque/méthylamine noté AMA (⑤ **Clivage**). Ce traitement basique permet également de déprotéger les bases nucléaires et d'éliminer le groupement cyanoéthyle du phosphate pour engendrer le squelette ADN naturel. La protection DMT finale présente à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide est conservée pour une étape de purification en phase inverse sur cartouche Glen-Pak®. Elle permet notamment d'éliminer les séquences tronquées : lors du chargement, l'entité DMT-ODN adhère à la cartouche tandis que les séquences de délétions ne sont généralement pas retenues ; après-quoi le DMT est retiré par traitement au TFA aqueux à 1%. Une fois élué, l'oligonucléotide est purifié par RP-HPLC.

Les modifications post-synthèse souhaitées sont ensuite introduites par réactions *click* impliquant des fonctions chimiques convertibles incorporées durant l'élongation.

Il faut noter que d'autres méthodologies ont depuis été développées pour la SPOS, comme l'approche dite aux hydrogenophosphonates¹⁹ ou plus récemment la nouvelle stratégie au phosphore (V) développée par Baran.²⁰ Cela dit, l'approche des phosphoramidites reste la méthode la plus largement utilisée aujourd'hui.

2. La chimie « click » pour les ligations bioorthogonales compatible avec les oligonucléotides

La chimie « click » est un concept introduit pour la première fois en 2001 par l'équipe de K.B. Sharpless dans une revue aujourd'hui considérée comme historique.²³ Une étude des

molécules naturelles - la Nature étant, bien entendu, la chimiste par excellence - a révélé une préférence pour les liaisons carbone-hétéroatome comparées aux liaisons carbone-carbone. En effet, les acides nucléiques, les protéines et les polysaccharides sont des biopolymères constitués de sous-unités majoritairement liées par des liaisons C—N, C—O, C—P et C—S. Suivant l'exemple de la nature, dont les processus anaboliques sont caractérisés par l'assemblage de petits éléments moléculaires via de telles liaisons C—X, Sharpless définit un ensemble de critères stricts auxquels une réaction doit répondre pour être qualifiée de processus click. Elle doit être modulaire, économe en atomes, simple et stéréospécifique avec une force motrice thermodynamique élevée qui propulse la réaction de manière rapide et irréversible vers la formation du produit désiré, et cela avec un rendement élevé. Les sous-produits générés doivent être minimes et inoffensifs et le lien formé doit être stable en condition physiologique. De plus, la réaction doit s'effectuer en conditions douces (idéalement dans l'eau et à température ambiante) et le produit doit pouvoir être facilement isolé.

Deux ans plus tard, Carolyn Bertozzi invente le terme complémentaire « chimie bioorthogonale », définie comme des réactions click qui se déroulent dans un environnement biologique sans interférer avec les processus biochimiques naturels ni altérer les molécules environnantes endogènes.^{24,25} Cette chimie implique des réactions biocompatibles et sélectives entre des groupements fonctionnels qui ne sont normalement pas présents dans les organismes vivants.

Bien que répondre à ces exigences soit un défi de taille, plusieurs réactions respectant la majorité des critères définis ci-dessus ont été identifiés. Parmi elles, on compte les réactions d'ouverture de cycle nucléophiles (époxydes, aziridines, aziridinium, etc), la chimie des carbonyles non aldolique, les additions de Michael et les réactions de cycloaddition (cycloaddition 1,3-dipolaire, réaction de Diels-Alder). Avec plus d'un millier de nouvelles publications sur le sujet ajoutées à la base de données SciFinder chaque année depuis sa conception, il va sans dire que l'avènement de la chimie click a eu une profonde influence sur toutes les branches de la synthèse organique. Elle a même valu à Sharpless, Bertozzi et Morten Meldal le prix Nobel de chimie en 2022.

Une multitude de revues a répertorié en détail les réactions click ainsi que leur évolution et leurs applications au fil des ans.^{26–31} À ce titre, nous ne présenterons que quelques exemples du vaste groupe de techniques recensées par la littérature. En particulier, les méthodologies les plus représentatives dans le domaine de la chimie oligonucléotidique seront mises en évidence.

a) Les cycloadditions azoture-alcyne

La réaction click la plus classique est la cycloaddition 1,3-dipolaire entre des groupes azoture et alcyne menant à la formation d'un cycle [1,2,3]-triazole. Sharpless a qualifié cette réaction de « premier exemple de chimie click », et elle reste la stratégie la plus répandue à ce jour. Sa popularité s'explique en partie par l'introduction facile des fragments azotures et alcynes à faible gêne stérique dans l'échafaudage des sous-unités moléculaires à assembler. De plus, ces groupements sont chimiquement inertes envers la plupart des fonctions naturellement portées par les biopolymères et peuvent donc être considérés comme bioorthogonaux et biocompatibles.

La condensation originelle de Huisgen, du nom du chercheur qui a introduit le concept de cycloadditions 1,3-dipolaires en 1961,³² se déroulait à haute température (généralement dans du toluène à reflux pendant plusieurs heures, voire plusieurs jours) et engendrait un mélange de régioisomères 1,4- et 1,5-triazoles (Schéma 91). Naturellement, les températures élevées, les temps de réaction longs et la faible régiospécificité de la cycloaddition limitent sévèrement son application (des conditions aussi dures entraîneraient une dégradation de l'ADN) et ne répondent pas aux principes de chimie click.

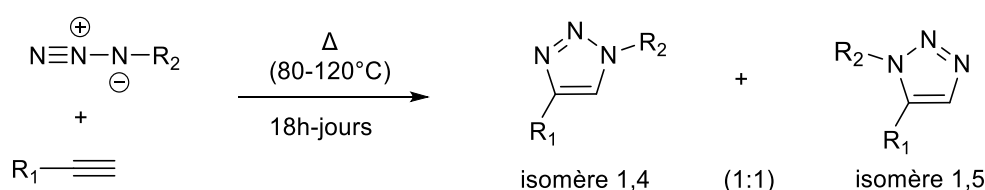


Schéma 91 : Cycloaddition 1,3-dipolaire thermique entre un azoture et un alcyne de Huisgen

Les travaux menés simultanément et indépendamment par l'équipe de Meldal³³ et Sharpless³⁴ en 2002 ont permis de remédier à ces limitations par simple addition d'un métal en solution. La cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre(I) (notée CuAAC, pour Cu-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition) évolue à température ambiante et conduit à la formation exclusive de l'isomère 1,4-triazole. Cette variante au cuivre est également caractérisée par une accélération de la cinétique d'un facteur 10^6 à 10^8 . Rapide et régiosélective, la CuAAC est si efficace qu'elle est devenue synonyme de réaction click. En effet, elle est compatible avec une multitude de solvants, y compris l'eau, et les rendements sont souvent quantitatifs.³⁵ De plus, les réactifs sont relativement inoffensifs. Le Cu(I) présente aussi l'avantage d'être peu coûteux et facile à manipuler. La plupart des protocoles utilisés aujourd'hui implique une réduction *in situ* de sources stables de Cu(II) telles que le sulfate de cuivre en présence d'ascorbate de sodium, ou la médiamutation d'espèces Cu(II)/Cu(0). Les interférences redox sont facilement gérées par addition d'un ligand tel que le tris(benzyltriazolylméthyl)amine (THPTA) qui vient stabiliser le cuivre sous sa forme réduite et accélérer davantage la

cycloaddition. En outre, le THPTA protège les cellules en minimisant les dommages causés par les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) produits par le cuivre dans les systèmes vivants.

Contrairement à la variante non catalysée, la présence de cuivre exclut une voie mécanistique concertée au profit d'un processus en plusieurs étapes. Des calculs DFT combinés à des études cinétiques ont permis d'identifier deux mécanismes concurrents possibles pour la CuAAC^{36–39}: un processus relativement lent catalysé par une espèce Cu mononucléaire et une voie plus rapide promue par la formation d'une espèce cuivreuse dinucléaire (Schéma 92).

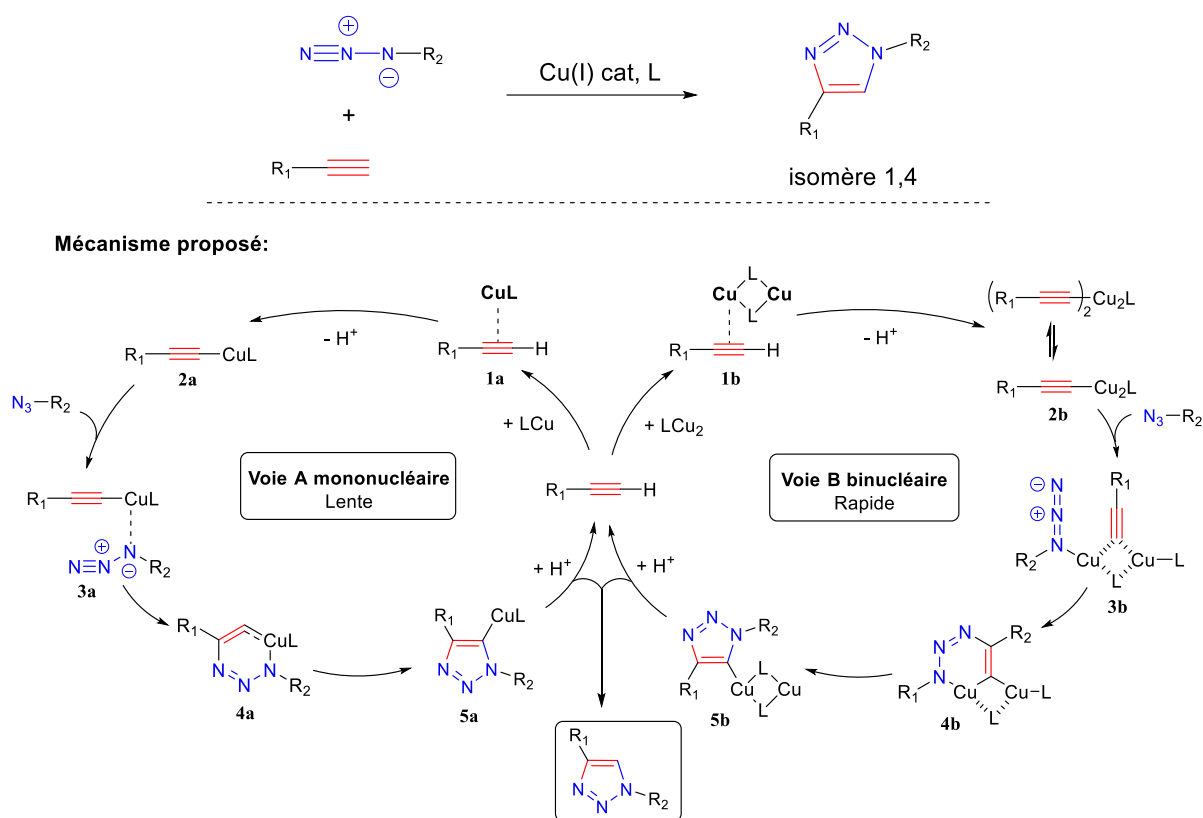


Schéma 92 : Deux voies mécanistiques compétitives pour la CuAAC

Dans les deux voies, la première étape réactionnelle consiste en la formation d'un complexe π -alcyne ($\mathbf{1a}$ et $\mathbf{1b}$). La formation du complexe de coordination réduit le pKa de l'alcyne et facilite sa déprotonation, générant ainsi un adduit Cu-acétylure ($\mathbf{2a}$ et $\mathbf{2b}$). Ceci est suivi par la coordination de l'azoture au Cu(I) de l'acétylure dans la voie A ($\mathbf{3a}$), ou la formation du complexe binucléaire $\mathbf{3b}$ selon la voie B. Après cela, une addition nucléophile se produit conduisant aux métallacycles Cu(III) hexacycliques $\mathbf{4a}$ et $\mathbf{4b}$. La présence de cuivre joue un rôle essentiel dans la formation de la liaison C—N par réduction de la barrière d'activation par rapport à la réaction non catalysée (l'énergie passe de ~ 26 kcal/mol à ~ 19 à 15 kcal/mol en fonction des substituants). Durant l'étape finale, le cycle se contracte pour former le pentacycle triazolyle-cuivre ($\mathbf{5a}$ et $\mathbf{5b}$) qui subit ensuite une protolyse libérant le produit désiré.

La cycloaddition azoture-alcyne peut également être catalysée par l'argent⁴⁰, le nickel⁴¹ ou l'or⁴², bien qu'il s'agisse d'alternatives plus onéreuses. Des versions menant régiosélectivement à l'isomère 1,5-triazole ont également été développées en remplaçant le cuivre par du ruthénium⁴³, du zinc⁴⁴ ou de l'iridium⁴⁵.

Malgré sa grande efficacité, la CuAAC et ses variantes réalisées *in vivo* exposent l'organisme à des métaux exogènes qui peuvent être toxiques ou interférer avec son métabolisme. Comme mentionné plus haut, les métaux peuvent en effet catalyser la formation d'espèces radicalaires oxygénées (ROS) capables d'endommager les structures cellulaires par stress oxydant. Pour contourner ces effets indésirables, des alternatives biocompatibles sans métal ont été conçues. La plus remarquable est la ligation « SPAAC » (pour Strain Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition) développée par Bertozzi en 2004.⁴⁶ Dans cette méthodologie, les dérivés de cyclooctyne remplacent les alcynes terminaux. En effet, la contrainte du cycle est utilisée comme alternative à l'activation métallique ou thermique de la triple liaison : la structure rigide du cyclooctyne plie les angles de l'hybridation sp à 163° .⁴⁷ Cette déformation de la liaison représente un gain d'énergie de 18 kcal/mol,⁴⁸ ce qui pousse la géométrie de l'alcyne vers l'état de transition.⁴⁹ Une grande partie de l'énergie est libérée lors de la cycloaddition, entraînant ainsi une accélération de la cinétique comparée aux alcynes non-contraints. La SPAAC est illustrée dans le Schéma 93. On note qu'un mélange racémique est obtenu lorsqu'un dérivé asymétrique du cyclooctyne est utilisé.

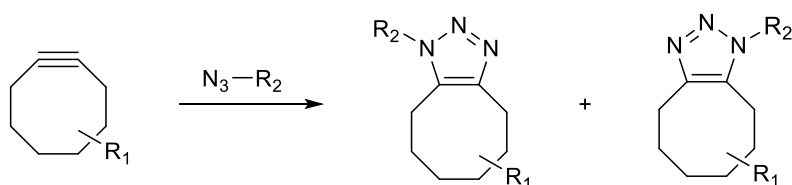


Schéma 93 : Réaction de cycloaddition des azotures et des cyclooctynes contraints (SPAAC)

Cette méthodologie, présentant initialement une efficacité et une réactivité limitée en milieu aqueux, a été améliorée par modification du cycle contraint. Il s'avère que la tension diminue l'énergie de la LUMO_{alcyne}, ce qui la rapproche de la HOMO_{azoture} et améliore ainsi les interactions entre les deux orbitales.⁵⁰ Il est alors possible d'augmenter la cinétique de la réaction par introduction de substituants électroattracteurs sur le cyclooctyne de telle sorte à induire un déplacement hypo-énergétique plus intense de la LUMO_{alcyne}. À titre d'exemple, l'addition de deux atomes de fluor en position 3 du cyclooctyne (DIFO) augmente la vitesse de la cycloaddition d'un facteur 60.⁵¹ Une réactivité comparable a également été observée pour les dérivés du dibenzocyclooctyne (DIBO), les deux benzènes venant augmenter la tension du cycle et abaisser la barrière d'activation énergétique.⁵² L'optimisation de la SPAAC est aussi possible par incorporation d'hétéroatomes au sein du cyclooctyne, augmentant ainsi

la solubilité de la molécule dans l'eau comme c'est le cas pour le DIMAC.⁵³ Quelques exemples de cyclooctynes commercialisés pour la SPAAC sont présentés sur la Figure 35.

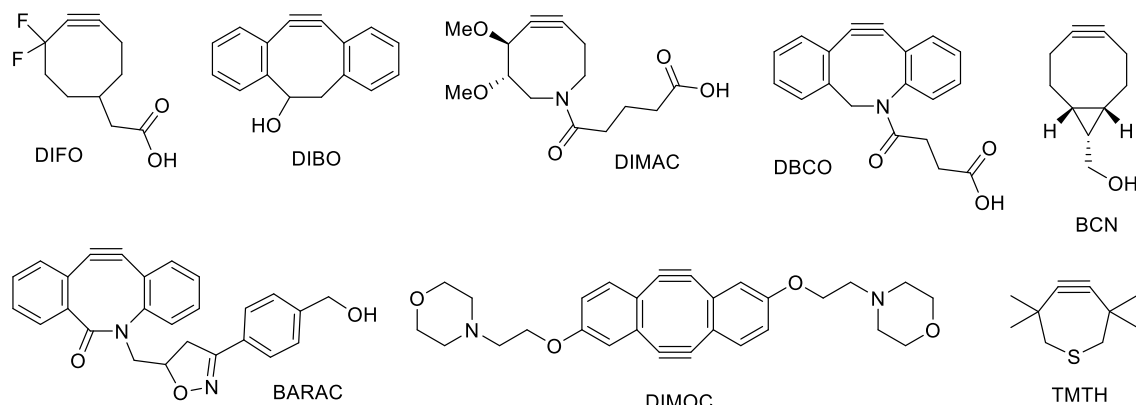


Figure 35 : Alcyne contraints cycliques commerciaux pour la SPAAC

Compte tenu de la taille des molécules porteuses d'alcyne, l'approche SPAAC conduit à une liaison plutôt volumineuse. Il existe des méthodes de conjugaison sans métal moins encombrantes, notamment celles dérivées de la chimie non aldolique des carbonyles. De plus, même après optimisation, la SPAAC reste plus lente que la CuAAC qui maintient sa place sur le podium en tant que deuxième réaction click la plus rapide à ce jour (la médaille d'or étant attribuée aux cycloadditions Diels-Alder à demande inverse).⁵⁴

b) Les ligations basées sur la chimie des carbonyles

La formation d'imines, d'éthers oximes et d'hydrazones à partir de composés carbonylés est une stratégie de conjugaison couramment utilisée au sein du laboratoire I₂BM. Cette classe de réactions implique une condensation d'un aldéhyde ou d'une cétone avec une amine, une oxyamine ou une hydrazine, libérant par la même occasion une molécule d'eau comme unique sous-produit (Schéma 94).

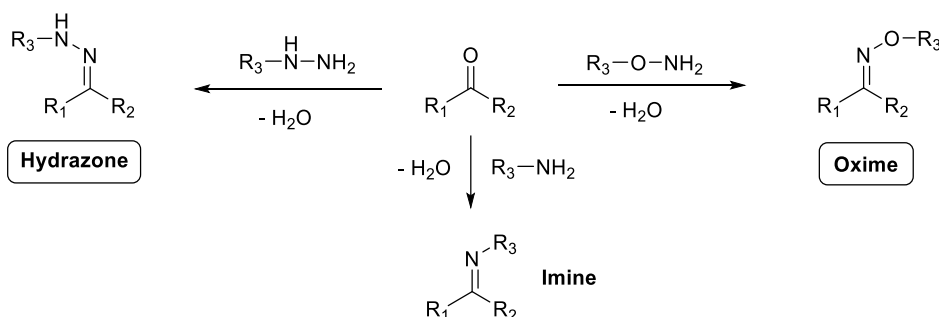


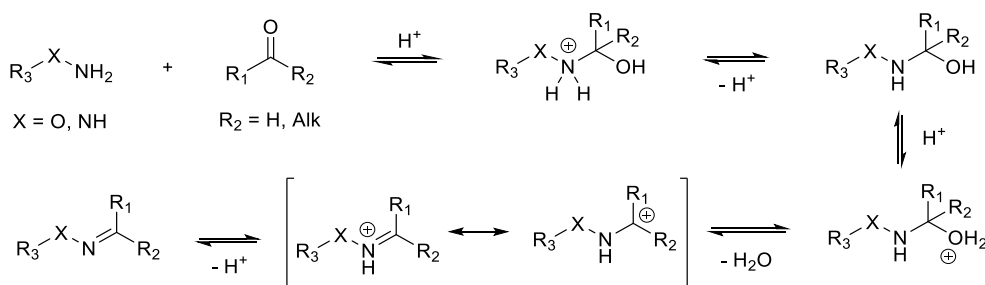
Schéma 94 : Réactions click basées sur des composés carbonylés

Les imines présentent une faible chimiosélectivité et peuvent être facilement hydrolysées. Elles sont donc moins exploitées pour l'assemblage de biomolécules que les hydrazones et les oximes. La plus grande stabilité de ces derniers en milieu aqueux s'explique par

l'hétéroatome adjacent à l'azote.⁵⁵ En effet, la délocalisation électronique des doublets non liant diminue le caractère électrophile du carbone sp_2 ce qui le rend moins susceptible aux attaques nucléophiles. De plus, les oximes ont une demi-vie de 25 jours dans l'eau grâce à l'effet inductif supérieur de l'oxygène en α , et sont de ce fait plus résistantes face à l'hydrolyse que les hydrazones (dont la décomposition est 600 fois plus rapide). Par conséquent, la ligation oxime constitue la liaison la plus adaptée à la préparation de bioconjugués et à leur application *in vivo*.⁵⁶⁻⁵⁹

Notons que ces réactions sont plus anciennes que le reste des méthodologies click : les oximes ont été découvertes et étudiées par Meyer dès 1882.⁶⁰ De même, le premier article consacré aux hydrazones a été publié au cours de la même décennie par Fischer.⁶¹ Leur utilité synthétique et leurs activités biologiques ont depuis lors été largement étudiées.^{62,63} L'attention spéciale qu'elles ont suscitée s'explique par la simplicité et l'efficacité de leur formation. En effet, les liaisons oximes/hydrazones sont générées rapidement (quelques minutes à quelques heures) à partir de fonctions faciles à introduire. Les hydroxylamines sont si réactives envers les composés carbonylés que l'acétone n'est pas utilisée pour rincer la verrerie dans le laboratoire I₂BM. Par ailleurs, les liens oximes/hydrazones sont de très petite taille et conduisent à une perturbation minime des fonctions natives des biomolécules.

En pratique, la ligation est généralement effectuée à pH 4-5 et à une concentration de l'ordre du millimolaire. Les conditions acides accélèrent la réaction,⁶⁴ mais il a été démontré qu'en dessous de pH 3, la vitesse est de nouveau ralentie.⁵⁹ En général, les aldéhydes sont plus réactifs que les cétones envers les oxyamines ou les hydrazines, principalement par effets stériques. Le mécanisme de condensation est détaillé dans le Schéma 95. La réaction débute par une attaque nucléophile de l'amine terminale portée par l'hydroxylamine/l'hydrazine sur le carbone électrophile, activé par un proton. Après transfert de H^+ , l'hémi-aminal intermédiaire subit une déshydratation. Une déprotonation finale aboutit à l'oxime ou l'hydrazone souhaité.



La protonation joue un rôle clé. On comprend donc que la réaction soit plus lente à pH 7, ce qui limite son utilisation. Cependant, la ligation oxime peut être accélérée en utilisant l'aniline comme catalyseur nucléophile.⁶⁵ Cette accélération s'explique par la formation d'une base de

Schiff intermédiaire, représentée dans le Schéma 96. Sa transimination en oxime est favorisée par rapport à une simple catalyse acide. Les vitesses de réaction sont ainsi augmentées d'un facteur 400 à pH 4,5 et 40 fois à pH 7.

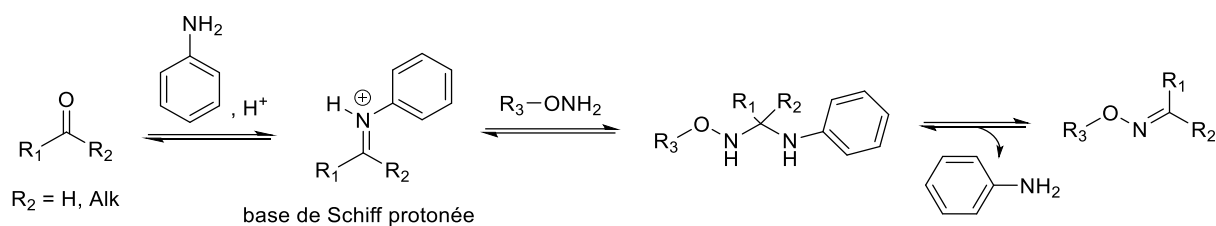
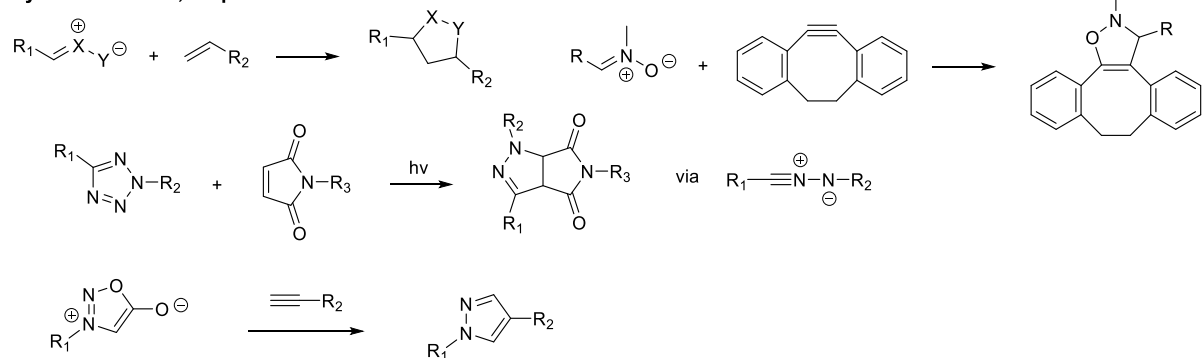


Schéma 96 : Ligation oxime catalysée par l'aniline

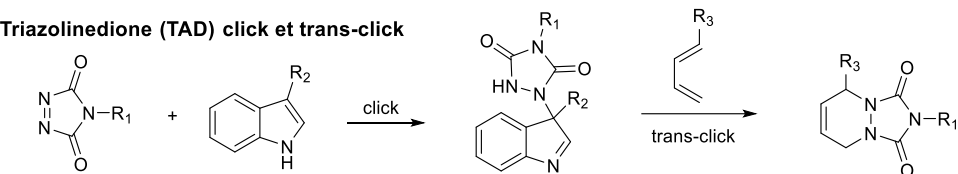
Notons que même si les ligations oxime et hydrazone sont souvent classées sous l'égide des réactions bioorthogonales, cela n'est pas strictement correct. Les oxyamines et hydrazines libres sont rarement trouvées dans les systèmes biologiques, mais on ne peut pas en dire autant des cétones et des aldéhydes. On les trouve par exemple aux extrémités réductrices des glucides qui existent en équilibre avec leur forme ouverte. Cela dit, la ligation oxime a été utilisée avec succès *in vivo*⁶⁶ puisque la concentration de composés carbonylés endogènes potentiellement réactifs dépend de la localisation de la cible et de son environnement.

Outre la formation de liaisons amides, la fonctionnalisation des séquences oligonucléotidiques dans le cadre de notre projet de thèse est exclusivement assurée par des liens triazoles et oximes selon les méthodologies décrites ci-dessus. Cela dit, un large panel de réactions click alternatives existe. Elles sont résumées dans le Schéma 97. Une brève présentation de quelques méthodes occasionnellement utilisées au sein du laboratoire conclura cette partie introductive du chapitre.

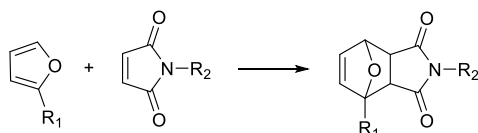
Cycloadditions 1,3-dipolaires



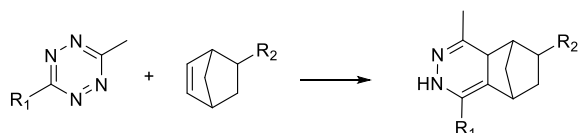
Triazolinédione (TAD) click et trans-click



Cycloaddition [4+2] de Diels-Alder



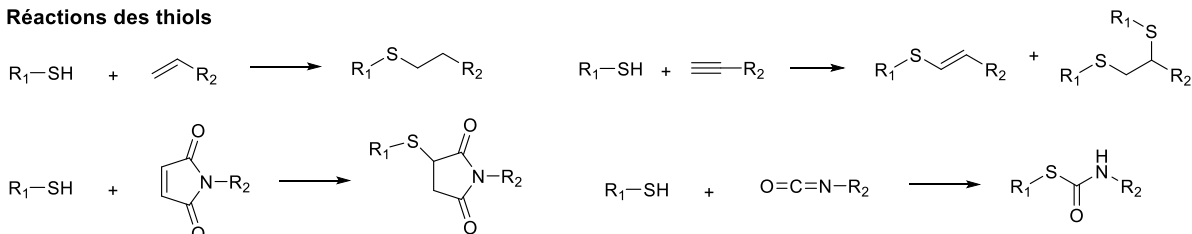
Cycloaddition de Diels-Alder à demande électronique inverse



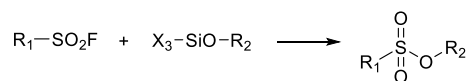
Ouvertures de cycle nucléophiliques



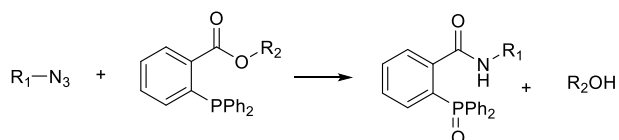
Réactions des thiols



Sulfur fluoride exchange (SuFEx)



Ligation de Staudinger



Ligation squarate

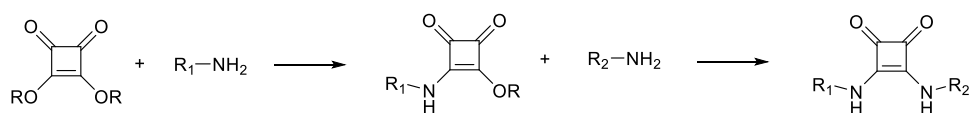


Schéma 97 : Principales réactions utilisées en chimie click

Parmi les réactions les plus marquantes, on peut distinguer la ligation thiol-chloroacétamide (Schéma 98). Étudiée par Lindley dans les années 1960s, cette méthodologie a d'abord été utilisée pour la modification de peptides.⁶⁷⁻⁷⁰ En effet, le chloroacétamide est un électrophile

capable de réagir avec la cystéine par déplacement du chlore par le groupe thiol. Il en résulte une liaison thioéther, peu encombrante et résistante à la réduction ainsi qu'aux échanges thiol-disulfures. Ce type de lien conduit à des peptides possédant une stabilité *in vivo* élevée car ils ne sont pas facilement dégradés par les protéases.⁷¹

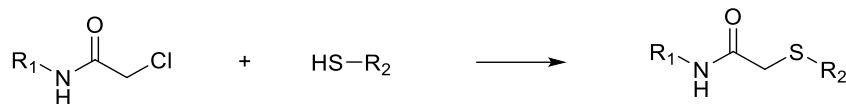


Schéma 98 : Ligation thiol-chloroacétamide

La réaction a ensuite été adaptée à la fonctionnalisation d'oligonucléotides par introduction d'un fragment chloracétamide ou thiol sur le brin d'ADN.⁷² Elle présente par ailleurs l'avantage d'être orthogonale aux ligations oxime et CuAAC : en d'autres termes, la formation de chaque lien peut être contrôlée au sein d'une unité portant chacune des fonctions précurseurs correspondantes. Dans cet esprit, les trois réactions click ont été utilisées par l'équipe I₂BM pour la construction de l'édifice ADN-peptide illustré dans le Schéma 99.⁷³

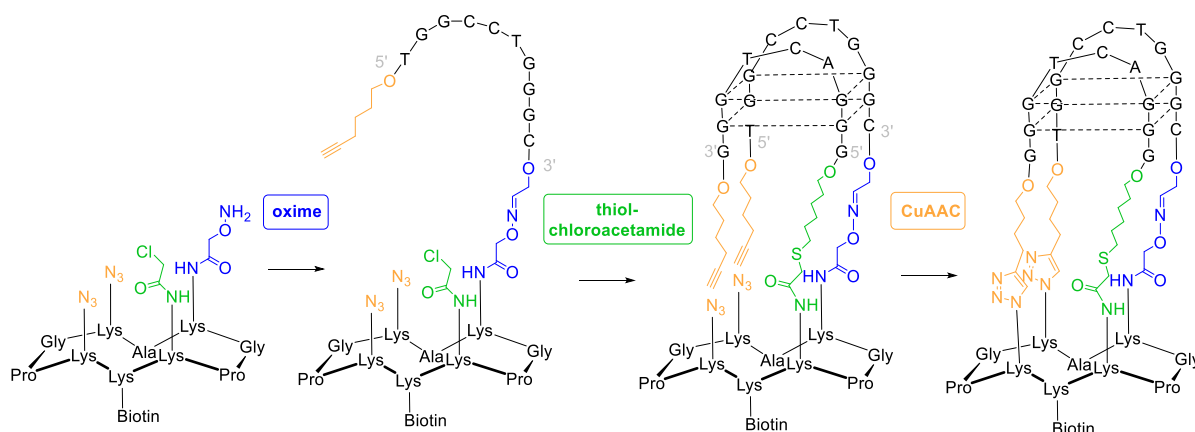


Schéma 99 : Construction d'un bioconjugué ADN-peptide contraint mimant le motif G-quadruplexe HIV-PRO1

Pour finir, il convient de mentionner la réaction de Staudinger (Schéma 100). Décrite pour la première fois en 1919 par le chercheur éponyme,⁷⁴ la ligation a été réintroduite par Bertozzi au début du 21^e siècle dans le cadre de la chimie bioorthogonale.⁷⁵ Efficace et très sélective, cette réaction est aujourd'hui considérée comme l'une des techniques de bioconjugaison les plus importantes. Elle procède par attaque nucléophile d'une phosphine sur un azoture, générant un intermédiaire aza-ylure avec libération de diazote suivi d'une cyclisation intramoléculaire de l'espèce donnant lieu à l'oxazaphosphétane **II**. Après hydrolyse, un oxyde de phosphine lié à un amide est formé.

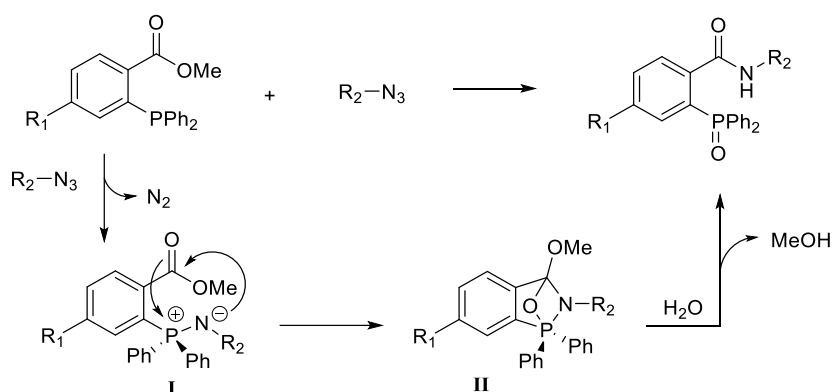


Schéma 100 : Ligation de Staudinger

Aussi simple que soit le processus, le lien généré est plutôt volumineux et assez instable en conditions oxydantes. Pour s'affranchir du fragment phosphine résiduel présent sur le produit final, une variante « sans trace » a été développée en 2000 par le groupe de Bertozzi.⁷⁶ Cette version alternative repose sur une liaison aryle clivable (Schéma 101). En effet, le groupe carbonyle est maintenant attaché au cycle aromatique par l'intermédiaire d'un hétéroatome tel que le soufre. Cette simple modification empêche la cyclisation de l'ylure. À sa place, l'attaque nucléophile de l'azote sur le carbonyle conduit au sel d'amidophosphonium **II**. L'hydrolyse ultérieure de l'adduit produit une liaison amide et libère un oxyde de phosphine, facilement éliminable par filtration et/ou traitement au chlorure d'oxalyle ou au chlorure de zinc.^{77,78}

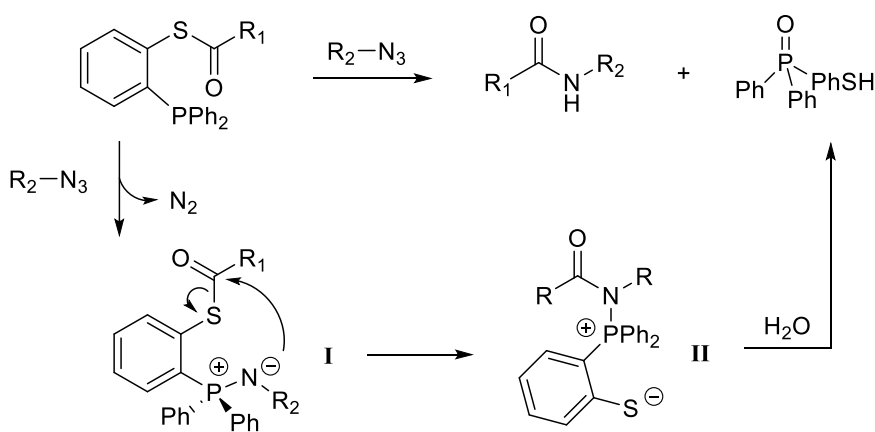


Schéma 101 : Ligation Staudinger sans trace

La réaction de Staudinger a principalement trouvé son application dans la chimie des peptides,⁷⁹⁻⁸¹ mais elle a également été utilisée pour la conjugaison et le marquage d'acides nucléiques.^{82,83}

Après ce préambule, la synthèse de nos bioconjugués peut désormais être abordée.

3. Synthèse des conjugués indolizine-ADN

a) *Synthèse des oligonucléotides modifiés*

Rappelons qu'en plus de vouloir étudier les effets de l'ADN sur la fluorescence de nos indolizines, nous souhaitons également évaluer l'influence du fluorophore sur la stabilité d'un duplex. Pour ce faire, nous avons choisi une séquence représentative composée de 11 paires de bases. Le brin naturel [5'-CGCACACACGC3'] (**82**) est surnommé **ODN1** tandis que sa séquence complémentaire [5'-GCGTGTGTGCG3'] (**83**) est appelée **ODN2**. Ce duplex est un système bien défini avec des propriétés documentées⁸⁴ et il est suffisamment court pour éviter les éventuelles interférences dues à des structures tertiaires spécifiques. Leur synthèse est effectuée par SPOS.

Nos trois indolizines portent une chaîne oxyamine en position 7. Afin de les conjuguer à l'ADN via une ligation oxime, une fonction aldéhyde doit d'abord être incorporée au sein des oligonucléotides. Par souci de simplicité, la modification est introduite à l'extrémité 3' des séquences à l'aide du support commercial 3'-Glyceryl-CPG. Après clivage, la résine libère une fonction 3'-diol. L'aldéhyde est généré dans un deuxième temps par coupure oxydante. Cette dernière est réalisée en présence d'un excès de méta-périodate de sodium dans l'eau.⁸⁵ Les sels et le formaldéhyde généré lors de l'oxydation sont ensuite éliminés par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) sur colonne Sephadex™ NAP-25.

Les oligonucléotides fonctionnalisés **aODN1** et **aODN2** (**86** et **87** respectivement) sont ainsi obtenus suivant le chemin réactionnel illustré dans le Schéma 102.

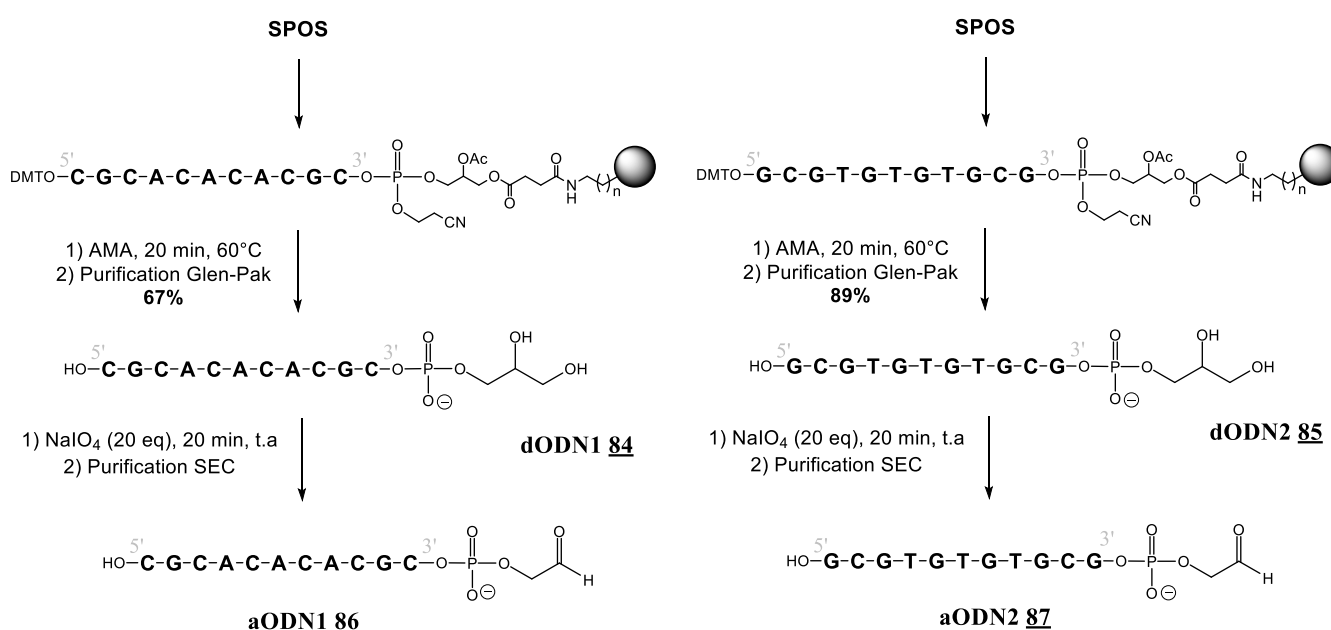


Schéma 102 : Synthèse des oligonucléotides 3'-aldéhydes **aODN1** (**86**) et **aODN2** (**87**)

La conjugaison du fluorophore à l'ADN se décline en deux étapes (Schéma 103). Tout d'abord, l'indolizine est déprotégée. L'élimination du groupement éthyl acétimide est réalisée dans un mélange de TFA/H₂O (1/1) à température ambiante pendant 1 à 2 heures. Le milieu réactionnel est ensuite dilué et lyophilisé afin d'éliminer les traces résiduelles d'acide qui pourraient dégrader l'ADN par dépurination via hydrolyse des liaisons N-glycosidiques.⁸⁶

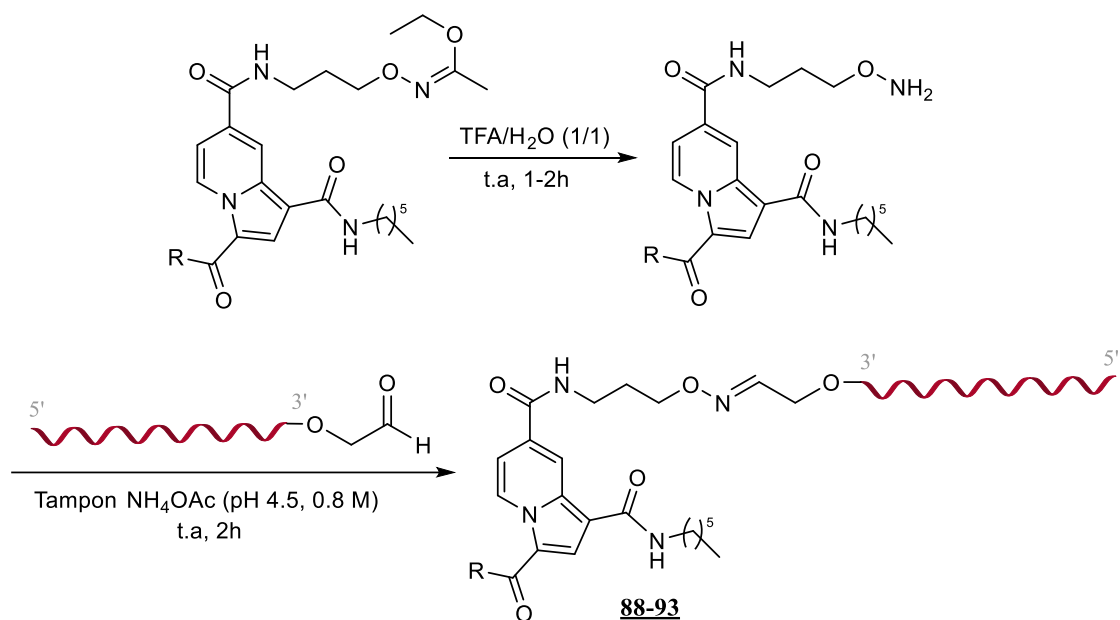


Schéma 103 : Conjugaison de l'ADN aux indolizines par ligation oxime

Durant l'étape de couplage, les oxyamines libérées sont simplement mises en contact avec les oligonucléotides 3'-aldéhydes précédemment synthétisés. La ligation oxime, effectuée dans un tampon acétate d'ammonium à pH 4,5 sans aucun autre additif, est suivie par RP-UPLC/MS. Comme le montre la Figure 36, nous constatons que l'ajout du fragment indolizine au brin d'ADN augmente fortement sa rétention par la colonne. Sans surprise, les conjugués sont plus hydrophobes que la séquence native en raison de l'aromaticité supplémentaire fournie par le fluorophore.

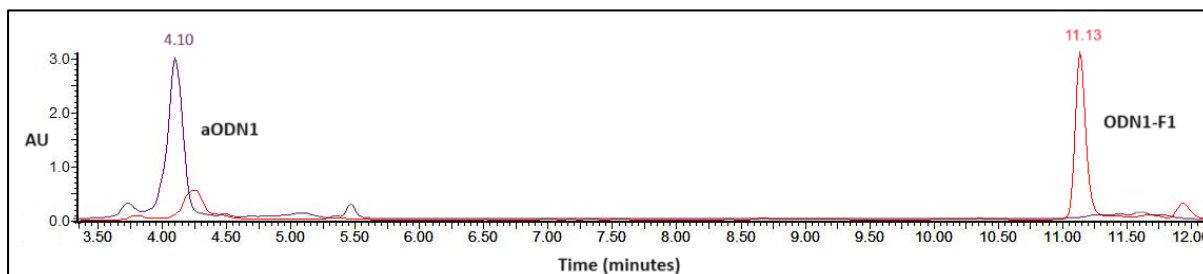
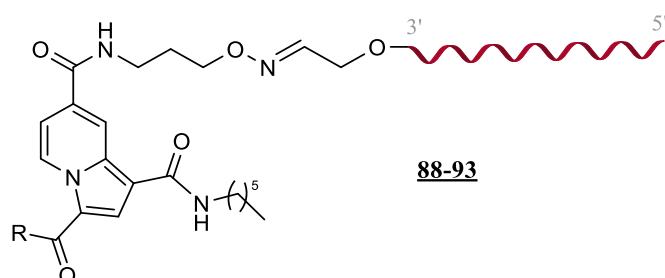


Figure 36 : Chromatogramme RP-UPLC du conjugué **ODN1-F1 (88)** à t=0 (mauve) et t=2h (rouge)

Les résultats des ligations sont rassemblés dans le Tableau 9. Au total, 6 conjugués ont été synthétisés. Les notations F1, F2 et F3 correspondent aux indolizines **81b**, **81g** et **81h** respectivement.



Conjugué	Séquence oligonucléotidique	R	Indolizine correspondante	Rendement (%)
ODN1-F1 (88)	5'CGCACACACGC-F1 ^{3'}	PhOMe	81b	25
ODN1-F2 (89)	5'CGCACACACGC-F2 ^{3'}	NHPr	81g	24
ODN1-F3 (90)	5'CGCACACACGC-F3 ^{3'}	NHEt ₂	81h	18
ODN2-F1 (91)	5'GCGTGTGTGCG-F1 ^{3'}	PhOMe	81b	26
ODN2-F2 (92)	5'GCGTGTGTGCG-F2 ^{3'}	NHPr	81g	20
ODN2-F3 (93)	5'GCGTGTGTGCG-F3 ^{3'}	NHEt ₂	81h	29

Tableau 9 : Rendements des ligations oximes **88-93**

Les produits **88** à **93** sont purifiés par HPLC préparative pour fournir des rendements compris entre 29 et 18%. Avec 4 équivalents d'indolizine ajoutés à la réaction, la conversion de l'oligonucléotide est totale après 2 heures. Initialement, le couplage a été réalisé durant la nuit (~18 heures). Les rendements isolés le lendemain étaient cependant très faibles (6% pour **ODN1-F1 88**). Des résultats similaires sont également obtenus lorsque la réaction évolue pendant 4 heures suivie de la concentration sous vide du milieu réactionnel pour la nuit. Les conditions optimales ont finalement été fixées à 2 heures de couplage immédiatement suivi par la purification du produit. En effet, une exposition prolongée de nos conjugués à des conditions acides, même si elles sont relativement douces dans notre tampon (pH 4,5), conduit à une dégradation de l'ADN. Dans la même veine, une concentration de la solution sous vide augmente son acidité et affecte les rendements. Une étape de SEC intermédiaire réduit par ailleurs la quantité de produit isolé.

Les rendements modestes peuvent également s'expliquer par l'hydrophobie des conjugués : une partie du produit peut éventuellement rester insoluble et ne pas être prélevée par l'aiguille d'injection du système préparatif.

Cela dit, 9 différents duplex peuvent être assemblés et étudiés en comptant les séquences natives (3 duplex *conjugué/séquence naturelle*, 3 duplex *conjugué/conjugué* portant le même fluorophore, et enfin 3 duplex *conjugué/conjugué* dit « mixtes » portant deux fluorophores différents).

B. Caractérisation des conjugués indolizine-ODN

1. Etude de la dénaturation des duplex conjugués par Dichroïsme Circulaire

a) *Le dichroïsme circulaire, un outil spectroscopique pour la caractérisation des structures d'ADN*

Nous avons d'abord examiné la stabilité des duplex par dichroïsme circulaire (noté CD pour Circular Dichroism). Il s'agit d'une méthode spectroscopique largement utilisée pour étudier la structure hélicoïdale de l'ADN en solution. En effet, l'ADN peut exister sous de nombreuses conformations.⁸⁷ La forme prédominante est l'ADN-B, une double hélice droite décrite pour la première fois en 1953 et caractérisée par la formation de deux sillons (sillon principal et sillon mineur). Des structures alternatives ont été découvertes plus tard, notamment la double hélice droite plus compacte A (typique de l'ARN mais rare pour l'ADN) et l'ADN-Z à conformation gauchère. On peut également citer les structures en épingle à cheveux, les triplex, les quadruplexes de guanine et les tétraplexes de cytosines intercalés.⁸⁸

Le dichroïsme circulaire permet de différencier rapidement ces conformations. Il repose sur un phénomène optique provenant des interactions d'une molécule chirale avec des rayons électromagnétiques polarisés.⁸⁹ Une lumière polarisée linéaire est la somme de deux composantes : une onde polarisée circulaire gauche et une onde polarisée circulaire droite. L'absorbance d'une espèce asymétrique peut donc être divisée en deux termes : l'absorbance polarisée gauche (APG) et l'absorbance polarisée droite (APD). La différence entre ces deux absorptions est alors appelée CD et est définie comme $\Delta A = APG - APD$. La grandeur utilisée pour décrire ce phénomène est appelée ellipticité θ , exprimée en degrés :

$$\theta = \tan \frac{a}{b}$$

$$\theta \propto \Delta A$$

avec a et b les demi axes de l'ellipse formée par superposition des deux ondes circulaires détectées après absorption par l'espèce chirale.

Une expression du CD plus pratique et plus parlante est la différence des coefficients d'extinction molaires gauche et droite (ϵ_G et ϵ_R respectivement) notée $\Delta\epsilon$ basée sur la loi de Beer-Lambert:

$$\Delta A = AP_G - AP_D$$

$$\Delta A = (\epsilon_G - \epsilon_D) \times C \times l$$

$$\Delta A = \Delta\epsilon \times C \times l$$

$$\Delta\epsilon = CD$$

Les structures secondaires de l'ADN (et de toutes autres biomolécules) présentent ainsi des signatures distinctives sur leurs spectres CD permettant leur identification.⁹⁰ À titre d'exemple, les caractéristiques de l'ADN-A, B et Z sont représentées sur la Figure 37. L'ADN-B présente un maximum positif à 260–290 nm et une bande négative autour de 250 nm. La position et les amplitudes des maxima/minima diffèrent toutefois selon la séquence. Pour sa part, le spectre de l'ADN-A est caractérisé par une bande positive à 260 nm. La forme Z présente, quant à elle, une quasi-inversion du profil CD de l'ADN-B avec un minimum négatif aux alentours de 290 nm et une bande positive vers 260-270 nm.

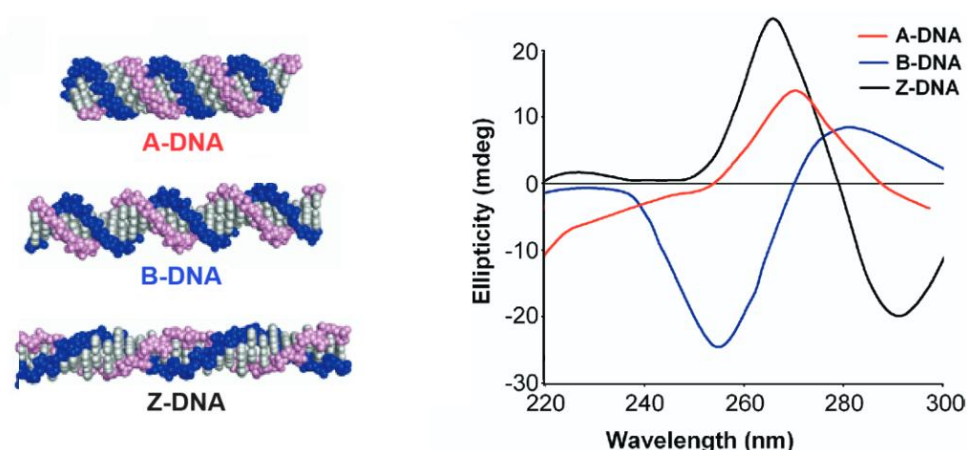


Figure 37 : Spectres CD attendus pour l'ADN-A, l'ADN-B et l'ADN-Z, extrait de Baket et al (2007)⁹¹

Outre l'identification structurelle, le dichroïsme circulaire est également utilisé pour étudier la stabilité de l'ADN. Cette dernière peut être évaluée par une expérience de dénaturation thermique impliquant un dépliage progressif de la structure secondaire en fonction de la température. En effet, la conformation hélicoïdale de l'ADN est principalement maintenue par des liaisons hydrogènes entre les paires de bases complémentaires. Ces liaisons sont facilement rompues par de l'énergie thermique, déroulant ainsi la double hélice pour fournir deux brins distincts. La signature CD caractéristique du duplex est donc perdue à mesure que l'ADN est chauffé. Contrairement aux protéines, ce processus de dénaturation est réversible et le duplex se réassemble une fois l'échantillon refroidi. La température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme de simple brin est appelée point de fusion T_m (pour Melting Temperature). Plus cette valeur est élevée, plus le duplex est stable.

La dénaturation peut également être suivie par spectroscopie UV grâce à l'effet hyperchromique de l'ADN : les bases non appariées absorbent plus de lumière que les bases hybridées.⁹² La dénaturation est donc accompagnée par une augmentation progressive de l'absorbance, représentée par une courbe sigmoïde dont le point d'inflexion permet de définir la température de fusion.

b) *Caractérisation CD/UV des conjugués indolizine-ODN*

L'hybridation des duplex a été réalisée en chauffant à 90°C et pendant 10 min une quantité micromolaire des brins complémentaires solubilisés dans un tampon Tris-HCl (10 mM, pH 7,5, 20 mM NaCl), suivi par le refroidissement lent du système durant la nuit. La dénaturation est suivie le lendemain par CD et UV sur une plage de température croissante de 10°C à 90°C. Les résultats obtenus pour le duplex **ODN1-F1/ODN2-F1 (D4)** sont présentés ci-dessous à titre d'exemple. Nous notons un maximum positif à 220 nm, une bande négative à 257 nm et une seconde bande positive à 282 nm (Figure 38-A), ce qui est cohérent avec la signature CD de l'ADN-B attendue. La conjugaison n'induit donc pas de changement de la structure locale du brin d'ADN double hélice.

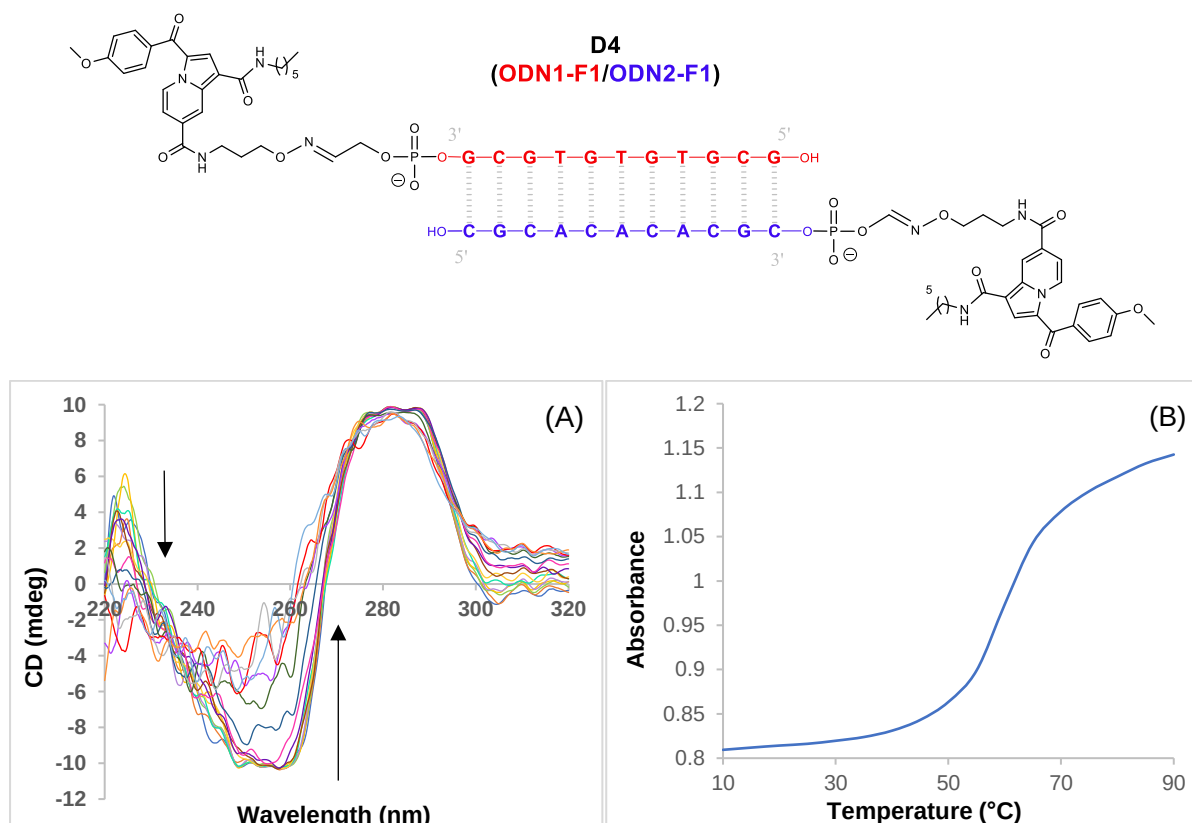


Figure 38 : A) Courbe de dénaturation du duplex **D4**, de 15 à 95°C ; B) Absorption de **D4** en fonction de la température à $\lambda = 260$ nm. Les analyses ont été faites avec des concentrations en duplex de 7,5 μ M.

Une perte de ce profil caractéristique est observée sous chauffage. Les intensités absolues des bandes à 220 et 257 nm diminuent avec un aplatissement progressif du signal à partir de 55°C, tandis que la bande à 282 nm reste relativement inchangée à l'exception de sa queue. Ce changement de forme indique une concentration croissante en ADN dénaturé. Un comportement similaire est constaté pour l'ensemble des duplex évalués.

Les températures de fusion ont été déterminées à partir de l'absorbance des espèces à 260 nm en traçant la seconde dérivée dA^2/dT^2 (où A est l'absorbance et T la température). Les T_m mesurées sont regroupés dans le Tableau 10. Nous avons d'abord déterminé le point de fusion du duplex naturel **D_{nat}** dans le tampon sélectionné. La valeur trouvée (entrée 1, T_m = 57,3°C) est conforme aux déterminations empiriques précédemment effectuées au laboratoire.

Entrée	Duplex	Séquences hybridées	Fluorophore	T_m (°C)	ΔT_m (°C) ^[a]
1	D_{nat}	5'CGCACACACGC3' 3'GCGTGTGTGCG5'	-	57,3	-
2	D1	5'CGCACACACGC-F13' 3'GCGTGTGTGCG5'	F1	61,8	+4,5
3	D2	5'CGCACACACGC-F23' 3'GCGTGTGTGCG5'	F2	63,5	+6,2
4	D3	5'CGCACACACGC-F33' 3'GCGTGTGTGCG5'	F3	61,2	+3,9
5	D4	5'CGCACACACGC-F13' 3'F1-GCGTGTGTGCG5'	F1/F1	59,1	+1,8
6	D5	5'CGCACACACGC-F23' 3'F2-GCGTGTGTGCG5'	F2/F2	62,5	+5,2
7	D6	5'CGCACACACGC-F33' 3'F3-GCGTGTGTGCG5'	F3/F3	61,0	+3,7
8	D7	5'CGCACACACGC-F33' 3'F1-GCGTGTGTGCG5'	F3/F1	59,8	+2,5
9	D8	5'CGCACACACGC-F33' 3'F2-GCGTGTGTGCG5'	F3/F2	61,0	+3,7

Tableau 10 : Température de fusion (T_m) des duplex **D1-D8**. ^[a]Gain de T_m par rapport au duplex naturel **D_{nat}**

La conjugaison d'une indolizine au nucléotide 3'-terminal stabilise le duplex contre la dénaturation thermique (**D1-D3**, entrée 2 à 4). Des gains de T_m compris entre 3,9 et 6,2°C sont enregistrés par rapport à la séquence contrôle **D_{nat}**. L'effet stabilisant de F2 (indolizine **81g**) est le plus significatif, suivi de F1 puis F3. Les hybrides *conjugué/conjugué* présentent également des points de fusion plus élevés que l'analogue naturel (**D4-D6**, entrée 5 à 7).

Cependant, la stabilisation est moindre par rapport au duplex *conjugué/brin naturel*. Nous nous attendions à une stabilisation accrue grâce aux éventuelles interactions d'empilement π - π entre les indolizines, mais une tendance opposée est observée : l'interaction semble être déstabilisante, peut-être en raison de gênes stériques. Encore une fois, F2 induit le plus grand décalage de T_m (+ 5,2 °C). Par contre, la présence de deux fragments F3 aux extrémités du duplex stabilise davantage l'entité par rapport à F1 (+ 3,7 °C et + 1,8 °C respectivement). Les duplex mixtes **D7** et **D8** (entrée 8-9) ont ensuite été examinés mais la stabilisation apportée par deux indolizines différentes reste comparable ou inférieure aux observations précédentes (+ 2,5°C et + 3,7°C respectivement).

Les courbes de dénaturation UV ont également été exploitées pour la détermination des constantes thermodynamiques de chaque duplex. Elles sont rassemblées dans le Tableau 11.

Duplex	ΔT_m (°C) ^[a]	ΔG° (kJ.mol ⁻¹)	ΔH° (kJ.mol ⁻¹)	ΔS° (J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
D_{nat}	-	-47	-107	-202
D1	4,5	-65	-275	-706
D2	6,2	-75	-329	-854
D3	3,9	-59	-214	-521
D4	1,8	-50	-165	-385
D5	5,2	-64	-266	-677
D6	3,7	-57	-212	-521
D7	2,5	-56	-179	-414
D8	3,7	-46	-165	-399

Tableau 11 : Paramètres thermodynamiques des duplex. ^[a]Gain de T_m par rapport au duplex naturel D_{nat}

Les valeurs ont été estimées à l'aide de l'équation de Van't Hoff et sa forme intégrée :

$$\Delta G^\circ = -RT \ln(K_{eq}) = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

$$-\ln(K_{eq}) = \frac{\Delta H^\circ}{R} \frac{1}{T} - \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

ΔG° , ΔH° et ΔS° représentent respectivement l'enthalpie libre de Gibbs, l'enthalpie et l'entropie des équilibres duplex-simplex. T correspond à la température en Kelvin et R à la constante de Boltzmann.

La constante d'équilibre de l'hybridation (K_{eq}) est elle-même estimée à partir de l'équation suivante :

$$K_{eq} = \frac{2 - 2\theta}{\theta^2 - C_t}$$

avec C_t la concentration en oligonucléotide totale.

La fraction des brins dénaturés θ est calculée à partir de la formule standard,

$$\theta = (A - A_{min}) / (A_{max} - A_{min})$$

où A , A_{min} et A_{max} correspondent à l'absorbance de l'échantillon, l'absorbance de la ligne de base inférieure et l'absorbance de la ligne de base supérieure du graphique $A = f(T)$. T_m est la température pour laquelle $\theta = 0,5$.^{93,94} La courbe de $\ln(K_{eq})$ en fonction de $1/T$ se traduit par une relation linéaire. Après ajustement graphique, la pente et l'interception à l'ordonnée sont utilisées pour calculer ΔH° et ΔS° . Un exemple de l'ajustement effectué pour chaque duplex est présenté dans la Figure 39.

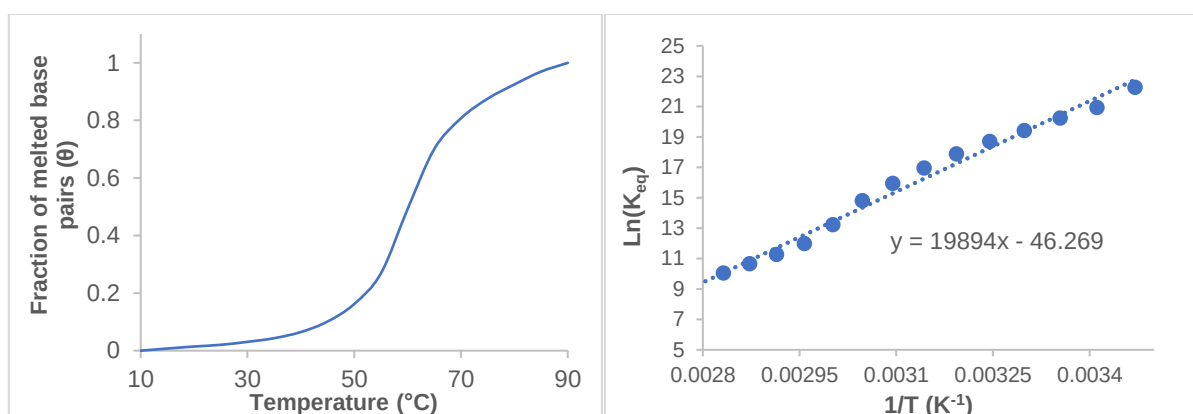


Figure 39 : Ajustement des données de dénaturation thermique pour la détermination de ΔH° , ΔS° et $\Delta G_{25^\circ C}$ pour le duplex **D4**.

Les effets stabilisants de l'indolizine sur les duplex sont également visibles au niveau des paramètres thermodynamiques estimés. On constate que la conjugaison de F2 à l'ADNdb diminue l'énergie libre de Gibbs du système de -28 kJ/mol (Tableau 12, entrée 2). La stabilisation du système est soutenue par une baisse de l'enthalpie ($\Delta\Delta H^\circ = -222$ kJ/mol), bien qu'une variation positive de l'entropie ne soit pas observée. Néanmoins, un comportement similaire (diminution de ΔG° , ΔH° et ΔS°) a été rapporté lors de l'étude des effets stabilisateurs des cyanines sur l'ADN.⁹⁵ Lorsque le duplex est marqué par notre fluorophore F2 sur deux brins, la stabilisation est moins importante (-17 kJ/mol). Une tendance similaire est observée pour F1. En revanche, les effets stabilisateurs apportés par F3 sont comparables que le duplex porte une ou deux indolizines.

entrée		$\Delta\Delta G^\circ(\text{kJ.mol}^{-1})$ [a]		$\Delta\Delta H^\circ(\text{kJ.mol}^{-1})$ [c]		$\Delta\Delta S^\circ(\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1})$ [c]	
		1F[d]	2F[e]	1F	2F	1F	2F
1	F1	-18	-3	-168	-58	-504	-183
2	F2	-28	-17	-222	-159	-652	-475
3	F3	-12	-10	-107	-105	-319	-319

Tableau 12 : Différence de valeurs thermodynamiques pour les duplex d'ADN marqués avec une ou deux indolizines. [a] Différence d'énergie libre de Gibbs : $\Delta\Delta G^\circ = \Delta G^\circ(\text{conjugué}) - \Delta G^\circ(\text{naturel})$, [b] Différence d'enthalpie : $\Delta\Delta H^\circ = \Delta H^\circ(\text{conjugué}) - \Delta H^\circ(\text{naturel})$, [c] Différence d'entropie : $\Delta\Delta S^\circ = \Delta S^\circ(\text{conjugué}) - \Delta S^\circ(\text{naturel})$, [d] Duplex marqué par un fluorophore, [e] Duplex marqué par deux fluorophores.

Une fois les expériences de dénaturation réalisées, l'influence de la conjugaison sur l'émission de nos fluorophores a été étudiée. Pour ce faire, nous avons comparé les paramètres photophysiques dans l'eau des indolizines libres avec celles du conjugué simple-brin et des formes double-brin (duplex *conjugué/brin naturel* et duplex *conjugué/conjugué*). Les résultats sont répertoriés dans le Tableau 13. Comme l'illustre la Figure 40, la ligation de l'indolizine à l'ADN conduit à un quenching (ou extinction) significatif de la fluorescence. L'intensité diminue d'environ de moitié pour F1 mais s'approche à un facteur 10 pour F2 et F3.

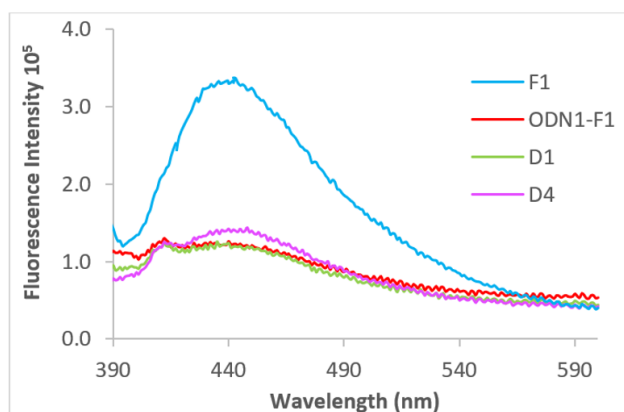


Figure 40 : Spectres d'émission dans l'eau de l'indolizine F1 (81b) et ses conjugués à C = 100 nM

Ce n'est pas une réponse surprenante : le quenching d'un fluorophore par les bases nucléiques est un phénomène documenté dans la littérature qui peut s'expliquer par un transfert d'électrons intramoléculaire provenant du nucléotide vers le colorant photoexcité.⁹⁶ Cela est d'autant plus susceptible de se produire qu'un espaceur court lie les deux entités comme c'est le cas pour nos conjugués. Malgré cette diminution, les conjugués restent relativement fluorescents en solution aqueuse pour des concentrations de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-6} M.

L'hybridation de la sonde à sa cible (ici, le brin complémentaire naturel) induit une réponse variable selon la séquence. Pour les conjugués F1, le simple brin **ODN1-F1** et le duplex **D1** présentent des intensités d'émission comparables (entrées 1 et 3). Lorsqu'on observe F2 (entrées 5 et 6), on remarque une légère augmentation de l'intensité après hybridation. Quant à F3 (entrées 10 et 11), la formation de duplex a l'effet inverse avec une intensité réduite.

Les duplex formés entre deux conjugués complémentaires (**D4**, **D5** et **D6** ; entrées 4, 7 et 12 respectivement) fluorescent plus fort que leurs analogues conjugué/brin naturel. Cela semble instinctif puisque la concentration formelle en fluorophore présent en solution a augmenté ; cependant le gain en intensité n'est pas additif par rapport aux espèces monocaténares. En

ce qui concerne la longueur d'onde d'émission, l'impact de la conjugaison (et de l'hybridation) est négligeable. Les valeurs de λ_{em} restent quasiment constantes avec une variation de 2-3 nm au plus. Les interactions indolizine-indolizine au sein des duplex **D4-D6** n'ont pas d'impact sur cette valeur.

Entrée	Composé	Type	λ_{em} (nm)	Δ (nm) ^[a]	I (CPS) ^[b]
1	F1	Fluorophore libre	448	62	258 170
2	ODN-F1	Conjugué simple brin	446	60	120 820
3	D1	Duplex Conjugué/Brin Naturel	445	59	119 330
4	D4	Duplex Conjugué/Conjugué	445	59	143 790
5	F2	Fluorophore libre	439	105	4 036 400
6	ODN-F2	Conjugué simple brin	440	106	81 940
7	D2	Duplex Conjugué/Brin Naturel	440	106	96 110
8	D5	Duplex Conjugué/Conjugué	440	106	197 920
9	F3	Fluorophore libre	443	79	4 637 780
10	ODN-F3	Conjugué simple brin	444	80	454 860
11	D3	Duplex Conjugué/Brin Naturel	442	78	280 300
12	D6	Duplex Conjugué/Conjugué	443	79	315 700

Tableau 13 : Propriétés photophysiques des conjugués dans l'eau. ^[a]Déplacements de Stokes, calculés à partir des longueurs d'onde d'excitation λ_{ex} = 386, 335 et 364 respectivement. ^[b]Les intensités I ont été mesurées pour une concentration C = 100 nM.

La fluorescence des duplex mixtes (**D7** et **D8**) a également été comparée au duplex F3/F3 **D6** (Figure 41). Les intensités diffèrent selon l'ordre décroissant **D6** > **D7** > **D8**, mais les longueurs d'onde d'émission restent similaires à 442, 445 et 443 nm respectivement. Cela n'est pas surprenant étant donné que les λ_{em} des trois brins simples sont tous inclus dans une gamme mince de 440-446 nm.

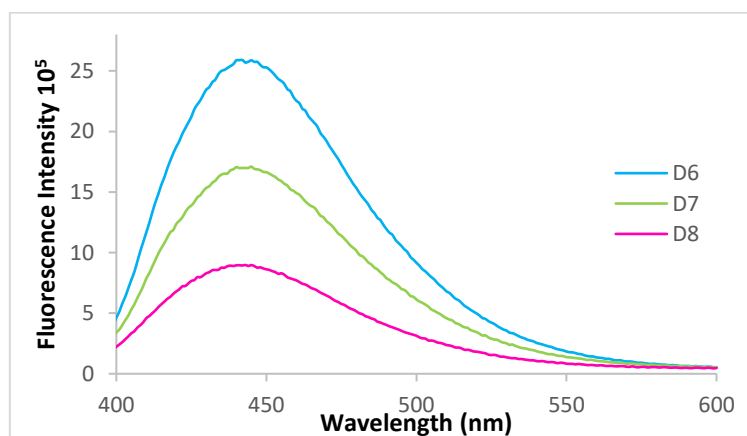


Figure 41 : Spectres d'émission des duplex conjugué/conjugué **D6**, **D7** et **D8** à C = 1 µM.

Pour récapituler, la conjugaison de nos indolizines à l'ADN au niveau du terminus 3' augmente la stabilisation du duplex undecamère et atténue l'intensité de la fluorescence, sans affecter les longueurs d'onde d'émission. Cependant, la spécificité de la séquence n'a pas été étudiée et il pourrait être pertinent de le faire à l'avenir. De plus, la conjugaison du colorant au terminal 5' pourrait conduire à des effets différents, en particulier dans le cas d'un duplex marqué par un fluorophore aux extrémités opposées. Bien que nos indolizines se soient révélées être des colorants adaptés à nos besoins, une comparaison directe avec des alternatives commerciales telles que l'aminométhylcoumarine pourrait compléter cette étude.

Cela étant dit, l'objectif principal de notre projet de thèse peut maintenant être exploré : concevoir un système de détection à aptamère divisé pour les petites molécules basé sur la Cycloaddition 1,3-Dipolaire d'un Ylure de Pyridinium et d'un Alcyne (désormais notée CDYPA).

II. Vers un modèle aptamère simplifié pour la reconnaissance de petites molécules

A. Le modèle double-brin complémentaire basé sur l'ADN matriciel

Parmi les petits analytes que nous avons considérés comme cibles pour notre preuve de concept, l'adénosine triphosphate (ATP) et la cocaïne ont été retenues (507 et 303 Da respectivement). En effet leurs aptamères ont été largement étudiés dans le passé, y compris leurs analogues divisés.

L'ATP est la source d'énergie majeure des cellules et joue un rôle crucial dans divers processus biologiques, notamment la neurotransmission et la signalisation cellulaire. Ainsi, les dysrégulations de l'ATP sont impliquées dans plusieurs pathologies, telles que les maladies neurodégénératives d'Alzheimer, de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique (SLA), ainsi que les ischémies myocardiques, les accidents vasculaires cérébraux et l'épilepsie (pour n'en citer que quelques-unes).^{97,98} La détection et la quantification de l'ATP sont donc particulièrement importantes. Le premier aptamère d'ATP décrit dans la littérature a été découvert en 1993 par Sassanfar *et al.*⁹⁹ Il s'agit d'un 40-mère d'ARN possédant une boucle de 12 nucléotides à laquelle se lie la cible (Figure 42-A). Sa constante de dissociation K_d varie de 0,7 à 8 μM selon la concentration en ions Mg^{2+} .

Deux ans plus tard, le groupe de Szostak a caractérisé un aptamère à ADN pour l'ATP et l'adénosine ($K_d = 6 \mu\text{M}$).¹⁰⁰ La séquence est composée de 25 nucléobases dont la structure comprend deux G-quartets empilés (plateaux de quatre résidus de guanine formés par

appariement de type Hoogsteen). Dans la même publication, les auteurs ont montré que l'aptamère peut être divisé en deux fragments au niveau de la boucle 2 : c'est le premier exemple de split-aptamer décrit, bien qu'il a fallu attendre les travaux de Stojanovic pour populariser le concept. Chaque brin a été prolongé de trois nucléotides pour compenser la perte de stabilité. Aucun des deux fragments isolés ne se lie à l'ATP, mais une fois hybridé, l'hétérodimère résultant est capable de former un complexe ternaire avec la cible.

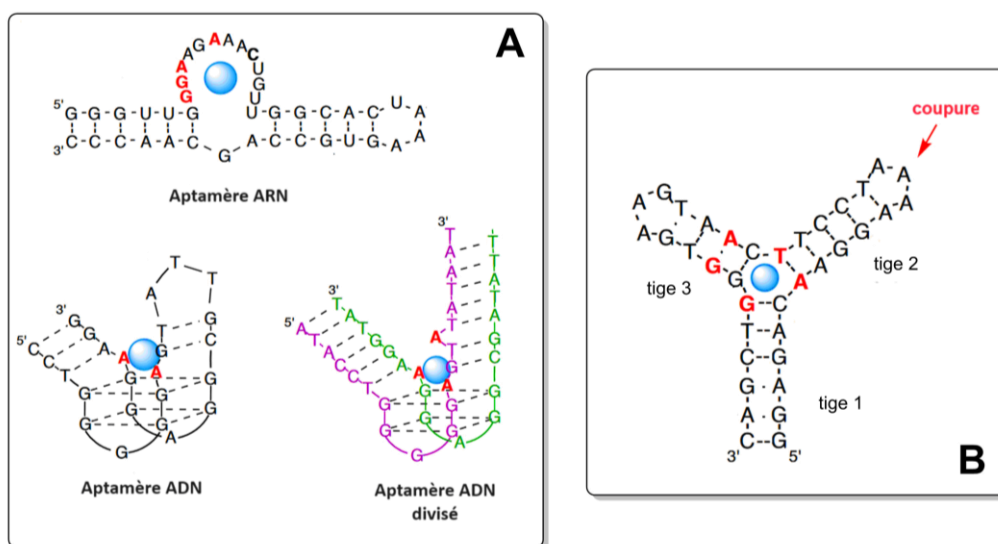


Figure 42 : Structures secondaires des aptamères (A) d'adénosine et d'adénosine triphosphate (ATP); (B) de cocaïne, la position de fragmentation est indiquée par une flèche rouge. Les nucléotides essentiels à la reconnaissance des cibles sont marqués en rouge. Figure adaptée de la publication de Muller et al (2020).¹⁰¹

Pour ce qui est de la cocaïne, son aptamère ADN a été découvert par Stojanovic au début du 21^e siècle.¹⁰² La structure de reconnaissance est assurée par une jonction à trois voies composée de trois tiges, son centre formant la poche de liaison ($K_d = 0,4$ à $10 \mu\text{M}$, Figure 42-B). Une variante aptamère divisé a été exploitée par coupure de l'oligonucléotide au niveau de la boucle 2, position représentée par une flèche rouge ci-dessus.¹⁰³ Comme nous l'avons établi dans le chapitre d'introduction, l'aptamère divisé présente une stabilité réduite ($K_d = 20 \mu\text{M}$), mais sa spécificité pour la cible est considérablement augmentée.

Ainsi, la détection de la cocaïne suppose la synthèse d'un 27-mer et d'un hexadecamer. L'ATP nécessite quant à lui la préparation de deux 19-mers. De plus, ces deux systèmes reposent sur la présence de la cible en solution pour l'auto-assemblage du complexe ternaire. On rappelle que ce dernier est nécessaire à la formation de l'indolizine désirée qui vient ensuite stabiliser la structure de reconnaissance, comme l'illustre la Figure 43-A.

Avant d'employer les aptamères, un modèle binaire plus simple a été conçu afin d'évaluer l'influence de la conjugaison à l'ADN sur la réactivité des précurseurs ylures et alcynes (Figure 43-B). Cela limite d'ailleurs le coût des tests préliminaires. Ce modèle repose sur le duplex undécamérique 5'-CGCACACACGC3'/5'-GCGTGTGTGCG3' que nous avons précédemment

utilisé. Cette fois-ci, **ODN1** porte la fraction alcyne tandis que **ODN2** est associé à l'ylure de pyridinium. Ce modèle est qualifié de « DNA-templated » car les oligonucléotides guident et favorisent la cycloaddition. En effet, l'hybridation des deux brins complémentaires rapproche les deux précurseurs, augmentant ainsi la molarité effective des réactifs ce qui devrait faciliter la réaction. Ce concept a été introduit par Liu et Gartner¹⁰⁴ en 2001 et depuis lors, de nombreuses réactions ont été dirigées à l'aide de matrices d'ADN. Parmi elles, on compte les couplages croisés, la CuAAC et la synthèse de diverses macromolécules.^{105,106}

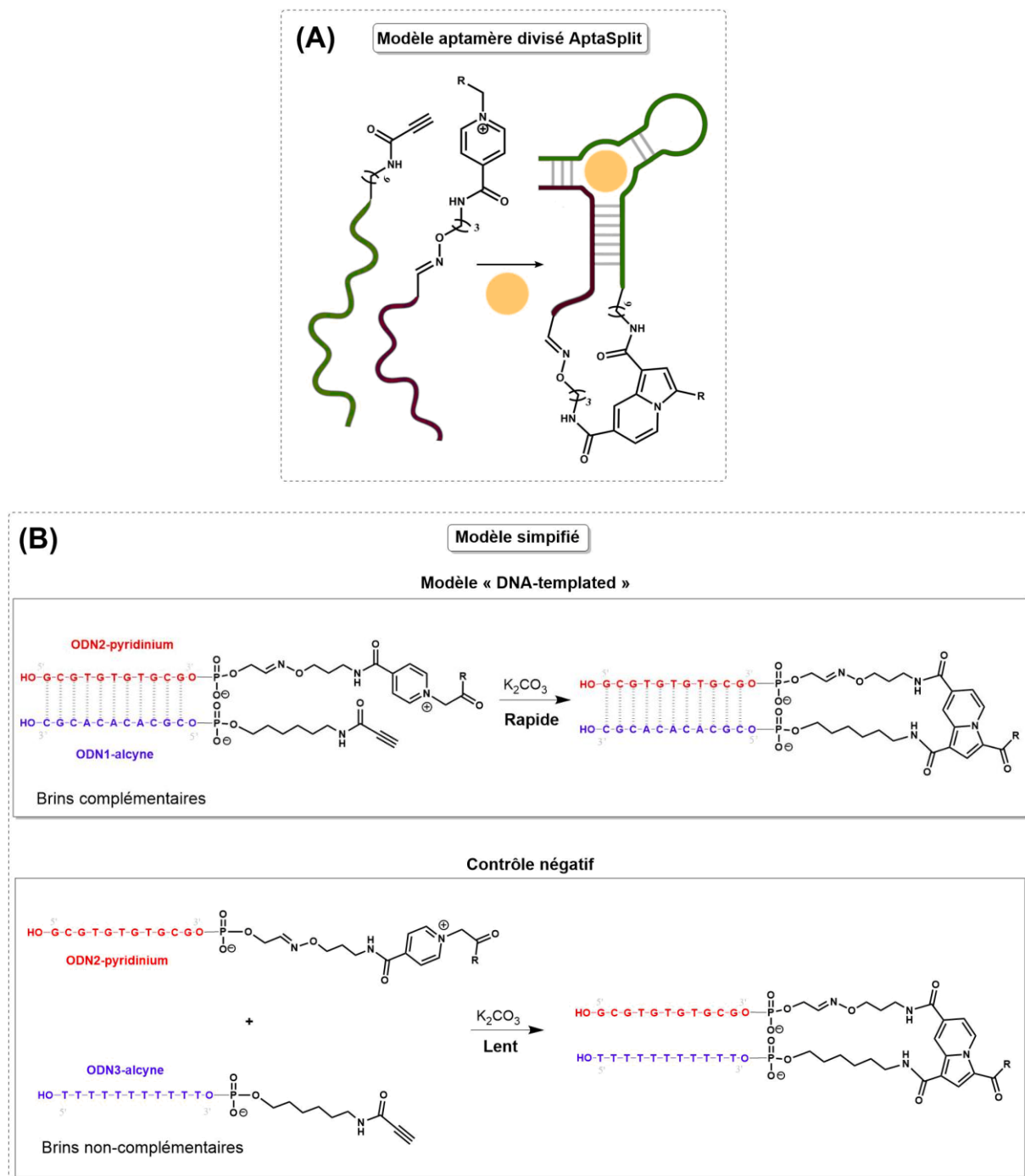


Figure 43 : (A) Modèle **AptaSplit-Indo** employant l'aptamère divisé d'un analyte donné ; (B) Modèle simplifié basé sur la chimie « DNA-templated »

Afin de mieux apprécier l'accélération apportée par l'hybridation du duplex, un contrôle négatif sera également examiné. Cela implique la synthèse d'une troisième séquence poly-T₁₁ (**ODN3-alcyne**). Lorsqu'elle est utilisée en conjonction avec **ODN3-pyridinium**, la cinétique de la cycloaddition devrait être significativement plus lente.

Une fois la compatibilité de la cycloaddition 1,3-dipolaire avec l'ADN prouvée, le modèle **AptaSplit-Indo** pourra être abordé.

B. Synthèse des conjugués ADN-précurseurs

1. Synthèse des conjugués ADN-pyridinium par ligation oxime

Les produits **94** et **95** sont obtenus aisément suivant la même méthodologie oxime utilisée pour la préparation de nos conjugués précédents (Schéma 104) : les sels de pyridinium sont d'abord déprotégés en conditions acides. Une fois la fonction oxyamine libérée, l'intermédiaire est mis en réaction avec l'oligonucléotide 3'-aldéhyde **aODN2 (87)** dans le tampon acétate ammonium (pH 4,5). Après purification, les conjugués sont obtenus avec des rendements compris entre 44 et 30%. L'efficacité modérée de la liaison oxime peut encore une fois s'expliquer par une éventuelle dégradation de l'ADN causée par la présence résiduelle de traces de TFA. Ceci est d'autant plus probable que l'étape intermédiaire de lyophilisation après déprotection a été omise cette fois-ci. À sa place, l'acide a simplement été co-éaporé avec de l'acétonitrile.

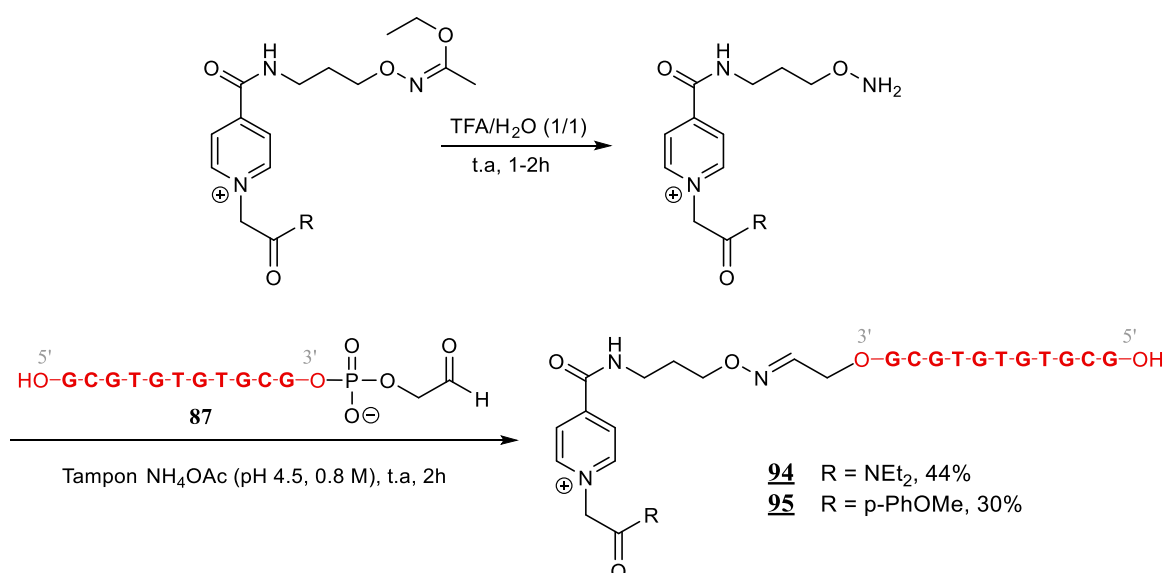


Schéma 104: Synthèse des conjugués **94** et **95** par ligation oxime

2. Synthèse des conjugués ADN-alcyne

Comparée au précurseur pyridinium, la synthèse du partenaire alcyne 3'-oligonucléotide a été beaucoup plus difficile. En effet, la conjugaison d'un brin d'ADN 3'-amino avec l'acide propiolique et ses dérivés a systématiquement échoué.

Pour commencer, la séquence **ODN1-C₆NH₂** (**96**) a été obtenue en utilisant la résine commerciale 3'-PT-Amino C6 CPG (Schéma 105). Après séparation du support, une chaîne amine à 6 carbones est révélée à l'extrémité 3'. La fonctionnalisation a ensuite été tentée à l'aide de l'ester NHS de l'acide propiolique (**97**) en milieu basique. Ce dernier a été synthétisé au préalable par un couplage DCC du *N*-hydroxysuccinimide et de l'acide correspondant.

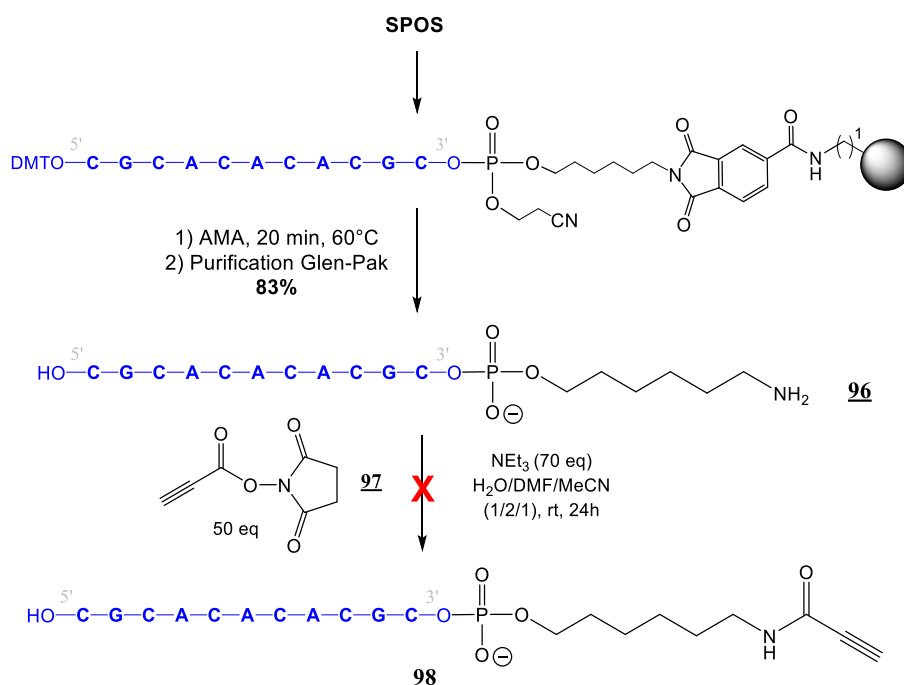


Schéma 105 : Synthèse de l'oligonucléotide 3'-amino **96** et sa réaction avec l'ester-NHS de l'acide propiolique

Malheureusement, le produit de substitution **98** souhaité n'est pas généré. À sa place, un oligonucléotide $m/z = 3600$ est détecté par spectrométrie de masse, ce qui représente 100 Da de plus que prévu. Le même résultat est obtenu que la réaction soit menée pendant quelques heures ou un jour. Remplacer l'ester NHS par l'analogue para-nitrophénol **99** ne change pas la donne. Le chromatogramme du mélange réactionnel comprend deux nouveaux pics avec des temps de rétention distincts ; cependant leurs spectres de masse sont identiques (Figure 44).

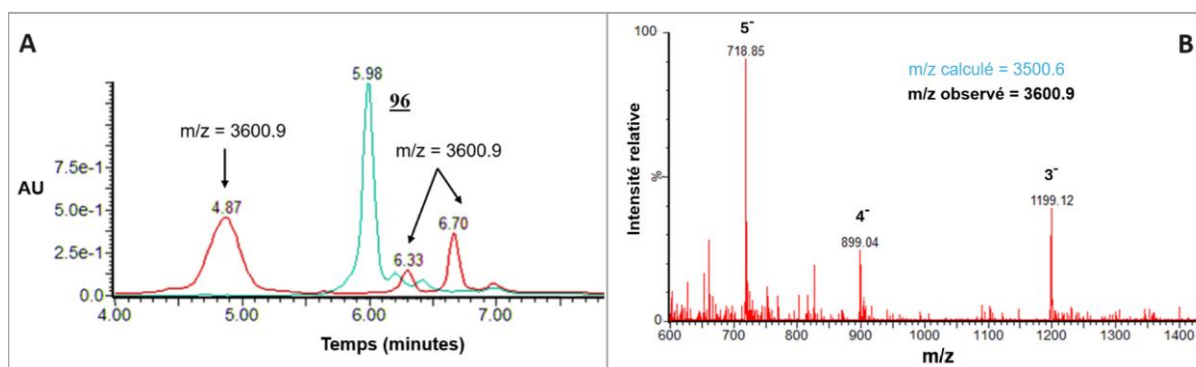
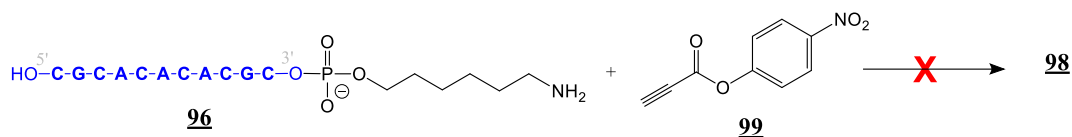


Figure 44 : A) Chromatogramme du mélange réactionnel entre l'oligonucléotide 3'-amine 96 et l'ester para-nitrophénol de l'acide propiolique 99, à t = 0h (vert) et t = 4h (rouge). (B) spectres de masse des pics trouvés à $t_r = 4,87$ min, $t_r = 6,33$ min et $t_r = 6,70$ min

La voie de synthèse alternative représentée dans le Schéma 106 emploie directement l'acide propiolique pour une réaction de couplage amide. Plusieurs agents de couplage ont été testés (EDC/HOBt, EDC/s-NHS, HATU/2,6-lutidine, DMTMM), sans succès : cette fois-ci, les analyses ESI révèlent des pics monochargés ne correspondant pas aux profils attendus pour un oligonucléotide. Ils sont probablement dus à la formation d'adduits avec l'EDC, le HATU ou le DMTMM.

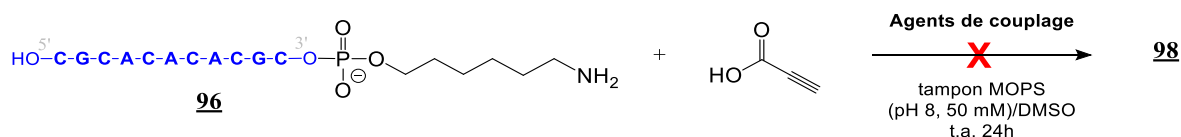


Schéma 106: Tentative de couplage amide entre l'oligonucléotide 3'-amine et l'acide propiolique

Afin de s'assurer que les difficultés rencontrées ne sont pas spécifiques à la séquence **ODN1**, la réaction de substitution de l'ester NHS 97 a été tentée avec le brin polyT ($5'\text{-T}_{11}\text{-C}_6\text{NH}_2\text{-}3'$) 100. Une fois de plus, le conjugué 101 souhaité n'est pas formé et les produits majoritaires détectés par UPLC-MS présentent un rapport masse sur charge de +100 (Figure 45).

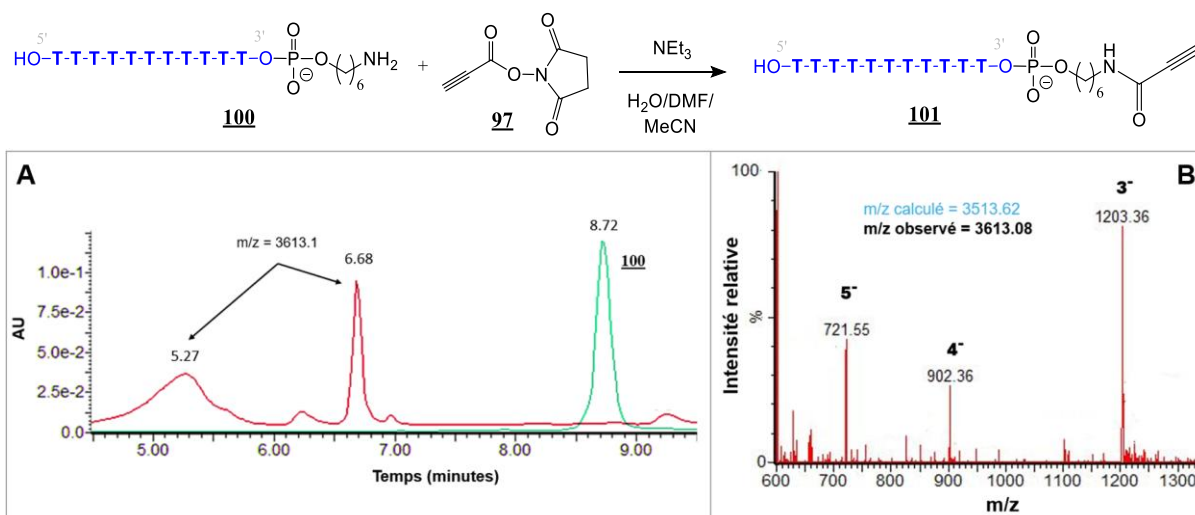


Figure 45 : A) Chromatogramme du mélange réactionnel entre l'oligonucléotide polyT₁₁ 3'amino **100** et l'ester NHS **97**, à $t = 0\text{h}$ (vert) et $t = 4\text{h}$ (rouge) ; (B) Spectres de masse des pics marqués par une flèche.

Cet excès systématique a été attribué à l'addition de Michael de la triéthylamine (101 Da), utilisée comme base pour faciliter la substitution, sur l'alcyne terminal polarisé du conjugué désiré. Bien qu'ils soient généralement considérés comme de mauvais nucléophiles en raison de leur encombrement stérique, les trialkylamines sont toutefois capables de réagir avec les acétylènes dans l'eau pour former des composés vinyltrialkylammonium.^{107,108} Par exemple, le traitement du propiolate de méthyle avec NEt_3 dans un mélange H_2O -DCM génère jusqu'à 80% du sel *trans*-vinyltriéthylammonium correspondant.¹⁰⁹ Cela pourrait expliquer pourquoi, à notre connaissance, la couplage direct de l'acide propiolique (et ses dérivés esters activés) à l'ADN n'a pas été précédemment décrit dans la littérature.

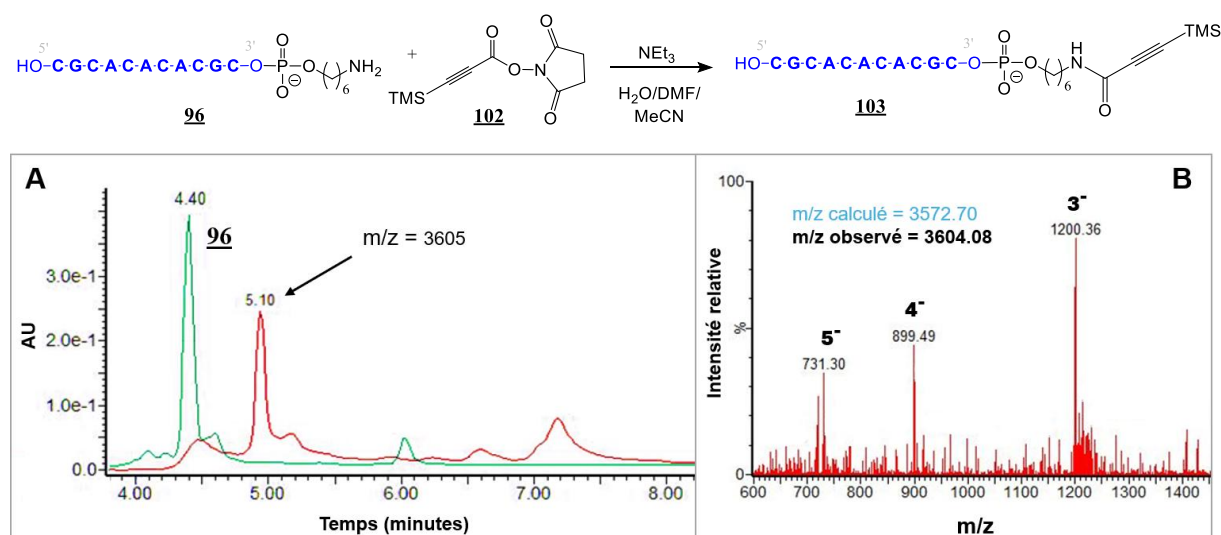


Figure 46 : A) Chromatogramme du mélange réactionnel entre l'oligonucléotide **96** et l'ester NHS **102**, à $t = 0\text{h}$ (vert) et $t = 4\text{h}$ (rouge) ; (B) Spectre de masse des pics marqués par une flèche.

Naturellement, nous nous sommes tournés vers l'acide 3-(triméthylsilyl)propiolique pour éviter l'addition 1,4 parasite. Malheureusement, protéger la triple liaison n'a pas résolu notre problème. Une fois de plus, la réaction entre l'ester TMS **102** et l'oligonucléotide **96** représentée ci-dessus ne conduit pas à la formation du conjugué souhaité. À sa place, un produit de masse +31 inexplicable a été détecté par UPLC-MS (Figure 46-B). La masse recherchée n'a pas été trouvée non plus lorsque nous avons tenté le couplage amide de l'acide 3-TMS-propiolique avec l'amine en 3' du composé **96**.

Dans l'espoir de contourner ce problème, quatre voies alternatives de synthèse ont été conçues (Schéma 107). Elles sont basées sur l'éloignement de la fonction acétylénique du groupe fonctionnel devant réagir avec l'oligonucléotide via l'introduction d'un lien espaceur : nous avons émis l'hypothèse qu'une molécule plus longue pourrait se comporter d'une manière différente par rapport à l'acide propiolique. Plus important encore, ces voies impliquent des amides α,β -insaturés qui sont moins réactifs vis-à-vis des additions de Michael comparés aux esters. De plus, elles conduisent à 3 types de liaisons différentes. Les voies A et B progressent selon une CuAAC aboutissant à un lien 1,2,3-triazole, la voie C implique la formation d'une liaison oxime tandis que la voie D génère un lien amide. Avoir plusieurs conjugués ADN-alcynes entre nos mains nous permettrait notamment d'examiner l'influence de divers liens sur la réactivité des précurseurs durant la CDYPA ultérieure.

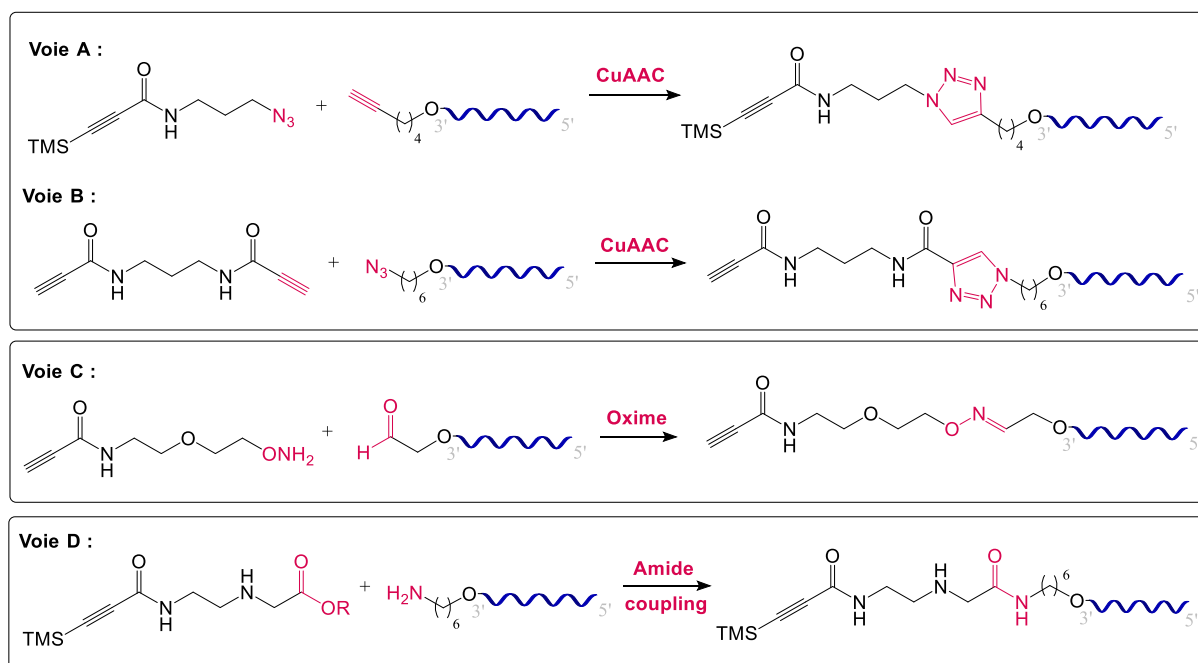


Schéma 107 : Voies alternatives pour la synthèse d'un conjugué ADN-alcyne

La synthèse de chaque réactif dérivé de l'acide propiolique est détaillée ci-dessous.

a) Synthèse des linkers acétylènes

La préparation du 3-TMS-propiolamide fonctionnalisé par un azoture ne nécessite que deux simples étapes (Schéma 108). Dans un premier temps, le 3-azido-1-propanamine **104** est obtenu en traitant le bromhydrate de 3-bromopropylamine avec de l'azoture de sodium. Le rendement modéré de la réaction (46%) peut s'expliquer par le faible point d'ébullition du produit provoquant des pertes lors de sa concentration sous vide après extraction. L'alcyne protégé par un groupement TMS est ensuite ajouté à la chaîne via un couplage DCC, ce qui fournit le composé **105** avec un rendement de 55%.

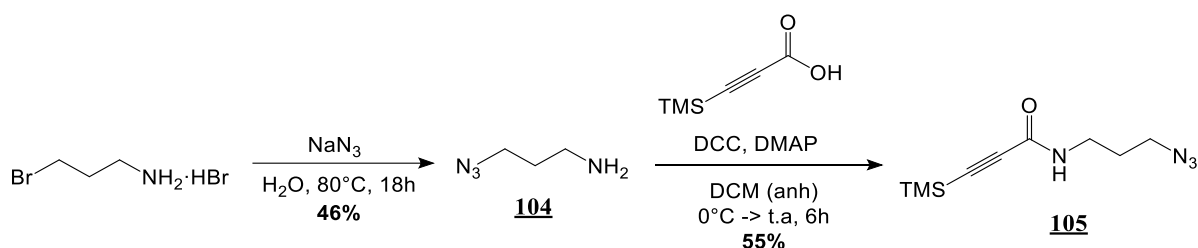


Schéma 108 : Synthèse du N-(3-azidopropyl)-3-(triméthylsilyl)propiolamide **105**

De même, le N,N'-(propane-1,3-diyl)dipropiolamide **107** est synthétisé en deux étapes. Après couplage DCC de deux équivalents d'acide 3-TMS-propiolique avec le 1,3-diaminopropane, l'intermédiaire **106** est déprotégé à l'aide de TBAF (Schéma 109). Compte tenu du faible rendement fourni par les ions fluor (16%), la désilylation a également été tentée par irradiation aux micro-ondes. En effet, la déprotection rapide des alcynes aryliques en présence de carbonate de potassium dans du méthanol a été décrite par Minidis *et al.* en 2003.¹¹⁰ Dans notre cas, nous avons opté pour une méthodologie sans solvant faisant usage de gel de silice (3 min, 350 W, 150°C). L'élimination sélective du TMS dans ces conditions a en effet été observée lors de la synthèse d'une autre molécule décrite plus bas. Cependant, la quantité de **107** isolée à l'aide de notre méthode s'est avérée plus faible (10%) et moins propre que la déprotection au fluor, nécessitant une étape de purification intermédiaire.

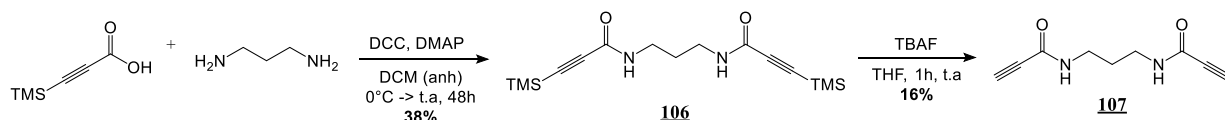


Schéma 109 : Synthèse du N,N'-(propane-1,3-diyl)dipropiolamide **107**

Pour sa part, la préparation de la molécule **112** impliquée dans la voie C se fait en 5 étapes. Le schéma de synthèse correspondant est représenté ci-dessous. Dans un premier temps, l'anhydride phtalique est condensé avec la diglycolamine à haute température. L'alcool intermédiaire, obtenu avec un rendement de 79%, est ensuite transformé en mésylate à l'aide

du chlorure de méthanesulfonyle puis bromé au bromure de lithium pour fournir le composé **109**. La substitution suivante utilisant le *N*-hydroxycarbamate de *tert*-butyle comme nucléophile en présence de carbonate de potassium est très peu efficace (9%). Après déprotection du phthalimide, l'amine révélée est couplée à l'acide 3-(TMS)propiolique, aboutissant ainsi au composé **112** avec un rendement de 26%, encore une fois étonnamment bas malgré les protections.

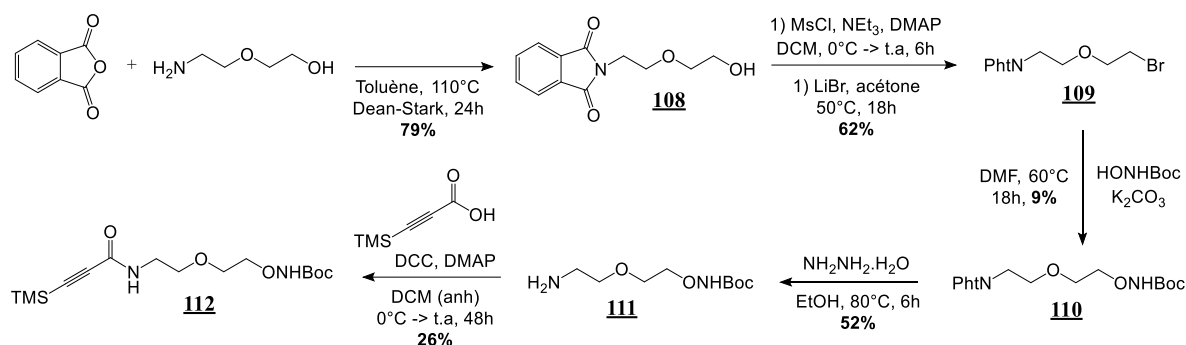


Schéma 110 : Synthèse du linker **112**

L'obtention du quatrième linker s'est avérée plus compliquée et n'a malheureusement pas été concluante. Idéalement, la molécule cible **115** porterait une protection triméthylsilyle sur l'alcyne. Cela a causé des difficultés synthétiques liées à une incompatibilité des groupements protecteurs. En effet, si l'élongation de la chaîne procède à partir de l'acide 3-TMS-propiolique, les conditions acides doivent être par la suite évitées.

Le premier chemin réactionnel envisagé commence par le couplage DCC de l'acide acétylénique à la *N*-Boc-éthylènediamine (Schéma 111). Une déprotection sélective du groupement Boc en présence du TMS a ensuite été tentée à l'aide d'irradiations aux micro-ondes. En effet, Vaquero et ses collègues ont décrit en 1998 l'élimination du Boc en présence de gel de silice par catalyse aux micro-ondes.¹¹¹ En espérant que le groupe silyle resterait intact, nous avons irradié pendant 3,5 minutes à 300W l'intermédiaire **113** sous la forme d'un mélange solide sec avec un large excès de dioxyde de silicium. Cependant, l'analyse RMN du produit après lavage a révélé la déprotection sélective de l'alcyne tandis que le groupement Boc ciblé reste indemne. Bien que la réaction souhaitée n'ait pas été observée, l'élimination inattendue du TMS dans de telles conditions a été exploitée ultérieurement pour la synthèse de la molécule **107** comme nous l'avons décrit plus haut.

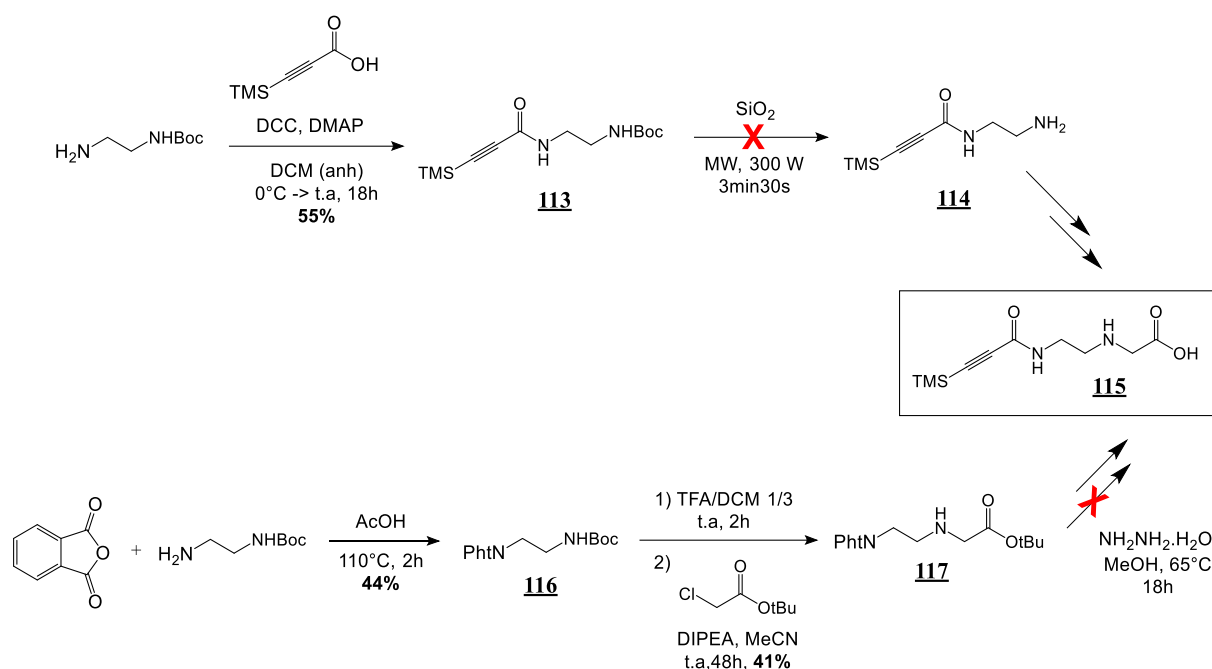


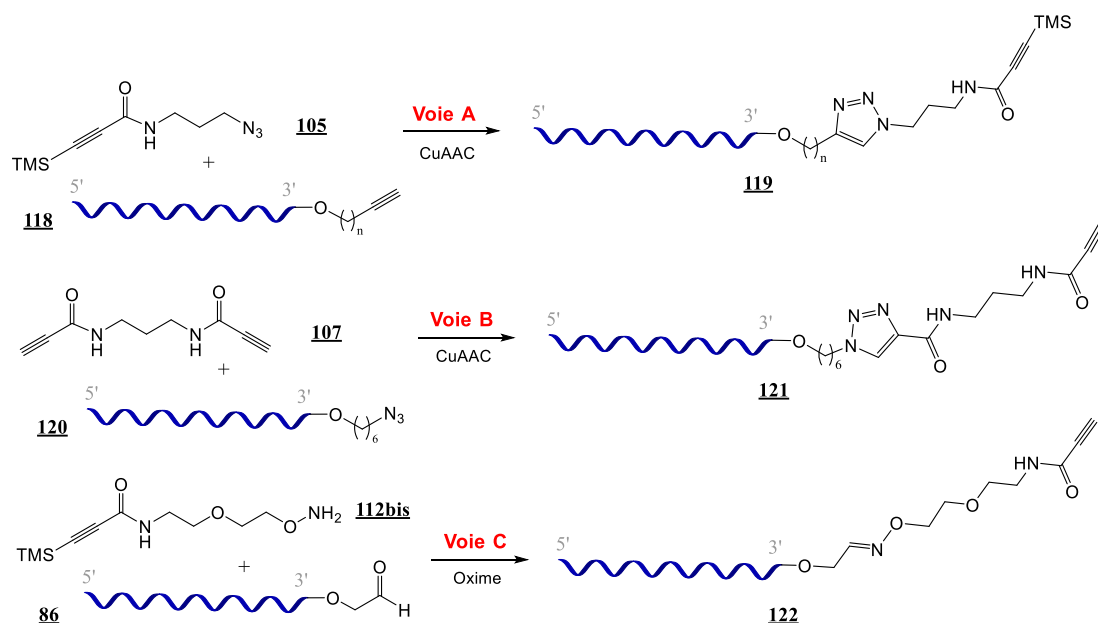
Schéma 111 : Tentatives de synthèse du quatrième linker **115**

Une deuxième stratégie de synthèse a été explorée en utilisant la *N*-Boc-éthylènediamine comme réactif de départ. Un phtalimide a été introduit en tant que protection orthogonale via la condensation de l'amine avec l'anhydride phtalique dans l'acide acétique à reflux. Le groupement Boc porté par l'intermédiaire **116** est ensuite éliminé au TFA et l'amine libérée est mise en réaction avec le chloroacétate de *tert*-butyle. Une fois encore, le rendement de la substitution isolé après purification est modéré (41%). Nous avons essayé d'optimiser la transformation, mais la réaction à reflux ou l'utilisation de l'analogue bromure conduit à la formation d'une majorité du produit di-alkylé. Ici, l'étape limitante est la déprotection du phtalimide. Un traitement à l'hydrazine ne génère qu'une très faible quantité de résidu huileux composé d'un mélange complexe de sous-produits. Par souci de temps, la synthèse de la molécule cible **115** a été abandonnée : seules les voies de conjugaison A à C seront exploitées.

b) Conjugaison des linkers acétylènes aux oligonucléotides

L'incorporation de l'alcyne à l'ADN a été retenue à l'aide des nouveaux linkers. Les résultats des trois essais effectués sont résumés dans le Tableau 14. Une fois de plus, les conjugués souhaités n'ont pas été obtenus. Brièvement, la ligation CuAAC entre le linker azoture **105** et l'oligonucléotide 3'-alcyne **118** (entrée 1, voie A) a conduit à la formation d'un mélange complexe de produits caractérisés par des temps de rétention voisins difficiles à séparer. La deuxième CuAAC selon la voie B génère des entités de masse +100 bien que le milieu réactionnel ne contienne pas de triéthylamine (entrée 2, voie B). Cependant, NEt₃ est un

composant mineur des éluants utilisés pour la UPLC-MS et la RP-HPLC. Ainsi, l'addition de Michael de la base sur l'alcyne terminal se produirait pendant l'injection ou dans la colonne. La formation de cet adduit semble donc inévitable : une purification est nécessaire après conjugaison et la paire d'ions couramment utilisée pour les séparations d'oligonucléotides est l'acétate de triéthylammonium (TEAA).



Entrée	Linker	Réactif ODN	Type de réaction	Détection du conjugué ^[a]	Difficultés rencontrées
1	105	118 (ODN1-alkyne)	CuAAC (Voie A)	Non	Obtention d'un mélange complexe de produits aux temps de rétention voisins
2	107	120 (ODN1-N ₃)	CuAAC (Voie B)	Non	Apparition d'adduits +100 Da
3	112	86 (ODN1-aldéhyde)	Oxime (Voie C)	Oui	Apparition d'adduits +100 Da avant et après purification

Tableau 14 : Résultats des tentatives de conjugaison à l'aide des nouveaux linkers synthétisés. ^[a] Les réactions ont été suivies par UPLC-MS.

En ce qui concerne la ligation oxime (entrée 3, voie C), la masse désirée est détectée par UPLC-MS pour la première fois (Figure 47). Le produit est indiqué sur le chromatogramme par une flèche orange. Sa formation reste toutefois minoritaire par rapport aux adduits +100. Malheureusement, nous n'avons pas pu isoler le conjugué **122** après purification car la résolution des pics adjacents en HPLC préparative était très faible. De plus, un contact prolongé avec l'éluant a augmenté la quantité relative de l'adduit de Michael m/z = 3647.

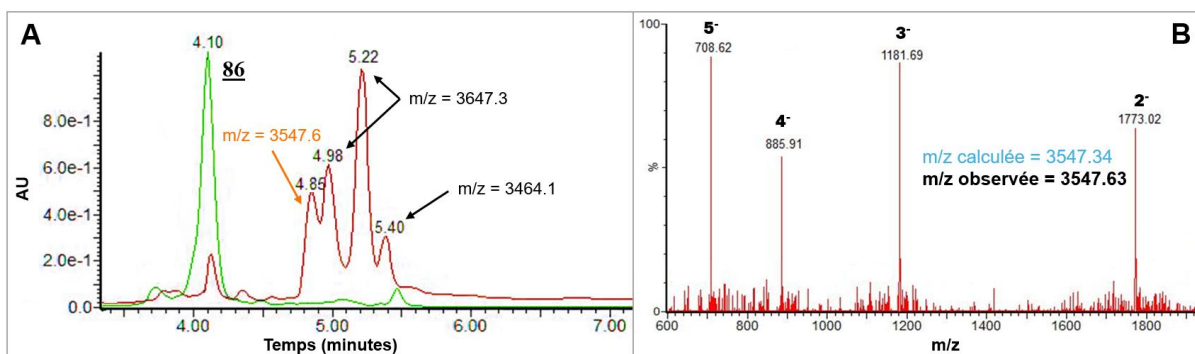


Figure 47 : A) Chromatogramme du milieu réaction de la ligation oxime à t=0h (vert) et t=2h (rouge) ; B) Spectre de masse du produit à tr = 4,85 min

Compte tenu de ces résultats, nous avons finalement décidé de remplacer l'acide propiolique par une triple liaison moins polarisée. Ainsi, l'acide 4-éthynylbenzoïque est choisi comme alternative. En effet, son dérivé amide peut faire office de dipolarophile pour la synthèse d'indolizines *via* une CDYPA. Le résultat de la réaction entre le 4-éthynyl-*N*-propylbenzamide **123** et l'ylure de pyridinium **80h** est illustré dans le Schéma 112. Sans surprise, le rendement de la cycloaddition est inférieur à la quantité de produit obtenue avec le *N*-hexylpropiolamide **69** (11 et 33% respectivement dans l'acétonitrile, 6 et 13% dans l'eau) puisque le fragment benzaldéhyde est moins électroattracteur qu'un carbonyle. Ce qu'il convient de noter, c'est que la relative désactivation de l'alcyne rend l'addition de Michael parasite moins probable.

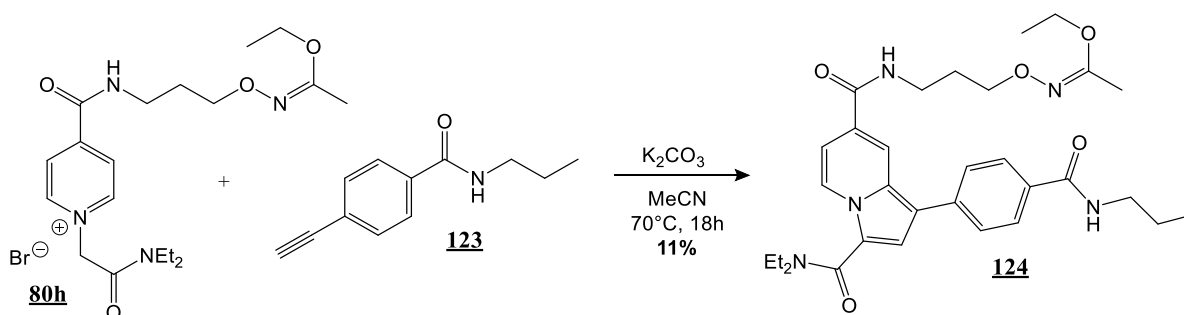


Schéma 112 : Cycloaddition 1,3-dipolaire du pyridinium **80h** et de l'alcyne **123**

Avec ce nouveau précurseur, la stratégie initiale de conjugaison est exploitée. Pour ce faire, l'ester NHS de l'acide 4-éthynylbenzoïque est préparé par couplage DCC. Le produit **125** subit ensuite une attaque nucléophile par le groupement 3'-amino de l'oligonucléotide **96**. Cette fois-ci, la substitution procède sans problème. Comme le montre la Figure 48, seul le produit **126** souhaité est formé et aucune entité +100 n'est détectée par spectrométrie de masse. Après purification, le conjugué est isolé avec un rendement satisfaisant de 87%, nous permettant enfin d'explorer la CDYPA des précurseurs-ADN. L'analogue alcyne-polyT₁₁ **127** est synthétisé de la même manière (37%).

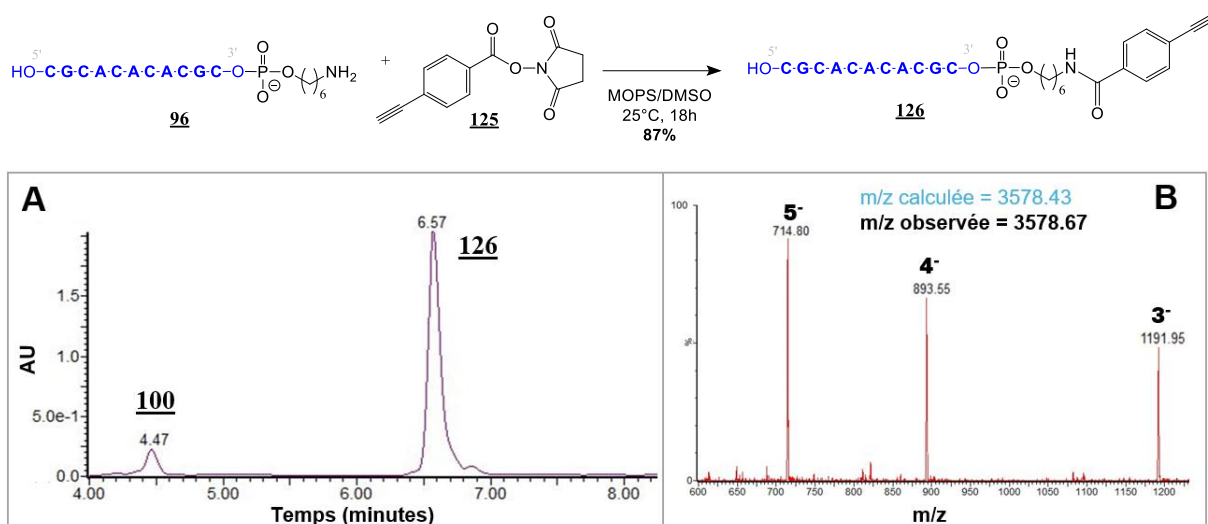


Figure 48 : A) Chromatogramme du milieu réactionnel à t=18h ; B) Spectre de masse du produit **126**

Par souci de temps, seul le lien amide est considéré.

C. Cycloaddition 1,3-dipolaire des conjugués ADN-précurseurs

Munis de nos conjugués pyridiniums et alcynes, la cycloaddition 1,3-dipolaire des précurseurs liés à l'ADN peut enfin être évaluée. Avant d'étudier l'apport cinétique apporté par l'hybridation des brins complémentaires, un premier test est réalisé sans étape d'annelage pour s'assurer que la formation de nos indolizines est bien possible. Pour ce faire, une quantité équimolaire des conjugués **ODN1-AIk (126)** et **ODN2-P1 (94)** est solubilisée dans une solution de K_2CO_3 à pH 8, le même milieu aqueux utilisé lors de la cycloaddition des précurseurs libres. Le mélange réactionnel est ensuite agité à 25°C avec suivi UPLC-MS.

Dans le Chapitre 1, nous avons établi le fait que la cycloaddition de nos précurseurs dans l'eau est peu efficace (rendements inférieurs à 15%). Néanmoins, nous avons émis l'hypothèse que le couplage des réactifs aux oligonucléotides améliorerait leur solubilité, ce qui augmenterait ainsi leur réactivité en milieu aqueux. Mais comme on peut le voir sur la Figure 49, la réalité est autre : aucune conversion n'est observée même après 48 heures de réaction. En effet, le chromatogramme du milieu réactionnel n'évolue pas et aucune trace du produit indolizine **ODN-Ind₁ (128)** n'est formée. Le composé à $t_r = 5,63$ min est présent à t=0h et est caractérisé par le même spectre de masse que l'oligonucléotide pyridinium **94**. Il s'agit donc vraisemblablement de la forme ylure du conjugué, existant à l'état d'équilibre avec l'analogue non-déprotoné dans le tampon basique.

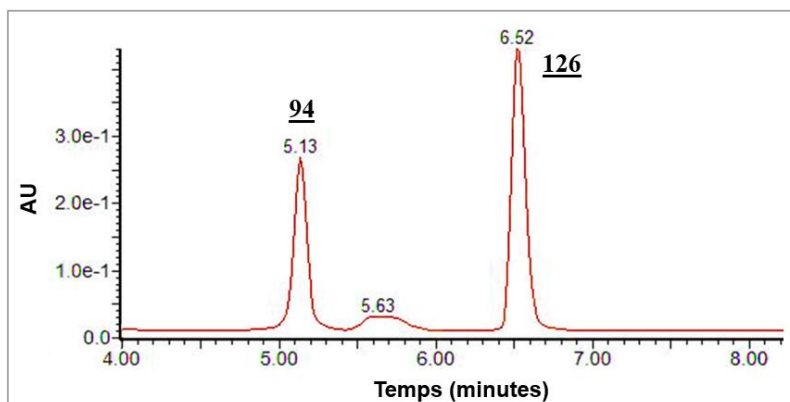
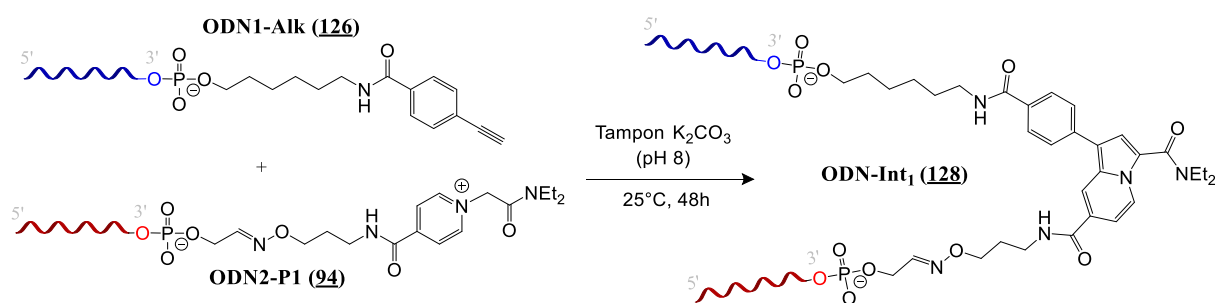


Figure 49 : Chromatogramme du milieu réactionnel à $t = 48\text{h}$

L'ajout de 5 à 15% d'acétonitrile dans le milieu, au cas où la réactivité serait limitée par des problèmes de solubilité, ne change pas la donne. Le remplacement du tampon carbonate de potassium par un tampon de borate de sodium plus basique (150 mM, pH 9) a conduit à un résultat identique. Dans l'espoir de favoriser la cycloaddition par templating ADN, les conjugués ont été dissous dans un tampon PBS (10 mM, 1 mM EDTA, pH 6) puis hybridés en chauffant le mélange à 90°C pendant 10 minutes avant de le laisser refroidir lentement durant la nuit. Le lendemain, le pH est ajusté à 7 à l'aide de K_2CO_3 et le milieu réactionnel est agité à 30°C pendant 72 heures. Une fois de plus, la formation du produit désiré n'est pas observée malgré la proximité accrue des fonctions précurseurs au sein du duplex (Figure 50).

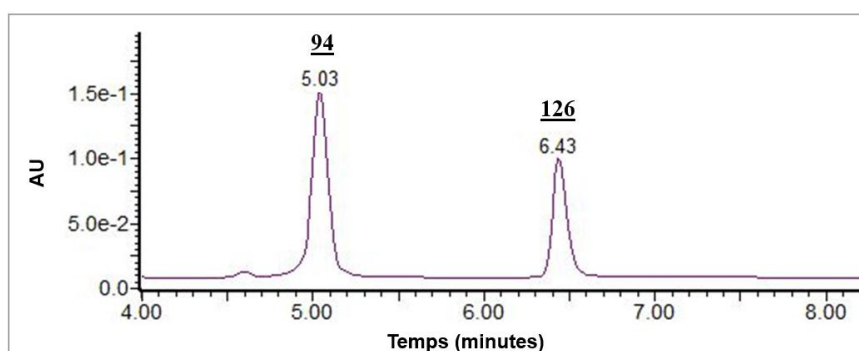
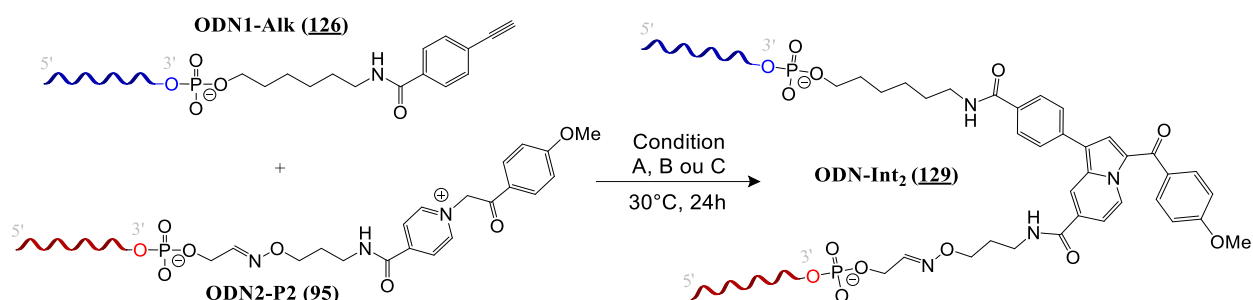


Figure 50 : Chromatogramme du milieu réactionnel à $t = 72\text{h}$

Afin de déterminer si cette absence de réactivité est spécifique au pyridinium utilisé, la cycloaddition est tentée avec le conjugué **ODN2-P2 95** portant l'analogue para-méthoxyacétophénone (Tableau 15). Trois conditions différentes sont testées. La réaction est

réalisée sans étape d'hybridation dans un tampon K_2CO_3 pH 8 (condition A) ainsi qu'en présence de 10% de MeCN (condition B). La condition C implique quant à elle une étape d'hybridation préalable dans un tampon MOPS (100 mM, 10 mM NaCl, pH 8).



Condition	Tampon	préhybridation
A	K_2CO_3 (pH 8)	Non
B	K_2CO_3 (pH 8), 10% MeCN	Non
C	MOPS (100 mM, 10 mM NaCl, pH 8)	Oui

Tableau 15 : Réaction des conjugués **126** et **95** dans différents tampons

Une fois de plus, l'indolizine souhaitée n'est pas formée : l'échec de la cycloaddition semble donc être un phénomène généralisé. Cela dit, on observe l'apparition de deux nouveaux pics dans les chromatogrammes des milieux réactionnels, un profil similaire étant obtenu pour les trois différentes conditions essayées. (Figure 51). Les masses associées à ces produits indésirés sont inférieures à celle du produit attendu **129**. A $t_r = 4,67$ min, on note ainsi la présence d'une espèce oligonucléotidique de masse -135 ou +139 comparés aux réactifs de départ **95** et **126** respectivement. À $t_r = 5,30$ min, la variation est de -149 ou +124.

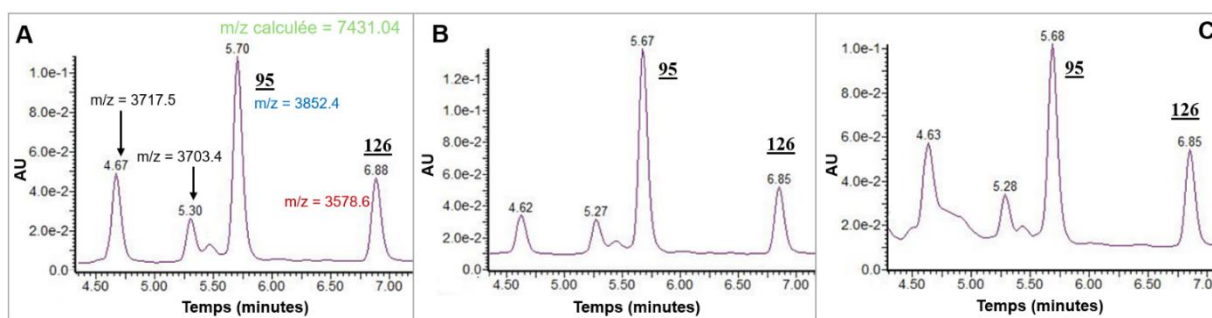


Figure 51 : Chromatogrammes des milieux réactionnels A, B et C à $t = 24h$

Nous ne sommes pas en mesure d'attribuer une potentielle identité à la première espèce. Par contre, une valeur de -149 pourrait s'expliquer par la perte du groupement alkyle porté par le noyau pyridine du conjugué **ODN2-P2 95** (Figure 52). Cette hypothèse reste toutefois à approcher avec précaution : à notre connaissance, la *N*-alkylation réversible de pyridines n'a été décrite dans la littérature que pour un ligand particulier (la *R,R*-diiminopyridine) et elle nécessite une thermolyse¹¹³, absente ici. On note toutefois que des expériences menées au

sein du laboratoire ont révélé que l'alkylation de la DMAP est réversible, même à température ambiante.

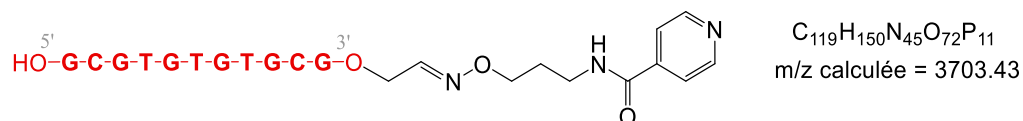
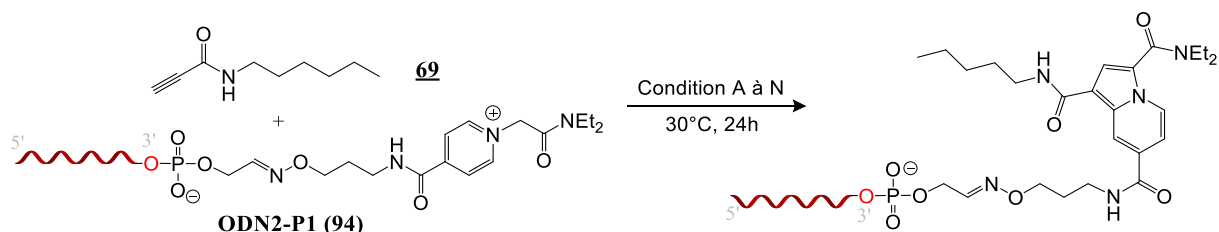


Figure 52 : Eventuelle structure du composé trouvé à $t_r = 5.30$ min

Afin de mieux comprendre ce manque de réactivité inattendu, divers tests ont été réalisés. Tout d'abord, la réaction d'un conjugué avec le précurseur libre correspondant a été étudiée. Pour ce faire, **ODN2-P1 (94)** a été agité pendant 24 heures en présence d'un excès de *N*-hexylpropiolamide **69**, dipolarophile plus réactif que le 4-éthynyl-*N*-propylbenzamide. Au total, 14 conditions différentes ont été évaluées. La température a été maintenue à 30°C, mais les bases, contre-ions et forces ioniques du tampon ont été variés. La composition des milieux réactionnels est répertoriée dans le Tableau 16.



Entrée	Condition	Tampon
1	A	K ₂ CO ₃ (pH 8,5)
2	B	K ₂ CO ₃ (pH 8,5), 10% MeCN
3	C	NaHCO ₃ (50 mM, pH 8,5)
4	D	NaOAc (100 mM, pH 8)
5	E	MOPS (100 mM, 10 mM NaCl, pH 8)
6	F	PBS (10 mM, 1 mM EDTA, pH 7)
7	G	EDTA (10 mM)
8	H	HEPES (1 M, pH 7,4)
9	I	TEAA (1 M, pH 7)
10	J	H ₂ O/DMF (pH 7)
11	K	Tris (100 mM, 1 mM EDTA, 50 mM MgCl ₂ , pH 8)
12	L	Tris (250 mM, 10 mM MgCl ₂ , pH 8)
13	M	Tris-HCl (200 mM, 100 mM NaCl, 100 mM CaCl ₂ , pH 7,5)
14	N	CaCl ₂ (50 mM, pH 7)

Tableau 16 : Réaction du *N*-hexylpropiolamide **69** et du conjugué **ODN2-P1 94** dans différents tampons

Comme les tentatives précédentes, le produit désiré n'a pas été détecté par spectrométrie UPLC-MS ou ESI : la CDYPA ne se produit pas, même lorsqu'un seul précurseur est lié à l'ADN. Dans la plupart des cas, aucune évolution du chromatogramme n'a été observée. Les seules exceptions sont les entrées 5 et 8 (tampon MOPS et HEPES respectivement).

Lorsqu'un acide sulfonique est utilisé comme système tampon, on remarque l'apparition d'un nouveau pic à $t_r = 10,37$ min sur le chromatogramme du milieu réactionnel (Figure 53-B). Il est caractérisé par une masse inférieure à celle de l'oligonucléotide de départ, mais cette diminution ne correspond pas à une perte du fragment *N,N*-diéthylacetamide (perte de masse de -82 observée au lieu de -116). Soupçonnant que la charge négative du squelette ADN puisse interférer avec la formation de l'indolizine (par chélation du pyridinium par exemple), les groupements phosphates ont été écrantés par des cations divalents (entrées 11 à 14). Malheureusement, l'ajout de Mg^{2+} ou Cl^{2+} au milieu réactionnel n'a pas d'effet.

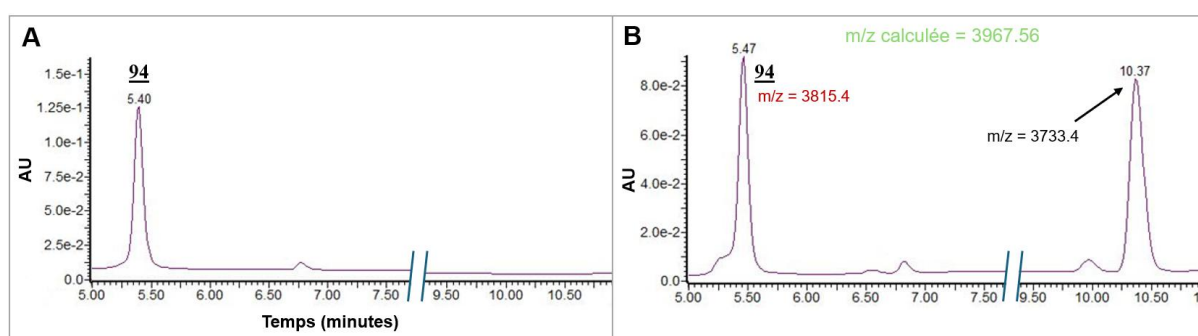


Figure 53 : Chromatogrammes du milieu réactionnel à $t = 24h$ de la A) Condition A (K_2CO_3 , pH 8,5) et ; B) Condition E (MOPS 100 mM, 10 mM NaCl, pH 8)

La réaction opposée a également été tentée : les sels de pyridinium libres **80b** et **80h** sont mis en réaction avec le conjugué alcyne **126** dans le tampon K_2CO_3 (pH 8), sans succès (Schéma 113). De la même manière, remplacer l'oligonucléotide par le brin poly-T₁₁ **ODN3-Alk (127)** n'a pas généré l'indolizine recherchée. Par conséquent, l'échec de la cycloaddition n'est pas un problème spécifique à la séquence utilisée.

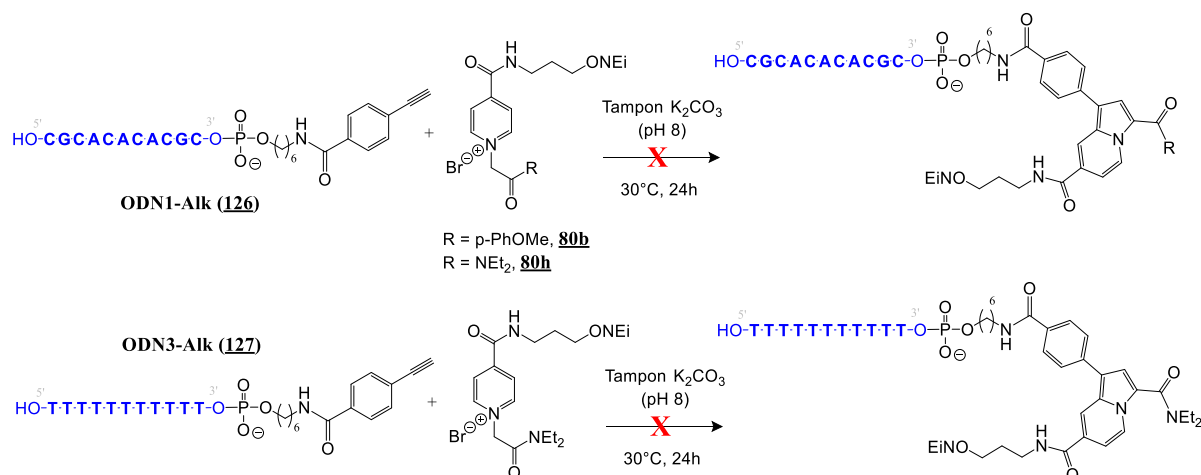


Schéma 113 : Réactions des conjugués alcynes **126** et **127** avec les sels de pyridiniums libres **80b** et **80h**

Après avoir fait varier la composition du tampon, la température du milieu réactionnel a été augmentée afin d'évaluer l'effet activateur de la chaleur. En effet, l'échec systématique de la cycloaddition avec un conjugué peut éventuellement être causée par la formation de poches hydrophiles ou hydrophobes issues de l'interaction de l'ADN avec les précurseurs, ce qui générerait la CDYPA par effets stériques. En plus de fournir l'énergie d'activation qui pourrait s'avérer être nécessaire pour faire avancer la réaction, le chauffage à hautes températures dénature l'ADN : cela supprimerait toute structure secondaire potentiellement contraignante.

Le conjugué pyridinium **ODN2-P1** (**94**) et un excès de *N*-hexylpropiolamide **69** (8 eq) sont ainsi dissous dans le tampon K₂CO₃ (pH 8) et chauffés à 90°C. Le mélange est agité pendant plusieurs jours avec suivi RP-HPLC. L'énergie thermique n'a pas déclenché la cycloaddition, même après 48 heures. Par contre, l'exposition prolongée de notre milieu réactionnel à la température élevée a progressivement dégradé l'oligonucléotide : on observe une graduelle diminution de l'intensité du pic correspondant sur le chromatogramme (Figure 54-A). En effet, la dégradation thermique de l'ADN brise les liaisons covalentes du brin, conduisant éventuellement à sa fragmentation totale. Au bout de 4 jours, le conjugué initial n'est plus détecté par UPLC-MS (Figure 54-B). En parallèle, une fluorescence est visible sous lampe UV ($\lambda = 365$ nm) dès que l'oligonucléotide est entièrement détérioré.

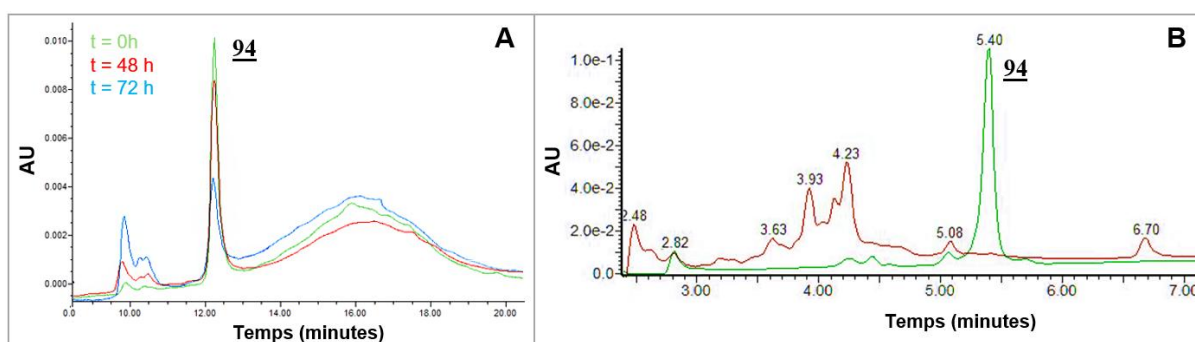
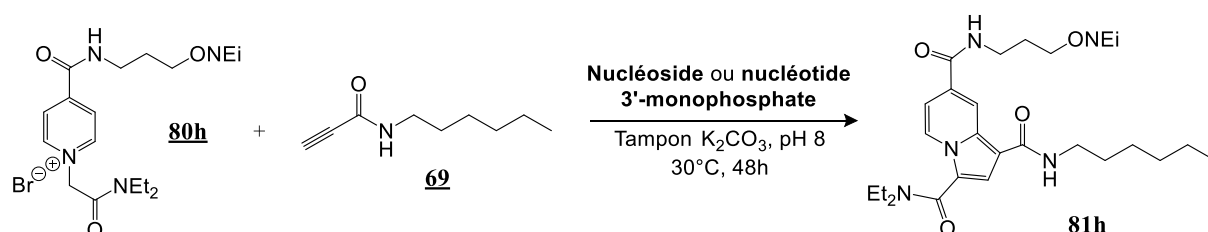


Figure 54 : A) Chromatogramme RP-HPLC du milieu réactionnel à différents moments ; B) Chromatogramme UPLC-MS du milieu réactionnel à t=0h (vert) et t=96h (rouge)

Vraisemblablement, la fluorescence est due à la formation d'une indolizine qui n'est possible qu'une fois l'acide nucléique est éliminé de la solution, à partir du pyridinium libéré par dégradation de la séquence **ODN2-P1**. Cette observation suggère que la présence même d'ADN interfère avec la CDYPA. Pour confirmer notre hypothèse, la cycloaddition des précurseurs libres (sels de pyridinium **80h** et *N*-hexylpropiolamide **69**) a été tentée dans un tampon K₂CO₃ (pH 8) contenant de l'ADN (1 équivalent du brin naturel [5'GCGTGTGTGCG3'] **ODN2**). Une fois encore, l'indolizine souhaitée n'est pas générée après 48 heures, ce qui conforte notre conjecture : la présence d'ADN est incompatible avec la cycloaddition 1,3-dipolaire de nos précurseurs.

Afin de déterminer quelle partie de l'ADN est à l'origine de l'interférence observée (en d'autres termes, préciser si l'absence de CDYPA est causée par le phosphate, le sucre ou la base nucléaire du brin), la réaction des précurseurs libres est étudiée en présence d'un excès de nucléosides ou de nucléosides monophosphates (3 équivalents). Des quantités micromolaires de réactifs sont ainsi agitées dans le tampon K_2CO_3 habituel, à 30°C et pendant 48 heures. Les résultats des différentes expériences sont regroupés dans le Tableau 17.



Entrée	Nucléoside/ Nucléotide	Formation de l'indolizine	Disparition du pyridinium
1	Guanosine	Oui	Non
2	Adenosine	Oui	Non
3	Cytidine	Oui	Non
4	Thymidine	Oui	Non
5	Uridine	Oui	Non
6	3'-AMP	Non	Oui
7	3'-GMP	Non	Oui
8	3'-CMP	Non	Oui
9	3'-TMP	Oui	Non
10	3'-UMP	Oui	Non
11	2':3'-cUMP	Oui	Non
12	5'-CMP	Non	Oui
13	3'-dGMP	Non	Oui
14	5'-dGMP	Oui	Non

Tableau 17 : Tests de cycloaddition des précurseurs libres en présence de nucléosides et nucléotides

La formation de l'indolizine **81h** est contrôlée par spectrométrie de masse. L'analyse UPLC-MS du milieu réactionnel incluant de la guanosine comme additif (entrée 1) est fournie à titre d'exemple dans la Figure 55. Puisque la conversion en milieu aqueux est limitée, l'indolizine n'est obtenue qu'en quantité minoritaire lorsque la cycloaddition est possible : le produit recherché est alors caractérisé à $t_r = 2,32$ min par un pic de très faible intensité sur le chromatogramme. Cependant, la fluorescence générée est fortement visible sous lampe UV comme on peut le voir sur la Figure 56.

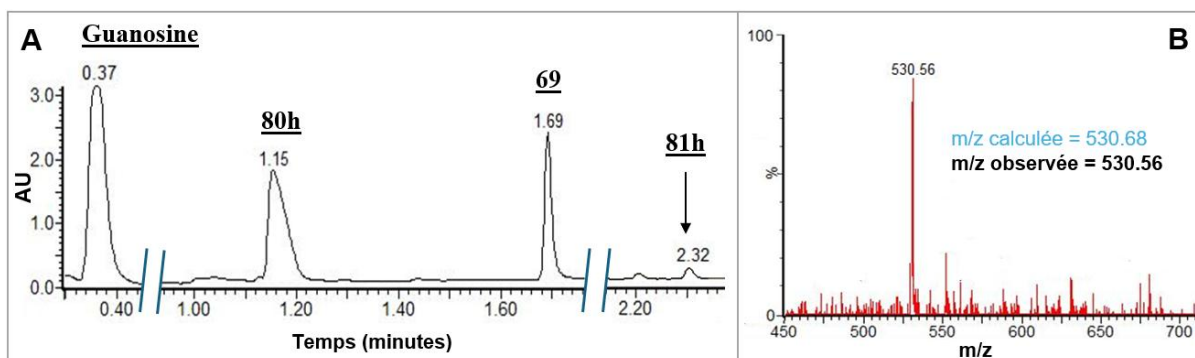


Figure 55 : A) Chromatogramme du milieu réactionnel entre le sel de pyridinium **80h** et l'alcyne **69** en présence de guanosine à $t = 48h$; B) Spectre de masse du pic à $tr = 2,32 \text{ min}$ (**81h**)

L'indolizine est formée en présence des cinq nucléosides naturels (entrées 1 à 5, Tableau 17). A priori, cela signifie que ni le sucre, ni les bases nucléaires ne sont à l'origine de l'interférence causée par les oligonucléotides. Théoriquement, la réduction du groupement 2'-hydroxyle au sein de l'ADN pourrait avoir un impact significatif sur la faisabilité de notre réaction, mais cela semble peu probable étant donné que la cycloaddition se déroule en présence de thymidine, un désoxyribonucléoside (entrée 4). Par processus d'élimination, on pourrait donc pointer du doigt le squelette phosphaté. Toutefois, la réalité s'est avérée plus complexe après avoir testé la réaction en présence de nucléoside 3'-monophate (entrée 6 à 10). Lorsque le 3'-GMP, le 3'-AMP et le 3'-CMP sont ajoutés au milieu réactionnel, l'indolizine n'est pas formée, ce qui conforte l'idée que le phosphate est l'élément problématique. Cependant, ce manque de réactivité n'est pas observé pour tous les nucléotides. En effet, la fluorescence désirée est générée en présence de 3'-TMP et de 3'-UMP (Figure 56).

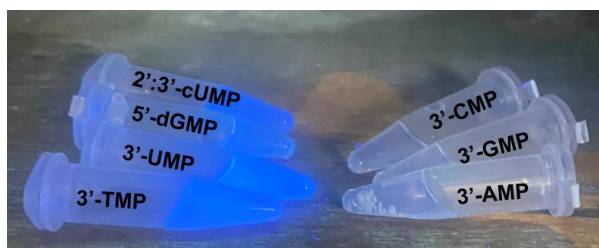


Figure 56 : Fluorescence sous lampe UV ($\lambda = 365 \text{ nm}$) de l'indolizine **81h** formée (ou non) en présence de nucléotide après 24 heures d'agitation.

D'autres nucléotides ont également été testés, avec des résultats mitigés. La cycloaddition en présence de monophosphate cyclique 2':3'-cUMP se produit avec succès (entrée 11). L'indolizine est également formée en présence de 5'-dGMP (entrée 14), mais pas lorsque le phosphate se trouve en position 3' (entrée 13). La cycloaddition échoue également en présence de 5'-CMP (entrée 12). Ces résultats suggèrent que l'interférence est due à une combinaison de la présence (et de la position) du phosphate et de la nature de la base nucléaire. Proposer une explication rationnelle pouvant justifier ces observations reste difficile à ce stade. Rappelons que la cycloaddition du conjugués polyT₁₁ **ODN3-AIk 127** faillit

systématiquement, bien que la réaction ait lieu en présence de 3'-TMP. Encore une fois, nous n'avons aucune justification certaine à offrir. Hypothétiquement, le manque de réactivité observé avec l'oligonucléotide pourrait être dû aux groupement 5'-phosphates. Nous nous sommes contentés des produits disponibles au laboratoire, mais des tests complémentaires faisant appel à une plus large gamme de nucléotides, tels que la thymidine 3',5'-diphosphate, pourraient être utiles : ils répliqueraient la sous-unité d'ADN sous sa forme chaîne native plus fidèlement.

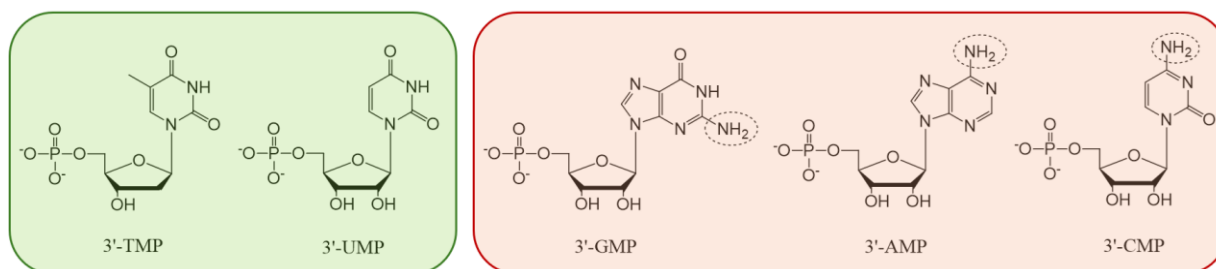


Figure 57 : Structure des nucléotides 3'-monophosphates compatibles avec la cycloaddition (vert) et les nucléotides non compatibles (rouge)

Mise à part la position du phosphate, la seule différence que l'on peut mettre en évidence entre les nucléotides compatibles avec la cycloaddition (3'-TMP, 3'-UMP) et ceux qui ne le sont pas (3'-GMP, 3'-AMP, 3'-CMP) est la présence d'une amine sur la base nucléaire du deuxième groupe (Figure 57). Cette amine pourrait éventuellement être impliquée dans une réaction imprévue avec le sel de pyridinium (ou l'ylure correspondant). En effet, les chromatogrammes des mélanges réactionnels à $t = 48\text{h}$ révèlent que le pyridinium est entièrement consommé lorsque l'indolizine **81h** n'est pas générée (Figure 58-B, avec la 3'-CMP comme exemple), tandis qu'un excès des deux précurseurs reste en solution lorsqu'il n'y a pas d'interférence par le nucléoside/nucléotide.

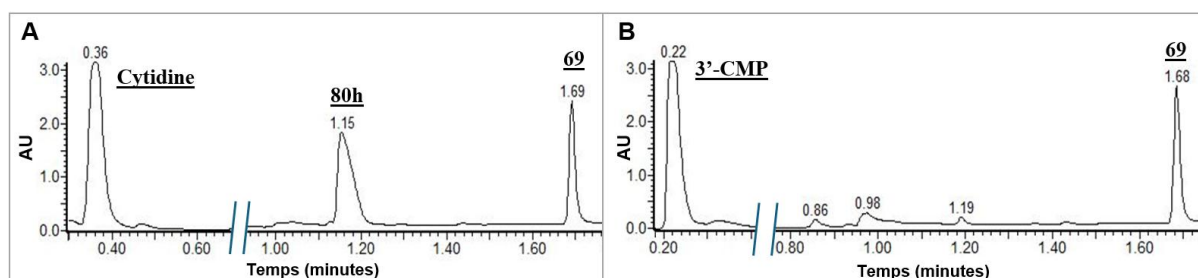
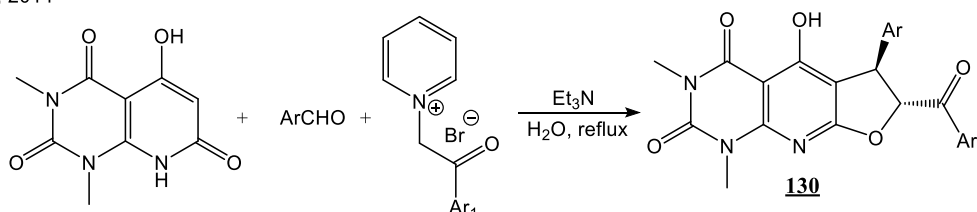


Figure 58 : Chromatogrammes des milieux réactionnels en présence de A) cytidine ; B) 3'-CMP, à $t = 48\text{h}$

Le produit de cette transformation parasite n'apparaît pas sur le chromatogramme, peut-être en raison de sa précipitation en solution ou sur la colonne. Par ailleurs, la consommation du pyridinium par le 3'-CMP est également observée en absence de *N*-hexylpropiolamide : l'alcyne ne joue donc aucun rôle dans cette réaction compétitive.

La réactivité des ylures de pyridinium avec divers composés hétérocycliques a été explorée dans la littérature.¹¹⁴ On distingue notamment la condensation par furo-annulation représentée dans le Schéma 114. En 2014, Bazgir et ses collègues ont décrit la réaction des pyrido[2,3-d]pyrimidinetriones avec des aldéhydes aryliques et des bromures de phénacetylpyridinium en conditions basiques, formant des dihydrofuropyrido[2,3-d]pyrimidines **130**.¹¹⁵ Deux ans plus tard, Bhuyan *et al.* ont rapporté une réaction analogue à partir de dérivés d'acide barbiturique.¹¹⁶ Elle donne lieu à deux régioisomères obtenus *via* une cyclisation 1,5 impliquant une élimination de pyridine.

Bazgir *et al.*, 2014



Bhuyan *et al.*, 2014

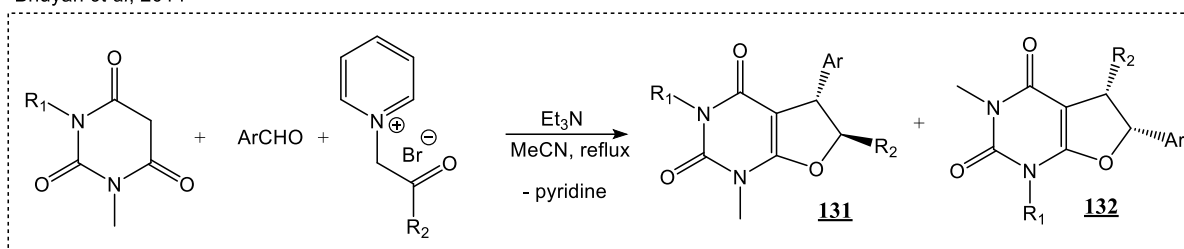


Schéma 114: Réactions de furo-annulation d'ylure de pyridinium avec des dérivés de pyrimidine et d'aldéhydes aryliques

L'acide barbiturique ressemble structurellement aux nucléobases pyrimidiques. Il ne serait pas insensé d'imaginer une réaction de condensation similaire se produisant entre l'ADN et l'ylure de pyridinium **80h**. La libération du fragment pyridine serait cohérente avec nos observations UPLC-MS : cela expliquerait l'apparition d'oligonucléotides caractérisés par des masses molaires plus petites que les conjugués de départ, puisque l'ADN est ancré en position C4 du cycle pyridinique.

Une expérience antérieure qui pourrait accorder du crédit à cette conjecture est illustrée dans le Schéma 115. Considérant les difficultés rencontrées lors des tentatives de conjugaison de l'acide propiolique à l'ADN, d'autres alcynes ont été envisagés. Finalement, nous avons opté pour l'acide 4-éthynylbenzoïque, mais avant de faire ce choix nous avons brièvement songé à l'utilisation de la 5-éthynyl-uridine (5-EU) comme dipolarophile. Si la triple liaison portée par le nucléoside modifié s'était avérée capable de participer à la CDYPA, alors le phosphoramidite correspondant aurait pu être utilisé pour introduire directement le bras alcyne à la séquence oligonucléotidique lors de sa synthèse automatisée. Dans cette optique, nous avons réalisé un test préliminaire durant lequel la 5-EU a été mise en réaction avec le sel de

pyridinium **80a**. Après 18 heures d'agitation à 70°C dans notre tampon carbonate de potassium, l'indolizine n'était toujours pas détectée. Mais il est plus intéressant de noter que l'analyse CCM et RMN du milieu réactionnel a révélé que le substrat pyridinium avait été partiellement transformé en précurseur pyridine non alkylé. Cela conforte l'hypothèse d'une dégradation de l'ylure de pyridinium en pyridine causée par les pyrimidines telles que l'uracile.

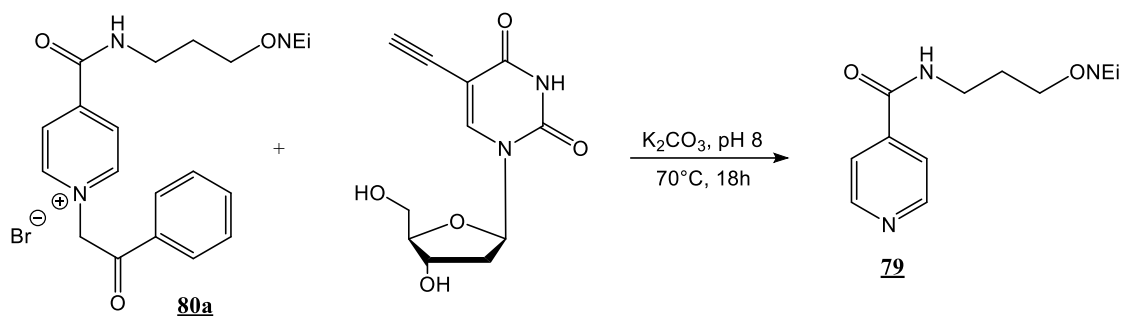


Schéma 115 : Tentative de cycloaddition entre le sel de pyridinium 80a et la 5-éthynyl-uridine

Cela dit, comme démontré précédemment, aucune interférence avec la cycloaddition n'est provoquée par le 3'-TMP ou le 3'-UMP, alors que les monophosphates à base de purine affectent le résultat. De plus, les aldéhydes aryliques nécessaires à la transformation décrite par Bazgir et Bhuyan sont absents de nos milieux réactionnels. L'élimination de l'alkylation médiée par la 5-EU n'est certainement pas due à une furo-annulation.

Les explications proposées jusque-là restent largement hypothétiques et nécessitent une investigation et des tests plus approfondis. Malheureusement, nous n'avons pas pu clarifier le mécanisme d'interférence rencontré, faute de temps. La seule chose dont nous sommes sûrs, c'est que la cycloaddition 1,3-dipolaire de nos précurseurs est incompatible avec l'ADN et donc les aptamères : la réaction d'intérêt ne peut donc pas être utilisée pour construire le modèle **AptaSplit-Indo**. Cela met évidemment frein à notre projet initial de thèse et à la réalisation des objectifs associés. Aussi, la majeure partie de nos travaux de recherche suivante est-elle focalisée sur la conception de modèles aptamères alternatifs pour la détection de petites molécules.

III. Perspectives et valorisation de la cycloaddition comme réaction click fluorogénique

Avant d'abandonner définitivement la cycloaddition 1,3-dipolaire d'ylures de pyridinium et d'alcyne, ce dernier segment du Chapitre 2 vise à présenter brièvement quelques voies que l'on pourrait suivre pour davantage exploiter la réaction. Considérant la quantité de temps et de travail que nous lui avons consacrée, il serait dommage de la mettre de côté sans examiner

toutes les possibilités. À ce titre, nous allons dévoiler deux perspectives qui mériteraient d'être explorées à l'avenir.

A. Modèle AptaSplit-Indo à aptamères ANP

1. L'acide nucléique peptidique

L'apparente incompatibilité de la cycloaddition avec l'ADN peut théoriquement être contournée grâce à l'utilisation d'acide nucléique peptidique (ANP). Introduit par Nielsen et al. en 1991, l'ANP est un analogue synthétique de l'ADN qui se différencie par son squelette.¹¹⁸ Comme son nom l'indique, l'armature désoxyribose-phosphate naturelle est remplacée par un pseudo-peptide composé d'unités de *N*-(2-aminoéthyl)-glycines auxquelles sont liées les nucléobases par des liaisons méthylcarbonyl (Figure 59). Les ANPs sont capables de s'hybrider avec des séquences ADN ou ARN complémentaires selon l'appariement de bases Watson-Crick. Ils peuvent également se lier à des duplex double-brin via des liaisons hydrogènes de type Hoogsteen. Contrairement aux acides nucléiques natifs, le squelette d'un ANP n'est pas chargé. Il s'hybride donc à sa séquence complémentaire sans répulsion électrostatique. Par conséquent, la stabilité des duplex ANP-ADN est supérieure à celle des entités ADN-ADN analogues. Ce phénomène se traduit par des T_m plus élevées. En prenant la séquence pentadécamère [$3'$ -TGTACGTCACAATA- $5'$] comme exemple, la température de fusion du duplex ANP-ADN a été mesurée à 69,5°C, ce qui représente une augmentation de 16°C par rapport à l'ADN double brin ($T_m = 53,3^\circ\text{C}$).¹¹⁹

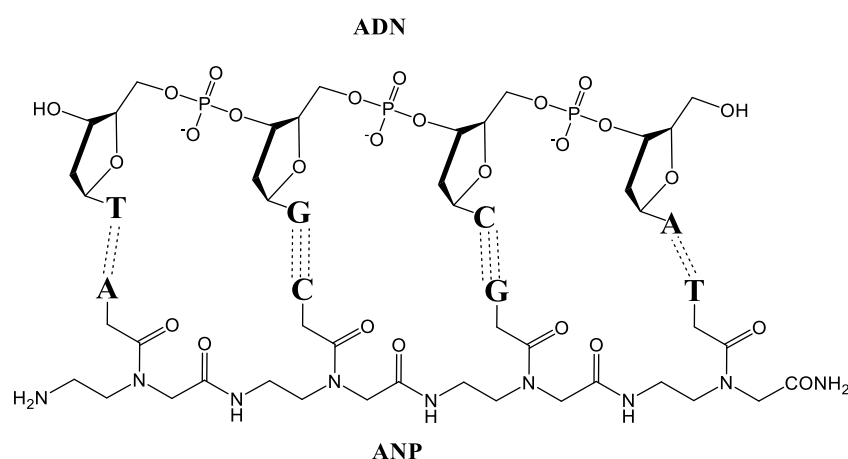


Figure 59 : Représentation d'un duplex ANP-ADN

L'hybridation des ANPs se caractérise également par une sélectivité et une spécificité accrues, se manifestant par une faible tolérance aux mésappariements. La présence d'un seul mismatch de base dans un 15-mère APN-ADN ou APN-ARN a conduit à une diminution de la température de fusion de 15 °C.¹²⁰ Pour comparaison, le même mésappariement entraîne une

baisse de 4°C pour un duplex ADN-ADN. De plus, leur squelette non naturel signifie que les ANPs ne sont pas dégradés par les nucléases ou les protéases et possèdent de ce fait une grande stabilité *in vivo*.

Sans surprise, ces avantages ont permis aux ANPs de trouver une utilisation dans le domaine biomédical en tant que sondes moléculaires, biocapteurs et agents antigéniques.¹²¹ Dans notre cas, les ANPs ont retenu notre attention car leur squelette peptidique éliminerait l'interférence rencontrée durant la CDYPA causée par les nucléotides (en particulier, par la présence des phosphates) tout en maintenant les interactions médiées par les nucléobases nécessaire à la reconnaissance de la cible.

2. Les aptamères à ANP

Les structures non canoniques ont suscité un grand intérêt pour la conception de nouveaux aptamères. Les acides nucléiques verrouillés (LNA, pour Locked Nucleic Acid)^{122–125}, déverrouillés (UNA, pour Unlocked Nucleic Acid)^{126,127} et les Spiegelmers à base d'ARN-L^{128–130} ont connu du succès comme alternatives à l'ADN ou l'ARN. Compte tenu de leur stabilité exceptionnelle, on pourrait penser que les ANPs figureraient abondamment dans cette liste de substitutions réussies, mais l'utilisation d'aptamères ANP reste rare et seuls quelques exemples peuvent être trouvés dans la littérature.^{131,132} Cela s'explique en partie par l'absence d'équivalent itératif SELEX pour la sélection de récepteurs ANPs. Ainsi, la seule possibilité est de recourir à des modifications post-SELEX basées sur un aptamère ADN ou ARN précédemment décrit. Malheureusement, la transition des nucléotides vers les ANPs n'est pas si simple : une perte d'affinité significative est souvent observée. En effet, bien que l'appariement des bases complémentaires soit plus fort avec les ANPs, ces derniers ne parviennent souvent pas à reproduire les modes de liaison alternatifs trouvés au sein des complexes *aptamères naturels-cibles* en raison de leurs structures radicalement différentes. Outre les liaisons hydrogènes assurées par les nucléobases, les interactions d'empilement π , les effets hydrophobes et les interactions électrostatiques peuvent jouer un rôle important pour la liaison de la sonde à l'analyte. Par conséquent, l'élimination du squelette phosphate-sucre chargé entraîne souvent une perte d'interactions essentielles avec la molécule cible.

Cela dit, si la liaison de l'aptamère ADN à sa cible dépend peu de la force ionique du milieu, il y a de fortes chances que la composante électrostatique ne soit pas importante ou décisive pour l'interaction. En d'autres termes, un squelette aptamère peptidique neutre n'handicaperait pas (ou peu) l'affinité. En 2013, Lee *et al.* démontrent pour la première fois l'intérêt des ANPs comme nouvelle classe d'aptamères.¹³³ Le groupe rapporte un pentadécamère possédant une séquence de nucléobases identique à celle de l'aptamère

ADN capable de se lier spécifiquement à la thrombine, et ce avec une affinité 6 fois supérieure à l'analogue naturel. Plus récemment, Rodrigues et ses collègues ont décrit en 2023 un aptamère ANPs pour la troponine cardiaque I caractérisé par une remarquable affinité picomolaire.¹³⁴ Ces exemples prouvent que les ANPs ont le potentiel de rivaliser avec les aptamères ADN/ARN, et pourraient donc constituer une alternative intéressante pour notre modèle **AptaSplit-Indo**.

Bien entendu, les systèmes mentionnés ci-dessus ciblent des protéines de poids moléculaire supérieur à 24 kDa, et ne sont donc pas adaptés à nos critères de recherche. De plus, la fragmentation d'aptamères ANPs pour un mode de liaison « divisé » n'a pas encore été décrite. Le remplacement de l'ADN par des aptamères ANP nécessiterait en amont un immense travail autour de la sélection, la caractérisation, l'optimisation et la fragmentation de nouveaux aptamères ANP pour la reconnaissance de petits analytes tels que l'adénosine. Naturellement, nous ne pouvons pas explorer cette voie dans les limites du temps qui nous reste, mais les aptamères ANP restent des alternatives théoriques pour le modèle **AptaSplit-Indo** initial faisant usage de la cycloaddition 1,3-dipolaire d'ylures de pyridinium et d'alcyne.

Un modèle ANP simplifié a été conçu pour évaluer la faisabilité de la CDYPA (Figure 60). Il nécessite la synthèse de deux courts brins ANP complémentaires composés de six nucléobases, portant à leurs extrémités nos précurseurs. La préparation du brin A a été brièvement explorée mais après deux tentatives infructueuses (masse détectée supérieure à la m/z calculée) et pressés par le temps, les expériences ont été mises de côté et ce modèle a été relégué au rang de perspectives futures.

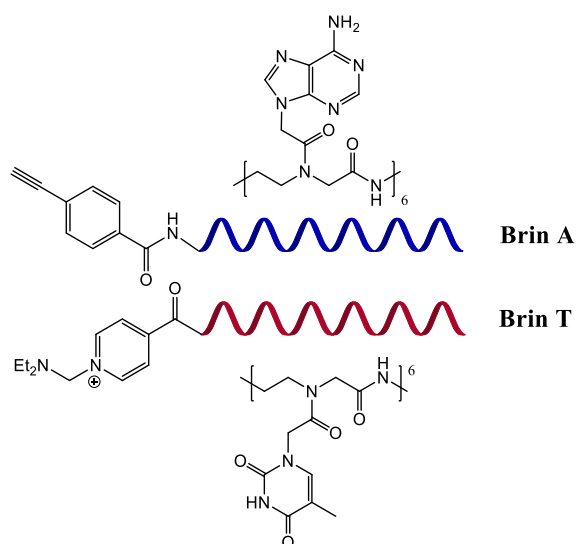


Figure 60 : Modèle ANP simplifié

B. Valorisation de la cycloaddition 1,3-dipolaire comme réaction click fluorogénique pour la synthèse peptidique

La cycloaddition 1,3-dipolaire d'ylures de pyridinium et d'alcynes peut également être valorisée comme réaction click bio-orthogonale et fluorogénique pour la synthèse de biomolécules autres que l'ADN telles que les peptides ou les oligosaccharides.

1. Les réactions click fluorogéniques

Comme nous l'avons vu dans le chapitre d'introduction, les réactions fluorogéniques ont de larges applications en biomarquage et peuvent être définies comme le couplage de deux précurseurs peu ou pas fluorescents formant une nouvelle molécule qui émet un fort signal de fluorescence. L'assemblage du produit d'intérêt peut donc être facilement suivi en temps réel.

Les variantes fluorogéniques de la CuAAC sont nombreuses. Le premier exemple remonte à 2004 où une fonction azoture a été greffée sur un précurseur coumarinique non fluorescent (Schéma 116).¹³⁵ La réaction de la 3-azidocoumarine avec un alcyne terminal a permis d'obtenir un produit 1,2,3-triazole très fluorescent. Plus tard, la CuAAC a été adaptée pour la formation d'autres fluorophores tels que les dérivés de 1,8-naphtalimide¹³⁶, d'anthracène¹³⁷ et de benzothiazole.¹³⁸ Leur utilisation en imagerie cellulaire est vaste et a fait l'objet de plusieurs revues.^{139,140} Il va sans dire que les réactions click fluorogéniques sont des outils précieux en biochimie et que de nouvelles méthodologies seront toujours appréciées.

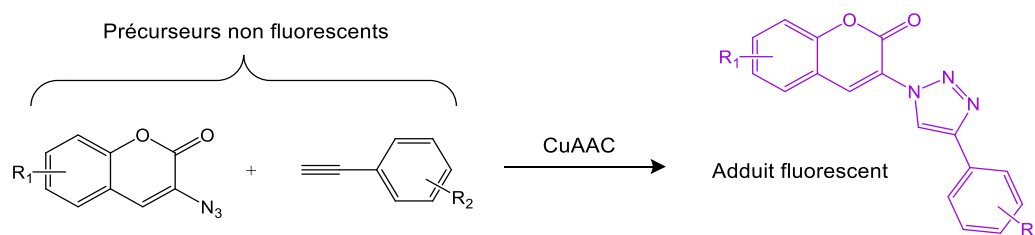


Schéma 116 : Réaction click CuAAC fluorogénique

Nous espérons donc mettre en évidence le potentiel de la cycloaddition 1,3-dipolaire générant une indolizine comme nouvelle méthode d'assemblage macromoléculaire, hors ADN/ARN. En effet, la réaction est compatible avec la présence de divers groupes fonctionnels et s'effectue en conditions douces. De plus, la liaison indolizine formée est stable en conditions physiologiques et se caractérise par une fluorescence intense. Les rendements sont certes faibles dans l'eau lorsqu'on utilise nos précurseurs sélectionnés, mais la réactivité des ylures de pyridinium peut facilement être améliorée. En effet, l'ajout d'un groupement électroattracteur supplémentaire sur le carbone méthylure peut abaisser davantage le pKa de

l'espèce et ainsi favoriser la cycloaddition. La structure d'un éventuel précurseur biacétylé est représentée sur la Figure 61. À titre d'exemple, le sel de 4-cyanopyridinium substitué par un dicarboxylate de diéthyle au niveau de l'azote conduit à la formation du produit avec un rendement de 63% dans l'eau contre 24% pour l'analogue monocarboxylate.¹⁴¹

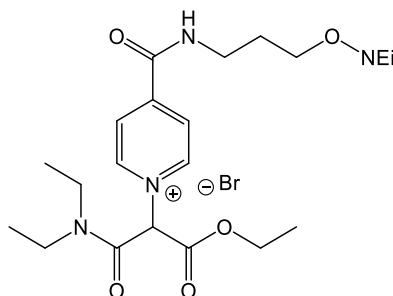


Figure 61 : Structure du sel de pyridinium biacétylé pour l'optimisation de la cycloaddition dans l'eau

2. Vers une application pour la synthèse de plateformes peptidiques multimériques

Pour illustrer le potentiel de la cycloaddition en tant que réaction fluorogénique, nous avons considéré son utilisation pour la synthèse de peptides, et plus précisément pour la préparation de RAFT-RGD multimériques (Schéma 117). Un RAFT (pour *Regioselectively Addressable Functionalized Template*) est un support décamerique cyclique à base d'acides aminés. Ce type de macromolécules contraintes est une spécialité du laboratoire I₂BM : elles sont impliquées dans la détection et la thérapie du cancer par ciblage du récepteur intégrine $\alpha V\beta 3$ surexprimé à la surface des cellules tumorales via le motif RGD.¹⁴² Classiquement, la substitution trouvée au bas du châssis peptidique (position Alloc sur le schéma) est utilisée comme point d'ancrage pour un fluorophore. Recourir à la cycloaddition 1,3-dipolaire comme réaction click pour la conjugaison des cyclopeptides RGD au support décamerique permettrait donc de libérer ce site à d'autres fins (par exemple, pour l'immobilisation de la structure sur une puce ou pour sa conjugaison à un anticarcinogène).

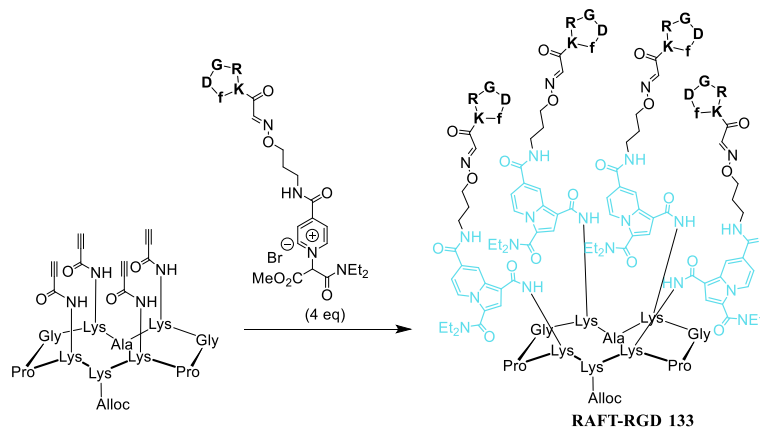


Schéma 117 : Assemblage du **RAFT-RGD** à l'aide de la cycloaddition 1,3-dipolaire d'ylures de pyridinium et d'alcynes

La préparation du composé **133** aurait été l'objectif final si nous avions plus de temps à lui consacrer. À sa place, nous avons entamé la préparation d'un conjugué peptidique linéaire plus simple en tant que preuve de concept, impliquant la formation d'une unique liaison indolizine au lieu de quatre. Ce modèle simplifié est représenté dans le Schéma 118. Il est composé de deux tétrapeptides couplés par le biais de notre hétérocycle fluorescent.

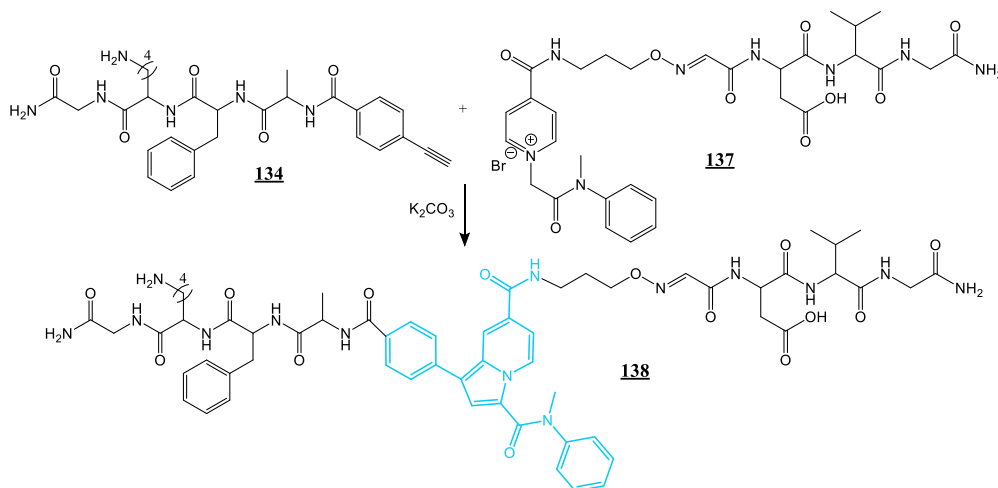


Schéma 118 : Synthèse de l'octapeptide **138** à l'aide de la cycloaddition 1,3-dipolaire générant un lien indolizine

L'assemblage de la molécule **138** nécessite d'abord la synthèse et la fonctionnalisation des peptides **134** et **137** aux séquences respectives GKFA et GVDS.

Les synthèses peptidiques sont réalisées sur phase solide en utilisant la résine Rink amide. Après clivage au TFA, cette dernière libère un amide au niveau du C-terminal ce qui augmente la stabilité du peptide par rapport à l'analogue carboxylique. À l'instar de la SPOS, l'élongation de la chaîne se fait dans le sens du C-terminal vers le N-terminal par étapes successives de couplage et déprotection. Les chaînes latérales réactives portent des groupements protecteurs orthogonaux compatibles avec les conditions de couplage peptidique et de déprotection des amines en α . La stratégie couramment utilisée est la chimie dite « Fmoc/tBu » durant laquelle les amines α sont protégées par un groupement Fmoc (fluorénylméthoxycarbonyl). Ce dernier peut être éliminé par β -élimination à l'aide de pipéridine (10% dans le DMF). Les chaînes latérales sont quant à elles protégées par des groupements acido-labiles tels que le tBu, éliminés lors de l'étape de clivage. L'agent de couplage assurant les liaisons peptidiques est l'HBTU, un dérivé phosphonium qui présente une résistance face à la racémisation.

Le tétrapeptide alcyne **134** est préparé selon le chemin réactionnel illustré dans le Schéma 119. Une fois le dernier Fmoc déprotégé, l'acide 4-éthynyl-benzoïque est couplé au N-terminal à l'aide d'EEDQ afin de maximiser la réaction. En effet, l'EEDQ est considéré comme un réactif

de couplage plus efficace. Un rendement global de 76% est obtenu après purification sur HPLC préparative.

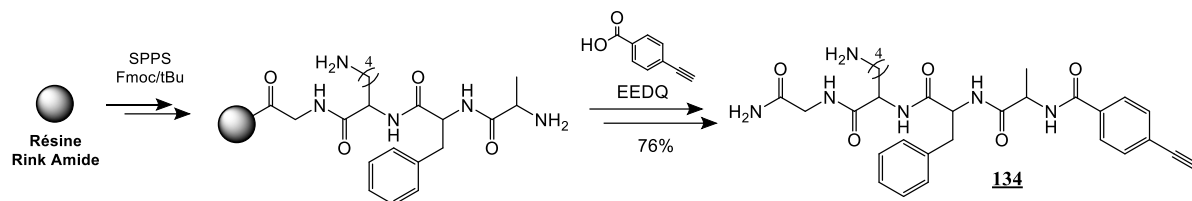


Schéma 119 : Synthèse du térapeptide alcyne **134**

La séquence GVDS **135** est isolée avec un rendement de 44% (Schéma 120). Une sérine est introduite au niveau du N-terminus afin de pouvoir l'oxyder en groupement glyoxalamide pour réaliser une ligation oxime ultérieure avec le sel de pyridinium. Pour ce faire, le peptide est agité avec un excès de périodate de sodium (10 eq) dans l'eau pendant 40 minutes. La réaction est stoppée par purification, conduisant au composé **136** avec un rendement de 83%.

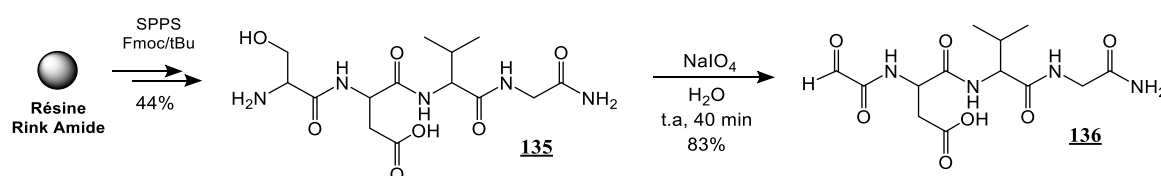


Schéma 120 : Synthèse du térapeptide alcyne **136**

Nous arrivons alors à l'étape limitante de cette synthèse : la conjugaison du sel de pyridinium au peptide. Après sa déprotection, la molécule **80i** et le peptide **136** sont mis en réaction dans une solution aqueuse de TFA à 1%. La progression est suivie par UPLC-MS. Bien que le produit désiré soit détecté, le résultat de la transformation est loin d'être satisfaisant. Comme on peut le voir sur le chromatogramme du milieu réactionnel à $t = 2\text{h}$ (Figure **62**), un mélange de différents produits est formé. Le conjugué **137** est minoritaire et trouvé à $t_r = 1,50\text{ min}$, mais sa purification par RP-HPLC n'a abouti qu'à une piètre quantité de peptide **138** ($<1\text{ mg}$), insuffisante pour nos tests de cycloadditions.

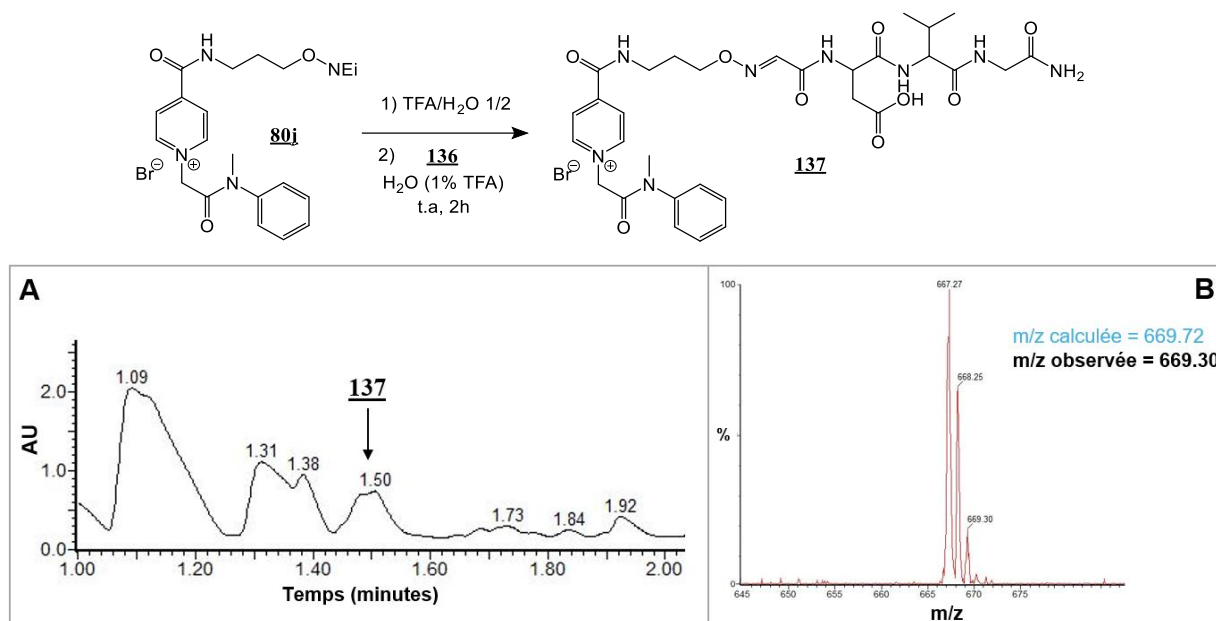


Figure 62 : A) Chromatogramme du milieu réactionnel à t = 2h; B) Spectre de masse du produit à tr = 1.50 min

Au cas où le problème serait spécifique au pyridinium utilisé, celui-ci a été remplacé par le précurseur **80g** (Schéma 121). Le résultat reste cependant décevant : un mélange de produits est encore une fois obtenu, et cette fois-ci le conjugué souhaité **139** n'est à priori pas détecté.

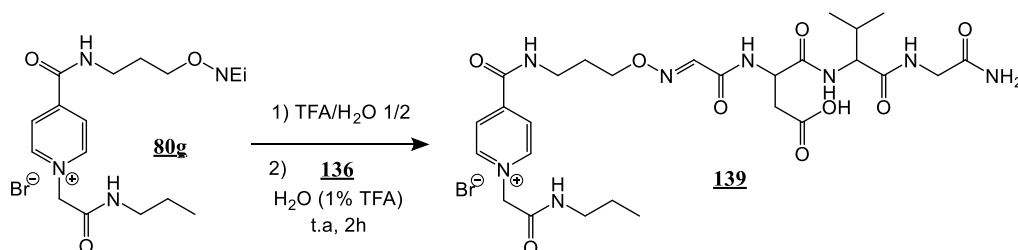


Schéma 121 : Ligation oxime entre le sel de pyridinium **80g** et le peptide **136**

Voulant dédier les 8 derniers mois de thèse à l'exploration d'alternatives pour le modèle **AptaSplit-Indo**, nous avons finalement décidé de mettre les peptides de côté au lieu d'insister davantage sur la ligation oxime décrite ci-dessus. Malheureusement, nous n'avons pas eu le temps nécessaire à une ré-exploration de ces expériences. La valorisation de la CDYPA en tant que réaction click fluorogénique pour la synthèse de conjugués peptidiques reste une perspective future prometteuse.

C. Bilan général du chapitre

Les travaux recensés au cours de ce chapitre se sont focalisés sur la préparation et la caractérisation de conjugués oligonucléotidiques. Tout d'abord, nos trois fluorophores indolizines sélectionnés ont été évalués comme biomarqueurs d'ADN. Les conjugués ont été minutieusement caractérisés et leurs propriétés d'émission étudiées en milieu aqueux. Bien qu'atténuée, la fluorescence reste intense au sein du conjugué et le couplage augmente la stabilité des duplex. Nos indolizines émergent donc comme nouvelles alternatives aux colorants commerciaux.

Les études sur les précurseurs oligonucléotidiques des indolizines se sont révélées moins fructueuses. Après une multitude de tests, nous avons découvert que la cycloaddition 1,3-dipolaire de nos ylures de pyridinium et alcynes est apparemment incompatible avec l'ADN, ce qui rend notre modèle **AptaSplit-Indo** invalide. Des recherches plus approfondies sont nécessaires pour déterminer le mécanisme d'interférence provoqué par l'acide nucléique. Nos observations suggèrent une dégradation réversible du cycle pyridinium.

Désormais, notre attention se portera sur le développement d'une méthode de détection alternative, restant toujours basée sur l'assemblage supramoléculaire d'aptamères divisés. L'interaction stabilisatrice et le signal de transduction après liaison à la cible ne peuvent plus être dus à la formation d'une indolizine. Cependant, nous souhaitons conserver l'hétérocycle comme composant de notre modèle, idéalement en tant que réactif qui subirait une transformation une fois le complexe ternaire formé en présence de la cible.

Références bibliographiques

- (1) Schowalter, D. B.; Sommer, S. S. The Generation of Radiolabeled DNA and RNA Probes with Polymerase Chain Reaction. *Anal. Biochem.* **1989**, *177* (1), 90–94. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90019-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90019-5).
- (2) Yule, H. P. Half-Lives of Some Short-Lived Radioactive Isotopes. *Nucl. Phys. A* **1967**, *94* (2), 442–448. [https://doi.org/10.1016/0375-9474\(67\)90015-2](https://doi.org/10.1016/0375-9474(67)90015-2).
- (3) Yershov, G.; Barsky, V.; Belgovskiy, A.; Kirillov, E.; Kreindlin, E.; Ivanov, I.; Parinov, S.; Guschin, D.; Drobishev, A.; Dubiley, S.; Mirzabekov, A. DNA Analysis and Diagnostics on Oligonucleotide Microchips. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93* (10), 4913–4918. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.10.4913>.
- (4) Agasti, S. S.; Wang, Y.; Schueder, F.; Sukumar, A.; Jungmann, R.; Yin, P. DNA-Barcoded Labeling Probes for Highly Multiplexed Exchange-PAINT Imaging. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (4), 3080–3091. <https://doi.org/10.1039/C6SC05420J>.
- (5) Femino, A. M.; Fay, F. S.; Fogarty, K.; Singer, R. H. Visualization of Single RNA Transcripts in Situ. *Science* **1998**, *280* (5363), 585–590. <https://doi.org/10.1126/science.280.5363.585>.
- (6) Azadnia, A.; Campbell, R.; Sharma, M. The Scope of Dansyl vs Fluorescein Label in Fluorescence Postlabeling Assay for DNA Damage. *Anal. Biochem.* **1994**, *218* (2), 444–448. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1204>.
- (7) Bucevičius, J.; Gerasimaitė, R.; Kiszka, K. A.; Pradhan, S.; Kostiuk, G.; Koenen, T.; Lukinavičius, G. A General Highly Efficient Synthesis of Biocompatible Rhodamine Dyes and Probes for Live-Cell Multicolor Nanoscopy. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 1306. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36913-2>.
- (8) Fegan, A.; Shirude, P. S.; Balasubramanian, S. Rigid Cyanine Dye Nucleic Acid Labels. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2008**, No. 17, 2004. <https://doi.org/10.1039/b801629a>.
- (9) Pereira, A.; Martins, S.; Caldeira, A. T.; Pereira, A.; Martins, S.; Caldeira, A. T. Coumarins as Fluorescent Labels of Biomolecules. In *Phytochemicals in Human Health*; IntechOpen, 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85973>.
- (10) Khalfan, H.; Abuknesha, R.; Rand-Weaver, M.; Price, R. G.; Robinson, D. Aminomethyl Coumarin Acetic Acid: A New Fluorescent Labelling Agent for Proteins. *Histochem. J.* **1986**, *18* (9), 497–499. <https://doi.org/10.1007/BF01675617>.
- (11) Castro, G.; Romero-Ávila, M.; Farfán, N.; Arcos-Ramos, R.; Maldonado-Domínguez, M. Heterocycles as Supramolecular Handles for Crystal Engineering: A Case Study with 7-(Diethylamino)Coumarin Derivatives. *RSC Adv.* **2024**, *14* (29), 20824–20836. <https://doi.org/10.1039/D4RA03656E>.
- (12) Fonin, A.; Sulatskaya, A.; Kuznetsova, I.; Turoverov, K. Fluorescence of Dyes in Solutions with High Absorbance. Inner Filter Effect Correction. *PloS One* **2014**, *9*, e103878. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103878>.
- (13) Pal, H.; Nad, S.; Kumbhakar, M. Photophysical Properties of Coumarin-120: Unusual Behavior in Nonpolar Solvents. *J. Chem. Phys.* **2003**, *119* (1), 443–452. <https://doi.org/10.1063/1.1578057>.
- (14) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149–2154. <https://doi.org/10.1021/ja00897a025>.
- (15) Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. Deoxynucleoside Phosphoramidites—A New Class of Key Intermediates for Deoxypolynucleotide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22* (20), 1859–1862. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)90461-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)90461-7).
- (16) Letsinger, R. L.; Mahadevan, V. Oligonucleotide Synthesis on a Polymer Support. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87* (15), 3526–3527. <https://doi.org/10.1021/ja01093a058>.
- (17) Letsinger, R. L.; Ogilvie, K. K. Nucleotide Chemistry. XIII. Synthesis of Oligothymidylates via Phosphotriester Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91* (12), 3350–3355. <https://doi.org/10.1021/ja01040a042>.
- (18) Gilham, P. T.; Khorana, H. G. Studies on Polynucleotides. I. A New and General Method for the Chemical Synthesis of the C5"-C3" Internucleotidic Linkage. Syntheses of Deoxyribo-Dinucleotides¹. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80* (23), 6212–6222. <https://doi.org/10.1021/ja01556a016>.
- (19) Letsinger, R. L.; Finnan, J. L.; Heavner, G. A.; Lunsford, W. B. Nucleotide Chemistry. XX. Phosphite Coupling Procedure for Generating Internucleotide Links. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97* (11), 3278–3279. <https://doi.org/10.1021/ja00844a090>.

- (20) Matteucci, M. D.; Caruthers, M. H. Synthesis of Deoxyoligonucleotides on a Polymer Support. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103* (11), 3185–3191. <https://doi.org/10.1021/ja00401a041>.
- (21) Köster, H.; Biernat, J.; McManus, J.; Wolter, A.; Stumpe, A.; Narang, Ch. K.; Sinha, N. D. Polymer Support Oligonucleotide Synthesis-XV: Synthesis of Oligodeoxynucleotides on Controlled Pore Glass (CPG) Using Phosphate and a New Phosphite Triester Approach. *Tetrahedron* **1984**, *40* (1), 103–112. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(84\)85108-X](https://doi.org/10.1016/0040-4020(84)85108-X).
- (22) Berner, S.; Mühlegger, K.; Seliger, H. Studies on the Role of Tetrazole in the Activation of Phosphoramidites. *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17* (3), 853–864.
- (23) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5).
- (24) Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. Chemistry in Living Systems. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1* (1), 13–21. <https://doi.org/10.1038/nchembio0605-13>.
- (25) Hang, H. C.; Yu, C.; Kato, D. L.; Bertozzi, C. R. A Metabolic Labeling Approach toward Proteomic Analysis of Mucin-Type O-Linked Glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (25), 14846–14851. <https://doi.org/10.1073/pnas.2335201100>.
- (26) Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. The Growing Applications of Click Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (8), 1249–1262. <https://doi.org/10.1039/B613014N>.
- (27) Binder, W. H.; Sachsenhofer, R. ‘Click’ Chemistry in Polymer and Materials Science. *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28* (1), 15–54. <https://doi.org/10.1002/marc.200600625>.
- (28) Hein, C. D.; Liu, X.-M.; Wang, D. Click Chemistry, A Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. *Pharm. Res.* **2008**, *25* (10), 2216–2230. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9616-1>.
- (29) Devaraj, N. K.; Finn, M. G. Introduction: Click Chemistry. *Chem. Rev.* **2021**, *121* (12), 6697–6698. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00469>.
- (30) Fantoni, N. Z.; El-Sagheer, A. H.; Brown, T. A Hitchhiker’s Guide to Click-Chemistry with Nucleic Acids. *Chem. Rev.* **2021**, *121* (12), 7122–7154. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00928>.
- (31) Mitry, M. M. A.; Greco, F.; Osborn, H. M. I. In Vivo Applications of Bioorthogonal Reactions: Chemistry and Targeting Mechanisms. *Chem. – Eur. J.* **2023**, *29* (20), e202203942. <https://doi.org/10.1002/chem.202203942>.
- (32) Huisgen, R. Centenary Lecture: 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Proc. Chem. Soc.* **1961**, No. October, 357–396. <https://doi.org/10.1039/PS9610000357>.
- (33) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057–3064. <https://doi.org/10.1021/jo011148j>.
- (34) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596–2599. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4).
- (35) Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (11), 3192–3193. <https://doi.org/10.1021/ja021381e>.
- (36) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (1), 210–216. <https://doi.org/10.1021/ja0471525>.
- (37) Rodionov, V. O.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. Mechanism of the Ligand-Free Cu^I-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (15), 2210–2215. <https://doi.org/10.1002/anie.200461496>.
- (38) Straub, B. F. M-Acetylide and μ -Alkenylidene Ligands in “Click” Triazole Syntheses. *Chem. Commun.* **2007**, No. 37, 3868–3870. <https://doi.org/10.1039/B706926J>.
- (39) Jin, L.; Tolentino, D. R.; Melaimi, M.; Bertrand, G. Isolation of Bis(Copper) Key Intermediates in Cu-Catalyzed Azide-Alkyne “Click Reaction.” *Sci. Adv.* **2015**, *1* (5), e1500304. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500304>.
- (40) Banerji, B.; Chandrasekhar, K.; Killi, S. K.; Pramanik, S. K.; Uttam, P.; Sen, S.; Maiti, N. C. Silver-Catalysed Azide–Alkyne Cycloaddition (AgAAC): Assessing the Mechanism by Density Functional Theory Calculations. *R. Soc. Open Sci.* **2016**, *3* (9), 160090. <https://doi.org/10.1098/rsos.160090>.
- (41) Rao, H. S. P.; Chakibanda, G. Raney Ni Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction. *RSC Adv.* **2014**, *4* (86), 46040–46048. <https://doi.org/10.1039/C4RA07057G>.
- (42) Librando, I. L.; Mahmoud, A. G.; Carabineiro, S. A. C.; Guedes da Silva, M. F. C.; Maldonado-Hódar, F. J.; Geraldes, C. F. G. C.; Pombeiro, A. J. L. Heterogeneous Gold Nanoparticle-Based

- Catalysts for the Synthesis of Click-Derived Triazoles via the Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction. *Catalysts* **2022**, *12* (1), 45. <https://doi.org/10.3390/catal12010045>.
- (43) Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Alkynes and Organic Azides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (46), 15998–15999. <https://doi.org/10.1021/ja054114s>.
 - (44) Smith, C. D.; Greaney, M. F. Zinc Mediated Azide–Alkyne Ligation to 1,5- and 1,4,5-Substituted 1,2,3-Triazoles. *Org. Lett.* **2013**, *15* (18), 4826–4829. <https://doi.org/10.1021/ol402225d>.
 - (45) Rasolofonjatovo, E.; Theeramunkong, S.; Bouriaud, A.; Kolodych, S.; Chaumontet, M.; Taran, F. Iridium-Catalyzed Cycloaddition of Azides and 1-Bromoalkynes at Room Temperature. *Org. Lett.* **2013**, *15* (18), 4698–4701. <https://doi.org/10.1021/ol402008u>.
 - (46) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047. <https://doi.org/10.1021/ja044996f>.
 - (47) Meier, H.; Petersen, H.; Kolshorn, H. Die Ringspannung von Cycloalkinen und ihre spektroskopischen Auswirkungen. *Chem. Ber.* **1980**, *113* (7), 2398–2409. <https://doi.org/10.1002/cber.19801130708>.
 - (48) Turner, R. B.; Jarrett, A. D.; Goebel, P.; Mallon, B. J. Heats of Hydrogenation. IX. Cyclic Acetylenes and Some Miscellaneous Olefins. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95* (3), 790–792. <https://doi.org/10.1021/ja00784a025>.
 - (49) Shea, K. J.; Kim, J. S. Influence of Strain on Chemical Reactivity. Relative Reactivity of Torsionally Strained Double Bonds in 1,3-Dipolar Cycloadditions. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (12), 4846–4855. <https://doi.org/10.1021/ja00038a059>.
 - (50) Hamlin, T. A.; Levandowski, B. J.; Narsaria, A. K.; Houk, K. N.; Bickelhaupt, F. M. Structural Distortion of Cycloalkynes Influences Cycloaddition Rates Both by Strain and Interaction Energies. *Chem. – Eur. J.* **2019**, *25* (25), 6342–6348. <https://doi.org/10.1002/chem.201900295>.
 - (51) Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. Copper-Free Click Chemistry for Dynamic in Vivo Imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (43), 16793–16797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707090104>.
 - (52) Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G. Visualizing Metabolically Labeled Glycoconjugates of Living Cells by Copper-Free and Fast Huisgen Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (12), 2253–2255. <https://doi.org/10.1002/anie.200705456>.
 - (53) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. A Hydrophilic Azacyclooctyne for Cu-Free Click Chemistry. *Org. Lett.* **2008**, *10* (14), 3097–3099. <https://doi.org/10.1021/ol801141k>.
 - (54) Luu, T.; Gristwood, K.; Knight, J. C.; Jörg, M. Click Chemistry: Reaction Rates and Their Suitability for Biomedical Applications. *Bioconjug. Chem.* **2024**, *35* (6), 715–731. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.4c00084>.
 - (55) Kalia, J.; Raines, R. T. Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (39), 7523–7526. <https://doi.org/10.1002/anie.200802651>.
 - (56) Singh, Y.; Edupuganti, O. P.; Villien, M.; Defrancq, É.; Dumy, P. The Oxime Bond Formation as a Useful Tool for the Preparation of Oligonucleotide Conjugates. *Comptes Rendus Chim.* **2005**, *8* (5), 789–796. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2005.02.007>.
 - (57) Ulrich, S.; Boturyn, D.; Marra, A.; Renaudet, O.; Dumy, P. Oxime Ligation: A Chemoselective Click-Type Reaction for Accessing Multifunctional Biomolecular Constructs. *Chem. – Eur. J.* **2014**, *20* (1), 34–41. <https://doi.org/10.1002/chem.201302426>.
 - (58) Agten, S. M.; Dawson, P. E.; Hackeng, T. M. Oxime Conjugation in Protein Chemistry: From Carbonyl Incorporation to Nucleophilic Catalysis. *J. Pept. Sci.* **2016**, *22* (5), 271–279. <https://doi.org/10.1002/psc.2874>.
 - (59) Kölmel, D. K.; Kool, E. T. Oximes and Hydrazones in Bioconjugation: Mechanism and Catalysis. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (15), 10358–10376. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00090>.
 - (60) Meyer, V.; Janny, A. Ueber Stickstoffhaltige Acetonderivate. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1882**, *15* (1), 1164–1167. <https://doi.org/10.1002/cber.188201501257>.
 - (61) Fischer, E. Ueber Die Hydrazone. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1888**, *21* (1), 984–988. <https://doi.org/10.1002/cber.188802101188>.
 - (62) Narang, R.; Narasimhan, B.; Sharma, S. A Review on Biological Activities and Chemical Synthesis of Hydrazide Derivatives. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (4), 569–612. <https://doi.org/10.2174/092986712798918789>.
 - (63) Schepetkin, I. A.; Plotnikov, M. B.; Khlebnikov, A. I.; Plotnikova, T. M.; Quinn, M. T. Oximes: Novel Therapeutics with Anticancer and Anti-Inflammatory Potential. *Biomolecules* **2021**, *11* (6), 777. <https://doi.org/10.3390/biom11060777>.

- (64) Cordes, E. H.; Jencks, W. P. General Acid Catalysis of Semicarbazone Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84* (22), 4319–4328. <https://doi.org/10.1021/ja00881a024>.
- (65) Dirksen, A.; Hackeng, T. M.; Dawson, P. E. Nucleophilic Catalysis of Oxime Ligation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (45), 7581–7584. <https://doi.org/10.1002/anie.200602877>.
- (66) Tang, L.; Yin, Q.; Xu, Y.; Zhou, Q.; Cai, K.; Yen, J.; Dobrucki, L. W.; Cheng, J. Bioorthogonal Oxime Ligation Mediated in Vivo Cancer Targeting. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (4), 2182–2186. <https://doi.org/10.1039/C5SC00063G>.
- (67) Lindley, H. A Study of the Kinetics of the Reaction between Thiol Compounds and Chloroacetamide. *Biochem. J.* **1960**, *74* (3), 577–584. <https://doi.org/10.1042/bj0740577>.
- (68) LINDLEY, H. The Reaction of Thiol Compounds and Chloroacetamide. 2. The Reaction between Chloroacetamide and Cysteine Peptides. *Biochem. J.* **1962**, *82* (3), 418–425. <https://doi.org/10.1042/bj0820418>.
- (69) Lindgren, J.; Eriksson Karlström, A. Intramolecular Thioether Crosslinking of Therapeutic Proteins to Increase Proteolytic Stability. *ChemBioChem* **2014**, *15* (14), 2132–2138. <https://doi.org/10.1002/cbic.201400002>.
- (70) Wang, J.; Yu, Y.; Xia, J. Short Peptide Tag for Covalent Protein Labeling Based on Coiled Coils. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (1), 178–187. <https://doi.org/10.1021/bc400498p>.
- (71) Rink, R.; Arkema-Meter, A.; Baudoin, I.; Post, E.; Kuipers, A.; Nelemans, S. A.; Akanbi, M. H. J.; Moll, G. N. To Protect Peptide Pharmaceuticals against Peptidases. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2010**, *61* (2), 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.02.010>.
- (72) Olszewska, A.; Pohl, R.; Brázdová, M.; Fojta, M.; Hocek, M. Chloroacetamide-Linked Nucleotides and DNA for Cross-Linking with Peptides and Proteins. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (9), 2089–2094. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00342>.
- (73) Bonnat, L.; Bar, L.; Gennaro, B.; Bonnet, H.; Jarjays, O.; Thomas, F.; Dejeu, J.; Defrancq, E.; Lavergne, T. Template-Mediated Stabilization of a DNA G-Quadruplex Formed in the HIV-1 Promoter and Comparative Binding Studies. *Chem. – Eur. J.* **2017**, *23* (23), 5602–5613. <https://doi.org/10.1002/chem.201700417>.
- (74) Staudinger, H.; Meyer, J. Über Neue Organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylderivate Und Phosphinimine. *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2* (1), 635–646. <https://doi.org/10.1002/hlca.19190020164>.
- (75) Saxon, E.; Bertozzi, C. R. Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science* **2000**, *287* (5460), 2007–2010. <https://doi.org/10.1126/science.287.5460.2007>.
- (76) Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R. A “Traceless” Staudinger Ligation for the Chemoselective Synthesis of Amide Bonds. *Org. Lett.* **2000**, *2* (14), 2141–2143. <https://doi.org/10.1021/ol006054v>.
- (77) Ścianowski, J.; Rafiński, Z.; Wojtczak, A. Syntheses and Reactions of New Optically Active Terpene Dialkyl Diselenides. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006* (14), 3216–3225. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200600044>.
- (78) Batesky, D. C.; Goldfogel, M. J.; Weix, D. J. Removal of Triphenylphosphine Oxide by Precipitation with Zinc Chloride in Polar Solvents. *J. Org. Chem.* **2017**, *82* (19), 9931–9936. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b00459>.
- (79) Merckx, R.; Rijkers, D. T. S.; Kemmink, J.; Liskamp, R. M. J. Chemoselective Coupling of Peptide Fragments Using the Staudinger Ligation. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (24), 4515–4518. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(03\)01014-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(03)01014-1).
- (80) Tam, A.; Raines, R. T. Protein Engineering with the Traceless Staudinger Ligation. *Methods Enzymol.* **2009**, *462*, 25–44. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)62002-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)62002-4).
- (81) Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. High-Yielding Staudinger Ligation of a Phosphinothioester and Azide To Form a Peptide. *Org. Lett.* **2001**, *3* (1), 9–12. <https://doi.org/10.1021/ol006739v>.
- (82) Weisbrod, S. H.; Baccaro, A.; Marx, A. Site-Specific DNA Labeling by Staudinger Ligation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2011**, *751*, 195–207. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-151-2_12.
- (83) Kitoun, C.; Fonvielle, M.; Arthur, M.; Etheve-Quelquejeu, M.; Iannazzo, L. Traceless Staudinger Ligation for Bioconjugation of RNA. *Curr. Protoc.* **2021**, *1* (2), e42. <https://doi.org/10.1002/cpz1.42>.
- (84) Cahen, P.; Luhmer, M.; Fontaine, C.; Morat, C.; Reisse, J.; Bartik, K. Study by ²³Na-NMR, ¹H-NMR, and Ultraviolet Spectroscopy of the Thermal Stability of an 11-Basepair Oligonucleotide. *Biophys. J.* **2000**, *78* (2), 1059–1069. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76664-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76664-1).

- (85) Sudalai, A.; Khenkin, A.; Neumann, R. Sodium Periodate Mediated Oxidative Transformations in Organic Synthesis. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (15), 4374–4394. <https://doi.org/10.1039/C5OB00238A>.
- (86) An, R.; Jia, Y.; Wan, B.; Zhang, Y.; Dong, P.; Li, J.; Liang, X. Non-Enzymatic Depurination of Nucleic Acids: Factors and Mechanisms. *PLoS ONE* **2014**, *9* (12), e115950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115950>.
- (87) Ghosh, A.; Bansal, M. A Glossary of DNA Structures from A to Z. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2003**, *59* (Pt 4), 620–626. <https://doi.org/10.1107/s0907444903003251>.
- (88) Mirkin, S. M. Discovery of Alternative DNA Structures: A Heroic Decade (1979-1989). *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **2008**, *13*, 1064–1071. <https://doi.org/10.2741/2744>.
- (89) Stephens, P. J. Circular Dichroism: Principles and Applications. Wiley-VCH: New York. 2000. Xxii + 878 Pp. \$195.00. ISBN: 0-471-33003-5. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (27), 8182–8182. <https://doi.org/10.1021/ja015338n>.
- (90) Rodger, A. Nucleic Acid Circular Dichroism. In *Encyclopedia of Biophysics*; Roberts, G. C. K., Ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2013; pp 1759–1761. https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6_632.
- (91) Baker, E. S.; Bowers, M. T. B-DNA Helix Stability in a Solvent-Free Environment. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18* (7), 1188–1195. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.03.001>.
- (92) D'Abramo, M.; Castellazzi, C. L.; Orozco, M.; Amadei, A. On the Nature of DNA Hyperchromic Effect. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (29), 8697–8704. <https://doi.org/10.1021/jp403369k>.
- (93) Borer, P. N.; Dengler, B.; Tinoco, I.; Uhlenbeck, O. C. Stability of Ribonucleic Acid Double-Stranded Helices. *J. Mol. Biol.* **1974**, *86* (4), 843–853. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(74\)90357-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90357-X).
- (94) Owczarzy, R. Melting Temperatures of Nucleic Acids: Discrepancies in Analysis. *Biophys. Chem.* **2005**, *117* (3), 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2005.05.006>.
- (95) Moreira, B. G.; You, Y.; Owczarzy, R. Cy3 and Cy5 Dyes Attached to Oligonucleotide Terminus Stabilize DNA Duplexes: Predictive Thermodynamic Model. *Biophys. Chem.* **2015**, *198*, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2015.01.001>.
- (96) Seidel, C. A. M.; Schulz, A.; Sauer, M. H. M. Nucleobase-Specific Quenching of Fluorescent Dyes. 1. Nucleobase One-Electron Redox Potentials and Their Correlation with Static and Dynamic Quenching Efficiencies. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (13), 5541–5553. <https://doi.org/10.1021/jp951507c>.
- (97) Chu, X.-Y.; Xu, Y.-Y.; Tong, X.-Y.; Wang, G.; Zhang, H.-Y. The Legend of ATP: From Origin of Life to Precision Medicine. *Metabolites* **2022**, *12* (5), 461. <https://doi.org/10.3390/metabo12050461>.
- (98) Galber, C.; Carissimi, S.; Baracca, A.; Giorgio, V. The ATP Synthase Deficiency in Human Diseases. *Life* **2021**, *11* (4), 325. <https://doi.org/10.3390/life11040325>.
- (99) Sassanfar, M.; Szostak, J. W. An RNA Motif That Binds ATP. *Nature* **1993**, *364* (6437), 550–553. <https://doi.org/10.1038/364550a0>.
- (100) Huizenga, D. E.; Szostak, J. W. A DNA Aptamer That Binds Adenosine and ATP. *Biochemistry* **1995**, *34* (2), 656–665. <https://doi.org/10.1021/bi00002a033>.
- (101) Debais, M.; Lelievre, A.; Smietana, M.; Müller, S. Splitting Aptamers and Nucleic Acid Enzymes for the Development of Advanced Biosensors. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48* (7), 3400–3422. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa132>.
- (102) Stojanovic, M. N.; de Prada, P.; Landry, D. W. Aptamer-Based Folding Fluorescent Sensor for Cocaine. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (21), 4928–4931. <https://doi.org/10.1021/ja0038171>.
- (103) Stojanovic, M. N.; de Prada, P.; Landry, D. W. Fluorescent Sensors Based on Aptamer Self-Assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (46), 11547–11548. <https://doi.org/10.1021/ja0022223>.
- (104) Gartner, Z. J.; Liu, D. R. The Generality of DNA-Templated Synthesis as a Basis for Evolving Non-Natural Small Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (28), 6961–6963. <https://doi.org/10.1021/ja015873n>.
- (105) Gorska, K.; Winssinger, N. Reactions Templated by Nucleic Acids: More Ways to Translate Oligonucleotide-Based Instructions into Emerging Function. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (27), 6820–6843. <https://doi.org/10.1002/anie.201208460>.
- (106) O'Reilly, R. K.; Turberfield, A. J.; Wilks, T. R. The Evolution of DNA-Templated Synthesis as a Tool for Materials Discovery. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (10), 2496–2509. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00280>.
- (107) Herkes, F. E.; Simmons, H. E. Mono- and Disubstituted Vinyltrialkylammonium Compounds. Synthesis and Stereochemistry. *J. Org. Chem.* **1973**, *38* (16), 2845–2851. <https://doi.org/10.1021/jo00956a025>.

- (108) Arens, J. F.; Bouman, J. G.; Koerts, D. H. The Chemistry of Acetylenic Ethers XV: The Reaction of Ethoxyacetylene with Aqueous Solutions of Tertiary Aliphatic Amines. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1955**, 74 (8), 1040–1044. <https://doi.org/10.1002/recl.19550740811>.
- (109) McCulloch, A. W.; McInnes, A. G. The Reaction of Propiolic Acid Esters with Tertiary Amines. Formation of Betaines. *Can. J. Chem.* **1974**, 52 (21), 3569–3576. <https://doi.org/10.1139/v74-534>.
- (110) Wettergren, J.; Minidis, A. B. E. Microwave-Assisted in Situ Deprotection and ω -Methoxylation of TMS-Protected Aryl Alkynes. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44 (41), 7611–7612. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2003.08.059>.
- (111) Siro, J. G.; Martín, J.; García-Navío, J. L.; Remuñán, M. J.; Vaquero, J. J. Easy Microwave Assisted Deprotection of N-Boc Derivatives. *Synlett* **1998**, 1998 (2), 147–148. <https://doi.org/10.1055/s-1998-1604>.
- (112) Lartia, R.; Bonnat, L.; Murat, P.; Defrancq, E. Preparation of Azido Containing Oligonucleotides Through Diazo Transfer Reaction. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2012**, 50 (1). <https://doi.org/10.1002/0471142700.nc0450s50>.
- (113) Khorobkov, I.; Gambartta, S.; Yap, G. P. A.; Budzelaar, P. H. M. Reversible Alkylation at the Pyridine Nitrogen in a α,α -Diimine Pyridine Ligand System. *Organometallics* **2002**, 21 (15), 3088–3090. <https://doi.org/10.1021/om020349q>.
- (114) Funt, L. D.; Novikov, M. S.; Khlebnikov, A. F. New Applications of Pyridinium Ylides toward Heterocyclic Synthesis. *Tetrahedron* **2020**, 76 (35), 131415. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2020.131415>.
- (115) Ahadi, S.; Kamranifard, T.; Armaghan, M.; Khavasi, H. R.; Bazgir, A. Domino Knoevenagel Condensation–Michael Addition–Cyclization for the Diastereoselective Synthesis of Dihydrofuro[2,3-d]Pyrimidines via Pyridinium Ylides in Water. *RSC Adv.* **2014**, 4 (14), 7296–7300. <https://doi.org/10.1039/C3RA45795H>.
- (116) Dutta, L.; Sharma, M.; Bhuyan, P. J. Regioisomeric Synthesis of Dihydrofuro[2,3-d]Pyrimidines in a Diastereoselective Manner Involving Nitrogen Ylides in One-Pot Three-Component Reaction. *Tetrahedron* **2016**, 72 (42), 6654–6660. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.08.084>.
- (117) Pesnot, T.; Gershater, M. C.; Edwards, M.; Ward, J. M.; Hailes, H. C. One-Pot Phosphate-Mediated Synthesis of Novel 1,3,5-Trisubstituted Pyridinium Salts: A New Family of S. Aureus Inhibitors. *Molecules* **2017**, 22 (4), 626. <https://doi.org/10.3390/molecules22040626>.
- (118) Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. Sequence-Selective Recognition of DNA by Strand Displacement with a Thymine-Substituted Polyamide. *Science* **1991**, 254 (5037), 1497–1500. <https://doi.org/10.1126/science.1962210>.
- (119) Egholm, M.; Buchardt, O.; Christensen, L.; Behrens, C.; Freier, S. M.; Driver, D. A.; Berg, R. H.; Kim, S. K.; Norden, B.; Nielsen, P. E. PNA Hybridizes to Complementary Oligonucleotides Obeying the Watson–Crick Hydrogen-Bonding Rules. *Nature* **1993**, 365 (6446), 566–568. <https://doi.org/10.1038/365566a0>.
- (120) Park, H.; Germini, A.; Sforza, S.; Corradini, R.; Marchelli, R.; Knoll, W. Kinetic and Affinity Analyses of Hybridization Reactions between Peptide Nucleic Acid Probes and DNA Targets Using Surface Plasmon Field-Enhanced Fluorescence Spectroscopy. *Biointerphases* **2006**, 1 (4), 113–122. <https://doi.org/10.1116/1.2365386>.
- (121) Brazil, R. Peptide Nucleic Acids Promise New Therapeutics and Gene Editing Tools. *ACS Cent. Sci.* **2023**, 9 (1), 3–6. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00016>.
- (122) Darfeuille, F.; Hansen, J. B.; Orum, H.; Di Primo, C.; Toulmé, J.-J. LNA/DNA Chimeric Oligomers Mimic RNA Aptamers Targeted to the TAR RNA Element of HIV-1. *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32 (10), 3101–3107. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh636>.
- (123) Förster, C.; Zydek, M.; Rothkegel, M.; Wu, Z.; Gallin, C.; Geßner, R.; Lisdat, F.; Fürste, J. P. Properties of an 'LNA'-Modified Ricin RNA Aptamer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, 419 (1), 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.127>.
- (124) Elle, I. C.; Karlsen, K. K.; Terp, M. G.; Larsen, N.; Nielsen, R.; Derbyshire, N.; Mandrup, S.; Ditzel, H. J.; Wengel, J. Selection of LNA-Containing DNA Aptamers against Recombinant Human CD73. *Mol. Biosyst.* **2015**, 11 (5), 1260–1270. <https://doi.org/10.1039/C5MB00045A>.
- (125) Oliveira, R.; Pinho, E.; Azevedo, N. F.; Almeida, C. Post-SELEX Modifications with Locked Nucleic Acids (LNA) of a SEA-Specific DNA Aptamer Assisted by in Silico Modelling. *Mol. Syst. Des. Eng.* **2024**, 9 (8), 847–855. <https://doi.org/10.1039/D4ME00043A>.
- (126) Pasternak, A.; Hernandez, F. J.; Rasmussen, L. M.; Vester, B.; Wengel, J. Improved Thrombin Binding Aptamer by Incorporation of a Single Unlocked Nucleic Acid Monomer. *Nucleic Acids Res.* **2011**, 39 (3), 1155–1164. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq823>.

- (127) Chen, Z.; Luo, H.; Gubu, A.; Yu, S.; Zhang, H.; Dai, H.; Zhang, Y.; Zhang, B.; Ma, Y.; Lu, A.; Zhang, G. Chemically Modified Aptamers for Improving Binding Affinity to the Target Proteins via Enhanced Non-Covalent Bonding. *Front. Cell Dev. Biol.* **2023**, *11*, 1091809. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1091809>.
- (128) FAULHAMMER, D.; ESCHGFÄLLER, B.; STARK, S.; BURGSTALLER, P.; ENGLBERGER, W.; ERFURTH, J.; KLEINJUNG, F.; RUPP, J.; VULCU, S. D.; SCHRÖDER, W.; VONHOFF, S.; NAWRATH, H.; GILLEN, C.; KLUSSMANN, S. Biostable Aptamers with Antagonistic Properties to the Neuropeptide Nociceptin/Orphanin FQ. *RNA* **2004**, *10* (3), 516–527. <https://doi.org/10.1261/rna.5186504>.
- (129) Olea, C.; Weidmann, J.; Dawson, P. E.; Joyce, G. F. An L-RNA Aptamer That Binds and Inhibits RNase. *Chem. Biol.* **2015**, *22* (11), 1437–1441. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.09.017>.
- (130) Ji, D.; Lyu, K.; Zhao, H.; Kwok, C. K. Circular L-RNA Aptamer Promotes Target Recognition and Controls Gene Activity. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49* (13), 7280–7291. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab593>.
- (131) 하상수. Pna Aptamer Able to Isolate a Metal. WO2012108675A2, August 16, 2012. <https://patents.google.com/patent/WO2012108675A2/en> (accessed 2024-09-17).
- (132) Wang, X.; Hu, Y.; Qu, F.; Khan, R. U. Multiple Modes of Capillary Electrophoresis Applied in Peptide Nucleic Acid Related Study. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1501*, 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.038>.
- (133) Lee, E. J.; Lim, H. K.; Cho, Y. S.; Hah, S. S. Peptide Nucleic Acids Are an Additional Class of Aptamers. *RSC Adv.* **2013**, *3* (17), 5828–5831. <https://doi.org/10.1039/C3RA40553B>.
- (134) Rodrigues, T.; Curti, F.; Leroux, Y. R.; Barras, A.; Pagneux, Q.; Happy, H.; Kleber, C.; Boukherroub, R.; Hasler, R.; Volpi, S.; Careri, M.; Corradini, R.; Szunerits, S.; Knoll, W. Discovery of a Peptide Nucleic Acid (PNA) Aptamer for Cardiac Troponin I: Substituting DNA with Neutral PNA Maintains Picomolar Affinity and Improves Performances for Electronic Sensing with Graphene Field-Effect Transistors (gFET). *Nano Today* **2023**, *50*, 101840. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2023.101840>.
- (135) Sivakumar, K.; Xie, F.; Cash, B. M.; Long, S.; Barnhill, H. N.; Wang, Q. A Fluorogenic 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction of 3-Azidocoumarins and Acetylenes. *Org. Lett.* **2004**, *6* (24), 4603–4606. <https://doi.org/10.1021/ol047955x>.
- (136) Sawa, M.; Hsu, T.-L.; Itoh, T.; Sugiyama, M.; Hanson, S. R.; Vogt, P. K.; Wong, C.-H. Glycoproteomic Probes for Fluorescent Imaging of Fucosylated Glycans *in Vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (33), 12371–12376. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605418103>.
- (137) Xie, F.; Sivakumar, K.; Zeng, Q.; Bruckman, M. A.; Hodges, B.; Wang, Q. A Fluorogenic ‘Click’ Reaction of Azidoanthracene Derivatives. *Tetrahedron* **2008**, *64* (13), 2906–2914. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.01.080>.
- (138) Qi, J.; Tung, C.-H. Development of Benzothiazole “Click-on” Fluorogenic Dyes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (1), 320–323. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.11.009>.
- (139) Droumaguet, C. L.; Wang, C.; Wang, Q. Fluorogenic Click Reaction. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1233–1239. <https://doi.org/10.1039/B901975H>.
- (140) Chen, Y.; Jiang, H.; Hao, T.; Zhang, N.; Li, M.; Wang, X.; Wang, X.; Wei, W.; Zhao, J. Fluorogenic Reactions in Chemical Biology: Seeing Chemistry in Cells. *Chem. Biomed. Imaging* **2023**, *1* (7), 590–619. <https://doi.org/10.1021/cbmi.3c00029>.
- (141) Bonte, S.; Ghinea, I.; Dinica, R.; Baussanne, I.; Demeunynck, M. Investigation of the Pyridinium Ylide—Alkyne Cycloaddition as a Fluorogenic Coupling Reaction. *Molecules* **2016**, *21* (3), 332. <https://doi.org/10.3390/molecules21030332>.
- (142) Cossu, J.; Thoreau, F.; Boturny, D. Multimeric RGD-Based Strategies for Selective Drug Delivery to Tumor Tissues. *Pharmaceutics* **2023**, *15* (2), 525. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020525>.

Chapitre 3

Exploration de modèles aptamères alternatifs : l'indolizine comme précurseur fluorescent

Dans ce dernier chapitre, nous allons brièvement décrire les travaux effectués en vue de concevoir des modèles aptamères alternatifs éventuellement capables de contourner l'obstacle rencontré avec l'approche **AptaSplit-Indo**. Rappelons que la méthodologie initiale, basée sur la formation stabilisante d'indolizine via une CDYPA, s'est avérée inadéquate en raison de l'incompatibilité de la réaction et des acides nucléiques. Afin de préserver l'essence du projet de base, nous souhaitons conserver l'hétérocycle comme élément central du design. Pour ce faire, l'indolizine sera amenée à agir comme un précurseur fluorescent subissant une transformation lors de la formation du complexe ternaire (Figure 63), avec, nous l'espérons, un décalage significatif de la longueur d'onde d'émission du produit fluorescent généré.

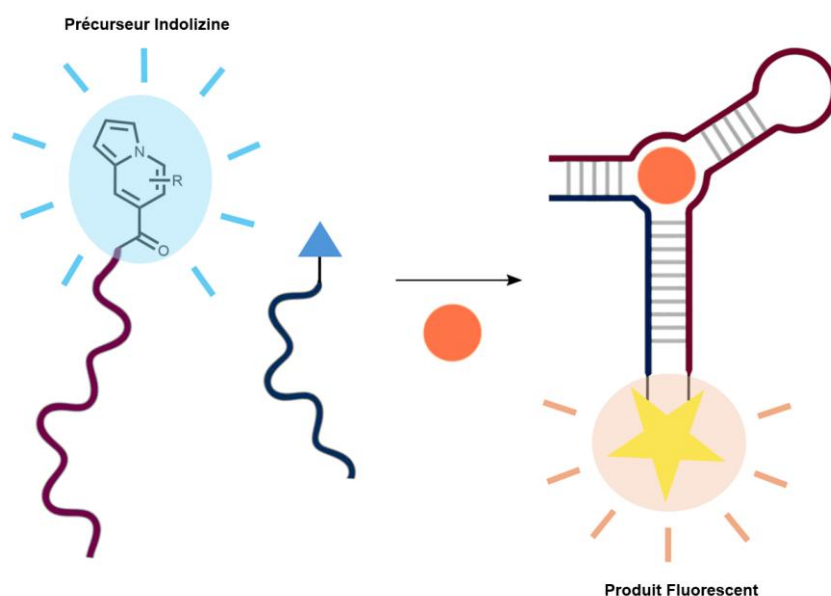


Figure 63 : Modèle aptamère alternatif: l'indolizine en tant que réactif fluorescent

I. Le modèle des cycl[3.2.2]azines

L'examen de la littérature nous a conduit à considérer trois différentes approches. La première est basée sur la formation d'une cycl[3.2.2]azine.

Décrites pour la première fois en 1958 par Boekelheide¹, les cyclazines sont constituées d'un noyau tricyclique caractérisé par un atome d'azote central (Figure 64). Dans la nature, leur existence est rare. Seuls deux exemples ont été rapportés jusqu'à présent : la structure hydrogénée est observée au sein de la vlasoulamine A², un dimère de lactone sesquiterpénique à activité neuroprotectrice, ainsi que dans les myrmicarines, alcaloïdes trouvés dans la sécrétion des glandes à venin de la fourmi africaine *Myrmecaria opaciventris*.³ Cela dit, certains dérivés synthétiques de cycl[3.2.2]azines tels que le NNC 45-0095 se sont révélés être d'excellents agonistes non stéroïdiens pour le récepteur des œstrogènes.⁴

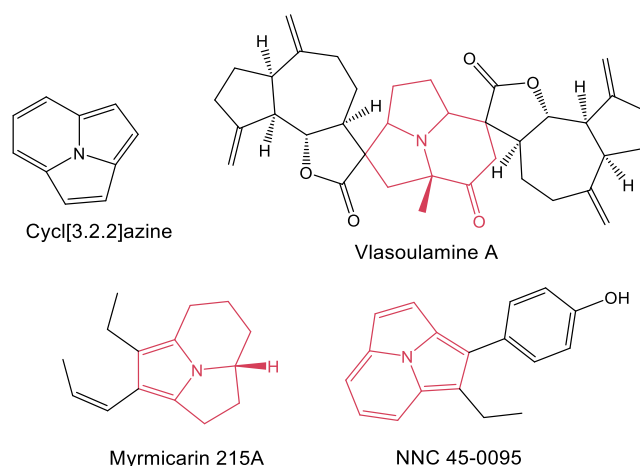


Figure 64 : Structures de la cycl[3.2.2]azine et de quelques dérivés

De plus, les cyclazines ont également suscité un intérêt pour leurs propriétés optiques. Comme l'indolizine non substituée, elles émettent dans la région bleue avec une efficacité quantique élevée.⁵ Toutefois, les propriétés émissives peuvent être altérées par l'introduction de divers groupes fonctionnels (Figure 65) : certains dérivés cyclaziniques présentent une fluorescence verte, jaune⁶ et même rouge.⁷

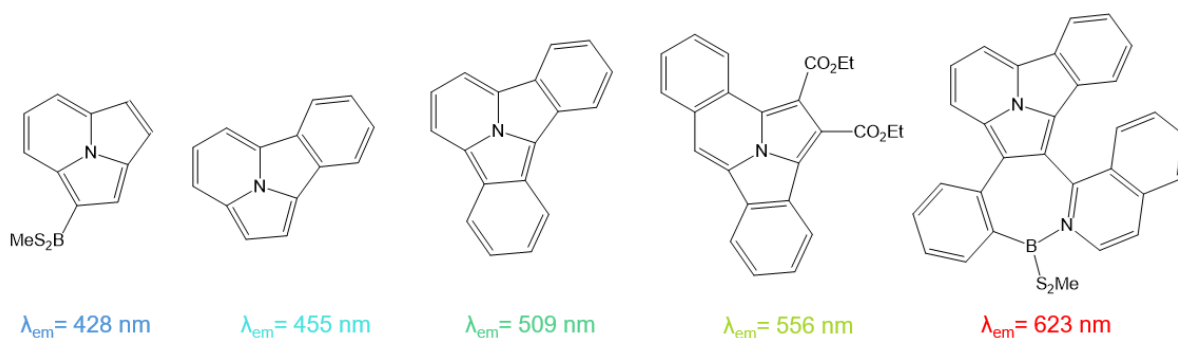


Figure 65 : Structures et longueurs d'onde d'émission d'une variété de cycl[3.2.2]azines

La méthode la plus répandue pour la préparation des cycl[3.2.2]azines est la cycloaddition [8+2] d'indolizines avec des acétylènes tels que le DMAD ou des alcynes activés non symétriques (Schéma 122). Introduite il y a 60 ans par Boekelheide,⁸ la réaction nécessite généralement la présence de catalyseurs métalliques coûteux et toxiques comme le palladium, ou l'ajout d'additifs comme le DDQ en tant qu'oxydants.⁹

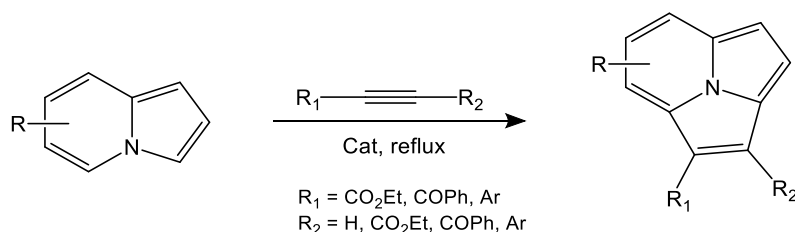


Schéma 122 : Cycloaddition [8+2] d'indolizine et d'alcynes activés générant une cycl[3.2.2]azine

De plus, la cycloaddition décrite ci-dessus s'effectue à reflux dans des solvants organiques tels que le toluène, le THF ou le nitrobenzène.¹⁰ Ces conditions ne sont évidemment pas compatibles avec l'utilisation d'ADN. Fort heureusement, les travaux de Gogoi *et al.* publiés en 2012 ont retenu notre attention.¹¹ La méthodologie plus verte décrite par le groupe se distingue par l'utilisation d'un milieu aqueux. En effet, l'étude rapporte la formation de l'hétérocycle tricyclique selon une réaction à 3 composants, sans métal et dans l'eau, impliquant la cycloaddition du DMAD avec une indolizine de Tschitschibabin générée *in situ* à partir d'une 2-alkylpyridine et d'un composé α -bromo carbonyle en présence de carbonate de potassium (Schéma 123).

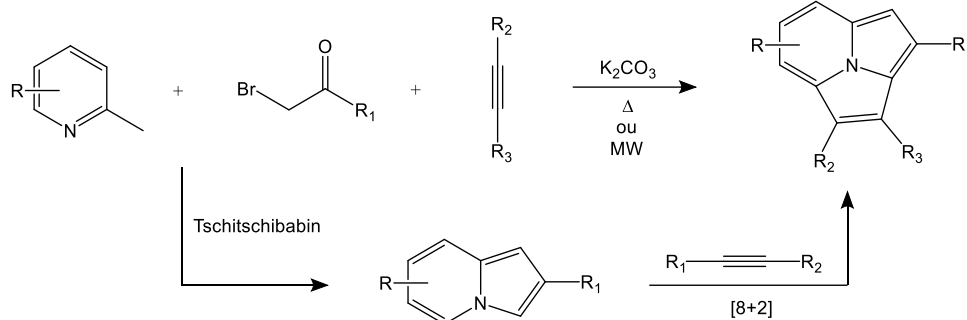


Schéma 123 : Réaction à 3 composants conduisant à la formation de cycl[3.2.2]azine

La RMC est réalisée soit par chauffage thermique (100°C) pendant 1 heure, soit par irradiation aux micro-ondes pendant quelques minutes. L'eau est non seulement compatible avec ce protocole, mais elle représente aussi la meilleure option. À titre d'exemple, la réaction de la 2-picoline, du phénylbromure et du DMAD dans l'eau bouillante a fourni 70% de produit contre 0, 2 et 8% de rendements dans le toluène, l'acétonitrile et l'éthanol respectivement.

Puisque la réaction implique la formation intermédiaire du produit de Tschitschibabin, il est raisonnable de supposer que la cycloaddition se déroulera également dans les conditions décrites (K_2CO_3 , H_2O , 100°C) en utilisant directement une indolizine comme substrat. Ceci a inspiré le modèle **AptaSplit-Cyclazine** représenté sur la Schéma 124. Dans cette preuve de concept simplifiée, l'extrémité du brin **ODN1** est modifiée par une indolizine tandis que la séquence complémentaire porte l'acétylène. La réaction des deux conjugués dans un tampon basique devrait conduire à la formation de l'adduit cycl[3.2.2]azine **140**. Même si la conversion nécessite une température élevée, les temps de réaction courts décrits dans la publication devraient empêcher la dégradation de l'ADN. La cycloaddition [8+2] sous irradiation aux micro-ondes sera par ailleurs favorisée pour accélérer davantage la transformation. Au passage, le chauffage du milieu réactionnel à 100°C signifie que la cycloaddition entrerait en compétition avec la dénaturation de l'ADN et donc avec l'hybridation des brins complémentaires, mais cette considération a été mise de côté pour l'instant.

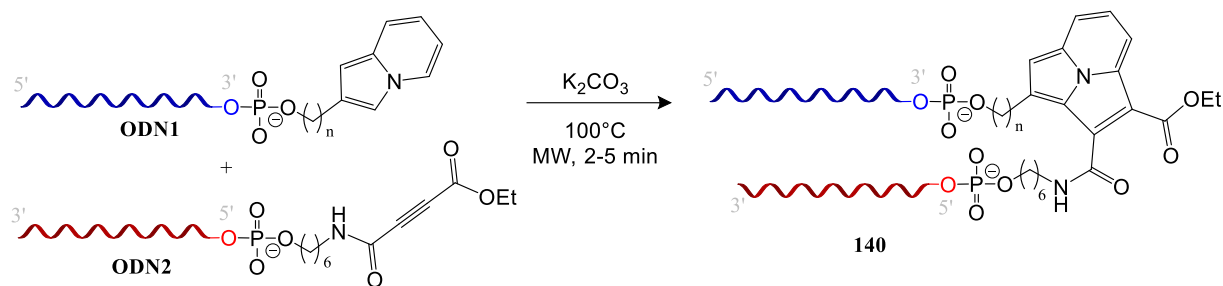


Schéma 124 : Modèle *Aptasplit-Cyclazine* simplifiée

L'approche alternative illustrée ci-dessus nécessite la synthèse de nouveaux précurseurs : en effet, la cycloaddition fait appel à des indolizines non substituées en position 3. Par conséquent, nos composés précédents **81a-i** ne peuvent pas être utilisés à cette fin. La préparation des nouveaux précurseurs de la cycloaddition [8+2] est détaillée ci-après.

A. Synthèse des précurseurs libres de la cycloaddition [8+2]

Présentée dans le premier chapitre, la réaction de Tschitschibabin est sans doute la méthodologie la plus pratique pour la synthèse d'indolizines 2-substituées. Simple, associée à de hauts rendements et s'effectuant en conditions douces, elle implique des réactifs commerciaux ou facilement modifiables. Sans surprise, nous avons emprunté cette voie pour la synthèse de nos nouveaux précurseurs indoliziniques.

Pour assurer la future conjugaison de notre hétérocycle à l'ADN, nous devons introduire une chaîne fonctionnalisée sur notre échafaudage. Synthétiquement parlant, l'ajout d'un azoture est la stratégie la plus simple. La préparation de l'indolizine **144**, réservée à une CuAAC ultérieure, est décrite dans le Schéma 125. La voie de synthèse débute par la saponification du 4-acétylbenzoate d'éthyle. L'acide carboxylique correspondant est ensuite utilisé pour un couplage DCC à la 3-azido-1-propanamine. L'amide **142** résultant est isolé avec un rendement de 60% puis bromé avec du *N*-bromosuccinimide en présence d'une quantité équimolaire de TMSOTf. Le produit **143**, obtenu avec un bon rendement (92%), est ensuite mis en réaction avec la 2-picoline dans de l'acétone à reflux pendant 18 heures. Après quaternisation, le sel intermédiaire est filtré puis dilué avec un excès de carbonate de potassium dans de l'eau pour générer l'indolizine **144** souhaitée avec 52% de rendement.

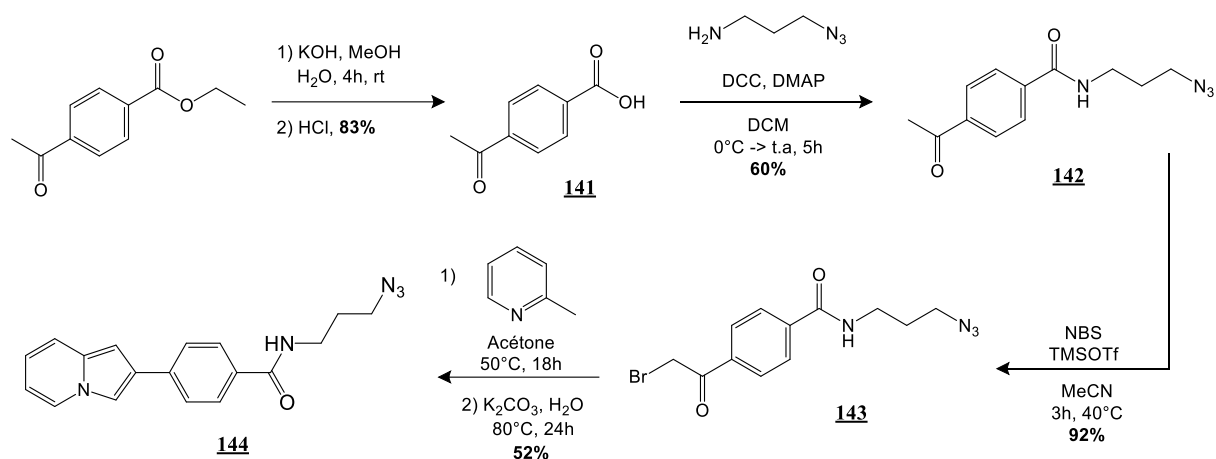


Schéma 125 : Synthèse de l'indolizine **144**

Craignant que la cycloaddition thermique de l'azide et de l'acétylène puisse entrer en compétition avec la formation de la cyclazine, nous avons également décidé d'introduire une chaîne oxyamine protégée dans l'indolizine comme alternative. Initialement, la position 2 était de nouveau visée comme point d'ancrage. Cependant, les difficultés rencontrées au cours des synthèses représentées dans le Schéma 126 nous ont conduit à envisager une autre stratégie.

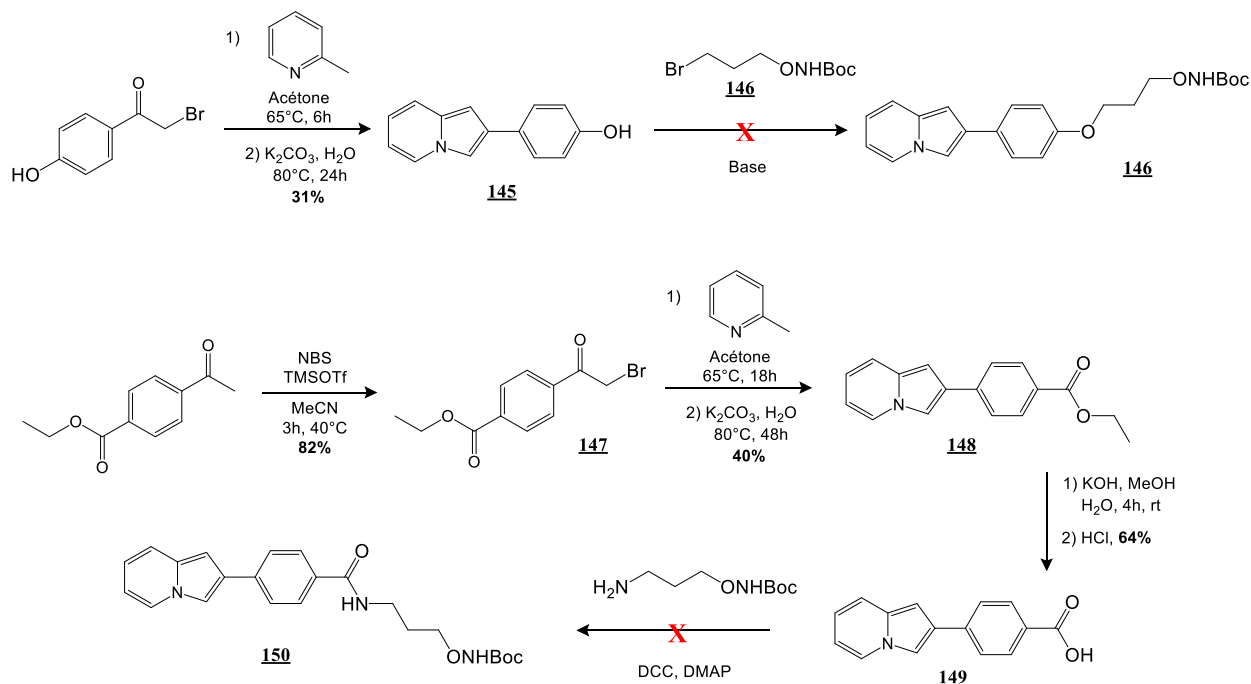


Schéma 126 : Tentatives de synthèse des indolizines oxyamines protégées **146** et **150**

En ce qui concerne l'indolizine cible **146**, conçue pour nécessiter le moins d'étapes de synthèse possible, la substitution finale entre l'alcool **146** et le *tert*-butyl (3-bromopropoxy)carbamate **147** a continuellement échoué. Plusieurs bases (K_2CO_3 , CS_2CO_3 , NEt_3 , DIPEA, DBU, NaH) et solvants (DMF, acétone, THF) ont été testés sans succès. Quant

à l'indolizine **150**, c'est le couplage amide entre l'acide carboxylique **149** et le *tert*-butyl (3-aminopropoxy)carbamate qui n'a pas engendré le produit désiré.

Pour contourner cet obstacle, la position 7 a été choisie comme nouveau point d'ancrage (Schéma 127) : cela permet d'introduire l'oxyamine protégée sur le fragment pyridine en début de synthèse. Pour ce faire, l'acide 2-méthylisonicotinique est couplé au linker amine. Le meilleur mélange de réactifs s'est avéré être HBTU/HOBt en présence de DIPEA. Bien que le rendement isolé en produit **151** reste faible (20%), la réaction impliquant le DCC génère exclusivement l'adduit *o*-acylisourée de l'acide avec le carbodiimide tandis que le DMTMM n'a provoqué aucune évolution. Par ailleurs, l'utilisation de chlorure d'oxalyle et de pentachlorure de phosphore comme agents de chloration n'a pas fonctionné non plus. L'intermédiaire amide réagit ensuite avec la 2-bromoacétophénone selon une réaction de Tschitschibabin pour former l'indolizine correspondante **152** avec un rendement de 42%.

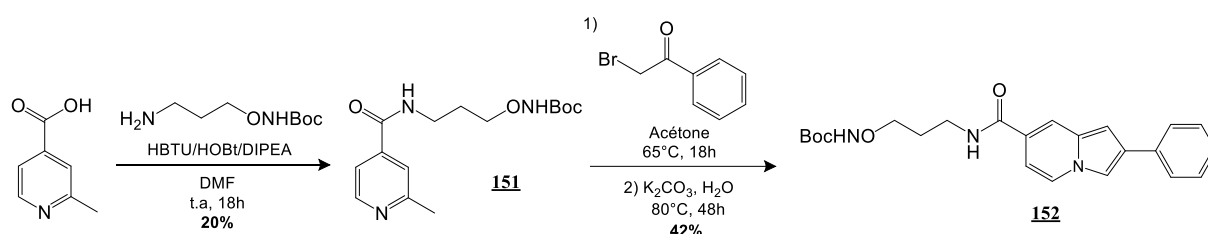


Schéma 127 : Synthèse de l'indolizine **152**

Avant d'assembler le modèle ADN simplifié, il est nécessaire d'évaluer la faisabilité de la cycloaddition [8+2] à l'aide de nos précurseurs libres. Pour éviter la formation de régioisomères, l'acétylène amide **153** symétrique est préparé à la place de l'ester monocarboxylate représenté dans le Schéma 124. Le *N*¹,*N*⁴-dihexylbut-2-ynediamide est obtenu en ajoutant un excès de *N*-hexylamine à une suspension d'acide acétylènedicarboxylique en présence de DMTMM.BF₄ comme agent de couplage (Schéma 128). Le faible rendement de la réaction (11%) peut encore une fois s'expliquer par une addition de Michael compétitive.

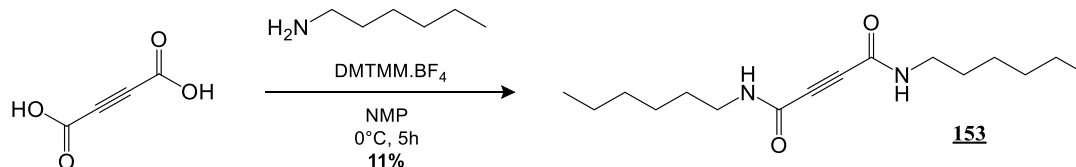


Schéma 128 : Synthèse de *N*¹,*N*⁴-dihexylbut-2-ynediamide **153**

B. La cycloaddition [8+2] d'indolizines et d'acétylènes mise à l'épreuve

Munis de nos nouveaux précurseurs, nous avons exploré la formation de la cycl[3.2.2]azine dans l'eau. Notre premier test a fait appel à l'indolizine **144** porteuse d'un bras azoture. Des

quantités équimolaires de cette dernière et de l'alcyne **153** ainsi qu'un excès de carbonate de potassium (2 équiv.) ont été agités à 100°C et pendant 24 heures en milieu aqueux (Schéma 129). Cela a conduit à la formation d'un mélange complexe de produits difficile à interpréter par RMN. Une tentative de chromatographie sur colonne a été réalisée, mais le composé souhaité n'a pas été isolé. L'analyse en spectrométrie de masse du brut a confirmé que le tricycle n'a pas été formé. Les sous-produits générés ont été attribués aux éventuelles réactions entre l'azoture et l'alcyne.

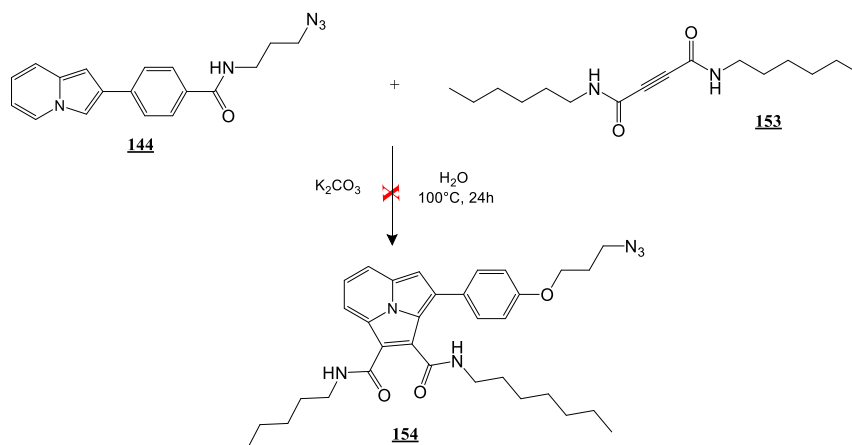


Schéma 129 : Tentative de cycloaddition [8+2] de l'indolizine **144** et l'acétylène **153**

La cycloaddition dans l'eau avec les dérivés du propiolamide n'a pas été décrite dans la littérature. Soupçonnant le fait qu'ils seraient moyennement ou peu réactifs, nous avons remplacé le précurseur **153** par le DMAD, mais cette substitution n'a pas résolu le problème : la cyclazine correspondante n'a pas été générée.

Afin d'éviter tout risque de cycloaddition de Huisgen compétitive, la réaction de l'indolizine **152** avec le DMAD a ensuite été examinée (Schéma 130). Cette fois-ci, aucune conversion n'a été observée : le profil CCM n'a pas évolué après 24 heures, confirmant que les produits formés précédemment étaient dus à la présence du linker azoture.

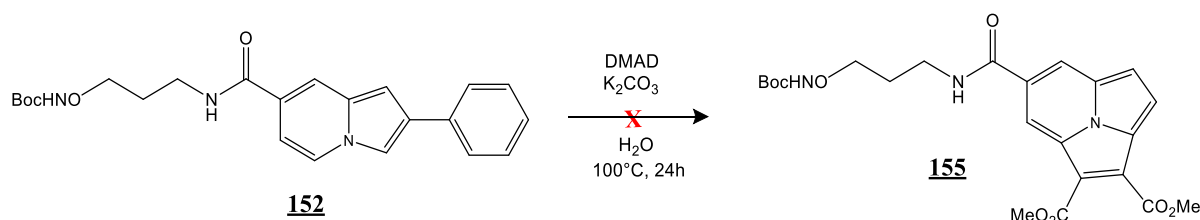


Schéma 130 : Tentative de cycloaddition [8+2] de l'indolizine **152** et le DMAD.

Ce manque de réactivité pourrait être dû au fait que le mécanisme proposé par Gogoi et ses collègues n'est pas entièrement correct : le groupe a postulé que la réaction procède par la formation d'une indolizine intermédiaire, mais ce n'est peut-être pas le cas, ou du moins la réaction pourrait requérir la présence des trois composants initiaux en solution. Par mesure

de précaution, une vérification de la réaction décrite dans la publication a été réalisée (Schéma 131).

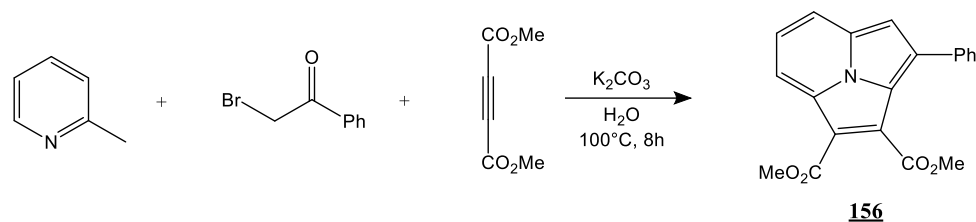


Schéma 131 : 3-RMC pour la synthèse de cycl[3.2.2.]azine

La 2-picoline, le bromure de phénacyle, le carbonate de potassium et le DMAD ont été agités dans de l'eau à reflux pendant 8 heures. En utilisant les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus, les auteurs ont rapporté un rendement de 84% en cycl[3.2.2.]azine **156**. Cependant, nous avons de notre côté constaté que ce résultat n'était pas reproductible. Les composants du mélange réactionnel apparaissant sur la plaque CCM ont tous été soigneusement séparés. Les fractions de purification récoltées ont ensuite été analysées par RMN et spectroscopie de masse mais le produit désiré n'a pas été trouvé, suggérant une nouvelle fois que la cyclazine n'est pas formée, même en appliquant la méthodologie 3-RMC. Lorsque la réaction a été tentée par irradiation aux micro-ondes (2 min, 100 °C, 180 W), nous n'avons pas pu isoler ou détecter la molécule **156**. Cela dit, un composé de masse 305 Da a été trouvé par ESI, ce qui pourrait éventuellement correspondre au produit hydrolysé.

Compte tenu des résultats décevants et de la contrainte de temps, une exploration plus approfondie de la cycloaddition [8+2] et du modèle **AptaSplit-Cyclazine** a été abandonnée pour se tourner vers d'autres approches potentielles.

II. Le modèle des indolizines squaraines

Une autre façon d'exploiter les indolizines comme précurseur réside dans leur réaction avec l'acide squarique. En effet, l'hétérocycle peut être converti en squaraine.

L'acide squarique, rapporté pour la première fois en 1959 par le groupe de Cohen¹², est un cycle rigide à quatre chaînons caractérisé par une aromaticité déficiente en électrons. Il peut donc facilement subir une condensation avec des molécules électroniquement riches pour former des dérivés portant le nom de squaraines dont la résonance est stabilisée par une structure zwitterionique (Figure 66). Cette classe de colorants planaires a été décrite pour la première fois par Treibs et Jacobs en 1965 après avoir fait réagir l'acide squarique avec le pyrrole.¹³ Grâce à leurs propriétés photoélectriques uniques, les composés squarainiques ont

trouvé diverses applications dans les domaines de la photoconductivité¹⁴, des cellules photovoltaïques¹⁵ et du stockage de données.¹⁶

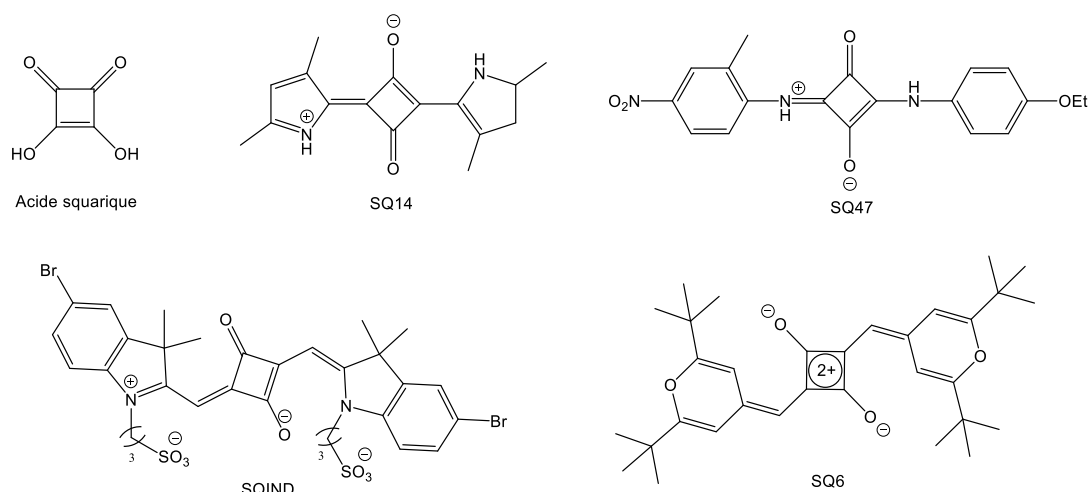


Figure 66 : Structures de l'acide squarique et quelques dérivés squaraines

De plus, les squaraines présentent une forte bande d'absorption et d'émission dans le proche infrarouge (noté NIR pour Near InfraRed). Dans cette gamme de longueurs d'onde (700-1500 nm), les phénomènes de diffusion ainsi que l'absorption et l'autofluorescence des tissus biologiques sont minimes. Cela signifie que la lumière NIR pénètre plus efficacement dans les tissus que la lumière visible, permettant ainsi l'étude des structures cellulaires plus profondes avec un rapport bruit/signal inférieur. Les colorants squaraines ont donc trouvé leur utilité comme outils thérapeutiques pour l'imagerie *in vivo*.¹⁷⁻¹⁹

Malgré leurs absorptivités molaires et leurs rendements quantiques élevés, les squaraines sont souvent caractérisés par des faibles décalages de Stokes (10–30 nm). Cela limite leur utilisation par effets d'auto-extinction et d'interférence avec la source d'excitation, ce qui diminue la sensibilité de détection. C'est notamment le cas pour les squaraines à base d'indole telles que la molécule SQIND représentée ci-dessus ($\Delta = 15$ nm).²⁰

Pour remédier à cela, McNamara *et al.* ont remplacé en 2017 les groupements indoles par des indolizines (Figure 67). En effet, ces dernières sont plus riches en électrons en raison de leur système π entièrement conjugué. Il a été postulé que l'augmentation de la densité électronique et de l'encombrement stérique conduirait à une différence entre les bandes d'absorption et d'émission plus significative.

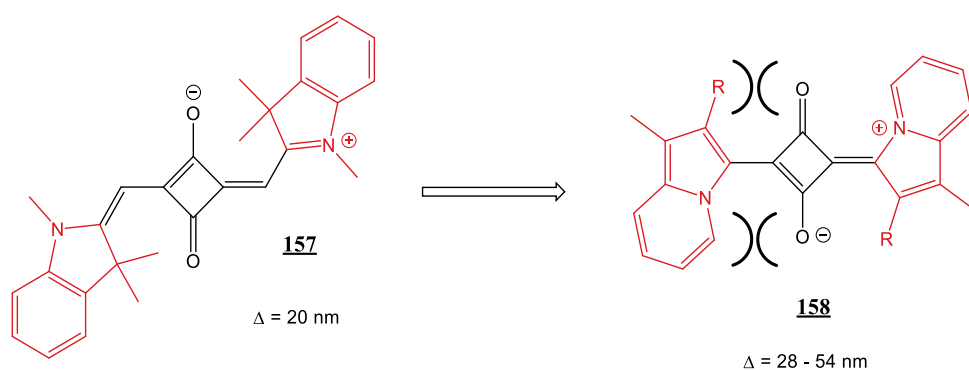


Figure 67 : Substitution du motif indole en indolizines pour une nouvelle classe de colorants squarainiques

La prévision s'est avérée correcte : cet échange a conduit à une augmentation du décalage de Stokes pouvant atteindre 30 nm en fonction des substituants. La squaraine **158** a été obtenue en chauffant un équivalent d'acide squarique en présence de deux équivalents d'indolizine, générant l'isomère *trans* avec de bons rendements (50 à 80%). L'équipe de McNamara a effectué la condensation en solvants organiques (butanol/toluène), toutefois les travaux de Meador *et al.* publiés en 2020 ont révélé qu'un ajout d'eau dans le milieu réactionnel entraînait une augmentation du rendement dans le méthanol.²¹ Cela a inspiré le modèle **AptaSplit-Squaraine** simplifié, illustré dans la Figure 68.

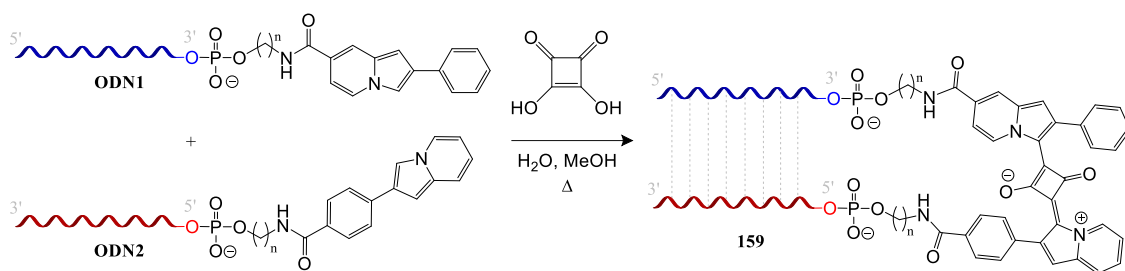


Figure 68 : Modèle AptaSplit-Squaraine simplifié

Conceptuellement, la squaraine formée est asymétrique : les deux séquences **ODN1** et **ODN2** sont modifiées à leurs extrémités par des indolizines orientées dans des directions opposées de telle sorte que l'hybridation des brins complémentaires puisse conduire à la formation majoritaire de l'adduit *trans* mixte par rapport à la condensation entre deux brins identiques. Bien que la réaction décrite dans la littérature soit réalisée à 100°C (et plus), nous espérons optimiser la condensation en condition aqueuse de manière à ce qu'elle se produise à une température plus basse compatible avec une étape d'annelage antérieure.

En guise de test préliminaire, la formation d'une indolizine squaraine symétrique a d'abord été tentée en utilisant le composé **152** synthétisé précédemment et l'acide squarique (2/1 equiv.) dans du méthanol bouillant pendant 6 heures (Schéma 132), à priori sans succès. En effet, la faible quantité de solide vert foncé isolée après traitement dans l'éther diéthylique a été analysée par spectroscopies RMN et ESI et le produit désiré n'a pas été détecté.

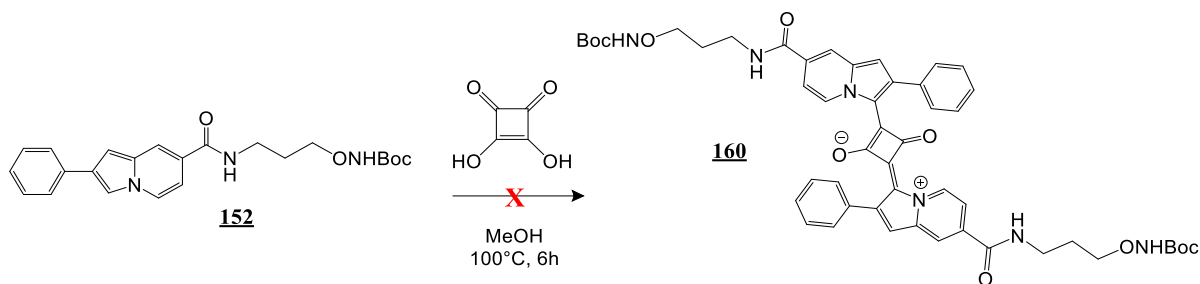


Schéma 132 : Condensation de l'indolizine **152** avec l'acide squarique

Soupçonnant que la présence d'une substitution en C7 pourrait affecter la réactivité, nous avons décidé d'étudier la faisabilité de la condensation en utilisant la 2-phénylindolizine **161** (Schéma 133). Les substrats ont été chauffés à reflux dans un mélange 1/1 de toluène/butanol pendant la nuit. Cette fois-ci, la formation de la squaraine correspondante **163** a été confirmée par spectrométrie de masse, bien que le rendement isolé après chromatographie sur colonne reste faible (14%). Par ailleurs, la purification et la caractérisation spectrale RMN du produit ont été rendues difficiles en raison d'une faible solubilité du produit.

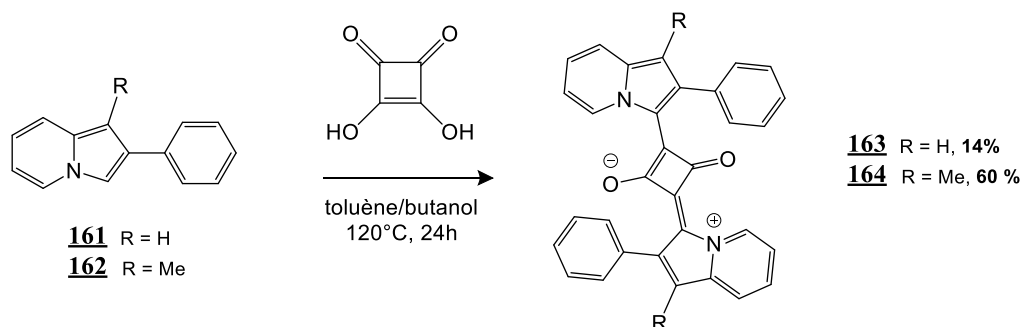


Schéma 133 : Synthèses des indolizines squaraines **163** et **164**

Les travaux de McNamara et Meador impliquent un méthyle en position 1 des donneurs indoliziniques. Leur utilisation a conduit à des transformations plus efficaces. En supposant que cette meilleure réactivité est due à une densité électronique accrue apportée par le groupement supplémentaire, la 1-méthyl-2-phénylindolizine **162** a été préparée. Effectivement, sa condensation avec l'acide squarique a fourni un rendement nettement supérieur (60%). La substitution en C1 semble donc être cruciale. Cette position peut dès lors servir de point d'ancrage au linker oxyamine.

Mais avant de modifier le noyau indolizine, la faisabilité de la réaction dans l'eau a été évaluée. Pour ce faire, le composé **162** et l'acide squarique ont été mis en réaction dans un mélange H₂O/MeOH (2/1) à 100°C avec suivi ESI. Après 48 heures, la squaraine correspondante ne s'est toujours pas formée. L'augmentation de la température à 120°C pendant 3 jours supplémentaires n'a pas activé la conversion. De toute évidence, la transformation en milieu majoritairement aqueux n'est pas possible, malgré le fait qu'une quantité catalytique d'eau

améliore les rendements de la condensation.²² Cette réactivité bloquée peut être expliquée par le mécanisme de condensation suggéré par Sprenger et Ziegenbein illustré dans le Schéma 134.²³ Il est généralement admis que l'acide squarique est d'abord activé par l'alcool pour former un éther d'énol avec perte d'une molécule d'eau, suivie par l'attaque nucléophile du composé aromatique sur la nouvelle position électrophile. L'intermédiaire arylé libère un alcoolate durant ce processus, après quoi une seconde molécule aromatique attaque le carbonyle déficient en électrons. Après déshydratation, la squaraine est obtenue. En général, l'eau est éliminée du système par distillation azéotropique afin de faire avancer la réaction. Nous comprenons alors qu'un excès d'eau dans le milieu réactionnel pourrait être contre-productif en poussant l'équilibre de la réaction vers l'acide squarique.

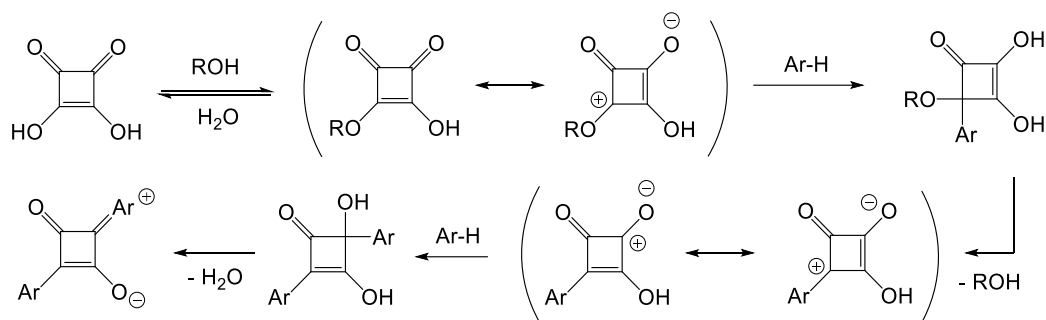


Schéma 134 : Mécanisme de la réaction proposé par Sprenger

En raison de cette incompatibilité avec l'eau, et donc l'ADN, le modèle **AptaSplit-Squaraine** a également été mis de côté sans exploration plus approfondie au profit d'une troisième voie alternative.

III. Le modèle basé sur la dimérisation oxydative d'indolizines

A. Les 3,3-biindolizines comme source d'inspiration

La dernière idée envisagée pour construire un nouveau modèle aptamère s'inspire de la dimérisation oxydative des indolizines.

Comme établi dans la section précédente, les indolizines peuvent réagir avec des électrophiles en position 3. En 1981, alors qu'ils étudiaient la réactivité de l'hétérocycle avec des oléfines pauvres en électrons, le groupe de Kakehi a isolé un produit inattendu en présence d'agent déshydrogénant : un dimère d'indolizine (Schéma 135).²⁴ Depuis lors, les 3,3'-biindolizines ont suscité un intérêt en tant que matériaux rédox-actifs luminescents^{25,26} ou ligands chiraux pour les synthèses énantiosélectives.^{27,28}

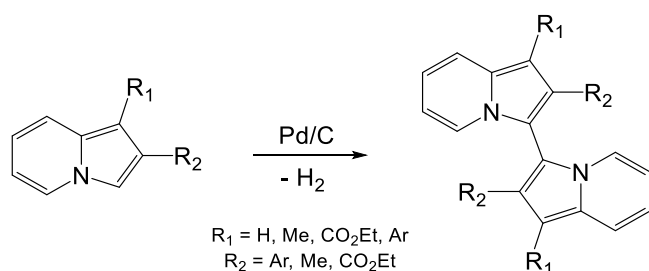


Schéma 135 : Dimérisation d'indolizines par déshydrogénation

Leur synthèse à partir des monomères correspondants nécessite généralement des catalyseurs métalliques tels que le Pd/C,²⁴ Pd(OAc)₂,²⁹ Pt/C,³⁰ K₃[Fe(CN)₆]³¹ ou Fe(III)/O₂,³² et peut également se produire électrochimiquement avec un électrolyte support à base d'Et₄NClO₄.³³ En 2013, Mamedov *et al.* ont révélé que [I₂-NaOAc] était un système binaire efficace pour la dimérisation oxydative des indolizines sans métal.³⁴ En effet, l'iode moléculaire peu coûteux (seul ou associé à l'acétate de sodium) a permis la formation de 3,3'-biindolizines en conditions douces. L'avantage de cette stratégie réside dans le fait que la réaction se produit à température ambiante dans le DCM et non dans des solvants à reflux. Une autre originalité apportée par la méthode est qu'elle permet la dimérisation d'indolizines portant des groupements accepteurs d'électrons tels qu'un fragment quinoxalin-3-yle ou ester, alors que les méthodologies précédentes ne fournissaient généralement des rendements élevés que pour les substrats contenant des substituants donneurs d'électrons. On note qu'à notre connaissance, le cycle pyridine n'a jamais été substitué durant les dimérisations 3,3' décrites dans la littérature.

Le modèle simplifié **AptaSplit-DimerI₂** inspiré par ce protocole est représenté ci-dessous. La réaction illustrée dans la Figure 69 est une pseudo-dimérisation puisque les biindolizines générées sont asymétriques : encore une fois, les précurseurs sont ancrés à l'ADN sur des positions différentes pour permettre l'appariement des bases complémentaires. Comme la transformation ne nécessite pas de chauffage, l'hybridation du duplex **ODN1/ODN2** est présumée possible. Cette fois-ci, notre principale préoccupation réside dans la transition de la réaction de dimérisation d'un milieu organique à un tampon aqueux.

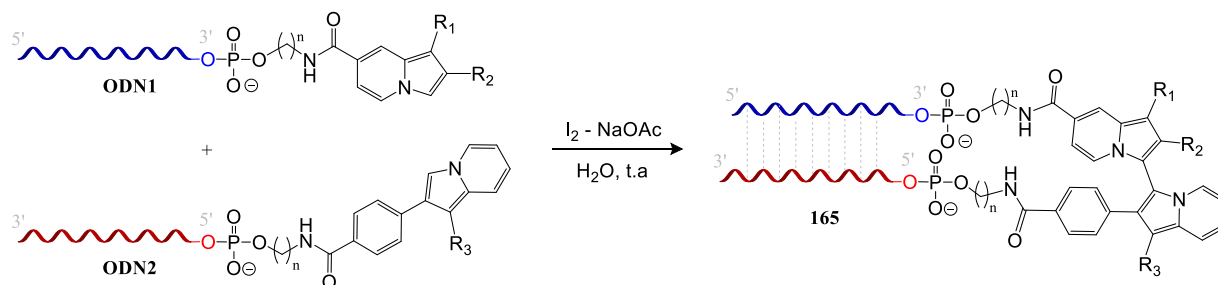


Figure 69 : Modèle simplifié *AptaSplit-DimerI₂*

B. Synthèses et dimérisations de précurseurs indoliziniques

Afin d'exploiter nos molécules précédemment synthétisées, la dimérisation a d'abord été tentée avec le composé **152**, non substitué en position 1 et portant un groupement donneur en C2 contrairement aux substrats utilisés par Mamedov et ses collègues. Comme le montre le Schéma 136, l'indolizine a été agitée dans du DCM en présence d'un léger excès de I₂-NaOAc (1,3 equiv.) pendant 24 heures et à température ambiante. Une espèce jaune moins polaire est apparue sur la plaque CCM du milieu réactionnel, cependant son analyse spectrométrique après chromatographie sur colonne a révélé qu'il s'agissait d'un adduit du réactif avec le diiode (m/z = 663) et non pas du dimère souhaité.

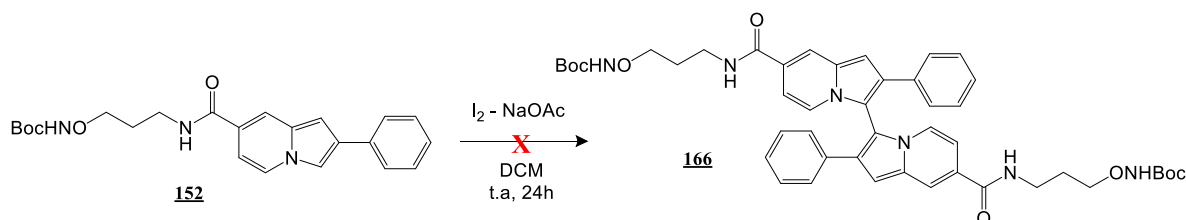


Schéma 136 : Tentative de dimérisation de l'indolizine **152**

En supposant que la présence d'un groupement électro-attracteur en position 2 soit nécessaire pour permettre la dimérisation médiée par l'iode grâce à une augmentation du potentiel d'oxydation de l'espèce, l'indolizine **168** a été synthétisée selon le chemin réactionnel représenté dans le Schéma 137. Elle porte une chaîne propylamide en position 1 censée imiter la longueur du linker de conjugaison oxyamine. La synthèse ne requiert que deux courtes étapes : tout d'abord, la propylamine est couplée à l'acide 2-(pyridin-2-yl)acétique en utilisant l'HATU comme agent de couplage puisque, encore une fois, la réaction avec le DCC a conduit à la formation d'une acylisourée au lieu de l'amide. Ensuite, l'intermédiaire **167** est mis en réaction avec le bromopyruvate d'éthyle dans de l'acétone à reflux pour fournir l'indolizine **168** avec un modeste rendement de 22% selon une adaptation du protocole publié par Bragg et Wibberly en 1963 décrivant la préparation d'indolizines 1,2-substituées à partir de 2-pyridylacétate et de composés α-halogéno-carbonyl.³⁵

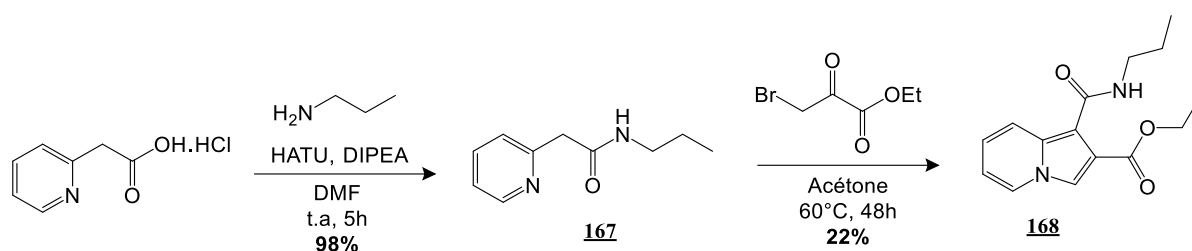
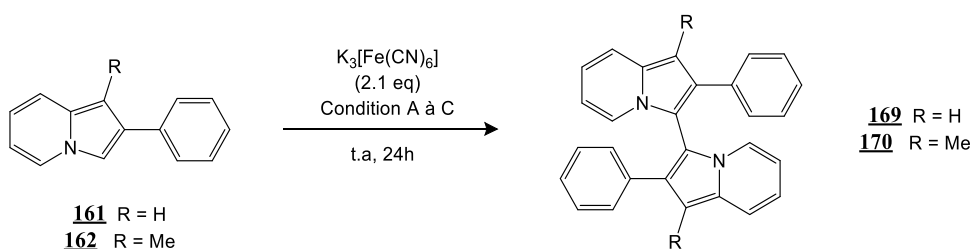


Schéma 137 : Synthèse de l'indolizine **168**

La dimérisation de ce nouveau composé a été réalisée dans le DCM pendant 24 heures. Malheureusement, le seul produit isolé après 24 heures était encore une fois un adduit du substrat avec l'iode ($m/z = 401$). Puisque la dimérisation de l'indolizine-2-carboxylate d'éthyle a été rapportée avec un rendement moyen (45%), il semblerait que l'ajout d'un substituant amide électroattracteur en position 1 ait diminué le potentiel d'oxydation de l'hétérocycle et l'ait rendu inactif.

Cet obstacle rencontré nous a obligé à reconsidérer l'utilisation de méthodes impliquant des métaux pour la préparation de 3,3'-biindolizines. Après quelques tentatives infructueuses avec le Pd/C et le FeCl_3 , le ferricyanure de potassium(III) s'est avéré être le catalyseur de choix. Décrite pour la première fois par Hünig il y a cinquante ans,³¹ cette méthodologie présente l'avantage d'être compatible avec l'eau. En effet, les travaux originaux ont été réalisés dans un mélange MeCN/ H_2O 3/2 (v/v) en présence de triéthylamine et d'acide perchlorique à température ambiante. Nos tests ont révélé que la dimérisation peut se produire dans un milieu majoritairement aqueux et sans ajout de l'oxoacide (Tableau 18).



Entrée	R	Condition	Dimer	Rendement (%)
1	Me	A: $\text{NEt}_3/\text{HClO}_4$ (0,7 eq), $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (1/1)	170	31
2	Me	B : NEt_3 (0,7 eq), $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (2/1)	170	41
3	H	C : $\text{NEt}_3/\text{HClO}_4$ (0,7 eq), $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (1/1)	169	0

Tableau 18 : Dimérisation d'indolizine catalysée par le ferricyanure de potassium(III)

La réaction de la 1-méthyl-2-phénylindolizine (**162**) dans un mélange équivalent eau/acétonitrile contenant de l'acide perchlorique a généré un rendement de 31% tandis que 41% du produit **170** sont isolés lorsque la réaction est réalisée dans un mélange 2/1 en faveur de l'eau et sans l'additif chloré (entrées 1 et 2 respectivement). De plus, la présence d'un

substituant sur position 1 s'est avérée nécessaire pour que la dimérisation puisse avoir lieu : lorsque la 2-phénylindolizine **161** a été évaluée comme substrat, aucune conversion n'a été observée (entrée 3).

Ceci a conduit à la conception du dernier modèle simplifié **AptaSplit-DimerFe** illustré dans la Figure 70. Le développement de ce design fut l'objet du temps restant à notre disposition. Il implique l'introduction de substituants méthyles en position 1 de nos deux précurseurs indoliziniques.

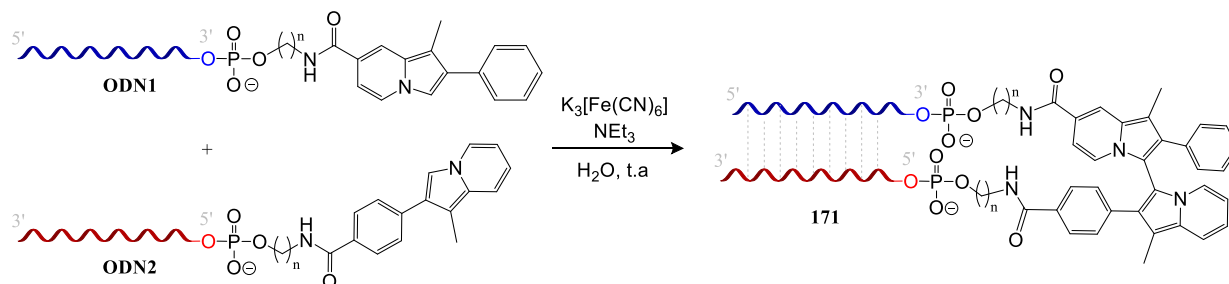


Figure 70 : Modèle simplifié **AptaSplit-DimerFe**

Le moyen le plus rapide d'obtenir un précurseur prêt à l'emploi pour la dimérisation et la conjugaison à l'ADN était d'utiliser le dérivé de 2-Bromoacétophénone **143** portant une fonction azide que nous avons déjà sous la main. Il a ainsi été réagi avec la 2-éthylpyridine pour aboutir à l'indolizine de Tschitschibabin **172** isolée après filtration et lavage avec un rendement de 65% (Schéma 138).

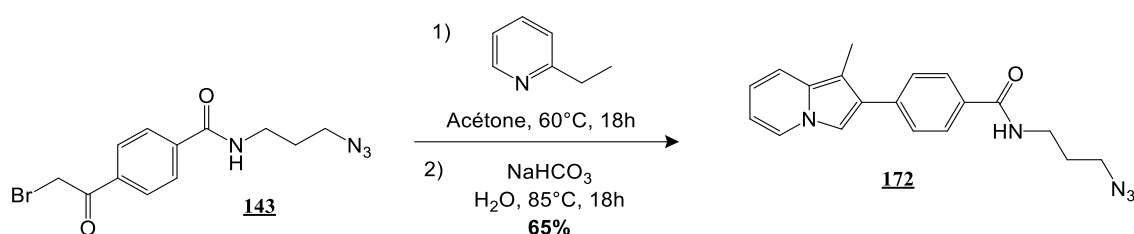


Schéma 138 : Synthèse de l'indolizine **172**

Par la suite, sa dimérisation oxydative à l'aide de ferricyanure de potassium a été réalisée (Schéma 139). Les conditions de réaction standard (NEt_3 , $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 2/1, t.a, 24h) ont généré 25% de rendement sous la forme d'un solide moutarde présentant une fluorescence jaune sous lampe UV ($\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$), tandis que le monomère est bleu vif. Nous rappelons qu'une réactivité limitée est préférable pour un effet DNA-templated plus appréciable.

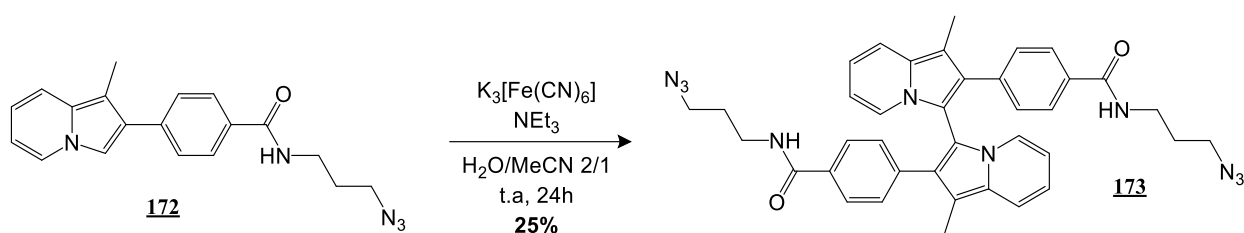


Schéma 139 : Synthèse du dimer **173**

Les propriétés photophysiques des deux espèces ont été évaluées plus en détail dans l'eau afin de déterminer si le décalage de la longueur d'onde d'émission est effectivement significatif comme semblent le suggérer les observations sous lampe UV. Comme le montre la Figure **71**, le monomère fluoresce à 449 nm tandis que le dimère présente une longueur d'onde d'émission maximale à 511 nm. Cela correspond à un décalage de 62 nm, amplement satisfaisant pour nos objectifs : l'indolizine **172** est comprise dans la gamme du bleu tandis que la 3,3'-biindolizine **173** peut être regroupée avec les fluorophores verts.

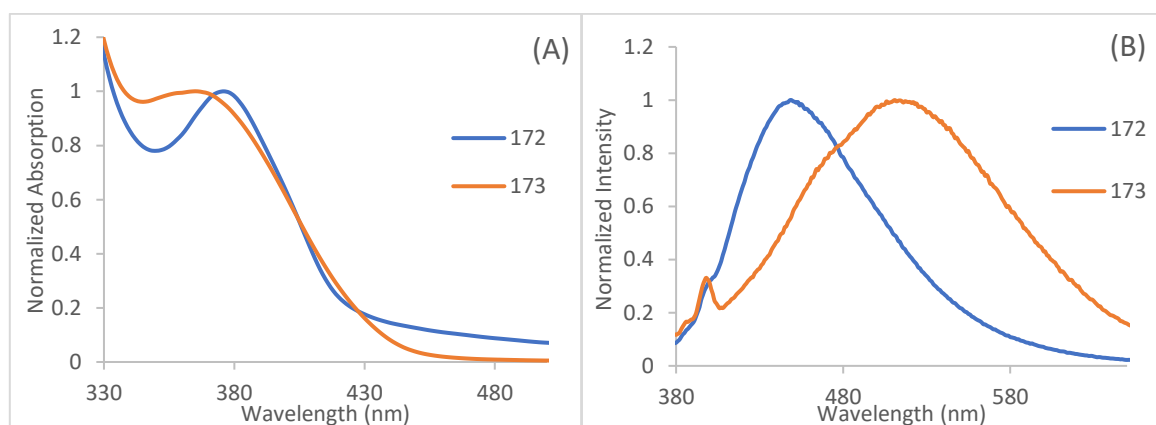


Figure **71** : A) Spectres d'absorption normalisés de **172** et **173** dans l'eau ($C = 40 \mu\text{M}$) ; B) Spectres d'émission normalisés de **172** et **173** dans l'eau ($C = 5 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$), avec des décalages de Stokes de 84 et 146 nm respectivement.

C. Préparation des nouveaux conjugués ADN-indolizines

Nous avons confirmé le fait que la dimérisation de l'indolizine conduit à une modification significative du signal d'émission. La construction du modèle **AptaSplit-DimerFe** peut donc commencer. La première étape est la conjugaison du composé **172** à un des deux brins d'ADN. Par précaution, nous avons décidé de réaliser un premier test de dimérisation en utilisant un seul conjugué plutôt que de recourir immédiatement au modèle asymétrique, afin d'évaluer si la présence d'acide nucléique provoquerait à nouveau une interférence.

La CuAAC a été réalisée en utilisant la séquence alcyne **ODN1-AIk** (**118**) synthétisée lors du Chapitre 2, avec suivi UPLC-MS. Bien que le conjugué souhaité ait été détecté en solution après 1 heure d'agitation, le produit a disparu peu de temps après. La diminution de l'intensité

du pic correspondant au composé **174** entre $t = 1\text{h}$ et $t = 3\text{h}$ est visible sur le chromatogramme ci-dessous (Figure 72-A). Le même phénomène est observé lorsque la réaction est effectuée avec le brin alcyne complémentaire **ODN2-Alk (175)** : la liaison tétrazole entre notre indolizine et l'ADN n'est a priori pas stable ou inerte. Compte tenu de l'augmentation de l'intensité du pic à $t_r = 7,52\text{ min}$, on peut supposer que le conjugué ait été consommé et transformé ; cependant nous n'avons pas pu identifier le sous-produit généré en spectrométrie de masse.

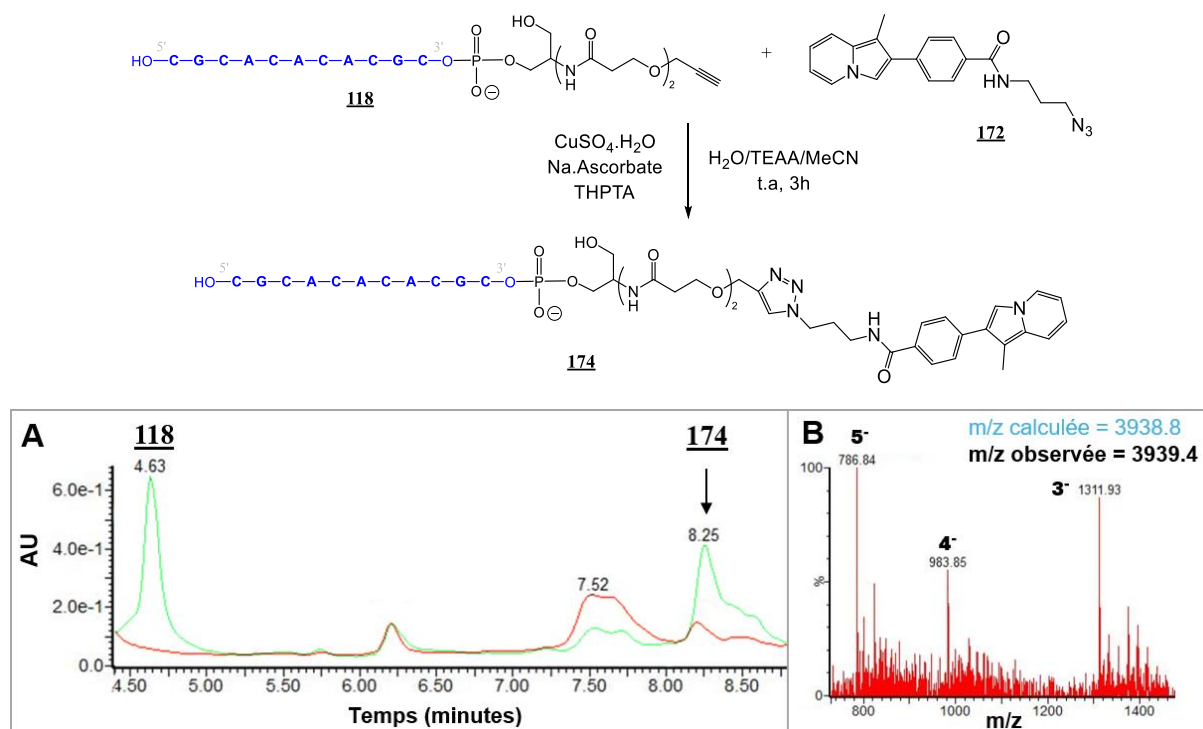


Figure 72 : A) Chromatogramme du milieu réactionnel à $t = 1\text{h}$ (vert) et $t = 3\text{h}$ (rouge) ; B) Spectre de masse de l'espèce à $t_r = 8,25\text{ min}$

Dans l'espoir de surmonter cet obstacle, la CuAAC a été remplacée par une SPAAC. Pour ce faire, un fragment DBCO a été introduit à l'extrémité 5' des deux séquences d'ADN à l'aide d'un phosphoramidite DBCO-Serinol commercial. Ensuite, la nouvelle séquence **ODN1-Cyclooctyne (176)** a été mise en réaction avec l'indolizine **172** dans un tampon TEAA 0,5 M à température ambiante (Figure 73). La réaction s'est effectuée pendant 24 heures avec suivi UPLC-MS.

Tout comme la tentative précédente, le conjugué est formé ($t_r = 8,78\text{ min}$). Cependant, le produit n'est pas retrouvé dans le milieu réactionnel le lendemain après avoir laissé la cycloaddition se poursuivre durant la nuit dans l'espoir d'augmenter le taux de conversion. Lorsque **ODN2-cyclooctyne (177)** a été utilisé, il n'y a eu aucune évolution du chromatogramme entre $t = 0$ et $t = 24\text{ h}$: recourir à une SPAAC n'a pas permis de contourner l'obstacle rencontré avec la CuAAC. À la lumière de ces observations, nous avons choisi de

remplacer la chaîne azoture de l'indolizine **172** par une oxyamine afin de réaliser une ligation oxime à la place.

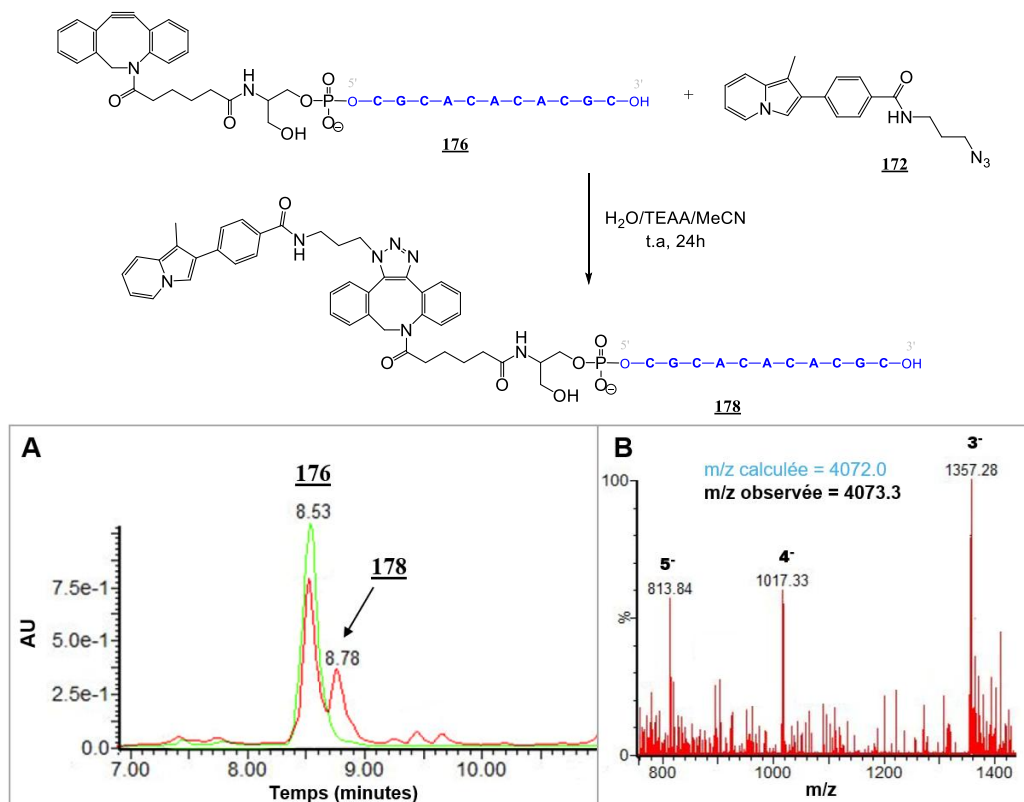


Figure 73 : A) Chromatogramme du milieu réactionnel à t = 0h (vert) et t = 3h (rouge); B) Spectre de masse de l'espèce à tr = 8,78 min

La synthèse du nouveau précurseur indolizine **180** est décrite dans le Schéma 140. Tout d'abord, l'éthyl 4-(2-bromoacétyl)benzoate réagit avec la 2-éthylpyridine pour former l'indolizine intermédiaire **179** (20%) qui est ensuite hydrolysée en l'acide correspondant puis couplée à la chaîne oxyamine protégée à l'aide de HATU, donnant lieu au produit **180** avec un rendement de 38%.

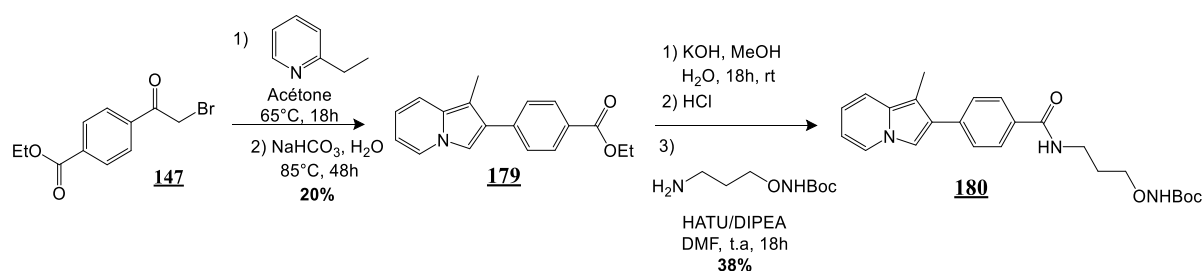


Schéma 140 : Synthèse du précurseur indolizinique **180**

Le deuxième précurseur portant le linker de conjugaison en position 7 a été préparé par la même occasion. La synthèse décrite dans le Schéma 141 nécessite quelques étapes supplémentaires. Tout d'abord, l'isonicotinate d'éthyle **181** est obtenu à partir de l'acide

correspondant avec un rendement de 61% dans l'éthanol à reflux en présence d'acide sulfurique. Ensuite, une chaîne éthyle est introduite en position 2 du noyau pyridine en utilisant l'acide α -aminobutyrique comme précurseur alkyle radicalaire. La réaction est catalysée par l'argent en présence de TFA et d'un excès de persulfate d'ammonium.³⁶ Son mécanisme impliquerait la formation d'un aldéhyde suivie d'un processus radicalaire de décarbonylation/alkylation de type Minisci, fournissant ainsi l'intermédiaire **182** avec un rendement de 62%. Cette méthodologie s'est avérée plus efficace que la fonctionnalisation catalysée au palladium du 2-bromoisonicotinate de *tert*-butyle à l'aide du diéthylzinc³⁷ qui n'a généré le produit correspondant qu'avec un modeste rendement de 23%. Le noyau indolizine a ensuite été formé via une réaction de Tschitschibabin en utilisant la 2-éthylpyridine, après-quoi l'intermédiaire **183** a été hydrolysé et couplé à la chaîne oxyamine protégée pour donner le produit **184** avec un rendement de 44%.

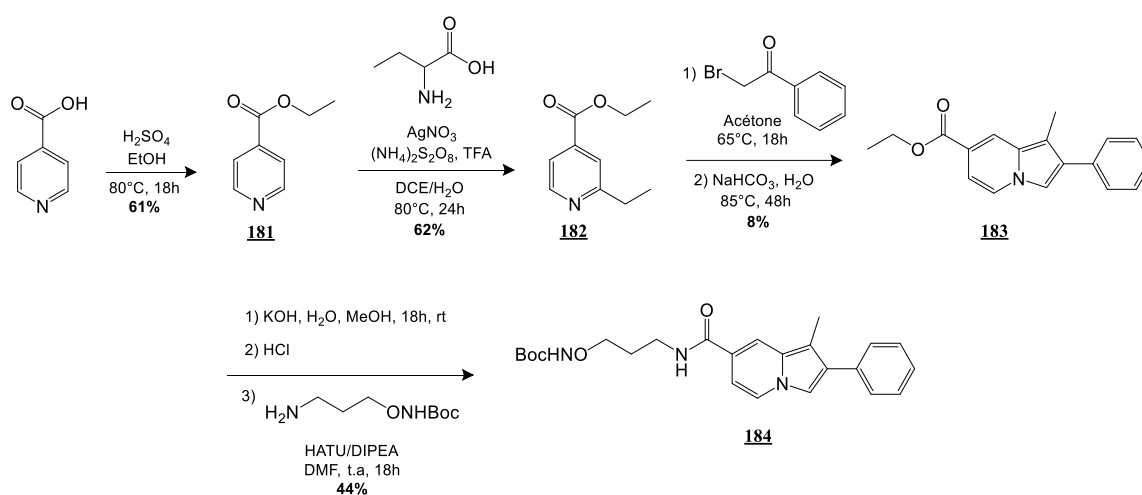
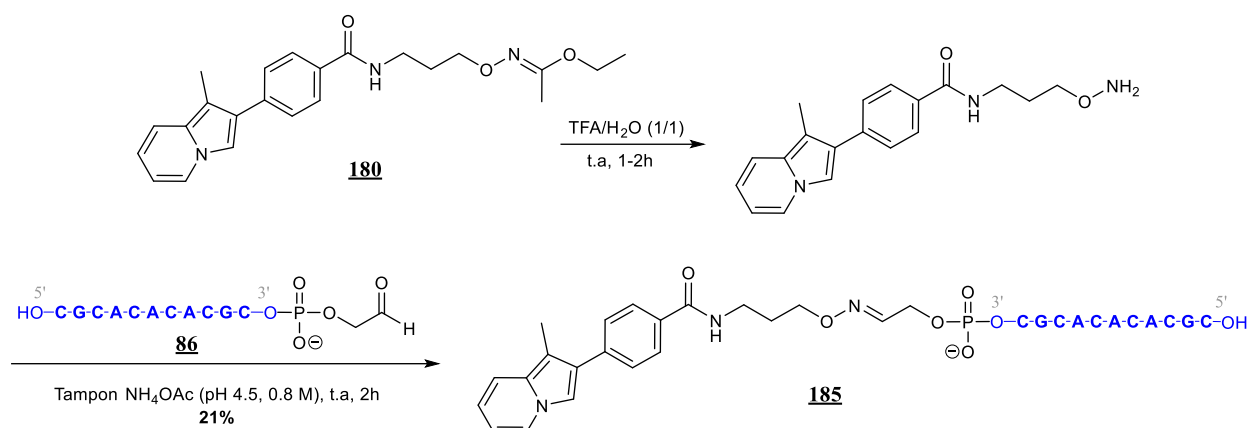


Schéma 141 : Synthèse du précurseur indolizine **184**

La fonctionnalisation des oligonucléotides porteurs d'aldéhyde a ensuite été réalisée. Au total, 3 conjugués ont été préparés selon le protocole standard de couplage oxime, pour permettre l'étude de la formation de dimères symétriques et asymétriques. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 19 avec la synthèse du conjugué **185** illustrée à titre d'exemple. À l'exception du conjugué **186** qui a été isolé après purification RP-HPLC en quantité quantitative, le rendement des ligations oximes reste modéré (15-21%, entrée 1 et 3).



Entrée	Séquence	Indolizine	Produit	Rendement (%)
1	5'CGCACACACGC3' (ODN1)	<u>180</u>	<u>185</u>	21
2	5'CGCACACACGC3' (ODN1)	<u>184</u>	<u>186</u>	97
3	5'GCGTGTGTGCG3' (ODN2)	<u>184</u>	<u>187</u>	15

Tableau 19 : Synthèse des conjugués ADN-indolizines

Nous avons donc maintenant en main tous les précurseurs pour tester la stratégie **AptaSplit-DimerFe**. Malheureusement celle-ci n'a pu être testée par manque de temps.

D. Conclusion et perspectives : Dimérisation oxydative des conjugués médiée par le fer(III)

Dans ce chapitre, nous avons exploré diverses réactions qui pourraient servir de potentielle alternative à la cycloaddition 1,3-dipolaire initiale entre les ylures de pyridinium et les alcynes. Après de nombreux essais, la dimérisation oxydative des 1,2-indolizines médiée par le ferricyanure de potassium s'est révélée être la voie la plus prometteuse.

Malheureusement, le temps alloué aux manipulations est arrivé à son terme avant que nous puissions tester la formation de 3,3-indolizines avec nos conjugués. Cependant, les éléments constitutifs du modèle **AptaSplit-DimerFe** sont disponibles pour une utilisation future.

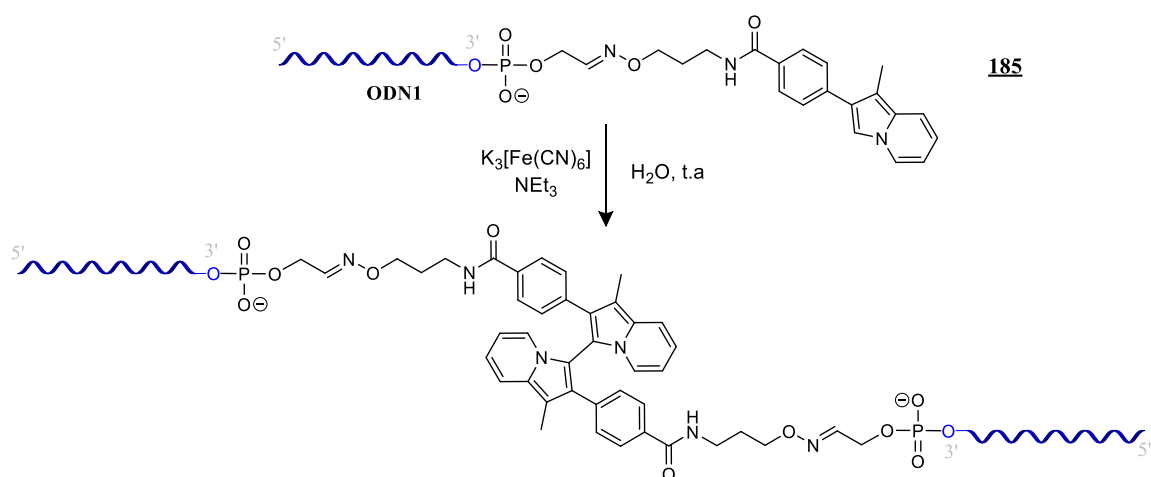


Schéma 142 : Dimerisation symétrique du conjugué **185**

La première étape de la construction d'une nouvelle preuve de concept consisterait à confirmer la faisabilité de la réaction en présence d'ADN selon le modèle symétrique représenté ci-dessus (Schéma 142). Ensuite, la pseudo-dimérisation à l'aide des brins complémentaires **185** et **187** pourra être explorée, d'abord sans, puis avec une étape d'annealing. Après étude de la cinétique et de la fluorescence au sein du duplex formé, la transition vers l'utilisation d'aptamères fragmentés en présence d'une cible spécifique pourra être envisagée (Schéma 143).

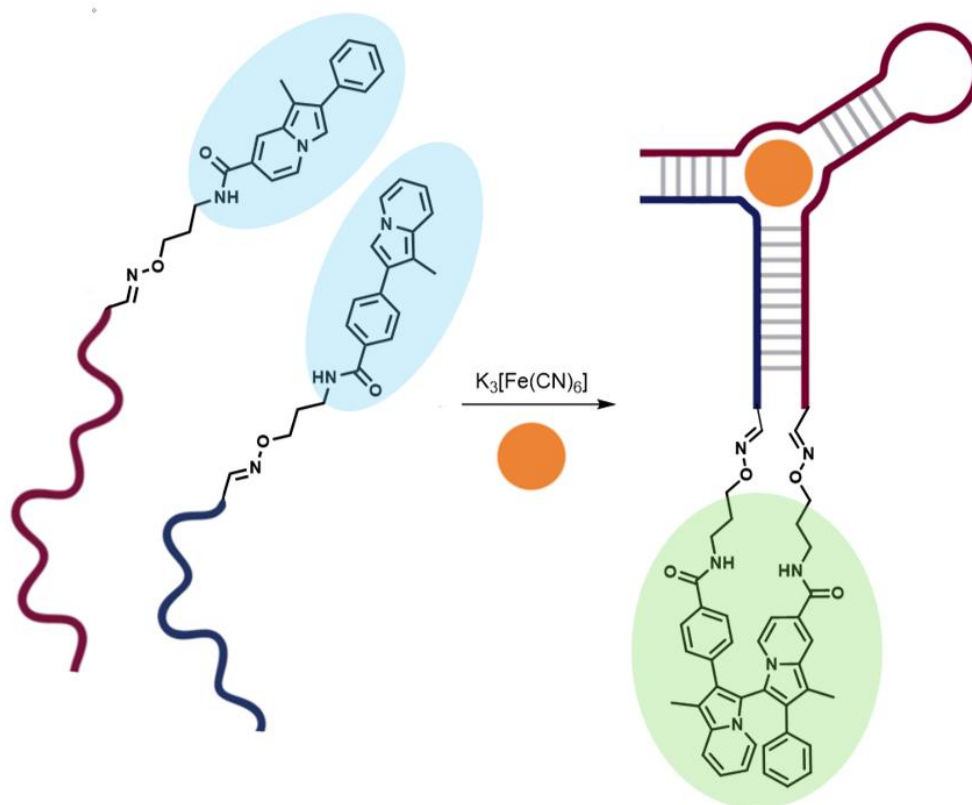


Schéma 143 : Modèle **Aptasplit-DimerFe**

Références bibliographiques

- (1) Galbraith, A.; Small, T.; Boekelheide, V. Communications- Reaction of Dimethyl Acetylenedicarboxylate with Pyrrocoline. *J. Org. Chem.* **1959**, *24* (4), 582–582. <https://doi.org/10.1021/jo01086a619>.
- (2) Wu, Z.; Wang, Q.; Wang, J.; Dong, H.; Xu, X.; Shen, Y.; Li, H.; Zhang, W. Vlasoulamine A, a Neuroprotective [3.2.2]Cyclazine Sesquiterpene Lactone Dimer from the Roots of *Vladimiria Souliei*. *Org. Lett.* **2018**, *20* (23), 7567–7570. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b03306>.
- (3) Ondrus, A. E.; Movassaghi, M. Total Synthesis and Study of Myrmicarin Alkaloids. *Chem. Commun.* **2009**, No. 28, 4151–4165. <https://doi.org/10.1039/B903995N>.
- (4) Jørgensen, A. S.; Jacobsen, P.; Christiansen, L. B.; Bury, P. S.; K. Synthesis and Pharmacology of a Novel Pyrrolo[2,1,5-Cd]Indolizine (NNC 45-0095), a High Affinity Non-Steroidal Agonist for the Estrogen Receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10* (4), 399–402. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(00\)00015-9](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)00015-9).
- (5) Mitsumori, T.; Bendikov, M.; Dautel, O.; Wudl, F.; Shioya, T.; Sato, H.; Sato, Y. Synthesis and Properties of Highly Fluorescent Indolizino[3,4,5-Ab]Isoindoles. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (51), 16793–16803. <https://doi.org/10.1021/ja049214x>.
- (6) Shen, Y.; Grampp, G.; Leesakul, N.; Hu, H.; Xu, J. Synthesis and Emitting Properties of the Blue-Light Fluorophores Indolizino[3,4,5- Ab]Isoindole Derivatives. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *2007* (22), 3718–3726. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200700250>.
- (7) Zeng, C.; Yuan, K.; Wang, N.; Peng, T.; Wu, G.; Wang, S. The Opposite and Amplifying Effect of B ← N Coordination on Photophysical Properties of Regioisomers with an Unsymmetrical Backbone. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (6), 1724–1734. <https://doi.org/10.1039/C8SC04210A>.
- (8) Galbraith, A.; Small, T.; Barnes, R. A.; Boekelheide, V. The Formation of Cycl[3.2.2]Azine Derivatives via the Reaction of Pyrrocoline with Dimethyl Acetylenedicarboxylate. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83* (2), 453–458. <https://doi.org/10.1021/ja01463a046>.
- (9) Noguchi, M.; Tanigawa, N.; Kajigaeshi, S. Preparation of Cyclohepta and Benzo[Ef]Cycl[3.2.2]Azines. *J. Heterocycl. Chem.* **1985**, *22* (4), 1049–1053. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570220425>.
- (10) Babaev, E. V.; Shadrin, I. A. Indolizines and Their Hetero/Benzo Derivatives in Reactions of [8+2] Cycloaddition. *Molecules* **2021**, *26* (7), 2050. <https://doi.org/10.3390/molecules26072050>.
- (11) Gogoi, S.; Dutta, M.; Gogoi, J.; Boruah, R. C. Microwave Promoted Synthesis of Cycl[3.2.2]Azines in Water via a New Three-Component Reaction. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52* (7), 813–816. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.12.036>.
- (12) Cohen, S.; Lacher, J. R.; Park, J. D. DIKETOCYCLOBUTENEDIOL. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81* (13), 3480–3480. <https://doi.org/10.1021/ja01522a083>.
- (13) Treibs, A.; Jacob, K. Cyclotrimethine Dyes Derived from Squaric Acid. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1965**, *4* (8), 694–694. <https://doi.org/10.1002/anie.196506941>.
- (14) Zhou, D.; Xu, X.; Xu, F. Ab Initio Study on Photoconductivity and Electronic Structures of Unsymmetrical Squaraine Dyes. *Acta Chim. Sin.* **2001**, *59* (6), 847.
- (15) Wei, G.; Xiao, X.; Wang, S.; Sun, K.; Bergemann, K. J.; Thompson, M. E.; Forrest, S. R. Functionalized Squaraine Donors for Nanocrystalline Organic Photovoltaics. *ACS Nano* **2012**, *6* (1), 972–978. <https://doi.org/10.1021/nn204676j>.
- (16) Materials for Optical Data Storage. *Angew. Chem.* **1989**, *28* (11), 1445–1471. <https://doi.org/10.1002/ANIE.198914453>.
- (17) Lee, Y.-D.; Lim, C.-K.; Kim, S.; Kwon, I. C.; Kim, J. Squaraine-Doped Functional Nanoprobes: Lipophilically Protected Near-Infrared Fluorescence for Bioimaging. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20* (17), 2786–2793. <https://doi.org/10.1002/adfm.201000650>.
- (18) Jetty, R.; Bandera, Y. P.; Daniele, M. A.; Hanor, D.; Hung, H.-I.; Ramshesh, V.; Duperreault, M. F.; Nieminen, A.-L.; Lemasters, J. J.; Foulger, S. H. Protein Triggered Fluorescence Switching of Near-Infrared Emitting Nanoparticles for Contrast-Enhanced Imaging. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1* (36), 4542–4554. <https://doi.org/10.1039/C3TB20681E>.
- (19) Sreejith, S.; Joseph, J.; Lin, M.; Menon, N. V.; Borah, P.; Ng, H. J.; Loong, Y. X.; Kang, Y.; Yu, S. W.-K.; Zhao, Y. Near-Infrared Squaraine Dye Encapsulated Micelles for in Vivo Fluorescence and Photoacoustic Bimodal Imaging. *ACS Nano* **2015**, *9* (6), 5695–5704. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b02172>.

- (20) Al-horaibi, S. A.; Asiri, A. M.; El-Shishtawy, R. M.; Gaikwad, S. T.; Rajbhoj, A. S. Indoline and Benzothiazole-Based Squaraine Dye-Sensitized Solar Cells Containing Bis-Pendent Sulfonate Groups: Synthesis, Characterization and Solar Cell Performance. *J. Mol. Struct.* **2019**, *1195*, 591–597. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.05.068>.
- (21) Meador, W. E.; Autry, S. A.; Bessetti, R. N.; Gayton, J. N.; Flynt, A. S.; Hammer, N. I.; Delcamp, J. H. Water-Soluble NIR Absorbing and Emitting Indolizine Cyanine and Indolizine Squaraine Dyes for Biological Imaging. *J. Org. Chem.* **2020**, *85* (6), 4089–4095. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b03108>.
- (22) Law, K.-Y.; Bailey, F. C. Squaraine Chemistry. Synthesis of Bis(4-Dimethylaminophenyl)Squaraine from Dialkyl Squarates. Mechanism and Scope of the Synthesis. *Can. J. Chem.* **1986**, *64* (12), 2267–2273. <https://doi.org/10.1139/v86-372>.
- (23) Sprenger, H.-E.; Ziegenbein, W. Cyclobutenediylum Dyes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1968**, *7* (7), 530–535. <https://doi.org/10.1002/anie.196805301>.
- (24) Kakehi, A.; Ito, S.; Hamaguchi, A.; Okano, T. Facile Dehydrogenative Dimerization of Indolizine Derivatives. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1981**, *54* (9), 2833–2834. <https://doi.org/10.1246/bcsj.54.2833>.
- (25) Matsushima, T.; Kimura, R.; Asahara, M.; Murata, H. Photoluminescence and Electroluminescence Characteristics of 3,3'-Dicyano-[7,7'-Biindolizine]-1,1',2,2'-Tetracarboxylic Acid 1,2-Diethyl 1',2'-Dimethyl Ester. *Chem. Lett.* **2008**, *37* (12), 1260–1261. <https://doi.org/10.1246/cl.2008.1260>.
- (26) Henry, J. B.; MacDonald, R. J.; Gibbad, H. S.; McNab, H.; Mount, A. R. The Formation and Characterisation of Redox Active and Luminescent Materials from the Electrooxidation of Indolizine. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13* (12), 5235. <https://doi.org/10.1039/c0cp02645j>.
- (27) Theil, F.; Sonnenschein, H.; Kreher, T. Lipase-Catalysed Resolution of 3,3'-Bi-Indolizines: The First Preparative Access to Enantiomerically Pure Samples. *Tetrahedron Asymmetry* **1996**, *7* (12), 3365–3370. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(96\)00444-2](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(96)00444-2).
- (28) Köckritz, A.; Sonnenschein, H.; Bischoff, S.; Theil, F.; Gloede, J. PHOSPHINE- AND PHOSPHITE-SUBSTITUTED 3,3'-BI-INDOLIZINES- NEW ATROPISOMERIC LIGANDS. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1998**, *132* (1), 15–19. <https://doi.org/10.1080/10426509808036970>.
- (29) Xia, J.-B.; Wang, X.-Q.; You, S.-L. Synthesis of Biindolizines through Highly Regioselective Palladium-Catalyzed C–H Functionalization. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (1), 456–458. <https://doi.org/10.1021/jo802227u>.
- (30) Sonnenschein, H.; Kosslick, H.; Tittelbach, F. Dehydrogenation of 3-Unsubstituted Indolizines on Platinum on Carbon. A Facile Synthesis of Biindolizines. *Synthesis* **1998**, *1998* (11), 1596–1598. <https://doi.org/10.1055/s-1998-2202>.
- (31) Hünig, S.; Linhart, F. Oxidative Dimerisierung von 1,3,3-Trimethylindolenin Und 1,2-Dimethylindolizin. *Tetrahedron Lett.* **1971**, *12* (17), 1273–1276. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)96684-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)96684-5).
- (32) Andruzzi, R.; Cardellini, L.; Greci, L.; Stipa, P.; Poloni, M.; Trazza, A. Radical Cations. Part 2. Oxidative Dimerization of Indolizines: A Chemical and Electrochemical Investigation. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1988**, *0* (12), 3067–3070. <https://doi.org/10.1039/P19880003067>.
- (33) Yanilkin, V. V.; Mamedov, V. A.; Toropchina, A. V.; Kalinin, A. A.; Nastapova, N. V.; Morozov, V. I.; Shekurov, R. P.; Isaikina, O. G. Redox Active Surface Films Produced by Electrooxidation of Substituted Indolysines. *Russ. J. Electrochem.* **2006**, *42* (3), 212–224. <https://doi.org/10.1134/S1023193506030025>.
- (34) Mamedov, V. A.; Kalinin, A. A.; Samigullina, A. I.; Mironova, E. V.; Krivolapov, D. B.; Gubaidullin, A. T.; Rizvanov, I. K. Iodine–Sodium Acetate (I₂–NaOAc) Mediated Oxidative Dimerization of Indolizines: An Efficient Method for the Synthesis of Biindolizines. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54* (26), 3348–3352. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.04.052>.
- (35) Bragg, D. R.; Wibberley, D. G. 609. Indolizines. Part II. Preparation from Ethyl 2-Pyridylacetate and Related Compounds. *J. Chem. Soc. Resumed* **1963**, No. 0, 3277–3281. <https://doi.org/10.1039/JR9630003277>.
- (36) Mai, D. N.; Baxter, R. D. Unprotected Amino Acids as Stable Radical Precursors for Heterocycle C–H Functionalization. *Org. Lett.* **2016**, *18* (15), 3738–3741. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b01754>.
- (37) Bolli, M. H.; Abele, S.; Birker, M.; Bravo, R.; Bur, D.; De Kanter, R.; Kohl, C.; Grimont, J.; Hess, P.; Lescop, C.; Mathys, B.; Müller, C.; Nayler, O.; Rey, M.; Scherz, M.; Schmidt, G.; Seifert, J.; Steiner, B.; Velker, J.; Weller, T. Novel S1P₁ Receptor Agonists – Part 3: From Thiophenes to Pyridines. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (1), 110–130. <https://doi.org/10.1021/jm4014696>.

I. Conclusion Générale

L'objectif de ces travaux de thèse fut l'élaboration d'une nouvelle technique de détection pour les petites molécules basée sur les aptamères split et le motif indolizine, une combinaison jusqu'alors inédite. La cycloaddition 1,3-dipolaire d'ylures de pyridinium et d'alcynes, déjà utilisée, étudiée et optimisée au sein du laboratoire DPM, nous a semblé prometteuse. En effet, son potentiel en tant que réaction click fluorogénique avait déjà été mis en évidence. Supposant que la conjugaison des précurseurs à des fragments d'aptamère permettrait d'accélérer la réaction tout en fournissant une stabilité et un signal détectable pour l'assemblage supramoléculaire, nous avons entrepris d'explorer un modèle ADNdb simplifié comme preuve de concept.

Pour ce faire, de nouveaux fluorophores 1,3,7-indolizines ont été synthétisés et caractérisés. Comme prévu, la cycloaddition [3+2] de leurs précurseurs s'est avérée lente et à rendement modéré dans les milieux organiques comme en tampon aqueux, et les dix molécules de la série ont toutes émergé comme des fluorophores relativement brillants avec un potentiel pour le biomarquage. La présence d'un groupement amide en position 3 est associée à de meilleures propriétés de fluorescence, et deux indolizines en particulier se sont distinguées du reste du lot par leur rendement quantique de fluorescence et leur intensité d'émission dans l'eau particulièrement élevés.

Par la suite, leur potentiel comme alternatives aux fluorophores bleus classiquement utilisés pour le marquage d'acides nucléiques a été mis à l'épreuve. Nous avons découvert qu'une conjugaison des indolizines à l'ADN entraînait une stabilisation des duplex, avec une augmentation de la température de fusion et une variation de leurs paramètres thermodynamiques significatifs. Malgré une certaine extinction de la fluorescence observée, l'émission des conjugués ADN-indolizine dans l'eau reste élevée, ce qui rend nos composés adaptés à nos objectifs de détection. Après ces tests préliminaires, la cycloaddition des précurseurs liés à des brins d'ADN a été étudiée afin d'évaluer l'influence de la conjugaison sur la réactivité. Rapidement, nous avons découvert une incompatibilité de la CDYPA avec l'ADN : la réaction ne se produit jamais en présence d'acide nucléique (et de certains nucléotides spécifiques). Nous avons tenté d'élucider cette interférence, et bien que les détails les plus fins restent mystérieux, nous sommes arrivés à la conclusion suivante : le noyau pyridinium et l'ADN sont engagés dans une réaction secondaire qui dépend de la nature de la nucléobase. Des recherches plus approfondies sont encore nécessaires, mais pour des raisons de temps, nous avons choisi de concentrer notre attention sur le développement de modèles aptamères alternatifs.

Le motif indolizine a été conservé comme élément central de notre conception, mais cette fois-ci, l'hétérocycle joue le rôle de réactif et non pas de produit fluorogénique. Cette nouvelle approche repose sur un décalage significatif de la longueur d'onde d'émission qui aurait lieu lors d'une transformation déclenchée par assemblage de la cible à ses ligands aptamères. Trois modèles ont été considérés et explorés : les modèles cycl[3.2.2]azine, indolizine squaraine et 3,3'-biindolizine. Ce dernier s'est révélé être la voie la plus prometteuse pour de futures explorations : en effet, la dimérisation d'indolizines portant des linkers de conjugaison, dans l'eau et catalysée par le fer (III), a été fructueuse. Par manque de temps, nous n'avons pas pu effectuer un premier essai de dimérisation avec les conjugués. Ce travail est envisagé comme perspective imminente. À cela s'ajoute l'optique de développer un système split aptamère à base de ANP exploitant la CDYPA, ou encore valoriser la cycloaddition initialement considérée comme réaction click pour la synthèse de RAFT-RGD.

Partie expérimentale

II. Materials, equipment and methods

Chemicals and solvent for organic synthesis were purchased from Sigma-Aldrich, TCI, Fisher Scientific, Alfa Chemistry, Fluorochem, Merck or BLDpharm and used without further purification.

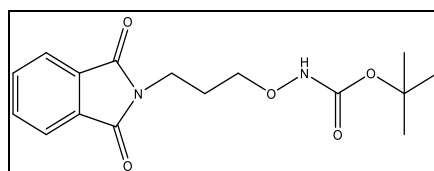
NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III spectrometer (400 MHz for ^1H , 100 MHz for ^{13}C) using the solvent as the internal reference. Deuterated solvents (CDCl_3 , MeOD, DMSO- d_6 , Acetone- d_6 , Acetonitrile- d_3 , Trifluoroacetic acid- d) were purchased from Deutero GmbH (Kastellaun, Germany).

Mass spectra were recorded by the Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble (ICMG). ElectroSpray Ionization (ESI) spectra were recorded on a Bruker amaZon speed, while high resolution mass spectrometry (HRMS) were recorded on a LTQ Orbitrap XL Thermo Scientific with ElectroSpray Ionization (ESI).

UV-Vis absorption spectra were recorded on an UV-1650 PC Shimadzu spectrophotometer. Fluorescence emission spectra were recorded on Fluorimax-4 spectrofluorometer. Fluorescence quantum yields (Φ_f) were determined using appropriate reference dyes following the *relative* procedure described by Würth et al.¹

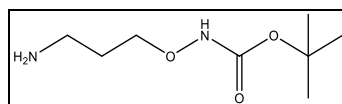
III. Syntheses

1,1-Dimethylethyl N-[3-(1,3-dihydro-1,3-dioxo-2H-isoindol-2-yl)propoxy]carbamate (62)



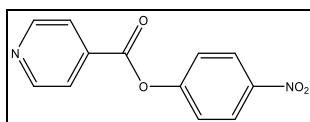
N-3-bromopropylphthalimide (2.10 g, 7.84 mmol, 1 eq) and N-Boc-hydroxylamine (1.25 g, 9.41 mmol, 1.2 eq) were added to a round-bottom flask and dissolved in anhydrous DMF (40 mL) then potassium carbonate (2.16 g, 15.68 mmol, 2 eq) was added. The mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure and the oily residue was diluted in cold water. The product was extracted with 3 x 50 mL AcOEt then the combined organic phases were washed with saturated NaCl, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. After column chromatography (SiO_2 , DCM/AcOEt 9/1), a viscous pale-yellow oil was obtained in 78% yield (1.97 g). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.85 (m, 2H); 7.72 (m, 2H); 3.93 (t, 2H, $J = 5.72$ Hz); 3.83 (t, 2H, $J = 6.92$ Hz), 2.02 (qt, 2H, $J = 6.68$ Hz); 1.48 (s, 9H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 168.4, 156.8, 133.9, 132.1, 123.2, 81.7, 73.9, 35.0, 28.2, 27.2.

1,1-Dimethylethyl N-(3-aminopropoxy)carbamate (63)



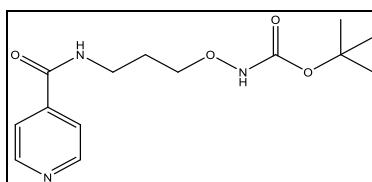
62 (1.97 g, 6.12 mmol, 1 eq) was dissolved in MeOH (100 mL) then hydrazine hydrate 78-82% (5.9 mL, 91 mmol, 15 eq) was added under vigorous agitation. The mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure. The stringy white solid residue was diluted in DCM (50 mL), filtrated on glass frit and washed with 3 x 15 mL DCM. The filtrate was diluted with water (100 mL), extracted with 2 x 40 mL DCM and the combined organic phases were washed with saturated NaCl, dried over MgSO_4 , filtered then concentrated under reduced pressure to afford a yellow oil was in 53% yield (611 mg). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 3.94 (t, 2H, $J = 6$ Hz), 2.85 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz), 1.77 (qt, 2H, $J = 6.4$ Hz), 1.48 (s, 9H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 157.0, 81.5, 74.8, 39.1, 31.0, 28.2.

4-Nitrophenyl isonicotinate (**64**)



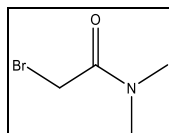
Isonicotinic acid (2 g, 16.24 mmol, 1 eq) and DMAP (79 mg, 0.65 mmol, 0.05 eq) were dissolved in DCM (40 mL) and the mixture was cooled in an ice-bath. 4-nitrophenol (2.25 g, 16.24 mmol, 1 eq) and DCC (3.34 g, 16.24 mmol, 1 eq) were added. After stirring at 0°C for 10 minutes, the reaction proceeds at room temperature for 4 hours. The urea was filtered off then the filtrate was washed with 2 x 50 mL citric acid 10%, 2 x 50 mL NaOH 0.2 M and 4 x 40 mL H₂O. The organic phases were combined and dried over MgSO₄, filtered then concentrated under reduced pressure to afford a white solid in 77% yield (3.07 g). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.90 (d, 2H, J = 6.1 Hz), 8.35 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 8.01 (d, 2H, J = 6.0 Hz), 7.44 (d, 2H, J = 9.2 Hz). In accordance with the literature.²

Tert-butyl (3-(isonicotinamido)propoxy)carbamate (**65**)



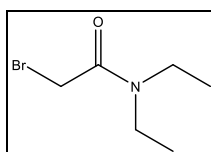
63 (1.38 g, 7.26 mmol, 1 eq) and **64** (1.95 g, 7.99 mmol, 1.1 eq) were dissolved in DCM (100 mL) and the mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure to afford a yellow oil that was later purified using column chromatography (SiO₂, DCM/AcOEt 1/1) to give a white solid in 56% yield (1.20 g). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.70 (d, 2H, J = 5.9 Hz), 8.54 (bs, 1H), 7.90 (d, 2H, J = 6.0 Hz), 7.51 (s, 1H), 4.02 (t, 2H, J = 5.4 Hz), 3.71 (q, 2H, J = 5.8 Hz), 1.89 (qt, 2H, J = 5.6 Hz), 1.50 (s, 9H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 165.4, 157.8, 150.2, 141.9, 121.5, 82.7, 75.8, 37.7, 28.2, 26.8.

2-Bromo-*N,N*-dimethylacetamide (**66a**)



Bromoacetyl bromide (432 μL, 4.96 mmol, 1 eq) was solubilized in anhydrous DCM (10 mL) and the mixture was cooled to -20°C. A solution of 2M dimethylamine in THF (4.96 mL, 9.92 mmol, 2 eq) was added dropwise to the reacting medium which was stirred for 20 minutes. Once it was brought back to room temperature, the mixture was diluted with H₂O (50 mL) and the product was extracted with 3 x 20 mL DCM. The combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford a yellow oil in 76% yield (626 mg). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.87 (s, 2H), 3.10 (s, 3H), 2.99 (s, 3H). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 166.7, 38.1, 36.0, 26.1.

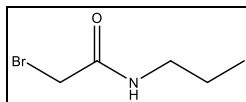
2-Bromo-*N,N*-diethylacetamide (**66b**)



Diethylamine (2.06 mL, 20.00 mmol, 2 eq) was solubilized in anhydrous DCM (10 mL) and the mixture was cooled to 0°C. A solution of bromoacetyl bromide (870 μL, 10.00 mmol, 1 eq) in 5 mL DCM was added dropwise to the reacting medium which was stirred for 30 minutes. Afterward, the mixture was washed with 2 x 25 mL HCl 0.3 M. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated

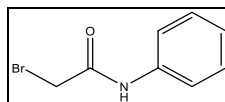
under reduced pressure to afford a yellow oil in 71% yield (626 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 3.82 (s, 2H), 3.37 (qd, 4H, J = 7.1, 1.5 Hz), 1.23 (t, 3H, J = 7.2 Hz), 1.11 (t, 3H, J = 7.2 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 166.0, 43.0, 40.6, 26.4, 14.4, 12.5.

2-Bromo-N-propylacetamide (66c)



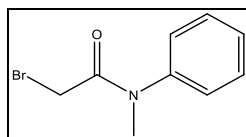
Propylamine (1.64 mL, 20.00 mmol, 2 eq) was solubilized in anhydrous DCM (10 mL) and the mixture was cooled to 0°C. A solution of bromoacetyl bromide (870 μL, 10 mmol, 1 eq) in 5 mL DCM was added dropwise to the reacting medium which was stirred for 30 minutes. Afterward, the white precipitate was filtered off and the filtrate was washed with 2 x 25 mL HCl 0.3 M. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford a clear oil in 57% yield (1.01 g). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 7.39 (bs, 1H), 3.88 (s, 2H), 3.19 (q, 2H, J = 6.9 Hz), 1.52 (sext, 2H, J = 7.4 Hz), 0.88 (t, 3H, J = 7.4 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 166.9, 42.1, 28.7, 22.3, 11.3.

2-Bromo-N-phenylacetamide (66d)



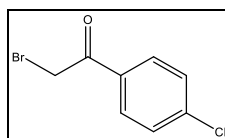
Bromoacetyl bromide (435 μL, 4.99 mmol, 1 eq) was solubilized in anhydrous DCM (10 mL) and the mixture was cooled to 0°C. Aniline (913 μL, 10.00 mmol, 2 eq) was added dropwise to the reacting medium which was stirred for 20 minutes. Afterward, the white precipitate was filtered off and the filtrate was washed with 2 x 25 mL HCl 0.3 M. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford a white solid in 25% yield (272 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 8.12 (bs, 1H), 7.54 (d, 2H, J = 7.6 Hz), 7.37 (t, 2H, J = 7.6 Hz), 7.18 (t, 1H, J = 7.4 Hz). In accordance with the literature.³

2-Bromo-N-methyl-N-phenylacetamide (66e)



Bromoacetyl bromide (435 μL, 4.99 mmol, 1 eq) was solubilized in anhydrous DCM (10 mL) and the mixture was cooled to 0°C. N-Methylaniline (1083 μL, 10.00 mmol, 2 eq) was added dropwise to the reacting medium which was stirred for 20 minutes. Afterward, the mixture was washed with 2 x 25 mL HCl 0.3 M. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford a brown oil in 76% yield (877 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 7.43 (m, 3H), 7.29 (m, 2H), 3.67 (s, 2H), 3.31 (s, 3H). In accordance with the literature.⁴

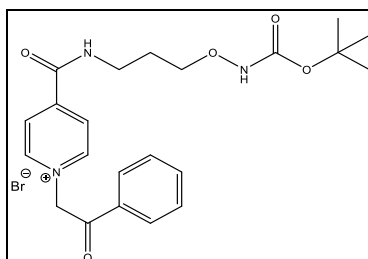
2-Bromo-4'-chloroacetophenone (67)



4-Chloroacetophenone (816 mg, 5.28 mmol, 1 eq) and copper (II) bromide (141 g, 6.33 mmol, 1.2 eq) were stirred overnight in AcOEt (20 mL) at room temperature. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was diluted in DCM (30 mL) and was washed with 2 x 30 mL H₂O followed by brine. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and

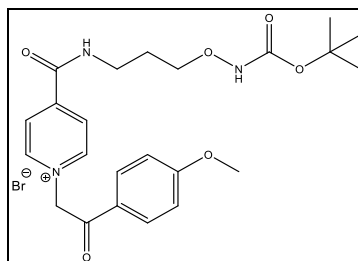
concentrated under reduced pressure. The product was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/DCM 7/3) to afford white crystals in 31% yield (382 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 7.94 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 7.48 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 4.05 (s, 2H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 190.2, 140.6, 132.3, 130.4, 129.3, 30.34.

4-((3-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)oxy)propyl)carbamoyl)-1-(2-oxo-2-phenylethyl)pyridinium bromide (68a)



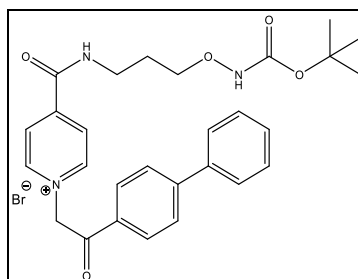
65 (148 mg, 0.50 mmol, 1 eq) and 4-bromoacetophenone (100 mg, 0.50 mmol, 1 eq) were stirred for 40 hours in MeCN (5 mL) heated at 50°C. After evaporation of the solvent, the residue was triturated and washed 3 x with Et₂O. The product was purified using column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH 9/1 → MeOH) to afford an orange solid in 56% yield (131 mg). **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ (ppm) 9.09 (d, 2H, J = 6.8 Hz), 8.56 (d, 2H, J = 6.8 Hz), 8.16 (d, 2H, J = 7.3 Hz), 7.80 (t, 1H, J = 7.5 Hz), 7.67 (t, 2H, J = 7.9 Hz), 6.52 (s, 2H), 3.98 (t, 2H, J = 5.8 Hz), 3.66 (t, 2H, J = 6.5 Hz), 2.00 (qt, 2H, J = 6.2 Hz), 1.51 (s, 9H). **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ (ppm) 208.7, 162.6, 158.1, 147.2, 134.7, 133.5, 132.8, 128.9, 128.2, 125.5, 80.9, 74.2, 37.8, 29.3, 27.3, 26.9. **HRMS (ESI) [M-Br]⁻** m/z calcd for C₂₂H₂₈N₅O₃ 414.20235, obsd 414.20203.

4-((3-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)oxy)propyl)carbamoyl)-1-(2-(4-methoxyphenyl)-2-oxoethyl)pyridinium bromide (68b)



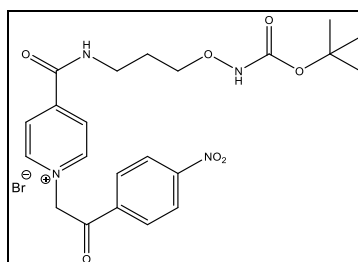
65 (319 mg, 1.08 mmol, 1 eq) and 2-bromo-4'-methoxyacetophenone (246 mg, 1.08 mmol, 1 eq) were stirred for 40 hours in MeCN (5 mL) heated at 50°C. The precipitate was filtered and washed Et₂O to afford a pale yellow solid in 68% yield (387 mg). **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ (ppm) 8.93 (d, 2H, J = 7.2 Hz), 8.41 (d, 2H, J = 6.8 Hz), 7.99 (d, 2H, J = 8.9 Hz), 7.04 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 3.83 (m, 5H), 3.53 (t, 2H, J = 6.5 Hz), 1.87 (qt, 2H, J = 6.2 Hz), 1.38 (s, 9H). **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ (ppm) 187.7, 165.3, 162.6, 158.2, 149.9, 147.1, 130.6, 126.2, 125.5, 114.1, 81.0, 74.3, 54.9, 37.8, 27.2, 26.9. **LRMS (ESI) [M-Br]⁺** m/z calcd for C₂₃H₃₁N₃O₆⁺ 444.21, obsd 444.31.

1-(2-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-oxoethyl)-4-((3-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)oxy)propyl)carbamoyl)pyridinium bromide (68c)



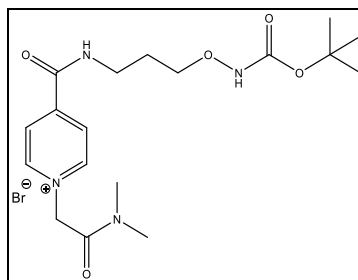
65 (316 mg, 1.07 mmol, 1 eq) and 2-bromo-4'-phenylacetophenone (506 mg, 1.85 mmol, 1.7 eq) were stirred for 40 hours in MeCN (5 mL) heated at 50°C. After evaporation of the solvent, the residue was triturated and washed 3 x with Et₂O. The product was purified using column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH 9/1 → MeOH) to afford an orange solid in 87% yield (131 mg). **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ (ppm) 9.11 (d, 2H, J = 6.9 Hz), 8.58 (d, 2H, J = 6.8 Hz), 8.24 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 7.95 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 7.78 (d, 2H, J = 7.2 Hz), 7.56 (t, 2H, J = 7.1 Hz), 7.49 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 3.99 (t, 2H, J = 5.8 Hz), 3.68 (t, 2H, J = 6.5 Hz), 2.01 (qt, 2H, J = 6.3 Hz), 1.52 (s, 9H). **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ (ppm) 189.0, 162.6, 158.2, 150.0, 147.5, 147.2, 139.2, 132.1, 128.8, 128.8, 128.4, 127.3, 126.9, 125.5, 81.0, 74.3, 37.9, 27.2, 26.8. **LRMS (ESI) [M-Br]⁺** m/z calcd for C₂₈H₃₃N₃O₅⁺ 491.23, obsd. 491.33.

4-((3-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)oxy)propyl)carbamoyl)-1-(2-(4-nitrophenyl)-2-oxoethyl)pyridinium bromide (68d)



65 (120 mg, 0.41 mmol, 1 eq) and 2-bromo-4'-nitroacetophenone (99 mg, 0.41 mmol, 1 eq) were stirred for 40 hours in MeCN (15 mL) heated at 50°C. After evaporation of the solvent, the residue was triturated and washed 3 x with Et₂O. The product was purified using column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH 9/1 → MeOH) to afford a brown solid in 86% yield (161 mg). **¹H NMR (100 MHz, MeOD):** δ (ppm) 9.09 (d, 2H, J = 6.6 Hz), 8.46 (d, 2H, J = 6.5 Hz), 8.38 (m, 2H), 8.28 (m, 2H), 4.50 (s, 2H), 3.95 (t, 2H, J = 5.8 Hz), 3.63 (t, 2H, J = 6.6 Hz), 1.99 (qt, 2H, J = 7.4 Hz), 1.51 (s, 9H).

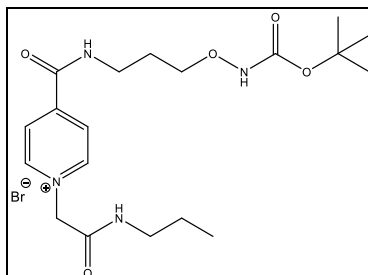
4-((3-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)oxy)propyl)carbamoyl)-1-(2-(dimethylamino)-2-oxoethyl)pyridinium bromide (68e)



65 (566 mg, 1.92 mmol, 1.1 eq) and 2-bromo-*N,N*-dimethylacetamide (288 mg, 1.74 mmol, 1 eq) were stirred for 40 hours in MeCN (10 mL) heated at 50°C. After evaporation of the solvent, the residue was triturated and washed 3 x with Et₂O. The product was purified using column chromatography (SiO₂,

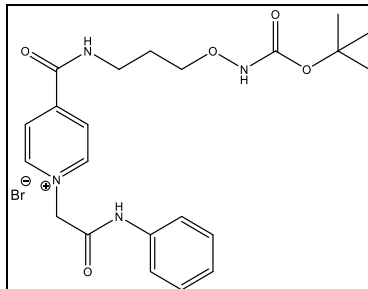
DCM/MeOH 9/1 → MeOH → H₂O) to afford a pink solid in 25% yield (199 mg). **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ (ppm) 9.04 (d, 2H, J = 6.7 Hz), 8.51 (d, 2H, J = 6.9 Hz), 5.85 (s, 2H), 3.97 (t, 2H, J = 5.8 Hz), 3.65 (t, 2H, J = 6.6 Hz), 3.21 (s, 3H), 3.06 (s, 3H), 1.99 (qt, 2H, J = 6.3 Hz), 1.52 (s, 9H). **LRMS (ESI) [M-Br]⁺** m/z calcd for C₁₈H₃₀N₄O₅⁺ 382.21, obsd 382.20.

4-((3-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)oxy)propyl)carbamoyl)-1-(2-oxo-2-(propylamino)ethyl)pyridinium bromide (68f)



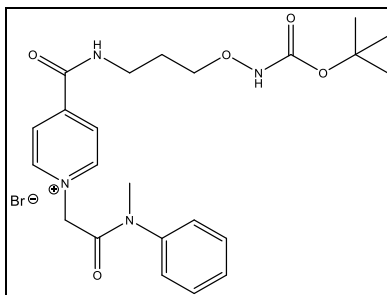
65 (140 mg, 0.47 mmol, 1 eq) and 2-bromo-*N*-propylacetamide (85 mg, 0.47 mmol, 1 eq) were stirred for 40 hours in MeCN (10 mL) heated at 50°C. After evaporation of the solvent, the residue was triturated and washed 3 x with Et₂O. The product was purified using column chromatography (SiO₂, AcOEt/MeOH 9/1 → MeOH) to afford a yellow solid in 47% yield (106 mg). **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ (ppm) 9.14 (d, 2H, J = 6.2 Hz), 8.51 (d, 2H, J = 6.1 Hz), 5.61 (m, 1H), 3.96 (t, 2H, J = 5.4 Hz), 3.64 (t, 2H, J = 6.3 Hz), 3.27 (t, 2H, J = 6.9 Hz), 1.99 (t, 2H, J = 5.9 Hz), 1.61 (qt, 2H, J = 7.2 Hz), 1.51 (s, 9H), 1.00 (t, 3H, J = 7.3 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ (ppm) 164.0, 162.5, 158.1, 149.8, 146.9, 125.4, 80.9, 74.1, 47.0, 41.4, 37.7, 27.2, 26.9, 22.1, 10.3.

4-((3-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)oxy)propyl)carbamoyl)-1-(2-oxo-2-(phenylamino)ethyl)pyridinium bromide (68g)



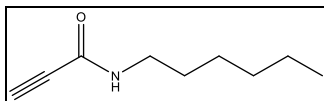
65 (150 mg, 0.51 mmol, 1 eq) and 2-bromo-*N*-phenylacetamide (110 mg, 0.51 mmol, 1 eq) were stirred for 40 hours in MeCN (15 mL) heated at 50°C. After evaporation of the solvent, the residue was triturated and washed 3 x with Et₂O. The product was purified using column chromatography (SiO₂, AcOEt → AcOEt/MeOH 1/1) to afford a white solid in 40% yield (199 mg). **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ (ppm) 9.16 (d, 2H, J = 6.9 Hz), 8.53 (d, 2H, J = 6.8 Hz), 7.62 (d, 2H, J = 7.6 Hz), 7.37 (t, 2H, J = 7.8 Hz), 7.17 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 5.73 (d, 1H, J = 6.6 Hz), 3.97 (t, 2H, J = 5.8 Hz), 3.65 (t, 2H, J = 4.9 Hz), 1.99 (qt, 2H, J = 6.4 Hz), 1.51 (s, 9H). **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ (ppm) 162.6, 162.3, 158.2, 150.0, 147.1, 137.7, 128.3, 125.4, 124.4, 119.6, 80.9, 74.2, 37.8, 27.2, 26.7. **LRMS (ESI) [M-Br]⁺** m/z calcd for C₂₂H₂₉N₄O₅⁺ 429.21, obsd. 429.09.

4-((3-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)oxy)propyl)carbamoyl)-1-(2-(methyl(phenyl)amino)-2-oxoethyl)pyridinium bromide (68h)



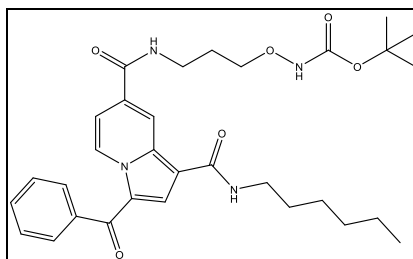
65 (150 mg, 0.51 mmol, 1 eq) and 2-bromo-*N*-methyl-*N*-phenylacetamide (117 mg, 0.51 mmol, 1 eq) were stirred for 40 hours in MeCN (15 mL) heated at 50°C. After evaporation of the solvent, the residue was triturated and washed 3 x with Et₂O. The product was purified using column chromatography (SiO₂, AcOEt → AcOEt/MeOH 1/1) to afford a white solid in 25% yield (66 mg). **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ (ppm) 9.05 (m, 2H), 8.48 (d, 2H, J = 6.8 Hz), 7.63 (m 5H), 5.42 (m, 1H), 3.96 (t, 2H, J = 5.8 Hz), 3.64 (t, 2H, J = 6.6 Hz), 3.38 (s, 3H), 1.98 (qt, 2H, J = 6.2 Hz), 1.51 (s, 9H). **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ (ppm) 163.9, 162.6, 158.1, 149.7, 147.2, 140.9, 130.2, 129.0, 127.4, 127.1, 125.8, 125.4, 125.2, 81.0, 74.2, 37.7, 37.0, 27.3, 26.9. **LRMS (ESI) [M-Br]⁺** m/z calcd for C₂₃H₃₁N₄O₅⁺ 443.23, obsd. 443.11.

***N*-Hexylpropiolamide (69)**



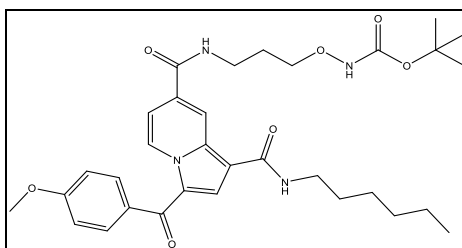
Propiolic acid (504 μL, 8.2 mmol, 1.3 eq) and 4-nitrophenol (880 mg, 6.3 mmol, 1 eq) were solubilized in anhydrous DCM (30 mL). DCC (1.69 g, 8.2 mmol, 1.3 eq) was added in small fractions and the mixture was stirred at room temperature for 4 hours. The urea was filtered off and the filtrate was washed with 3 x 20 mL NaOH 0.2M, followed by 4 x 20 mL H₂O, 20 mL citric acid 10% and 20 mL H₂O again. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford 4-nitrophenyl ester as a white solid in 81% yield (983 mg). The activated ester (200 mg, 1.05 mmol, 1 eq) was then solubilized in anhydrous DCM (5 mL) and the mixture was cooled in an ice-bath. Afterward, a solution of *N*-hexylamine (166 μL, 1.30 mmol, 1.2 eq) in DCM (2 mL) was added dropwise and the reaction was stirred at 0°C for 3 hours before proceeding at room temperature for the night. The mixture was then washed with 2 x 20 mL NaOH 0.5 M and 3 x 20 mL H₂O. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and the product was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 7/3) to afford a yellow oil in 31% yield (51 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 5.89 (bs, 1H), 3.30 (q, 2H, J = 7.0 Hz), 2.77 (s, 1H), 1.54 (m, 2H), 1.30 (s, 6H), 0.89 (t, 3H, J = 6.86 Hz). **¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 152.2, 77.5, 73.0, 39.9, 31.4, 29.1, 26.5, 22.5, 14.0.

***Tert*-butyl (3-(3-benzoyl-1-(hexylcarbamoyl)indolizine-7-carboxamido)propoxy)carbamate (70a)**



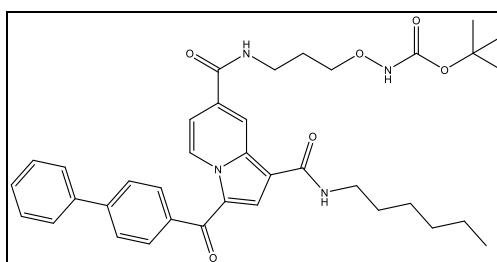
68a (20 mg, 0.04 mmol, 1 eq) and *N*-hexylpropiolamide (6 mg, 0.04 mmol, 1 eq) were dissolved in 4 mL of potassium carbonate solution (pH 7-8). The reaction was stirred at 35°C for 48 hours. The mixture was diluted with DCM (10 mL) and washed with 2 x 15 mL H₂O and 15 mL brine. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was purified twice using column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH 97/3 then cyclohexane/AcOEt 6/4) to afford a yellow solid in 40% yield (9 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 9.88 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 8.98 (s, 1H), 8.04 (bs, 1H), 7.80 (d, 2H, J = 7.2 Hz), 7.69 (s, 2H), 7.58 (m, 2H), 7.53 (m, 2H), 7.48 (s, 1H), 5.92 (bs, 1H), 4.06 (t, 2H, J = 5.4 Hz), 3.68 (q, 2H, J = 5.9 Hz), 3.43 (q, 2H, J = 6.3 Hz), 1.95 (qt, 4H, J = 5.7 Hz), 1.60 (qt, 4H, J = 7.5 Hz), 1.45 (s, 11H), 1.30 (m, 22H), 0.89 (m, 8H). **LRMS (ESI)** [M-H]⁻ m/z calcd for C₃₁H₃₉N₄O₆ 562.29, obsd 562.36.

***Tert*-butyl (3-(1-(hexylcarbamoyl)-3-(4-methoxybenzoyl)indolizine-7-carboxamido)propoxy)carbamate (70b)**



68b (60 mg, 0.11 mmol, 1 eq) and *N*-hexylpropiolamide (18 mg, 0.11 mmol, 1 eq) were dissolved in 6 mL of potassium carbonate solution (pH 7-8). The reaction was stirred at 35°C for 48 hours. The mixture was diluted with DCM (10 mL) and washed with 2 x 15 mL H₂O and 15 mL brine. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 6/4) to afford a yellow solid in 49% yield (33 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 9.75 (d, 1H, J = 7.3 Hz), 8.91 (s, 1H), 8.03 (bs, 1H), 7.90 (bs, 1H), 7.79 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.55 (s, 1H), 7.49 (d, 1H, J = 8.0), 6.97 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 6.25 (bs, 1H), 4.05 (m, 5H), 3.87 (s, 3H), 3.65 (q, 2H, J = 5.6 Hz), 3.42 (q, 2H, J = 6.7 Hz), 1.93 (qt, 2H, J = 5.7 Hz), 1.60 (m, 5H), 1.44 (s, 11H), 1.28 (m, 34H), 0.89 (m, 20H). **LRMS (ESI)** [M-H]⁻ m/z calcd for C₃₂H₄₁N₄O₇ 593.31, obsd 593.37.

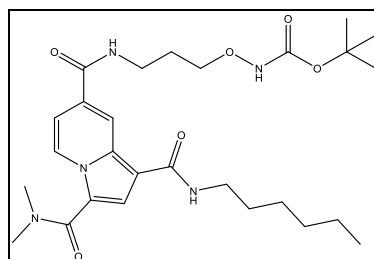
***Tert*-butyl (3-(3-([1,1'-biphenyl]-4-carbonyl)-1-(hexylcarbamoyl)indolizine-7-carboxamido)propoxy)carbamate (70c)**



68c (55 mg, 0.10 mmol, 1 eq) and *N*-hexylpropiolamide (15 mg, 0.10 mmol, 1 eq) were dissolved in 5 mL of potassium carbonate solution (pH 7-8). The reaction was stirred at 35°C for 48 hours. The mixture was diluted with DCM (10 mL) and washed with 2 x 15 mL H₂O and brine (15 mL). The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was purified twice using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 1/1 then 6/4) to afford a yellow solid in 35% yield (21 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 9.81 (dd, 1H, J = 7.3, 0.6 Hz), 8.91 (d, 1H, J = 0.9 Hz), 8.02 (bs, 1H), 7.82 (d, 2H, J = 8.3 Hz), 7.67 (d, 3H, J = 8.3 Hz), 7.59 (d, 2H, J = 7.1 Hz), 7.52 (dd, 1H, J = 7.4, 1.9 Hz), 7.49 (s, 1H), 7.43 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 7.35 (tt, 1H, J = 7.4, 1.2 Hz), 5.95 (bs, 1H), 4.00 (t, 2H, J = 5.3 Hz), 3.61 (q, 2H, J = 5.8 Hz), 3.37 (q, 2H, J = 7.0 Hz), 1.88 (qt, 2H, J = 5.7 Hz), 1.54 (qt, 2H, J = 6.9 Hz), 1.39 (s, 9H), 1.27 (m, 8H), 0.81 (t, 3H, J = 6.9 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 185.0, 165.4, 163.7, 158.0, 144.5, 140.0, 138.5, 138.1, 132.8, 129.6, 129.0,

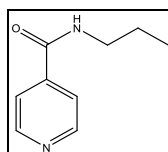
128.3, 128.2, 127.3, 127.2, 124.6, 122.7, 118.7, 113.2, 82.2, 75.8, 39.7, 38.4, 31.6, 29.9, 28.2, 27.4, 26.9, 26.8, 22.6, 14.1. **LRMS (ESI) [M+H]⁺ m/z** calcd for C₃₇H₄₅N₄O₆ 641.33, obsd 641.26.

***Tert*-butyl (3-(3-(dimethylcarbamoyl)-1-(hexylcarbamoyl)indolizine-7-carboxamido)propoxy)carbamate (70d)**



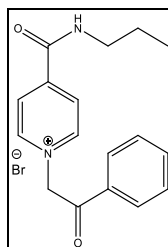
68e (31 mg, 0.07 mmol, 1 eq) and *N*-hexylpropiolamide (22 mg, 0.14 mmol, 2.1 eq) were dissolved in 6 mL of potassium carbonate solution (pH 7-8). The reaction was stirred at 35°C for 48 hours. The mixture was diluted with DCM (10 mL) and washed with 2 x 15 mL H₂O and brine (15 mL). The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was purified twice using column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH 9/1 then cyclohexane/AcOEt 6/4) to afford a yellow solid in 16% yield (6 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 8.84 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz), 8.75 (s, 1H), 7.87 (s, 2H), 7.30 (s, 1H), 6.21 (bs, 1H), 4.03 (m, 4H), 3.63 (q, 2H, *J* = 5.8 Hz), 3.43 (q, 2H, *J* = 6.8 Hz), 3.20 (s, 6H), 1.92 (qt, 2H, *J* = 5.7 Hz), 1.61 (m, 5H), 1.43 (s, 9H), 1.30 (m, 34H), 0.86 (m, 16H).

***N*-Propylisonicotinamide (71)**



Isonicotinic acid (1g, 8.12 mmol, 1 eq) and *N*-propylamine (668 μ L, 8.12 mmol, 1 eq) were dissolved in DCM (20 mL). DCC (2g, 9.74 mmol, 1.2 eq) was added and the mixture was stirred overnight at room temperature. Urea was filtered off and the filtrate was washed with 2 x 20 mL saturated NaHCO₃ and 2 x 20 mL HCl 0.1M then dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford a white solid in 73% yield (984 mg). **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ (ppm) 8.74 (bs, 1H), 8.66 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz), 7.70 (d, 2H, *J* = 5.6 Hz), 3.18 (q, 2H, *J* = 6.7 Hz), 1.50 (sext, 2H), 0.84 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ (ppm) 165.0, 150.7, 142.1, 121.7, 41.5, 22.7, 11.9.

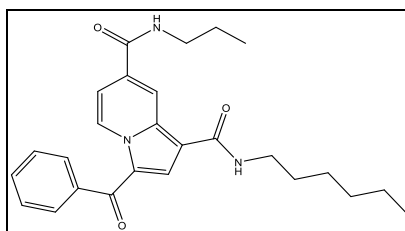
1-(2-oxo-2-phenylethyl)-4-(propylcarbamoyl)pyridinium bromide (72)



71 (200 mg, 1.22 mmol, 1 eq) and 4-bromoacetophenone (243 mg, 1.22 mmol, 1 eq) were solubilized in MeCN (15 mL) and the mixture was stirred at 60°C for 24 hours. After evaporation of the solvent, the residue was triturated and washed 4 x with Et₂O to afford a white solid in 80% yield (355 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 9.08 (s, 2H), 8.52 (d, 2H, *J* = 5.7 Hz), 8.16 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.81 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.68 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 6.51 (m, 1H), 3.47 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 1.74 (sext, 2H, *J* = 7.2 Hz), 1.06 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 189.4, 161.4, 149.9, 146.6,

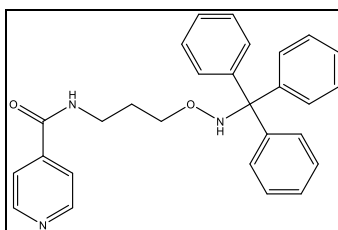
135.2, 133.0, 129.3, 128.8, 126.3, 66.6, 42.4, 22.4, 11.6. **LRMS (ESI)** $[M-Br]^+$ m/z calcd for $C_{17}H_{19}N_2O_2^+$ 283.14, obsd 282.96.

3-Benzoyl-N1-hexyl-N7-propylindolizine-1,7-dicarboxamide (73)



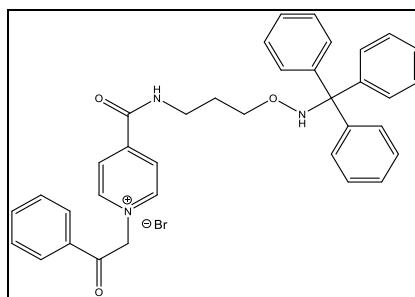
72 (100 mg, 0.28 mmol, 1 eq), *N*-hexylpropiolamide (42 mg, 0.28 mmol, 1 eq) and potassium carbonate (76 mg, 0.56 mmol, 2 eq) were dissolved in DMF (10 mL). The reaction was stirred at 60°C for 22 hours. After evaporation of the solvent, the residue was diluted with DCM (10 mL) and washed with 2 x 15 mL H_2O and brine (15 mL). The organic phase was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was purified using column chromatography (SiO_2 , cyclohexane/ $AcOEt$ 7/3) to afford a beige solid in 14% yield (17 mg). **^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$):** δ (ppm) 9.88 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz), 8.87 (s, 1H), 7.80 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz), 7.60 (m, 2H), 7.53 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz), 6.59 (bs, 1H), 6.02 (bs, 1H), 3.44 (m, 4H), 1.64 (m, 4H), 1.32 (m, 6H), 1.00 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz), 0.86 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz). **LRMS (ESI)** $[M+H]^+$ m/z calcd for $C_{26}H_{31}N_3O_3$ 434.14, obsd 432.32.

***N*-(3-((tritylamino)oxy)propyl)isonicotinamide (74)**



65 (265 mg, 0.90 mmol, 1 eq) was solubilized in TFA/DCM 1/2 (9 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 2 hours. The solvent was removed under reduced pressure and TFA was co-evaporated with 3 x MeCN. The oily residue was diluted with DCM (15 mL) and DIPEA (600 μL , 3.61 mmol, 4 eq) followed by trityl chloride (275 mg, 0.99 mmol, 1.1 eq) were added to the solution which was then stirred overnight at room temperature. The mixture was washed with 4 x 20 mL saturated $NaHCO_3$ and brine (20 mL). The organic phase was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was purified using column chromatography (SiO_2 , $AcOEt$ /cyclohexane 8/2) to afford a white solid in 57% yield (226 mg). **^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$):** δ (ppm) 8.51 (s, 2H), 7.23 (m, 18H), 6.15 (bs, 1H), 3.82 (t, 2H, 5.3 Hz), 3.22 (q, 2H, $J = 5.3$ Hz), 1.68 (qt, 2H, $J = 5.5$ Hz).

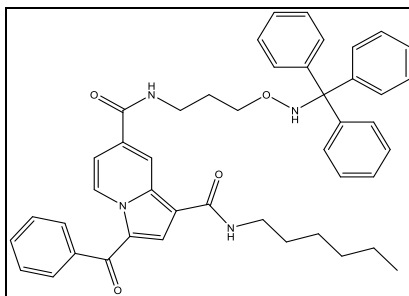
1-(2-oxo-2-phenylethyl)-4-((3-((tritylamino)oxy)propyl)carbamoyl)pyridinium bromide (75)



74 (215 mg, 0.49 mmol, 1 eq) and 4-bromoacetophenone (98 mg, 0.49 mmol, 1 eq) were solubilized in MeCN (10 mL) and the mixture was stirred at 80°C for 48 hours. After evaporation of the solvent, the residue was triturated and washed 4 x with Et_2O to afford a white solid in 62% yield (197 mg). **^1H NMR**

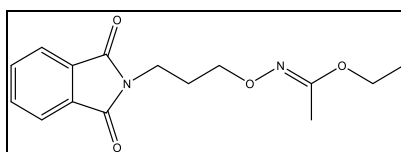
(400 MHz, CD₃CN): δ (ppm) 8.83 (d, 2H, J = 6.9 Hz), 8.50 (d, 2H, J = 6.6 Hz), 8.13 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 7.84 (t, 1H, J = 7.5 Hz), 7.70 (t, 2H, J = 8.0 Hz), 7.39 (m, 17H), 6.40 (s, 2H), 3.48 (q, 2H, J = 7.0 Hz), 3.37 (q, 2H, J = 6.6 Hz), 1.81 (qt, 2H, J = 6.2 Hz).

3-Benzoyl-*N*1-hexyl-*N*7-(3-((tritylamino)oxy)propyl)indolizine-1,7-dicarboxamide (76)



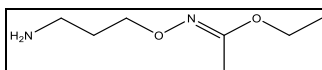
75 (110 mg, 0.17 mmol, 1 eq), *N*-hexylpropiolamide (29 mg, 0.19 mmol, 1.1 eq) and potassium carbonate (48 mg, 0.35 mmol, 2 eq) were dissolved in DMF (4 mL). The reaction was stirred at 80°C for 18 hours. After evaporation of the solvent, the residue was twice purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 7/3 then 8/2) to afford a yellow solid in 10% yield (12 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 9.82 (dd, 1H, J = 7.3, 0.8 Hz), 8.74 (d, 1H, J = 0.9 Hz), 7.82 (m, 2H), 7.60 (m, 1H), 7.53 (m, 2H), 7.47 (s, 1H), 7.26 (m, 19H), 6.46 (m, 1H), 5.94 (m, 1H), 3.27 (q, 2H, J = 6.3 Hz), 1.72 (m, 6H), 1.58 (m, 3H), 1.29 (m, 15H).

Ethyl *N*-(3-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)propoxy)acetimidate (77)



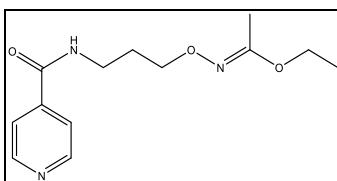
N-(3-Bromopropyl)phthalimide (4.31g, 16.08 mmol, 1 eq), ethyl *N*-hydroxyethanimidate (1.99g, 19.30, 1.2 eq) and potassium *tert*-butoxide (3.60g, 32.16 mmol, 2 eq) were solubilized in DMF (30 mL) and agitated at room temperature for the weekend. After evaporation of the solvent, the resulting brown oil was diluted in water (50 mL) and extracted with 3 x 50 mL DCM. The organic phases were combined and dried over MgSO₄, filtered then concentrated under reduced pressure. The product was purified using column chromatography (SiO₂, DCM/AcOEt 9/1) to afford a white solid (2.99 g, yield: 64%). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 7.84 (m, 2H), 7.71 (m, 2H), 3.98 (m, 4H), 3.80 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 2.05 (qt, 2H, J = 6.3 Hz), 1.05 (s, 3H), 1.25 (t, 3H, J = 7.2 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 168.3, 162.4, 133.9, 132.2, 123.1, 70.9, 62.1, 35.6, 27.9, 14.4, 13.5.

Ethyl *N*-(3-aminopropoxy)acetimidate (78)



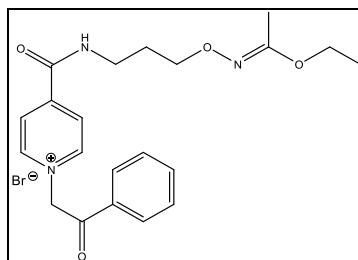
77 (2.99 g, 10.27 mmol, 1 eq) was solubilized in MeOH (100 mL) then 3-amino-1-propanol (7.8 mL, 10.27 mmol, 1 eq) was added under vigorous stirring and the reaction proceeds under reflux overnight. After evaporation of the solvent, the resulting oil was diluted in H₂O (50 mL) and extracted with 3 x 30 mL Et₂O. The combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford a colorless oil in 60% yield (987 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 3.99 (m, 4H), 2.79 (t, 2H, J = 6.8 Hz), 1.92 (s, 3H), 1.77 (qt, 2H, J = 6.4 Hz), 1.26 (t, 3H, J = 7.1 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** 162.2, 71.4, 62.1, 39.5, 33.0, 14.4, 13.6.

Ethyl N-(3-(isonicotinamido)propoxy)acetimidate (79)



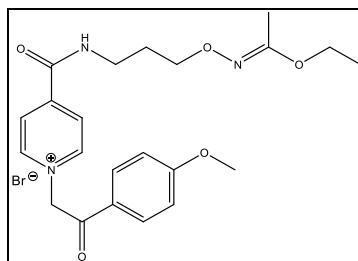
4-Nitrophenyl isonicotinate (1.35 g, 5.53 mmol, 1 eq) and **78** (987 mg, 6.17 mmol, 1.11 eq) were dissolved in anhydrous DCM (50 mL) and the mixture was stirred at 50°C overnight. After evaporation of the solvent, the oily residue was purified using column chromatography (SiO₂, AcOEt/cyclohexane 7/3) to afford a viscous colorless oil in 77% yield (1.13 g). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 8.72 (dd, 2H, J = 4.4, 1.6 Hz), 7.57 (dd, 2H, J = 4.4, 1.7 Hz), 6.76 (bs, 1H), 4.05 (t, 2H, J = 5.6 Hz), 3.98 (q, 2H, J = 7.0 Hz), 3.60 (q, 2H, J = 6.2 Hz), 1.98 (qt, 2H, J = 6.0 Hz), 1.91 (s, 3H), 1.25 (t, 3H, J = 7.1 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 165.4, 162.9, 150.5, 142.0, 120.8, 72.1, 62.4, 38.4, 28.4, 14.4, 13.8.

4-((3-(((1-ethoxyethylidene)amino)oxy)propyl)carbamoyl)-1-(2-oxo-2-phenylethyl)pyridinium bromide (80a)



79 (330 mg, 1.24 mmol, 1 eq) and 2-bromoacetophenone (248 mg, 1.24 mmol, 1 eq) were dissolved in MeCN (15 mL) and the mixture was stirred at 80°C for 48 hours. After evaporation of the solvent, the oily residue was triturated in and washed with 4 x 20 mL Et₂O to afford a white solid in 89% yield (515 mg). **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ (ppm) 9.10 (d, 2H, J = 6.4 Hz), 8.53 (d, 2H, J = 6.4 Hz), 8.16 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 7.81 (t, 1H, J = 7.2 Hz), 7.68 (t, 2H, J = 7.7 Hz), 6.53 (m, 1H), 4.05 (m, 4H), 3.61 (t, 2H, J = 7.1 Hz), 2.06 (qt, 2H, J = 6.4 Hz), 1.95 (s, 3H), 1.30 (t, 3H, 7.1 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ (ppm) 190.9, 164.1, 163.7, 151.6, 148.6, 136.1, 134.9, 130.3, 129.5, 126.9, 71.9, 63.3, 39.0, 29.6, 14.7, 13.6. **HRMS (ESI) [M-Br]⁺ m/z** calcd for C₂₁H₂₆N₄O₃ 384.19178, obsd 384.19166.

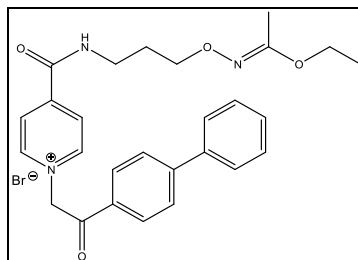
4-((3-(((1-ethoxyethylidene)amino)oxy)propyl)carbamoyl)-1-(2-(4-methoxyphenyl)-2-oxoethyl)pyridinium bromide (80b)



79 (187 mg, 0.71 mmol, 1 eq) and 2-bromo-4'-methoxyacetophenone (162 mg, 0.71 mmol, 1 eq) were dissolved in MeCN (5 mL) and the mixture was stirred at 80°C for 48 hours. After evaporation of the solvent, the oily residue was triturated and washed with 4 x 20 mL Et₂O to afford a yellowish white solid in 72% yield (253 mg). **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ (ppm) 9.08 (d, 2H, J = 6.4 Hz), 8.51 (d, 2H, J = 4.1 Hz), 8.13 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.17 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 6.46 (m, 1H), 4.03 (m, 4H), 3.96 (s, 3H), 3.60 (t, 2H, J = 7.0 Hz), 2.05 (qt, 2H, J = 6.4 Hz), 1.95 (s, 3H), 1.29 (t, 3H, J = 7.1 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ (ppm) 187.7, 165.3, 162.7, 162.3, 150.0, 147.2, 130.6, 126.2, 125.4, 114.1, 70.5,

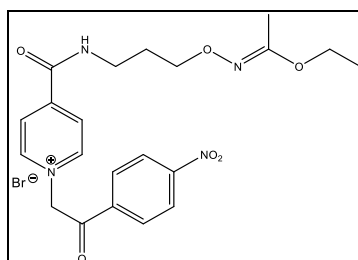
61.8, 54.9, 37.6, 28.2, 13.3, 12.2. **HRMS (ESI)** $[M-Br]^+$ m/z calcd for $C_{22}H_{28}N_5O_3$ 414.20235, obsd 414.20213.

1-(2-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-oxoethyl)-4-((3-(((1-ethoxyethylidene)amino)oxy)propyl)carbamoyl)pyridinium bromide (80c)



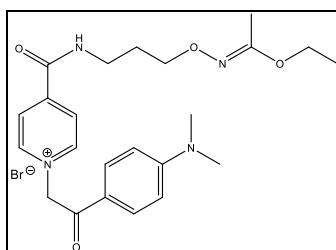
79 (171 mg, 0.64 mmol, 1 eq) and 2-bromo-4'-phenylacetophenone (177 mg, 0.64 mmol, 1 eq) were dissolved in MeCN (5 mL) and the mixture was stirred at 80°C for 48 hours. The precipitate was washed with 4 x 20 mL Et₂O to afford an orange solid in 81% yield (282 mg). **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ (ppm) 9.11 (d, 2H, J = 6.7 Hz), 8.53 (d, 2H, J = 6.7 Hz), 8.23 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.94 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.77 (d, 2H, J = 7.3 Hz), 7.55 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 7.47 (t, 1H, J = 7.2 Hz), 6.55 (s, 2H), 4.03 (m, 4H), 3.61 (t, 2H, J = 7.0 Hz), 2.01 (qt, 2H, J = 6.4 Hz), 1.95 (s, 3H), 1.29 (t, 3H, J = 7.1 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ (ppm) 189.0, 162.7, 150.1, 147.5, 147.2, 139.2, 132.1, 128.8, 4.03 (m, 4H), 3.61 (t, 2H, J = 7.0 Hz), 2.01 (qt, 2H, J = 6.4 Hz), 1.95 (s, 3H), 1.29 (t, 3H, J = 7.1 Hz). 128.4, 127.3, 126.9, 125.4, 70.5, 61.8, 37.6, 28.1, 13.3, 12.2. **HRMS (ESI)** $[M-Br]^+$ m/z calcd for $C_{27}H_{30}N_4O_3$ 460.22308, obsd 460.22208.

4-((3-(((1-ethoxyethylidene)amino)oxy)propyl)carbamoyl)-1-(2-(4-nitrophenyl)-2-oxoethyl)pyridinium bromide (80d)



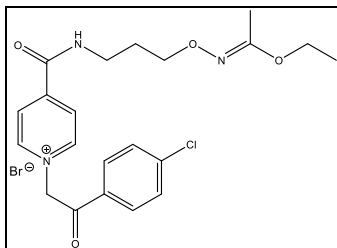
79 (124 mg, 0.47 mmol, 1.05 eq) and 2-bromo-4'-nitroacetophenone (109 mg, 0.45 mmol, 1 eq) were dissolved in MeCN (5 mL) and the mixture was stirred at 80°C for 24 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was washed with 3 x 10 mL Et₂O and 2 x 10 mL pentane to afford a beige solid in 80% yield (183 mg). **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ (ppm) 9.10 (d, 2H, J = 6.7 Hz), 8.54 (d, 2H, J = 6.8 Hz), 8.50 (dd, 2H, J = 6.9, 1.9 Hz), 8.38 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 6.58 (m, 2H), 4.03 (m, 4H), 3.61 (t, 2H, J = 7.1 Hz), 2.05 (qt, 2H, J = 6.2 Hz), 1.95 (s, 3H), 1.29 (t, 3H, J = 7.1 Hz). **HRMS (ESI)** $[M-Br]^+$ m/z calcd for $C_{21}H_{25}N_6O_4$ 429.17686, obsd 429.17647.

1-(2-(4-(dimethylamino)phenyl)-2-oxoethyl)-4-((3-(((1-ethoxyethylidene)amino)oxy)propyl)carbamoyl)pyridinium bromide (80e)



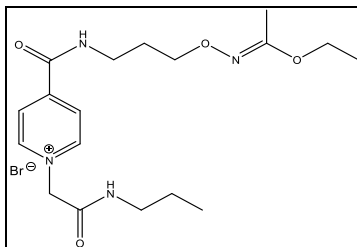
79 (203 mg, 0.77 mmol, 1 eq) and 2-bromo-1-(4-dimethylamino-phenyl)-ethanone (185 mg, 0.77 mmol, 1 eq) were dissolved in acetone (10 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 48 hours. The precipitate was filtered and washed with 4 x 20 mL Et₂O to afford an orange solid in 70% yield (280 mg). **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ (ppm) 9.06 (d, 2H, J = 6.3 Hz), 8.50 (d, 2H, J = 6.4 Hz), 7.99 (d, 2H, J = 8.9 Hz), 6.88 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 4.04 (m, 4H), 3.61 (t, 2H, J = 7.1 Hz), 3.17 (s, 6H), 2.05 (qt, 2H, J = 6.5 Hz), 1.95 (s, 3H), 1.30 (t, 3H, J = 7.1 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ (ppm) 186.2, 162.7, 162.3, 154.9, 149.7, 147.1, 130.4, 125.2, 120.3, 110.7, 70.4, 61.8, 38.7, 37.5, 28.1, 13.3, 12.2. **HRMS (ESI) [M-Br]⁺** m/z calcd for C₂₃H₃₁N₄O₄ 427.23398, obsd 427.23398.

1-(2-(4-chlorophenyl)-2-oxoethyl)-4-((3-(((1-ethoxyethylidene)amino)oxy)propyl)carbamoyl)pyridinium bromide (80f)



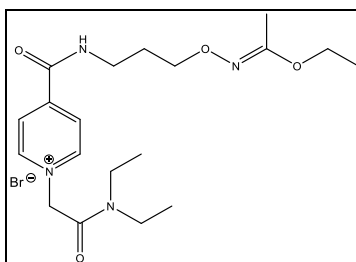
79 (158 mg, 0.60 mmol, 1.05 eq) and 2-bromo-4'-chloroacetophenone (133 mg, 0.57 mmol, 1 eq) were dissolved in MeCN (5 mL) and the mixture was stirred at 80°C for 48 hours. After removal of the solvent, the residue was washed with 3 x 10 mL Et₂O and 2 x 10 mL pentane to afford a white solid in 81% yield (230 mg). **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ (ppm) 9.08 (d, 2H, J = 6.9 Hz), 8.53 (d, 2H, J = 6.8 Hz), 8.14 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 7.7 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 6.50 (m, 1H), 4.04 (m, 4H), 3.61 (t, 2H, J = 7.1 Hz), 2.05 (qt, 2H, J = 6.6 Hz), 1.95 (s, 3H), 1.29 (t, 3H, J = 7.1 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ (ppm) 188.4, 162.6, 162.4, 150.1, 147.2, 141.1, 132.0, 129.7, 129.2, 125.5, 70.5, 61.9, 37.6, 28.2, 13.4, 12.4. **HRMS (ESI) [M-Br]⁺** m/z calcd for C₂₁H₂₅N₃O₄Cl 418.15281, obsd 418.15275.

4-((3-(((1-ethoxyethylidene)amino)oxy)propyl)carbamoyl)-1-(2-oxo-2-(propylamino)ethyl)pyridinium bromide (80g)



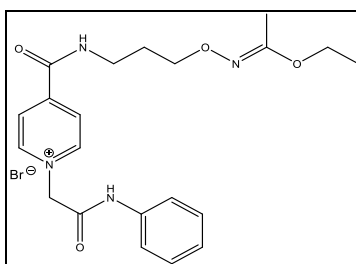
79 (201 mg, 0.76 mmol, 1.05 eq) and 2-bromo-N-propylacetamide (129 mg, 0.72 mmol, 1 eq) were dissolved in MeCN (5 mL) in a round-bottom flask and the mixture was stirred at room temperature for the weekend. After evaporation of the solvent under reduced pressure, the oily residue was washed with 3 x 20 mL Et₂O and 3 x 20 mL pentane to afford a pink solid in 63% yield (392 mg). **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ (ppm) 9.10 (d, 2H, J = 6.8 Hz), 8.46 (d, 2H, J = 6.9 Hz), 5.56 (s, 2H), 4.03 (m, 4H), 3.59 (t, 2H, J = 7.1 Hz), 2.03 (qt, 2H, J = 6.8 Hz), 1.94 (s, 3H), 1.62 (sext, 2H, J = 7.2 Hz), 1.29 (t, 3H, J = 7.1 Hz), 1.00 (t, 3H, J = 7.4 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ (ppm) 164.0, 162.6, 162.2, 149.9, 147.0, 125.2, 70.4, 61.8, 61.6, 41.4, 37.5, 28.1, 22.0, 13.3, 12.2, 10.3. **HRMS (ESI) [M-Br]⁺** m/z calcd for C₁₈H₂₉N₄O₄ 365.21833, obsd 365.21780.

1-(2-(diethylamino)-2-oxoethyl)-4-((3-(((1-ethoxyethylidene)amino)oxy)propyl)carbamoyl)bromide (80h)



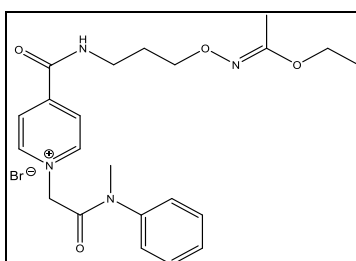
79 (192 mg, 0.72 mmol, 1.05 eq) and 2-bromo-*N,N*-diethylacetamide (133 mg, 0.69 mmol, 1 eq) were dissolved in MeCN (5 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 48 hours. After evaporation of the solvent, the oily residue was washed with 3 x 20 mL Et₂O and 3 x 20 mL pentane to afford a pale pink solid in 81% yield (259 mg). **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ (ppm) 9.08 (d, 2H, *J* = 4.8 Hz), 8.47 (d, 2H, *J* = 5.3 Hz), 5.86 (s, 2H), 4.03 (m, 4H), 3.54 (m, 6H), 2.04 (qt, 2H, *J* = 6.5 Hz), 1.94 (s, 3H), 1.39 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz), 1.29 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz), 1.21 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ (ppm) 164.1, 163.7, 151.4, 148.7, 126.6, 71.9, 63.2, 42.8, 42.4, 39.0, 29.6, 14.7, 14.1, 13.7, 13.0. **HRMS (ESI)** [M-Br]⁺ *m/z* calcd for C₁₉H₃₁N₄O₄ 379.23398, obsd 379.23359.

4-((3-(((1-ethoxyethylidene)amino)oxy)propyl)carbamoyl)-1-(2-oxo-2-(phenylamino)ethyl)pyridinium bromide (80i)



79 (184 mg, 0.69 mmol, 1.05 eq) and 2-bromo-*N*-phenylacetamide (142 mg, 0.66 mmol, 1 eq) were dissolved in MeCN (5 mL) and the mixture was stirred at room temperature for the weekend. After evaporation of the solvent, the oily residue was washed with 3 x 20 mL Et₂O and 3 x 20 mL pentane to afford a purple solid in 83% yield (264 mg). **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ (ppm) 9.16 (d, 2H, *J* = 6.7 Hz), 8.49 (d, 2H, *J* = 6.6 Hz), 7.62 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz), 7.38 (t, 2H, *J* = 7.9 Hz), 7.18 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz), 5.74 (s, 2H), 4.03 (m, 4H), 3.60 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz), 2.04 (qt, 2H, *J* = 6.6 Hz), 1.95 (s, 3H), 1.29 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ (ppm) 162.6, 162.2, 150.0, 147.1, 137.6, 128.6, 125.2, 124.4, 119.6, 70.4, 61.8, 37.5, 28.1, 13.2, 12.2. **HRMS (ESI)** [M-Br]⁺ *m/z* calcd for C₂₁H₂₇N₄O₄ 399.20268, obsd 399.20259.

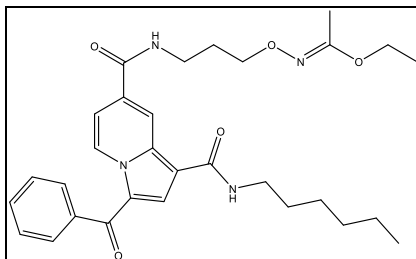
4-((3-(((1-ethoxyethylidene)amino)oxy)propyl)carbamoyl)-1-(2-(methyl(phenyl)amino)-2-oxoethyl)pyridinium bromide (80j)



79 (287 mg, 1.08 mmol, 1.05 eq) and 2-bromo-*N*-methyl-*N*-phenylacetamide (235 mg, 1.03 mmol, 1 eq) were dissolved in MeCN (5 mL) and the mixture was stirred at room temperature for the weekend. After evaporation of the solvent, the resulting solid was washed with 3 x 20 mL Et₂O and 3 x 20 mL

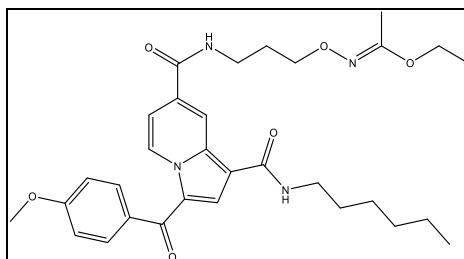
pentane to afford a pale purple solid in 77% yield (392 mg). **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ (ppm) 9.04 (d, 2H, J = 6.3 Hz), 8.43 (d, 2H, J = 6.6 Hz), 7.61 (m, 5H), 5.44 (s, 2H), 4.03 (m, 4H), 3.60 (t, 2H, J = 7.0 Hz), 3.39 (s, 3H), 2.04 (qt, 2H, J = 6.6 Hz), 1.94 (s, 3H), 1.29 (t, 3H, J = 7.1 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ (ppm) 163.8, 162.6, 162.2, 149.9, 147.2, 140.9, 130.1, 129.0, 127.3, 125.0, 70.4, 61.8, 37.5, 36.9, 28.1, 13.2, 12.1. **HRMS (ESI) [M-Br]⁺** m/z calcd for C₂₂H₂₉N₄O₄ 413.21833, obsd 413.21807.

Ethyl N-(3-(3-benzoyl-1-(hexylcarbamoyl)indolizine-7-carboxamido)propoxy)acetimidate (81a)



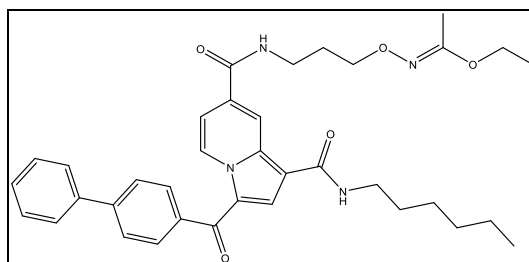
80a (100 mg, 0.22 mmol, 1 eq), *N*-hexylpropiolamide (36 mg, 0.24 mmol, 1.1 eq) and potassium carbonate (60 mg, 0.43, 2 eq) were dissolved in MeCN (3 mL) and stirred at 70°C for 18 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 7/3) to afford a viscous yellow residue in 15% yield (17 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 9.85 (dd, 1H, J = 9.6, 0.7 Hz), 8.86 (d, 1H, J = 0.9 Hz), 7.78 (d, 2H, J = 6.9 Hz), 7.52 (m, 5H), 6.93 (bs, 1H), 6.15 (bs, 1H), 4.01 (m, 4H), 3.58 (q, 2H, J = 6.4 Hz), 3.41 (q, 2H, J = 6.7 Hz), 1.98 (qt, 2H, J = 6.2 Hz), 1.94 (s, 3H), 1.59 (qt, 2H, J = 7.3 Hz), 1.31 (m, 9H), 0.87 (t, 3H, J = 6.9 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 185.4, 165.2, 163.8, 162.7, 139.8, 138.1, 132.4, 131.6, 128.9, 128.5, 124.3, 122.6, 117.6, 114.0, 111.3, 71.4, 62.3, 38.7, 38.1, 31.5, 29.9, 28.8, 26.8, 22.6, 14.4, 14.0, 13.8. **LRMS (ESI) [M+H]⁺** m/z calcd for C₃₀H₃₉N₄O₅ 535.28, obsd 535.31.

Ethyl N-(3-(1-(hexylcarbamoyl)-3-(4-methoxybenzoyl)indolizine-7-carboxamido)propoxy)acetimidate (81b)



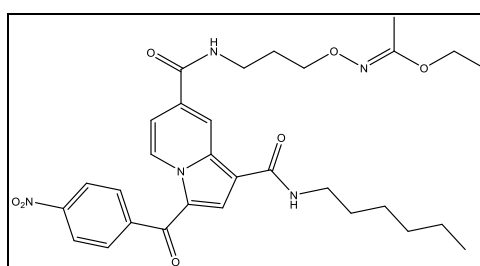
80a (100 mg, 0.20 mmol, 1 eq), *N*-hexylpropiolamide (46 mg, 0.30 mmol, 1.5 eq) and potassium carbonate (58 mg, 0.40, 2 eq) were dissolved in MeCN (3 mL) and stirred at 70°C for 18 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 8/2 → 7/3) to afford a viscous yellow residue in 18% yield (21 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 9.77 (dd, 1H, J = 7.3, 0.6 Hz), 8.21 (d, 1H, J = 0.9 Hz), 7.81 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.51 (m, 2H), 7.06 (t, 1H, J = 5.5 Hz), 7.99 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 6.21 (m, 1H), 4.02 (m, 4H), 3.89 (s, 3H), 3.59 (q, 2H, J = 6.4 Hz), 3.43 (q, 2H, J = 6.8 Hz), 1.99 (qt, 2H, J = 6.4 Hz), 1.94 (s, 3H), 1.61 (qt, 2H, J = 7.3 Hz), 1.32 (m, 9H), 0.89 (t, 3H, J = 6.9 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 184.4, 165.2, 163.9, 162.7, 137.8, 132.2, 132.1, 131.2, 128.4, 123.5, 122.8, 117.5, 113.8, 113.7, 110.9, 71.4, 62.3, 55.5, 39.6, 38.0, 31.5, 29.9, 28.8, 26.7, 22.6, 14.4, 14.0, 13.8. **HRMS (ESI) [M-H]⁻** m/z calcd for C₃₁H₃₉N₄O₆ 563.28751, obsd 563.28694.

Ethyl N-(3-(3-([1,1'-biphenyl]-4-carbonyl)-1-(hexylcarbamoyl)indolizine-7-carboxamido)propoxy)acetimidate (81c)



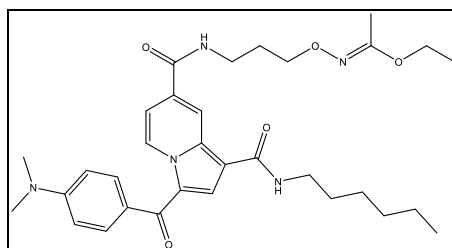
80c (100 mg, 0.19 mmol, 1 eq), *N*-hexylpropiolamide (43 mg, 0.28 mmol, 1.5 eq) and potassium carbonate (51 mg, 0.37, 2 eq) were dissolved in MeCN (3 mL) and stirred at 70°C for 18 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 7/3) to afford a viscous orange residue in 15% yield (17 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 9.85 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 8.85 (s, 1H), 7.86 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz), 7.71 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz), 7.62 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz), 7.56 (s, 1H), 7.50 (m, 3H), 7.40 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz), 6.89 (m, 1H), 6.20 (m, 1H), 4.02 (m, 4H), 3.59 (q, 2H, *J* = 6.3 Hz), 3.42 (q, 2H, *J* = 6.5 Hz), 1.98 (qt, 2H, *J* = 6.3 Hz), 1.95 (s, 3H), 1.60 (qt, 2H, *J* = 7.2 Hz), 1.31 (m, 9H), 0.87 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 185.0, 165.2, 163.9, 162.8, 144.5, 139.9, 138.4, 138.1, 132.4, 129.6, 129.0, 128.5, 128.2, 127.2, 127.1, 124.2, 122.7, 117.6, 114.0, 111.3, 71.4, 62.3, 39.7, 38.0, 31.5, 29.9, 28.8, 26.8, 22.6, 14.4, 14.0, 13.8. **HRMS (ESI)** [M-H]⁻ *m/z* calcd for C₃₆H₄₁N₄O₅ 609.30824, obsd 609.30743.

Ethyl N-(3-(1-(hexylcarbamoyl)-3-(4-nitrobenzoyl)indolizine-7-carboxamido)propoxy)acetimidate (81d)



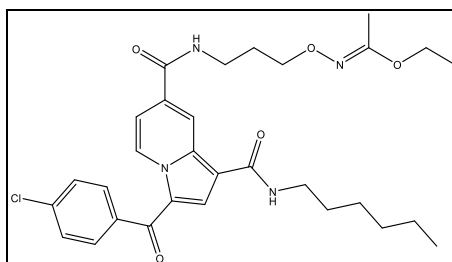
80d (100 mg, 0.20 mmol, 1 eq), *N*-hexylpropiolamide (33 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) and potassium carbonate (56 mg, 0.40, 2 eq) were dissolved in MeCN (3 mL) and stirred at 70°C for 18 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 7/3) to afford an orange residue in 9% yield (10 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 9.88 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 8.89 (s, 1H), 8.33 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz), 7.93 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.60 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 7.47 (s, 1H), 6.96 (bs, 1H), 6.21 (bs, 1H), 4.01 (m, 4H), 3.59 (q, 2H, *J* = 6.3 Hz), 3.41 (q, 2H, *J* = 6.7 Hz), 1.97 (qt, 2H, *J* = 6.4 Hz), 1.93 (s, 3H), 1.58 (qt, 2H, *J* = 7.2 Hz), 1.30 (m, 9H), 0.86 (t, 3H, *J* = 6.6 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 182.8, 164.9, 163.4, 162.8, 149.3, 145.2, 138.8, 133.2, 129.8, 128.6, 124.6, 123.6, 122.0, 117.8, 114.6, 112.2, 71.4, 62.3, 39.7, 38.2, 31.5, 29.7, 28.7, 26.7, 22.6, 14.4, 14.0, 13.8. **HRMS (ESI)** [M-H]⁻ *m/z* calcd for C₃₀H₃₆N₅O₇ 578.26202, obsd 578.26120.

Ethyl N-(3-(3-(4-(dimethylamino)benzoyl)-1-(hexylcarbamoyl)indolizine-7-carboxamido)propoxy)acetimidate (81e)



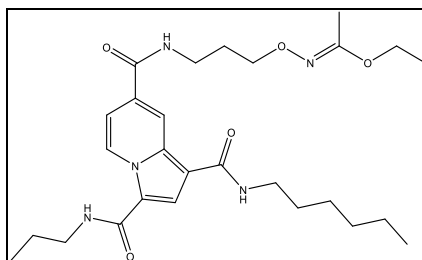
80e (100 mg, 0.20 mmol, 1 eq), *N*-hexylpropiolamide (30 mg, 0.20 mmol, 1 eq) and potassium carbonate (54 mg, 0.39, 2 eq) were dissolved in MeCN (3 mL) and stirred at 70°C for 18 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 6/4) to afford an orange solid in 34% yield (39 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 9.69 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 8.82 (s, 1H), 7.79 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.52 (s, 1H), 7.44 (dd, 1H, *J* = 7.4, 1.9 Hz), 6.90 (m, 1H), 6.73 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 6.22 (bs, 1H), 4.01 (m, 4H), 3.58 (q, 2H, *J* = 6.4 Hz), 3.43 (q, 2H, *J* = 6.7 Hz), 3.06 (s, 6H), 1.98 (qt, 2H, *J* = 6.2 Hz), 1.94 (s, 3H), 1.61 (qt, 2H, *J* = 7.3 Hz), 1.31 (m, 9H), 0.87 (t, 3H, *J* = 6.6 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 184.1, 165.5, 164.2, 162.7, 152.9, 137.2, 131.5, 128.1, 126.5, 123.2, 123.1, 117.6, 113.1, 110.9, 110.6, 71.3, 62.3, 40.1, 39.7, 37.9, 31.5, 29.9, 28.8, 26.8, 22.6, 14.4, 14.0, 13.8. **HRMS (ESI)** [M-H]⁻ *m/z* calcd for C₃₂H₄₂N₅O₅ 576.31914, obsd 576.31853.

Ethyl N-(3-(3-(4-chlorobenzoyl)-1-(hexylcarbamoyl)indolizine-7-carboxamido)propoxy)acetimidate (81f)



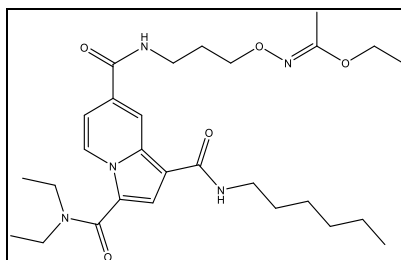
80f (100 mg, 0.20 mmol, 1 eq), *N*-hexylpropiolamide (34 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) and potassium carbonate (56 mg, 0.40, 2 eq) were dissolved in MeCN (3 mL) and stirred at 70°C for 18 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 7/3) to afford a yellow residue in 8% yield (9 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 9.81 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 8.85 (s, 1H), 7.73 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz), 7.53 (d, 1H, *J* = 7.1 Hz), 7.46 (m, 3H), 6.97 (bs, 1H), 6.16 (bs, 1H), 4.01 (m, 4H), 3.58 (q, 2H, *J* = 6.3 Hz), 3.41 (q, 2H, *J* = 6.6 Hz), 1.98 (qt, 2H, *J* = 6.2 Hz), 1.93 (s, 3H), 1.59 (qt, 2H, *J* = 7.2 Hz), 1.31 (m, 9H), 0.87 (t, 3H, *J* = 6.6 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 184.0, 165.1, 163.7, 162.7, 138.2, 138.1, 138.0, 132.7, 130.3, 128.8, 128.5, 124.1, 122.3, 117.6, 114.2, 111.4, 71.4, 62.3, 39.7, 38.1, 31.5, 29.9, 28.8, 26.7, 22.6, 14.4, 14.0, 13.8. **HRMS (ESI)** [M-H]⁻ *m/z* calcd for C₃₀H₃₆N₄O₅Cl 567.23797, obsd 567.23732.

Ethyl N-(3-(1-(hexylcarbamoyl)-3-(propylcarbamoyl)indolizine-7-carboxamido)propoxy)acetimidate (81g)



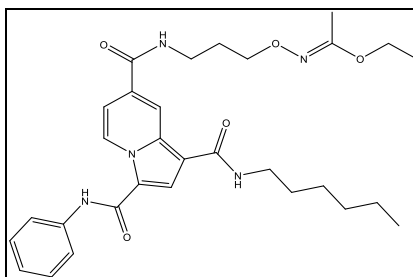
80g (99 mg, 0.22 mmol, 1 eq), *N*-hexylpropiolamide (38 mg, 0.25 mmol, 1.1 eq) and potassium carbonate (62 mg, 0.45, 2 eq) were dissolved in MeCN (3 mL) and stirred at 70°C for 18 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 4/6) to afford a white solid in 24% yield (28 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 9.34 (d, 1H, *J* = 6.7 Hz), 8.49 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.14 (dd, 1H, *J* = 7.4, 1.8 Hz), 6.89 (t, 1H, 5.5 Hz), 6.41 (t, 1H, 5.6 Hz), 6.27 (t, 1H, 5.5 Hz), 4.00 (m, 4H, *J* = 6.4 Hz), 3.56 (q, 2H, *J* = 6.4 Hz), 3.39 (qt, 4H, *J* = 6.2 Hz), 1.97 (qt, 2H, *J* = 6.2 Hz), 1.92 (s, 3H), 1.61 (m, 4H), 1.32 (m, 6H), 1.26 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz), 0.99 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz), 0.88 (t, 3H, *J* = 6.7 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 165.9, 164.2, 162.6, 161.3, 135.1, 129.4, 127.0, 118.1, 117.3, 115.0, 111.8, 109.9, 71.4, 62.2, 41.2, 39.7, 37.9, 31.6, 29.7, 28.8, 26.8, 23.1, 22.6, 14.4, 14.0, 13.8, 11.5. **HRMS (ESI) [M-H]⁻** *m/z* calcd for C₂₇H₄₀N₅O₅ 514.30349, obsd 514.30262.

Ethyl N-(3-(3-(diethylcarbamoyl)-1-(hexylcarbamoyl)indolizine-7-carboxamido)propoxy)acetimidate (81h)



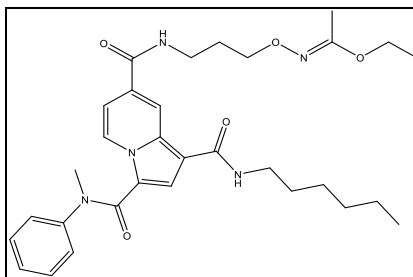
80h (100 mg, 0.22 mmol, 1 eq), *N*-hexylpropiolamide (43 mg, 0.28 mmol, 1.3 eq) and potassium carbonate (60 mg, 0.44, 2 eq) were dissolved in MeCN (3 mL) and stirred at 70°C for 18 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 4/6) to afford a pale yellow solid in 33% yield (38 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 8.64 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz), 8.59 (s, 1H), 7.21 (dd, 1H, *J* = 7.3, 1.4 Hz), 7.12 (s, 1H), 7.02 (m, 1H), 6.27 (bs, 1H), 4.00 (m, 4H), 3.55 (m, 6H, *J* = 6.5 Hz), 3.42 (q, 2H, *J* = 6.5 Hz), 1.96 (m, 5H), 1.62 (qt, 2H, *J* = 6.5 Hz), 1.31 (m, 15H), 0.88 (t, 3H, *J* = 6.7 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 165.8, 164.4, 162.6, 162.4, 134.5, 129.0, 126.5, 118.4, 117.6, 114.9, 111.8, 109.5, 71.4, 62.2, 41.6, 39.7, 37.8, 31.6, 29.9, 28.9, 26.8, 22.6, 14.4, 14.0, 13.7. **HRMS (ESI) [M-H]⁻** *m/z* calcd for C₂₈H₄₂N₅O₅ 528.31914, obsd 528.31850.

Ethyl N-(3-(1-(hexylcarbamoyl)-3-(phenylcarbamoyl)indolizine-7-carboxamido)propoxy)acetimidate (81i)



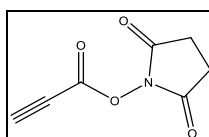
80i (100 mg, 0.21 mmol, 1 eq), N-hexylpropiolamide (41 mg, 0.27 mmol, 1.3 eq) and potassium carbonate (57 mg, 0.42, 2 eq) were dissolved in MeCN (3 mL) and stirred at 70°C for 18 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 4/6) to afford a yellow oily residue in 23% yield (27 mg). **¹H NMR (400 MHz, acetone d₆):** δ (ppm) 9.54 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 8.81 (s, 1H), 8.22 (m, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.86 (d, 2H, J = 8.0 Hz), 7.51 (bs, 1H), 7.39 (t, 3H, J = 7.9 Hz), 7.14 (t, 1H, J = 7.4 Hz), 4.03 (m, 4H), 3.57 (q, 2H, J = 6.5 Hz), 3.44 (q, 2H, J = 6.3 Hz), 2.02 (qt, 2H, J = 6.6 Hz), 1.92 (s, 3H), 1.65 (qt, 2H, J = 7.3 Hz), 1.38 (m, 6H), 1.26 (t, 3H, J = 7.1 Hz), 0.91 (t, 3H, J = 6.7 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, acetone d₆):** δ (ppm) 166.0, 164.5, 162.3, 160.5, 140.1, 136.8, 130.5, 129.6, 127.6, 124.4, 120.8, 119.2, 118.8, 118.2, 112.6, 111.6, 71.9, 62.7, 39.9, 37.9, 32.4, 30.7, 27.6, 23.3, 14.7, 14.3, 13.6. **HRMS (ESI)** [M-H]⁻ m/z calcd for C₃₀H₃₈N₅O₅ 548.28784, obsd 548.28705.

Ethyl N-(3-(1-(hexylcarbamoyl)-3-(methyl(phenyl)carbamoyl)indolizine-7-carboxamido)propoxy)acetimidate (81j)



80j (100 mg, 0.20 mmol, 1 eq), N-hexylpropiolamide (40 mg, 0.26 mmol, 1.3 eq) and potassium carbonate (56 mg, 0.40, 2 eq) were dissolved in MeCN (3 mL) and stirred at 70°C for 18 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 4/6) to afford a yellow solid in 42% yield (48 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 9.36 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 8.61 (s, 1H), 7.34 (m, 4H), 7.18 (d, 2H), 6.85 (bs, 1H), 6.01 (s, 1H), 5.39 (bs, 1H), 3.98 (m, 4H), 3.55 (q, 2H, J = 6.3 Hz), 3.48 (s, 3H), 3.28 (q, 2H, J = 6.3 Hz), 1.94 (qt, 2H, J = 6.3 Hz), 1.91 (s, 3H), 1.47 (qt, 2H, J = 6.7 Hz), 1.27 (m, 9H), 0.89 (t, 3H, J = 6.8 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 165.6, 164.0, 162.6, 162.0, 145.0, 134.9, 129.8, 129.7, 127.7, 127.4, 127.3, 119.0, 117.7, 117.3, 112.3, 109.4, 71.3, 62.3, 39.2, 38.2, 37.8, 31.5, 29.6, 28.8, 26.6, 22.6, 14.4, 14.1, 13.7. **HRMS (ESI)** [M-H]⁻ m/z calcd for C₃₁H₄₀N₅O₅ 562.30349, obsd 562.30272.

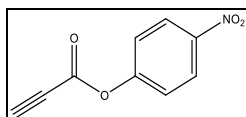
2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl propiolate (97)



Propiolic acid (406 mg, 5.80 mmol, 1 eq) was dissolved in anhydrous DCM (5 mL) and the solution was degassed with argon. Phosphorus pentachloride (1.21 g, 5.80 mmol, 1 eq) solubilized in 10 mL of

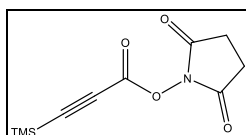
degassed anhydrous DCM were added to the reaction vessel and the mixture was stirred at room temperature for 1 hour. In another round bottom flask, *N*-hydrosuccinimide (734 mg, 6.38 mmol, 1.1 eq) and potassium carbonate (1.67 g, 12.80 mmol, 2.2 eq) were dissolved in DCM (20 mL) and the solution was cooled in an ice-bath. The chloride intermediate was then added to the flask and the mixture was stirred 20 minutes at 0°C before the reaction was allowed to progress at room temperature during the night. The white precipitate was filtrated off and the filtrate was evaporated. The resulting yellow oil was purified using column chromatography (SiO₂, DCM/AcOEt 3/1) to afford a white solid in 59% yield (571 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 3.38 (s, 1H), 2.91 (s, 4H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 168.3, 147.8, 82.1, 70.2, 25.6.

4-Nitrophenyl propiolate (99)



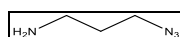
Propiolic acid (504 μ L, 8.20 mmol, 1.3 eq) and para-nitrophenol (880 mg, 6.30 mmol, 1 eq) were dissolved in anhydrous DCM (30 mL) then DCC (1.69 g, 8.20 mmol, 1.3 eq) was added in small fraction. The mixture was stirred at room temperature for 4 hours. The urea was filtered off and the filtrate was washed with 3 x 20 mL NaOH 0.2 M, 4 x 20 mL H₂O, 2 x 20 mL citric acid 10% and 20 mL H₂O. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum to give a white solid in 81% yield (983 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 8.31 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 7.41 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 3.18 (s, 1H). In accordance with the literature.⁵

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 3-(trimethylsilyl)propiolate (102)



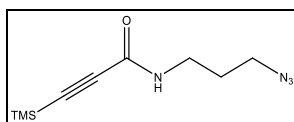
3-(Trimethylsilyl)propiolic acid (200 mg, 1.41 mmol, 1 eq), *N*-hydroxysuccinimide (162 mg, 1.41 mmol, 1 eq) and DMAP (5 mg, 0.04 mmol, 0.03 eq) were dissolved in anhydrous DCM (15 mL) and cooled in an ice-bath then DCC (290 mg, 1.41 mmol, 1 eq) was added in small fractions. After 20 minutes at 0°C, the mixture was stirred at room temperature overnight. The urea was filtered off and the filtrate was washed with 3 x 20 mL saturated NaHCO₃ and 20 mL saturated NaCl. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified using column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH 98/2) to afford an orange solid in 20% yield (67 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 2.84 (s, 4H), 0.28 (s, 9H).

3-Azido-1-propanamine (104)



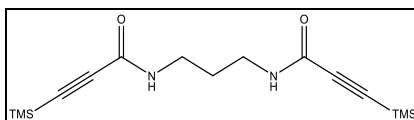
Sodium azide (5.87 g, 90.35 mmol, 3.33 eq) was added to a solution of 3-Bromopropylamine hydrobromide salt (5.94 g, 27.13 mmol, 1 eq) in H₂O (100 mL) and the reaction stirred at 80°C overnight. The mixture was cooled to room temperature and potassium hydroxide (3.04 g, 54.26 mmol, 2 eq) was added followed by stirring for 15 min. The residue was extracted with 3 x 50 mL Et₂O and the combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered then concentrated under vacuum with a bath temperature of 30°C to afford a yellow oil in 46% yield (1.24 g). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm); 3.36 (t, 2H, J = 6.5 Hz), 2.79 (t, 2H, J = 6.8 Hz), 1.71 (qt, 2H, J = 1.7 Hz), 1.44 (bs, 2H). In accordance with the literature.⁶

***N*-(3-azidopropyl)-3-(trimethylsilyl)propiolamide (105)**



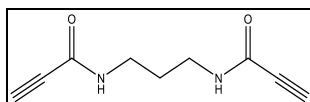
3-(Trimethylsilyl)propionic acid (122 mg, 0.86 mmol, 1 eq), 3-azidopropan-1-amine (86 mg, 0.86 mmol, 1 eq) and DMAP (5 mg, 0.04 mmol, 0.05 eq) were solubilized in anhydrous DCM (10 mL). The mixture was cooled in an ice-bath then DCC (177 mg, 0.86 mmol, 1 eq) was slowly added over 5 minutes and the reaction was stirred at room temperature for 6 hours. The urea was filtered off and the filtrate was washed with 3 x 25 mL HCl 0.2 M, 2 x 25 mL saturated NaHCO₃ and 25 mL saturated NaCl. After being dried over MgSO₄ and filtered, the organic phase was concentrated under reduced pressure. The obtained oil was diluted in cold Et₂O (20 mL). The resulting precipitate was filtered off and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford an orange oil in 55% yield (106 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 3.40 (m, 4H), 1.82 (qt, 2H, *J* = 6.6 Hz), 0.23 (s, 9H).

***N,N'*-(propane-1,3-diyl)bis(3-(trimethylsilyl)propiolamide) (106)**



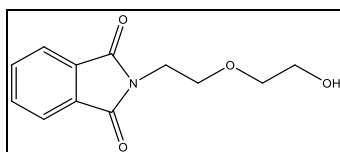
3-(Trimethylsilyl)propionic acid (341 mg, 2.40 mmol, 2 eq) and DMAP (7 mg, 0.06 mmol, 0.05 eq) were solubilized in anhydrous DCM (20 mL) followed by the addition of 1,3-diaminopropane (100 μ L, 1.198 mmol, 1 eq). The mixture was cooled in an ice-bath then DCC (495 mg, 2.40 mmol, 2 eq) was slowly added over 5 minutes and the reaction was stirred at room temperature overnight. The urea was filtered off and the filtrate was washed with 2 x 25 mL 0.5 M HCl, 2 x 25 mL saturated NaHCO₃ and saturated NaCl (25 mL). After being dried over MgSO₄ and filtered, the organic phase was concentrated under reduced pressure and the residue was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 8/2) to afford a yellow oil in 38% yield (148 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 6.78 (m, 2H), 3.31 (q, 4H, *J* = 6.2 Hz), 1.67 (qt, 2H, *J* = 6.2 Hz), 0.19 (s, 18H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 154.3, 98.1, 92.6, 36.9, 30.0, 0.0.

***N,N'*-(propane-1,3-diyl)dipropiolamide (107)**



106 (264 mg, 0.82 mmol, 1 eq) was solubilized in THF (10 mL) then 1M TBAF in THF (1.60 mL, 1.60 mmol, 2 eq) was added and the reaction was stirred at room temperature for an hour. The mixture was diluted with saturated NH₄Cl (30 mL) and the product was extracted with 3 x 30 mL Et₂O. The combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford a white solid in 16% yield (23 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 8.48 (bs, 1H), 3.34 (s, 2H), 3.02 (m, 4H), 1.49 (qt, 2H, *J* = 7.0 Hz).

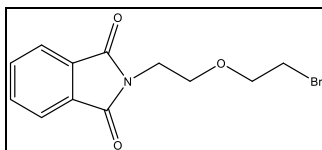
2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)isoindoline-1,3-dione (108)



A solution of phthalic anhydride (5.71 g, 39 mmol, 1 eq) and diglycolamine (4.07 g, 39 mmol, 1 eq) in toluene (100 mL) was heated under reflux in a three-necked round bottom flask fitted with a Dean-Stark apparatus for 24 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the oily residue was

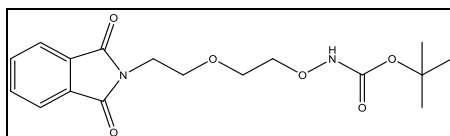
washed with Et₂O until it crystallizes into a white solid obtained in 79% yield (7.23 g). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 7.87 (dd, 2H, J = 3.1, 2.3 Hz), 7.74 (dd, 2H, J = 3.0, 2.4 Hz), 3.93 (t, 2H, J = 5.5 Hz), 3.76 (t, 2H, J = 5.5 Hz), 3.70 (t, 2H, J = 4.3 Hz), 3.62 (t, 2H, J = 4.3 Hz).

2-(2-(2-bromoethoxy)ethyl)isoindoline-1,3-dione (109)



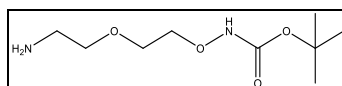
2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)isoindoline-1,3-dione (2.85 g, 12.14 mmol, 1 eq), DMAP (100 mg, 0.82 mmol, 0.07 eq) and NEt₃ (3.38 μ L, 24.28 mmol, 2 eq) were solubilized in DCM (30 mL) and the mixture was cooled in an ice-bath. Methanesulfonyl chloride (1.41 μ L, 18.21, 1.5 eq) was slowly added under stirring. After 5 minutes, the reaction was allowed to proceed at room temperature for 6 hours. The mixture was washed with 3 x 30 mL HCl 3M, 3 x 30 mL saturated NaHCO₃ and 30 mL saturated NaCl. The organic phase was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The resulting oil was solubilized in acetone (25 mL) then lithium bromide (1.27 g, 14.57 mmol, 1.2 eq) was added and the mixture was stirred at 60°C overnight. After removal of the solvent under reduced pressure, the residue was diluted in water (30 mL) and extracted with 3 x 30 mL DCM. The combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. After purification using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 7/3), a colorless oil was obtained in 62% yield (2.24 g). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 7.87 (dd, 2H, J = 3.1, 2.3 Hz), 7.74 (dd, 2H, J = 3.1, 2.3 Hz), 3.93 (t, 2H, J = 5.7 Hz), 3.80 (m, 4H), 3.42 (t, 2H, J = 6.16 Hz).

***Tert*-butyl 2-(2-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)ethoxy)ethoxy)carbamate (110)**



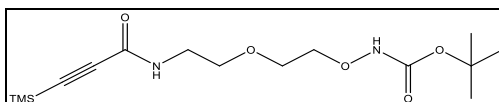
A solution of 2-(2-(2-bromoethoxy)ethyl)isoindoline-1,3-dione (2.23 g, 7.50 mmol, 1 eq), *tert*-butyl *N*-hydroxycarbamate (1.10 g, 8.25 mmol, 1.1 eq) and potassium carbonate (2.07 g, 15.00 mmol, 2 eq) in DMF (65 mL) was stirred at 60°C overnight. The mixture was concentrated under reduced pressure then the residue was diluted in water (100 mL) and extracted with 3 x 60 mL AcOEt. The combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. After purification using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 7/3), a colorless oil was obtained in 9% yield (230 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 7.82 (dd, 2H, J = 3.1, 2.4 Hz), 7.70 (dd, 2H, J = 3.0, 2.4 Hz), 7.59 (bs, 1H), 3.95 (t, 2H, J = 4.5 Hz), 3.80 (t, 2H, J = 5.6 Hz), 3.74 (t, 2H, J = 5.6 Hz), 3.69 (t, 2H, J = 4.5 Hz), 1.45 (s, 9H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 168.4, 156.8, 134.0, 132.1, 123.3, 81.5, 75.4, 68.5, 68.1, 37.2, 28.2.

***Tert*-butyl 2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)carbamate (111)**



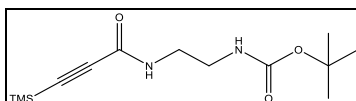
Hydrazine hydrate (50-60%, 180 μ L, 2.57 mmol, 3 eq) was added to a solution of *tert*-butyl 2-(2-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)ethoxy)ethoxy)carbamate (300 mg, 0.86 mmol, 1 eq) in EtOH (10 mL) and the mixture was stirred under reflux for 5 hours. The solvent was removed under reduced pressure then the residue was purified using column chromatography (SiO₂, AcOEt $\rightarrow$ MeOH) to afford an orange oil in 52% yield (98 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 4.00 (t, 2H, J = 4.0 Hz), 3.65 (t, 2H, J = 4.4 Hz), 3.50 (t, 2H, J = 4.9 Hz), 2.85 (t, 2H, J = 5.0 Hz), 1.45 (s, 9H).

***Tert*-butyl (2-(2-(3-(trimethylsilyl)propiolamido)ethoxy)ethoxy)carbamate (112)**



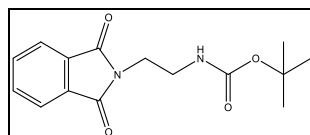
3-(Trimethylsilyl)propionic acid (67 mg, 0.47 mmol, 1 eq), *tert*-butyl (2-(2-aminoethoxy)ethoxy)carbamate (98 mg, 0.47 mmol, 1 eq) and DMAP (3 mg, 0.02 mmol, 0.05 eq) were solubilized in anhydrous DCM (5 mL) and the mixture was cooled in an ice-bath. DCC (96 mg, 0.47 mmol, 1 eq) was slowly added and the reaction stirred at 0°C for 15 minutes before proceeding at room temperature overnight. The urea was filtered off and the filtrate was washed with 2 x 20 mL citric acid 10%, 2 x 20 mL saturated NaHCO₃ and 20 mL saturated NaCl. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The oily residue was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 6/4) to afford a colorless oil in 26% yield (43 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 7.38 (bs, 1H), 6.62 (bs, 1H), 4.01 (t, 2H, J = 4.3 Hz), 3.68 (t, 2H, J = 4.3), 3.58 (t, 2H, J = 4.9 Hz), 3.49 (t, 2H, J = 5.2 Hz), 1.48 (s, 9H), 0.21 (s, 9H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 157.6, 153.6, 98.4, 92.1, 82.6, 76.3, 69.6, 69.2, 40.0, 34.6, 28.9, 0.0.

***Tert*-butyl (2-(3-(trimethylsilyl)propiolamido)ethyl)carbamate (113)**



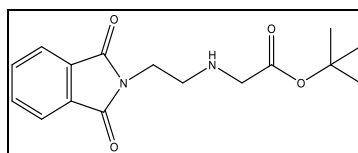
3-(Trimethylsilyl)propionic acid (533 mg, 3.75 mmol, 1 eq), *N*-Boc-ethylenediamine (600 mg, 3.75 mmol, 1 eq) and DMAP (25 mg, 0.20 mmol, 0.05 eq) were solubilized in anhydrous DCM (20 mL) and the mixture was cooled in an ice-bath. DCC (773 mg, 3.75 mmol, 1 eq) was slowly added and the reaction stirred at 0°C for 15 minutes before proceeding at room temperature overnight. The urea was filtered off and the filtrate was washed with 2 x 20 mL citric acid 10%, 2 x 20 mL saturated NaHCO₃ and 20 mL saturated NaCl. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The oily residue was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 8/2) to afford a yellow oil in 55% yield (590 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 6.51 (bs, 1H), 4.89 (s, bs), 3.39 (m, 2H), 3.29 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 0.21 (s, 9H).

***Tert*-butyl (2-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)ethyl)carbamate (116)**



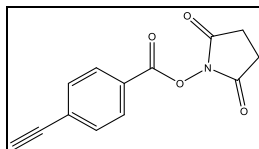
A solution of phthalic anhydride (1.36 g, 9.18 mmol, 1 eq) and *N*-Boc-ethylenediamine (1.47 g, 9.18 mol, 1 eq) in acetic acid (30 mL) was heated under reflux for 2 hours. The reaction mixture was diluted with water (150 mL) and extracted with 3 x 100 mL DCM. The combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The obtained solid was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 7/3) to yield a white powder in 44% yield (1.18 g). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 7.82 (dd, 2H, J = 3.0, 2.3 Hz), 7.68 (dd, 2H, J = 3.0, 2.3 Hz), 4.91 (bs, 1H), 3.81 (t, 2H, J = 3.81 Hz), 3.41 (m, 2H), 1.31 (s, 9H).

***Tert*-butyl (2-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)ethyl)glycinate (117)**



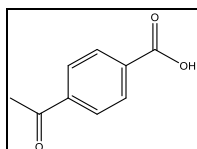
116 (850 mg, 2.93 mmol, 1.05 eq) was diluted in a mixture of TFA/DCM 1/3 (10 mL) and stirred at room temperature for 2 hours. The solvent was removed under reduced pressure and TFA was co-evaporated with 3 x MeCN. The resulting salt was diluted in MeCN (30 mL) and DIPEA (1069 μ L, 6.14 mmol, 2.2 eq) was added. *tert*-Butyl chloroacetate (399 μ L, 2.79 mmol, 1 eq) was then added dropwise to the mixture which was then stirred at room temperature for 48 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure and the oily residue was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 7/3 $\rightarrow$ 1/1) to yield a colorless oil in 41% yield (348 g). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 7.84 (dd, 2H, J = 3.1, 2.3 Hz), 7.71 (dd, 2H, J = 3.0, 2.3 Hz), 3.81 (t, 2H, J = 6.2 Hz), 3.31 (s, 2H), 2.92 (t, 2H, J = 6.3 Hz), 1.43 (s, 9H).

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-ethynylbenzoate (125)



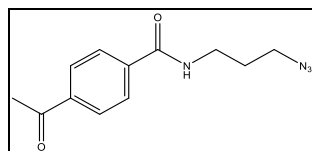
4-Ethynylbenzoic acid (203 mg, 1.39 mmol, 1 eq), *N*-hydroxysuccinimide (160 mg, 1.39 mmol, 1 eq) and DMAP (8 mg, 0.07 mmol, 0.05 eq) were solubilized in anhydrous DCM (15 mL) then the mixture was cooled in an ice-bath. DCC (286 mg, 1.39 mmol, 1 eq) was slowly added and the reaction was stirred at room temperature overnight. After filtering off the urea, the filtrate was washed with 2 x 25 mL saturated NaHCO₃ and 25 mL saturated NaCl. The organic phase was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure then the residue was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 7/3) to afford a white powder in 47% yield (160 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 8.11 (d, 2H, J = 8.54 Hz), 7.62 (d, 2H, J = 8.48 Hz), 2.92 (bs, 2H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 169.1, 161.3, 132.5, 130.4, 128.9, 125.0, 82.3, 81.6, 25.7.

4-Acetylbenzoic acid (141)



Ethyl 4-acetylbenzoate (1 g, 5.20 mmol, 1 eq) was dissolved in MeOH (20 mL) in a round-bottom flask and cooled to 0°C in an ice-bath. A solution of potassium hydroxide (2.92 g, 52.04 mmol, 10 eq) in H₂O (10 mL) was added dropwise to the mixture which was then stirred at room temperature for 4 hours. After removal of the solvent under reduced pressure, the residue was diluted in H₂O (30 mL) and washed with 2 x 30 mL AcOEt then acidified to pH 2 with a solution of HCl 2M. The resulting precipitate was filtrated and washed with H₂O then dried under vacuum to afford a white solid in 83% yield (705 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 8.22 (d, 2H, J = 8.3 Hz), 8.07 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 2.69 (s, 3H). In accordance with the literature.⁷

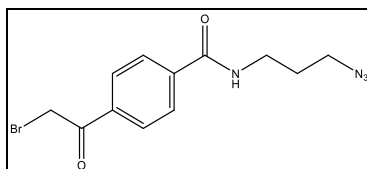
4-Acetyl-*N*-(3-azidopropyl)benzamide (142)



4-Acetylbenzoic acid (700 mg, 4.27 mmol, 1.06 eq), 3-azido-1-propanamine (440 mg, 4.40 mmol, 1.09 eq) and DMAP (23 mg, 0.19 mmol, 0.05 eq) were dissolved in anhydrous DCM (25 mL) and the mixture was cooled to 0°C in an ice-bath before DCC (831 mg, 4.03 mmol, 1 eq) was added in small portion. The reaction was stirred at 0°C for 15 min then at room temperature for 5 hours. The urea was filtered off and the filtrate was washed with 3 x 25 mL citric acid 10%, 2 x 25 mL saturated NaHCO₃ and 25 mL saturated NaCl. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered then concentrated under reduced

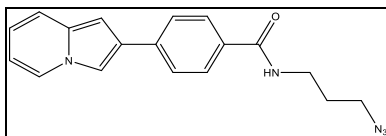
pressure. The residue was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 7/3) to afford a white solid in 60% yield (540 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 8.01 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.85 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 6.51 (bs, 1H), 3.58 (q, 2H, J = 6.4 Hz), 3.48 (t, 2H, J = 6.4 Hz), 2.64 (s, 3H), 1.94 (qt, 2H, J = 6.5 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 197.4, 166.6, 139.3, 138.3, 128.6, 127.2, 49.7, 38.1, 28.7, 26.8.

***N*-(3-azidopropyl)-4-(2-bromoacetyl)benzamide (143)**



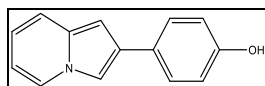
142 (519 mg, 2.11 mmol, 1 eq) and *N*-Bromosuccinimide (418 mg, 2.32 mmol, 1.1 eq) were solubilized in MeCN (20 mL) in a round-bottom flask then TMSOTf (382 μ L, 2.11 mmol, 1 eq) was added and the mixture was stirred at 40°C for 3 hours. After removal of the solvent under reduced pressure, the resulting oil was diluted in AcOEt (50 mL) and washed with 3 x 30 mL H₂O. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford a pale orange solid in 92% yield (632 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 7.97 (d, 2H, J = 8.3 Hz), 7.85 (d, 2H, J = 8.3 Hz), 6.98 (bs, 1H), 4.45 (s, 2H), 3.54 (qt, 2H, J = 6.4 Hz), 3.44 (t, 2H, J = 6.4 Hz), 1.90 (qt, 2H, J = 6.5 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 190.9, 166.6, 139.1, 136.0, 129.1, 127.5, 49.6, 38.0, 30.9, 28.6.

***N*-(3-azidopropyl)-4-(indolizin-2-yl)benzamide (144)**



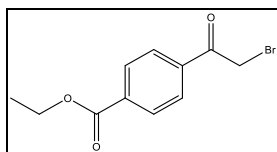
143 (450 mg, 1.39 mmol, 1 eq) was dissolved in acetone (15 mL) followed by the addition of 2-picoline (160 μ L, 1.62 mmol, 1.16 eq). The mixture was stirred overnight under reflux. The precipitate was filtered and dissolved in H₂O (15 mL). Potassium carbonate (345 mg, 2.50 mmol, 1.54 eq) was added to the aqueous phase which was then stirred at 80°C overnight. The resulting precipitate was filtrated, washed with H₂O and dried under vacuum to afford a light brown solid in 52% yield (232 mg). **¹H NMR (400 MHz, CD₃CN):** δ (ppm) 8.44 (bs, 1H), 8.23 (d, 1H, J = 6.9 Hz), 8.10 (s, 1H), 7.89 (d, 2H, J = 8.2 Hz), 7.80 (d, 2H, J = 8.2 Hz), 7.43 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 6.84 (s, 1H), 6.72 (t, 1H, J = 7.7 Hz), 6.57 (t, 1H, J = 6.6 Hz), 3.44 (t, 2H, J = 6.7 Hz), 3.37 (qt, 2H, J = 6.3 Hz), 1.83 (qt, 2H, J = 6.8 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN):** δ (ppm) 166.5, 138.1, 133.5, 132.7, 128.3, 127.7, 126.2, 125.7, 119.2, 118.3, 111.2, 111.0, 96.9, 49.1, 37.1, 28.9.

4-(indolizin-2-yl)phenol (145)



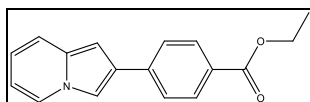
2-Bromo-4'-hydroxyacetophenone (500 mg, 2.33 mmol, 1 eq) was dissolved in acetone (30 mL) followed by the addition of 2-picoline (230 μ L, 2.33 mmol, 1 eq). The mixture was stirred for 6 hours under reflux. The precipitate was filtered and dissolved in H₂O (30 mL). Potassium carbonate (338 mg, 2.45 mmol, 1.05 eq) was added to the aqueous phase which was then stirred at 80°C overnight. The resulting precipitate was filtrated, washed with H₂O and dried under vacuum to afford a gray solid in 31% yield (151 mg). **¹H NMR (400 MHz, CD₃CN):** δ (ppm) 9.49 (s, 1H), 8.28 (d, 1H, J = 6.8 Hz), 7.91 (s, 1H), 7.60 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 7.45 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 6.89 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 6.75 (m, 2H), 6.59 (t, 1H, J = 6.6 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN):** δ (ppm) 156.7, 133.3, 129.1, 127.3, 126.3, 126.0, 118.8, 117.7, 116.1, 110.4, 109.3, 96.1.

Ethyl 4-(2-bromoacetyl)benzoate (147)



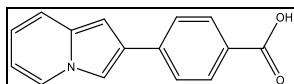
Ethyl 4-acetylbenzoate (500 mg, 2.60 mmol, 1 eq) and *N*-Bromosuccinimide (509 mg, 2.86 mmol, 1.1 eq) were solubilized in MeCN (20 mL) then TMSOTf (470 μ L, 2.60 mmol, 1 eq) was added and the mixture was stirred at 40°C for 3 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was diluted in AcOEt (30 mL) then washed with 3 x 30 mL H₂O. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford a brown oil that later crystallizes into a beige solid in 82% yield (575 mg). **¹H NMR (400 MHz, CD₃CN):** δ (ppm) 8.16 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz), 8.04 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 4.47 (s, 2H), 8.04 (qt, 2H, *J* = 7.1 Hz), 1.42 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 190.87, 165.48, 137.06, 135.00, 129.98, 128.85, 61.60, 30.70, 14.28.

Ethyl 4-(indolizin-2-yl)benzoate (148)



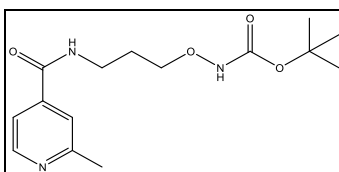
147 (575 mg, 2.13 mmol, 1 eq) was dissolved in acetone (25 mL) followed by the addition of 2-picoline (210 μ L, 2.13 mmol, 1 eq). The mixture was stirred at 65°C overnight. The white precipitate was filtered and dissolved in H₂O (25 mL). Potassium carbonate (353 mg, 2.56 mmol, 1.2 eq) was added to the aqueous phase which was then stirred at 80°C for the weekend. The resulting precipitate was filtrated, washed with H₂O and dried under vacuum to afford a white solid in 40% yield (225 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 8.08 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz), 7.92 (d, 1H, *J* = 6.9 Hz), 7.73 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz), 7.66 (s, 1H), 7.38 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz), 6.76 (s, 1H), 6.69 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz), 6.50 (t, 1H, *J* = 6.7 Hz), 4.42 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz), 1.44 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 166.6, 139.9, 133.8, 130.1, 128.3, 128.1, 125.8, 125.1, 119.2, 117.8, 111.0, 109.9, 96.9, 60.8, 14.4.

4-(indolizin-2-yl)benzoic acid (149)



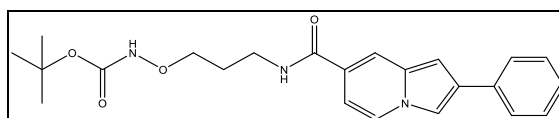
148 (220 mg, 0.83 mmol, 1 eq) was dissolved in MeOH (20 mL) and the suspension was cooled in an ice-bath. A solution of potassium hydroxide (465 mg, 8.30 mmol, 10 eq) in H₂O (10 mL) was added dropwise then the mixture was cooled to room temperature and stirred overnight. The solid was filtered off and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The resulting residue was diluted in H₂O (20 mL), washed with 3 x 20 mL AcOEt then the aqueous phase was acidified to pH 2 with a solution of 1M HCl and the product was extracted with 3 x 20 mL AcOEt. The organic phase was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to afford a yellow solid in 64% yield (125 mg). **¹H NMR (400 MHz, TFA-d):** δ (ppm) 9.07 (d, 1H, *J* = 6.2 Hz), 8.58 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz), 8.43 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 8.18 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.97 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.91 (t, 1H, *J* = 6.9 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, TFA-d):** δ (ppm) 171.5, 157.7, 153.4, 145.5, 140.3, 134.1, 131.2, 131.1, 126.7, 122.9, 121.7.

Tert-butyl (3-(2-methylisonicotinamido)propoxy)carbamate (151)



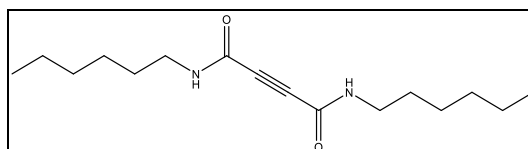
2-Methylisonicotinic acid (1 g, 7.30 mmol, 1 eq) was dissolved in DMF (40 mL) then 1,1-dimethylethyl *N*-(3-aminopropoxy)carbamate (1.39 g, 7.30 mmol, 1 eq), HBTU (3.04 mg, 8.03 mmol, 1.1 eq) and HOBt (1.08 mg, 8.03 mmol, 1.1 eq) were added to the mixture followed by DIPEA (3.6 mL, 21.90 mmol, 3 eq). The reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was concentrated under reduced pressure then it was diluted with H₂O (50 mL) and the product was extracted with 3 x 25 mL DCM. The combined organic phases were washed with 50 mL HCl 1M, 50 mL saturated NaHCO₃ and 50 mL saturated NaCl then dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 4/6) to afford a yellow oil that later crystallizes into a white solid in 20% yield (454 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 8.64 (m, 1H), 8.47 (d, 2H, *J* = 5.1 Hz), 7.61 (s, 1H), 7.55 (d, 1H, *J* = 5.1 Hz), 3.92 (t, 2H, *J* = 5.0 Hz), 3.61 (q, 2H, *J* = 5.5 Hz), 2.52 (s, 3H), 1.81 (qt, 2H, *J* = 5.4 Hz), 1.41 (s, 9H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 165.7, 159.0, 157.8, 149.3, 142.3, 121.1, 118.6, 82.4, 75.6, 37.6, 28.2, 26.8, 24.4.

***Tert*-butyl (3-(2-phenylindolizine-7-carboxamido)propoxy)carbamate (152)**



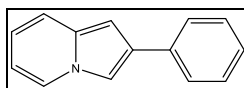
151 (520 mg, 1.68 mmol, 1 eq) and 2-bromoacetophenone (335 mg, 1.68 mmol, 1 eq) were dissolved in acetone (15 mL) in a round-bottom flask and stirred under reflux overnight. The precipitate was filtered and diluted in H₂O (15 mL) then potassium carbonate (302 mg, 2.19 mmol, 1.3 eq) was added and the mixture was stirred at 80°C overnight. The resulting precipitate was filtered, washed with H₂O and dried under vacuum to afford a yellowish white solid in 42% yield (284 mg). **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ (ppm) 9.92 (bs, 1H), 8.35 (bs, 1H), 8.25 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 8.09 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.73 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz), 7.42 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 7.27 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz), 7.00 (s, 2H), 3.80 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz), 3.37 (q, 2H, *J* = 6.4 Hz), 1.81 (qt, 2H, *J* = 6.5 Hz), 1.43 (s, 9H). **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ (ppm) 165.5, 156.8, 134.9, 132.2, 130.1, 129.4, 127.3, 126.2, 125.5, 123.7, 118.9, 112.1, 109.1, 100.1, 80.1, 74.0, 36.9, 28.5, 28.2.

***N*¹,*N*⁴-Dihexylbut-2-ynediamide (153)**



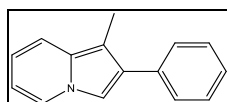
A suspension of acetylenedicarboxylic acid (433 mg, 3.80 mmol, 1 eq) in NMP (8 mL) was cooled to 0°C in an ice-bath, followed by the dropwise addition of a solution of hexylamine (1197 μ L, 9.11 mmol, 2.4 eq) in NMP (4 mL) to the mixture. After 10 minutes of stirring, DMTMM.BF₄ (3.05 mg, 9.28 mmol, 2.4 eq) was added and the reaction maintained at 0°C for 5 hours. The mixture was then diluted with H₂O (60 mL) and AcOEt (60 mL). The organic phase was washed with saturated NaCl (50 mL), saturated NaHCO₃ (50 mL), HCl 1M (50 mL) and saturated NaCl (50 mL) then dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 8/2) to afford a white solid in 11% yield (120 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 7.07 (m, 2H), 3.27 (q, 4H, *J* = 6.6 Hz), 1.52 (t, 4H, *J* = 6.8 Hz), 1.28 (m, 12H), 0.87 (t, 6H, *J* = 6.8 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN):** δ (ppm) 151.8, 76.7, 40.1, 31.4, 28.9, 26.5, 22.5, 14.0.

2-Phenylindolizine (161)



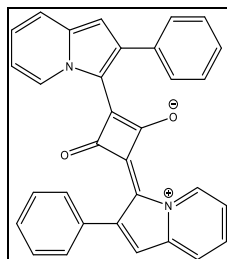
2-Picoline (297 μL , 3.02 mmol, 1 eq) and 2-bromoacetophenone (600 mg, 3.02 mmol, 1 eq) were dissolved in acetone (25 mL) in a round-bottom flask and stirred under reflux overnight. After removal of the solvent under reduced pressure, the residue was diluted in H_2O (30 mL) and washed with 3 x 25 mL DCM. Sodium bicarbonate (1.01 g, 12.08 mmol, 4 eq) was added to the aqueous phase and the mixture was stirred under reflux overnight. The resulting precipitate was filtered, washed with H_2O and dried under vacuum to afford a gray solid in 84% yield (420 mg). **^1H NMR (400 MHz, MeOD):** δ (ppm) 8.23 (dd, 1H, $J = 7.0, 1.0$ Hz), 7.98 (d, 1H, $J = 1.2$ Hz), 7.71 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz), 7.41 (m, 3H), 7.25 (td, 1H, $J = 7.4, 1.1$ Hz), 6.77 (s, 1H), 6.71 (m, 1H), 6.55 (td, 1H, $J = 6.9, 1.2$ Hz). **^{13}C NMR (100 MHz, MeOD):** δ (ppm) 135.4, 133.4, 129.3, 128.7, 126.7, 126.2, 126.1, 119.1, 118.0, 110.9, 110.3, 96.6. **ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$** calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}$ 193.09, obsd. 193.95.

1-Methyl-2-phenylindolizine (162)



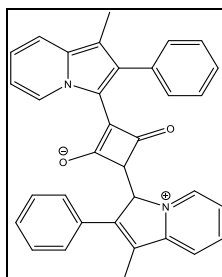
2-Bromoacetophenone (618 mg, 3.12 mmol, 1 eq) and 2-ethylpyridine (427 μL , 3.73 mmol, 1.2 eq) were dissolved in acetone (20 mL) in a round-bottom flask and stirred at 70°C overnight. The precipitate was filtered and diluted in H_2O (20 mL) alongside sodium bicarbonate (940 mg, 11.19 mmol, 3 eq) then the mixture was stirred under reflux overnight. The resulting precipitate was filtered, washed with H_2O and dried under vacuum to afford a beige solid in 64% yield (492 mg). **^1H NMR (400 MHz, CDCl_3):** δ (ppm) 7.85 (d, 1H, $J = 7.0$ Hz), 7.53 (d, 2H, $J = 7.4$ Hz), 7.43 (t, 2H, $J = 7.7$ Hz), 7.39 (s, 1H), 7.32 (m, 2H), 6.61 (m, 1H), 6.41 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz), 2.44 (s, 3H). **^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3):** δ (ppm) 136.0, 131.0, 129.1, 128.7, 128.5, 126.3, 124.8, 117.5, 115.7, 110.1, 109.8, 105.6, 9.7. **ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$** calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}$ 208.10, obsd. 207.97.

(E)-3-oxo-4-(2-phenyl-3H-indolizin-4-ium-3-ylidene)-2-(2-phenylindolizin-3-yl)cyclobut-1-en-1-olate (163)



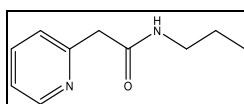
The reagents were degassed with argon for 10 minutes. **161** (86 mg, 0.45 mmol, 2 eq) and squaric acid (26 mg, 0.23 mmol, 1 eq) were dissolved in toluene/butanol 1:1 (7 mL) and the mixture was stirred under reflux for 24 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was diluted in H_2O (20 mL). The product was extracted with 3 x 15 mL DCM and the combined organic phases were dried over MgSO_4 , filtered then concentrated under reduced pressure. The resulting black residue was triturated in Et_2O to afford a dark green solid that was later purified using column chromatography (SiO_2 , DCM/MeOH 99.5/0.5) leading to the obtention of a dark blue solid in 14% yield (15 mg). **^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$):** δ (ppm) 10.90 (d, 1H, $J = 6.9$ Hz), 8.44 (s, 1H), 8.36 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 8.05 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.87 (t, 1H, $J = 7.0$ Hz), 7.82 (d, 1H, $J = 7.1$ Hz), 7.07 (m, 4H), 7.48 (m, 3H), 7.41 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz), 7.27 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 7.14 (t, 1H, $J = 7.3$ Hz), 6.70 (m, 2H), 6.54 (s, 1H), 6.47 (t, 1H, $J = 6.8$ Hz). **HRMS (ESI)** calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{21}\text{O}_2\text{N}_2$ 465.15975, obsd. 465.15889.

4-(1-methyl-2-phenyl-3H-indolizin-4-ium-3-yl)-2-(1-methyl-2-phenylindolizin-3-yl)-3-oxocyclobut-1-en-1-olate (164)



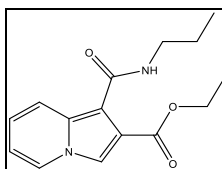
The reagents were degassed with argon for 10 minutes. **162** (100 mg, 0.48 mmol, 2 eq) and squaric acid (28 mg, 0.24 mmol, 1 eq) were dissolved in toluene/butanol 1:1 (10 mL) and the mixture was stirred under argon for 24 hours at 120°C. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was diluted in DCM (20 mL) then washed with 3 x 15 mL H₂O. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified using column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH 99/1) to afford a dark green solid in 60% yield (71 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 10.09 (d, 2H, J = 6.8 Hz), 7.44 (m, 5H), 7.35 (m, 6H), 7.19 (t, 2H, J = 7.4 Hz), 6.85 (td, 2H, J = 6.8, 1.0 Hz), 2.19 (s, 6H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 175.6, 168.1, 141.2, 137.4, 134.8, 134.5, 130.4, 127.5, 127.3, 126.7, 120.4, 118.1, 116.8, 114.8, 9.3. ESI [M]⁺ calcd. for C₃₄H₂₄N₂O₂ 492.18, obsd. 492.16.

N-Propyl-2-(pyridin-2-yl)acetamide (167)



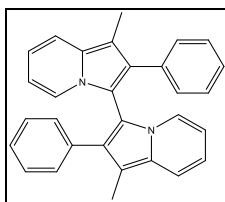
2-(Pyridin-2-yl)acetic acid hydrochloride (500 mg, 2.88 mmol, 1 eq) was dissolved in DMF (30 mL) then HATU (1.31 g, 3.46 mmol, 1.2 eq) and DIPEA (950 μ L, 5.76 mmol, 2 eq) were added and the acid was preactivated for 10 minutes. Propylamine (354 μ L, 4.32 mmol, 1.5 eq) was added and the mixture was stirred at room temperature for 5 hours. After removal of the solvent under reduced pressure, the residue was diluted with H₂O (50 mL) and the product was extracted with 3 x 25 mL DCM. The combined organic phases were washed with HCl 1M (50 mL), saturated NaHCO₃ (50 mL) and saturated NaCl then dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified twice using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 7/3 $\rightarrow$ 1/1) to afford an orange solid that still contains impurities (yield > 100%, 664 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 8.57 (d, 1H, J = 4.2 Hz), 7.70 (td, 1H, J = 7.7, 1.8 Hz), 7.31 (m, 1H), 7.23 (m, 1H), 3.74 (s, 2H), 3.22 (q, 2H, J = 6.1 Hz), 1.52 (m, 2H), 0.89 (t, 3H, J = 7.4 Hz).

Ethyl 1-(propylcarbamoyl)indolizine-2-carboxylate (168)



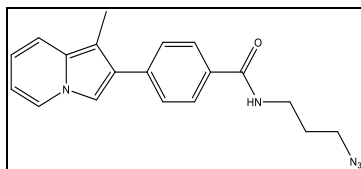
N-Propyl-2-(pyridin-2-yl)acetamide (664 mg, 3.73 mmol, 2 eq) and ethyl bromoacetate (234 μ L, 1.86 mmol, 1 eq) were solubilized in acetone (10 mL) and stirred under reflux for 48 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the obtained residue was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 7/3) to afford a yellow solid in 22% yield (115 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 9.78 (bs, 1H), 8.78 (d, 1H, J = 9.4 Hz), 7.88 (s, 2H), 6.99 (m, 1H), 6.76 (m, 1H), 4.41 (q, 2H, J = 7.1 Hz), 3.46 (m, 2H), 1.70 (m, 2H), 1.43 (t, 3H, J = 7.1 Hz), 1.04 (t, 3H, J = 7.4 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 166.7, 164.4, 137.2, 125.0, 122.9, 122.0, 119.5, 116.1, 114.1, 107.5, 61.3, 41.1, 22.9, 14.3, 11.7. **HRMS (ESI)** calcd. for C₁₅H₁₉O₃N₂, obsd. 275.13907.

1,1'-dimethyl-2,2'-diphenyl-3,3'-biindolizine (170)



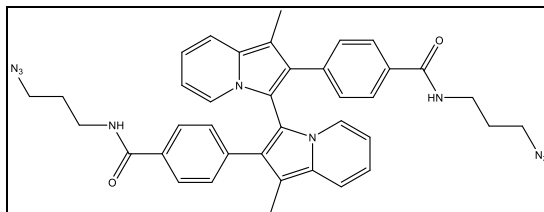
Potassium hexacyanoferrate(III) (484 mg, 1.47 mmol, 2.1 eq) was added to a solution of NEt₃ (68 μL, 0.49 mmol, 0.7 eq) in H₂O (33 mL). The mixture was stirred for 10 minutes then a solution of 1-methyl-2-phenylindolizine (145 mg, 0.7 mmol, 1 eq) in MeCN (17 mL) was added. The mixture was stirred at room temperature for 24 hours. The solvent was removed under reduced pressure then the residue was diluted in H₂O (50 mL) and extracted with 3 x 50 mL DCM. The combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified using column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 9/1) to afford a yellow solid in 41% yield (60 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 7.32 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 7.17 (d, 2H, J = 7.1 Hz), 7.03 (m, 6H), 6.84 (m, 4H), 6.57 (m, 2H), 6.22 (t, 2H, J = 6.7 Hz), 2.31 (s, 6H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 135.4, 131.3, 130.5, 129.1, 127.9, 125.9, 122.9, 117.3, 116.3, 110.1, 106.5, 26.9, 9.7.

N-(3-azidopropyl)-4-(1-methylindolizin-2-yl)benzamide (172)



143 (315 mg, 0.97 mmol, 1 eq) was dissolved in acetone (20 mL) followed by the addition of 2-Ethylpyridine (122 μL, 1.07 mmol, 1.1 eq). The mixture was stirred overnight under reflux. The solvent was removed under reduced pressure then the residue was diluted in H₂O (20 mL) and washed with 3 x 15 mL DCM. Sodium bicarbonate (327 mg, 3.88 mmol, 4 eq) was added to the aqueous phase which was then stirred at 85°C overnight. The resulting precipitate was filtrated, washed with H₂O and dried under vacuum to afford a light brown solid in 65% yield (205 mg). **¹H NMR (400 MHz, CD₃CN):** δ (ppm) 8.01 (d, 2H, J = 6.9 Hz), 7.87 (d, 2H, J = 8.0 Hz), 7.66 (d, 2H, J = 8.0 Hz), 7.61 (s, 1H), 7.40 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 7.18 (bs, 1H), 6.68 (t, 1H, J = 7.6 Hz), 6.50 (t, 1H, J = 6.4 Hz), 3.46 (m, 4H), 2.44 (s, 3H), 1.89 (t, 2H, J = 6.7 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 167.5, 139.6, 131.9, 131.2, 128.6, 127.8, 127.1, 124.8, 117.6, 116.0, 110.5, 110.1, 105.7, 49.7, 37.8, 28.9, 9.8. **HRMS (ESI) m/z** calcd for C₁₉H₂₀ON₅ 334.16624, obsd 334.16636.

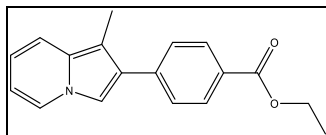
4,4'-(1,1'-dimethyl-[3,3'-biindolizine]-2,2'-diyl)bis(N-(3-azidopropyl)benzamide) (173)



Triethylamine (42 μL, 0.30 mmol, 0.7 eq) was added to a solution of Potassium hexacyanoferrate(III) (301 mg, 0.91 mmol, 2.1 eq) in H₂O (33 mL). After 5 minutes of stirring, **172** (145 mg, 0.44 mmol, 1 eq) was solubilized in MeCN (17 mL) and added to the reaction mixture which was then stirred at room temperature for 24 hours. The solvent was removed under reduced pressure then the green residue was diluted in H₂O (50 mL) and washed with 3 x 30 mL DCM. The combined organic phases were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. After purification on column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 6/4), a yellow solid was obtained in 25% yield (73 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 7.46 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 7.36 (d, 4H, J = 8.3 Hz), 7.2 (d, 2H, J = 7.6 Hz), 6.85

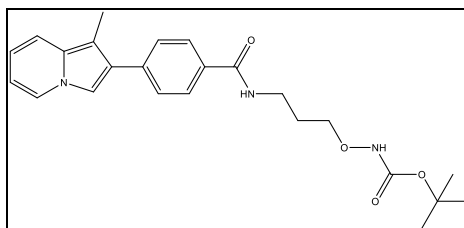
(t, 2H, $J = 5.7$ Hz), 6.74 (m, 6H), 6.46 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 3.54 (q, 4H, $J = 6.4$ Hz), 3.44 (t, 4H, $J = 6.4$ Hz), 2.32 (s, 6H), 1.92 (qt, 4H, $J = 6.6$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 168.4, 138.7, 132.0, 131.7, 129.5, 129.3, 126.4, 123.2, 117.7, 116.6, 111.3, 111.0, 106.8, 49.5, 37.7, 28.8, 9.50. HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{36}\text{O}_2\text{N}_{10}$ 664.30172, obsd 664.30145

Ethyl 4-(1-methylindolizin-2-yl)benzoate (179)



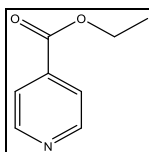
147 (4653 mg, 19.23 mmol, 1 eq) and 2-Ethylpyridine (2638 μL , 23.07 mmol, 1.2 eq) were solubilized in acetone (80 mL) in a round-bottom flask and stirred at 65°C overnight. The white precipitate was filtrated on fritted glass and washed with 3 x acetone then diluted in water (80 mL) alongside sodium bicarbonate (6460 mg, 76.91 mmol, 4 eq). The mixture was stirred at 85°C overnight. The precipitate was filtrated, washed with 3 x H_2O and dried under vacuum to afford a dark brown solid in 20% yield (1035 mg). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8.10 (d, 2H, $J = 8.32$ Hz), 7.86 (d, 1H, $J = 6.96$ Hz), 7.60 (d, 2H, $J = 8.36$ Hz), 7.45 (s, 1H), 7.34 (d, 1H, $J = 9.12$ Hz), 6.63 (m, 1H), 6.45 (m, 1H), 4.41 (q, 2H, $J = 7.12$ Hz), 2.46 (s, 3H), 1.43 (t, 3H, $J = 7.12$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 116.73, 140.81, 131.25, 129.77, 128.28, 128.10, 127.92, 124.80, 117.66, 116.03, 110.53, 110.17, 105.76, 60.86, 10.40, 9.79.

tert-butyl (3-(4-(1-methylindolizin-2-yl)benzamido)propoxy)carbamate (180)



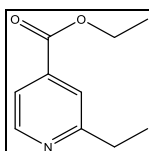
179 (248 mg, 1.38 mmol, 1 eq) was solubilized in MeOH (15 mL) in a round-bottom flask. A solution of KOH (776 mg, 13.84 mmol, 10 eq) in 7.5 mL H_2O was added dropwise to the mixture which was then stirred at room temperature overnight. A white precipitate was formed. MeOH was evaporated, the obtained residue was diluted in water (30 mL) and then washed with 3 x 30 mL AcOEt. The aqueous phase was acidified to pH 5 with HCl 1M and the resulting precipitate was filtered on fritted glass, washed with water and then dried under vacuum to afford 70 mg (0.28 mmol) of yellow solid in 20% yield. Said solid was added to a bottom flask containing 1,1-Dimethylethyl N -(3-aminopropoxy)carbamate (63 mg, 0.362 mmol, 1.3 eq) in DMF (10 mL). DIPEA (92 μL , 0.56 mmol, 2 eq) and HATU (117 mg, 0.31 mmol, 1.1 eq) were added and the mixture stirred overnight at room temperature. The solvent was evaporated and the resulting brown oil was diluted in water. After extraction with 3 x 15 mL DCM, the combined organic phases were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under vacuum. The product was purified with column chromatography (SiO_2 , cyclohexane/AcOEt 6/4 $\rightarrow$ 4/6) and obtained as a deep green residue in 38% yield (43 mg). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.98 (d, 2H, $J = 8.28$ Hz), 7.93 (bs, 1H), 7.54 (d, 2H, $J = 8.32$ Hz), 7.41 (m, 2H), 7.32 (d, 1H, $J = 9.08$ Hz), 6.62 (m, 1H), 6.43 (m, 1H), 4.02 (t, 2H, $J = 5.48$ Hz), 3.71 (q, 2H, $J = 5.92$ Hz), 2.43 (s, 3H), 1.91 (qt, 2H, $J = 5.68$ Hz), 1.51 (s, 9H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 167.31, 157.51, 138.98, 132.35, 131.13, 128.31, 128.22, 127.54, 124.78, 117.58, 115.92, 110.38, 110.01, 105.67, 82.28, 75.46, 37.22, 28.23, 27.30, 9.68. HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4$ 423.2158, obsd 424.2240.

Ethyl isonicotinate (181)



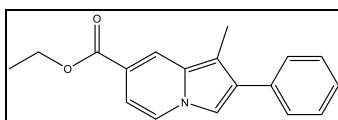
Isonicotinic acid (4.92 g, 40.00 mmol, 1 eq) was dissolved in EtOH (80 mL) in a round-bottom flask then sulfuric acid (2.14 mL, 40.00 mmol, 1 eq) was added and the mixture was stirred under reflux overnight. The solvent was evaporated under reduced pressure and the oily residue was diluted in 200 mL of Na₂CO₃ (1M), then extracted with 3 x 50 mL Et₂O. The combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford a colorless oil in 61% yield (3.70 g). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 8.78 (m, 2H), 7.85 (m, 2H), 4.42 (q, 2H, J = 7.12 Hz), 1.42 (t, 3H, J = 7.12 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 165.13, 150.58, 137.63, 122.83, 61.82, 14.20.

Ethyl 2-ethyl-4-pyridinecarboxylate (182)



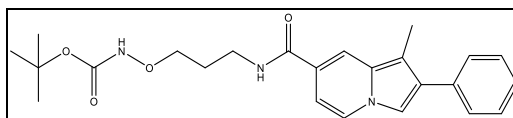
181 (925 mg, 6.13 mmol, 1 eq), α -aminobutyric acid (1.26 g, 12.26 mmol, 2 eq) and ammonium persulfate (6.99 g, 30.65 mmol, 5 eq) were dissolved in DCE/H₂O 1/1 (60 mL) then TFA (469 μ L, 6.13 mmol, 1 eq) was added and the mixture stirred for a minute at room temperature. A 10 mol% solution of silver nitrate (104 mg, 0.61 mmol, 0.1 eq) in water (5 mL) was added to the mixture which was then heated at 80°C for 24 hours. The mixture was diluted with 90 mL of NaOH (4M) and extracted with 3 x 100 mL AcOEt. The combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. After column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 8/2), a yellow oil was afforded in 62% yield (670 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 8.66 (dd, 1H, J = 5.08, 0.6 Hz), 7.71 (s, 1H), 7.64 (dd, 1H, J = 5.08, 0.6 Hz), 4.39 (q, 2H, J = 7.16 Hz), 2.89 (q, 2H, J = 7.60 Hz), 1.40 (t, 3H, J = 7.12 Hz), 1.33 (t, 3H, J = 7.60 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 165.49, 164.65, 149.93, 138.04, 121.29, 120.09, 61.68, 31.39, 14.22, 13.78.

Ethyl 1-methyl-2-phenyl-3-indolizine carboxylate (183)



182 (708 mg, 3.92 mmol, 1 eq) and 2-bromoacetophenone (780 mg, 3.92 mmol, 1 eq) were solubilized in acetone (20 mL) then stirred under reflux overnight. The solvent was evaporated and the residue diluted with DCM (20 mL) followed by extraction with 3 x 10 mL H₂O. Sodium bicarbonate (1.32 g, 15.68 mmol, 4 eq) was added to the aqueous phase and the mixture was stirred overnight at 85°C. The product was extracted with 3 x 20 mL DCM then the combined organic phases were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. After column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 8/2), a dark yellow residue was afforded in 8% yield (83 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 8.19 (s, 1H), 7.83 (d, 1H, J = 7.68 Hz), 7.51 (m, 3H), 7.44 (t, 2H, J = 7.44 Hz), 7.33 (m, 1H), 7.02 (dd, 1H, J = 7.20, 1.60 Hz), 4.38 (q, 2H, J = 7.08 Hz), 2.51 (s, 3H), 1.42 (t, 3H, J = 7.08 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 166.24, 135.17, 130.57, 130.15, 128.67, 128.58, 126.70, 123.74, 121.60, 117.32, 112.88, 111.60, 109.30, 60.80, 14.46, 9.86.

***Tert*-butyl (3-(1-methyl-2-phenylindolizine-7-carboxamido)propoxy)carbamate (**184**)**



184 (75.5 mg, 0.270 mmol, 1 eq) was solubilized in MeOH (5 mL) then a solution of KOH (152 mg, 2.70 mmol, 10 eq) in 2.5 mL H₂O was added dropwise to the mixture which was then stirred at room temperature overnight. The solvent was evaporated, the obtained residue was diluted in water (15 mL) and then washed with 3 x 10 mL AcOEt. The aqueous phase was acidified to pH 2 with HCl 1M and the resulting precipitate was filtered on glass frit. The yellow solid was washed with water and dried under vacuum then added to a bottom flask containing 1,1-Dimethylethyl *N*-(3-aminopropoxy)carbamate (21 mg, 0.119 mmol, 1.3 eq) in DMF (3 mL). DIPEA (30 μ L, 0.184 mmol, 2 eq) and HATU (38.4 mg, 0.101 mmol, 1.1 eq) were added and the mixture stirred overnight at room temperature. The solvent was evaporated and the resulting brown oily residue was diluted in water. After extraction with 3 x 15 mL DCM, the combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The product was purified with column chromatography (SiO₂, cyclohexane/AcOEt 6/4) and obtained as a yellow residue in 44% yield (17 mg). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 8.05 (s, 1H), 7.80 (m, 2H), 7.51 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz), 7.42 (m, 3H), 7.31 (m, 1H), 6.99 (dd, 1H, *J* = 7.24, 1.32 Hz), 4.01 (t, 2H, *J* = 5.44 Hz), 3.69 (q, 2H, *J* = 5.84 Hz), 2.48 (s, 3H), 1.90 (qt, 2H, 5.6 Hz), 1.50 (s, 9H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 166.51, 157.46, 135.50, 130.21, 130.19, 128.63, 128.52, 126.52, 123.80, 121.53, 118.26, 111.65, 109.96, 108.43, 82.22, 75.46, 37.35, 28.26, 27.19, 9.23. **HRMS (ESI) *m/z*** calcd for C₂₄H₂₉N₃O₄ 423.2158, obsd 424.2227.

A. General procedure for DNA synthesis

Reagents were purchased from Glen Research. The solvent used were of the highest grade commercially available. The oligonucleotides were prepared using solid-phase β -cyanoethylphosphoramidite chemistry on a 3400 DNA synthesizer at a micromolar scale (1 to 4 μ M).

Subsequent cleavage from the resin and deprotection were performed in an aqueous 28% ammonia/methylamine (1/1) solution for 20 min at 60 °C. The crude product was purified using a Glen-Pak® C-18 cartridge, followed by RP-HPLC. After concentration of the collected fraction, the samples were freeze-dried and conserved at -20°C.

RP-UPLC-MS analysis were performed on a Waters system using a Nucleosil C18 column (130 Å, 2.1 x 50 mm, 1.7 μ m). Detection was performed by UV at 260 nm and 280 nm and by electron spray ionization mass spectrometry. A 0.3 mL/min linear flow was applied. Solvent C (15 mM triethylamine, 50 mM hexafluoro-2- propanol in water) and solvent D (15 mM triethylamine, 50 mM hexafluoro-2- propanol in methanol) were used for gradient I (0-30% D in 12.5 minutes). The multiply charged data produced by the mass spectrometer were converted to the molecular weight.

RP-HPLC purifications were performed on a Gilson system with a Nucleosil C-18 column (Macherey-Nagel, 100 Å, 250 x 10 mm, 7 μ m) using a 4 mL/min flow with UV-monitoring at 260 nm and 280 nm. Solvent A (50 mM triethylammonium acetate buffer, 5% acetonitrile in water) and solvent B (5% water in acetonitrile). Two gradients were used: Gradient I (0-30% B in 27 minutes) or Gradient II (0-45% B in 18 minutes).

Desalting of oligonucleotides were performed by SEC on NAP 25 cartridges using the recommended protocol. UV quantifications of oligonucleotides were performed at 260 nm. Molar extinction $\epsilon_{260\text{ nm}}$ were estimated according to the nearest-neighbor model.

Water used for synthesis was distilled through a Milli-Q® cartridge system. Solvents and reagents used were of highest purity commercially available.

a) General procedure for the oxidation of 3'-diol DNA

20 eq of sodium periodate were added to a solution of 3'-diol oligonucleotide in water to obtain a final concentration of 10^{-3} M. The reacting medium was wrapped in aluminum foil and the mixture was stirred for 20 min at room temperature. Excess of NaIO_4 was then removed by SEC. The oxidation was considered quantitative and the crude oligonucleotide was used for oxime ligation without further purification.

b) General procedure for oxime ligation

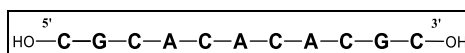
The oxyamine was deprotected in TFA/ H_2O (1/1) at room temperature for 1h30 then the mixture was diluted with water and the product lyophilized for the night.

Aldehyde oligonucleotide (1 eq) was solubilized in 600 μL of 0.4 M ammonium acetate buffer (pH 4.5, 10^{-3} M). The free aminoxy indolizine/pyridinium was dissolved in MeCN/ H_2O and 4 eq were added to the oligonucleotide. The solution was stirred at room temperature for 2 hours then the crude product was immediately purified on RP-HPLC with a Gradient II.

c) General procedure for CuAAC ligation

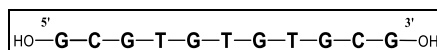
To a solution of alkyne and azide partner (10^{-3} M) in 2 M TEAA buffer (pH 8) were added CuSO_4 (4 equiv), THPTA (10 equiv) and sodium ascorbate (20 equiv). The reaction was stirred at room temperature with RP-UPLC-MS monitoring and quenched with a 0.5 M EDTA solution (50 equiv.) and RP-HPLC purification followed.

ODN1 (82)



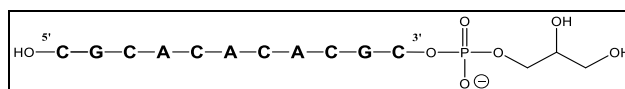
Oligonucleotide **82** was obtained from automated synthesis using commercially available C SynBaseTM resin at 1 μmol scale, using General Procedure **1** (847 nmol, yield = 85%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 96\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). R_t (UPLC-MS) = 4.640 min. R_t (RP-HPLC, Gradient I) = 18.00 min. UPLC-MS(-) m/z calcd for $\text{C}_{104}\text{H}_{132}\text{N}_{43}\text{O}_{61}\text{P}_{10}$ 3271.15, m/z obsd.: 3270.90.

ODN2 (83)



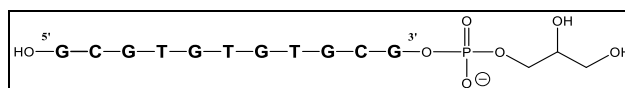
Oligonucleotide **83** was obtained from automated synthesis using commercially available C SynBaseTM resin at 1 μmol scale, using General Procedure **1** (624 nmol, yield = 62%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 101\,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). R_t (UPLC-MS) = 4.43 min. R_t (RP-HPLC, Gradient I) = 15.34 min. UPLC-MS(-) m/z calcd for $\text{C}_{108}\text{H}_{136}\text{N}_{42}\text{O}_{67}\text{P}_{10}$ 3404.21, m/z obsd.: 3404.67.

dODN1 (84)



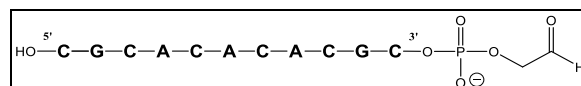
Oligonucleotide **84** was obtained from automated synthesis using commercially available 3'-Glyceryl-CPG resin at 4 μmol scale, using General Procedure **1** (2675 nmol, yield = 67%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 96\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). R_t (UPLC-MS) = 3.72 min. UPLC-MS(-) m/z calcd for $\text{C}_{107}\text{H}_{140}\text{N}_{43}\text{O}_{66}\text{P}_{11}$ 3425.21, m/z obsd.: 3425.22.

dODN2 (85)



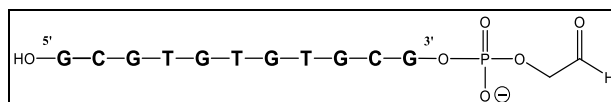
Oligonucleotide **85** was obtained from automated synthesis using commercially available 3'-Glyceryl-CPG resin at 4 μmol scale, using General Procedure **1** (3592 nmol, yield = 89%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 101\,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). R_t (UPLC-MS) = 4.02 min. UPLC-MS(-) m/z calcd for $\text{C}_{111}\text{H}_{143}\text{N}_{42}\text{O}_{72}\text{P}_{11}$ 3558.27, m/z obsd.: 3559.02.

aODN1 (86)



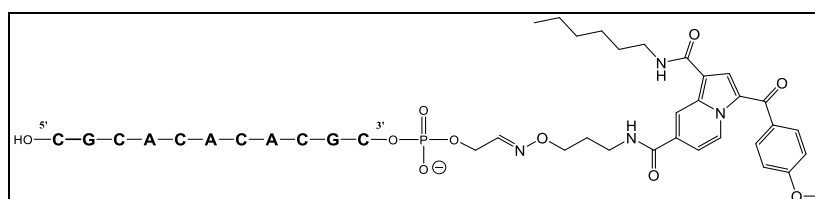
Oligonucleotide **86** was obtained from **84** using General Procedure **1.a** (quantitative yield, $\epsilon_{260\text{nm}} = 96\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). R_t (UPLC-MS) = 4.10 min. UPLC-MS(-) m/z calcd for $\text{C}_{106}\text{H}_{136}\text{N}_{43}\text{O}_{65}\text{P}_{11}$ 3393.17, m/z obsd.: 3393.69.

aODN2 (87)



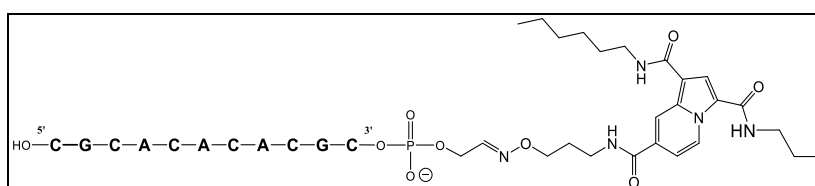
Oligonucleotide **87** was obtained from **85** using General Procedure **1.a** (quantitative yield, $\epsilon_{260\text{nm}} = 101\,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). R_t (UPLC-MS) = 4.15 min. UPLC-MS(-) m/z calcd for $\text{C}_{110}\text{H}_{139}\text{N}_{42}\text{O}_{71}\text{P}_{11}$ 3526.23, m/z obsd.: 3526.67.

ODN1-F1 (88)



Conjugate **88** was obtained from oligonucleotide **86** (687 nmol, 1 eq) and indolizine **81b** (2748 nmol, 4 eq) using General Procedure **1.b** (174 nmol, yield = 25%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 96\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). R_t (UPLC-MS) = 11.13 min. R_t (RP-HPLC, Gradient II) = 17.11 min. UPLC-ESI MS (-) m/z calcd for $\text{C}_{133}\text{H}_{168}\text{N}_{47}\text{O}_{69}\text{P}_{11}$ 3869.74, m/z obsd.: 3869.08. HRMS $[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$ m/z calcd for $\text{C}_{133}\text{H}_{165}\text{N}_{47}\text{O}_{69}\text{P}_{11}$ 1288.26591, m/z obsd.: 1288.26528.

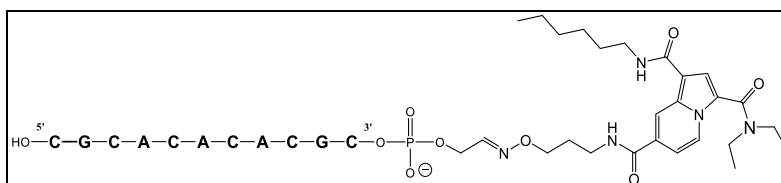
ODN1-F2 (89)



Conjugate **89** was obtained from oligonucleotide **86** (660 nmol, 1 eq) and indolizine **81g** (2640 nmol, 4 eq) using General Procedure **1.b** (158 nmol, yield = 24%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 96\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). R_t (UPLC-MS) = 10.20 min. R_t (RP-HPLC, Gradient II) = 17.68 min. UPLC-ESI MS (-) m/z calcd for

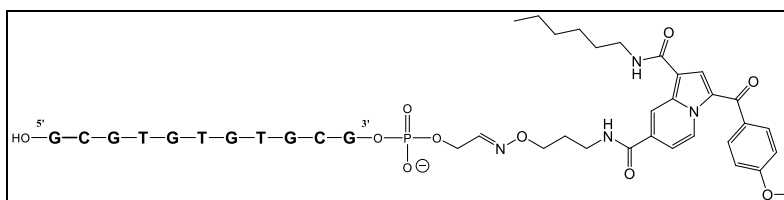
C₁₂₉H₁₆₉N₄₈O₆₈P₁₁ 3820.71, m/z obsd.: 3819.92. **HRMS [M-3H]³⁻** m/z calcd for C₁₂₉H₁₆₆N₄₈O₆₈P₁₁ 1271.93791, m/z obsd.: 1271.93797.

ODN1-F3 (90)



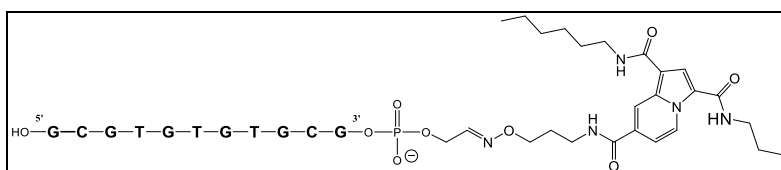
Conjugate **90** was obtained from oligonucleotide **86** (687 nmol, 1 eq) and indolizine **81h** (2748 nmol, 4 eq) using General Procedure **1.b** (125 nmol, yield = 18%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 96\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). **R_t** (**UPLC-MS**) = 11.10 min. **R_t** (**RP-HPLC**, Gradient II) = 18.02 min. **UPLC-ESI MS (-)** m/z calcd for C₁₃₀H₁₇₁N₄₈O₆₈P₁₁ 3834.73, m/z obsd.: 3833.94. **HRMS [M-3H]³⁻** m/z calcd for C₁₃₀H₁₆₈N₄₈O₆₈P₁₁ 1276.60979, m/z obsd.: 1276.60988.

ODN2-F1 (91)



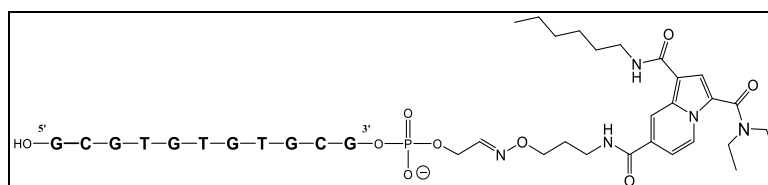
Conjugate **91** was obtained from oligonucleotide **87** (705 nmol, 1 eq) and indolizine **81b** (2818 nmol, 4 eq) using General Procedure **1.b** (182 nmol, yield = 26%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 101\,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). **R_t** (**UPLC-MS**) = 11.22 min. **R_t** (**RP-HPLC**, Gradient II) = 16.03 min. **UPLC-ESI MS (-)** m/z calcd for C₁₃₇H₁₇₁N₄₆O₇₅P₁₁ 4002.50, m/z obsd.: 3869.08. **HRMS [M-3H]³⁻** m/z calcd for C₁₃₇H₁₆₈N₄₆O₇₅P₁₁ 1332.59588, m/z obsd.: 1332.59533

ODN2-F2 (92)



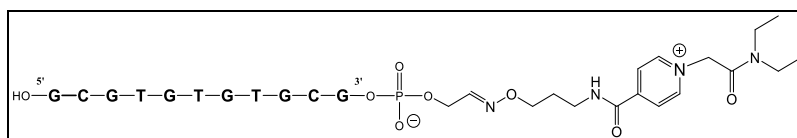
Conjugate **92** was obtained from oligonucleotide **87** (898 nmol, 1 eq) and indolizine **81b** (3595 nmol, 4 eq) using General Procedure **1.b** (176 nmol, yield = 20%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 101\,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). **R_t** (**UPLC-MS**) = 11.10 min. **R_t** (**RP-HPLC**, Gradient II) = 16.43 min. **UPLC-ESI MS (-)** m/z calcd for C₁₃₃H₁₇₂N₄₇O₇₄P₁₁ 3953.76, m/z obsd.: 3952.93. **HRMS [M-3H]³⁻** m/z calcd for C₁₃₃H₁₆₉N₄₇O₇₄P₁₁ 1316.26787, m/z obsd.: 1316.26849

ODN2-F3 (93)



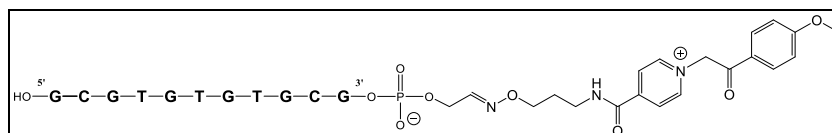
Conjugate **93** was obtained from oligonucleotide **87** (705 nmol, 1 eq) and indolizine **81b** (2818 nmol, 4 eq) using General Procedure **1.b** (207 nmol, yield = 29%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 101\,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). R_t (UPLC-MS) = 11.10 min. R_t (RP-HPLC, Gradient II) = 16.65 min. UPLC-ESI MS (-) m/z calcd for $\text{C}_{134}\text{H}_{174}\text{N}_{47}\text{O}_{74}\text{P}_{11}$ 3966.84, m/z obsd.: 3966.77. HRMS $[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$ m/z calcd for $\text{C}_{134}\text{H}_{171}\text{N}_{47}\text{O}_{74}\text{P}_{11}$ 1320.93975, m/z obsd.: 1320.93954.

ODN2-P1 (94)



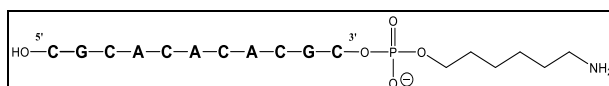
Conjugate **94** was obtained from oligonucleotide **87** (580 nmol, 1 eq) and pyridinium salt **80h** (1160 nmol, 2 eq) using General Procedure **1.b** (254 nmol, yield = 44%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 101\,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). R_t (UPLC-MS) = 6.32 min. R_t (RP-HPLC, Gradient I) = 17.21 min. UPLC-ESI MS (-) m/z calcd for $\text{C}_{125}\text{H}_{160}\text{N}_{46}\text{O}_{73}\text{P}_{11}$ 3815.58, m/z obsd.: 3815.44.

ODN2-P2 (95)



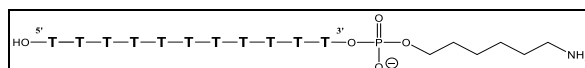
Conjugate **95** was obtained from oligonucleotide **87** (580 nmol, 1 eq) and pyridinium salt **80b** (1160 nmol, 2 eq) using General Procedure **1.b** (254 nmol, yield = 30%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 101\,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). R_t (UPLC-MS) = 5.67 min. R_t (RP-HPLC, Gradient I) = 17.56 min. UPLC-ESI MS (-) m/z calcd for $\text{C}_{128}\text{H}_{159}\text{N}_{45}\text{O}_{74}\text{P}_{11}$ 3852.59, m/z obsd.: 3852.87.

ODN1-C₆NH₂ (96)



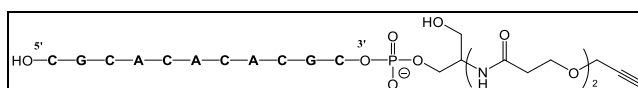
Oligonucleotide **96** was obtained from automated synthesis using commercially available 3'-PT-Amino-Modifier C6 CPG resin at 1 μmol scale, using General Procedure **1** (828 nmol, yield = 83%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 96\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). R_t (UPLC-MS) = 7.85 min. UPLC-MS(-) m/z calcd for $\text{C}_{110}\text{H}_{147}\text{N}_{44}\text{O}_{64}\text{P}_{11}$ 3448.67, m/z obsd.: 3447.96.

ODN3-C₆NH₂ (100)



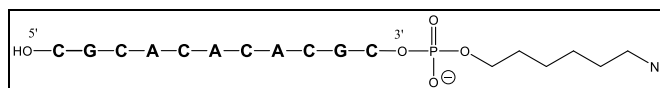
Oligonucleotide **100** was obtained from automated synthesis using commercially available 3'-PT-Amino-Modifier C6 CPG resin at 1 μmol scale, using General Procedure **1** (746 nmol, yield = 75%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 89\,700\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). R_t (UPLC-MS) = 5.30 min. UPLC-MS(-) m/z calcd for $\text{C}_{116}\text{H}_{158}\text{N}_{23}\text{O}_{78}\text{P}_{11}$ 3461.62, m/z obsd.: 3462.04.

ODN1-Alk (118)



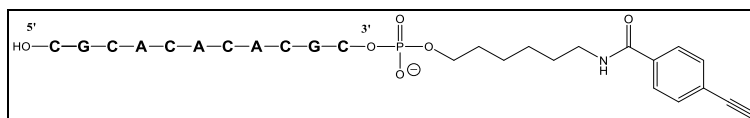
Oligonucleotide **118** was obtained from automated synthesis using commercially available 3'-Alkyne-Modifier Serinol CPG resin at 1 μ mol scale, using General Procedure **1** (361 nmol, yield = 36%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 96\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). R_t (UPLC-MS) = 4.47 min. UPLC-MS(-) m/z calcd for $\text{C}_{116}\text{H}_{152}\text{N}_{45}\text{O}_{68}\text{P}_{11}$ 3605.41, m/z obsd.: 3605.74.

ODN1-N₃ (120)



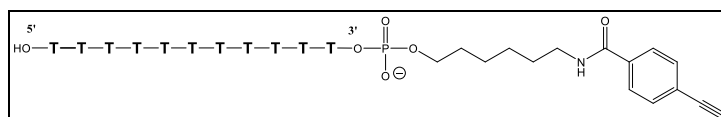
Oligonucleotide **96** (100 nmol, 1 eq) is solubilized in a solution of NaHCO_3 50 mM (400 μ L). CuSO_4 (0.14 mg, 560 nmol, 5.6 eq) is added followed by imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride (0.55 mg, 2200 nmol, 22 eq) solubilized in 50 μ L of MeOH/ H_2O . The mixture is stirred at room temperature for 18 hours. The oligonucleotide is purified by SEC and RP-HPLC to generate **120** in 91% yield (91 nmol, $\epsilon_{260\text{nm}} = 96\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). R_t (UPLC-MS) = 4.02 min. R_t (RP-HPLC, Gradient I) = 16.87 min. UPLC-MS(-) m/z calcd for $\text{C}_{110}\text{H}_{145}\text{N}_{46}\text{O}_{64}\text{P}_{11}$ 3476.30, m/z obsd.: 3477.04.

ODN1-Alk (126)



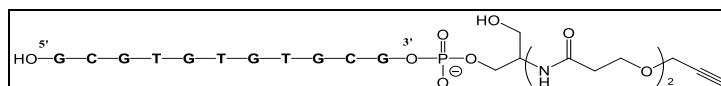
Oligonucleotide **96** (444 nmol, 1 eq) is solubilized in 600 μ L of MOPS buffer (0.1M, pH 8). 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-ethynylbenzoate **125** (44 μ mol, 100 eq) solubilized in 100 μ L of DMSO are added to the oligonucleotide. The reaction mixture is stirred at 25°C for 18 hours. The oligonucleotide is purified by SEC and RP-HPLC to generate **126** in 87% yield (386 nmol, $\epsilon_{260\text{nm}} = 96\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). R_t (UPLC-MS) = 6.53 min. R_t (RP-HPLC, Gradient I) = 17.67 min. UPLC-MS(-) m/z calcd for $\text{C}_{119}\text{H}_{151}\text{N}_{44}\text{O}_{65}\text{P}_{11}$ 3578.43, m/z obsd.: 3578.67.

ODN3-Alk (127)



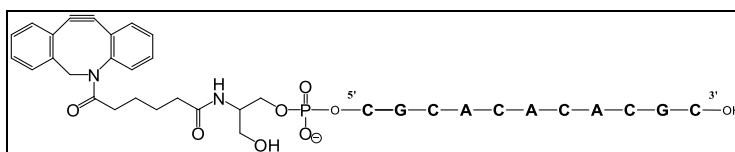
Oligonucleotide **100** (373 nmol, 1 eq) is solubilized in 600 μ L of MOPS buffer (0.1M, pH 8). 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-ethynylbenzoate **125** (37 μ mol, 100 eq) solubilized in 100 μ L of DMSO are added to the oligonucleotide. The reaction mixture is stirred at 25°C for 18 hours. The oligonucleotide is purified by SEC and RP-HPLC to generate **127** in 37% yield (137 nmol, $\epsilon_{260\text{nm}} = 89\,700\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). R_t (UPLC-MS) = 7.25 min. R_t (RP-HPLC, Gradient I) = 18.07 min. UPLC-MS(-) m/z calcd for $\text{C}_{125}\text{H}_{162}\text{N}_{23}\text{O}_{79}\text{P}_{11}$ 3591.44, m/z obsd.: 3590.98.

ODN2-Alk (175)



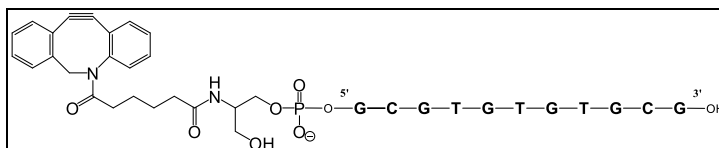
Oligonucleotide **175** was obtained from automated synthesis using commercially available 3'-Alkyne-Modifier Serinol CPG resin at a 2 μ mol scale, using General Procedure **1** (1384 nmol, yield = 69%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 101\,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). R_t (UPLC-MS) = 4.65 min. UPLC-MS(-) m/z calcd for $\text{C}_{120}\text{H}_{155}\text{N}_{44}\text{O}_{74}\text{P}_{11}$ 3736.68, m/z obsd.: 3736.21.

ODN1-Cyclooctyne (176)



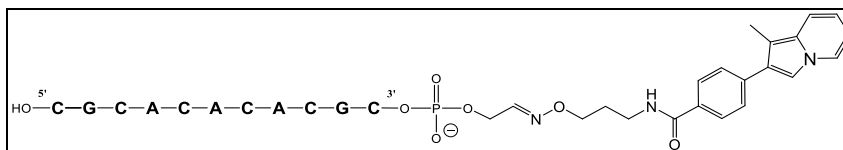
Oligonucleotide **176** was obtained from automated synthesis using commercially available 3'C- CPG resin at 2 μmol scale, using General Procedure **1** (985 nmol, yield = 49%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 96\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). **R_t** (UPLC-MS, Gradient I) = 8.50 min. UPLC-MS(-) m/z calcd for $\text{C}_{128}\text{H}_{157}\text{N}_{45}\text{O}_{67}\text{P}_{11}$ 3738.58, m/z obsd.: 3739.29

ODN2-Cyclooctyne (177)



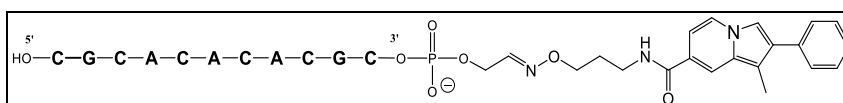
Oligonucleotide **177** was obtained from automated synthesis using commercially available 3'G- CPG resin at 1 μmol scale, using General Procedure **1** (776 nmol, yield = 78%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 101\,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). **R_t** (UPLC-MS, Gradient I) = 8.33 min. UPLC-MS(-) m/z calcd for $\text{C}_{132}\text{H}_{161}\text{N}_{44}\text{O}_{73}\text{P}_{11}$ 3872.65, m/z obsd.: 3872.87.

ODN 185



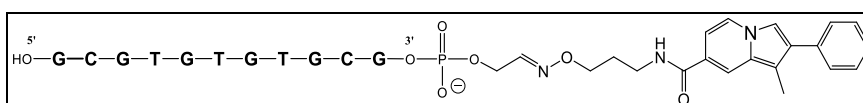
Conjugate **185** was obtained from oligonucleotide **86** (150 nmol, 1 eq) and indolizine **180** (2962 nmol, 20 eq) using General Procedure **1.b** (31 nmol, yield = 21%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 96\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). **R_t** (UPLC-MS) = 8.65 min. **R_t** (RP-HPLC, Gradient II) = 15.68 min. UPLC-ESI MS (-) m/z calcd for $\text{C}_{125}\text{H}_{155}\text{N}_{46}\text{O}_{66}\text{P}_{11}$ 3698.54, m/z obsd.: 3698.79.

ODN 186

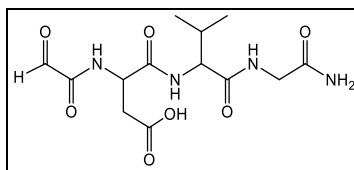


Conjugate **186** was obtained from oligonucleotide **86** (670 nmol, 1 eq) and indolizine **184** (2040 nmol, 3 eq) using General Procedure **1.b** (653 nmol, yield = 97%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 96\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). **R_t** (UPLC-MS) = 8.77 min. **R_t** (RP-HPLC, Gradient II) = 15.77 min. UPLC-ESI MS (-) m/z calcd for $\text{C}_{125}\text{H}_{155}\text{N}_{46}\text{O}_{66}\text{P}_{11}$ 3698.54, m/z obsd.: 3698.10.

ODN 187



Conjugate **187** was obtained from oligonucleotide **87** (385 nmol, 1 eq) and indolizine **184** (2962 nmol, 8 eq) using General Procedure **1.b** (60 nmol, yield = 15%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 101\,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). **R_t** (UPLC-MS)



135 (81 mg, 0.21 mmol, 1 eq) and sodium periodate (460 mg, 2.15 mmol, 10 eq) are solubilized in 5 mL of 1% TFA aqueous solution. After 2 hours, the reaction is stopped by purification to afford 62 mg of white solid were isolated (83%). **R_t** (**UPLC-MS**) = 0.62 min. **R_t** (**RP-HPLC**, Gradient I) = 7.80 min **UPLC-MS(-)** m/z calcd for C₁₃H₂₀N₄O₇ 344.32, m/z obsd.: 344.76

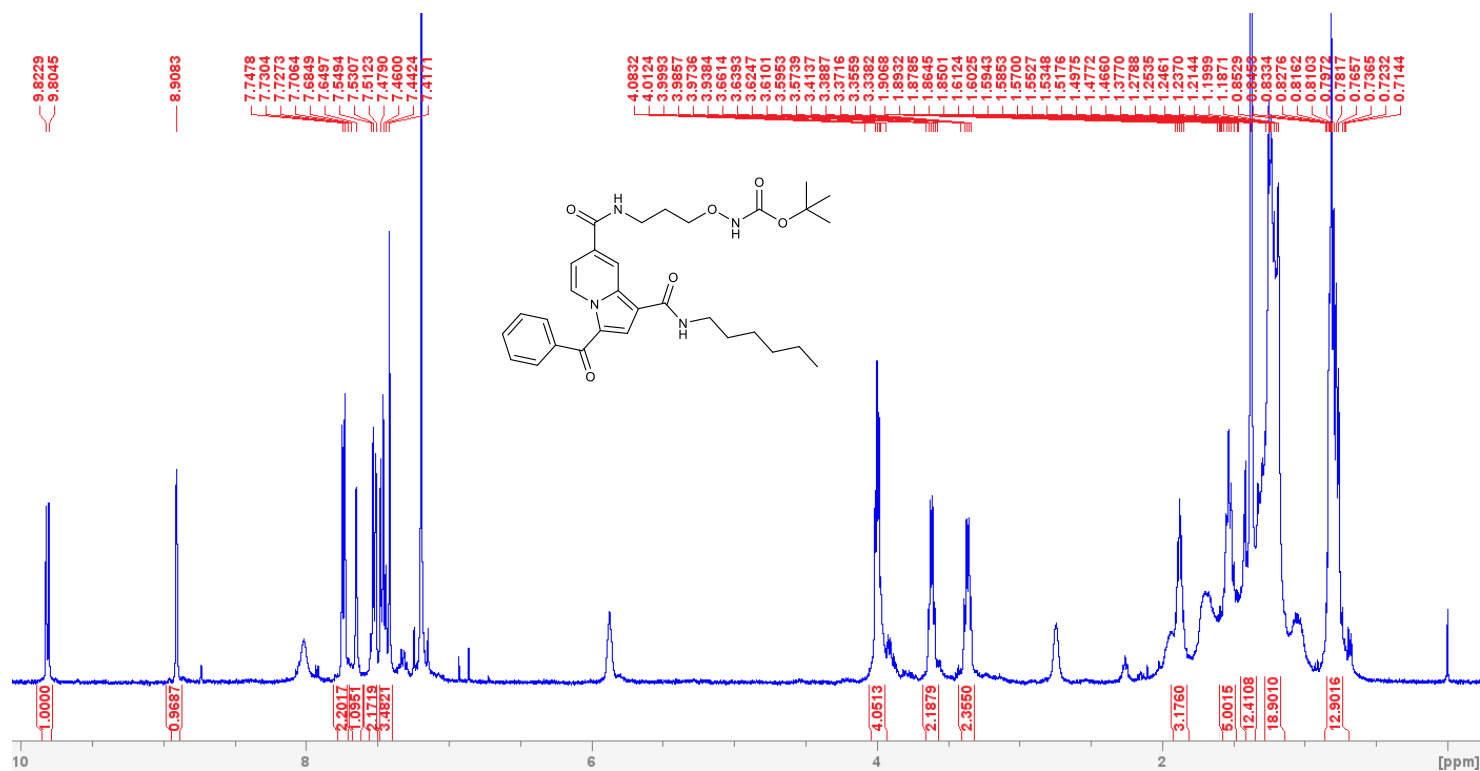
C. General procedure for Circular Dichroism studies

The CD melting studies were recorded on a Jasco J-810 spectropolarimeter using a 1 mm quartz cuvette. The DNA duplex were solubilized in a Tris-HCl Buffer (10 mM, pH 7.5, 20 mM NaCl). A step of annealing was applied by heating the sample at 90°C for 10 minutes and cooling it to room temperature overnight. Dichroism readings were collected at 5°C intervals from 10°C to 95°C with a ramp rate of 2°C per minute. Each CD spectrum was an average of three scans with the buffer blank subtracted, which was also averaged from three scans. The concentration used to measure CD spectra was of the micromolar range (7 μM). Melting temperatures (*T_m*) were obtained from the maximum of the second derivative dA/dT plots (where *A* is absorbance and *T* is temperature) at 260 nm. Absorbance values are also used for the calculation of thermodynamic parameters.

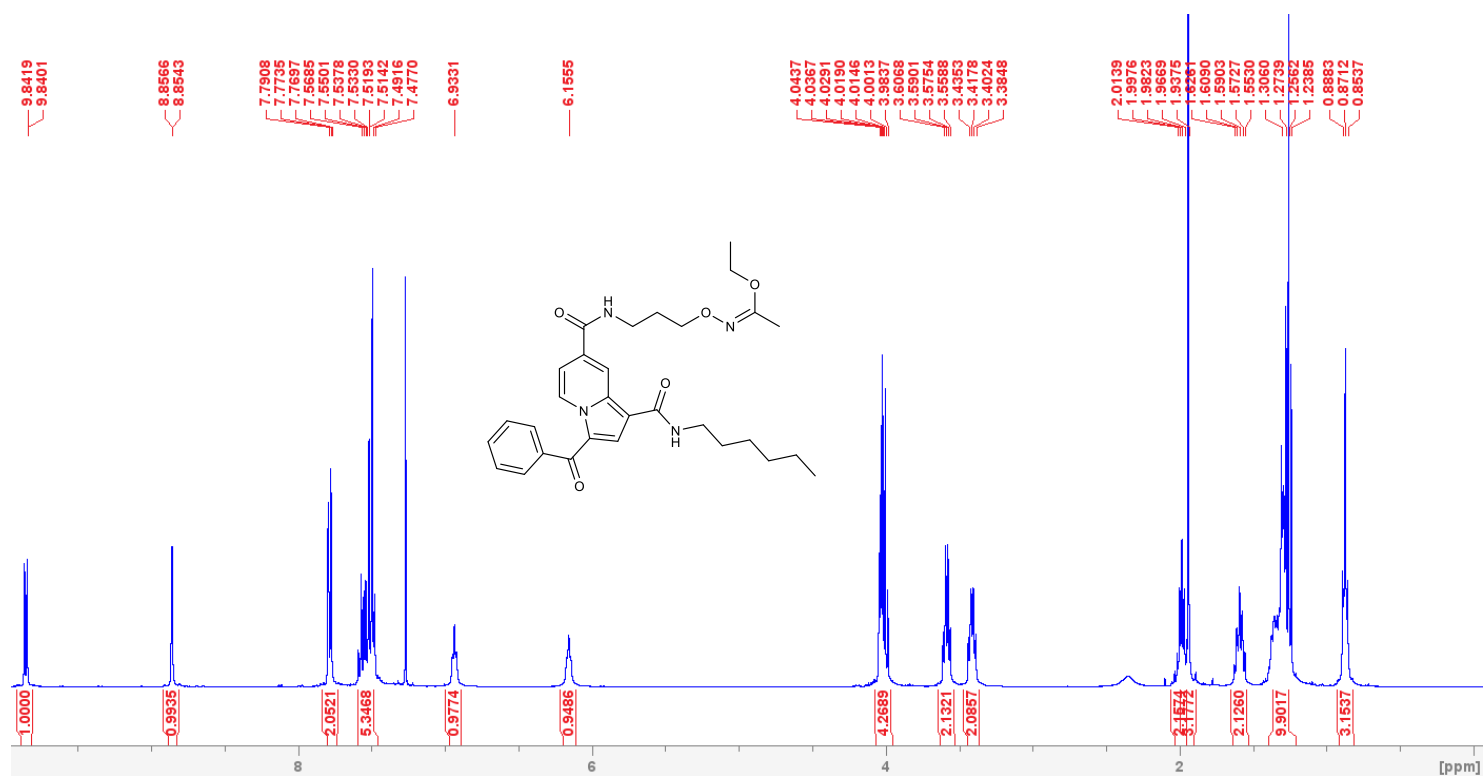
References

- (1) Würth, C.; Grabolle, M.; Pauli, J.; Spieles, M.; Resch-Genger, U. Relative and Absolute Determination of Fluorescence Quantum Yields of Transparent Samples. *Nat. Protoc.* **2013**, 8 (8), 1535–1550. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.087>.
- (2) Ellis, A.; Gooch, D.; Twyman, L. J. Bimolecular Catalysis and Turnover from a Macromolecular Host System. *J. Org. Chem.* **2013**, 78 (11), 5364–5371. <https://doi.org/10.1021/jo400532r>.
- (3) Henderson, B. J.; Carper, D. J.; González-Cestari, T. F.; Yi, B.; Mahasenan, K.; Pavlovicz, R. E.; Dalefield, M. L.; Coleman, R. S.; Li, C.; McKay, D. B. Structure–Activity Relationship Studies of Sulfonylpiperazine Analogues as Novel Negative Allosteric Modulators of Human Neuronal Nicotinic Receptors. *J. Med. Chem.* **2011**, 54 (24), 8681–8692. <https://doi.org/10.1021/jm201294r>.
- (4) Cappelli, A.; Bini, G.; Valenti, S.; Giuliani, G.; Paolino, M.; Anzini, M.; Vomero, S.; Giorgi, G.; Giordani, A.; Stasi, L. P.; Makovec, F.; Ghelardini, C.; Di Cesare Mannelli, L.; Concas, A.; Porcu, P.; Biggio, G. Synthesis and Structure–Activity Relationship Studies in Translocator Protein Ligands Based on a Pyrazolo[3,4-b]Quinoline Scaffold. *J. Med. Chem.* **2011**, 54 (20), 7165–7175. <https://doi.org/10.1021/jm200770f>.
- (5) Barr, L.; Lincoln, S. F.; Easton, C. J. A Cyclodextrin Molecular Reactor for the Regioselective Synthesis of 1,5-Disubstituted-1,2,3-Triazoles. *Supramol. Chem.* **2005**, 17 (7), 547–555. <https://doi.org/10.1080/10610270500329131>.
- (6) Shi, Y.; Pierce, J. G. Synthesis of the 5,6-Dihydroxymorpholin-3-One Fragment of Monanchocidin A. *Org. Lett.* **2015**, 17 (4), 968–971. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b00069>.
- (7) Pandey, S. N.; Sengupta, A.; Bera, R.; Ali, S.; Yadav, S. A Sugar-Derived Ligand for Room Temperature Aerial Oxidation or Non-Aqueous Markovnikov Hydration of Styrenes Using a Preformed or in Situ Generated Co Complex. *Catal. Sci. Technol.* **2024**, 14 (16), 4487–4495. <https://doi.org/10.1039/D4CY00522H>.

Annexe



Annexe I : Spectre RMN ¹H (CDCl₃) de l'indolizine **70a**



Annexe II : Spectre RMN ¹H (CDCl₃) de l'indolizine **81a**